

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N 4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Živočišné biotechnologie

Katedra aplikované chemie

Vedoucí katedry: prof. Ing. Martin Křížek, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**SLEDOVÁNÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ A
POLYAMINŮ BĚHEM SKLADOVÁNÍ A
TEPELNÝCH ÚPRAV SKOPOVÉHO MASA.**

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

Konzultant diplomové práce: prof. Ing. Pavel Kalač, CSc.

Autor: Bc. Lucie Tothová

České Budějovice, duben 2012

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 10. dubna 2012

Podpis:

Práce byla vypracována na katedře aplikované chemie Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích s finanční podporou výzkumného záměru MSM 6007665806 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

Děkuji své školitelce Ing. Evě Dadákové, Ph.D za spolupráci, odborné vedení po celou dobu mé diplomové práce a poskytnuté materiály, dále ji děkuji za cenné připomínky k jejímu zdárnému dokončení. Velký dík patří také Ing. Evě Samkové, Ph.D za pomoc se zpracováním. Děkuji i konzultantovi prof. Ing. Pavlu Kalači CSc. za přečtení celé práce a neocenitelné rady k úpravám.

Dále děkuji celé rodině a všem svým blízkým za podporu v průběhu celého studia.

SOUHRN

Cílem diplomové práce bylo zjistit obsah biogenních aminů a polyaminů, přesněji putrescinu (PUT), spermidinu (SPD) a sperminu (SPM) ve skopovém mase během skladování a tepelných úprav.

Maso jatečných zvířat je bohaté na tyto aminy, ale bohužel údaje o obsahu ve skopovém mase ať už v jatečných tělech, tak i během skladování či tepelných úprav v literatuře stále chybějí.

Poskytnuté vzorky byly od drobných chovatelů a zvířata byla hybridy několika plemen. Odebírány byly vzorky z kýty a ze hřbetu. Vzorky ze skopového hřbetu byly zmrazeny a sledovány po dobu 0 až 6 měsíců. Vzorky kýty se zchladily a zabalily do tří různých druhů obalů pro další skladování. Jednalo se o typ zabalení do polyethylenového sáčku (PE), vakuově balené (VP) a balení do ochranné atmosféry (MAP). Všechny vzorky byly analyzovány ve dnech a zároveň i na počáteční koncentraci v den 0. U vzorků mražených a chlazených skladovaných v PE a VP byl pozorován pokles všech sledovaných aminů. Pouze u balení v MAP došlo u SPD k mírnému nárůstu nad počáteční obsah. Z tepelných úprav byly provedeny běžné kuchyňské úpravy, které se provádějí ve střední Evropě (vaření, dušení a pečení) a stanovovány v předem určené dny. Nejvyšší pokles aminů byl u pečení a pak následovalo vaření a dušení.

Zjištěné údaje jsou srovnatelné s publikovanými údaji pro masa vepřová a hovězí skladovaná za stejných či podobných podmínek. Domnívám se, že mohou pomoci rozšířit údaje v literatuře.

Klíčová slova: skopové maso, biogenní aminy, polyaminy, skladování, UPLC

SUMMARY

The aim of this thesis was to determine the content of biogenic amines and polyamines, specifically putrescine (PUT), spermidine (SPD) and spermine (SPM) in mutton meat during storage and heat treatment.

The meat of slaughter animals is rich in these amines but, unfortunately, data on the content of mutton meat whether in slaughter bodies as well as during storage or heat treatments in the literature are still missing.

The samples were provided by small farmers and the animals were hybrids of several breeds. The samples were taken from the thigh and back. The samples of lamb meat were frozen and the ones were watched from 0-6 months. The samples of leg were cooled and packed into three different types of packaging. It was the type of packaging in a polyethylene bag (PE), vacuum packed (VP) and controlled atmosphere packaging (MAP). All the samples were analyzed in the days and also on the initial concentration at day 0. For frozen and cooled (chilled) samples which were stored in PE and VP was observed the decrease in all monitored amines. Only the packaging in MAP occurred in the SPD to a slight increase over the initial content. From heat treatments were performed usual preparations of the meals which are made in central Europe and the meals were cooked on particular days. The highest decrease was measured in roasted meat, then stewed and cooked meat in this order.

Reported data are comparable to published data for pork and beef meat stored under the same or similar conditions. I think that these data can help to extend the data in the literature.

Key words: mutton meat, biogenic amines, polyamines, storage, UPLC

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AdoMetDC	adenosylmethionedekarboxyláza
AE	aerobní skladování
AGM	agmatin
Arg	arginin
AMK	aminokyseliny
BA	biogenní aminy
BAI	biogenní aminový index
CAD	kadaverin
CZE	kapilární zónová elektroforéza
GC	plynová chromatografie
HIM	histamin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	iontová chromatografie
LAB	bakterie mléčného kvašení
LOD	detekční limit
MAP	baleno v upravené atmosféře
MECC	elektrokinetická kapilární chromatografie
Met	metionin
ODC	ornithindekarboxyláza
Ort	ornithin
PA	polyaminy
PE	polyethylenový obal
PEA	fenylethylamin
PUT	putrescin
S.D.	směrodatná odchylka
SPD	spermidin
SPM	spermin
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TYM	tyramin
TRM	tryptamin
UPLC	ultra výkonná kapalinová chromatografie
VP	vakuově baleno

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Literární přehled	10
2.1 Aminy	10
2.1.1 Biogenní aminy	10
2.1.2 Vznik, vlastnosti a dělení BA	10
2.1.2 Polyaminy	10
2.1.3 Katabolismus a vznik polyaminů	12
2.1.4 Obsah polyaminů v potravinách.....	14
2.1.4.1 Obecné poznatky	14
2.1.4.2 Polyaminy v potravinách rostlinného původu.....	15
2.1.4.3 Polyaminy v mase, rybách a masných výrobcích.....	15
2.1.4.4 Polyaminy v mléce, mléčných výrobcích a ve vejcích.....	16
2.2 Vliv skladování a tepelného zpracování na potraviny	17
2.2.1 Hovězí maso.....	17
2.2.2 Vepřové maso.....	18
2.2.3 Vepřová játra.....	19
2.2.4 Vepřové ledviny a slezina.....	20
2.2.5 Kuřecí maso, játra a srdce.....	21
2.2.6 Ledviny, játra, slezina ze srnce a zajíce polního.....	22
2.3 Analytické metody	22
2.3.1 Kapalinová chromatografie (HPLC)	23
2.3.1.1 Využití metody HPLC pro stanovení BA a PA.....	23
2.3.2 Ultra výkonná kapalinová chromatografie (UPLC)	24
2.3.2.1 Využití metody UPLC pro stanovení BA a PA.....	24
2.3.3 Iontová chromatografie (IEC).....	24
2.3.5 Kapilární elektroforéza (CZE)	25
2.3.5.1 Využití CZE pro stanovení BA A PA.....	25
2.3.6 Elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC).....	25
3 Cíl práce	26
4 Experimentální část.....	27
4.1 Použité laboratorní pomůcky, chemikálie, přístroje a zařízení.....	27

4.2	Odběr vzorků.....	28
4.3	Skladovací podmínky	28
4.4	Kuchyňské úpravy.....	29
4.5	Analytický postup	29
4.5.1	Rozbor BA a PA metodou HPLC.....	30
4.6	Výsledky a diskuze	33
4.6.1	Mrazírenské úpravy	33
4.6.2	Chladírenské úpravy	39
4.6.3	Kuchyňské úpravy	52
5	Závěr	58
6	Použitá literatura	60

1 Úvod

Biogenní aminy (BA) a polyaminy (PA) jsou látky, které vznikají v potravinách dekarboxylací příslušné aminokyseliny (AMK), ale najdeme je i v rostlinách, živých organismech či mikrobiálních buňkách. Vznikají kromě dekarboxylace i působením mikrobiálních enzymů jako jsou bakterie hnilobné a také bakterie mléčného kvašení, ale i biosyntézou či fermentací (HALASZ ET AL., 1994; KRÍŽEK ET AL., 2004).

Aminy jsou skoro ve všech potravinách jako běžné produkty metabolismu. Nachází se ať už v sýrech, ovoci a zelenině, fermentovaných výrobcích, alkoholu např. vínu či pivu, tak i v masných výrobcích a rybách. Množství aminů je ovlivňováno: složením, teplotou skladování, zráním a balením (HALASZ ET AL., 1994; VELÍŠEK, 1999).

V mase a masných výrobcích má nejvyšší obsah spermin. Cílem diplomové práce bylo sledování vybraných aminů a to putrescinu (PUT), spermidinu (SPD) a sperminu (SPM) ve vzorcích skopového masa. Vzorky byly uchovávány při různých skladovacích podmínkách (chlazení, mražení a kuchyňské úpravy běžně prováděné ve středoevropské kuchyni) a pozorován jejich obsah v časovém období. Stanovení se provádělo pomocí kapalínové chromatografie na principu UPLC.

2 Literární přehled

2.1 Aminy

2.1.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy (BA) jako putrescin (PUT), kadaverin (CAD), spermidin (SPD), spermin (SPM), tryptamin (TRM), fenylethylamin (PEA), histamin (HIM) a tyramin (TYM) patří mezi nízkomolekulární bazické alifatické, aromatické nebo heterocyklické organické sloučeniny, které jsou nežádoucími produkty rozkladu bílkovin (MIAZAKI A YANG, 1958).

2.1.2 Vznik, vlastnosti a dělení BA

BA se vyskytují v některých potravinách přirozeně – vznikají biosyntézou v rostlinných a živočišných buňkách. Při kažení potravin se BA vytvářejí hlavně bakteriální dekarboxylací volných aminokyselin (AMK) za působení mikrobiálního enzymu. Z histidinu vzniká dekarboxylací produkt HIM, z lysinu CAD a z argininu (Arg) vzniká agmatin a dále PUT. Z PUT vzniká metylací S- adenosylmethioninem SPD a dále SPM. K jejich tvorbě přispívají i nevhodné podmínky skladování a nevhodné zacházení. Jejich účinek na zdraví člověka je škodlivý při zvýšeném příjmu (HALASZ ET AL., 1994; KRÍŽEK ET AL., 2004).

Některé BA mají významné biologické vlastnosti, jsou např. lokálními tkáňovými hormony a zároveň mají vliv na krevní tlak (HIM), fungují jako protoalkaloidy (hordenin a gramin) a jsou stavebními látkami, které se dále účastní biosyntézy dalších živočišných hormonů, auxinů, alkaloidů aj. (VELÍŠEK, 1999).

BA se dělí na dvě základní skupiny: monoaminy: HIM, TYM, PEA a TRM, diaminy: PUT a CAD a triamin: AGM, jsou hlavní složky této skupiny. Polyaminy, tvořící druhou skupinu, se nacházejí hlavně jako přirozené složky všech živých organismů, jak s pozitivním tak negativním účinkem na zdraví člověka (DADÁKOVÁ ET AL., 2009).

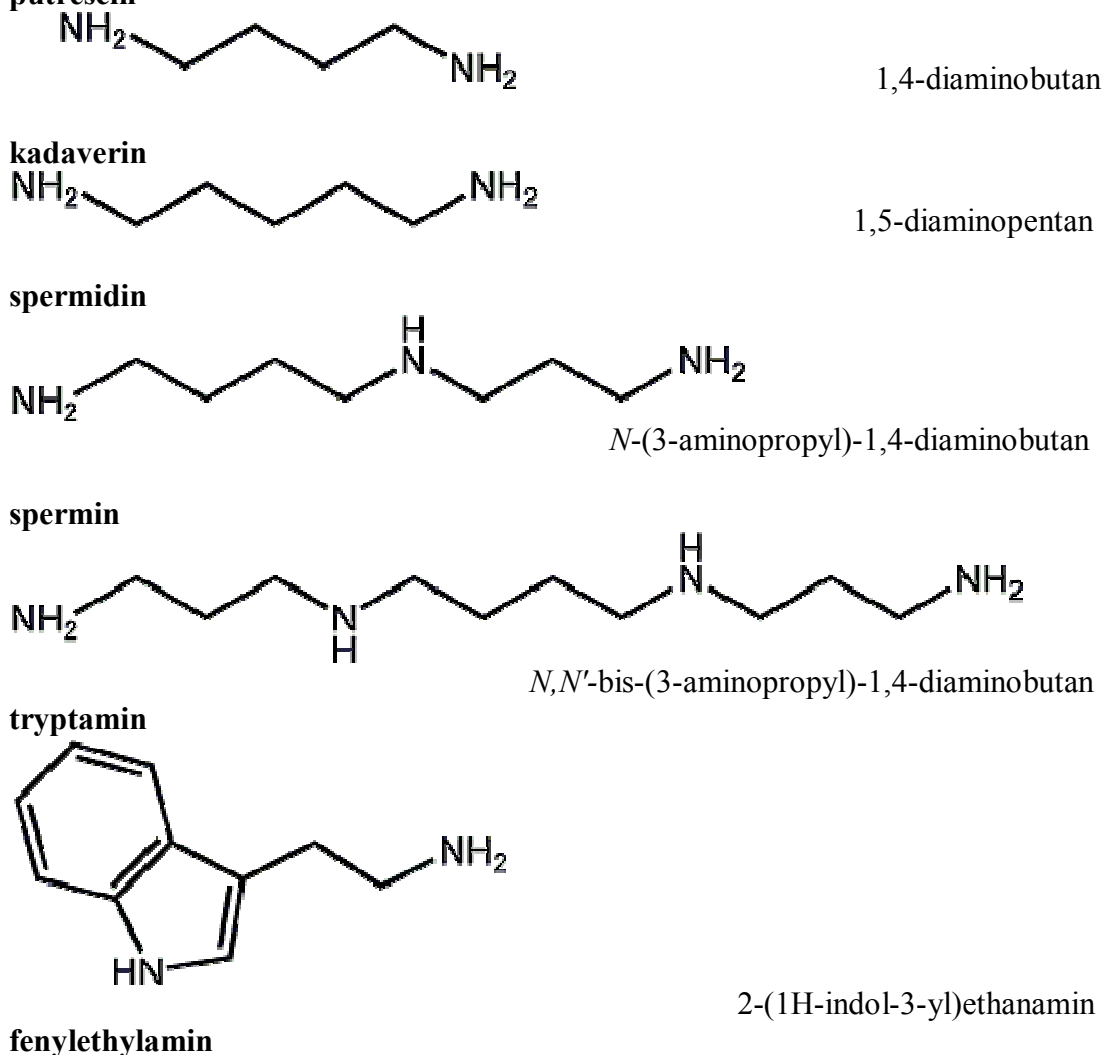
2.1.2 Polyaminy

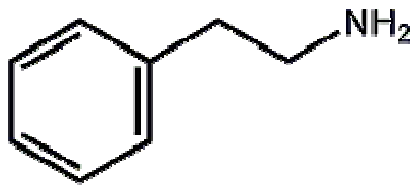
Polyaminy putrescin (PUT, 1,4-diaminobutan), spermidin (SPD, *N*-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan) a spermin (SPM, *N,N'*-bis(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan) začaly být vyčleňovány ze skupiny biogenních aminů jako jednotlivé polyaminy v devadesátých letech minulého století kvůli jejich podstatné roli při růstu

a funkci normálních buněk a také kvůli způsobu jejich tvorby. Putrescin, i když je svou strukturou diamin, je zařazen do skupiny polyaminů kvůli své roli jako prekursoru obou fyziologických („pravých“) polyaminů (PUT→SPD→SPM). Polyaminy (PA) jsou přítomny při dělení buněk a tak je o ně velký zájem při výzkumu nádorového bujení (BARACH, 2004; THOMAS A THOMAS, 2003).

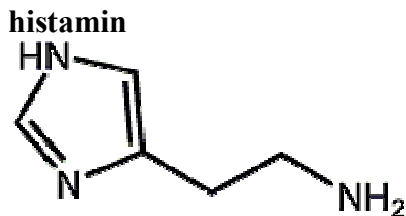
Jeden ze směrů výzkumu léčby rakoviny je omezit vstup polyaminů. Avšak polyaminy jsou účinné při hojení zranění a při růstu, dozrávání a regeneraci střevní sliznice (DELOYER, PEULEN A DANDRIFOSSE, 2005; PEULEN A DANDRIFOSSE, 2004). Jak endogenní, tak polyaminy získávané výživou se zúčastňují procesů hojení zranění, dozrávání a regenerace (BARDÓCZ, 1995).

