

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
KATEDRA APLIKOVANÉ CHEMIE



# Doktorská disertační práce

Tvorba biogenních aminů v mase vybraných druhů ryb

Ing. Kateřina MATĚJKOVÁ

2013

Školitel: prof. Ing. Martin Křížek, CSc.

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství.

V Českých Budějovicích dne 12.11.2013

.....

Práce byla vypracována na katedře aplikované chemie Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v období září 2009 – říjen 2013 s finanční podporou výzkumného záměru MSM 600 766 5806, P503/11/1417 GAČR, GAJU 067/2010/Z, GAJU 047/2010/Z, GAJU 026/2010/Z, GAJU 058/2013/Z.

*Děkuji školiteli prof. Ing. Martinu Křížkovi, CSc. za trpělivost, mnoho podnětných rad a věcných připomínek, které mi poskytl během vypracování této práce a v neposlední řadě také za ochotu při řešení problémů. Dále bych ráda poděkovala prof. Ing. Pavlu Kalačovi, CSc. za jeho vstřícnost a cenné rady během studia. Také děkuji doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za pomoc při měření na UPLC a následném vyhodnocování získaných dat a Ing. Tamaře Pelikánové za spolupráci při realizaci experimentů vztahující se ke stanovení aminů.*

*Děkuji své rodině a blízkým za jejich podporu a vytvoření ideálních podmínek ke studiu.*

## SOUHRN

Disertační práce se zabývá užitím a účinností některých méně běžných způsobů konzervace rybího masa. V souvislosti s netradičními konzervačními metodami je sledována tvorba biogenních aminů v mase. Tyto látky mohou sloužit jako indikátory rozkladu bílkovin. Kvalita rybího masa byla posuzována v souvislosti s narůstajícím obsahem vybraných biogenních aminů (putrescinu, kadaverinu, spermidinu, sperminu, 2-fenylethylaminu, histaminu, tyraminu a tryptaminu). Pro stanovení biogenních aminů byla použita metoda ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC). Osm biogenních aminů bylo derivatizováno dansylchloridem před jejich rozdělením pomocí metody UPLC.

Rybí maso bylo vakuově zabaleno. Po účinku vybrané konzervační techniky byly vzorky uchovávány po několik týdnů v termostatu při zvolené skladovací teplotě. Ke konzervaci rybího masa bylo užito jednak  $\beta$ -záření, dále pak vysoký hydrostatický tlak. Současně byly připraveny kontrolní vzorky, které nebyly vystaveny účinku  $\beta$ -záření a vysokému tlaku. U všech vzorků byly sledovány organoleptické vlastnosti (vůně/zápach, vzhled a tvar).

Konzervace účinkem  $\beta$ -záření byla aplikována na rybí maso kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Oba druhy sladkovodních ryb jsou hospodářsky významné. Jsou nejčastěji konzumovanými druhy v ČR. Z hlediska výživy člověka je rybí maso považováno za zdravé a dietní, to však platí pouze v případě současné čerstvosti.

Ke zjištění vhodné dávky  $\beta$ -záření byla u kapra obecného vytvořena zkušební série vzorků. V prvním experimentu byla vystavena nejvyšší přípustné dávce záření pro rybí maso 3 kGy. V dalších experimentech byla dávka záření snížena na základě zkušeností z úvodního pokusu. U pstruha duhového byly použity dávky 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 a 2,0 kGy. Hodnoty  $\beta$ -záření 0,75 kGy a vyšší (1,0; 2,0 a 3,0 kGy) prodloužily údržnost rybího masa, které v těchto případech bylo skladovatelné až tři měsíce (98 dnů). Prodloužení skladovatelnosti masa na 98 dnů je při 3,5 °C z technického hlediska nadbytečné. V opakovaném experimentu s kapřím masem byly proto podrobněji zkoušeny nižší dávky záření 0,25; 0,5 a 0,75 kGy. Nižší dávky  $\beta$ -záření jsou u obou druhů ryb považovány za přijatelnější a současně dostatečně účinné pro oddálení začínajících rozkladných procesů.

Vysoký hydrostatický tlak byl aplikován na maso kapra obecného (*Cyprinus carpio*), pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a štiky obecné (*Esox lucius*). Štika obecná je dalším velmi oblíbeným druhem sladkovodní ryby. Maso štiky je velmi chutné, avšak tento druh ryby není mezi spotřebiteli tolik rozšířen ve srovnání s kaprem a pstruhem. Důvodem je především jeho vyšší cena.

Na rozdíl od experimentů s  $\beta$ -zářením byly vzorky po aplikaci vysokého tlaku skladovány kromě standardní nižší teploty 3,5 °C, také při vyšší teplotě 12 °C. Nízká skladovací teplota byla navržena tak, aby se prostředí uložených vzorků podobalo podmínkám uchovávání rybího masa v průmyslových chladírenských zařízeních a domácnostech. Podle dostupných informací vznikl předpoklad, že vysoký tlak nebude dostatečnou konzervační technikou při vyšších skladovacích teplotách. Pro ověření tohoto předpokladu byly vzorky ošetřené vysokým tlakem skladovány jak při 3,5 °C tak i při vyšší teplotě 12 °C. Vyšší teplotou bylo simulováno selhání chladírenského zařízení či nevhodné teplotní uchovávání masa.

U všech druhů vybraných sladkovodních ryb byly aplikovány dvě úrovně vysokého tlaku – 300 a 500 MPa. Obě úrovně měly významný vliv na omezení tvorby biogenních aminů především u vzorků, které byly skladovány při 3,5 °C. Účinek 300 i 500 MPa oddálil při této teplotě začátek rozkladných procesů v rybím mase o 3–4 týdny. Při 12 °C a 500 MPa prodlužuje vysoký tlak udržitelnost masa nejvýše o 1 týden. U nižší skladovací teploty představuje 500 MPa účinný konzervační zákrok. Oproti tomu při vyšší teplotě není vysoký tlak tak spolehlivou konzervační technologií.

U kvalitních a zdravotně nezávadných vzorků byly obsahy sledovaných aminů zpravidla nižší než 10 mg.kg<sup>-1</sup>. Nárůst obsahu putrescinu, kadaverinu a tyraminu během skladování vzorků velmi dobře korespondoval s účinky použité dávky  $\beta$ -záření či úrovně vysokého tlaku a organoleptickými vlastnostmi. Polyaminy, spermidin a spermin nevykazovaly statisticky významné změny ve srovnání s použitou dávkou záření a úrovní vysokého tlaku během skladování. Změny obsahu histaminu, tryptaminu a 2-fenylethylaminu byly po aplikaci obou konzervačních technik a během skladování velmi malé a v některých případech dokonce zanedbatelné.

## SUMMARY

The thesis deals with the use and effectiveness of some less common methods of conservation of fish meat. The formation of biogenic amines in meat is observed in connection with the non-traditional preservative methods. Amines can serve as indicators of protein degradation. The quality of fish was considered in connection with the increasing content of selected biogenic amines (putrescine, cadaverine, spermidine, spermine, 2-fenylathylamine, histamine, tyramine and tryptamine). Ultra performance liquid chromatography (UPLC) was used as the method for determination of biogenic amines. Amines were derivatized by dansylchloride before their UPLC separation.

The fish flesh was vacuum-packed. Samples were stored for several weeks in a thermostat at the selected storage temperature after the application of selected preservative technique. Beta-irradiation and high hydrostatic pressure were used for the preservation of fish flesh. Control samples were not exposed to the  $\beta$ -irradiation and high pressure. The organoleptic properties were studied for all samples (smell/odor, insight and shape).

Beta-irradiation was applied to fish meat of common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Both these species of freshwater fish are economically significant. Carp and trout are the species being mostly consumed in the Czech Republic. Fish meat is considered to be provided the flesh is fresh.

A testing series of samples was created with common carp to determine the appropriate dose of  $\beta$ -irradiation. The maximum permissible dose of irradiation for fish meat is 3 kGy. Fish samples were exposed this dose in the first experiment. The dose of irradiation was reduced in following experiments based on the experience from the initial experiment. The doses of 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 and 2.0 kGy were applied to rainbow trout. The value of 0.75 kGy of  $\beta$ -irradiation or higher (1.0, 2.0 and 3.0 kGy) prolonged the shelf life of fish meat, which was stored for three months (98 days). Prolonging of the shelf life of fish meat to approximately 98 days at 3.5 °C is redundant from technical point of view. For that reason lower doses 0.25, 0.5 and 0.75 kGy were tested in more detail in the repeated experiment with carp meat. Lower doses of  $\beta$ -irradiation are considered to be more acceptable and-at the same time-sufficiently effective for delaying the beginning of degradation processes.

High hydrostatic pressure was applied to meat of common carp (*Cyprinus carpio*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pike (*Exos lucius*). Pike is another very popular kind of freshwater fish. Pike flesh is very tasty, but in spite of this, pike is not so much popular among consumers compared to carp and trout. The cause is its high price.

