

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

## Bakalářská práce

# Metody prodloužení skladovatelnosti strojně děleného rybího masa

Autor: Michal Kubík

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. František Vácha, CSc.

Studijní program a obor: Zootechnika, rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2015

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum: 4. května 2015

Podpis:

### **Poděkování**

Děkuji svému vedoucímu práce doc. Ing. Františku Váchovi, CSc. za metodické vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady, trpělivost a cenné připomínky. Dále děkuji panu Ing. Tomáši Zajícovi, Ph. D. za poskytnutou pomoc při vypracování této bakalářské práce. Vlastní experimentální práce byla podpořena projektem CZ.1.25/3.1.00/13.00448.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Fakulta rybářství a ochrany vod  
Akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michal KUBÍK**  
Osobní číslo: **V12B044P**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybářství**  
Název tématu: **Metody prodloužení skladovatelnosti strojně děleného rybího masa**  
Zadávací katedra: **Ústav akvakultury**

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

Cíl: Navrhnout a ověřit působení zdravotně bezpečného přípravku na prodloužení skladovatelnosti strojně děleného masa kapra.

Vzhledem k tradičním rybím výrobkům se na trhu projevuje možnost rozšířit obchodní nabídku dalšími výrobky, které jsou připraveny na základě rybí suroviny. Strojně dělené maso je novým produktem, který má velmi vhodné nutriční složení a významný dietetický potenciál odpovídající masu čerstvých ryb.

Při rostoucích požadavcích na kvalitu výrobků a současné dodržení podmínek potravní bezpečnosti je potřeba hledat nové formy vedoucí k prodloužení doby bezpečné skladovatelnosti. Obchodní řetězce i zpracovatelé ryb potřebují detailnější poznatky při hledání vhodných forem pro tržní využití nových výrobků.

V práci budou zhodnoceny současné formy přípravy strojně děleného masa ryb a na základě mikrobiologických rozborů ověřeno působení potravně bezpečného přípravku. Bude navržen vhodný způsob aplikace přípravku tak, aby jeho použití bylo aplikovatelné při prodeji strojně děleného masa kapra.

Výsledkem práce bude i vyhodnocení vlivů působících na úspěšné obchodní uplatnění tohoto specifického výrobku.

Rozsah grafických prací: **8-12 tabulek a grafů**

Rozsah pracovní zprávy: **35-40 stran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

- Buchtová, H., Vorlová, L., 2001. Jakostní a hygienické parametry požitelných částí kapra obecného (*Cyprinus carpio*, Linn.). Veterinářství 51: 472-476 s.
- Costell, E., 2002. Acomparision of sensory methods in quality control. Food Qual. Prefer. 13: 341-353 s.
- Ingr, I., 2004. Jakost a zpracování ryb. MZLU, Brno: 29-52 s.
- Vácha, F.: Zpracování ryb, skriptum JU ZF Č. Budějovice 2000, 104 s.
- Velíšek, J.: Chemie potravin. OSSIS Tábor, 2002, soubor 3 knih. 1038 s.
- Kinclová, V., Jarošová, A., Tremlová, B., 2004. Senzorická analýza potravin. Veterinářství 4: 362-364 s.
- Matyáš, Z., 1991. Obecná hygiena potravin. VŠV Brno: 214 s.
- Pokorný, J., Valentová, H., Panovská, Z., 1998. Senzorická analýza potravin. VŠCHT; Praha: 40-75 s.
- Príbela, A., Mál'a, P., Sabolová, G., Turek, P., Máté, D., Baranová, M., Nagy, J., 2001. Senzorické hodnotenie potravinárskych surovín, aditívnych látok a výrobkov. Inštitút vzdelávania veterinárnych lekárov; Košice: 190 s.
- Vácha, F., Buchtová, H., 2005. Komodity akvakultury. JČU České Budějovice: 26-27 s.
- Huss, A., 1988. Fresh fish. Quality and quality Changes. FAO Fisheries Series No. 29 s.
- Roerbaek, K., Jensen, B., Mathiasen, K. (1993). Oxidation and aroma in fish oil. In: G. Lambertsen (ed.) Proceedings of the 17 Nordic symposium on lipids, Imatra, Sf. Lipidforum, Bergen, Norway, 175 s.
- Rudiger, J.: The Markets for Freshwater Fish in Europe. FAO/GLOBEFISH Research Programme, Vol. 49, 1998, Rome, FAO, 56 s.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. František Vácha, CSc.**

Ústav akvakultury

Datum zadání bakalářské práce: **14. února 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2015**

  
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD  
Zátiší 728/II  
369 25 Vodňany (2)

  
Ing. Jan Mráz, Ph.D.  
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. února 2014

# Obsah

<b>OBSAH</b> .....	<b>6</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>8</b>
2.1 STROJNĚ DĚLENÉ RYBÍ MASO .....	8
2.1.1 <i>Metody separování</i> .....	8
2.1.1.1 Metoda lisování.....	8
2.1.1.2 Metoda protlačování.....	9
2.2 <i>Bezpečnost potravin</i> .....	9
2.2.1 <i>Legislativa</i> .....	10
2.2.2 <i>Postmortální změny</i> .....	11
2.2.2.1 Změny autolytické.....	11
2.2.2.2 Změny proteolytické .....	12
2.2.2.3 Celkový počet mikroorganismů.....	13
2.2.3 <i>Biogenní aminy</i> .....	13
2.3 SKLADOVÁNÍ .....	16
2.3.1 <i>Metody prodlužování skladovatelnosti</i> .....	16
2.3.1.1 Skladování při různých teplotách .....	16
2.3.1.2 Ochranná atmosféra .....	17
2.3.1.3 Benzoová kyselina a její soli .....	18
2.3.1.4 Sorbová kyselina a její soli.....	18
2.3.1.5 Kyselina mléčná a její soli .....	19
2.3.1.6 Čajový a rozmarýnový extrakt.....	19
2.3.1.8 Chitosan .....	19
2.3.1.9 Enzymatické přípravky .....	20
<b>3. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>21</b>
3.1.1 <i>Přípravek SEA-i</i> .....	22
3.1.2 <i>Tekutý kouř</i> .....	22
3.2 <i>Postup práce</i> .....	22
3.3 <i>Odběr vzorků</i> .....	24
3.4 <i>Mikrobiologický rozbor</i> .....	24
3.5 <i>Biogenní aminy</i> .....	25
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>27</b>
4.1. MIKROBIOLOGICKÉ HODNOCENÍ .....	27
4.2. BIOGENNÍ AMINY .....	31
4.2.1 Histamin .....	31
4.2.2 Putrescin .....	32
4.2.3 Ostatní biogenní aminy .....	34
<b>5. DISKUZE</b> .....	<b>38</b>
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	<b>41</b>
<b>7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>42</b>
<b>8. ABSTRAKT</b> .....	<b>46</b>
<b>9. ABSTRACT</b> .....	<b>47</b>

# 1. Úvod

Rybí maso je zdrojem mnoha výživově zajímavých a esenciálních látek pro správnou funkci organismu a jeho pravidelný přísun ve stravě člověka by měl být jedním z primárních požadavků na zdravou výživu.

Spotřeba ryb, zejména těch sladkovodních, však v České republice stagnuje. Tento trend je způsoben mnoha faktory. Jako jeden z nich se uvádí malá pestrost nabídky výrobků ze sladkovodních ryb. V současné době se sortiment skládá z chlazených či uzených celých ryb, jejich půlek, filetů či příčných řezů. Nejen při zpracování filetů se však otevírá možnost strojního dělení zbylé svaloviny z kostry ryb.

Strojně dělené maso ryb je jedna z nejnovějších forem zpracování. Nabízí získávání materiálu pro další zpracování z částí ryb nevyužitých při běžné produkci. Tato surovina se pak může stát základem do různých dalších výrobků rozšiřujících sortiment. Uchovává si základní charakteristiky rybího masa a je možné uplatňovat na něj základní zpracovatelské postupy, stejně jako na rybí maso. Jako příklad lze uvést jeho uzení či sušení.

Takto zpracované maso však vyžaduje mnohem více péče v oblasti skladování a následného zpracování. Stejně jako rybí svalovina, díky svým charakteristickým vlastnostem, podléhá různým rozkladným procesům, ale obsahuje vysoký podíl volné vody, která se stává důležitým a mohutným zdrojem pro následné mikrobiální kažení. Je třeba hledat způsoby potlačující tyto procesy tak, abychom prodloužili dobu skladovatelnosti, a rozšířili tak možnost uplatnění takovýchto výrobků na trhu.

Tato práce má za cíl navrhnout a ověřit působení zdravotně bezpečného přípravku na prodloužení skladovatelnosti strojně děleného masa kapra (*Cyprinus carpio*).

## 2. Literární přehled

### 2.1 Strojně dělené rybí maso

V moderní době zpracovatelského průmyslu se stalo trendem pohlížet na zbytky po zpracování potravin z jiného úhlu. Zatímco v letech minulých byl tento materiál považován za odpad a jediným daným kritériem bylo jeho ekologické odstranění, dnes je i díky novým postupům, technologiím a výrobkům na tyto zbytky pohlíženo více jako na surovinu a je vytvářen tlak na zpracovávání takovýchto ostatků.

Ryba projde různými zpracovatelskými procesy od usmrcení přes oddělení hlavy a vyvrnutí až po filetování. Po tomto procesu zůstane skelet i s částí suroviny. Například Vácha a Vejsada (2013) uvádějí, že po filetování zůstává podél páteře a žeber část masa, které nelze z ryby odstranit jinak než separací.

Ingr (2004) v separaci vidí cestu využití zbytků svaloviny, které zůstanou po prvovýrobě na kostře ryb, ale sám dodává, že tento postup se vyznačuje řadou specifík, které je třeba řešit. Mezi tato specifika pak řadí především malý objem zpracovaných ryb, související s nízkou efektivitou, či velkou rozptýleností zpracoven. Jako cestu vidí zpracovávání separátu ve velkých podnicích. Kromě těchto ekonomických úskalí pak uvádí „rybí separát“ jako velice choulostivou surovinu, jež snadno a rychle podléhá mikrobiálnímu kažení, oxidativnímu žluknutí a z toho vyplívajícím výrazným sensorickým změnám.

Buchtová (2001) uvádí, že separát z rybího masa se vyznačuje stejnými vlastnostmi jako rybí svalovina. Zachovává si vysoký obsah bílkovin a polynenasycených mastných kyselin. Zároveň je dobře stravitelný a díky jeho struktuře se dá snadno použít jako surovina pro pestrou škálu výrobků.

#### 2.1.1 Metody separování

##### *2.1.1.1 Metoda lisování*

Lisovací metody separování rybí svaloviny byly složeny de-facto ze dvou částí. V části první byla surovina rozemleta do formy husté kašovitě hmoty a v části druhé byla tato hmota protlačována šnekovým lisem přes otvory ve stěně nebo čele lisu. Tím



došlo k celkovému rozmělnění vkládané suroviny. Tato metoda však nebyla velmi oblíbená a to především z jediného důvodu. Tím důvodem je totální rozrušení struktury svaloviny, jelikož dochází k rozdělení a rozrušení svalových vláken. Takto rozrušená svalovina se pak stává méně vhodnou pro využití k dalšímu zpracování, a je mnohem náchylnější k různým rozkladům, čímž se rapidně snižuje doba její udržitelnosti.

### *2.1.1.2 Metoda protlačování*

V protlačovacích separátorech je surovina při strojním dělení zpracovávána jednofázově. Ryba po rozpůlení, ať už vyfiletovaná či nikoli, je vkládána do separátoru, kde je postupně protlačována přes otvory v separovacím válci a to díky tlaku průběžného pásu, jenž má o něco málo menší rychlost než je rychlost válce a přítlačných válečků. Vácha a Vejsada (2013) uvádějí vhodnost otvorů ve válci 4 – 5 mm pro zpracovávání kapra. Zároveň popisují využití separátoru jako velice vhodné i pro ostatní druhy ryb a otevírají tak cestu ke zpracování různých, spotřebitelsky zajímavých, ryb. Tuto cestu lze považovat za velice zajímavou z hledisek technologických i tržních. Metoda protlačování se stala jednou z nejrozšířenějších zejména pro její výsledný produkt. Typ protlačovacích separátorů je šetrný ke svalovině a nerozemílá její vlákna tak radikálně jako lisovací typ separátorů, čímž velice napomáhá následnému zpracování a uchování. Méně poškozená struktura svaloviny je mnohem vhodnější k dalšímu zpracování do rybích výrobků typu „fishburger“ a zároveň její menší poškození umožňuje delší skladovatelnost oproti rybímu separátu ze starších separátorů.

## **2.2 Bezpečnost potravin**

Bezpečnost potravin je primárním faktorem veškerých zpracovatelských procesů. Rozhodujícím faktorem této oblasti je bezpečnostní politika, která se dá chápat jako souhrn opatření pro bezpečí a ochranu spotřebitele. Zajištění bezpečnosti potravin je jednou z hlavních složek zabezpečení zdraví obyvatel (Lukášková, 2003).

Potravní bezpečnost byla dříve definována jako situace, kdy má každý jednotlivec přístup k bezpečným a výživovým potravinám tak, aby nebyl ohrožen jeho zdravotní stav či aktivní život. Organizace FAO (světová organizace pro výživu a zemědělství)

však tuto problematiku definovala jako dosažitelnost a stabilitu potravinových zásob na národní úrovni domácností a jednotlivců.

Zajišťování bezpečnosti neboli zdravotní nezávadnosti potravin je trvalým úkolem v celé zemědělské produkci. Je zabezpečována mnoha nástroji, jež můžeme najít po celé cestě potravinového řetězce. Význam zachovávání bezpečnosti potravin po celou cestu řetězce je prioritním požadavkem a zároveň významným aspektem všech jeho fází (Matyáš a Vítovec, 1999).