Obr. 1: strukturní vzorce a systematické názvy BA a PA

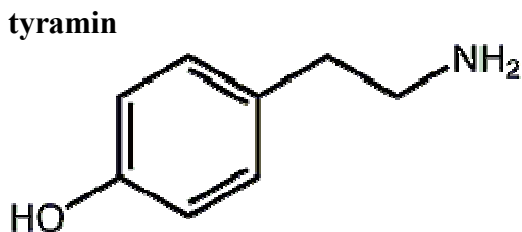




2-fenylethylamin



2-(4-imidazolyl)ethylamin



4-(2-aminoethyl)fenol

2.1.3 Katabolismus a vznik polyaminů

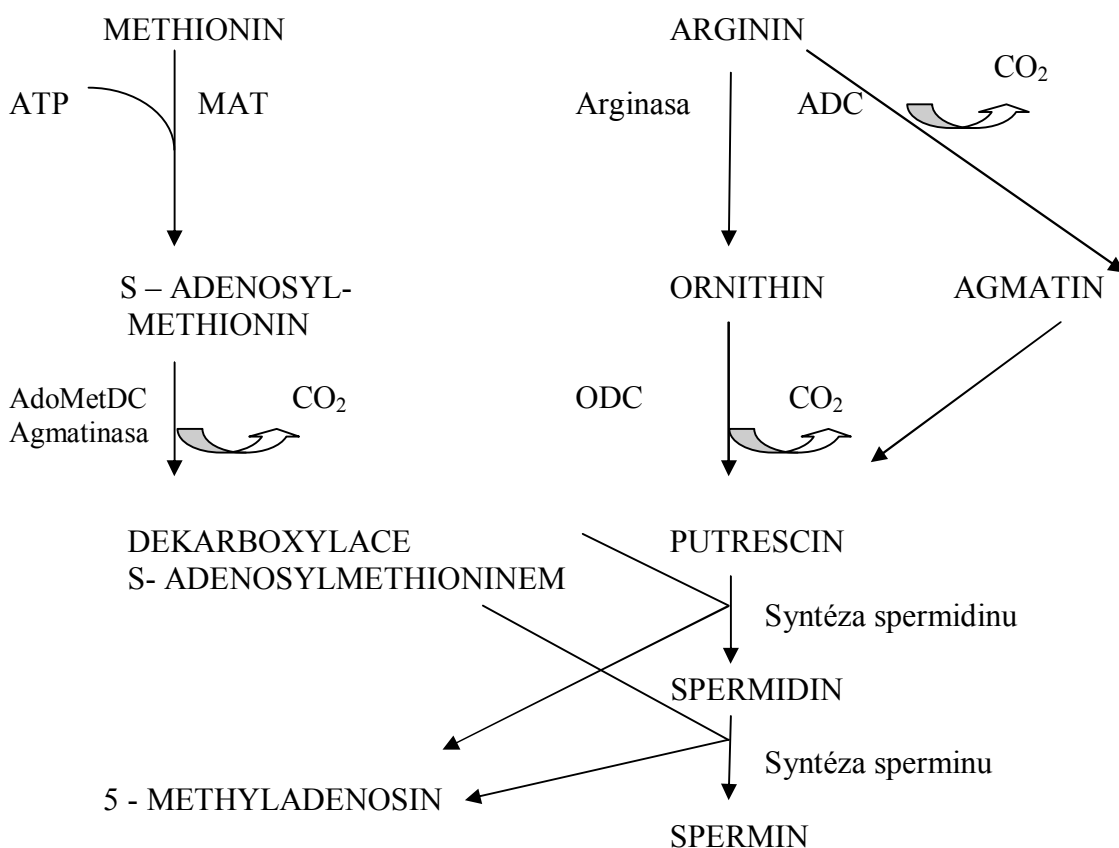
Polyaminy se odvozují jak *de novo* syntézou, tak absorpcí z mimobuněčných zdrojů. Úloha příjmu výživových polyaminů, hlavně toho neúčinnějšího, SPM, se zvyšuje u starších lidí s omezenou schopností vytvořit si je biosyntézou (LARQUÉ, SABATER-MOLINA A ZAMORA, 2007).

Hlavní role polyaminů pro zdraví (léčba zranění a růstu, obnova střevní sliznice, studie léčby Alzheimerovy choroby, podpora růstu vlasů, ochrana pokožky před škodlivým UV zářením a mnoho dalších) a nemoci, které mohou být způsobeny toxicitou aminů (bolest hlavy, otok obličeje, zvracení, nitrolebeční krvácení, neuronové poškození, selhání srdce a plic) byly nedávno publikovány (BECKER ET AL., 2001; HALASZ ET AL., 1994; MOINARD, CYNOBER a de BANDT, 2005; RODRÍGUEZ-CASO ET AL., 2006; TETI, VISALLI A McNAIR, 2002; WALLACE, FRASER A HUGES, 2003).

KALACĚ (2006) uvádí, že byly zjištěny tři zdroje polyaminů (PA):

- (a) biosyntéza v místě vzniku z argininu (Arg) přes ornitin (Ort) s ornithinovou dekarboxylázou (EC 4.1.1.17) jako klíčový enzym startující tvorby PUT,
- (b) syntéza a uvolnění z potravy pomocí gastrointestinální bakteriální flory,
- (c) přímo při přijímání potravy.

Schéma 1: Biosyntetický postup u savců (HILLARY A PEGG, 2003):



Biosyntéza u savců: je regulována aktivitou dvou klíčových enzymů, ornithindekarboxylázou (ODC) a S-adenosylmethionindekarboxylázou (AdoMetDC). Polyaminy se vytváří z aminokyselin metioninu (Met) a argininu (Arg). Hlavní postup při tvorbě PUT v buňkách savců je v důsledku aktivity ornithindekarboxylázy. Methionin poskytuje aminopropylové skupiny potřebné k přeměně PUT na vyšší PA. Syntéza probíhá pomocí dvou enzymů, spermidinsyntázy a sperminsyntázy (KALACĚ A KRAUSOVÁ, 2005).

Bylo opakovaně prokázáno, že výživa je důležitým zdrojem dodávajícím alespoň část požadovaného množství PA nezbytného k udržení normálního metabolismu. Denní požadované množství však ještě nebylo stanoveno (KALAČ, 2006).

Nicméně, každý orgán těla vyžaduje PA ke svému růstu, obnově a metabolismu a množství PA závisí na fyziologickém a patologickém stavu jedince (MOINARD, CYNOBER a de BANDT, 2005).

Požadavek na množství polyaminů je vyšší během období intenzivního růstu mladých lidí a také během dospívání kvůli snižování aktivity enzymů podílejících se na biosyntézách polyaminů. U orgánů s vysokou obměnou buněk, mezi které patří zažívací trakt, slinivka břišní nebo slezina, bylo zjištěno, že jsou obzvláště závislé na výživových polyaminech. Požadavek na výživové PA stoupá během hojení zranění, pooperačních stavů nebo regeneraci a vyrovnávání růstu některých orgánů (KALAČ, 2006).

Z tohoto důvodu potřebují odborníci na výživu informace o obsahu PA v potravinách, práce zabývající se selektivně PA v potravinách pojednávají o červeném masu a masných výrobcích, které byly zahrnuty do hlavních výživových zdrojů SPM, publikovali např. (BARDÓCZ ET AL., 1993; BARDÓCZ ET AL., 1995; ELIASSEN ET AL., 2002).

2.1.4 Obsah polyaminů v potravinách

2.1.4.1 Obecné poznatky

Polyaminy existují v buňkách jak ve volné, tak vázané formě (BAGNI A TASSONI, 2001).

Předpokládá se, že schopnost růstu buněk závisí na úrovni koncentraci volného polyaminu, zatímco vázaná forma je cesta k regulaci buněčného obsahu volných PA. Ve vázané formě jsou PA kovalentně připojeny k partnerské molekule (např. rostlinné fenoly nebo membránové fosfolipidy) a pro účely analýzy se dají uvolnit hydrolýzou pomocí silné kyseliny (KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005).

2.1.4.2 Polyaminy v potravinách rostlinného původu

Putrescin, spermin a spermidin obecně se vyskytující v rostlinných orgánech, hrají roli v široké řadě procesů, počínaje od zahájení vývoje orgánů až k ochraně proti stresu (BOUCHEREAU ET AL., 1999).

Hlavním biogenním aminem obsaženým v ovoci a zelenině bývá tyramin (TYM), v menších množstvích se pak vyskytují další BA, které se často nacházejí jako konjugáty BA se skořicovými kyselinami či mastnými kyselinami (MK). Tyto deriváty BA jsou řazeny mezi protoalkaloidy (VELÍŠEK, 1999).

Některé z testovaných potravin mají zřetelně vysokou hladinu putrescinu (nad 40 mg.kg⁻¹), hlavně pomeranče, pomerančová šťáva, mandarinky, grapefruitová šťáva. Citrusové plody *Citrus reticulata* (americké plody podobné mandarinkám) obsahují synefrit (méně běžný BA odvozený od TYM) (KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005; VELÍŠEK, 1999).

V listech špenátu se vyskytuje histamin (HIM) v množství kolem 200 – 400 mg.kg⁻¹, banány obsahují jako hlavní biogenní amin TYM, v klíčícím ječmeni je derivát tyraminu hordenin (VELÍŠEK, 1999).

Vyrobené potraviny jako kyselé zelí, kečup, mražený zelený hrášek a kvašené sojové výrobky mají stejně jako citrusové plody vysokou hladinu PUT. Obsah spermidinu v potravinách rostlinného původu je běžně vyšší než obsah sperminu. Luštěniny, zejména sojové boby, hrušky, květák a brokolice patří k potravinám s vysokým obsahem spermidinu, obvykle nad 30 mg.kg⁻¹, mají také vysoký obsah sperminu (KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005).

2.1.4.3 Polyaminy v mase, rybách a masných výrobcích

Na rozdíl od potravin rostlinného původu je nízká hladina putrescinu typická pro dobře ošetřené potraviny živočišného původu. Rybí omáčky, tresčí jikry a konzervované krabí maso jsou zaznamenány výjimky (KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005).

Vysoký obsah SPM, obvykle mezi 20 - 60 mg.kg⁻¹, je obvyklý v mase a masných výrobcích z teplokrevných zvířat. Nižší obsah SPD, běžně pod 10 mg.kg⁻¹, byl zaznamenán u ryb. Obsah SPM v mase a rybách zřídka přesáhl 10 mg.kg⁻¹. Tak protikladný vztah mezi obsahem SPD a SPM je typický pro potraviny živočišného původu ve srovnání s rostlinnými výrobky. SILVA A GLÓRIA (2002) vysvětlují

vyšší obsah SPD než SPM u vzorků výrobků na bázi kuřecího masa tím, že do výrobků je zapracován značný podíl rostlinných komponentů.

Tab. 1: Obsah BA v mase, rybách a masných výrobcích podle VELÍŠKA (1999):

potravina	Obsah v mg.kg ⁻¹							
	HIM	KAD	PUT	SPD	SPM	AGM	TYM	TRM
Maso								
vepřové	0-45	0-171	s-702	s-619	1-177		1-35	1-48
hovězí	0-217	0-27	s-26	s-50	4-382	2-112	s-61	
kuřecí	1	9	6		58		23	
Masné výrobky								
šunka	1-271	s-97	s-598	13-72	s-331		s-618	8-67
slanina	15	s-1	s-8	2-42	1-212		1-3	4
uzeniny	s-550	s-787	1-396	23- 137	s-241		0-1240	0-29
Ryby								
tuňák	s-8000	s-447	s-200	1-4	s-19		s-1060	
makrela	s-3000	s-226	s-40	2-4	s-48		s-75	
slaneček	s-1300	s-34	1-37	50-56	s-92		0-3000	
sardinky	4-2350	18- 1050	4-300	4-60	35-65		1-68	

s = stopy

V mase, rybách a masných výrobcích bývají z biogenních aminů obsaženy nejčastěji HIM, CAD, PUT A TYM. Při skladování masa za působení enzymové aktivity přítomné mikroflóry dochází k růstu obsahu BA. Tohoto růstu lze využívat jako indikátoru čerstvosti masa. Čerstvé jatečné vepřové maso má hodnoty CAD a PUT do 7 mg.kg⁻¹, zatímco zkažené maso 60 mg.kg⁻¹ a více (VELÍŠEK, 1999).

2.1.4.4 Polyaminy v mléce, mléčných výrobcích a ve vejcích

Obsah všech polyaminů je velmi nízký v kravském mléce, jogurtu, lidském mléce a slepičích vejcích. Avšak obsah všech PA může dosáhnout extrémních hodnot v sýrech, hlavně u sýrů zrajících (MOTYL ET AL., 1995).

Při výzkumu 100 vzorků nezrajících sýrů a čtyř typů zrajícího španělského sýra NOVELLA–RODRÍGUEZ ET AL. (2003) zjistili, že obsah polyaminů klesal v pořadí PUT → SPD → SPM, a lišil se u různých typů zralých sýrů a také u stejného typu sýru.

Ve studii pokoušející se určit podmínky při výrobě sýrů, které minimalizovaly obsah čtyř hlavních biogenních aminů, včetně putrescinu, byl testován účinek třech faktorů: použití syrového nebo pasterovaného mléka, termofilní nebo mezofilní startovací kultura a dohřívání nebo nedohřívání sýřenina. Zdá se, že nejlepší podmínky byly při použití pasterovaného mléka, mezofilních bakterií a u zahřívání sýřeniny (GENARO ET AL., 2003).

2.2 Vliv skladování a tepelného zpracování na potraviny

2.2.1 Hovězí maso

Vaření má relativně malý vliv na obsah BA, dochází pouze k jejich částečnému rozkladu, což je vidět z tab. 2 (VELÍŠEK, 1999).

Tab. 2: Vliv skladování a vaření na obsah BA v hovězím maso podle VELÍŠKA (1999):

Teplota °C	Doba dny	Obsah v mg.kg ⁻¹									
		Putrescin		Kadaverin		Spermidin		Spermin		Tyramin	
		syr.	vař.	syr.	vař.	syr.	vař.	syr.	vař.	syr.	vař.
4	0	11	10	23	0	39	56	382	440	8	25
	4	13	12	28	0	56	80	784	393	12	18
	8	46	42	29	0	54	65	520	407	16	12
	12	74	86	32	0	113	189	331	382	12	25
7	0	13	12	23	0	33	54	318	394	5	26
	4	17	19	28	1	91	92	563	437	18	20
	8	94	107	25	4	157	216	524	360	89	36
	12	224	202	45	36	201	266	390	349	201	111
10	0	12	12	28	0	80	50	362	446	4	12
	4	69	60	36	2	131	128	517	317	12	27
	8	207	205	32	36	278	267	345	321	52	151
	12	368	277	29	100	177	274	446	361	333	224

KOZOVÁ, KALÁČ A PELIKÁNOVÁ (2009a) odebírali 9 vzorků hovězí pečeně (*longissimus lumborum*) o váze 1,5 kg z bouraných mladých býků, 20 hodin po porážce na jatkách. Vzorky byly skladovány a po analytických metodách podstoupily kuchyňské úpravy, které napodobovaly běžnou úpravu hovězího ve

středoevropské kuchyni. Bylo testováno: vaření a dušení. Počáteční hodnoty SPM byly v rozpětí mezi 23,5 a 27,5 mg.kg⁻¹ u šesti pečení použitých při skladovacích pokusech 24 hodin po porážce. U třech hovězích pečení použitých ke kuchyňské úpravě byl obsah SPM v rozsahu mezi 19,8 a 25,2 mg.kg⁻¹ pět dnů po porážce. Odpovídající hodnoty byly 19,0 - 23,8 mg.kg⁻¹ v desátý den po porážce. Obsah PUT a SPD byly pod detekčním limitem u všech vzorků.

Obsah SPM se zvyšoval během prvních týdnů skladování v mrazírenských podmínkách a potom postupně klesal na 70 % počáteční hodnoty na konci skladovacího období. Poněkud vyšší ztráty byly u dušeného masa bez přidání vody. Rozdíly mezi testovanými kuchyňskými úpravami byly statisticky nevýznamné. Průměrné ztráty byly mírně nižší než u vepřové panenky vařené sedm dní po porážce za stejných experimentálních podmínek (KRAUSOVÁ ET AL., 2008).

Výrazné rozdíly v poklesu obsahu SPM byly nicméně pozorovány mezi jednotlivými hovězími pečeněmi (svíčkovými). Rozdíly mezi svíčkovou z býka ve věku 15 a 27 měsíců jsou zjevné. Věk porážených zvířat by mohl být faktorem ovlivňujícím stabilitu SPM při kuchyňských úpravách (KOZOVÁ, KALAČ A PELIKÁNOVÁ, 2009a)

2.2.2 Vepřové maso

KRAUSOVÁ ET AL. (2006) odebírali vzorky z vepřových panenek (*musculus longissimus, pars lumborum*) během bourání z 8 prasat 20 hodin po porážce. Mrtvá zvířata byla rychle zchlazena na vnitřní teplotu 4 – 5 °C a uložena v chladírně. U odebraných vzorků byly provedeny tepelné úpravy: vaření, dušení, pečení, pečení na pánvi bez oleje, úprava jako vídeňský řízek. Obsah PA byl také stanoven ve vývaru a tuku.