Samples of pike were stored at standard temperature 3.5 °C and also at higher temperature 12 °C (unlike experiments with  $\beta$ -irradiation). Lower temperature of storage (3.5 °C) followed the conditions of storing of fish meat in industrial refrigeration facilities and households. The high pressure might not be sufficient for preservation at higher storage temperatures. This assumption was based on available information. Samples were treated by high pressure and stored at both 3.5 °C and 12 °C to verify this assumption. Higher temperature simulated either failure of refrigeration equipment or unsuitable store temperature of meat.

In all species selected freshwater fish two levels of high pressure were applied – 300 and 500 MPa. Both levels had significantly reduced the formation of biogenic amines, especially in samples stored at 3.5 °C. At this temperature, the effect of 300 and 500 MPa delayed start of degradation processes in fish meat by 3–4 weeks. At 12 °C and 500 MPa, high pressure extended the sustainability of meat by no more than one week. 500 MPa is effective treatment at the lower temperature of 3.5 °C. High pressure is not reliable preservative techniques at higher temperature.

The contents of monitored amines were generally less than 10 mg.kg<sup>-1</sup> in samples with good sensory score. The increase of content of putrescine, cadaverine and tyramine corresponded very well with the effects of both used dose of  $\beta$ -irradiation and the level of high pressure as well as with organoleptic properties. The polyamines, spermidine and spermine did not show any statistically significant changes in connection with applied dose of irradiation and the level of high pressure. The changes of contents of histamine, tryptamine and 2-fenylathylamine were very small and negligible in most cases.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

biogenní aminy, polyaminy, putrescin, kadaverin, tyramin, ryby, kapr, pstruh, štika, záření, vysoký tlak, kvalitativní změny

## **KEYWORDS**

biogenic amines, polyamines, putrescine, cadaverine, tyramine, fish, carp, trout, pike, irradiation, high-pressure, quality changes

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Biogenní aminy .....</b>	<b>13</b>
3.1.1	Vznik a výskyt biogenních aminů .....	15
3.1.2	Biologický účinek BA .....	17
3.1.2.1	<i>Otrava histaminem (HIM) .....</i>	<i>18</i>
3.1.2.2	<i>Otrava tyraminem (TYM) .....</i>	<i>18</i>
3.1.2.3	<i>Role polyaminů .....</i>	<i>19</i>
<b>3.2</b>	<b>Biochemické reakce biogenních aminů .....</b>	<b>19</b>
3.2.1	Metabolismus aminů .....	19
3.2.2	Katabolismus aminů .....	22
<b>3.3</b>	<b>Mikroorganismy produkující biogenní aminy .....</b>	<b>23</b>
3.3.1	Enterococcus spp. ....	23
3.3.1.1	<i>Charakteristika enterokoků .....</i>	<i>23</i>
3.3.1.2	<i>Vliv enterokoků na lidský organismus .....</i>	<i>24</i>
3.3.2	Lactobacillus spp. ....	26
3.3.2.1	<i>Charakteristika laktobacilů .....</i>	<i>26</i>
3.3.2.2	<i>Vliv laktobacilů na lidský organismus .....</i>	<i>27</i>
<b>3.4</b>	<b>Biogenní aminy v mase .....</b>	<b>28</b>
3.4.1	Biogenní aminy v rybím mase .....	29
3.4.2	Rozkladné procesy biogenních aminů v rybím mase .....	31
<b>3.5</b>	<b>Ošetření rybího masa zářením .....</b>	<b>32</b>
3.5.1	Ozařování a bezpečnost potravin .....	32
3.5.1.1	<i>Typy ionizujícího záření .....</i>	<i>32</i>
3.5.1.2	<i>Vliv dávky záření .....</i>	<i>32</i>
3.5.1.3	<i>Výhody ozařování .....</i>	<i>34</i>
3.5.1.4	<i>Problémy, které brání širokému využití ozařování v praxi .....</i>	<i>34</i>
3.5.2	Ozáření rybího masa .....	35
3.5.2.1	<i>Zařízení pro ozáření rybího masa .....</i>	<i>36</i>
<b>3.6</b>	<b>Ošetření rybího masa vysokým tlakem .....</b>	<b>37</b>
3.6.1	Aplikace vysokého tlaku v potravinářství .....	37



3.6.1.1	Potenciální potravinářské aplikace vysokých tlaků.....	39
3.6.2	Aplikace vysokého tlaku na rybí maso.....	41
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>43</b>
4.1	Použité chemikálie, přístroje a zařízení.....	43
4.2	Izolace biogenních aminů.....	44
4.3	Obecné stanovení biogenních aminů .....	45
4.4	Rybí maso jako pokusný materiál.....	47
4.5	Odběr vzorků .....	48
4.6	Příprava vzorků k měření.....	49
4.6.1	Derivatizace .....	49
4.6.1.1	Příprava uhličitanového pufru .....	50
4.7	Analytická koncovka .....	50
4.7.1	Podmínky separace na UPLC .....	51
4.8	Stanovení a statistické vyhodnocení biogenních aminů .....	51
4.9	Konzervace rybího masa zářením.....	52
4.9.1	Vzorky pro ověření vhodné dávky záření a skladovatelnosti vzorků.....	52
4.9.2	Vzorky pro sledování obsahu biogenních aminů v mase pstruha duhového .....	52
4.9.3	Vzorky pro sledování obsahu biogenních aminů v mase kapra obecného .....	53
4.10	Konzervace rybího masa vysokým tlakem.....	54
4.10.1	Vzorky pro sledování obsahu biogenních aminů v rybím mase kapra obecného, pstruha duhového a štiky obecné .....	55
4.11	Organoleptické vlastnosti .....	56
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>57</b>
5.1	Vliv $\beta$ -záření na tvorbu biogenních aminů v mase sladkovodních ryb .....	57
5.1.1	Vliv nízké dávky záření na tvorbu biogenních aminů u vakuově baleného kapra obecného ( <i>Cyprinus carpio</i> ).....	65
5.1.1.1	Zkušební série vzorků (pokus 1) .....	65
5.1.1.2	Série vzorků s vhodnými dávkami ozáření a vhodnou dobou skladování (pokus 2) .....	68
5.1.2	Vliv nízké dávky ozáření na tvorbu biogenních aminů u vakuově baleného pstruha duhového ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ).....	71

5.2	Vliv vysokého hydrostatického tlaku na tvorbu biogenních aminů v mase sladkovodních ryb .....	76
5.2.1	Vliv vysokého tlaku na tvorbu biogenních aminů u vakuově baleného kapra obecného ( <i>Cyprinus carpio</i> ) .....	89
5.2.2	Vliv vysokého tlaku na tvorbu biogenních aminů u vakuově baleného pstruha duhového ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) .....	94
5.2.3	Vliv vysokého tlaku na tvorbu biogenních aminů u vakuově balené štiky obecné ( <i>Exos lucius</i> ) .....	100
6	ZÁVĚR .....	106
6.1	Konzervace rybího masa $\beta$ -zářením .....	107
6.2	Konzervace rybího masa vysokým tlakem.....	108
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	111
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	122
9	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ .....	124

# 1 ÚVOD

Biogenní aminy jsou přirozenou součástí všech živých buněk a rovněž i potravin. Po chemické stránce lze hlavní představitele těchto látek rozdělit do tří skupin. První skupinou jsou aromatické aminy, kam patří histamin, 2-fenylethylamin, tyramin a tryptamin. Další skupinu tvoří alifatické diaminy, putrescin a kadaverin. Poslední ze tří skupin představují alifatické polyaminy, spermidin a spermin.

Diaminy a polyaminy jsou přirozenými produkty metabolismu živočichů, rostlin a mikroorganismů. Hrají důležitou roli při syntéze proteinů v buňkách a při stabilizaci buněčných membrán.

V nefermentovaných poživatinách (např. v mase), představují BA jedny z nežádoucích zplodin konečného rozkladu proteinů. Proces jejich vzniku je katalyzován zpravidla mikrobiálními enzymy a postupuje od bílkovin přes peptidy k aminokyselinám, jejichž dekarboxylace vede ke vzniku aminů. Při tomto ději vzniká např. z ornitinu či argininu putrescin, z lysinu kadaverin, z histidinu histamin, z tyrosinu tyramin.

V odborné literatuře nacházíme v zásadě dva důvody pro sledování biogenních aminů v poživatinách. Hlavním z nich je toxicita těchto látek, další pak snaha o nalezení souvislosti mezi obsahem aminů v potravinách a jejich jakostí.

Toxicita biogenních aminů výrazně kolísá v závislosti na individuálních a obvykle i geneticky podmíněných detoxikačních schopnostech lidského organismu. Pro vnímavé jednotlivce představují především histamin a tyramin značnou míru rizika, zejména v případě současného požití alkoholu či některých druhů léčiv (antidepresiv nebo tuberkolostatik). Doprovodné diaminy – putrescin a kadaverin, mohou v důsledku synergického efektu nepříznivou situaci navíc ještě zhoršit. Intoxikace vyvolané požitím nekvalitního rybího masa se pravidelně objevují v různých částech světa. Za rizikové jsou považovány především makrelovité ryby, jejichž tkáň obsahuje volný histidin. Riziko nárůstu zejména v případech, že ryby byly skladovány při nevhodné (vyšší) teplotě, případně maso bylo upraveno (rozmělněno) pro přípravu rybích výrobků (např. fishburger).