### **2.2.1 Legislativa**

Bezpečnost potravin se zajišťuje především preventivním přístupem, používáním správné hygienické praxe a používáním metod založených na zásadách analýzy rizik a kritických kontrolních bodů, jak vyplývá z nařízení komise (ES) č. 2073/2005.

ČSN 56 9602 definuje bezpečnost potravin jako záruku, že potravina nebude příčinou zdravotních potíží u spotřebitele, pokud bude připravena anebo konzumována podle jejího zamýšleného použití.

V České republice je tato problematika právně ošetřena. Zákon o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb., ve znění pozdějších předpisů definuje v ustanovení § 2 zdravotně nezávadné potraviny. Musí tedy splňovat celou řadu chemických, fyzikálních a mikrobiologických požadavků na zdravotní nezávadnost. Oblasti rybářství se pak přímo týká vyhláška č. 326/2001 Sb. (pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich), která vymezuje požadavky na vybrané komodity živočišného původu, zahrnující též ryby. Co se týče zpracování, je závazné ustanovení § 22 Veterinárního zákona č.166/1999 Sb., definující povinnosti osob, které vyrábějí, zpracovávají nebo uvádějí do oběhu živočišné produkty. Zákon o potravinách pak ještě v § 18 definuje zdravotně nezávadné produkty. Další z mnoha zákonných opatření pak upravují další zákony a evropské směrnice, za zmínku zde stojí ještě zákon č.258/2000 Sb., týkající se péče o veřejné zdraví.

Na evropské úrovni je tato potravní bezpečnost upravena celou řadou nařízení a směrnic. Její zajišťování je pak ustanoveno v článku 3 nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002, v platném znění. Strojně dělené maso musí dle nařízení ES 853/2004 splňovat požadavky na čerstvé maso, teplota zpracování nesmí

přesáhnout 7 °C, maso použité k výrobě nesmí být starší 5 dnů. Pokud separované maso ihned nezpracujeme do dalších výrobků, je nezbytné, aby bylo zchlazeno na teploty nepřesahující 2 °C, případně zamrazeno na vnitřní teplotu – 18 °C.

S rychlostí postmortálních změn souvisí i výskyt biogenních aminů. Z tohoto důvodu řadíme ryby k poměrně rizikovým potravinám, což podtrhuje i stanovení maximálních koncentrací biogenních aminů pro produkty rybolovu evropskou směrnicí č. 2073/2005.

## **2.2.2 Postmortální změny**

Ingr (2010) označuje stav živého organismu jako homeostázi. Tento stav se udržuje fyziologickými procesy energetického a látkového metabolismu, které jsou katalyzovány nativními enzymy vyskytujícími se v tělních tkáních a tekutinách. Takovéto procesy metabolismu jsou podmíněné látkovou výměnou a příjmem živin.

Ihned po usmrcení se zničí podmínky pro udržení dynamické rovnováhy fyziologických dějů a začínají se projevovat postmortální biochemické dráhy. Ty se v první řadě týkají makro-energetických sloučenin, jako je glykogen, adenosintrifosfát, a bílkoviny (Vácha a Vejsada, 2013).

Rybí svalovina se ani okamžikem usmrcení nestává tzv. „mrtvou“, jelikož biologické pochody jsou v podstatě ihned zastoupeny pochody mikrobiologickými. Okamžikem usmrcení však dojde ke změně aktivity nativních enzymů. Postmortální změny rybí svaloviny Ingr (2010) v zásadě rozděluje na dvě části. Část první (autolytická), kdy dochází ke zrání svaloviny, a druhou část (proteolytickou), kdy dochází k mikrobiologickým změnám, kažení a hnití rybí svaloviny.

### *2.2.2.1 Změny autolytické*

Autolytické degradace na první pohled probíhají samovolně. Skutečnost je však taková, že jsou katalyzovány enzymy s běžným výskytem, jež živý organismus používá pro metabolické pochody. Tyto procesy probíhají v rybím mase rychleji než v mase jiných živočichů, rozdílná je také intenzita a důsledky. Veškeré autolytické procesy jsou ireversibilní a degradují složky masa přes jednodušší meziprodukty až na jednoduché

konečné produkty. Tyto degradační procesy rozdělujeme do tří neohrazených fází: posmrtné ztuhnutí, zrání masa, hluboká autolýza, které přecházejí plynule jedna v druhou (Ingr, 2010).

Autolytické procesy v rybí svalovině, které začínají okamžikem smrti, jsou postupně odsouvány do pozadí rozkladnými reakcemi proteolýzy, které řídí mikrobiální enzymy kontaminující mikroflóry. Všechny dráhy rozkladných procesů postupně degradujících energetické a stavební složky tělních tkání jsou ireversibilní (Vácha a Vejsada, 2013).

Samotná autolýza vlastně negativně ovlivňuje dobu údržnosti rybího masa i při jinak malých množstvích přítomných organismů (Sampels a kol., 2014).

### 2.2.2.2 Změny proteolytické

Proteolytické změny jsou způsobeny činností mikrobiálních enzymů. Tyto enzymy jsou tvořeny především z proteáz a lipáz. Na těle vodních živočichů je značné množství mikroorganismů a ty pak snadno pronikají do svaloviny. Tyto procesy jsou pak extrémně rychlé, pokud nedojde ihned po usmrcení k okamžitému vykuchání, opláchnutí zdravotně nezávadnou vodou a zchlazení pod 3 °C. Rybí svalovina je vhodným prostředím pro rychlý nárůst nejrůznějších mikroorganismů. Tato vlastnost je připisována mírnému a krátkému okyselení svaloviny ve fázi posmrtného ztuhnutí. Dalším ovlivňujícím faktorem je vysoké procento obsažené vody a menší podíl tkání tukových a zejména vazivových, jež představují ochranu proti průchodu mikroorganismů (Buchtová, 2001).

Ingr (2010) zdůrazňuje význam poměru mezi povrchem svaloviny a její tloušťkou. Jako příklad uvádí vykuchaného kapra obecného, respektive jeho velkou plochu svaloviny (vnější i vnitřní) a malou tloušťku svaloviny, jako ideální substrát pro rozvoj mikroorganismů. Poměr svaloviny kapra porovnává se svalovinou platýse bradavičnatého (*Platichthys flesus*), kvůli jeho malé tělní dutině. Z toho vyplývá, že separované maso, ať už jakékoliv ryby, bude předmětem okamžitého a extrémně rychlého podlehnutí proteolytickým změnám. U separovaného masa se setkáváme s nejvyšším možným poměrem povrchu a tloušťky a zároveň v něm najdeme mnoho volné vody vytvářející nejlepší možné prostředí pro okamžitý rozvoj mikroorganismů.

### 2.2.2.3 Celkový počet mikroorganismů

Celkový počet mikroorganismů je pojem, který se stanovuje pro 1 ml či 1 g vzorku, zředovací kultivační metodou. Určuje počet kolonií označovaných jako KTJ (kolonie tvořící jednotky), které vyrostly z očkovaného množství na nebo v živné půdě s předepsanou hodnotou pH. Tato metoda má též předepsané kultivační teploty a kultivační čas. Počet KTJ se pak násobí v závislosti na hodnotě zředění vzorku. Takto stanovený počet KTJ vyjádří obvykle jen určité procento z reálného počtu bakterií vyskytujících se na nebo ve vzorku. To je důvod označování „celkového počtu mikroorganismů“ v uvozovkách (Görner a Valík, 2004).

### 2.2.3 Biogenní aminy

Jedním z hledisek posuzování čerstvosti je i obsah bílkovin – resp. jejich degradačních produktů. V mém výzkumu jsme se pak zejména zaměřili na tzv. biogenní aminy. Punakivi a kol. (2006) uvádí, že stanovení biogenních aminů je důležité z hlediska kvality potravin a také z hlediska potravní bezpečnosti, jelikož potravina obsahující vysoké množství biogenních aminů může mít neblahé následky na lidské zdraví. Následky pozření takovéto potravin může díky svým toxikologickým účinkům vyvolat nevolnost, pocení, bolesti hlavy a hyper či hypotenzi.

Baixas – Nogueras (2009) popisuje důležitost monitoringu výskytu biogenních aminů především ze dvou důvodů. Tím prvním je samozřejmě hledisko hygienické. Tím druhým je pak jejich potenciál na poškození lidského zdraví.

Biogenní aminy vznikají dekarboxylací aminokyselin způsobenou mikrobiálními dekarboxylázami. Ty odštěpí z aminokyseliny oxid uhličitý a vzniknou mono či diaminy. Jejich kostra je uložena ve výchozích aminokyselinách. Při rozkladu cyklických aminokyselin se tvoří produkty vykazující vysoký zápach – indol, fenol. Z aminokyselin obsahujících síru pak sirovoďík. Při rozpadu aminokyselin pak může vznikat velká škála jednoduchých látek a také velké množství plynů. Míru vzniku konečných produktů rozkladu bílkovin pak přímo ovlivňuje kvalita i kvantita rozkládající se svaloviny, zejména pak složení bílkovin a jejich aminokyselin. Volné

aminokyseliny se výrazně promítnou do finálního charakteru rozkladných procesů (Vácha a Vejsada, 2013).

Biogenní aminy jsou skupinou různých bází odvozených od aminokyselin, které vykazují různé biologické účinky. Biogenní aminy odvozené od bazických a aromatických aminokyselin jsou v nízkých koncentracích přirozenou součástí mnoha potravin z důvodu jejich významné funkčnosti v živočišných i rostlinných tkáních. (Velíšek, 1999). Jsou též biologicky významné látky pro organismus člověka. Jejich působení v malé míře je dokonce nepostradatelné, jako příklad lze uvést histamin, který působí jako lokální tkáňový hormon, ovlivňuje sekreci žaludečních šťáv a krevní tlak. Biogenní aminy lze najít v jakékoli potravine jako běžný produkt degradace aminokyselin. Jejich výskyt je podmíněn i teplotou skladování. Při teplotách kolem 0 °C je jejich výskyt minimální, zato pokud stoupne teplota na 5 °C, dochází k okamžitému nárůstu degradačních procesů, jež produkují především histamin a putrescin. Kromě teploty je mikrobiální činnost také závislá na množství kontaminace mikroorganismy. Hlavními biogenními aminy jsou histamin, kadaverin, putrescin, a tyramin (Buchtová, 2001).

Biogenní aminy byly detekovány v potravinách po celém světě. Jejich vytváření je výsledek mikrobiologické činnosti v průběhu stárnutí potraviny a jejího skladování. Mezi potraviny s nejvyšší pravděpodobností výskytu biogenních aminů patří výrobky z ryb, masné výrobky, vejce, sýry, fermentované výrobky a sójové výrobky. Je nesporné, že největší pozornost týkající se výskytu biogenních aminů by měla být věnována rybám a rybím výrobkům. Hlavním důvodem je obsah červené svaloviny s vysokým obsahem volného histidinu. Díky znalosti produkce histaminu představují biogenní aminy kritérium kažení nebo zhoršování kvality rybích výrobků (Shalaby, 1997), což potvrzuje i Silla-Santos (1996) tvrzením, že obsah biogenních aminů, i přes jeho možnou nesouvislost s výskytem mikroflóry, lze užívat jako ukazatel čerstvosti masa, respektive indikátor jeho kažení.

Množství a druh vznikajících aminů je přímo závislé na chemickém složení potraviny. Silně ovlivněné je kvalitou surového produktu a mikrobiální flórou. Mezi další parametry řadí Barbuzzi a kol. (2009) například teplotu skladování a způsob balení. Při skladování dochází k nárůstu výskytu aminů, proto některé z nich skýtají potenciál v hodnocení čerstvosti. V čerstvém rybím mase je obsah biogenních aminů malý, například v mase tuňáka (*Thunnus thynnus*) bývá 0 – 10 mg.kg<sup>-1</sup> histaminu

a 0 – 2 mg.kg<sup>-1</sup> tyraminu (Velíšek, 1999). Obsah biogenních aminů však roste při nevhodném skladování. Při skladování ryb v teplotách kolem nebo pod 0 °C biogenní aminy téměř nevznikají. Při vyšších teplotách podléhá dekarboxylaci především histidin. Také ostatní biogenní aminy vznikají v relativně vysokém množství. Optimální teploty jsou značně rozdílné (pro histamin 5 – 38 °C) a závisí především na druhu kontaminující mikroflóry. V mase ryb zastává důležité postavení mezi biogenními aminy agmatin, jehož běžný výskyt se uvádí v rozmezí 1 – 3 mg.kg<sup>-1</sup>. Zvýšené koncentrace tohoto aminu můžeme pozorovat u některých koryšů a především u sušených ryb (Velíšek, 1999).

Při stanovování hranice toxicity biogenních aminů Velíšek (1999) naráží na problém jejich enzymatické odbourávání monoaminoxidásou či diaminoxidásou. Hodnota těchto enzymů je u každého jedince rozdílná a závislá na řadě faktorů, například na výskytu inhibitorů v léčivech apod. Nedostatečná znalost různých biogenních aminů má pak za následek stanovení maximálních hodnot pouze pro histamin a tyramin.

Tvorbu histaminu velice zpomaluje solení důsledkem inhibičního účinku na histidin dekarboxylázovou aktivitu (Kang a Park, 1984). I tak ale halo-tolerantní bakterie jsou schopny produkovat biogenní aminy v mase sardinek (*Sardina pilchardus*) s obsahem 12 % kuchyňské soli (Yatsunami a Echigo, 1993). Stejně tak byl zjištěn zvyšující se obsah Histaminu v průběhu nakládání rybích výrobků (Shalaby, 1990). Tento trend byl pozorován i u solených a nakládaných vzorků (Pechanek a kol., 1983; Shalaby, 1995).

Část histaminu vytvořená v průběhu skladování se ztrácí při procesu konzervace (Shalaby, 1990), ale tyto ztráty nejsou dostatečné k povolení konzervace takto znehodnocených ryb.