Počáteční obsah SPM byl v rozmezí 20,3 a 25,2 mg.kg⁻¹ u osmi vepřových panenek použitých u pokusů 24 hodin po porážce. Obsah SPM se mírně měnil po 6 dnech skladování dvou vepřových panenek použitých na kuchyňské úpravy z 23,4 a 21,9 mg.kg⁻¹ na 21,2 a 22,1 mg.kg⁻¹. Obsah PUT a SPD byl pod detekčním limitem (KRAUSOVÁ ET AL., 2006).

Byly zaznamenány ztráty SPM asi na 40 % počátečního obsahu během kuchyňských úprav (vaření, dušení, smažení) u pečení na pánvi bez oleje, které způsobilo ztrátu asi 55 %. Podobné ztráty byly zjištěny u panenky upravované 24 hodin a 7 dní po porážce. Žádný obsah SPM nebyl zjištěn ve vývaru a tuku,

který vznikl při kuchyňských úpravách. Nevýrazný pokles jak SPM tak SPD byl pozorován ve vepřovém mase, upravovaném za podobných podmínek a navíc u masa grilovaného a vařeného v mikrovlnné troubě. Ztráty obou polyaminů až na 26 % po vložení vepřového masa do solného roztoku a následném vaření a grilování. Vaření, dušení a grilování vepřové panenky snížilo obsah PUT asi na polovinu počátečního obsahu. Minimální pokles obsahu SPD a SPM byl zjištěn během úpravy vařeného vepřového ramínka a jeho skladování po dobu 2 týdnů. Žádný obsah SPM nebyl zjištěn ve vývaru a tuku, který vznikl při kuchyňských úpravách (KRAUSOVÁ ET AL., 2006).

PAULSEN, HAGEN A BAUER (2006) studovali ve své práci změny v obsahu BA, nebílkovinného dusíku a dusíkatých látek v průběhu zrání a tepelného zpracování *M. longissimus, Pars lumborum* vepřového masa, kdy byly sledovány změny u HIM, PUT, CAD, TYR, hmotnosti vzorku, obsahu sušiny, obsahu dusíkatých a bezdusíkatých látek byly studovány během ponoření vzorku v konzervačním slaném roztoku změny při vaření a grilování (70 °C - teplota jádra masa), jak "čerstvé", tak "naložené" (skladované 5 dní při 4 °C) kotlety vepřové panenky. Koncentrace aminů byly významně vyšší u "naloženého" vepřového, tento rozdíl byl zachován po většinu technik zpracování. Korelace aminů s nebílkovinným dusíkem byla slabá a bezvýznamná, ale silná a významná pro putrescin. Kadaverin ($r = 0,89$), stejně jako putrescinu. Tyramin ($r = 0,95$). Snížení aminů pro "čerstvé" vepřové nebyly výrazné. V "naloženém" vepřovém i ve vodě vařeném mase (voda / maso = 1:1) a při zrání v méně koncentrovaném nálevu činilo průměrné snížení 65 % pro putrescin, 77 % pro kadaverin a 68 % pro tyramin. Vařením konzervované vzorky přinesly snížení z 50 - 77 % pro histamin, 74 - 80 % pro tyramin, 67 až 71 % pro putrescin a 77 až 91 % pro kadaverin.

2.2.3 Vepřová játra

KRAUSOVÁ ET AL. (2007) provedli osm pokusů s vepřovými játry. Ve dvou pokusech byla vepřová játra skladována při teplotě -18 °C po dobu 168 dní, ve čtyřech pokusech byla játra skladována aerobně (AE), vakuově balená (VP) a balená v upravené atmosféře (MAP) a byly provedeny dva pokusy, kde byly testovány účinky kuchyňských úprav.

Rozložení jak SPD tak SPM ve čtyřech hlavních jaterních lalocích bylo homogenní. Počáteční obsah SPD a SPM ve 14 játrech 24 hodin po porážce byly 23.3 a 94.5 mg.kg⁻¹. Obsah putrescinu byl pod limitem stanovení. Obsah SPD a SPM se snížil během skladování v mrazírně na asi 70 % počátečních hodnot. Devátý den skladování se průměrný obsah SPD a SPM snížil asi na 85 % počátečních hodnot v játrech skladovaných v MAP a asi na 75 – 80 % v AE a VP při teplotě 2 °C. K výraznějšímu snižování docházelo ve VP víc než v MAP. PUT byl zjišťován od 15 dne skladování ve VP a MAP (KRAUSOVÁ ET AL., 2007).

Došlo k výraznému poklesu obsahu SPD a SPM a to asi na 70 – 60 % počátečních obsahů během kuchyňských úprav vařením. Rozdíly mezi jednotlivými kuchyňskými úpravami byly statisticky nevýznamné. Pečení na pánvi bez oleje způsobilo zvýšení poklesu na 56,9 % počáteční hodnoty u čerstvých jater, zatímco nejnižší pokles na pouhých 80,6 % počáteční hodnoty byl pozorován u jater skladovaných 6 dní před kuchyňskými úpravami (KRAUSOVÁ ET AL., 2007).

2.2.4 Vepřové ledviny a slezina

Rozdělení SPD a SPM v páru ledvin bylo homogenní. Průměrný obsah SPD a SPM ve vepřových ledvinách 24 hodin po porážce byl 9.39 a 53.1 mg.kg⁻¹ s žádnými výraznými rozdíly mezi mladými kanci nebo prasnicemi. Obsah putrescinu byl pod detekčním limitem 1.2 mg.kg⁻¹. V ledvinách skladovaných aerobně nebo vakuově zabalenými při 2-3 °C po 7 a 21 dní se výrazně snížil obsah SPD a SPM. Dušení snížilo oba polyaminy výrazně v ledvinách zpracovaných 1 den po porážce než 7. den po skladování při teplotě 2 - 3 °C. Průměrný obsah SPD a SPM v 10 slezinách 24 hodin po porážce byl 36.7 a 34.0 mg.kg⁻¹. Podle KOZOVÉ, KALAČE a PELIKÁNOVÉ (2008) jsou ledviny, i slezina řazeny mezi potraviny s vysokým obsahem SPM a SPD.

Tyto hodnoty jsou nižší než ty uvedené v práci VILLANUEVA VALERO ET AL. (2005) pro devět ledvin, kde obsah SPD a SPM je 18,6 a 72,2 mg.kg⁻¹. Jako jediný zaznamenaný obsah u vepřové sleziny 24 hodin po porážce uvádí 56 mg.kg⁻¹ SPD a 78 mg.kg⁻¹ SPM. Všechny tyto hodnoty jsou vyšší než hodnoty v práci výše zmíněné.

2.2.5 Kuřecí maso, játra a srdce

Byla sledována tvorba BA v mase kuřecích prsou během aerobního skladování a balení ochranné atmosféře (MAP) při teplotě 4 °C. Vzájemná souvislost mezi mikrobiálními a smyslovými změnami v kuřecím mase s tvorbou BA a jejich možnou rolí coby indikátorů zkažení drůbežního masa. Plátky kuřecích prsou se skladovaly aerobně nebo MAP (30% CO₂, 70 % N₂) při 4 °C 17 dní. Vyhodnocení kvality se provádělo pomocí mikrobiologické, chemické a senzorické analýzy. Celkový počet mikroorganismů pseudomonads a enterobakterií byly v kuřecím vzorku baleném na vzduchu obecně vyšší, zatímco bakterie mléčného kvašení (LAB) a enterobakterie převládaly ve vzorku v MAP. Hodnoty PUT a CAD se současně lineárně zvýšily s dobou skladování a byly vyšší v kuřeti skladovaném na vzduchu. Hodnoty SPM a SPD byly také zjištěné ve vzorcích jak v MAP tak i na vzduchu skladovaném drůbežím mase. Hodnoty TYR v obou vzorcích skladovaných na vzduchu a nebo MAP byly nízké (< 10 mg.kg⁻¹), zatímco zjištění tvorby HIM bylo až po jedenáctém dnu skladování (BALAMISTA ET AL., 2006).

Na základě senzorické a mikrobiologické analýzy a také s přihlédnutím k biogennímu aminovému indexu (BAI počet PUT, CAD a TYR) BAI hodnoty pro kažení tuňáků mezi 96 a 101 mg.kg⁻¹ mohou sloužit jako indexy kvality MAP a na vzduchu baleného čerstvého drůbežního masa. SPM a SPD plynule klesaly po celou dobu skladování kuřecího masa na vzduchu a MAP balení, a proto tyto dva aminy nemohou být použity jako indikátory kvality čerstvého masa. S cílem potvrdit hodnoty jako svěžest ukazatelů v čerstvém kuřecím mase jsou nutné další studie (VECIANA-NOGUE ET AL., 1997).

KOZOVÁ, KALÁČ A PELIKÁNOVÁ (2009b) určili složení polyaminů v chlazeném kuřecím mase a drůbkách (n = 20) a kůže (n = 10) 24 h po porážce. Střední hodnoty SPD byly 4,8; 10,2; 11,4; 48,7 a 12,1 mg.kg⁻¹ a hodnoty SPM byly 36,8; 38,0; 24,3; 82,7 a 133 mg.kg⁻¹ v prsou, stehnech, kůži, játrech a srdci (v tomto pořadí). Významný statistický vztah mezi obsahem SPD a SPM pozorovali u prsou, na stehnech, kůži a játrech, zatímco v případě srdce byl tento vzájemný vztah bezvýznamný. Zvýšení SPD a SPM se projevilo v prsou a stehnech během skladování při 18 °C po dobu 6 měsíců, avšak k významnému zvýšení došlo pouze v případě SPM ve stehnech. Úbytky obou SPD a SPM byly statisticky nevýznamné

v průběhu skladování u aerobně balených prsou až 9 dní při teplotě +2 °C. Dvacátý první den skladování při teplotě +2 °C bylo pozorováno významné snížení SPM asi na 60 % původního obsahu u prsou jak vakuově balených tak těch v ochranné atmosféře (20 % CO₂ a 80 % O₂). Pečení, grilování a smažení čerstvých prsou způsobilo úbytek SPM a SPD ve výši cca 40 – 60 % původního obsahu (vyšší než při vaření a dušení). Podobně vyšší úbytek SPM způsobilo pečení 3 - 6 měsíců mražených prsou než dušení. PUT byl zjištěn pouze ojediněle a na úrovni blízké detekční limit 1,0 mg.kg⁻¹ (čerstvé hmoty).

Odlišné změny polyaminů ve starších kuřecích prsou (n = 3) skladovaných při - 18 °C po 89 dnů byly v poslední době oznámeny od MOREIRA ET AL. (2008), kdy obsah spermidinu a sperminu se snížil z počátečních úrovní 27,4 a 38,7 mg.kg⁻¹ na 8,0 kg a 7,4 mg kg⁻¹ v tomto pořadí.

2.2.6 Ledviny, játra, slezina ze srnce a zajíce polního

BA a PA byly zjištěny v srnčích (n = 39) a zaječích (n = 20) ledvinách, játrech a slezině 6 hodin po porážce. Střední koncentrace (mg.kg⁻¹ čerstvé váhy), CAD a TYR byla < 5 mg.kg⁻¹ u orgánů u obou druhů, zatímco střední koncentrace HIM byla vyšší ve slezině (14,6 a 11,6 mg.kg⁻¹ v zaječím a v srnčím, v tomto pořadí) a nejnižší v játrech. Maximální koncentrace PUT 72,9 mg.kg⁻¹, ale střední hodnoty byly ≤ 7,8 mg.kg⁻¹. Průměrná koncentrace SPD byla 8,5; 10,7 a 42,9 mg.kg⁻¹ v srnčích játrech, ledvinách a slezině 37,2; 24,4 a 52,0 mg.kg⁻¹ v zaječím. Průměrná koncentrace SPM byla vyšší (94,6; 79,9; 102,2 a 111,2; 82,8; 91,1 mg.kg⁻¹, v uvedeném pořadí). Koncentrace SPM byla výrazně vyšší u srnců než u srnek. Poměry SPM : SPD (hmotnost základu) byly v pořadí 2:1 pro slezinu a vyšší u jater a ledvin. SPM a SPD spolu vzájemně souvisely ($r = 0.42-0.47$). I když změny koncentrací polyaminů jsou částečně spojeny se zvířecími druhy, orgány, věkem a pohlavím, relativní podíl jednotlivých faktorů si zaslouží další studium (PAULSEN, DICA KOVA A BAUER, 2007).

2.3 Analytické metody

Metod pro stanovení BA v potravinách je více. První sestavené postupy se soustředily hlavně na toxikologicky důležité aminy HIM a TYM. Pro stanovení aminů byla navržena tenkovrstvá chromatografie (TLC), iontová chromatografie

(IEC), plynová chromatografie (GC) a obzvláště kapalinová chromatografie (HPLC). Dobré výsledky poskytuje i kapilární zónová elektroforéza (CZE) (MORET A CONTE, 1996).

2.3.1 Kapalinová chromatografie (HPLC)

Vzorky aminů se před vlastní analýzou musejí extrahovat do roztoku. Pro tento účel je nejčastěji využívána kyselina chloristá (MORET A CONTE, 1996).

Mnohé aminy nemají dostatečnou absorpci a tak se nedají stanovovat přímo. Je třeba je před analýzou derivatizovat. Jako nejběžnější činidlo pro derivatizaci aminů se používá dansylchlorid. TLC dansyl derivátů aminů se stále využívá pro svou rychlost a jednoduchost při screeningu u více vzorků zároveň. TLC metoda je velmi využívána v potravinářském průmyslu (SHAKILA, VASUNDHARA A KUUDAVALLY, 2001).

Detekční limit (LOD) je 5 - 10 ng při fluorescenční densitometrii (LAPA – GUIAMARAES A PICKOVA, 2004).

Pro derivatizaci se používají i jiná činidla. VANDENABEELE ET AL. (1998) použil 2-chlorethylnitrosomočovinu, někdy se používal benzoylchlorid ale i přesto je nejčastěji používaný pravděpodobně dansyl chlorid (VANDENABEELE ET AL., 1998; HERNANDEZ-BORGEZ ET AL., 2007; PROETOS ET AL., 2008; SOUFLEROS ET AL., 2007).

2.3.1.1 Využití metody HPLC pro stanovení BA a PA

- Biologicky aktivní PA byly stanovovány ve vepřových ledvinách a slezině, po porážce, sledovaly se změny během skladování v chladárně a během kuchyňských úprav. Jak vepřové ledviny, tak i slezina se řadí mezi potraviny s vysokým obsahem SPM A SPD (KOZOVÁ, KALAČ A PELIKÁNOVÁ, 2008).
- Obsah biologicky aktivních PA byl zjišťován během skladování vepřové svíčkové/panenky a během jejích kuchyňských úprav. Kdy PA byly stanoveny jako dansyl deriváty, byl stanoven pouze SPM, obsah PUT a SPD byl pod detekčním limitem (KRAUSOVÁ ET AL., 2006).
- Změny v obsahu biologicky aktivních PA byly sledovány i u skladování hovězí pečeně a během vaření. Ztráty byly pozorovány během vaření a dušení

s nebo bez přídavku vody v práci KOZOVÉ, KALAČE A PELIKÁNOVÉ (2009).

2.3.2 Ultra výkonná kapalinová chromatografie (UPLC)

Rok 2004 přinesl novou generaci stacionárních fází, které vydrží vysoký tlak (až do 1000 barů), stejně jako kompatibilní LC systém, byla už u několika dodavatelů komerčně využita pod názvem UPLC (NGUYEN ET AL., 2007).

Výhodou UPLC oproti HPLC je využívání velmi malých částic (<2 μ m) v krátkých kolonách (5cm) což může výrazně zkrátit dobu analýzy bez snížení účinnosti. Další výhodou v porovnání s HPLC je menší spotřeba rozpouštědel a to při zachování vysoké rozlišovací schopnosti (LIU ET AL., 2007).

2.3.2.1 Využití metody UPLC pro stanovení BA a PA

- Metoda byla aplikována u analýzy aminů ve vybraných vzorcích potravin: vepřovém, hovězím, kuřecím a rybím mase, sýrech a jedlých houbách. Aminy byly derivatizovány dansyl chloridem, analýza byla velmi rychlá, analýza byla ukončena za méně než 6 minut (KALAČ ET AL., 2005).
- Obsah BA a PA u některých druhů evropských hub. Analytický postup použití lyofilizovaných vzorků, derivatizace dansyl chloridem a HPLC v uspořádání UPLC kvantifikace. Nebyl stanoven žádný obsah HIM a CAD. PUT byl amin s nejvyšší hlavně u druhů z rodu Boletaceae. Obsah SPD byl značně vyšší než SPM. U *Xerocomus badius* byl zjištěn významný vliv období sklizně, stáří a část plodnice a jejich vzájemné působení na obsah fenylethylaminu, PUT a SPM (DADÁKOVÁ, PELIKÁNOVÁ A KALAČ, 2009).