Z literárních rešerší je zřejmé, že o tvorbě aminů ve významných mořských rybách (tuňák, makrela aj.) je k dispozici řada údajů, situace u sladkovodních ryb je dosud podstatně méně prostudována. Ukazuje se, že u sladkovodních ryb nepředstavuje obsah biogenních aminů přímou toxikologickou hrozbu.

U sladkovodních ryb jsou obsahy biogenních aminů významné především z hlediska jejich potenciálního využití jako indikátorů jakosti masa. V minulosti byla navržena různá kritéria

založená na obsahu různých biogenních aminů ve vzorcích. Pro sladkovodní ryby byly nalezeny korelace mezi obsahem biogenních aminů a sensorickými ukazateli kvality. Na základě tvorby biogenních aminů lze posuzovat míru rozkladu matrice vzorku a sledovat změny, k nimž dochází v průběhu skladování masa či posuzovat účinnost různých způsobů konzervace.

## 2 CÍL PRÁCE

Mezi netradiční a perspektivní způsoby konzervace patří užití radioaktivního záření či aplikace vysokého tlaku. Cílem disertační práce je prozkoumat vliv konzervace vzorků účinkem radioaktivního záření a účinkem vysokého tlaku na tvorbu biogenních aminů. Pozornost je věnována zejména masu sladkovodních ryb. Očekává se, že různé dávky záření budou mít nestejný konzervační účinek na jakost masa a s ním spojenou tvorbu biogenních aminů. Lze předpokládat, že během experimentů budou nalezeny optimální (minimální) dávky  $\beta$ -záření a optimální (minimální) úrovně vysokého tlaku pro účinnou konzervaci rybího masa.

Pro disertační práci byly stanoveny následující cíle:

- Rozvrhnout experimentální schéma zpracovávaných vzorků ryb a následně čisté hmotnosti rybí svaloviny.
- Vzhledem k novosti řešené tematiky provést zkušební experiment s rybím masem, který umožní odhadnout optimální skladovací dobu, teplotu, správné rozložení časových odběrových profilů, správné dávky  $\beta$ -záření a správné úrovně vysokého tlaku. Tyto orientační výsledky by měly umožnit optimální založení následujících pokusů.
- Ověřit vliv  $\beta$ -záření a vysokého tlaku na tvorbu biogenních aminů v mase běžně konzumovaných sladkovodních ryb.
- Stanovit BA v mase sladkovodních ryb v průběhu skladování po aplikaci konzervační techniky pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC).
- Vyhodnotit účinek dané konzervační techniky ( $\beta$ -záření, vysoký tlak) na skladovatelnost masa sladkovodních ryb.

V rámci stanovení jednotlivých biogenních aminů v mase sladkovodních ryb, bude používán postup dle Dadákové a spol. 2009 <sup>1</sup>, při kterém se jako analytická koncovka používá ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC).

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární báze s významnou biologickou aktivitou. BA hrají důležitou roli v mnoha buněčných fyziologických funkcích. Hygienicky významné aminy jsou zvláště putrescin, kadaverin, spermidin, spermin, histamin, tyramin, tryptamin a 2-fenylethylamin. BA můžeme podle chemické struktury dělit na:

1. aromatické (tyramin – TYM, 2-fenylethylamin – PEA),
2. heterocyklické (histamin – HIM, tryptamin – TRM),
3. alifatické diaminy (putrescin – PUT, kadaverin – CAD),
4. polyaminy (spermidin – SPD, spermin – SPM).

U skupiny polyaminů (PUT, SPD, SPM, příp. CAD), které jsou v přiměřené míře přijímány potravou, byly prokázány za určitých podmínek příznivé účinky na organismus. Naopak při vyšších koncentracích se mohou objevit toxické účinky BA. Při konzumaci jídla, které obsahuje velké množství těchto látek, mohou nastat vážné zdravotní komplikace, zvláště u citlivých jedinců. Nepříznivý vliv má také souběžná konzumace alkoholu nebo užívání některých léků.

BA se často vyskytují ve zkažených potravinách, kde jsou považovány za indikátory rozkladu proteinů. V posledních dvou desetiletích velmi zesílil výzkum podmínek vzniku BA v potravinách a jejich účinku na lidský organismus i v souvislosti s hygienickými podmínkami.<sup>2</sup>

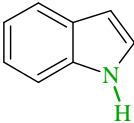
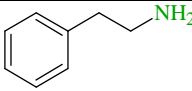
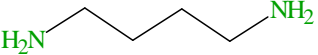
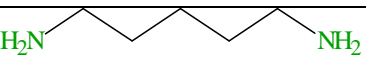
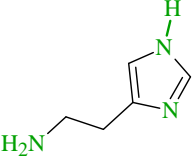
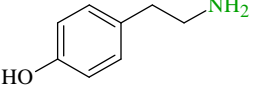
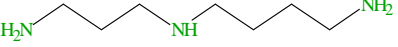
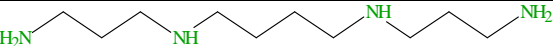
V potravinách, jako je ovoce, zelenina, maso, ryby, čokoláda, mléko a sýry, jsou BA v nízkých koncentracích přirozenou složkou. Aminy mohou být vytvořeny pomocí mikroorganismů a to působením jejich dekarboxyláz. Vysoký výskyt mikroorganismů může vést ke značné akumulaci BA. Přítomnost a akumulace BA závisí na mnoha faktorech. Jedním z těchto faktorů je například přítomnost specifických bakterií (enterokoky a laktobacily) a jejich dekarboxylačních enzymů, dalšími faktory jsou dostupnost substrátu (volné aminokyseliny), přítomnost vhodného kofaktoru, existence vhodného prostředí (vyšší pH, větší vlhkost, vyšší teplota a nižší obsah solí), typ potraviny a doba skladování.<sup>3</sup>

Aminy se někdy rozdělují do dvou typických skupin, a to na polyaminy a biogenní aminy.

Polyaminy (PUT, SPD, SPM) se přirozeně vyskytují ve všech živých buňkách. Jsou spojeny se syntézou DNA, RNA a proteinů, jsou esenciálními složkami pro růst

a rozmnožování buněk. SPD a SPM jsou činné při obnovování epitelu trávicího traktu a střevních tkání.

Biogenní aminy (PUT, CAD, TYM, HIM, PEA a TRM) obvykle vznikají v potravinách během procesu výroby nebo během fermentace. BA vznikají dekarboxylační přeměnou volných aminokyselin při procesu zvaném proteolýza.<sup>4</sup>

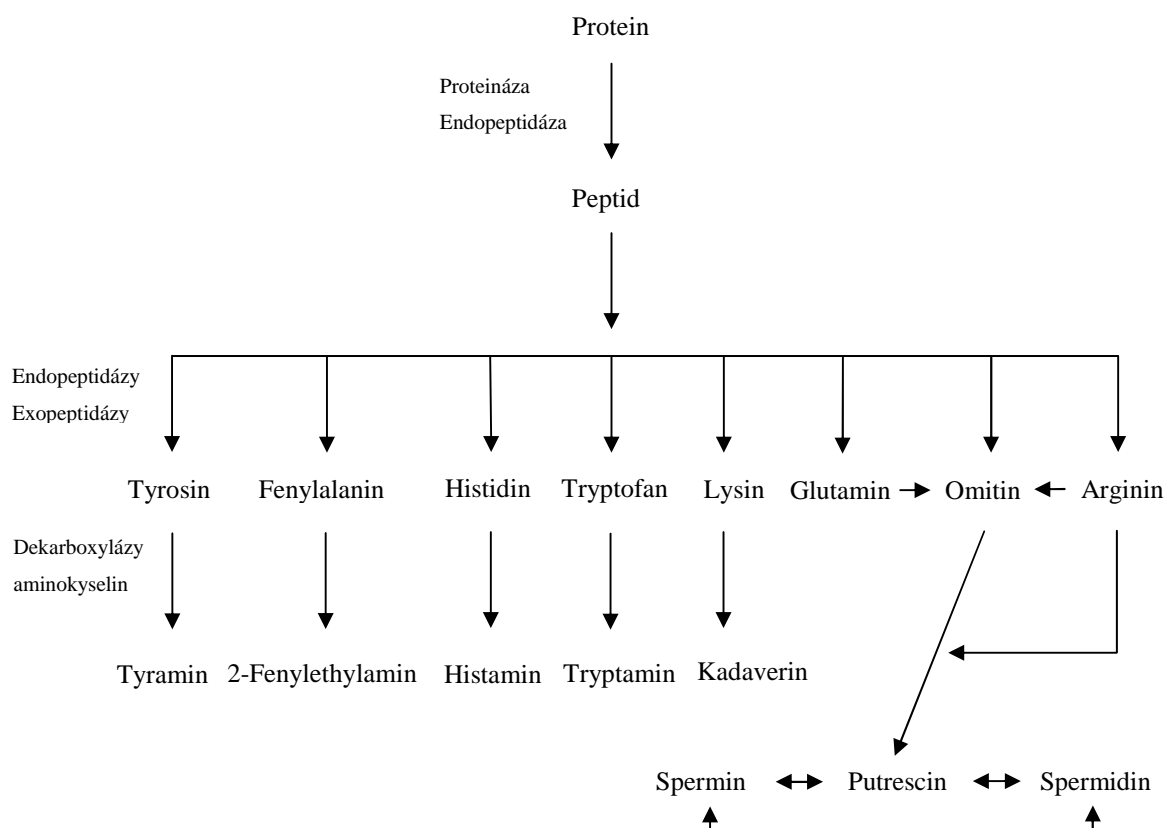
Triviální název BA	Systematický název
	Strukturní vzorec
tryptamin	2-(1H-imidazol-5-yl)etanamin
	