Obsah biogenních aminů nebyl výrazně snížen ani sterilizací (Shalaby, 1990), zhruba 90% biogenních aminů přežilo sterilizaci v mase tuňáka a makrel (*Scorpaenopsis scorpaenoides*) (Luten a kol., 1992). Naopak Fran a Sims (1987) uvádí, že podmínky předvaření následného tepelného zpracování konzerv tuňáka významně snížily hladinu výskytu biogenních aminů a zároveň konstatují, že výskyt zvýšených limitů putrescinu a kadaverinu v konzervách tuňáka je odrazem kvality použité suroviny. Při použití původní suroviny, která již dospěla do stádia pokročilého rozkladu, bude výskyt biogenních aminů nad povolené limity i při použití sebelepších konzervačních metod.

## 2.3 Skladování

Jakýmkoli technologickým procesem, jímž je maso rozděleno na menší části, se enormně zvětšuje plocha přicházející do styku s kontaminanty. To umožní rychlejší pomnožování bakterií, které má za následek urychlení autolýzy a proteolýzy. Ať už jsou takovéto výrobky určené k přímé spotřebě či nikoli, nesmí jejich teplota překročit 4 °C (Drdák a kol., 1996).

Strojně dělené maso je ideální pro rozvoj mikroorganismů, což zvyšuje jeho náchylnost k mikrobiální proteolýze. Tomuto přispívá i zvýšení teploty masa při separaci. Jako ideální se považuje zpracování suroviny ihned po jejím získání a neměla by překročit teplotu 3 °C. Jako vhodnou techniku uskladnění udává teplotu -18 °C a to maximálně po tři měsíce (Ingr, 2003).

Z hlediska mikrobiální dekontaminace je praní základním úkonem. Po oprání a odkapání je třeba rybí svalovinu zchladit na 0 – 2 °C, či tepelně opracovat. Chladírenským skladováním rybí maso lze uchovat, ale jen po velmi krátkou dobu. Ingr (2004) také vidí cestu prodloužení údržnosti v balení do plynné atmosféry. Ta je složena z plynů (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> a O<sub>2</sub>), které vytváří obranu proti aerobním bakteriím.

### 2.3.1 Metody prodlužování skladovatelnosti

#### 2.3.1.1 Skladování při různých teplotách

Yoshida a Nakamura (1982) neprokázali v čerstvé rybě žádnou známku histaminu. Když se však čerstvá makrela uchovávala při pokojové teplotě, úroveň histaminu se zvýšila až na 28,4 mg.kg<sup>-1</sup> po 24 hodinách a na 1540 mg.kg<sup>-1</sup> po 48 hodinách. Histamin se také snadno vytvoří, když je celá ryba uchovávána při středně zvýšené teplotě, i když čerstvá ryba byla prostá histaminu, jak deklarují Frank a kol. (1981).

Rybí svalovina je, co se údržnosti týče, jedna z velmi obtížně údržných surovin. Základem údržnosti je uchovávání rybí svaloviny, či výrobků z ní, ve velmi nízkých teplotách. Jeden z hlavních důvodů tohoto jevu je obsah glykogenu v rybí svalovině, respektive jeho velmi nízký obsah. Degradací glykogenu ve svalovině jatečných zvířat pak dochází ke snižování pH, které má samo o sobě přirozený ochranný účinek (Buchtová, 2001). V sardinkách skladovaných v chladničce (při 4 - 5 °C), nebo



v drceném ledu se zvýšil obsah biogenních aminů. Toxické úrovně histaminu byly zjištěny pouze v případě pokročilého stádia rozkladu sardinky (El-Akel, 1993). Stejně výsledky publikoval Murray a kol. (1982), který uvádí, že hladina histaminu v makrele skladované v ledu nepřekračuje  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , ačkoli se postupem času zkaží a stane nezpůsobitou k jídlu. Skladování ve vyšších teplotách, zejména výše  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , vede k výskytu vysokých úrovní histaminu.

Shalaby (1990) uvedl, že existuje trend úbytku koncentrací spermidinu a sperminu ve vztahu k ostatním biogenním aminům až do konce doby skladování. Vzestupný trend změn v koncentracích kadaverinu, putrescinu a zejména histaminu je ovlivněn spíše skladovacími podmínkami nežli druhem ryby.

Wei a kol. (1990) navíc neprokázali žádný příznivý účinek vakuového balení na bakteriální růst ani produkci biogenních aminů, ale potvrdili, že nízká teplota skladování je podstatně efektivnější než vakuové balení. Při testování výskytu bakterií produkujících histamin vykazovaly vzorky skladované při teplotě  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  výrazný růst bakterií a měly vyšší hladinu histaminu než ty, které byly skladovány při  $2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Biogenní aminy mohou být produkovány v mase makrel a sardinek během skladování v teplotních podmínkách nepřesahující  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  (Tiecco a kol., 1984). Histamin byl zjištěn ve všech z 52 testovaných zmrazených rybách (Pechanek a kol., 1983). Naopak Hardy a Smith (1976) uvádějí, že míra produkce histaminu byla mnohem nižší v mase zmražené makrely. Nulové hodnoty Histaminu byly zjištěny i po více než 72 týdnech skladování při  $-12 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-14 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $-29 \text{ }^\circ\text{C}$ . (Schulze a Zimmermann, 1982) uvádějí, že při skladování tuňáka při  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  se hodnoty biogenních aminů v průběhu skladování nemění.

### *2.3.1.2 Ochranná atmosféra*

Modifikovaná atmosféra plyny ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ , a  $\text{O}_2$ ) je také jedna z cest prodloužení údržnosti. Složení takovéto atmosféry pak závisí na druhu ryby, použitém obalovém materiálu a teplotě skladování. (Buchtová, 2001).

### 2.3.1.3 Benzoová kyselina a její soli

Benzoová kyselina a její soli, zejména pak benzoát sodný, jsou hojně využívané konzervační látky, které se vyskytují v nízkých koncentracích i běžně v přírodě. Dabrowski a kol. (2002) provedli studii mikroflóry na plátcích sledě (*Clupea harengus*). Pozorovali, že benzoát sodný snižuje rozmanitost bakterií a kvasinek ve vzorcích. I přes tuto inhibici se celkový počet mikroorganismů nikterak nelišil. To deklaruje fakt, že při vyloučení některých rodů bakterií z daného vzorku byly tyto bakterie objemově nahrazeny bakteriemi jiného typu.

Výhody benzoové kyseliny jsou v její ceně a jednoduchosti implementace do výrobků, bezbarvosti a neovlivněním chuti. Díky těmto vlastnostem se stala jedním z nejplošněji využívaných aditiv v produktech akvakultury (Chiple, 2005).

Benzoové kyseliny se obvykle využívá na prodloužení skladovatelnosti surimi, strojně děleného rybího masa a jiných mletých výrobků z ryb. Heruwati a kol. (2008) uvádí inhibici tvorby histaminu, až do výše 88,9%, v mase tuňáka při 30 minutovém ponechání v 0,1% benzoové kyselině a následném skladování po dobu osmi hodin za pokojové teploty.

### 2.3.1.4 Sorbová kyselina a její soli

Sorbová kyselina je mohutně využívána v potravinářství, jelikož po přidání do potravin prakticky neovlivní jejich chuť ani vůni (Sergeeva a kol., 2009). Je dostupná v podobě solí se zbytkem oxidantu, tj.: sorban sodný, sorban draselný a sorban vápenatý. Kyselina sorbová je známá především díky její schopnosti inhibovat kvasinky, plísně a bakterie (Sofos, 2000). Nicméně rozsah účinku inhibice je i tak závislý na kmenu a druhu vyskytujících se druhů mikroorganismů. To je zapříčiněno schopností některých mikroorganismů metabolizovat sloučeniny kyseliny sorbové, díky čemuž jsou proti takovému ošetření odolné (Stopforth a kol., 2005).

Bylo již prováděno mnoho výzkumů na způsob použití sorbové kyseliny ať už samostatně nebo s dalšími komponenty. V další studii Suprapti (2008) udává výborné výsledky při prodlužování skladovatelnosti za použití kyseliny sorbové smíšené s kyselinou benzoovou.

### 2.3.1.5 *Kyselina mléčná a její soli*

Doores (2005) prokázal antimikrobiální vlastnosti kyseliny mléčné na různých druzích masa, při jejím použití jakožto ponořovací lázně. Inhibice růstu nežádoucích bakterií přisuzuje důsledku snížení hodnoty pH na úroveň neslučitelnou s růstem bakterií.

Vácha a Pavlíček (1999) zkoumali vliv přípravku Purac a Purasal na prodloužení údržnosti rybího masa. Účinnými látkami byla kyselina mléčná v 80 % koncentraci, získaná při fermentaci cukrů. I přes její kyselou chuť je Purac v potravinářství hojně využíván. Purasal je založen na působení mléčnanu sodného. Účinnost těchto přípravků byla hodnocena mikrobiologickým rozbohem a jako ukazatel byl stanoven celkový počet mikroorganismů, psychofilních a psychrotrofních zárodků. Rozbory prokázaly redukci sledovaných skupin mikroorganismů. Použití těchto přípravků je jedna z cest k prodloužení skladovatelnosti rybího masa, včetně separátu.

### 2.3.1.6 *Čajový a rozmarýnový extrakt*

Přírodní konzervační látky, jakou jsou čajové polyfenoly a extrakt z rozmarýnu, jsou široce využitelnými látkami v potravinářském průmyslu, díky jejich dobrému konzervačnímu účinku (Li a kol., 2012). Konzervační účinek čajových polyfenolů a rozmarýnového extraktu je především v jejich schopnosti inhibovat některé enzymatické aktivity, stejně tak jako schopnost pohlcovat volné radikály, díky čemuž předcházejí oxidaci lipidů. Studie ukázala, že ošetření ponořením do 0,2% roztoku čajových polyfenolů či 0,2% extraktu z rozmarýnu může efektivně působit na zpomalení mikrobiálního růstu, zpoždovat chemické rozklady, zachovat nebo zlepšit senzorické vlastnosti a prodloužit skladovatelnost tolstolobika bílého (*Hypophthalmichthys molitrix*) o šest až osm dní chladírenského skladování (Fran a kol., 2008). Přírodní konzervační látky jako jsou čajové polyfenoly či extrakt z rozmarýnu mohou být použity jako bezpečná metoda prodloužení skladovatelnosti.

### 2.3.1.8 *Chitosan*

Chitosan je přípravek vyráběný převážně ze skořápek koryšů. Jedná se o druhý nejhojněji zastoupený polymer v přírodě ihned po celulóze (Shahidi a kol., 1999).

Chitosan, jako přírodní potravinářská přísada, přitahuje mnoho pozornosti. Mohou za to jeho specifická povaha a vlastnosti. Má netoxickou povahu, působí antibakteriálně, má vlastnost tvoření filmu, je to spolehlivý antioxidant, je biokompatibilní a zejména biologicky rozložitelný (Majeti a Ravi, 2000). Kim a Thomas (2007) uvádí možnost použití chitosanu v potravinách jako antioxidantní a antimikrobiální látku pro použití v masném průmyslu. Kromě toho má chitosan také využití v obalových vrstvách a povlacích. Hlavní využitelnou předností chitosanu je jeho bezproblémová konzumovatelnost.

Fan a kol. (2009) prováděli jeden z prvních výzkumů využití chitosanu při dlouhodobém prodlužování skladovatelnosti. Jejich výzkum byl zaměřen na zhodnocení účinku chitosanu při prodlužování skladovatelnosti tolstolobika. Dle jejich výsledků použití chitosanového povlaku na rybí svalovině může vést k dlouhodobějšímu uchování charakteristických vlastností a prodloužení trvanlivosti během skladování. I jejich hodnocení mikrobiologických, chemických a senzorických vlastností dopadlo výborně.

### *2.3.1.9 Enzymatické přípravky*

Jsou novou alternativní cestou k přípravkům na bázi chemických či antibiotických inhibitorů růstu mikroflóry. Jedním z typů enzymatických přípravků je i výrobek belgické společnosti Bianca. Výrobek SEA-i se skládá z přírodních bioaktivních proteinů. Tyto proteiny jsou přírodního charakteru a zároveň mají široký rozsah inhibice na gram-pozitivní i gram-negativní bakterie, kvasinky a plísně. Díky této vlastnosti jsou vhodným prostředkem ke zpomalení či zastavení rozkladných procesů způsobených okolní mikroflórou, čímž umožňují prodloužení skladovatelnosti pro široké spektrum potravin (Břečka, 2014).

### 3. Materiál a metodika

Ryby pocházely z kontrolovaných podmínek vodního prostředí (hodnoty vodivosti, koncentrací hydrogenuhličitanů (alkalita), celkového N a P, chlorofylu-a lze konstatovat vliv teploty skladování na jeho výskyt. Dalším potvrzeným vlivem na inhibici výskytu tohoto aminu se pak potvrdilo uzení, použití tekutého kouře i přípravku SEA-i. Ten však v kombinaci s tepelným zpracováním ztrácí na účinnosti. To je dle mého názoru způsobeno cukry, na které jsou navázané účinné látky přípravku. Ty se pak působením tepla mohou oddělit od enzymů a stát se potravní základnou pro bakteriální či enzymatické změny hodnoty průhlednosti zajišťovala firma ENKI, o.p.s.). Ryby pro další postup byly zabity, odšupinovány, byly odříznuty ploutve a hlava. Následně byly zpracovány tak, že byla strojně dělena svalovina a kosti. Při tom dochází k desintegraci svalových vláken, které je na typu námi použitého protlačovacího stroje šetrnější, než při použití jiných typů separátorů, využívajících princip celkové desintegrace hmoty a její následné dělení lisováním.

Návazný postup přípravy výrobku probíhal za aplikace přírodního anti-mikrobiálního přípravku SEA-i (bližší charakteristika je uvedena dále), s následným nasolením a aplikací tekutého kouře.

Postup byl doprovázen mikrobiologickými rozbory na zjištění koliformních bakterií *Escherichia coli* a celkového počtu mikroorganismů. Rozbory prováděl Státní veterinární ústav Jihlava v akreditované laboratoři v Českých Budějovicích. Současně byly výrobky podrobeny testům na výskyt biogenních aminů. Jejich stanovení a hodnocení bylo prováděno na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity. Řízení a úpravu chladících cyklů zajišťovala firma Talř elektronik.