2.3.3 Iontová chromatografie (IEC)

Iontová chromatografie je obzvláště vhodná pro komplexní matrice. Výluhy v kyselině chloristé byly vstříkovány bez dalších úprav do sloupce výměny kationtů a byly vyluhovány roztokem kyseliny metansulfonové. Detekční limity 7 – 12 mg.kg¹ byly vyšší ve srovnání s dalšími chromatografickými technikami. Možnost zapojení analyzáru AMK je obrovská výhodou IEC (FAVARO ET AL., 2007).

2.3.5 Kapilární elektroforéza (CZE)

Pomocí CZE mohou být snadno stanoveny aromatické a heterocyklické BA bez derivatizace díky jejich přirozené absorbanci UV světla. Analýzy HIM probíhají v jednoduchých zatavených křemíkových kapilárách v jednoduchém vyrovnávacím roztoku a jsou velmi rychlé (doba migrace je mezi 4-9 minutami). HIM se stanovoval např. u ryb ve fosfátovém vyrovnávacím roztoku, pH 2,5 na vzorky rajčat a v rajčatovém protlaku byl použit citrátový vyrovnávací roztok o pH 2,5 (ROSSANO ET AL., 2006; BOLDYGO ET AL., 2000).

Obecně musejí být vzorky před analýzou CZE derivatizovány. Na vzorky byl navržen 6-aminoquionyl-N-hydroxysuccinimidyl karbomát. BA nejčastěji se vyskytující v potravinách tedy: PUT, CAD, SPM, SPD, HIM, TYM a TRM byly analyzovány za 25 min. Stejná skupina aminů byla analyzována za 15 – 35 min při použití velmi jednoduché derivatizace pomocí benzoylchloridu (KOVACS, SIMON-SAKARDI A GANZLER, 1999; KRÍŽEK A PELIKÁNOVÁ, 1998).

Pro velmi citlivé stanovení aminů v rostlinných pletivech slouží derivatizace 4-fluor-7nitro-2,1,3-benzoxadiazolem, kdy detekce pomocí fluorescenčního detektoru splní požadavky na citlivost analýzy (ZHANG, THANG A SUN, 2005).

2.3.5.1 Využití CZE pro stanovení BA A PA

- Stanovení obsahu biogenních aminů v kyselém zelí při aplikaci bakterií mléčného kvašení jako startovacích kultur (ŠPIČKA ET AL., 2002).
- Stanovení obsahu PA ve zpracovaném mase, vepřových játrech a ledvinách, dušeném hrášku, grepfruitu, ale i v zeleném pepři a sóje (KALÁČ ET AL., 2005).

2.3.6 Elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)

Obsah biologicky aktivních PA v játrech hovězího dobytka, prasat a kuřat po porážce byl zjištěn jako N-benzamidy pomocí MECC byl studován v práci KRAUSOVÁ ET AL. (2006).

Stanovení pomocí MECC bylo testováno i na vzorcích sýrů, vína, piva, kyselého zelí a jiných (KRÍŽEK A PELIKÁNOVÁ, 1998).

3 Cíl práce

1. Vypracování literární rešerše na téma výskytu BA a PA v mase jatečných zvířat, zejména v jehněčím a skopovém mase. Zaměření na různý vliv během skladování, tepelných úprav a zpracování, jejich vliv na obsah BA a PA.
2. Navrhnutí experimentů, ve kterých je zkoumán vliv různých podmínek skladování a různých druhů tepelné úpravy na obsah BA a PA ve skopovém mase.
3. Stanovení vlastního obsahu BA a PA dle navržených experimentů v získaných vzorcích skopového masa.
4. Hodnocení získaných výsledků.

4 Experimentální část

4.1 Použité laboratorní pomůcky, chemikálie, přístroje a zařízení

Při analýze BA a PA byly použity mimo běžného laboratorního skla (odměrný válec, nálevka, titrační baňka atd.), laboratorních pomůcek, běžných chemikálií (všechny čistoty p.a.) i následující speciální chemikálie, přístroje a zařízení.

Chemikálie

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

Přístroje a zařízení

Analytické váhy, B 204, Metter Toledo, Švýcarsko,
Kapalinový chromatogram (RRLC) Agilent Technologies, USA
Mixér, Moulinex, Francie,
Odstředivka Sigma 2 – 5, Německo
Ponorný mixér, Bosch, Německo.

4.2 Odběr vzorků

Pro analýzu byly použity vzorky skopového masa. Odběr vzorků skopového byl prováděn na jatkách v Týně nad Vltavou. Zvířata byla kříženci, kteří pocházeli od drobných chovatelů. Vzorky byly odebrány do 20 hodin po porážce na jatkách během let 2009 a 2010. Poražená zvířata byla zchlazena na 4 °C a uchovávána při této teplotě. Odebrané maso bylo transportováno v chladícím boxu do laboratoře. Byly odebrány následující části kosterní svaloviny: hřbet (*Musculus longissimus lumborum et thoracis*) a kýta (*Musculus gluten gluten*). Před začátkem analýzy byl odstraněn viditelný tuk. Počáteční koncentrace aminů byla stanovena 24 hodin po porážce.

4.3 Skladovací podmínky

A. Druh masa: hřbet

Ze skopového masa byl odebírán hřbet o hmotnosti cca 150 g. Vzorek byl zataven v polyethylenovém obalu (HDPE, 0,017 mm). Vliv na skladované maso při teplotě -18 ± 1 °C (mražení) byl sledován po dobu 0 až 6 měsíců.

B. Druh masa: kýta

Vliv na skladované maso při teplotě $+2 \pm 0,5$ °C (chlazení) byl sledován ve třech pokusech za použití kuchyňských úprav. V každém pokusu kousky masa o váze asi 150 g byly zabaleny do sáčků vyrobených z polyetylenu o vysoké hustotě (HDPE, síla fólie 0,017 mm).

Obaly pro skladování skopové kýty:

- 1) V polyethylenovém obalu (HDPE sáčky), napodobující aerobní balení a skladování v domácnostech. Původní obal z jatek. Vzorky byly skladovány a analyzovány ve dnech 0, 2, 5 a 9.
- 2) Vakuově zabalené. Skladované a analyzované ve dnech 0, 5, 9, 15 a 21. Provedeno na jatkách originální obal.
- 3) Balené v modifikované atmosféře (70 % N₂ a 30 % CO₂). Skladované a analyzované ve stejné dny jako vakuově balené vzorky. Obal též původní

z jatek. Každý materiál byl analyzován na počáteční koncentraci aminů (den 0).

4.4 Kuchyňské úpravy

Měly být provedeny jako kuchyňské úpravy běžné ve střední Evropě.

Materiál: kýta skladovaná šest dnů při $+2 \pm 0,5$ °C v polyethylenové fólii, pro všechny druhy úprav.

Vaření:

Plátek kýty o hmotnosti cca 150 g byl nakrájen na kostičky o rozměru 2x2x2 cm. Z masa jsme odstranili viditelný tuk. Smíchali se stejným množstvím destilované vody (150 ml) a směs byla zatavena do v polyethylenového obalu. Sáček byl ponořen do vroucí vodní lázně po dobu 60 minut. Po ochlazení, byl stanoven obsah aminů v mase i ve vývaru (tekutina vzniklá po kuchyňské úpravě – v té nebyl detekován žádný obsah BA a PA).

Dušení:

Proběhlo za podobných podmínek jako vaření. Pouze s polovičním objem přidané vody.

Pečení:

Asi 150 g masa pokrájeného na kostky stejné velikosti jako při vaření 2x2x2 cm bylo zahříváno v porcelánové misce přikryté hliníkovou fólií při 190 °C po dobu 75 minut, bylo přidáno 25 ml vody. Nepřidával se žádný tuk.

4.5 Analytický postup

Biogenní aminy a polyaminy byly ve skopovém a jehněčím mase stanovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

4.5.1 Rozbor BA a PA metodou HPLC

Extrakce

Extraktby byly do doby analýzy uskladněny v chladničce při teplotě 4 ± 1 °C. Běžná doba skladování byla obvykle kratší než jeden měsíc, ojediněle až 2 měsíce.

Postup extrakce:

1. Navážení 40 ± 1 g vzorku masa a přelití přibližně 100 ml 0,6 M HClO₄.
2. Homogenizace směsi cca 3 min kuchyňským ručním tyčovým mixérem (Bosch, 600 W) a následné odstředění (Sigma 2-5, průměr rotoru 272 mm) při 3500 otáček /min po dobu 10 minut.
3. Přefiltrování supernatantu přes skládaný filtrační papír (pro kvalitativní analýzu, nekrepaný nehlazený) a celkový objem filtrátu jsme doplnili do 140 – 150 ml roztokem 0,6 M HClO₄.

Obr. č. 1: Extrakce aminů z matrice



Derivatizace

Extrakty byly derivatizovány a analyzovány podle publikovaného postupu (DADÁKOVÁ ET AL., 2009).

Postup derivatizace:

1. Odpipetování 1 ml extraktu vzorku 0,6 M kyseliny chloristé.
2. Přidání 100 µl vnitřního standardu, kterým byl roztok 1,7-heptandiaminu v 0,6 M HClO₄ o koncentraci 400 mg.l⁻¹.
3. Následná neutralizace roztoku 1,5 ml uhličitanového roztoku, který musí být vždy před analýzou čerstvý.

Tab. 3: Příprava uhličitanového neutralizačního roztoku

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

Příprava roztoku AB, který nemusí být pokaždé čerstvě připravován:

Roztok A: Na₂CO₃ 2,65 g ad 50 ml

Roztok B: NaHCO₃ 4,2g ad 100ml

4. Přidání 2 ml derivatizačního činidla (roztok 5 mg dansylchloridu na 1 ml acetonu); tento roztok musí být také před každou derivatizací čerstvě připraven.
5. Po přidání roztoku dansylchloridu se vzorek ponechal třepat 20 hodin ve tmě při laboratorní teplotě.
6. Poté jsme dávkovali 200 µl roztoku L-prolinu (0,1 g v 1 ml vody) a po zreagování nadbytečného činidla se ještě třepal 1 hodinu ve tmě.
7. Přidání 3 ml heptanu, do kterého jsme vzniklé deriváty polyaminů a biogenních aminů extrahovali, extrakce probíhala po dobu 2,5 minuty.
8. Po odeběru 1 ml supernatantu se vzorek odpařil do sucha pod dusíkem za laboratorní teploty.

Odparek se rozpustil v 1,5 ml roztoku acetonitrilu a byl přefiltrován přes skleněný filtr (velikost pórů 1,7 μm) do odměrné vialky.

Analytická koncovka

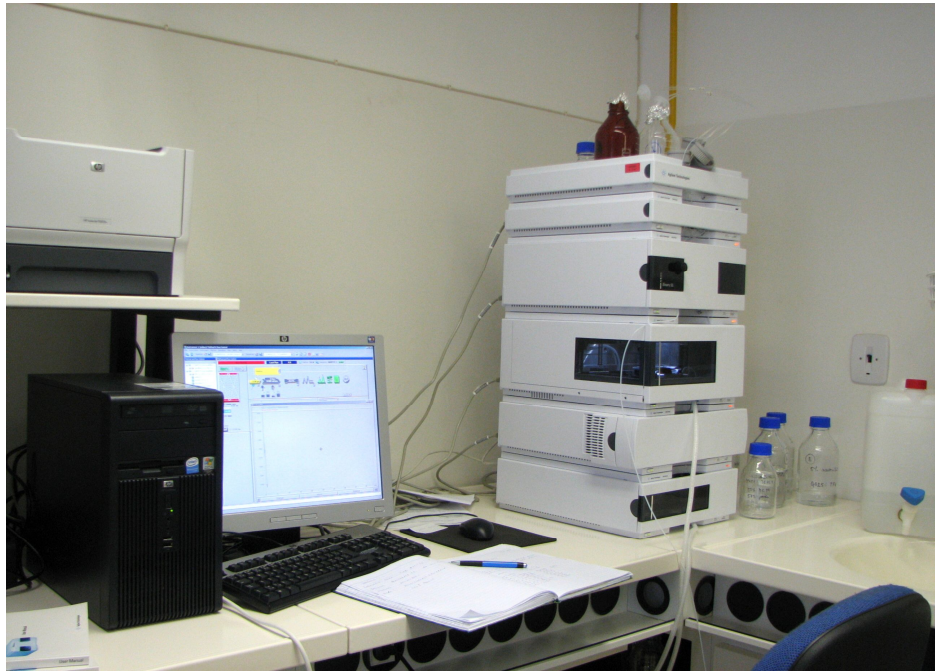
Analýza derivatizovaného vzorku, který obsahuje dansylderiváty přítomných aminů, byla provedena metodou kapalinové chromatografie s využitím techniky v uspořádání UPLC. Provedení odpovídalo publikované metodě (DADÁKOVÁ ET AL., 2009).

K analýze byl používán kapalinový chromatograf vybavený binární pumpou, zařízením na odplynění mobilních fází, autosamplerem, termostatem kolon a diode-array detektorem. Separace analytů probíhala v chromatografické koloně (Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, 50 mm x 4,6 mm ID, s velikostí částic sorbentu 1,8 μm). Koloně bylo předřazeno filtrační zařízení pro ochranu kolony (tzv. in-line filter). Vlastní chromatografická separace byla uskutečněna s použitím mobilních fází A (100 % acetonitril) a B (50 % acetonitril) a gradientové eluce podle následujícího programu:

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

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

Obr. č. 2: Kapalinový chromatograf



Statistické vyhodnocení

K veškerému zpracování výsledků analýz byl použit program Microsoft Excel. Obsah polyaminů v mase byl charakterizován aritmetickým průměrem, směrodatnou odchylkou, obsahem v sušině a relativním obsahem. Pro statistickou analýzu byl použit program Statistica Cz 9.0 (StatSoft s.r.o.). V souboru byly vyhodnoceny předpoklady pro užití parametrických metod a k analýze vlivu úpravy vzorku byla použita jednofaktorová analýza rozptylu, k porovnání významnosti skupin Fischerův LSD test při obvyklých hladinách významnosti ($p < 0,05$; 0,01; 0,001).

4.6 Výsledky a diskuze

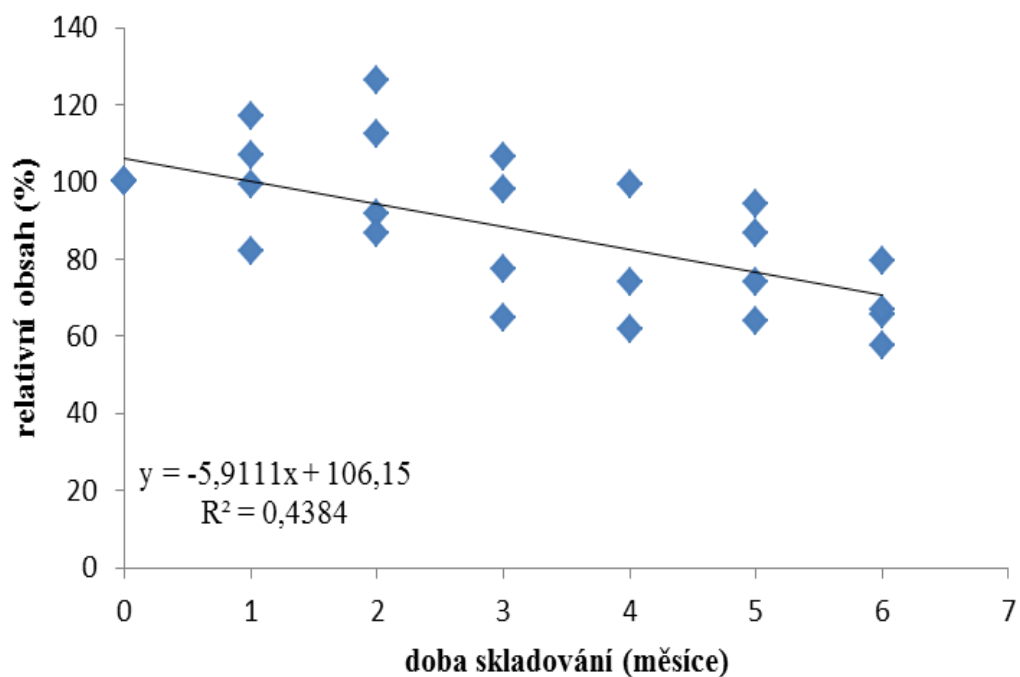
4.6.1 Mrazírenské úpravy

Aminy PUT, SPD a SPM byly stanovovány ve vzorcích skopového hřbetu od 4 zvířat při mrazírenských úpravách a analyzovány po měsících po dobu půl roku. Obsah PUT je udán v tabulce č. 4 a graficky znázorněn v grafu č. 1, SPD v tabulce č. 5 a grafu č. 2 a SPM v tabulce č. 6 a grafu č. 3.