2-fenyletylamin	2-fenyletanamin
	
putrescin	butan-1,4-diamin
	
kadaverin	pentan-1,5-diamin
	
histamin	2-(1H-imidazol-5-yl)etanamin
	
tyramin	4-(2-aminoethyl)fenol
	
spermidin	N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin
	
spermin	N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin
	

**Obr. 1** Systematický název a strukturní vzorec významných biogenních aminů.<sup>5</sup>

Narůstající zájem o stanovení obsahu a zastoupení jednotlivých BA v potravinách vychází z biologického působení těchto látek na člověka. BA jsou pro lidský organismus nepostradatelné, ale ve vysokých koncentracích mohou působit jako látky psychoaktivní a vasoaktivní. Symptomy po konzumaci vysokých dávek BA jsou zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypo- nebo hypertenze (HIM) a migrény (PEA, TYM). PUT a CAD mohou být indikátory nežádoucích přeměn proteinů. Během vývoje se měnil pohled na roli polyaminů, které, jak je známo, se podílejí na růstu a rozmnožování buněk a proto mohou působit příznivě např. při hojení ran, ale jsou naopak zcela nežádoucí z hlediska možné podpory růstu nádorových tkání.<sup>6</sup>

### 3.1.1 Vznik a výskyt biogenních aminů

BA vznikají účinkem mikroorganismů, a to enzymatickou dekarboxylací volných aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Vyskytují se ve všech potravinách, které obsahují proteiny nebo volné aminokyseliny a jsou vystaveny podmínkám mikrobiální a biochemické aktivity. Dále se BA vytvářejí působením nativních enzymů potravin a činností specifických mikrobiálních dekarboxyláz.



**Obr. 2** Tvorba biogenních aminů.<sup>7</sup>



Mezi jednotlivé faktory rozhodující při vzniku BA patří bakteriální hustota, synergické efekty mezi mikroorganismy, úroveň proteolýzy (dostupnost substrátu), pH, hladina solí ve vodě, teploty skladování a obsah sušiny. Koncentrace BA může dosahovat rizikové úrovně pouze tehdy, jestliže alespoň jeden z těchto faktorů je pro tvorbu BA příznivý.<sup>8</sup>

Pro vznik většího množství BA jsou nutné:

- dostupnost volných aminokyselin,
- výskyt bakterií vybavených dekarboxylázami aminokyselin,
- podmínky umožňující růst bakterií, biosyntézu dekarboxyláz a jejich aktivitu.

Významným předpokladem tvorby BA je proteolýza, kdy vznikají volné aminokyseliny jako prekurzory BA. Jedná se o proteolýzu autolytickou nebo bakteriální.<sup>2</sup>

Ve vyšších koncentracích se BA vyskytují ve fermentovaných výrobcích (sýry, trvanlivé salámy, pivo, víno, kysané zelí apod.). Míra jejich vzniku souvisí s použitými startovacími mikrobiálními kulturami a také s mikroorganismy, které jsou běžně přítomné ve zpracovávané surovině. Sýry obsahují vysoký obsah bílkovin, v nichž mikrobiální a enzymatické aktivity způsobují vznik volných aminokyselin a následně BA. Dochází k tomu, že během zrání sýrů dochází k degradaci kaseinu a následně k postupnému kumulování volných aminokyselin, které mohou být konvertovány na BA pomocí aktivity bakteriálních dekarboxyláz.

BA se vyskytují i v nefermentovaných potravinách (maso, mořské ryby, zelenina, ovoce) vznikají hlavně působením kontaminující mikroflóry během skladování. Při skladování potravin může být obsah BA ukazatelem jakosti vstupní suroviny nebo úrovně hygieny během výrobního procesu a skladování. Vysoké koncentrace aminů se vyskytují u potravin v pokročilém stupni rozkladu, proto zjišťování jejich obsahu slouží i k posouzení míry rozkladu potravin. Odstranění již jednou vzniklých BA v potravině je prakticky nemožné. Nejvhodnějším postupem je proto dodržování takových technologických postupů a hygienických podmínek výroby, které brání jejich vzniku. Nejdůležitějším opatřením pro zamezení tvorby aminů je používání vhodné teploty skladování. Při 10 °C je tvorba aminů značně zpomalena a při 5 °C téměř ustává. S teplotou souvisí také celková doba skladování.<sup>9, 10, 11</sup>

Decarboxylázy aminokyselin nejsou u bakterií zcela běžné, ale vyskytují se mnoha rodů, zejména *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* a *Shigella* a mléčných bakterií, jsou to rody *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Účinnost dekarboxyláz aminokyselin je velmi různá. Dokonce i různé rody jednoho druhu se mohou lišit v produkci BA až o tři řády. Je proto téměř

nemožné najít korelaci mezi obsahy BA a počty gramnegativních bakterií. Vzhledem k různorodosti druhů a rodů jsou odlišné i optimální podmínky pro tvorbu BA, jako je např. teplota, pH, přístup kyslíku či obsah chloridu sodného. Většina aminů včetně HIM je tepelně stálá. Některé dekarboxylázy si uchovávají aktivitu i po pasteraci, takže obsah BA může vzrůstat i během skladování takto ošetřených potravin.<sup>2</sup>

### 3.1.2 Biologický účinek BA

BA mohou zapříčinit např. bolest hlavy, výkyvy krevního tlaku, horečku, nevolnost, vyrážku na kůži (kopřivku), dýchací potíže, nával krve do obličeje, vyrážku na kůži, žaludeční a střevní vředy. Ve střevním traktu savců funguje detoxifikační systém, který dokáže metabolizovat běžná množství BA v potravinách. Hlavní roli hrají enzymy monoaminoxidáza (MAO) a diaminoxidáza (DAO). Tyto enzymy mají však jen omezenou kapacitu, která nezvládne odbourat nadměrný příjem BA. Intoxikace se pak může projevit i u potravin, které na pohled nejeví projevy zkažení. Uvedené enzymy působí především ve střevním epitelu. Do krevního oběhu se dostávají již produkty oxidace BA. Aktivitu zmíněných enzymů snižuje alkohol a některé léky, účinkující jako jejich inhibitory. Nejvýraznější vliv mají některá psychofarmaka a dále nepříznivě působí zvláště klasická antidepressiva Tranylcypromin, Nardil, Anuredal a Imipramin, některá z nich jsou v dnešní době nahrazována preparáty s jinými farmakodynamickými účinky. Nicméně velmi široce jsou používána broncholytika – např. ambroxol (lék Mucosolvan), která významně snižují činnost MAO a DAO. Detoxifikační schopnost organismu je individuální a zhoršuje se např. při některých onemocněních. Z tohoto důvodu je určení prahové toxicity BA velmi obtížné. Toxická dávka je silně závislá na schopnosti detoxifikačních mechanismů u každého jedince.<sup>3</sup>

Toxické dávky BA je obtížné stanovit. Velmi záleží na kondici jedince, zastoupení jednotlivých BA v potravine, množství zkonsumované potraviny a přítomnosti jiných potencujících složek, jimiž jsou již zmiňovaný alkohol nebo léky. Obsah  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  HIM ve vzorku může způsobit intoxikaci histaminem,  $100\text{--}800 \text{ mg.kg}^{-1}$  TYM může způsobit tzv. reakci na sýr („cheese reaction“) (k tomu stačí pouze i 6 mg, pokud pacient užívá léky s účinkem MAO). Alimentární migrénu může vyvolat PEA v obsahu pouhých  $30 \text{ mg.kg}^{-1}$ .<sup>12</sup>

Česká legislativa do roku 2004 obsahovala limity pro vybrané BA v rybách, sýrech, pivu a vínu, ale dnes je v ČR platný jen hygienický limit pro HIM v rybách a výrobcích z ryb

uváděný v Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 ve výši  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Tento limit může být ve dvou vzorcích z devíti z jedné šarže překročen až do hodnoty  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Legislativa neurčuje výrobcům deklarovat obsah BA na obalovém materiálu. Sýry obvykle obsahují jednotky až stovky  $\text{mg.kg}^{-1}$  HIM, TYM, PUT a CAD, jednotky až desítky  $\text{mg.kg}^{-1}$  PEA a velmi malá množství TRM.<sup>12</sup>

### **3.1.2.1 Otrava histaminem (HIM)**

Histamin může zasahovat do řady fyziologických funkcí a v organismu je exogenního nebo endogenního původu. V lidském těle je uložen v žírných buňkách a v basofilních granulocytech, což je jeden z druhů bílých krvinek. Odtud se uvolňuje do krve jako důsledek alergické reakce. Druhým zdrojem HIM je potrava. HIM z potravy může způsobovat stejné potíže, jako HIM uvolněný z tělních depozit. Intoxikace pomocí HIM se často mylně vysvětluje jako alergická reakce, protože jejich projevy jsou si velmi podobné. Otrava HIM se však dá rozlišit, podle toho zda už se alergie na danou potravinu již někdy vyskytla, zda došlo k projevům u více lidí a zda lze předpokládat výskyt HIM v dané potravíně.