Při přípravě výrobku byla použita vakuově balená, strojně dělená svalovina. Pro zajištění stejnorodosti a vyrovnanosti byla homogenizována na zařízení Kenwood KM 070. Planetární systém homogenizace na tomto zařízení je šetrný k uspořádání svalových vláken a umožňuje lepší zachování původních vlastností separátu pro další hodnocení.

### 3.1.1 Přípravek SEA-i

SEA-i je přírodní enzymatický anti-mikrobiální produkt. Skládá se z různých enzymů, substrátů a kofaktorů. Použité látky jsou přírodního charakteru, jsou přítomny v těle v každodenní stravě. Účinnost přípravku je převážně odvozena od laktoperoxidázy (Lp-s) a výsledkem působení má být inhibice mikroorganismů, zlepšení kvality a potravní bezpečnosti výrobků bez použití dalších přídatných látek. Pro použití do strojně děleného rybího masa byl doporučen přípravek SEA-i F75. Je uváděno, že SEA-i má bakteriostatický efekt na široké spektrum mikroorganismů, včetně bakterií, kvasinek, plísní a virů. Při tom různé skupiny bakterií vykazují různý stupeň citlivosti na SEA-i. Gram-negativní (*Pseudomonas* sp., koliformní bakterie, *Salmonella* a *Shigella*) jsou trochu více citlivé než Gram-positivní (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*).

Zahraniční výrobce přípravku uvádí, že po době působení klesnou aktivní komponenty na nevýznamnou úroveň a v konečném produktu není žádná následná aktivita. Použití přípravku je v souladu s Codex Alimentarius, EU a amerického FDA (úřad pro kontrolu potravin a léčiv).

Optimální podmínky pro aplikaci jsou při pH mezi 3,6 až 8,3. Pro aktivaci je potřeba minimálně 20 % volné vody. Přípravek je silně hydrofobický.

### 3.1.2 Tekutý kouř

Bylo použito tekuté kouřové aroma pro potravinářský průmysl od firmy Lay Gewurze. Certifikováno podle IFS: registrace š. 071073 IFS. Číslo výrobku 17046, šarže P13389177 s trvanlivostí do 18. 7. 2015.

## 3.2 Postup práce

V této části práce jsme odzkoušeli pět variant výrobků. Dva typy horkovzdušně uzeného produktu, dva typy produktu s použitím tekutého kouře a jeden s použitím samotného biologického přípravku na prodloužení skladovatelnosti.

V tomto segmentu práce hodnocení postupu zpracování probíhalo v šesti skupinách - pět výše uvedených a další skupina jako kontrolní, pro porovnání potravně bezpečnostních parametrů v testovaných skupinách.

Přídavek kuchyňské soli (2 %) byl aplikován do všech hodnocených skupin vzorků. Pro všechny varianty výrobku byl volen jednoduchý a snadno aplikovatelný technologický postup.

Pro variantu výrobku, kde bylo použito horkovzdušného uzení, byl použit následující technologický postup: vakuově balené strojně dělené maso bylo prosoleno kuchyňskou solí v dávce 2 % na kg masa a promícháno strojkem s planetovým míchacím zařízením. Poté v udící komoře proběhlo předsušování při teplotě 60 °C po dobu 14 minut. Následovalo propékání při teplotě 85 °C po dobu 12 minut a poté zakuřování kouřem z bukových pilin při teplotě 72 °C po dobu 10 minut. Tento postup byl v zásadě použit i u další varianty s tím, že v případě horkovzdušného uzení byl po prosolení přidán přípravek SEA-i. Ten byl připraven tak, že před jeho aplikací bylo potřebné množství přípravku pro koncentraci 100 mg.l<sup>-1</sup> (1%) rozpuštěno v destilované vodě a s prodlevou dvou hodin pro aktivaci enzymových složek byl aplikován.

Výrobky, kde byl využit tekutý kouř, také vycházely z použití vakuově baleného strojně děleného masa, jako základní suroviny. To bylo prosoleno kuchyňskou solí v dávce 2 %, přidán tekutý kouř v dávce 3 % a vše bylo promícháno strojkem s planetovým míchacím zařízením. Přípravek SEA-i byl aplikován obdobným způsobem a v dávce, jak je výše uvedeno. Poté proběhlo v tepelném zařízení předsušování při teplotě 60 °C po dobu 14 minut. Následovalo propékání při teplotě 85 °C po dobu 12 minut.

V další (páté) variantě byla ověřována účinnost samotného enzymatického přípravku SEA-i na skladovatelnost výrobku.

Specifikace duplikovaných skupin pro hodnocení rozvoje mikroorganismů a vývoje biogenních aminů:

1. kontrolní skupina – k ní se porovnávaly hodnoty z dalších skupin
2. aplikace horkovzdušného uzení
3. horkovzdušné uzení a 1 % přípravku SEA-i
4. skupina vzorků, kde byly aplikovány 3 % tekutého kouře
5. skupina, kde bylo použito 3 % tekutého kouře a 1 % přípravku SEA-i
6. skupina pro ověření účinnosti samotného přípravku SEA-i.

### 3.3 Odběr vzorků

Vzorky byly odebírány a analyzovány ve třech opakováních po 0 (čerstvé maso), 4, 7, 10, 14, 21, 28 dnech skladování. Uchovávání a skladování vzorků proběhlo v termoizolačních skříních v režimu přísně řízené teploty (3 °C). Vzhledem k typu produktů nebyl aplikován duální postup teplotního režimu uchovávání.

K přepravě vzorků do mikrobiologické laboratoře ve Státním veterinárním ústavu byly používány termoizolační boxy s vloženými zásobníky ledu. Převoz vzorků trval kolem 30 minut.

Vzorky pro stanovení obsahu biogenních aminů byly zpracovány bezprostředně po jejich odběru z termoizolační skříně, podle výše uvedeného rozpisu odběrů.

Experiment byl navržen tak, aby průběh tvorby biogenních aminů představoval dynamickou fázi. Intervaly vzorkování byly vybrány vzhledem k předchozím zkušenostem s různými vzorky potravin a dynamikou tvorby biogenních aminů. Na počátku skladování jsou změny v obsahu aminů menší, hůře předvídatelné.

U kontrolních vzorků byly analýzy ukončeny po osmadvacátém dnu skladování vzhledem k jejich špatným sensorickým vlastnostem. Uzený výrobek a výrobek s přípravkem SEA-i byl na zjištění výskytu biogenních aminů rozborován až do dvaadvacátého dne skladování.

V přehledu pro mikrobiologické hodnocení jsou uváděny dva typy výsledků. Nejprve je uvedeno hodnocení rozvoje mikroorganismů po 20 dnech. To už je více než dostatečná doba pro tento typ výrobku a dobře ilustruje průběh změn. Pro dokumentaci dalšího vývoje změn byly rozborové prováděny až do dvaadvacátého dne.

### 3.4 Mikrobiologický rozbor

Pro posouzení výrobku po stránce rozvoje mikroorganismů byl hodnocen celkový počet mikroorganismů a výskyt bakterie *Escherichia coli*. Hodnoty jsou uváděny v jednotkách KTJ.g<sup>-1</sup>.

KTJ je česká modifikace zkratky CFU. Jde o zkratku překladu anglického termínu „colony forming unit“, v češtině pak kolonii tvořící jednotka. Mikrobiologové při zjišťování počtu bakterií nebo jiných mikrobiálních buněk vycházejí z předpokladu, že jedna buňka se může na pevném médiu namnožit na kolonii buněk. Zkratka KTJ tedy vyjadřuje celkový počet životaschopných buněk, které se stanoví plotnovými metodami.



Zkoumaný vzorek se nanáší na Petriho misku s pevným médiem, a po inkubaci se spočítají vytvořené kolonie.

Použité metody:

ČSN EN ISO 4833 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.

ČSN ISO 16649-2 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu beta-glukuronidázopozitivních *Escherichia coli*.

Část 2: Technika počítání kolonií vykultivovaných při 44 °C s použitím 5-bromo-4-chloro-3-indolil beta-D-glukoronidu.

Stanovení glukuronidázopozitivních bakterií *Escherichia coli* zachycuje pohled na zdravotní nezávadnost a potravní přijatelnost výrobku.

### 3.5 Biogenní aminy

Biogenní aminy jsou přírodní antivýživové faktory. Jsou důležité z potravně bezpečnostního a hygienického hlediska. Jsou zapojeny jako původce v řadě otrav jídlem, a jsou schopny iniciovat různé farmakologické účinky.

Můj postup sledoval toto potravně bezpečnostní riziko, které je u děleného masa velmi aktuální.

Prekurzory biogenních aminů:

Histidin	Histamin
Tyrosin	Tyramin
Hydroxytryptofan	Serotonin
Tryptofan	Tryptamin
Lysin	Kadaverin
Ornitin	Putrescin
Arginin	Agmatin, Spermin, Spermidin

Extrakce vzorků a derivatizace:

Vzorky byly homogenizovány na Ultra-Turrax T25 homogenizéru (IKA Labortechnik, Staufen, Německo). Biogenní aminy byly extrahovány

z homogenizovaného materiálu, zředěnou kyselinou chloristou, *p.a.* (0,6 M). Po filtraci se objem doplní na 150 ml kyseliny chloristé. Aminy byly stanoveny jako dansyl deriváty po derivatizaci s dansylchloridem na UPLC (ultra účinná kapalinová chromatografie). Analýzy UPLC byly prováděny na Agilent řadě (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Systém je vybaven binárním čerpadlem, micro-vakuum odplyňovačem, vysoce výkonným autosamplerem a detektorem diodového pole. Zpracování dat bylo provedeno pomocí ChemStation pro 3D LC systém (Agilent Technologies).

## 4. Výsledky

### 4.1. Mikrobiologické hodnocení

V přehledu (grafy 1 až 4) je uvedeno hodnocení rozvoje mikroorganismů po dvaadvaceti dnech. Pro mikrobiologické hodnocení potravin je dvacet dní více než dostatečná doba a dobře ilustruje průběh změn.

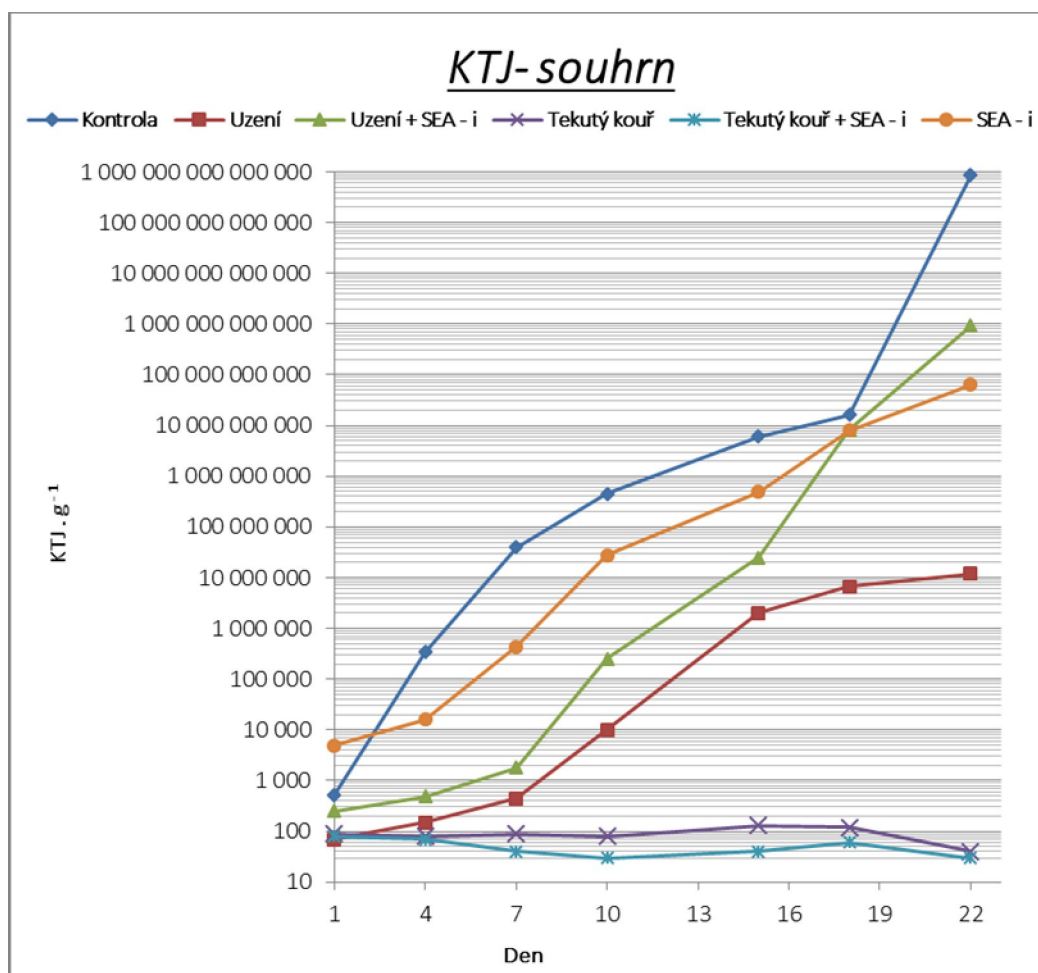
Podle zkušebních protokolů, zpracovaných ve Státním veterinárním ústavu, se potvrdil nízký výskyt bakterií *Escherichia coli*. Ve všech případech, v průběhu celého sledování jednotlivých variant produktů, se pohyboval na úrovni nižší než 10 KTJ.g<sup>-1</sup>. To dává dobrý obrázek o zdravotní nezávadnosti postupu zpracování u hodnocených produktů.