Tab. 4: Obsah PUT ve skopovém hřbetu

Skopový hřbet	Doba skladování (měsíce)						
	0	1	2	3	4	5	6
Zvíře 1							
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	8,01	8,55	8,99	8,54	7,96	6,94	5,26
S.D.	± 0,03	± 0,25	± 0,42	± 0,67	± 0,83	± 0,67	± 0,73
Relativní obsah (%)	100	106,78	112,27	106,69	99,45	86,73	65,68
Zvíře 2							
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	7,11	5,82	6,52	5,51	4,39	4,54	4,10
S.D.	± 2,87	± 0,29	± 0,69	± 0,50	± 0,08	± 0,16	± 0,07
Relativní obsah (%)	100	81,93	91,74	77,57	61,86	63,86	57,70
Zvíře 3							
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	12,06	12,01	10,45	7,80	8,95	8,93	8,06
S.D.	± 2,18	± 1,10	± 0,69	± 0,73	± 0,62	± 0,48	± 0,78
Relativní obsah (%)	100	99,53	86,64	64,67	74,18	74,06	66,85
Zvíře 4							
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	6,82	7,98	8,61	6,70	X	1 vz. = 6,42	5,43
S.D.	± 3,17	± 0,84	± 0,30	± 1,06	X	X	± 0,04
Relativní obsah (%)	100	116,91	126,14	98,19	X	94,11	79,61

Graf č. 1: Obsah PUT ve skopovém hřbetu



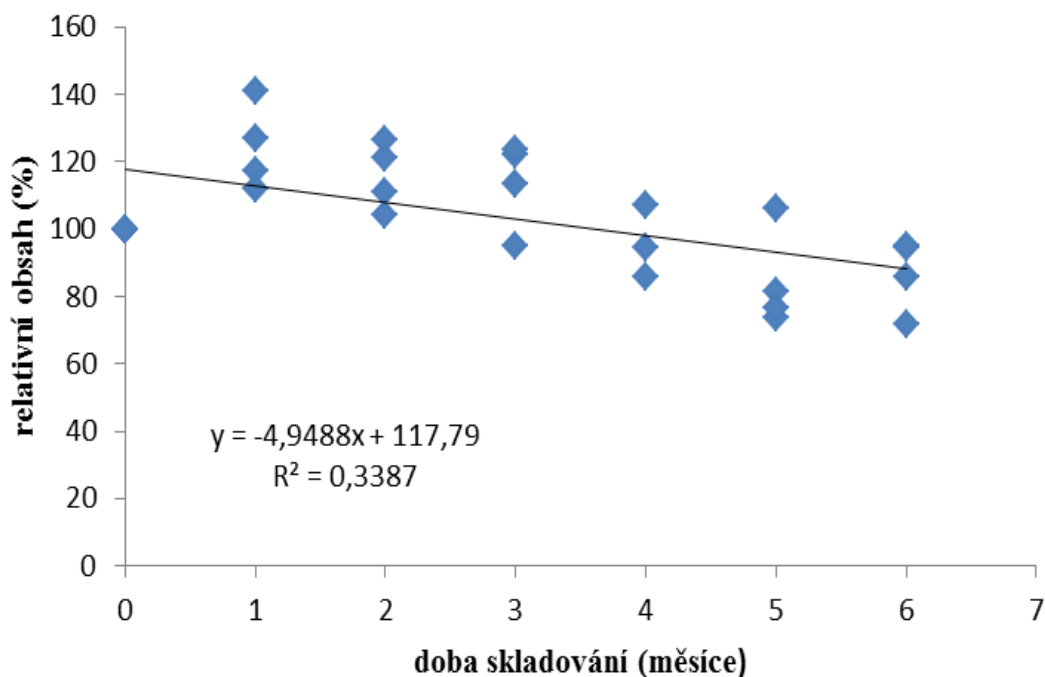
Z tabulky č. 4 a grafu č. 1 vyplývá, že při půlročním skladování docházelo k postupnému poklesu PUT. Pokles PUT zaznamenaný po 6 měsících skladování při mrazírenských teplotách byl na 65 %. Tato hodnota je srovnatelná s hodnotou pro SPM při stejném typu skladování.

CHEN ET AL. (1994) nepozorovali žádné změny polyaminů během devíti měsíců skladování vepřového masa při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tab. 5: Obsah SPD ve skopovém hřbetu

Skopový hřbet	Doba skladování (měsíce)						
	0	1	2	3	4	5	6
Zvíře 1							
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	26,03	30,51	31,47	31,78	24,62	27,62	24,72
S.D.	± 2,30	± 1,69	± 3,01	± 1,33	± 1,30	± 1,63	± 2,91
Relativní obsah (%)	100	117,20	120,87	122,05	94,57	106,09	94,94
Zvíře 2							
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	8,89	12,52	11,25	10,07	7,64	7,22	7,61
S.D.	± 1,54	± 0,71	± 1,03	± 0,11	± 0,17	± 1,05	± 0,09
Relativní obsah (%)	100	140,79	126,43	113,20	85,87	81,17	85,58
Zvíře 3							
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	34,07	38,05	35,41	32,35	36,41	25,13	24,45
S.D.	± 12,47	± 3,68	± 2,19	± 3,80	± 2,83	± 1,12	± 1,07
Relativní obsah (%)	100	111,67	103,91	94,94	106,86	73,76	71,76
Zvíře 4							
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	17,04	21,65	18,90	21,03	X	1 vz.= 13,08	16,01
S.D.	± 1,06	± 2,02	± 2,31	± 0,68	X	X	± 0,80
Relativní obsah (%)	100	127,05	110,91	123,42	X	76,79	94,51

Graf č. 2: Obsah SPD ve skopovém hřbetu



Z tabulky č. 5 a grafu č. 2 vyplývá, že při mrazírenském skladování došlo k mírnému úbytku aminu SPD z původních 100 % na 90 %. Z grafu je zjevný i počáteční nárůst v prvních měsících nad počáteční obsah aminů.

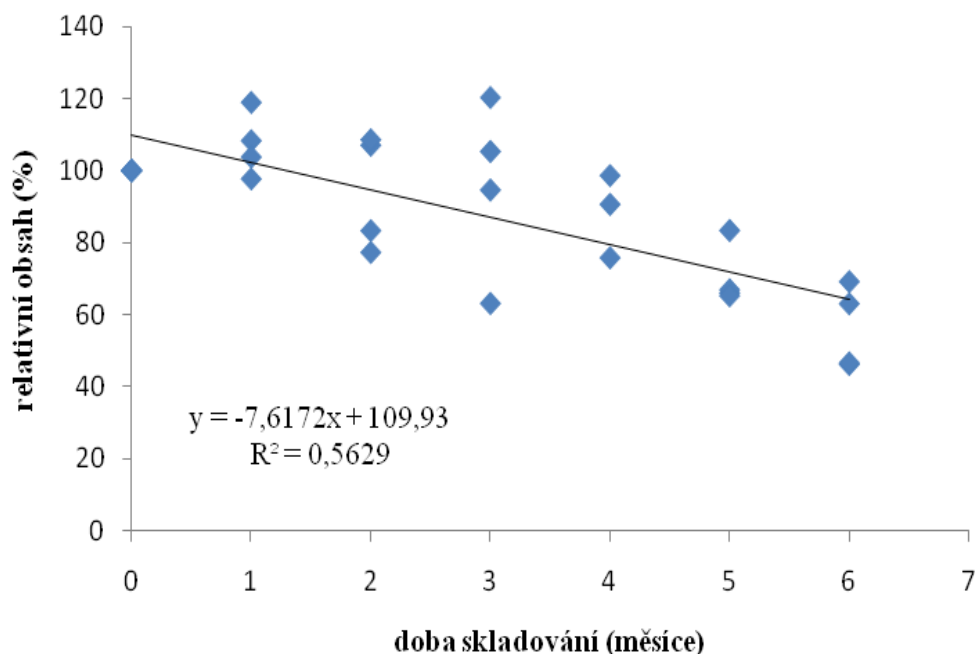
HERDNÁNDEZ- JOVER ET AL. (1996) nezaznamenali u vepřového masa žádné změny v obsahu SPD ani SPM. Maso bylo skladované při stejné teplotě - 18 °C za krátké období 12 dnů.

Naproti tomu HALÁST ET AL. (1994) uvedli výrazné snížení jak SPD tak SPM během 15 - ti denního skladování vepřového masa při - 20 °C.

Tab. 6: Obsah SPM ve skopovém hřbetu

Skopový hřbet	Doba skladování (měsíce)						
	0	1	2	3	4	5	6
Zvíře 1							
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	74,22	72,51	79,46	70,20	56,19	48,96	34,16
S.D.	± 4,26	± 6,44	± 3,74	± 14,35	± 3,66	± 2,07	± 1,95
Relativní obsah (%)	100	97,68	107,06	94,58	75,70	65,96	46,02
Zvíře 2							
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	48,47	52,49	52,63	58,33	47,79	32,39	30,50
S.D.	± 0,89	± 0,22	± 2,02	± 4,87	± 6,97	± 1,28	± 1,10
Relativní obsah (%)	100	118,96	77,23	105,33	90,58	83,33	46,48
Zvíře 3							
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	84,27	100,25	65,08	88,76	76,33	70,22	39,17
S.D.	± 16,04	± 0,85	± 1,46	± 4,55	± 2,92	± 6,48	± 1,90
Relativní obsah (%)	100	109,4	62,0	95,2	72,1	72,3	43,1
Zvíře 4							
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	60,16	62,43	50,09	37,92	X	1 vz. = 39,19	41,56
S.D.	± 5,12	± 6,14	± 12,11	± 3,06	X	X	± 6,17
Relativní obsah (%)	100	103,77	83,26	63,03	X	65,16	69,09

Graf č. 3: Obsah SPM ve skopovém hřbetu



Z tabulky č. 6 a grafu č. 3 vyplývá, že u SPM došlo k nejvyššímu poklesu po dobu skladování. Jeho obsah sice na počátku období prvního měsíce narostl nad 100 %, ale od prvního měsíce docházelo k postupnému úbytku aminu, který v 6. měsíci skladování dosáhl 65 % relativního obsahu.

KRAUSOVÁ ET AL. (2008) pozorovali relativní změny obsahu SPD a SPM u mražených vepřových jater. Obsah obou polyaminů se snížil během skladování asi na 70 % počáteční hodnoty.

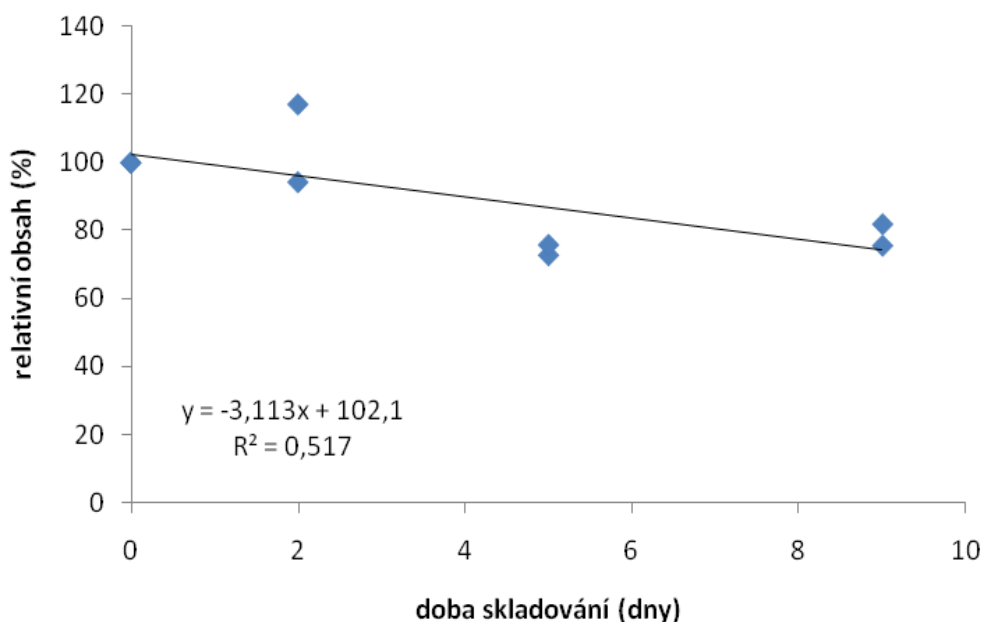
4.6.2 Chladírenské úpravy

Vzorky skopové kýty byly uchovávány ve třech skladovacích obalech: v polyethylenovém obalu (PE), vakuově zabalené (VP) a balené v modifikované atmosféře (MAP). Analýza vzorků probíhala ve dnech a byly stanovovány polyaminy PUT, SPD a SPM. Obsahy PA balených v PE jsou vidět z tabulek č. 7, 8, 9 a grafů č. 4, 5, 6. Obsah PA uchovávaných VP jsou zřejmé z tabulek č. 10, 11, 12 a grafů č. 7, 8, 9. Obsah PA balených do MAP jsou v tabulkách č. 13, 14, 15 a grafů č. 10, 11 a 12.

Tab. 7: Obsah PUT ve skopové kýtě baleno do PE

Skopová kýtá	Doba skladování (dny)			
	0	2	5	9
Zvíře 1				
Průměr	3,20	3,20	2,42	2,63
S.D.	± 0,33	± 0,30	± 0,44	± 0,24
Obsah v sušině (mg/kg)	12,23	11,53	8,91	10,02
Relativní obsah (%)	100	94,28	72,82	81,93
Zvíře 2				
Průměr	2,73	3,23	2,16	2,49
S.D.	± 0,38	± 0,09	± 0,31	± 0,65
Obsah v sušině (mg/kg)	10,20	11,95	7,74	7,71
Relativní obsah (%)	100	117,15	75,85	75,62

Graf č. 4: Obsah PUT ve skopové kýtě baleno do PE

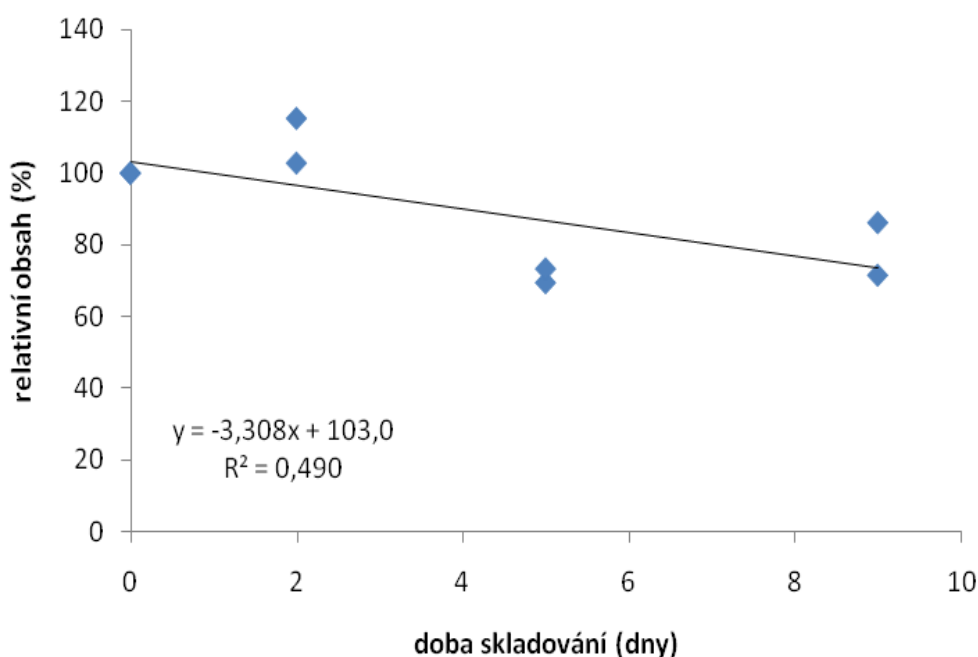


Z tabulky č. 7 a grafu č. 4 vyplývá, že při skladování skopové kýtá zabalené do polyethylénových sáčku došlo k postupnému snížení relativního obsahu PUT do 9 dne na 75 %. Byl to nejvyšší úbytek ve srovnání se zbylými aminy. Z použitých skladovacích podmínek, měl PUT nejvyšší úbytek oproti balení v MAP 85 % a ve vakuu 95 %.