Část HIM, případně i další BA, se již vstřebávají z dutiny ústní, jak lze usuzovat z rychlosti, s jakou se dostaví účinek po příjmu HIM (někdy dokonce i do pěti minut). Rychlost vstřebávání je tedy vyšší, než rychlost detoxifikace střevními aminooxidázami. Inkubační doba bývá 30 minut po požití. Projevy trvají obvykle několik hodin, výjimečně i několik dnů. Otravu lze rychle překonat podáním antihistaminik.<sup>2</sup>

### **3.1.2.2 Otrava tyraminem (TYM)**

TYM je nejučinnější ze skupiny tzv. vasoaktivních aminů, tj. látek, které zvyšují krevní tlak. TYM může při podání léků inhibujících MAO vyvolat tzv. hypertenzní krizi se silnými bolestmi hlavy, krvácením do mozku i selháním srdce. Mírnější intoxikace TYM se projevují jako migrény. Poprvé bylo zvýšení krevního tlaku vyvolané TYM zjištěno po konzumaci sýrů u pacientů léčených inhibitory MAO v 60. letech. Intoxikace TYM a HIM se někdy označuje jako tzv. „cheese reaction“.<sup>2</sup>

### 3.1.2.3 Role polyaminů

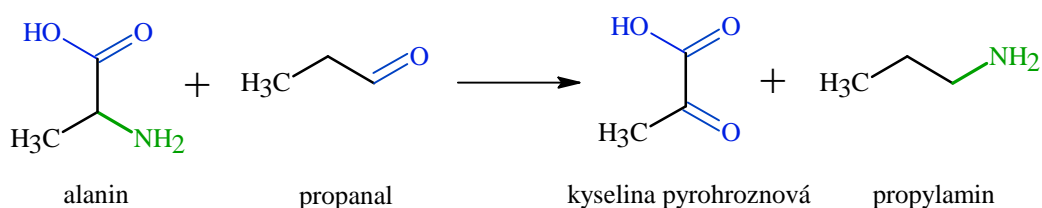
Polyaminy PUT, SPD a SPM jsou nepostradatelnou složkou pro všechny živé buňky, protože se podílejí na syntéze nukleových kyselin a proteinů. Lidský organismus využívá i polyaminy z potravy, které zřejmě ukládá jako rezervu ve svalech a kůži.

Zvýšená spotřeba polyaminů se projevuje při nádorovém bujení. Za těchto okolností by měl být jejich příjem co nejnižší. Naproti tomu v období, kdy je žádoucí intenzivní růst buněk, jako je hojení ran, pooperační stavy apod., může být zvýšený příjem žádoucí.<sup>2</sup>

## 3.2 Biochemické reakce biogenních aminů

### 3.2.1 Metabolismus aminů

Nižší monoaminy vznikají z aldehydů transaminačním pochodem. Pouze čtyři aminokyseliny mohou sloužit jako donor aminové skupiny: L-alanin, kyselina 5-aminokapronová, kyselina 4-aminomáselná a kyselina L-glutamová. Škála aldehydů schopných vstupovat do této reakce je poměrně široká.

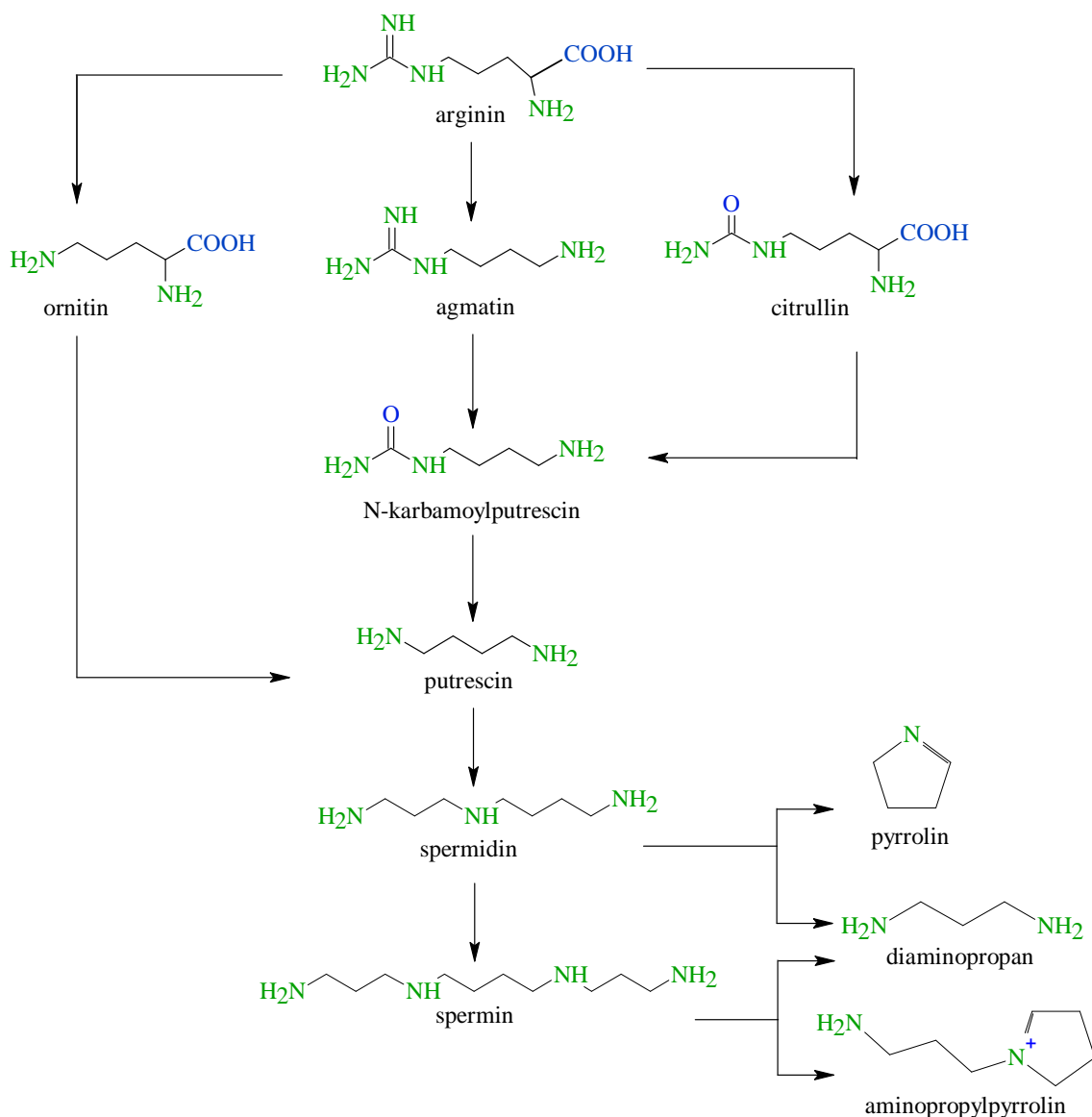


(1)

Některé z monoaminů, jeden až dva, ze šesti vznikají dekarboxylační reakcí. Touto cestou je vytvářen např. isobutylamin z valinu.<sup>13</sup>

Pro polyaminy je dnes běžně přijímáno biosyntetické schéma (Obr. 3), vycházející z aminokyselin argininu a ornitinu. Zdrojem PUT je u vyšších rostlin převážně arginin, který je arginindekarboxylasou (ADC) převáděn na agmatin. Z agmatinu může dále účinkem agmatindeiminasy vznikat *N*-karbamoylputrescin, z něhož PUT vzniká transformací pomocí *N*-karbamoylputrescinamidohydrolasy. V některých případech může *N*-karbamoylputrescin vznikat i z citrullinu.

Dalším prekurzorem PUT je ornitin tvořící se štěpením argininu enzymem arginasou. Pro některé rostliny (např. *Nicotiana*), je právě ornitin štěpený ornitindekarboxylasou (ODC) výhradním zdrojem PUT. Stejnou cestou, výlučně z ornitinu, vzniká PUT i v živočišných buňkách.