K mikrobiologickému hodnocení, dále dokladovanému na grafech, je potřeba uvést, že potravní bezpečnost masných výrobků při vyjádření celkového počtu mikroorganismů je uváděna v hodnotách v rozmezí pěti až pětiset milionů KTJ. Limity uvádí norma Pravidla správné hygienické a výrobní praxe. Norma je doporučením pro stanovení a aplikaci mikrobiologických kritérií v rámci celého potravinového řetězce.

Pro námi testované výrobky to obecně odpovídá době kolem desátého dne skladování. Výrobky, které prošly tepelným opracováním, dosahují této hodnoty kolem patnáctého dne skladování a výrobky s použitím tekutého kouře vykazují ještě delší dobu skladovatelnosti (graf 4).

V souhrnném grafu mikrobiologie (graf 1) se můžeme zaměřit na rozdíly v koncentraci kolonie tvořících jednotek mezi jednotlivými skupinami vzorků v závislosti na zpracovatelském postupu. Skupiny vzorků, které nepodléhaly tepelnému zpracování, jsou, co se týče KTJ, nejbohatší. Kontrolní skupina se na konci dvaadvacátého dne dostala k biliardové hranici. Skupina s přídávkem SEA-i se zastavila na stovkách miliard jednotek. Mezi ně se v řádech bilionů vměstnala skupina, která obsahovala SEA-i a prošla uzením. Skupina uzeného masa bez přidání přídávku SEA-i se zastavila na desítkách milionů jednotek. Vývoj KTJ ve vzorcích připravených

s přidáním tekutého kouře byl minimální. V průběhu celého experimentu se pohyboval v hodnotách do pětiset jednotek v gramu.

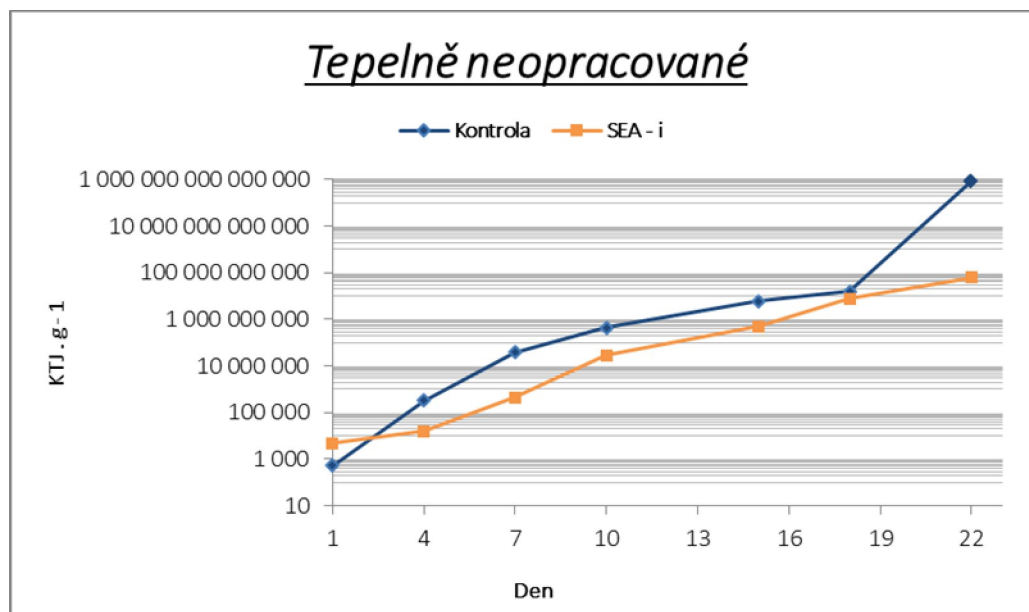


Graf č. 1 : Souhrnný přehled vývoje výskytu kolonie tvořících jednotek ve všech testovaných skupinách.

#### Tepelně neopracované vzorky

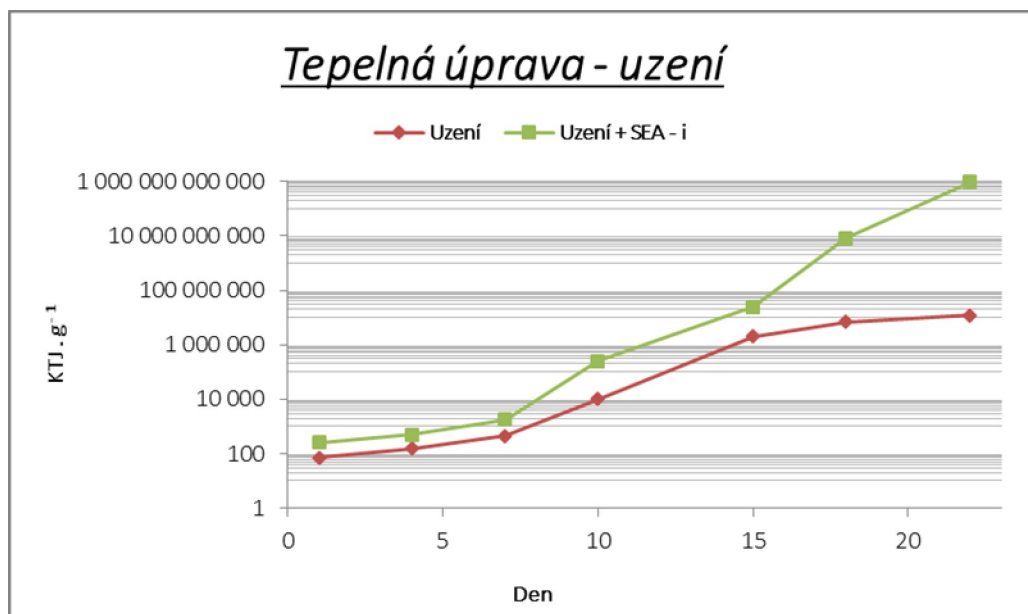
V kontrolní skupině dochází k okamžitému nárůstu mikroorganismů. Mezi prvním a čtvrtým dnem experimentu se znásobil téměř šestsetkrát. V polovině experimentální doby vykazovala kontrola půl miliardy kolonie tvořících jednotek. Na konci byla tato hodnota přes tři čtvrtě biliardy. Skupina, do které byl přidán přípravek SEA-i se od čtvrtého dne držela o tři řády níž, než kontrolní skupina. Výjimkou byl až osmnáctý

den, kdy se tato hodnota kontrole přiblížila. O čtyři dny déle však kontrolní skupina byla víc jak o tři řády vyšší.



Graf č. 2 : Přehled vývoje výskytu kolonie tvořících jednotek v kontrolní skupině a skupině s přidavkem přípravku SEA-i

### Uzení

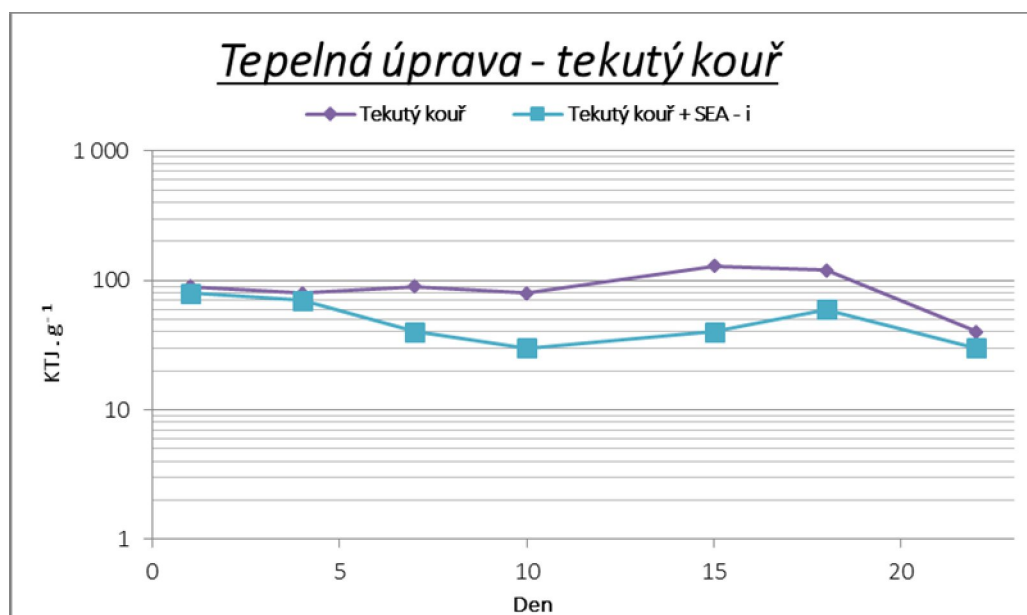


Graf č. 3: Přehled vývoje výskytu kolonie tvořících jednotek ve skupinách, které prošly procesem uzení: skupina bez a skupina s přidavkem přípravku SEA-i.

Skupina vzorků, které prošly tepelnou úpravou uzením, vykazovala velice nízké hodnoty až do sedmého dne experimentu, kdy vzorky dosahovaly hodnoty čtyři sta padesát jednotek. Po této době pak počet KTJ výrazně rostl. V desátém dnu překročil hranici deseti tisíc jednotek v gramu. Po patnácti dnech byla zjištěna hodnota dvou milionů a na konci experimentu milionů dvanáct. Druhá skupina uzených vzorků, do které bylo přidáno SEA-i, vykazovala po prvním týdnu hodnotu tisíc osm set jednotek v gramu. Za dalších pět dní se tato hodnota zestonásobila. Na konci experimentu dosahovala hodnota KTJ v této skupině téměř jednoho bilionu jednotek v gramu.

### Tekutý kouř

Vzorky s příměsí tekutého kouře vykazovaly minimální hodnoty a to po celou dobu experimentu. Vzorky bez přídavku SEA-i se v osmnácti dnech experimentu pohybovaly mezi osmdesáti a sto třiceti jednotkami v gramu. Dvaadvacátý den byla tato hodnota dokonce pouhých čtyřicet jednotek na gram. Vzorky s přidáním SEA-i po celou dobu nepřekročily sto jednotek KTJ v gramu. V desátém a dvaadvacátém dnu byla dokonce zjištěna hodnota KTJ v gramu vzorku pouhých třicet jednotek.



Graf č. 4: Přehled vývoje výskytu kolonie tvořících jednotek ve skupinách, které byly ošetřeny tekutým kouřem: skupina bez a skupina s přídavkem přípravku SEA-i.

Ve srovnání s kontrolními, neošetřenými vzorky, se projevil příznivý vliv úprav ve všech hodnocených variantách. Hodnoty nárůstu mikroorganismů do 20 dnů sledování, které jsou podstatné. Práce prokázala, že sice není nutně nezbytné používat biologický přípravek SEA-i, ale pokud je použit, vykazuje příznivý efekt. A to i v těch případech, pokud je vstupní hodnota mikrobiální zátěže vyšší než zátěž mikroorganismů v kontrolní skupině.

Bezpečné úrovně celkového počtu mikroorganismů je dosahováno až do 10. dne skladování pro všechny hodnocené varianty výrobků. Výrobky, které prošly tepelným opracováním, vykazují potravní bezpečnost kolem 15. dne skladování a výrobky s použitím tekutého kouře vykazují ještě delší dobu skladovatelnosti.

## **4.2. Biogenní aminy**

Z praktického pohledu je nejvíce sledovaný obsah histaminu a putrescinu. Pro komplexní pohled na obsah biogenních aminů je v následujících údajích dokumentováno jejich širší spektrum doplněné o kadaverin, tyramin, tryptamin a fenyletylamin v průběhu 28 dní. Hodnoty jsou uvedeny jako souhrnný výsledek z trojnásobných odběrů. Důležité je stanovení histaminu doložit i dalšími biogenními aminy, protože se uvádí, že jejich výskyt může synergicky působit spolu s histaminem a mít pak nepříznivý dopad na člověka.

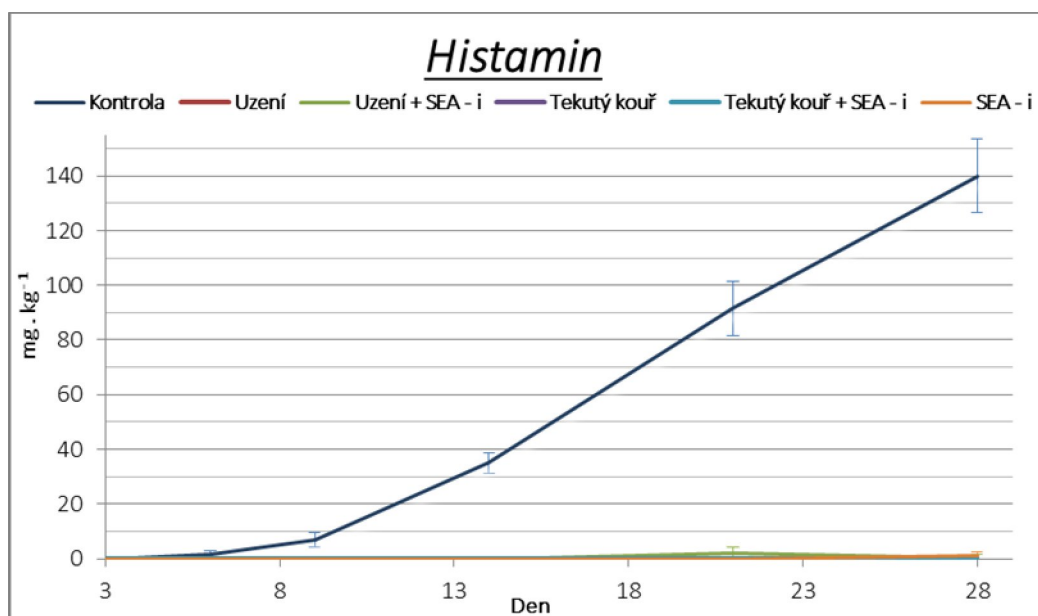
### *4.2.1 Histamin*

Histamin je jedním ze dvou nejdůležitějších biogenních aminů. Jeho hodnota v průběhu experimentu stoupala především v kontrolní skupině vzorků. Zde se jeho přítomnost objevila v šestém dni, v množství kolem dvou miligramů na kilogram vzorku. Za další tři dny se však více než zdvojnásobila na hladinu kolem sedmi miligramů. Po čtrnácti dnech dosahovala naměřená hodnota v kontrolní skupině třicet pět miligramů. Exponenciální růst se nezastavil ani po třech týdnech kdy dosahoval hodnot kolem sta miligramů na kilogram vzorku. O polovinu vyšší hodnoty pak byly neměřeny po čtyřech týdnech.