Tab. 8: Obsah SPD ve skopové kýtě baleno do PE

Skopová kýta	Doba skladování (dny)			
	0	2	5	9
Zvíře 1				
Průměr	3,25	3,97	2,42	2,81
S.D.	± 0,22	± 1,69	± 0,70	± 0,10
Obsah v sušině (mg/kg)	12,42	14,31	8,63	10,71
Relativní obsah (%)	100	115,25	69,48	86,21
Zvíře 2				
Průměr	4,94	5,11	3,78	15,17
S.D.	± 0,67	± 0,24	± 2,16	± 0,66
Obsah v sušině (mg/kg)	18,43	18,95	13,52	54,22
Relativní obsah (%)	100	102,81	73,36	93,81

Graf č. 5: Obsah SPD ve skopové kýtě baleno do PE



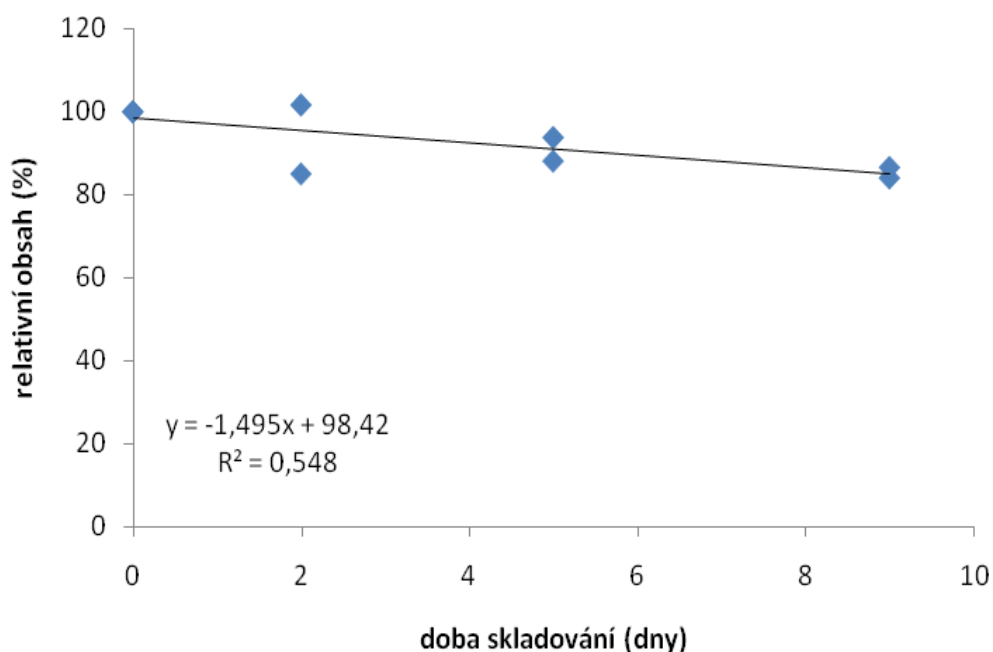
Z tabulky č. 8 a grafu č. 5 je patrné snížení obsahu SPD po dobu skladování na 75 % počáteční hodnoty. K nevyššímu poklesu došlo 5 den skladování.

Bohužel v literatuře nejsou žádné údaje pro srovnání masa s obsahem SPD a PUT pro balení v polyethylenovém obalu při chladírenském skladování.

Tab. 9: Obsah SPM ve skopové kýtě baleno do PE

Skopová kýta	Doba skladování (dny)			
	0	2	5	9
Zvíře 1				
Průměr	16,56	14,96	15,16	13,98
S.D.	± 0,69	± 0,55	± 0,86	± 0,87
Obsah v sušině (mg/kg)	63,32	53,89	55,85	53,27
Relativní obsah (%)	100	85,09	88,19	84,12
Zvíře 2				
Průměr	15,49	15,85	15,17	16,19
S.D.	± 1,04	± 0,95	± 0,66	± 2,37
Obsah v sušině (mg/kg)	57,79	58,74	54,22	50,07
Relativní obsah (%)	100	101,64	93,81	86,64

Graf č. 6: Obsah SPM ve skopové kýtě baleno do PE



Z tabulky č. 9 a grafu č. 6 vyplývá, že docházelo k mírnému poklesu SPM během skladování při chladírenských úpravách a balení v polyethylénovém sáčku, kdy relativní obsah poklesl po 9 dnech 85 %. Změny obsahu jsou srovnatelné s literaturou.

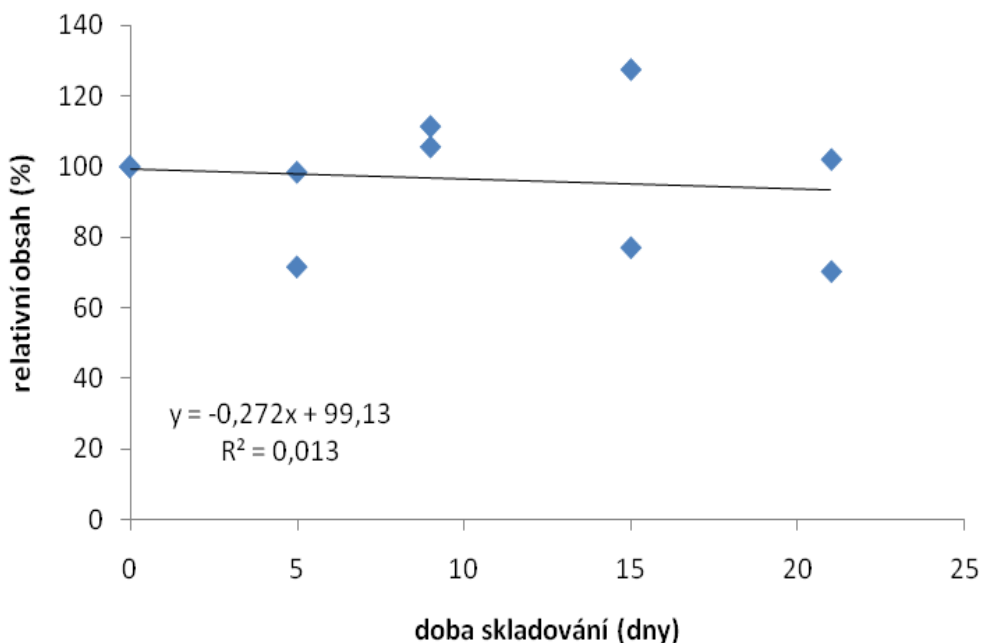
Relativní změny obsahu SPM během běžného aerobního skladování vepřové panenky v domácnosti balení do PE jsou patrné. Nebyl zjištěn žádný zjevný pokles obsahu SPM. Pokles SPM byl na 93 % (KRAUSOVÁ ET AL., 2008).

Podobné výsledky byly uvedeny u srovnatelných skladovacích podmínek u vepřového masa v pracích (HERNÁNDEZ-JOVER ET AL., 1996; PAULSEN A BAUER, 2007), u hovězího masa v práci (YANO ET AL., 1995) a u kuřecího masa od (VINCI A ANTONELLI, 2002). Avšak pokles pod 50 % počáteční hodnoty byl zaznamenán po 15 - ti dnech skladování vepřového masa při +5 °C (HALÁSZ ET AL., 1994).

Tab. 10: Obsah PUT ve skopové kýtě baleno VP

Skopová kýta	Doba skladování (dny)				
	0	5	9	15	21
Zvíře 1					
Průměr	3,20	3,66	4,02	2,76	2,34
S.D.	± 0,33	± 0,93	± 0,35	± 0,38	± 0,09
Obsah v sušině (mg/kg)	12,23	12,04	12,92	9,43	8,60
Relativní obsah (%)	100	98,43	105,62	77,08	70,31
Zvíře 2					
Průměr	2,73	2,10	3,45	3,65	3,00
S.D.	± 0,38	± 0,19	± 1,72	± 0,36	± 1,25
Obsah v sušině (mg/kg)	10,20	7,31	11,36	13,01	10,41
Relativní obsah (%)	100	71,63	111,38	127,50	102,04

Graf č. 7: Obsah PUT ve skopové kýtě baleno VP



Z tabulky č. 10 a grafu č. 7 je vidět pouze minimální pokles PUT během skladování, který dosáhl relativního obsahu 95 %. Hodnota je podobná poklesu SPM, který byl na 90 %, zatímco obsah SPD byl relativně nejvyšší při balení ve vakuu na 70 %.

YANO ET AL. (1995) sledovali značné zvýšení obsahu putrescinu po 13 dnech skladování, zatímco nedošlo k žádným změnám v obsahu SPM a SPD během skladování až do 39. dne u vakuově zabalené hovězí svíčkové při 0.5 nebo 10 °C.

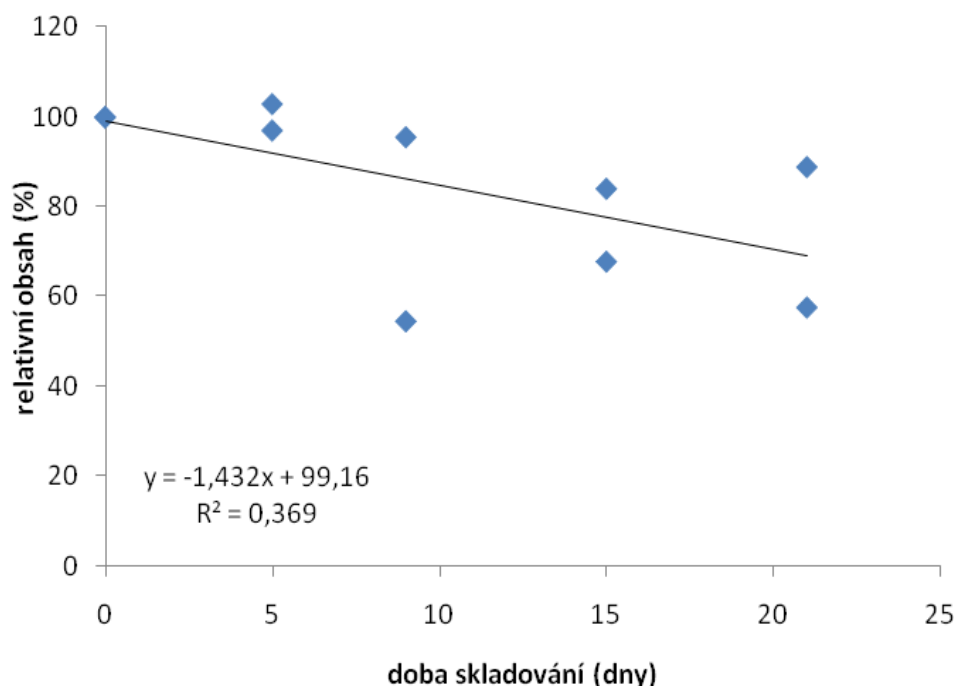
VINCI A ANTONELLI (2002) také uvedli zvýšení PUT v hovězím a kuřecím mase skladovaném při 4 °C po dobu 36 dnů. Obsah SPM v obou masech se snížil. Na počátku nízký obsah SPD se v hovězím mase zvýšil, ale u kuřecího masa se snížil.

HERNÁNDEZ-JOVER ET AL. (1996) ve své práci udávají, že obsah PUT se zvýšil rychle a výrazně v mletém a neplátkovaném vepřovém mase, skladovaném při teplotě 6 – 8 °C po 8 dnů, zatímco obsah SPD se nezměnil a obsah SPM postupně klesal.

Tab. 11: Obsah SPD ve skopové kýtě baleno VP

Skopová kýta	Doba skladování (dny)				
	0	5	9	15	21
Zvíře 1					
Průměr	3,25	3,67	3,69	3,05	3,01
S.D.	± 0,22	± 0,15	± 1,67	± 0,50	± 0,41
Obsah v sušině (mg/kg)	12,42	12,05	11,87	10,44	11,04
Relativní obsah (%)	100	97,02	95,54	84,04	88,88
Zvíře 2					
Průměr	4,94	5,45	3,05	3,50	3,06
S.D.	± 0,67	± 2,91	± 0,33	± 0,43	± 0,07
Obsah v sušině (mg/kg)	18,43	18,97	10,05	12,50	10,61
Relativní obsah (%)	100	102,93	54,51	67,80	57,58

Graf č. 8: Obsah SPD ve skopové kýtě baleno VP



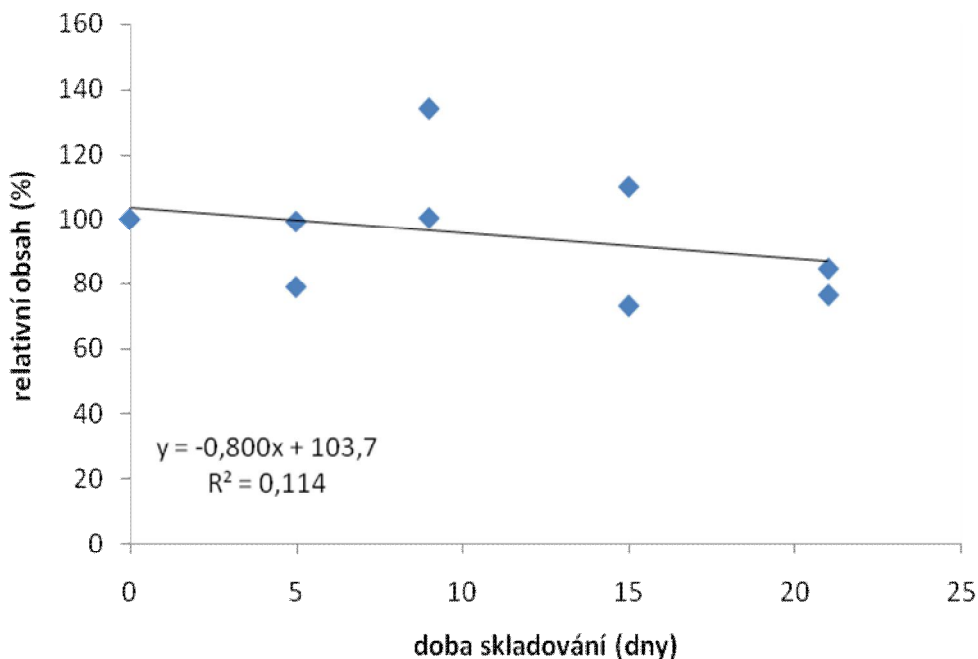
Z tabulky č. 11 a grafu č. 8 je patrný největší pokles SPD na 70 % oproti PUT a SPM, které měli nepatrný pokles na 90 a 85 %. Ten je zároveň i nejnižší z použitých skladovacích podmínek pro SPD. SPD balený v MAP dosahoval 118 % a v PE 78 %.

V práci VILLANUEVA VALERO ET AL. (2005) byly sledovány vakuově zabalené ledviny. Došlo ke snížení jak SPD tak SPM 5. den asi na 75-80 % počátečního obsahu, které bylo nižší než u aerobně skladovaných ledvin. V průběhu dalších dní snižování pokračovalo a 21. den průměrný obsah obou polyaminů byl asi na 50 % počáteční hodnoty. Snížení bylo statisticky významné u obou polyaminů.

Tab. 12: Obsah SPM ve skopové kýtě baleno VP

Skopová kýtá	Doba skladování (dny)				
	0	5	9	15	21
Zvíře 1					
Průměr	16,56	15,23	19,79	13,57	13,22
S.D.	± 0,69	± 0,19	± 5,62	± 2,55	± 1,62
Obsah v sušině (mg/kg)	63,32	50,06	63,59	46,39	48,48
Relativní obsah (%)	100	79,06	100,42	73,25	76,55
Zvíře 2					
Průměr	15,49	16,49	23,58	17,85	14,12
S.D.	± 1,04	± 1,50	± 2,40	± 2,43	± 1,17
Obsah v sušině (mg/kg)	57,79	57,38	77,67	63,62	48,98
Relativní obsah (%)	100	99,28	134,40	110,09	84,74

Graf č. 9: Obsah SPM ve skopové kýtě baleno VP



Z tabulky č. 12 a grafu č. 9 vyplývá, že došlo k podobnému úbytku SPM jako při balení v PE. Snížení obsahu SPM bylo zanedbatelné. Pokles byl na 85 % po dobu skladování 9 dnů stejně jako u balení ve VP a MAP. Skladování skopové kýtě v chladírně zabalené ve vakuovém obalu bylo nejlepší pro ochranu polyaminů.

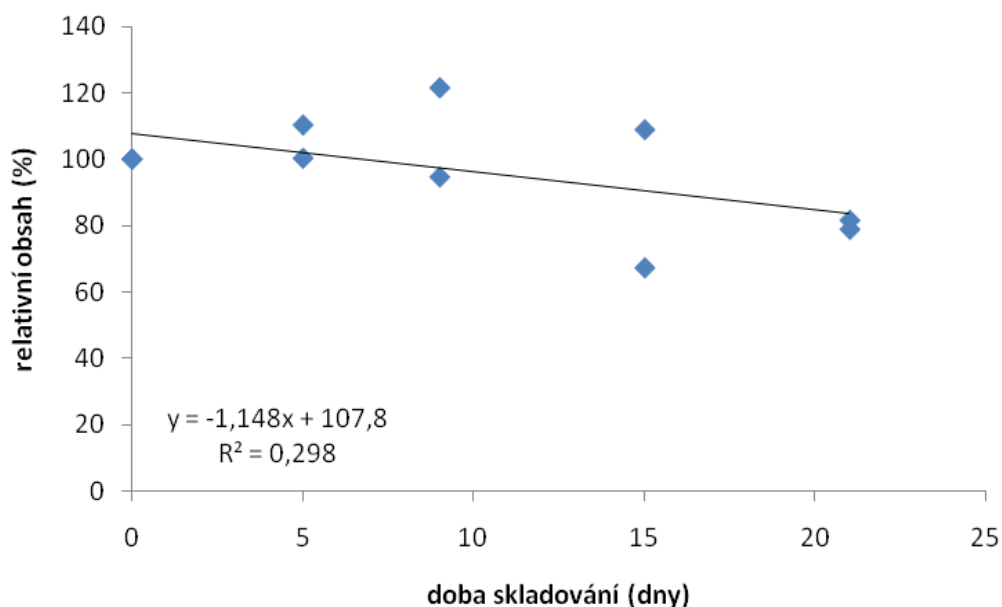
Jako jediný zdroj obsahu sperminu při vakuovém balení byl článek KRAUSOVÉ ET AL., (2008), kde obsah SPM ve vakuově zabalených plátcích vepřové panenky se snížil na poněkud vyšší hodnotu, než tomu bylo u předešlé varianty balení v PE. Došlo ke snížení na 85 % z počátečního obsahu. Snížení během 21- ti denního období bylo považováno za nevýznamné.