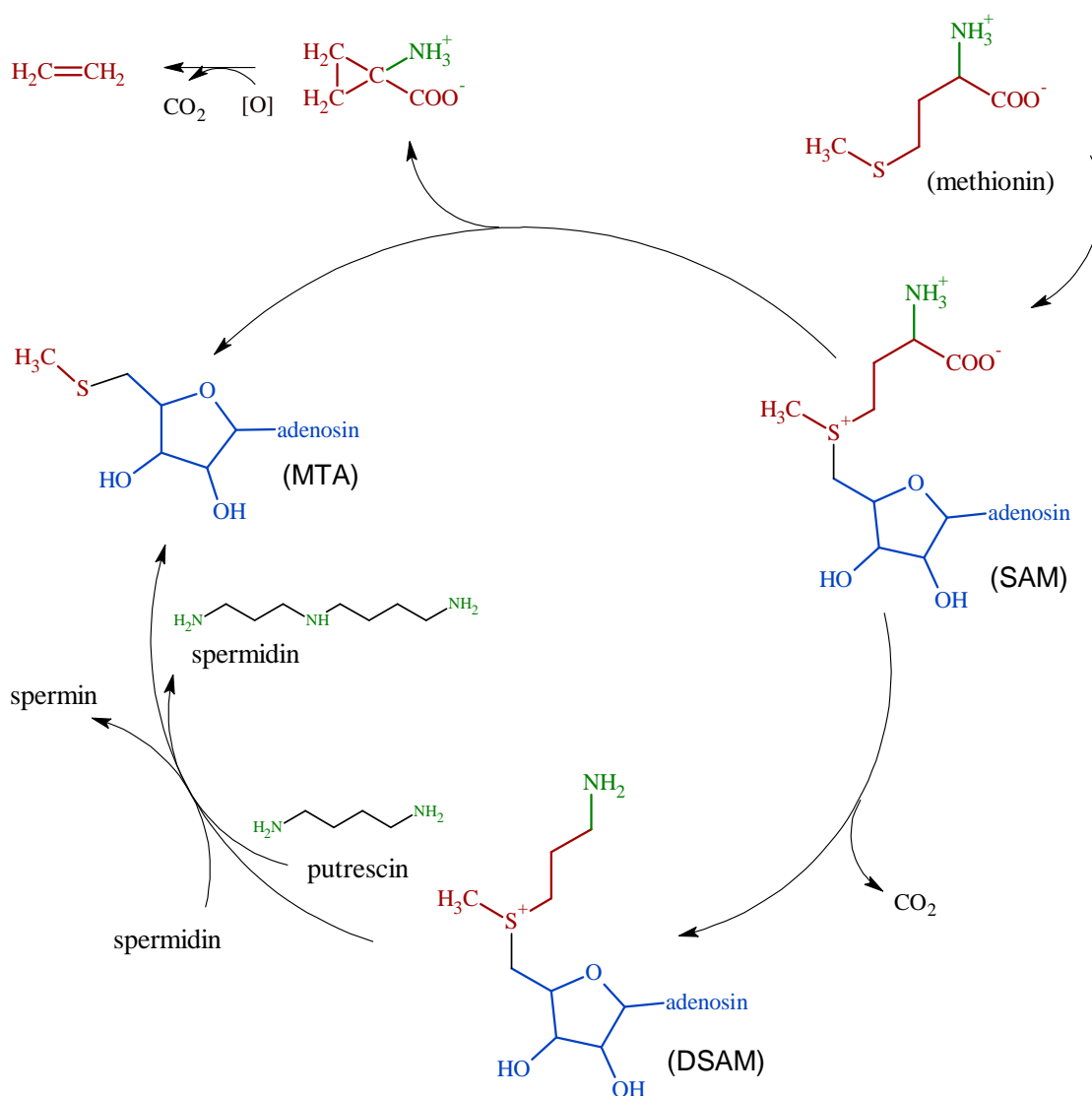
**Obr. 3** Biosyntéza diaminiů a polyamidů

Funkce ADC a ODC v rostlinných buňkách v souvislosti s tvorbou PUT je obtížné vymezit. Zvýšená aktivita ODC se promítá do zintenzivněného dělení buněk. Aktivita ADC souvisí pravděpodobně více s intenzitou růstu buněk, v případě rostlin též s jejich reakcemi na stresové situace.<sup>14</sup>

Na rozdíl od PUT je způsob biosyntézy SPD a SPM stejný u rostlin i živočichů. Tento proces byl velmi dobře popsán v roce 1987 Miyazakim a Yangem<sup>15</sup> a skládá se z několika kroků (Obr. 4). Pomocí enzymu *S*-adenosylmethionindekarboxylasy (SAMDC) je *S*-adenosylmethionin (SAM) přetvářen na dekarboxylovaný SAM (DSAM). Aminopropyllová skupina z DSAM je poté pomocí spermidinsyntasy přenášena buď na PUT za vzniku SPD

nebo na SPD za vzniku SPM. DSAM přitom přechází na 5'-methylthioadenosin (MTA). MTA, který vzniká jak při syntéze polyaminů, tak i ethylenu, přechází po řadě přeměn cyklicky opět v methionin. Je pravděpodobné, že existuje regulace směru biosyntézy usnadňující buď tvorbu ethylenu, nebo polyaminů. Tento předpoklad je z fyziologického hlediska přijatelný, neboť polyaminy a ethylen mají často protichůdné funkce. Ethylen urychluje některé procesy spojené se stárnutím (zráním). Polyaminy mohou takovéto změny zbrzdit.

Objev kompetitivního inhibitoru spermidinsyntasy – dicyklohexylaminu (DCHA) otevřel nové možnosti na tomto úseku výzkumu.<sup>16</sup>



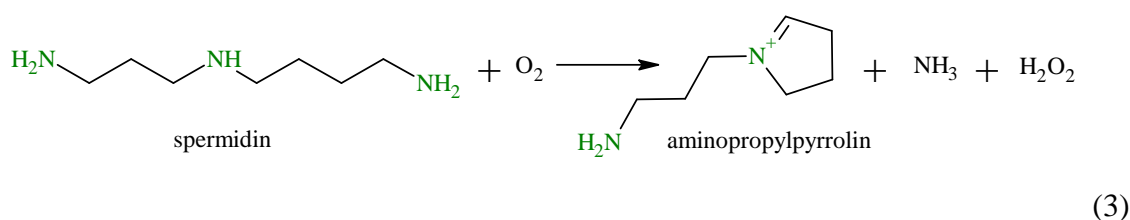
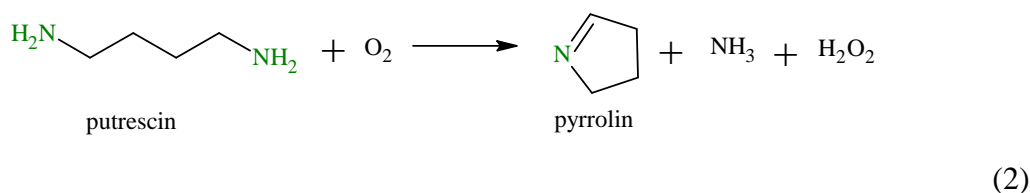
**Obr. 4** Biosyntéza SPD a SPM (tzv. methioninový cyklus)<sup>15</sup>

Biosyntéza CAD vychází z homoargininu přes homoagmatin jako meziprodukt. Rozhodující podíl CAD však vzniká důsledkem dekarboxylace lysinu. Ve srovnání s PUT a polyaminy není biochemie CAD zpracována v takové šíři.

Stěžejní cestou vzniků aminů v organických materiálech (poživatinách, krmivech či odumřelých organismech) je tvorba aminů dekarboxylační cestou z aminokyselin, katalyzovaná mikrobiálními enzymy.

### 3.2.2 Katabolismus aminů

Při katabolismu polyaminů v buňkách hraje důležitou úlohu diaminoxidasa (DAO). Tento enzym jeví vysokou specifitu k PUT a CAD, méně vhodnými substráty jsou SPD a SPM. PUT je zde oxidován na pyrrolin a SPD na aminopropylpyrrolin.



Dalším enzymem uplatňujícím se při katabolismu aminů je polyaminoxidasa (PAO). Jejím účinkem dochází k oxidaci SPD za vzniku pyrrolinu a k oxidaci SPM za vzniku aminopropylpyrrolinu. Reakce do značné míry analogická předchozí je však doprovázená tvorbou diaminopropanu namísto amoniaku.

Oba enzymy jsou z největší části situovány v buněčných stěnách a jejich hlavní funkcí je ovlivňovat rychlost růstu buněk.<sup>17</sup>

V poživatinách a krmivech se uplatňuje značná reaktivita BA. Mohou být přetvářeny na aldehydy cestou oxidační deaminace. S aldehydy mohou při zahřívání či dlouhodobém skladování tvořit amidy. Tyto reakce vedou ke vzniku Schiffových bází a jsou známy jako tzv. Maillardovy reakce či neenzymatické hnědnutí.