Skupina, do které byl přimíchán přípravek SEA-i, nevykazovala žádné stopy výskytu tohoto aminu a to téměř po celou dobu experimentu. První dokázaný výskyt nastal po čtyřech týdnech a dosahoval hodnot kolem jednoho miligramu.

U skupin vzorků uzených standartním způsobem se tento amin prokázal pouze nárazově a v minimálních hodnotách. Maximální výskyt byl zaznamenán ve třetím týdnu v uzených vzorcích s přídavkem SEA-i. Tento výskyt se pohyboval kolem dvou miligramů na kilogram, přičemž v dalším týdnu už byl dokázán výskyt pouze půl miligramu na kilogram.

Ve skupinách vzorků, které byly vystaveny působení studeného kouře, nebyl histamin detekován ani jednou v průběhu celého experimentu.



Graf č. 5: Přehled vývoje výskytu histaminu ve všech testovaných skupinách.

#### 4.2.2 Putrescin

Je druhým zástupcem nejdůležitějších biogenních aminů. Jeho výskyt v průběhu experimentu se v kontrolní skupině zvyšoval. Po třech dnech se hodnota jeho výskytu pohybovala kolem dvou miligramů na kilogram. Mezi třetím a šestým dnem experimentu se jeho výskyt téměř sedmkrát znásobil. Po následném zdvojnásobení se hladina výskytu pohybovala okolo čtyřiceti miligramů v kile a to až do třetího týdne

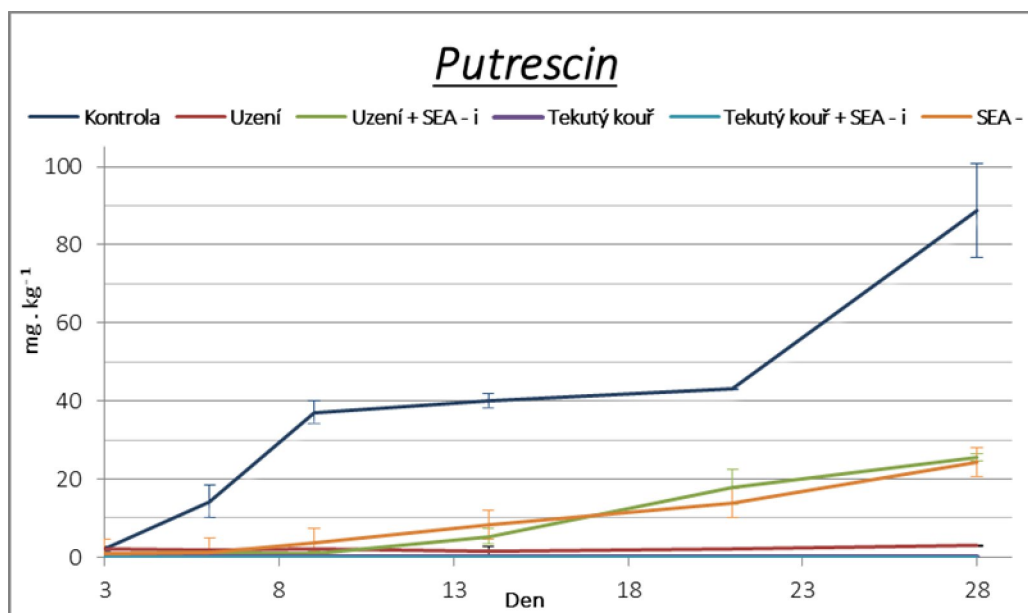


pozorování. Poslední, dvacátý osmý den se hodnoty putrescinu pohybovaly kolem osmdesáti miligramů, což je o třetinu víc než se obvykle nachází ve zkaženém mase.

Ve skupině vzorků bez tepelné úpravy s přidáním přípravku SEA-i se významně snížili tyto hodnoty. V průběhu devíti dnů nepřesáhly čtyři miligramy v kilogramu. Po dvou týdnech byl zjištěn výskyt putrescinu okolo hranice devíti miligramů. V průběhu každého dalšího týdne se obsah putrescinu zdvojnásobil.

Skupina, která prošla tepelnou úpravou – uzením, vykazuje minimální hodnoty tohoto aminu. V průběhu celého experimentu kolísaly mezi dvěma a třemi miligramy v kile. Podskupina s přidavkem testovaného přípravku v prvních devíti dnech výrazně nepřesáhla jeden miligram. Po dvou týdnech však hodnoty stouply na úroveň pěti miligramů. Mezi druhým a třetím týdnem se zvedly k hranici dvaceti a na konci experimentu až dvaceti pěti miligramům v kile.

Ve skupinách, kde byl použit tekutý kouř, nebyl detekován putrescin po celou dobu experimentu.



Graf č. 6: Přehled vývoje výskytu putrescinu ve všech testovaných skupinách.

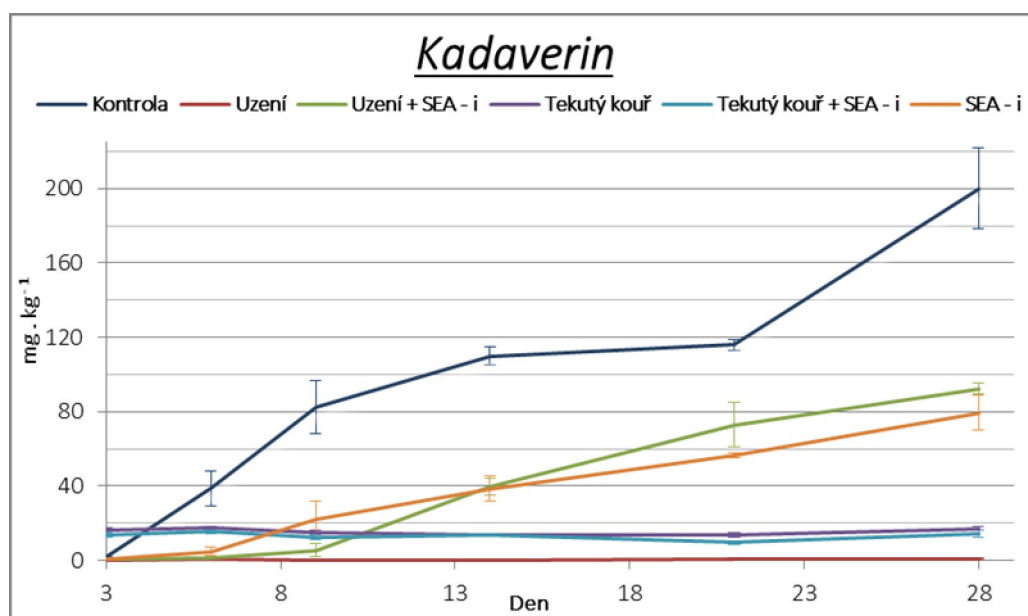
### 4.2.3 Ostatní biogenní aminy

#### Kadaverin

Jeho množství v kontrolním vzorku se během šesti dnů zvýšilo ke čtyřiceti miligramům na kilogram. Po dvou týdnech se tato hodnota dostala přes hranici sto deseti miligramů na kilo. Tento trend pokračoval i nadále, a na konci čtvrtého týdne se hodnoty vyšplhaly až na dvě stě miligramů. Ve skupině s přídatkem SEA-i se množství kadaverinu pohybovalo, v šestém dnu experimentu, pod hranicí pět miligramů. Po čtrnácti dnech nepřesáhlo čtyřicet miligramů a na konci experimentu bylo množství detekované ve vzorcích v blízkosti osmdesáti miligramové hranice.

Uzené vzorky bez aplikace SEA-i vykazovaly minimální hodnoty kadaverinu. Tyto hodnoty byly zjištěny až po třech týdnech a nepřesáhly hranici jednoho miligramu. Vzorky, do kterých byl přípravek aplikován, vykazovaly hodnoty přes pět miligramů po devátém dnu. Ve čtrnáctém dnu atakovaly tyto hodnoty čtyřicet miligramů a na konci experimentu byl kadaverin zjištěn v hodnotách přes devadesát miligramů.

U obou skupin smíchaných s tekutým kouřem byl obsah kadaverinu kolem patnácti miligramů již ve třetím dnu. Tyto hodnoty v průběhu kolísaly, ale po celou dobu nepřesáhly hranici osmnácti miligramů.



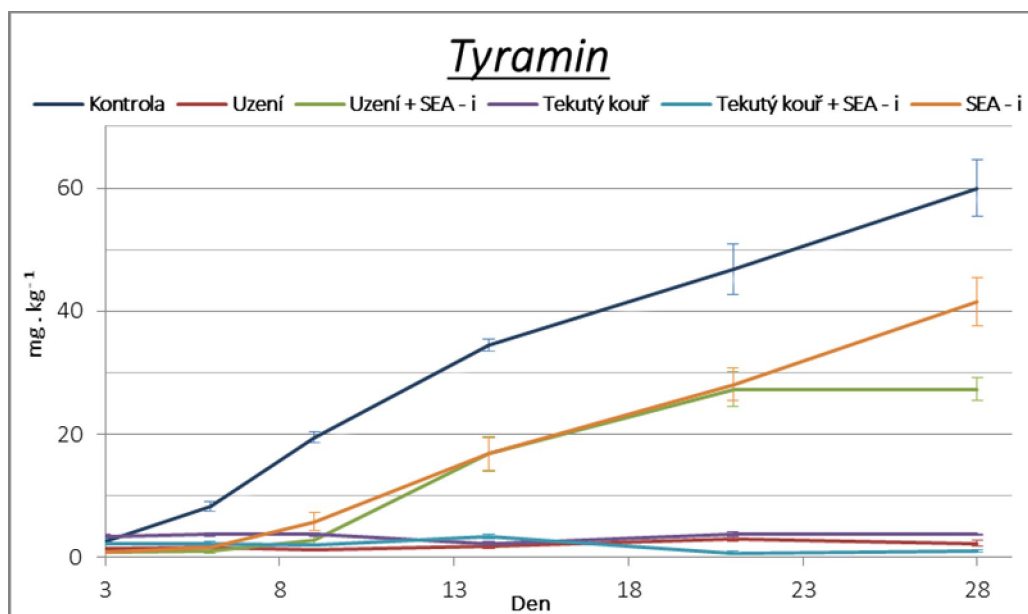
Graf č. 7: Přehled vývoje výskytu kadaverinu ve všech testovaných skupinách

## Tyramin

Výskyt tyraminu ve vzorcích kontrolní skupiny byl dokázán od třetího dne, kdy dosahoval hodnot okolo třech miligramů. Devátý den dosahoval tento amin hodnoty v hladině dvaceti miligramů. Třetí týden byly naměřeny hodnoty přesahující čtyřicet pět miligramů a poslední test po čtyřech týdnech prokázal šedesát miligramů tyraminu ve vzorcích. Ve vzorcích s přidavkem SEA-i se devátý den držela hladina tyraminu pod sedmi miligramy na kilogram. Třetí týden byl zaznamenán výskyt téměř třicet miligramů a poslední den experimentu přes čtyřicet miligramů.

Ve skupině vzorků uzených běžným způsobem se výskyt tyraminu za celou dobu experimentu nezjistil v hodnotách vyšších než tři a půl miligramu na kilogram. Ve vzorcích s přidavkem SEA-i se tato hranice nepřekročila v prvních devíti dnech experimentu. Po čtrnácti dnech dosahovaly hodnoty tyraminu přes sedmnáct miligramů. V dalších rozborech byla zjištěna konstantní hodnota přesahující sedmadvacet miligramů v kilogramu.

U vzorků s příměsí tekutého kouře se hladina držela velmi nízko. Ve skupině bez přidání SEA-i nebyla zjištěna ve větším množství než čtyři miligramy. U vzorků s použitím příměsí SEA-i nepřekročil výskyt tyraminu hodnoty třech a půl miligramů a to v průběhu celého experimentu.

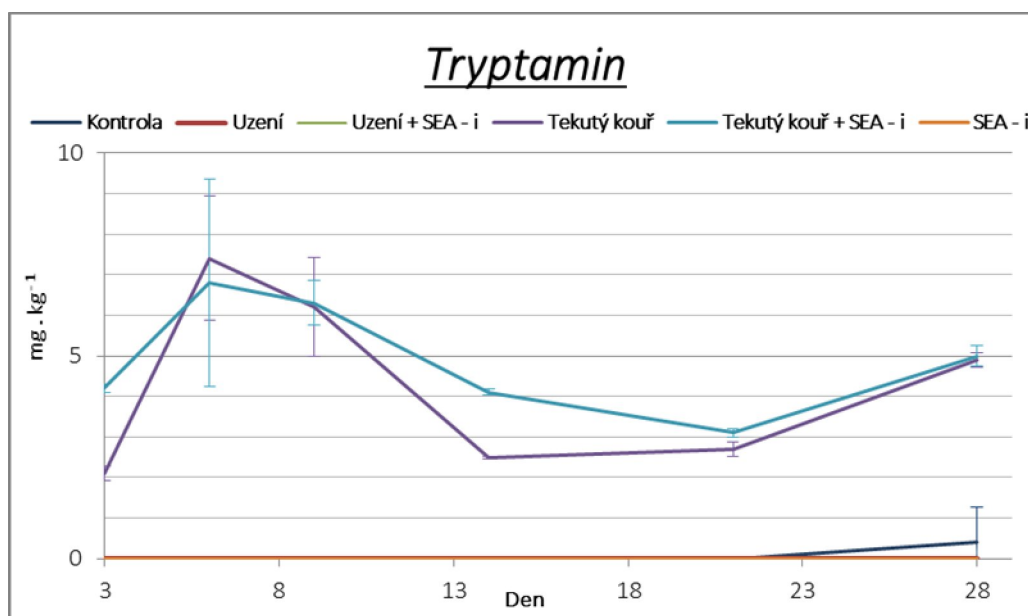


Graf č. 8: Přehled vývoje výskytu tyraminu ve všech testovaných skupinách.