KOZOVÁ, KALAČ A PELIKÁNOVÁ (2009a) došli stejných výsledků u vakuově balené svíčkové skladované do 21 dne, počáteční snížení SPM 9. den bylo průkaznější než předcházející varianty. Dvacátý prvý den se obsah SPM snížil asi na 85% počáteční hodnoty.

Tab. 13: Obsah PUT ve skopové kýtě baleno v MAP

Skopová kýtá	Doba skladování (dny)				
	0	5	9	15	21
Zvíře 1					
Průměr	3,20	3,58	3,17	2,17	2,74
S.D.	± 0,33	± 0,25	± 0,42	± 0,06	± 0,59
Obsah v sušině (mg/kg)	12,23	13,49	11,57	8,22	9,97
Relativní obsah (%)	100	110,30	94,60	67,20	81,51
Zvíře 2					
Průměr	2,73	3,04	4,43	2,92	2,41
S.D.	± 0,38	± 1,39	± 0,47	± 0,38	± 0,02
Obsah v sušině (mg/kg)	10,20	10,23	12,40	11,11	8,04
Relativní obsah (%)	100	100,27	121,53	108,88	78,83

Graf č. 10: Obsah PUT ve skopové kýtě baleno v MAP



Z tabulky č. 13 a grafu č. 10 je vidět pokles PUT na 85 %. Pokles je ovšem větší než při skladování ve vakuu, kde došlo k poklesu jen na 95 %, ale zároveň nižší než u skladování v polyethylenovém sáčku, kde byl pokles PUT nejvyšší na 75 %.

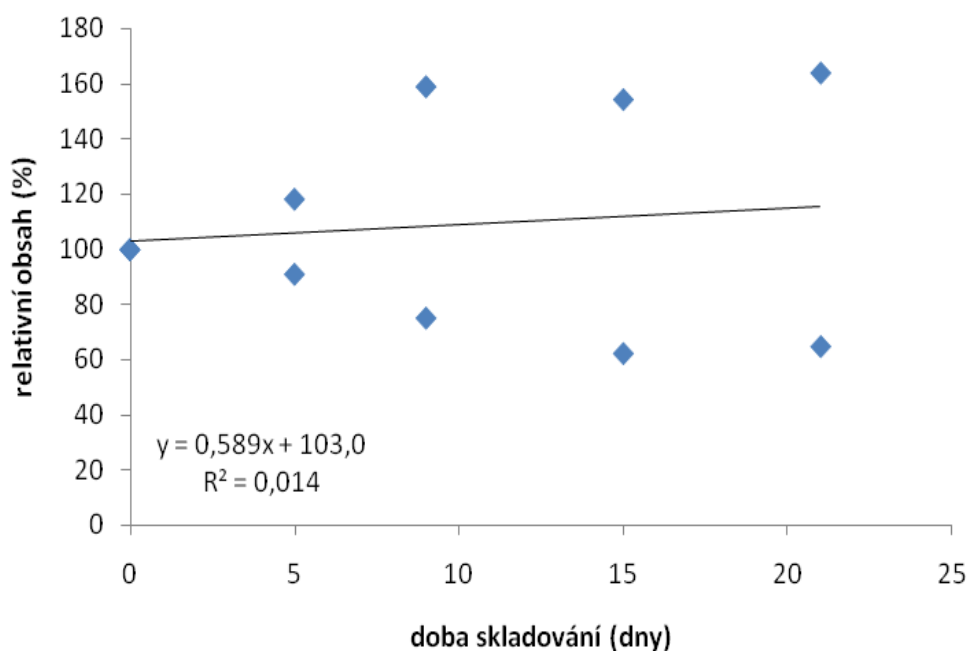
V porovnání se zbylými aminy balenými ve stejné modifikované atmosféře došlo k poklesu na stejné hodnoty jako u SPM.

GALLAS ET AL. (2009) pozorovali tvorbu BA v kuřecím masu skladovaném ve dvou typech MAP (označovaných A a B) za velmi podobných podmínek našim. U čerstvých vzorků po třech dnech skladování byly stanoveny pouze spermin a spermidin. Po devíti a čtrnácti dnech skladování byly detekovány i další BA. Nejvíce zastoupenými BA byly u vzorků skladovaných v MAP A putrescin o obsahu 49,7 % a spermin 24,8 % na konci skladování. U vzorků skladovaných v MAP B to byl putrescin s obsahem 47,0 % na konci skladování.

Tab. 14: Obsah SPD ve skopové kýtě baleno v MAP

Skopová kýta	Doba skladování (dny)				
	0	5	9	15	21
Zvíře 1					
Průměr	3,25	3,90	5,42	5,05	5,59
S.D.	± 0,22	± 0,30	± 1,13	± 0,35	± 2,14
Obsah v sušině (mg/kg)	12,42	14,69	19,75	19,17	20,37
Relativní obsah (%)	100	118,28	159,02	154,37	163,99
Zvíře 2					
Průměr	4,94	4,99	4,96	3,02	3,59
S.D.	± 0,67	± 0,74	± 0,35	± 0,76	± 1,30
Obsah v sušině (mg/kg)	18,43	16,79	13,86	11,50	11,96
Relativní obsah (%)	100	91,08	75,21	62,38	64,92

Graf č. 11: Obsah SPD ve skopové kýtě baleno v MAP



Z tabulky č. 14 a grafu č. 11 je vidět, že při skladování v MAP došlo jako u jediného skladování SPD k nárůstu na 118 %. To mohlo být způsobeno malým počtem vzorků a tím, že se jednalo o nehomogenní biologický materiál nebo analytickou chybu. Zatímco u PUT a SPM byl pozorován při balení v modifikované atmosféře úbytek na 85 %. Obsah SPD baleného v VP a PE se pohyboval od 70 – 75 %.

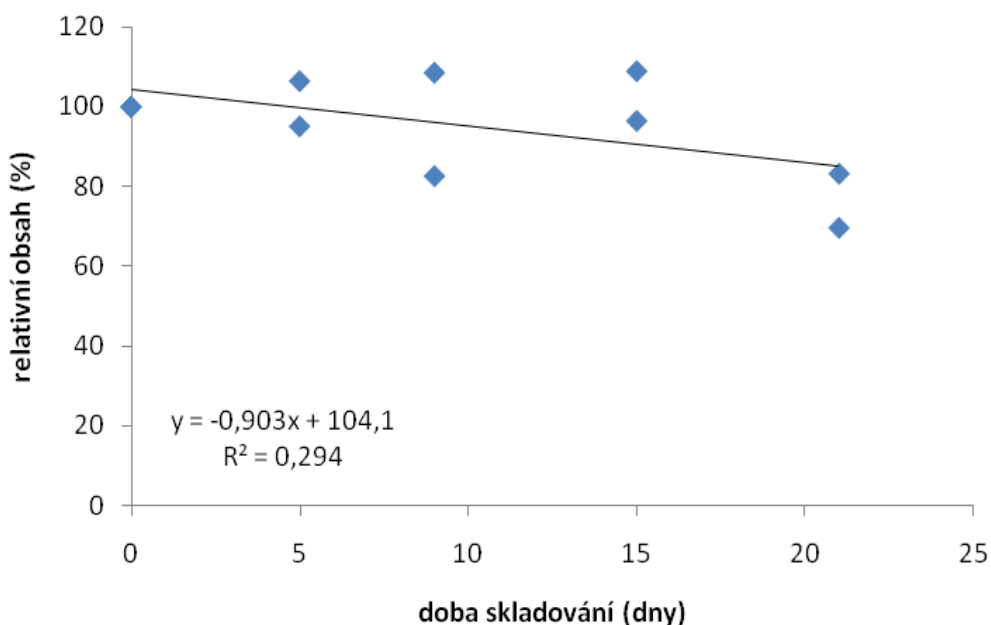
BALAMATSIA ET AL. (2006) uvedli trvalý pokles jak SPD tak SPM asi na 60-70% obsahu po porážce v kuřecích prsou skladovaných při teplotě +4 °C po dobu 17 dní u stejné modifikované atmosféry.

KRAUSOVÁ ET AL. (2008) porovnávali ztráty SPD a SPM mezi třemi systémy balení (PE, VP a MAP). Skladování jater v chladárně zabalených v modifikované atmosféře bylo nejlepší pro ochranu polyaminů.

Tab. 15: Obsah SPM ve skopové kýtě baleno v MAP

Skopová kýta	Doba skladování (dny)				
	0	5	9	15	21
Zvíře 1					
Průměr	16,56	15,99	14,34	18,19	12,09
S.D.	± 0,69	± 1,93	± 2,00	± 6,78	± 1,03
Obsah v sušině (mg/kg)	63,32	60,23	52,30	69,03	44,05
Relativní obsah (%)	100	95,11	82,59	109,01	69,56
Zvíře 2					
Průměr	15,49	18,31	22,44	14,64	14,41
S.D.	± 1,04	± 0,85	± 10,42	± 1,52	± 0,43
Obsah v sušině (mg/kg)	57,79	62,55	62,76	55,75	48,07
Relativní obsah (%)	100	106,50	108,60	96,47	83,18

Graf č. 12: Obsah SPM ve skopové kýtě baleno v MAP



Z tabulky č. 15 a grafu č. 12 vyplývá, že pokles SPM byl totožný u všech typů balení při chladírenském skladování. Jeho obsah po 21 denním skladování dosáhl relativního obsahu 85 %.

KRAUSOVÁ ET AL. (2008) udávají relativní změny obsahu SPM v plátcích vepřové panenky skladované v modifikované atmosféře na 95 %. Bylo také zjištěno, že snížení během 21 - ti denního období skladování je nevýznamné ($P < 0.05$).

BALAMASTIA ET AL. (2006) udávají ve své práci trvalý pokles asi na 60 – 70 % v kuřecích prsou.

4.6.3 Kuchyňské úpravy

Skopová kýta byla skladována šest dnů při teplotě $+2 \pm 0,5$ °C v polyethylénové fólii. Byly provedeny kuchyňské úpravy, které se běžně provádějí ve střední Evropě (vaření, dušení a pečení). Při vaření byl sáček ponořen do vroucí vodní lázně. Po ochlazení, byl stanoven obsah aminů (PUT, SPD a SPM) v mase i ve vývaru (ve vývaru nebyl detekován žádný obsah BA a PA). Dušení proběhlo podobně jako vaření. Při pečení nebyl dodáván žádný tuk a maso se peklo v porcelánové misce přikryté hliníkovou fólií, byla přidána voda.

Tab. 16: Obsah PUT při kuchyňských úpravách

Tepelná úprava	Vzorky 3 zvířat		
	3	4	5
Počáteční stav			
Obsah v sušině (mg/kg)	11,53	9,56	9,87
Relativní obsah (%)	100	100	100
Vaření			
Obsah v sušině (mg/kg)	5,84	5,82	5,69
Relativní obsah (%)	50,67	60,90	57,63
Pečení			
Obsah v sušině (mg/kg)	3,85	5,55	4,85
Relativní obsah (%)	33,42	58,00	49,13
Dušení			
Obsah v sušině (mg/kg)	6,31	5,94	5,82
Relativní obsah (%)	54,76	62,11	58,97

Z tabulky č. 16 je patrné, že k nevyššímu poklesu PUT došlo celkově při pečení, kdy nejvyšší zaznamenaný pokles byl 3. vzorku na 33,42 % počátečního obsahu. Úbytek na polovinu počátečního obsahu byl pozorovaný při vaření a dušení také u vzorku č. 3. Statistickým vyhodnocením dat bylo zjištěno, že pokles obsahu PUT je statisticky významný ($p < 0,001$), zatímco pokles ostatních aminů statisticky významný není.

PAULSEN, HAGEN A BAUER (2006) pozorovali při vaření, dušení a grilování vepřové panenky snížení obsahu PUT asi na polovinu počátečního obsahu.

Obsah putrescinu v kuřecích prsou byl pod detekčním limitem. Žádné zjizitelné hladiny polyaminů nebyly nalezeny v bujónu (KOZOVÁ, KALAČ A PELIKÁNOVÁ, 2009b).

Tab. 17: Obsah SPD při kuchyňských úpravách

Tepelná úprava	Vzorky 3 zvířat		
	3	4	5
Počáteční stav			
Obsah v sušině (mg/kg)	21,03	17,67	12,75
Relativní obsah (%)	100	100	100
Vaření			
Obsah v sušině (mg/kg)	12,06	8,79	9,52
Relativní obsah (%)	57,31	49,72	74,67
Pečení			
Obsah v sušině (mg/kg)	8,71	5,57	6,20
Relativní obsah (%)	41,40	32,55	48,64
Dušení			
Obsah v sušině (mg/kg)	15,73	8,81	7,17
Relativní obsah (%)	74,78	49,88	56,26

Z tabulky č. 17 je vidět, že ztráty pečením byly u SPD stejně jako u PUT nejvyšší. U vzorku č. 4, kde došlo ke snížení na 32,55 %. Tepelné úpravy vaření i dušení dosahovaly podobných hodnot. S rozdílem 3. vzorku, kdy při vaření byl obsah SPD 57,31 % a při dušení 74,78 % zatímco u 5. vzorku byl obsah SPD při vaření 74,67 % a při dušení 56,26 %. Statistickým vyhodnocením dat bylo zjištěno,

že pokles obsahu PUT je statisticky významný ($p < 0,001$), zatímco pokles ostatních aminů statisticky významný není.

KRAUSOVÁ ET AL. (2007) udávají významný pokles SPD na asi 70 – 60 % počátečního obsahu během vaření u vepřových jater. Rozdíly mezi úpravami testované Duncanovým testem nebyly statisticky významné v játrech upravovaných jak 24 hodin tak 6 dnů po porážce.

U ledvin dušených 1. den došlo k průměrnému relativnímu snížení na 64.2 % SPD a 66.0 % SPM. 7. den došlo ke snížení na 85.1 % SPD a 95.5 % SPM počátečních hodnot. Snížení bylo výrazné u SPD a SPM 1. den a u SPD 7. den, ale nevýznamné u SPM 7. den, pravděpodobně kvůli široké pestrosti hodnot u individuálních pokusů (KOZOVÁ, KALAČ A PELIKÁNOVÁ 2008).

KOZOVÁ, KALAČ A PELIKÁNOVÁ (2009b) pozorovali, že SPD i SPM při pečení, grilování a smažení čerstvých kuřecích prsou způsobily větší úbytek cca 40 - 60 % původního obsahu, než při vaření a dušení. Překvapivý byl relativní přírůstek SPM po převaření, počítáno v sušině. Zdá se, že kuchyňské úpravy při vyšších teplotách (pečení, smažení nebo grilování) způsobují vyšší úbytek spermidinu i sperminu než vaření nebo dušení.

Tab. 18: Obsah SPM při kuchyňských úpravách

Tepelná úprava	Vzorky 3 zvířat		
	3	4	5
Počáteční stav			
Obsah v sušině (mg/kg)	97,29	108,70	99,75
Relativní obsah (%)	100	100	100
Vaření			
Obsah v sušině (mg/kg)	59,05	55,27	79,10
Relativní obsah (%)	60,70	50,85	79,30
Pečení			
Obsah v sušině (mg/kg)	38,42	37,48	45,07
Relativní obsah (%)	39,51	34,48	45,18
Dušení			
Obsah v sušině (mg/kg)	74,60	50,83	71,29
Relativní obsah (%)	76,68	46,76	71,47

Z tabulky č. 18 můžeme pozorovat, že k nejvyššímu poklesu SPM došlo u vzorku č. 4 při pečení na 34,48 %. Stejně jako u předešlých aminů i u SPM má tepelná úprava pečením nejvyšší pokles. U dušení došlo k nejvýraznějšímu poklesu u vzorku 4 na 46,76 %, zatímco u ostatních vzorků byl pokles kolem 71,47 a 76,68 %. U vaření došlo u 4. vzorku ke snížení na 50,85 % počáteční hodnoty. Statistickým vyhodnocením dat bylo zjištěno, že pokles obsahu PUT je statisticky významný ($p < 0,001$), zatímco pokles ostatních aminů statisticky významný není.