BA mohou v kyselém prostředí vytvářet s dusitany či oxidy dusíku karcinogenní nitrosaminy.<sup>18</sup>

Při detoxikaci aminů u živočichů se kromě diaminooxidázy uplatňuje též enzym monoaminooxidasa (MAO). Tyto enzymy oxidují aminy na aldehydy a posléze na organické kyseliny.

HIM je v trávicím traktu detoxikován pomocí MAO i DAO na kyselinu imidazoloctovou, tyramin na kyselinu *p*-hydroxyfenyloctovou.<sup>19</sup>

### **3.3 Mikroorganismy produkující biogenní aminy**

Mikroorganismy, které jsou schopny produkovat BA a vykazují dekarboxylační aktivitu, jsou bakteriální rody *Bacillus*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Některé mikroorganismy v potravinách naopak BA odbourávají (*Pseudomonas*, *Serratia*, *Sarcina*). Proteolytická aktivita enzymů, které podporují tvorbu BA je mnohem vyšší než aktivita enzymů degradujících.<sup>10</sup>

Za tvorbu aminokyselin jsou odpovědný hlavně proteolytické enzymy pocházející ze startovacích kultur a syřidla, které podporují štěpení kaseinu. Optimum aktivity dekarboxylačních enzymů schopných dekarboxylovat aminokyseliny se pohybuje v kyselé oblasti pH. Velké výkyvy a zvláště rychlý pokles pH působí negativně na aktivitu enzymů. Produkce aminů se obvykle zvyšuje se zvyšující se teplotou, vodní aktivitou a snižující se koncentrací soli.<sup>4</sup>

#### **3.3.1 Enterococcus spp.**

##### **3.3.1.1 Charakteristika enterokoků**

Enterokoky patří mezi bakterie mléčného kvašení (LAB) a jsou významné jak pro životní prostředí, tak pro potraviny a klinickou mikrobiologii. Bakterie rodu *Enterococcus* neboli enterokoky (dříve nazývány také „fekální“ nebo Lancefieldova skupina D streptokoků) jsou všudypřítomné grampozitivní (G+) koky, které se ve vysokém množství vyskytují v zelenině, rostlinném materiálu, potravinách a to zvláště v těch, jejichž původce je živočich. Tyto bakterie hrají významnou užitečnou roli při výrobě různých tradičních fermentovaných potravin vyráběných zvláště v jižní Evropě (především při výrobě tradičních sýrů). Přítomnost a růst enterokoků ve fermentovaných potravinách jako jsou sýry a klobásy vykazují



organolepticky unikátní vlastnosti, které přispívají k zajištění vzniku místního kulinářství a jedinečnosti původu daného výrobku.<sup>20,21</sup>

V současné době do rodu *Enterococcus* řadíme více než 20 druhů, kdy se nejčastěji vyskytuje *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis*. *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis* jsou přirozenými členy střevní mikroflóry člověka vyskytujících se v různých množstvích v závislosti na jedinci ( $10^2$ – $10^8$ /g střevního obsahu) a osídlují celý zažívací trakt. Proto se někdy používají také jako probiotika mající blahodárny vliv na funkčnost zažívacího traktu. Často byly dříve považovány za indikátory fekálního znečištění, avšak bylo zjištěno, že se vyskytují téměř všude a i na rostlinách, které nepřišly s fekáliemi vůbec do styku.

Enterokoky vykazují i nežádoucí účinky. V kontrastu s tím, že jsou řazeny mezi bakterie mléčného kvašení, nejsou enterokoky považovány za všeobecně „bezpečné“ (GRAS = Generally Recognized as Safe) a jejich detekce ve vodě je považována jako indikátor fekální kontaminace. Jsou odpovědny za zkažení potravin, zvláště masa, a ještě závažněji mohou způsobit lidská onemocnění. Enterokoky jsou zdravotně závažné, protože zvyšují výskyt nosokomiálních onemocnění a neobvyklých infekcí jako je endokarditida, bakteriémie, infekce močových cest, infekce centrální nervové soustavy, vnitrobřišní a pánevní infekce.<sup>22,23</sup> Virulence enterokoků je výrazně umocněná tím, že jsou rezistentní proti antibiotikům, které se běžně v praxi používají.<sup>24</sup>

### 3.3.1.2 Vliv enterokoků na lidský organismus

Ačkoliv jsou enterokoky konzumovány již po staletí a nikdy nebyly považovány za částečně virulentní organismy, dnes je tomu jinak. Jsou objevovány jako hlavní příčina vzniku nosokomiálních infekcí všude ve světě. Enterokoky jsou třetí nejběžnější příčinou nosokomiální krevní infekce ve Spojených státech a čtvrtou v Evropě. Enterokokové infekce jsou převážně způsobeny *E. faecalis* a *E. faecium*, jež zodpovídají až za 80 % infekčních onemocnění. Poslední studie signalizují, že poměr infekcí způsobené *E. faecium* stoupá, hlavně následkem toho, že se zvyšuje antibiotická rezistence *E. faecium* izolátů. Jiné druhy enterokoků jako je *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* nebo *E. raffinosus* byly mnohem méně častěji odpovědny za enterokokové infekce. Enterokokové klinické izoláty jsou neškodné u zdravého jedince, ale stávají se patogenními hlavně u pacientů jednotky intenzivní péče a u hospitalizovaných pacientů se závažným onemocněním nebo zhoršenou funkcí imunitního systému nebo u starších lidí. Enterokoky

jsou často sdruženy s dalšími patogeny u polymikrobiálních intraabdominálních infekcí, čímž se komplikuje určení jejich konkrétní role u dané infekce. To však nemění nic na tom, že bylo jasně prokázáno, že jsou bakterie rodu *Enterococcus* spp. zodpovědné za infekci močových cest, bakteriémii, endokarditidy a pooperační komplikace po operaci šedého zákalu.

Epidemiologické studie často vztahují enterokokové infekce s primární kolonizací pacientova gastrointestinálního traktu. Translokace enterokoků přes intestinální epitelovou vrstvu je považována za příčinu vzniku bakteriémie. Další identifikovatelné zdroje pro vznik bakteriémie zahrnují zavedení intravenózní infuze, abscesy a infekce močových cest. Rizikový faktor úmrtnosti spojený s enterokokovou bakteriémií zahrnuje řadu nemocí, věk a užívání širokospektrálních antibiotik jako je třetí generace cefalosporinů nebo metronidazolů. Enterokoková bakteriémie může způsobit také endokarditidu, která vyžaduje nejnáročnější léčbu krevního řečiště a je spojována všeobecně s vyšší úmrtností. Hned po streptokokích a *Staphylococcus aureus* řadíme enterokoky na třetí místo ve schopnosti způsobovat bakteriémii. Ze všech případů onemocnění endokarditidou jsou enterokoky zodpovědné přibližně za 5–20 %.

Zatímco jsou všechny rizikové faktory enterokokové infekce stále debatovány, je zanedbávání hygienických podmínek, předcházející intenzivní ošetřování antibiotiky, delší hospitalizace a přítomnost močových nebo žilních katetrů považovány za rizikové faktory, kdy může vzniknout enterokoková infekce. Ačkoliv se stupeň úmrtnosti liší mezi studiemi a nemocničními studiemi z oddělení, je průměrný stupeň úmrtnosti 20–30 %. Enterokokové infekce jsou velmi závažné pro zdraví člověka a jako nosokomiální patogeny mají přímý a významný ekonomický dopad na prodloužení doby hospitalizace v nemocnicích a poskytování další a náročnější péče.<sup>22</sup>

### **Rezistence enterokoků k antibiotikům**

Virulence enterokoků je silně zvýšena jejich častou odolností k běžně používaným antibiotikům. Antibiotická rezistence, která může být jak vlastní, tak získaná, dělá enterokoky efektivními oportunisty způsobující nosokomiální infekce.<sup>24</sup> Antibiotická rezistence zaměřující se zejména na *E. faecalis* a *E. faecium* byla intenzivně prostudována. Většinou byly analýzy prováděny u klinických a lidských enterokokových izolátů, protože mají vyšší klinický dopad. Důkladná charakteristika enterokoků prokázala neobvykle vysokou úroveň vlastní tolerance k nízkým koncentracím několika druhů antibiotik zahrnující aminoglykosidy,  $\beta$ -laktamy (třetí generace cefalosporinů) a chinolony. Speciálně *E. faecium*

(jeho klinické izoláty) jsou skutečně rezistentní i k vysokým koncentracím penicilinu. Kromě jejich vlastní tolerance (nízká úroveň rezistence) jsou enterokoky vybaveny i genetickými determinanty, díky kterým získávají rezistenci k mnoha dalším antibiotikům. Speciálně glykopeptidům (vankomycin, teikoplanin) a k synergickému vlivu  $\beta$ -laktamů a aminoglykosidů. Enterokoky rezistentní na vankomycin představují hlavní problém při léčbě infekcí. Jako lék je vankomycin používán jako poslední možnost ošetření při infekcích ohrožující život způsobené vícenásobně antibioticky rezistentní enterokoky.