## Tryptamin

Tento amin byl detekován v kontrole a to v posledním dnu experimentu v hodnotě nepřesahující půl miligramu na kilogram. V ostatní vzorcích, kromě skupin s použitím tekutého kouře, nebyl v průběhu celého experimentu detekován žádný výskyt tryptaminu.

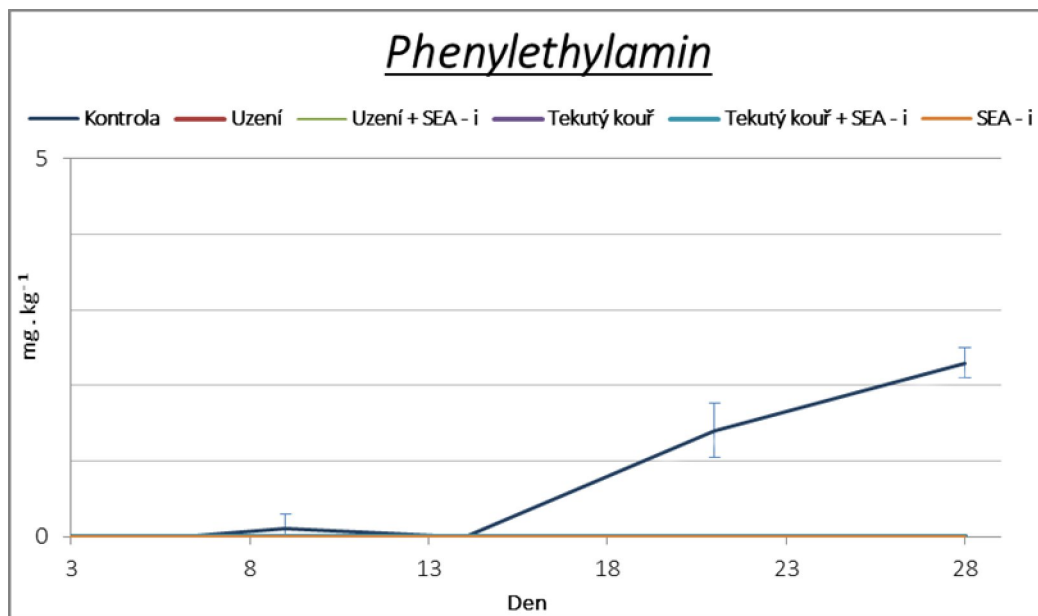
Ve vzorcích s příměsí tekutého kouře se tento amin prokázal kolísavě v rozmezí od dvou miligramů až k sedmi a půl miligramům v kile. Ve vzorcích s tekutým kouřem a přídatkem SEA-i se tento amin pohyboval mezi hodnotami třech až pěti a čtvrt miligramů.



Graf č. 9: Přehled vývoje výskytu tryptaminu ve všech testovaných skupinách.

## Phenylethylamin

Byl detekován pouze v kontrolní skupině vzorků. První výskyt v desetíně gramu na kilogram se prokázal devátý den experimentu. Po čtrnácti dnech však nebyl jeho výskyt detekován. Jednadvacátý den byl jeho výskyt stanoven na hodnoty kolem jednoho a půl miligramu a poslední den experimentu se tento výskyt zastavil pod hranicí dvou a půl miligramu na kilogram.



Graf č. 10: Přehled vývoje výskytu phenylethylaminu ve všech testovaných skupinách.

## 5. Diskuze

Li a kol. (2012) uvádí, že množství KTJ ve svalovině karase obecného (*Carassius carassius*) se v kontrolní skupině pohybovala v řádech desetitisíců po pěti dnech skladování. Do desátého dne se tato koncentrace zvýšila nad deset milionů a v posledním dvacátém dnu dosahovala desítek miliard. Stejný trend lze pozorovat v mém experimentu u kontrolní skupiny i přes rozdíl skladovacích teplot, kdy teplota skladování byla zhruba o 2 °C vyšší. Tyto hodnoty výrazně snižuje přidání přípravku SEA-i, pokud maso neprojde následnou úpravou při vyšších teplotách. Ve skupině uzených vzorků s přidáním SEA-i se v osmnáctém dnu vyrovnaly hodnoty KTJ se skupinou bez tepelné úpravy a následně jí výrazně převyší. Minimální hodnoty skupin, které byly vystaveny působení tekutého kouře, by nemusely odpovídat výrobní praxi. Pochybnosti o výsledcích skupin s použitím tekutého kouře vzbuzuje jeho doporučené množství, které by se dle výrobce mělo do potravin přidávat, jelikož takovéto množství se velice značně podepíše na chuti strojně děleného masa. Výrobek se stane po přidání takového množství nepříliš chutným.

Matějková a kol. (2013) zkoušela vliv vysokotlaké úpravy vakuového balení na výskyt biogenních aminů ve svalovině pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Histamin v průběhu jejího pokusu vykázal největší výskyt v kontrolní skupině po čtrnácti dnech skladování při 12 °C, a to 212 mg.kg<sup>-1</sup>. Ten samý vzorek, uskladněný při 3,5 °C přinesl výsledek 17,5 mg.kg<sup>-1</sup>. Křížek a kol. (2014) ve stejném experimentu se štikou obecnou (*Esox lucius*) dokázal nulový výskyt histaminu ve svalovině štiky při skladovací teplotě 3,5 °C po dobu dvaceti osmi dnů. Při teplotě 12 °C detekoval v kontrolní skupině 16 mg.kg<sup>-1</sup>. To prokazuje vliv teploty na výskyt biogenních aminů jako velice důležitý.

Neméně důležitým vlivem na výskyt těchto kontaminantů je struktura výrobku, resp. jeho forma. Ve výzkumu strojně děleného masa však Křížek a kol. (2011) prokázali hodnoty vyšší. Ve vzorcích kapra, pstruha a okouna říčního (*Perca fluviatilis*) nedetekoval množství přesahující 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> v žádném ze zkoušených vzorků po dobu sedmnácti dní při skladovací teplotě 3 °C. Při teplotě 15 °C se však už po týdnu u kapra prokázal výskyt 38,6 mg.kg<sup>-1</sup>, u pstruha 79,7 mg.kg<sup>-1</sup> a u okouna dokonce 110 mg.kg<sup>-1</sup>. V mém experimentu byla hranice 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> histaminu překročena po třech dnech

skladování. Díky teplotě skladování (6 °C) se histamin držel pod úrovní 40 mg.kg<sup>-1</sup> po dobu čtrnácti dní. Což dokazuje vliv teploty na výskyt histaminu. Zároveň se potvrdil pozitivní vliv uzení, tekutého kouře i přípravku SEA-i.

Putrescin se ve výzkumu Matějkové a kol. (2013) projevil ve větším množství. V osmadvacátém dnu skladování při teplotách 3 °C byl zjištěn výskyt putrescinu 34,9 mg.kg<sup>-1</sup>. Při teplotě 12 °C však dosahoval hodnot 225 mg.kg<sup>-1</sup>. Křížek a kol. (2011) potvrzuje výskyt putrescinu v hodnotách okolo 30 mg.kg<sup>-1</sup> při nižší teplotě a 258 mg.kg<sup>-1</sup> při teplotě 12 °C. Křížek a kol. (2011) také prokázal zvyšující se výskyt putrescinu ve strojně děleném mase. Hladina putrescinu ve vzorcích skladovaných při 3 °C v devátém dnu dosahovala 21,6 mg.kg<sup>-1</sup> u kapra, 21,2 mg.kg<sup>-1</sup> u pstruha duhového a 14,8 u okouna říčního. Na konci osmnáctého dne se tyto hodnoty zastavily na 168; 48,9 a 146 mg.kg<sup>-1</sup>. V mém experimentu se hladina putrescinu v kontrole vyšplhala na 37,1 mg.kg<sup>-1</sup> a kolem hladiny 40 mg.kg<sup>-1</sup> se držela do jednadvacátého dne experimentu.

Matějková a kol. (2013) z ostatních biogenních aminů uvádí ještě velké množství detekovaného kadaverinu – 352 mg.kg<sup>-1</sup>, ve dvacátém osmém dnu, ve vzorcích skladovaných při vyšších teplotách. Stejně tak tyramin za stejných podmínek vykázal hodnotu 367 mg.kg<sup>-1</sup>. Křížek a kol. (2014) uvádí výskyt tyraminu: 104 a 468 mg.kg<sup>-1</sup> a kadaverinu 30 a 216 mg.kg<sup>-1</sup> v kontrolních skupinách dvacátého osmého dne při teplotách skladování 3,5 a 12 °C.

Křížek a kol. (2011) uvádí, že kadaverin u kapra byl zaznamenán až po sedmi dnech skladování, po sedmnácti dnech bylo zjištěno množství 21,2 mg.kg<sup>-1</sup>. U pstruha duhového nebyl detekován po dobu devíti dní. V dalších osmi dnech vzrostlo jeho množství ve strojně děleném mase na 54,2 mg.kg<sup>-1</sup>. Ve strojně děleném mase okouna říčního byl v prvních šesti dnech detekován pouze dvakrát (druhý den 0,21 mg.kg<sup>-1</sup> a čtvrtý den 0,32 mg.kg<sup>-1</sup>). Všechny uvedené hodnoty vzorků byly skladovány při 3 °C.

V mém experimentu se kontrolní skupina po osmadvaceti dnech dostala na 200 mg.kg<sup>-1</sup> hranici výskytu kadaverinu. Tyto hodnoty pak poukazují na nezávislost textury na výskyt kadaverinu. Ve srovnání s výše uvedenou hodnotou tohoto aminu v separovaném mase kapra v sedmém dnu lze konstatovat vliv teploty skladování na jeho výskyt. Dalším potvrzeným vlivem na inhibici výskytu tohoto aminu se pak potvrdilo uzení, použití tekutého kouře i přípravku SEA-i. Ten však v kombinaci s tepelným zpracováním ztrácí na účinnosti. To je dle mého názoru způsobeno cukry, na

kteře jsou navázané účinné látky přípravku. Ty se pak působením tepla mohou oddělit od enzymů a stát se potravní základnou pro bakteriální či enzymatické změny.

Tryptamin byl Křížkem a kol. (2011) detekován pouze u strojně děleného masa pstruha duhového a to od pátého dne a jeho množství se pohybovalo mezi 0,11 až 0,15 mg.kg<sup>-1</sup> v průběhu zbytku experimentu. Srovnatelné hodnoty se i přes rozdílnost teplot skladování potvrdily u kontrolní skupiny i v mém experimentu. U tohoto aminu však pravděpodobně nepůsobí účinek tekutého kouře příliš pozitivně. Ve všech ostatních variantách provedení, kromě kontroly, nebyl po celou dobu experimentu detekován. Ve skupinách s použitím tekutého kouře však v průběhu celého experimentu vykazoval hodnoty od 3 do 8 mg.kg<sup>-1</sup>.

Tyramin byl dle Křížka a kol. (2011) detekován u všech druhů testovaných ryb, ale jeho množství ani v jednom případě nepřesáhlo 1 mg.kg<sup>-1</sup>. Trend výskytu tyraminu lze pozorovat i v mém výzkumu, a to v daleko vyšších koncentracích. V kontrolní skupině byl na konci experimentu zjištěn výskyt 60 mg.kg<sup>-1</sup>. Tento výskyt lze účinně snížit přípravkem SEA-i a to i při využití technologického postupu uzení tekutým kouřem. V případě uzení standartním postupem se tento přípravek neosvědčil, avšak samotné uzení bylo pro maso dostatečným inhibitorem výskytu tohoto aminu, kdy po celou dobu experimentu nepřesáhl jeho obsah 3 mg.kg<sup>-1</sup>.

Souhrnně, ve všech případech, bylo prokázáno, že nedochází k nebezpečnému výskytu žádného ze sledovaných biogenních aminů. Dobrý výsledek s praktickým uplatněním byl prokázán zejména při hodnocení tvorby histaminu, který patří k velmi konfliktním aminům z hlediska jeho negativního působení na člověka. Ve sledovaných produktech byl jeho obsah téměř nedetekovaný.

Pro hodnoty histaminu je u nás obecně přijímáno stanovisko, že pro zdravé osoby je jeho limit 50 mg, některé prameny (vyhláška 305/2004 Sb.) uvádějí pro výrobky z ryb hodnotu 100 mg. Jsou ale státy (Francie), kde je uváděn jeho limit pro zdravé osoby až 200 mg. Příznivé bylo, že u výše uvedených produktů nebyl až do jednadvacátého dne vůbec zaznamenán. Pouze u výrobku s použitím uzení horkým kouřem až od osmadvacátého dne byl jeho obsah pouze na úrovni 0,5 – 2,1 mg. U zdravého člověka existuje regulační mechanismus, který je schopný pomocí enzymů zvládnout toxické účinky histaminu. Větší množství histaminu nebo jiných biogenních aminů (putrescinu, kadaverinu, spermidinu, sperminu, agmatinu aj.) ale může tento systém regulačního mechanismu přetížít.



## 6. Závěr

V této bakalářské práci byl vyzkoušen přípravek SEA-i k prodloužení skladovatelnosti strojně děleného rybího masa. Přípravek byl použit ve třech různých provedeních. První bez tepelného ošetření, druhý ošetřen tekutým kouřem a třetí zauzen běžným postupem. Sekundárním cílem bylo otestovat možnost těchto procesů a jejich vliv na chuť a skladovatelnost. Všechny tyto skupiny byly duplikované, tak aby se dalo ověřit působení přípravku ve všech variantách technologického postupu.