KRAUSOVÁ ET AL. (2007) zaznamenali ztráty SPM asi na 40 % počátečního obsahu během kuchyňských úprav u pečení, které způsobilo ztrátu asi

55 %. Žádný zjistitelný obsah polyaminů nebyl v bujónu a v tuku vepřové panenky. Vliv u kuchyňské úpravy smažení bez oleje se nelišil statisticky od ostatních úprav.

PAULSEN, HAGEN A BAUER (2006) uvedli nevýrazný pokles jak SPM, tak SPD ve vepřovém mase upravovaném za podobných podmínek a navíc u masa grilovaného a vařeného v mikrovlnné troubě, a ztráty obou polyaminů dosahovaly až 26 % po vložení vepřového masa do solného roztoku a následném vaření a grilování.

U vepřových jater byly zjištěny statisticky významné poklesy obsahu SPM u všech úprav. Pokles na 73.2 %, 68.9 % a 70.6 % počátečního obsahu způsobený vařením, dušením s přidanou vodou a dušením bez vody, byl pozorován u jater upravovaných 24 hodin po porážce. Po 6 dnech skladování byly tyto hodnoty 77.5 %, 73.1 % a 63.6 % pro tyto kuchyňské úpravy jater. Rozdíly mezi jednotlivými kuchyňskými úpravami byly statisticky nevýznamné. Pečení na pánvi bez oleje způsobilo zvýšení poklesu na 56.9 % počáteční hodnoty u čerstvých jater, zatímco nejnižší pokles na pouhých 80.6 % počáteční hodnoty byl pozorován u jater skladovaných 6 dní před kuchyňskými úpravami. Ztráty asi 30 – 40 % počátečního obsahu jak SPD tak SPM během úprav vepřových jater se očekávaly. Protože byly uskutečněny pouze dva pokusy, vliv různých kuchyňských úprav by měl být podroben dalšímu studiu (KRAUSOVÁ ET AL., 2007).

5 Závěr

Cílem diplomové práce bylo stanovení obsahu putrescinu, spermidinu a sperminu ve skopovém masu. Práce se věnovala vlivu různých podmínek skladování, dlouhodobému mražení a vybraných kuchyňských úprav na obsah těchto aminů.

Na rozdíl od potravin rostlinného původu je nízká hladina putrescinu typická pro dobře ošetřené potraviny živočišného původu. Rybí omáčky, tresčí jikry a konzervované krabí maso jsou výjimky. Vysoký obsah SPM je obvyklý v masu a masných výrobcích teplokrevných zvířat. Nižší obsah SPD byl zaznamenán u ryb. Při skladování masa za působení enzymové aktivity přítomné mikroflóry dochází k růstu obsahu BA. Tohoto růstu lze využívat jako indikátoru čerstvosti masa.

Předmětem výzkumu byly vzorky skopového masa z hřbetu a kýty, poskytnuty od drobných chovatelů. Vzorky byly analyzovány po různých úpravách (mražení, chlazení a tepelné úpravy).

Mražené vzorky skopového hřbetu byly zataveny do polyethylenového obalu a byly skladovány při teplotě -18 ± 1 °C po dobu půl roku. Po půl roce došlo u PUT a SPM k poklesu na 65 % a pokles SPD byl na 90 %.

Chlazená skopová kýta byla skladována při teplotě $+2 \pm 0,5$ °C a obsah aminů byl sledován ve třech pokusech za použití různých podmínek skladování (balení v polyethylenovém sáčku, vakuově zabalené a baleno v modifikované atmosféře). Vzorky byly analyzovány 2., 5. a 9. den skladování. Nejvyšší zaznamenaný pokles aminů byl u balení v polyethylenovém obalu u PUT a SPD na 75 % a u SPM na 85 % počáteční hodnoty. Poté v modifikované atmosféře – PUT a SPM 85 % a SPD vzrostl na 118 %. Nejnižší pokles byl pozorován u vzorků balených ve vakuu – SPD 70 %, SPM 85 % a PUT klesl na 95 % počáteční hodnoty. Vakuový obal byl nejlepší pro ochranu polyaminů.

Z tepelných úprav u skopové kýty byly používány metody běžné ve středoevropské kuchyni (vaření, pečení, dušení). K nejvyššímu úbytku všech aminů došlo při pečení. Nejvyšší úbytek byl u SPD 4. vzorku na 33 % a nejnižší u PUT též 4. vzorku na 58 %. Při pečení došlo ke snížení aminů na polovinu počáteční hodnoty. Při vaření a dušení byl úbytek aminů celkem vyrovnaný. Vaření je ze zvolených kuchyňských úprav k aminům nejšetrnější. Pečení způsobuje nejvyšší ztráty aminů ze všech zvolených kuchyňských úprav.

Údaje jsou srovnatelné s publikovanými údaji v literatuře pro masa vepřová a hovězí skladovaná za stejných či podobných podmínek. Domnívám se, že má diplomová práce může být přínosem, který pomůže rozšířit údaje v literatuře.

6 Použitá literatura

- 1) Bachrach, U. (2004). Polyamines and cancer: Minireview article. *Amino Acids*, 26, 307–309.
- 2) Balamatsia, C.C., Paleologos, E.K., Kontominas, M.G., Savvaidis, I.N. (2006). Correlation between microbial flora, sensory changes and biogenic amines formation in fresh chicken meat stored aerobically or under modified atmosphere packaging at 4°C: possible role of biogenic amines as spoilage indicators. *Department of Chemistry*, 89, 9-17.
- 3) Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., & Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and enviromental challenges: Recent development. *Plant Science*, 140, 103-125.
- 4) Bardo' cz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 341–346.
- 5) Bardócz, S., Duguid, T. J., Brown, D. S., Grant, G., Pusztai, A., Ralph, A. (1995). The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *British Journal of Nutrition*, 73, 819-828.
- 6) Becker, K., Southwick, K., Reardon, J., Berg, R., & MacCormack, J. N. (2001). Histamine poisoning associated with eating tuna burgers. *Journal of the American Medical Association*, 285 (10), 1327-1330.
- 7) Bolygo, E., Cooper, P. A., Jesstop, K. M., & Moffatt, F. (2000). Determination of histamine in tomatoes by capillary electrophoresis. *Journal of AOAC International*, 83(1), 89-94.
- 8) Dadáková, E., Křížek, M., Pelikanová, T.(2009). Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, 116, (1), 365-370.

- 9) Dadáková, E., Pelikánová, T., Kalač, P. (2009). Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms. *Eur Food Res Technol*, 230, 163-171.
- 10) Deloyer, P., Peulen, O., & Dandrifosse, G. (2005). Intestinal effects of long-lasting spermine ingestion by suckling rats. *Experimental Physiology*, 90, 901–908.
- 11) Eliassen, K. A., Reistad, R., Risoen, U., & Ronning, H.F. (2002). Dietary polyamines. *Food Chemistry*, 78, 273-280.
- 12) Favaro, G., Pastore, P., Saccani, G., & Cavalli, S. (2007). Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au electrode. *Food Chemistry*, 105(4), 1652-1658.
- 13) Fernandes, J.O., Judas, I.C., Oliveira, M. B., Ferreira, I. & Ferreira, M. A. (2001). A GC-MS method for quantitation of histamine and other biogenic amines in beer. *Chromatographia*, 53, S327-S331.
- 14) Gallas, L., Standarová, E., Steinhauserová, I., Steinhauser, L., Vorlová, L. (2009). Formation of Biogenic Amines in Chicken Meat Stored under Modified Atmosphere. *Acta vet. Brno*, 79: S107–S116; doi:10.2754/avb201079S9S107.
- 15) Genaro, M. C., Gianotti, V., Marengo, E., Pattono, D., & Turi, R. M. (2003). A chemometric investigation of the effects of the cheesemaking process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). *Food Chemistry*, 82, 545–551.
- 16) Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., & Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 5(2), 42-49.

- 17) Hernandez-Borges, J., D'Orazio, G., Aturki, Z., & Fanali, S. (2007). Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines. *Journal of Chromatography A*, 1147(2), 192-199.
- 18) Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogues, M. T., Marine-Font, A., & Vidal-Carou, M. C. (1996). Biogenic amine sources in cooked cured shoulder pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3097–3101.
- 19) Chen CM, Lin LC, Yen GC (1994). *J Chin Agric Chem Soc* 32:47–60.
- 20) Kalač, P. (2006). Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: A review. *Meat Science*, 73, 1-11.
- 21) Kalač, P., Krausová, P. (2005). A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90, 219-230.
- 22) Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T., Langová, M., Veškrna O. (2005). Contents of polyamines in selected foods. *Food Chemistry*, 90, 561-564.
- 23) Kovacs, A., Simon-Sakardi, L., & Ganzler, K. (1999). Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 836(2), 305-313.
- 24) Kozová, M., Kalač, P., Pelikánová, T. (2008). Biologically active polyamines in pig kidneys and spleen: Content after slaughter and changes during cold storage and cooking. *Meat Science*, 79, 326-331.
- 25) Kozová, M., Kalač, P., Pelikánová, T. (2008). Biologically active polyamines in pig kidneys and spleen: Content after slaughter and changes during cold storage and cooking. *Meat Science*, 79, 326-331.

- 26) Kozová, M., Kalač, P., Pelikánová, T. (2009a). Changes in the content of biologically active polyamines during beef loin storage and cooking. *Meat Science*, 81, 607-611.
- 27) Kozová, M., Kalač, P., Pelikánová, T. (2009b). Contents of biologically active polyamines in chicken meat, liver heart and skin after slaughter and their changes during meat storage and cooking. *Food Chemistry*, 116, 419-425.
- 28) Krausová, P., Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T. (2006). Content of biologically active polyamines in livers of cattle, pigs and chickens after animal slaughter. *Meat Science*, 73, 640-644.
- 29) Krausová, P., Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T. (2007). Changes in the content of biologically active polyamines during storage and cooking of pig liver. *Meat Science*, 77, 269-274.
- 30) Krausová, P., Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T. (2008). Changes in the content of biologically active polyamines during pork loin storage and culinary treatments. *European Food Research and Technology*, 226, 1007-1012.
- 31) Křížek, M., & Pelikánová, T. (1998). Determination of seven biogenic amines in foods by micellar elektrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, 815(2), 243-250.
- 32) Křížek, M., & Pelikánová, T. (1998). Determination of seven biogenic amines in foods by micellar elektrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, 815(2), 243-250.
- 33) Křížek, M., Vácha, F., Vorlová, L., Lukášová, J., Cupáková, S., (2004). Biogenic amines in vacuum-packed and non-vacuum-packed flesh of carp (*Cyprinus carpio*) stored at different temperatures. *Food Chemistry*, 88(2), 185 – 191.

- 34) Lapa-Guimaraes, J., & Pickova, J. (2004). New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A*, 1045(1-2), 223-232.
- 35) Larque', E., Sabater-Molina, M., & Zamora, S. (2007). Biological significance of dietary polyamines. *Clinical Nutrition*, 23, 87-95.
- 36) Liu, M., Li, Y. G., Chou, G. X., Cheng, X. M., Zhang, M., & Wang, Z. T. (2007). Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophylic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb Radix Salviae Miltiorrhizae. *Journal of Chromatography A*, 1157(1-2), 51-55.
- 37) Miyazaki, J. H., Yang, S. F. (1987). The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 69(2), 366-370.
- 38) Moinard, C., Cynober, L., & de Bandt, J. P. (2005). Polyamines: Metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24, 184-197.
- 39) Moreira, A.P.S., Giombelli, A., Labanca, R.A., Nelson, D.L., & Glória, M.B.A. (2008). Effect of aging on bioactive amines, microbial flora, psycho-chemical characteristics, and tenderness of broiler breast meat. *Poultry Science*, 87, 1868-1873.
- 40) Moret, S., & Conte, L. S. (1996). High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic in foods – An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A*, 729(1-2), 363-369.
- 41) Motyl, T., Płoszaj, T., Wojtasik, A., Kukulska, W., & Podgurniak, M. (1995). Polyamines in cow's and sow's milk. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 111, 427-433.
- 42) Nguyen, D. T. T., Guillarme, D., Heinisch, S., Barrioulet, M. P., Rocca, J. L., Rudaz, S., et al. (2007). High throughput liquid chromatography with sub-2 mu

- m particles at high pressure and high temperature. *Journal of Chromatography A*, 1167(1), 76-84.
- 43) Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M. C. (2003). Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Journal of Food Science*, 68, 750–755.
- 44) Paik, M. J., Choi, Y. M., & Kim, K. R. (2006). Simultaneous profiling analysis of alkylphenols and amines by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 560(1-2), 218-226.
- 45) Paulsen P, Bauer F (2007) *Eur Food Res Technol*. doi: 10.1007/s00217-006-0464-0.
- 46) Paulsen, P., Dicakova, Z., Bauer F. (2007). Biogenic amines and polyamines in liver, kidney and spleen of roe deer and European brown hare. *European Food Research and Technology*, 227, 209-213.
- 47) Paulsen, P. Hagen, U., Bauer, F. (2006). Changes in biogenic amine contents, non-protein nitrogen and crude protein during curing and thermal processing of *M.longissimus, pars lumborum* of pork. *Eur Food Res Technol*, 223, 603-608.
- 48) Peulen, O., & Dandriofosse, G. (2004). Spermine-induced maturation in Wistar rat intestine: A cytokine-dependent mechanism. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 38, 524–532.
- 49) Proestos, C., Loukatos, P., & Komaitis, M. (2008). Determination of biogenic amines in wines by HPLC with pre-column dansylation and fluorometric detection. *Food Chemistry*, 106(3), 1218-1224.
- 50) Rodríguez-Caso, C., Montañez, R., Cascante, M., Sánchez-Jiménez, F., & Medina, M. A. (2006). Mathematical modelling of polyamine metabolism in mammals. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 21799–21812.

- 51) Rossano, R., Mastrangelo, L., Ungaro, N., & Riccio, P. (2006). Influence of storage temperature, freezing time on histamine level in the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (L., 1758): A study by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B –Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 830(1), 161-164.
- 52) Santos, W. C., Souza, M. R., Cerqueira, M., & Gloria, M. B. A. (2003). Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 degrees C. *Food Chemistry*, 81(4), 595-606.
- 53) Shakila, R. J., Vasundhara, T. S., & Kumudavally, K. V. (2001). A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chemistry*, 75(2), 255-259.
- 54) Silva, C. M. G., & Glória, M. B. A. (2002). Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 ± 1 °C and in chicken-based meat products. *Food Chemistry*, 78, 241 – 248.
- 55) Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., Zotou, A., Loukou, Z. (2007). Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry*, 101(2), 704-716
- 56) Špička, J., Kalač, P., Bover-Cid, S., Křížek, M. (2002). Application of lactic acid bacteria starter cultures for decreasing the biogenic amine levels in sauerkraut. *Eur Food Res Technol*, 215, 509-514.
- 57) Teti, D., Visalli, M., & McNair, H. (2002). Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *Journal of Chromatography B*, 781, 107–149.
- 58) Thomas, T., & Thomas, T.J. (2003). Polyamine metabolism and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 7, 113–126.

- 59) Vandenabeele, O., Garrelly, L., Ghelfenstein, M., Commeyras, A., & Mion, L. (1998). Use of 2-chloroethylnitrosourea, a new type of pre-column derivatizing agent for the measurement of biogenic amines, by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 795(2), 239-250.
- 60) Velíšek, J. (1999). *Chemie potravin 3.díl. OSSIS Tábor*, 1999, 331 s.
- 61) Veciana-Nogue's M.T., Marine'-Font A. and Vidal-Carou M.C.1997. BA'sas hygienic quality indicators of tuna Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines and organoleptic changes. *J. Agric. Food Chemistry*. 45: 2036 –2041.
- 62) Villanueva-Valero, B., Bauer, F., Smulders, F. J. M., Arino, A., Hagen, U., & Paulsen, P., (2005). Biogenic amines and polyamines and total aerobic count during storage of vakuüm-packaged porcine kidney, liver and spleen. *Food Science and Technology International*, 11, 337-344.
- 63) Vinci, G., & Antonelli, M. L. (2002). Biogenic amines: Quality index of freshness in red and white meat. *Food Control*, 13, 519–524.
- 64) Wallace, H. M., Fraser, A. V., & Hughes, A. (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochemical Journal*, 376, 1–14.
- 65) Yano, Y., Kataho, N., Watanabe, M., Nakamura, T., & Asano, Y. (1995). Changes in the concentration of biogenic amines and application of tyramine sensor during storage of beef. *Food Chemistry*, 54, 155–159.
- 66) Zhang, L. Y., Tang, X. C., & Sun, M. X. (2005). Simultaneous determination of histamine and polyamines by capillary zone electrophoresis with 4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B – Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 820(2), 211-219.