Prodloužení skladovatelnosti úzce souvisí s potravní bezpečností. Strojně dělené rybí maso patří k nejcitlivějším surovinám z pohledu zpracování a skladování. Z tohoto důvodu byl můj výzkum zaměřen především na sledování rozvoje mikroorganismů a různých chemických změn, jež jsou odraženy průběhem výskytu různých biogenních aminů. Pro strojně dělené maso jsou pouze dvě kritéria bezpečnosti potravin pro uvedení na trh v průběhu doby údržnosti. Jedná se o nulový výskyt salmonely a limitovaný obsah histidinu. Vyhláška č. 302/2004 Sb. udává maximální přípustnou míru výskytu histidinu na úrovni  $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . K této hranici jsme se ani zdaleka nepřiblížili.

Při dodržení navrženého technologického postupu je zaručena mikrobiální čistota a nezávadnost. Počet bakterií *Escherichia coli* se vždy pohyboval na hranici nižší než  $10\text{ KTJ}\cdot\text{g}^{-1}$ . Rozvoj vyjádřený celkovým počtem mikroorganismů se pohyboval, při zásadě předběžné opatrnosti, ve velmi bezpečné úrovni až do 10. dne skladování pro všechny hodnocené varianty výrobků. Výrobky, které prošly tepelným opracováním, vykazují potravní bezpečnost do patnáctého dne skladování a výrobky s použitím tekutého kouře vykazují ještě delší dobu skladovatelnosti. To dává dobrý obrázek o zdravotní nezávadnosti postupu zpracování u hodnocených produktů.

Souhrnně, ve všech případech, bylo prokázáno, že při dodržení navrženého technologického postupu, nedochází k nebezpečnému výskytu histaminu ani žádného jiného z dalších sledovaných biogenních aminů. To je výsledek s potravně bezpečnostním uplatněním. Pro konzumenta jsou výrobky chuťově přijatelné a nehrozí žádné alimentární potíže.

Výstup bakalářské práce je použitelný v komerčních provozech.

## 7. Přehled použité literatury

- Arnold, S. H., Brown, W. D., 1978. Histamine toxicity from fish products. *Advances in Food Research*. č. 34, s. 113-154.
- Barbuzzi, G., Grimaldi, F., Nobeil, M. A., 2009. Quality decay of fresh processed fish stored under refrigerated conditions. *Journal of food safety*. č. 29, s. 271–286.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., Vidal-Carou, M. C., 2009. Effect of gutting on microbial loads, sensory properties, and volatile and biogenic Amine contents of european hake (*Merluccius merluccius* var. *Maditerraneus*) stored in ice, *Journal of food protection*, č. 8, s. 1671–1760.
- Buchtová, H. 2001. Hygiena a technologie zpracování ryb a ostatních vodních živočichů, alimentární onemocnění z ryb, mrazírenství. *Veterinární a farmaceutická universita Brno*.
- Břečka, P. 2014. Ústní sdělení. (2014–04–24).
- Dabrowski, W., Rozycka-Kasztelan, K., Czeszejko, K., Mędrała, D., 2002. Microflora of low-salt herring II. The influence of sodium benzoate on microflora of low-salt herring. *Elect. J. Polish Agricultural University*. č. 5, s. 14.
- Doores, S., 2005. *Organic Acids*. CRC Press.
- Drdák, M., Studnický, J., Mórová, E., Karovičová, J. 1996. *Základy potravinářských technologií*. Malé centrum.
- El-Akel, A. T. 1993. Biogenic amines and other quality changes in sardine uninculated and insulated with *P. morganii*. *Proc. of the Fifth Arab Conference of Food and Technology*, 27-30. 12. 1993, Cairo, Egypt. s. 78 – 85.
- Fan, W. J., Chi, Y. L., Zhang, S. 2008. The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage in ice. *Food chemistry*, č. 108, s. 148–153.
- Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qui, J., Zhang, Y., Chi, Y. 2009. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food chemistry*. č. 115, s. 66–70.
- Fran, G., Sims, G. G. 1987. Chemical indices of decomposition in tuna. *Development in Food Science* č. 15, s. 175-183.
- Frank, H. A., Yoshinaga, W. K. Nip, W. K. 1981. Histamine formation and hortycombing during decomposition of skipjack tuna (*Kalsuwotius pelamis*) at elevated temperatures. *Mar. Fish. Rev.* č. 43, s. 9.
- Görner, F., Valík, L. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Malé centrum.
- Hardy, R. Smith, J. G. M. 1976. The storage of mackerel *Scomber scomberus*, development of histamine and rancidity. *Journal of Science of food and agricultural*. č. 27, s. 595.
- Heruwati, E. S., Sophia, R. A., Mangunwardoyo, W. 2008. Inhibition of L-histidine decarboxylase produced by histamin forming bacteria using benzoic acid. *Jurnal pasca panen dan bioteknologi kelautan dan perikanan*. č. 3, s. 1-8.

- Chipley, J. R. 2005. Sodium benzoate and benzoic acid. *Antimicrobials in food*. č. 143. s. 11-48.
- Ingr, I. 2003. *Produkce a zpracování masa*. Mendelova zemědělská a lesnická universita v Brně.
- Ingr, I. 2004. *Jakost a zpracování ryb*. Mendelova zemědělská a lesnická universita v Brně.
- Kang, J. H. Park, Y. H. 1984. Effect of food additives on the histamine formation during processing and storage of mackerel. *Journal of Korean fisheries society*. č. 17, s. 383.
- Kim, K. W., Thomas, R. L. 2007. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food chemistry*, č. 101, s. 308–313.
- Křížek, M., Vácha, F., Vejsada, P., Pelikánová, T. 2011. Formation of biogenic amines in fillets and minced flesh of three freshwater fish species stored at 3 °C and 15 °C. *Acta veterinaria Brno*. č. 80, s. 365-372
- Křížek, M., Matějková, K., Vácha, F., Dadáková, E. 2014. Biogenic amines formation in high-pressure processed pike flesh (*Esox lucius*) during storage. *Food chemistry*. č. 151, s. 466-471
- Li, T. T., Hu, W. Z., Li, J. R., Zhang, X. G., Zhu, J. L., Li, X. P. 2012. Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Food control*. č. 25, s. 101–106.
- Li, T., Li, J., Hu, W., Zhang, X., Li, X., Zhao, J. 2012. Shelf-life extension of crucian carp (*Carassius auratus*) using natural preservatives during chilled storage. *Food chemistry*. č. 135, s. 140–145.
- Lukášková, E. 2003. *Stravování obyvatelstva v krizových situacích z hlediska potravinové bezpečnosti státu [Disertační práce]*. VVŠ PV Vyškov.
- Luten, J. B., Bouquet, W., Seuren, L. A. J., Burggraaf, M. M., Riekwel-Booy, G., Durand, P., Etienne, M., Gouyou, J. P., Landrein, A., Ritchie, A., Leclercq, M. and Guinet, R. 1992. Biogenic amines in fishery products: Standardization methods within EC. *Quality assurance in the fish industry*. s. 427-439.
- Mahmoud, S. M. M., Yamazaki, K., Miyashita, K., Il-Schick, S., Dong-Suk, Ch., Suzuki, T. 2004. Bacterial mikroflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food microbiology*. č. 21, s. 657 - 666
- Majeti, N. V., Ravi, K. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*. č. 46, s. 1–27.
- Matějková, K., Křížek, M., Vácha, F., Dadáková, E. 2013. Effect of high-pressure treatment on biogenic amines formation in vacuum-packed trout flesh (*Oncorhynchus mykiss*). *Food chemistry*. č. 137, s. 31-36.
- Matyáš, Z., Vítovec, J. 1999. *Hygiena výroby a distribuce potravin*. Jihočeská universita v Českých Budějovicích.
- Murray, C. K., Hobbs, G., Gilbert, R. G. 1982. Scombrototoxin and scombrototoxin-like poisoning from canned fish. *Journal of hygiene*. č. 88, s. 215-218.

- Pechanek, U., Pfannhauser, W., Woidich, H. 1983. Determination of the content of biogenic amines in four food groups of Austrian marketplace. *Lebensm. Unters. Forsch.* č. 176, s. 335-340.
- Punakivi, K., Smolander, M., Niku-Paavola, M. L., Mattinen, J., Buchert, J. 2006. Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase. *Talanta*. č. 68, s. 1040 – 1045.
- Sampels, S., Levý, E., Mráz, J., Vejsada, P., Zajíc, T. 2014. Kvality a gastronomie ryb a rybích výrobků. Jihočeská universita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod.
- Sergeeva, Y. E., Galanina, L. A., Kochkina, G. A., and Feofilova, E. P. 2009. The effect of the preservative sorbic acid on the lipid composition of the ascomycete fungus *Penicillium roqueforti* Thom. *Microbiology*. č. 78, s. 630-635.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., Jeon, Y. J. 1999. Food applications of chitin and chitosan. *Trends in food science and technology*, č. 10, s. 37–51.
- Shalaby, A. R. 1990. Correlation between freshness indices and degree of fish decomposition. [Disertační práce]. Faculty of Agriculture, Ain Shams University, Cairo, Egypt.
- Shalaby, A. R. 1995. Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food chemistry* č. 52, s. 367-372.
- Shalaby A. R. 1997. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food research international*. č. 7, s. 675–690.
- Schulze, K., Zimmermann, T. 1982. Untersuchungen zum einfluss verschiedener lagerungsbedingungen auf die entwicklung biogenic Amine in thunfish und makrelenfleisch. *Fleischwirtschaft* č. 62, s. 907.
- Silla Santos, M. H. (1996): Biogenic amines in meat and meat products. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*. č. 4, s. 488–499.
- Sofos, J. N. 2000. Sorbic acid. *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press.
- Stopforth, J. D., Sofos, J. N., Busta, F. F. 2005. Sorbic Acid and Sorbates. *Antimicrobials in Food*. CRC Press.
- Suprapti, M. L. 2008. Various fish processing products, fish sauce, dried fish and kamaboko (In Indonesian). Yogyakarta.
- Tiecco, G., Tantillo, G, Francioso, E. and De Natale, G. 1984. Ricerca dell istamina e di altre poliamine in sgombri e sardine conservati a varie temperature. *Atti Sot. It. Sci. Vet.* č. 37, s. 620
- Vácha F., Pavlíček T. 1999. Uplatnění preparátu Purac na mikrobiologické hodnoty při skladování kapřího masa. *Maso*. č. 9, s. 23-26
- Vácha, F., Vejsada, P. 2013. Zpracování ryb. Jihočeská universita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod.
- Velíšek, J.: *Chemie potravin*, 2. svazek, 1999, OSSIS,

- Wei, C. I., Chen, C. M., Koburger, J. A., Otwell, W. S., Marshal, M. R. 1990. Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna. *Journal of food science*.č. 55, s. 599-603.
- Yatsunami, K., Echigo, T. 1993. Changes in the number of halotolerant histamine-forming bacteria and content of non-volatile amines in sardine meat with addition of salt. *Nippon Suisan Gakkaishi* č. 59, s. 123-127.
- Yoshida, A., Nakamura, A. 1982. Quantitation of histamine in fishes and fishes products by high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Sot. Jpn.* č. 23, s. 339.

## 8. ABSTRAKT

První část práce popisuje metody strojního dělení rybího masa a potravinovou bezpečnost. V této části jsou popsány metody separování, zmíněn je pohled legislativy. Primárními faktory ovlivňujícími kvalitu a možnost použití jsou změny způsobené proteolýzou a autolýzou, výskyt mikroorganismů a biogenních aminů. Tyto procesy jsou přirozené a lze je pouze zmírnit nebo oddálit jejich začátek. I přes možnost použití různých konzervačních prostředků je třeba věnovat pozornost hygienickým a technologickým postupům, zkrácením doby jejich trvání, a skladovacím podmínkám, zejména pak teplotě.

Část výzkumná je věnována možnosti využití enzymatického přípravku SEA-i a jeho dopadům na výskyt biogenních aminů, koliformních bakterií a celkového počtu mikroorganismů v separovaném kapřím mase při zausení a využití tekutého kouře. Použití SEA-i se ukázalo jako vhodný prostředek pro zabránění rozvoje biogenních aminů. Dokázal potlačit rozvoj histaminu pod detekovatelnou hranici a množství putrescinu snížil na  $24 \text{ mg.kg}^{-1}$  oproti kontrolní skupině s výskytem  $89 \text{ mg.kg}^{-1}$ . U ostatních biogenních aminů byl také prokázán silný inhibiční účinek. Jeho účinek byl taktéž dokázán u celkového počtu mikroorganismů.

Klíčová slova: separované maso, tekutý kouř, údržnost, biogenní aminy, SEA-i, mikroorganismy

## 9. ABSTRACT

The initial part of this work sums up the methods of mechanical mincing of fish meat and food safety. The fish meat processing methods are described in detail and supplemented with the respective legislative. The primary factors affecting the quality and usability of the product are the changes caused by proteolysis and autolysis, the occurrence of microorganisms and biogenic amines. These processes are natural; they may only be delayed or reduced in intensity. Despite the possibility of using different preservatives, we need to pay attention to the basic hygienic and technological processes particularly in shortening their duration and storage conditions, especially the temperature.

The major part of the research focuses on the possibility of using the enzyme preparation of SEA-i and its impact on the occurrence of biogenic amines, coliform bacteria and the total number of microorganisms in separated carp meat in smoking and liquid smoke treatment. Using SEA-i has proved to be a suitable means for preventing the development of biogenic amines. He was able to suppress the development of histamine below the detectable limit and the amount of putrescine decreased to  $24 \text{ mg.kg}^{-1}$  compared to the control group with the appearance of  $89 \text{ mg.kg}^{-1}$ . For other biogenic amines has also demonstrated potent inhibitory effect. Its effect was also demonstrated in the total number of microorganisms.

Keywords: separated meat, liquid smoke, shelf life, biogenic amines, SEA-i, microorganism