Mnohé studie se pokusily srovnávat rezistentní spektra různých enterokoků v závislosti na jejich původu (lidský, zvířecí, z potravin). I když jsou antibioticky rezistentní enterokoky izolovány z potravin, jen několik z nich je rezistentní ke klinicky významným antibiotikům jako je ampicilin, penicilin, gentamicin a vankomycin. Antibiotická rezistence u izolátů z mléčných produktů se zdá být poněkud odlišná, než jak bylo dokázáno ve studiích, jelikož závisí na druhu a regionálním původu daných izolátů nebo se také mohou lišit i z důvodu odlišné metody izolace. Např. rezistence na tetracykliny je jedna z nejběžnějších získaných forem antibiotických rezistencí u enterokokových izolátů z potravin. Dalším závažným problémem je schopnost přenosu rezistentních genů do více patogenních druhů. Byla studována a zjištěna schopnost přenosu z *E. faecalis* do *S. aureus* v myší kůži a přenos *in vitro* do listerie. V nových poznacích byl takovýto přenos zakomponovaný při vývoji *S. aureus* rezistentního k vankomycinu a methicilinu. Daná závažná hrozba reprezentovaná tímto patogenem musí být pečlivě monitorována.<sup>22</sup>

### **3.3.2 Lactobacillus spp**

#### **3.3.2.1 Charakteristika laktobacilů**

Laktobacily jsou nesporogenní, grampozitivní tyčinky spadající do skupiny bakterií mléčného kvašení (LAB – lactic acid bacteria). Nacházíme je v substrátech s vysokým obsahem sacharidů, dále také ve svalových membránách živočichů a lidí (ústní dutina, střeva, pochva), na rostlinách a materiálech rostlinného původu, v hnoјivu, v odpadních vodách a ve fermentujících nebo kazících se potravinách. Mikroskopicky jsou tyto bakterie nepohyblivé, tenké tyčinky lišící se ve své délce od dlouhých ke krátkým. Spousta druhů laktobacilů jsou fakultativními anaeroby rostoucí v přítomnosti nebo nepřítomnosti kyslíku v prostředí. Pouze 20 % druhů izolátů z lidského organismu jsou obligátní anaeroby. Laktobacily jsou všudypřítomné ve stravě a nacházejí se v gastrointestinálním traktu již brzy po narození. U zdravého jedince jsou přítomny v ústní dutině ( $10^3$ – $10^4$  cfu/g), tenkém střevě

( $10^3$ – $10^7$  cfu/g) a tlustém střevě ( $10^4$ – $10^8$  cfu/g) a také jsou dominantní mikroflórou v pochvě. Laktobacily hrají významnou roli při výrobě fermentovaných potravin: zelenina, maso a částečně fermentované mléčné produkty. Mléčná kyselina je hlavním metabolickým konečným produktem laktobacilů během fermentace glukosy. Octová a jantarová kyselina jsou také vytvářeny, ale jen v menším množství. Gastrointestinální trakt (GI) jednotlivých savců je běžně kolonizován bakteriemi rodu *Lactobacillus* spp. Nejčastěji izolovaným druhem z trávicího traktu jsou *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* a *Lb. salivarius*. Laktobacily jsou různorodá skupina bakterií.<sup>25</sup>

### 3.3.2.2 Vliv laktobacilů na lidský organismus

Navzdory jejich extrémní všudypřítomnosti je známo pouze několik málo případů infekcí způsobené laktobacily. Není dokumentovaný žádný případ nemoci z povolání nebo respirační alergie zapříčiněná laktobacily. Mezi roky 1950 a 2003 byl analyzován počet onemocnění způsobených laktobacily. Bylo uvedeno 241 případů a diskutováno, v jakém rozsahu se tento rod bakterií podílí na vzniku endokarditidy, bakteriémie, lokální infekce a další řady infekcí. Poslední sledované infekce postihly pacienty se zavedeným centrálním katetrem. *L. casei* (35,7 %) a *L. rhamnosus* (22,9 %) byli nejběžnějšími viníky onemocnění. Od roku 1823 bylo ve Francii detekováno pět případů infekcí zapříčiněných rodem *Lactobacillus*. Tři případy přivodily endokarditidu, jeden jaterní absces a jeden infekci močových cest. Je faktem, že většina těchto ojedinělých případů onemocnění se vyskytuje u jedinců prodávajících nějaké jiné onemocnění, obvykle několik nemocí současně. Pacienti s oslabenou imunitou jsou obecně více náchylní k infekcím s danými patogeny a více se u nich vyskytují oportunistické infekce.

Laktobacily samy o sobě nepředstavují pro organismus velké riziko. Mnohem rizikovější je výsledek jejich metabolické aktivity, kdy mohou vznikat pro tělo nepříznivé látky, jako je třeba D-laktát nebo BA (HIM, TYM, atd.). Dalšími relativně závažnými vlastnostmi laktobacilů je jejich schopnost dekarboxylace tyrosinu, jejich enzymatická aktivita, degradace kyseliny hyaluronové, kolonizace a produkce toxických metabolitů.<sup>25</sup>

### **Rezistence laktobacilů k antibiotikům**

Antibiotická rezistence bakterií izolovaných z potravin je ve středu pozornosti od té doby, kdy tyto bakterie, včetně laktobacilů, mohou sloužit jako rezervoáry pro antibioticky rezistentní geny. Prostřednictvím potravin vstupuje do našeho organismu velké množství

bakterií a mohou interagovat s vnitřní mikrobiální flórou člověka. Laktobacily se vyznačují také svou vlastní rezistencí vůči některým antibiotikům (např. vankomycin, bacitracin, gentamycin, atd.). Mnoho studií zabývajících se fermentovanými mléčnými výrobky mělo sklon k tomu stanovit antibiotickou škálu rezistence populace laktobacilů bez ohledu na jejich vlastní rezistenci. To je však v celku bezvýznamné, jelikož to nezajišťuje absenci přenosného mechanismu. Jak prohlásila EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin) v roce 2005: Vlastní rezistence a rezistence v důsledku mutace chromosomálních genů představuje malé riziko rozšiřování a na základě toho mohou být tyto bakterie akceptovány pro konzumaci v potravinách. Nicméně však získaná rezistence zprostředkována přidanými geny může představovat riziko pro veřejné zdraví. Pozornost by měla být věnována novým druhům bakterií, které se používají jako startovací kultury nebo probiotika.<sup>25</sup>

### 3.4 Biogenní aminy v mase

Koncentrace aminů v mase je významně ovlivněna způsobem a teplotou uskladnění a je výrazně též závislá na druhu masa. Nejvyšší hladiny aminů jsou typické pro rybí maso zejména u makrelovitých ryb, zejména HIM a TYM zde mohou dosahovat hodnot řádově až tisíců  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . U ostatních druhů masa se jejich hladiny pohybují v rozmezí desítek až stovek  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .<sup>19</sup>

Za tvorbu aminů v mase je zodpovědný zejména rod *Enterobacter* a *Pseudomonas*. Existuje korelace mezi obsahy PUT, CAD a SPD s počtem bakterií zmíněných rodů ve vzorcích hovězího a vepřového masa. Obsahy PUT a CAD bývají vyšší u vepřového masa.<sup>26</sup>

Všeobecně se uvádí, že množství aminů uskladněných při 0 °C či nižších teplotách je zanedbatelné. I u masa a masných výrobků je teplota důležitým činitelem při ovlivnění tvorby aminů. V poslední době se však objevují studie popisující tvorbu PUT, CAD a TYM i ve velmi kvalitně skladovaných vzorcích masa.<sup>27</sup>

Výzkumem dynamiky tvorby BA v rybím mase zjistili Mietz a Karmas v roce 1978, že s postupující dobou uskladnění narůstal v mase obsah PUT, CAD a HIM, zatímco obsah SPD a SPM klesal. Protichůdnosti těchto trendů využili autoři při návržení kritéria použitelného při hodnocení jakosti uskladněného masa. Jejich "index obsahu BA" je definován jako:

$$\text{BAI} = \frac{\text{PUT} + \text{CAD} + \text{HIM}}{1 + \text{SPD} + \text{SPM}}, \quad (4)$$

kde obsahy příslušných aminů jsou dosazovány v  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  či libovolných jiných, ale konzistentních jednotkách. Hodnoty indexu BAI jsou v dobré shodě s organoleptickými vlastnostmi vzorků.<sup>28</sup> V kvalitním rybím mase jsou hodnoty  $\text{BAI} < 1$ , pro ještě přijatelnou kvalitu platí  $1 < \text{BAI} < 10$ , nevyhovující vzorky vykazovaly  $\text{BAI} > 10$ .

Ačkoli korelace mezi BAI a stupněm rozkladu rybího masa prokázali i jiní vědci<sup>29</sup>, řada autorů nepovažuje pokles obsahu SPD a SPM ve skladovaném mase za výrazný či průkazný a doporučují jako optimální kvalitativní kritérium obsah pouze některého konkrétního aminu.

Využití samotného stanovení HIM k odhadu stupně rozkladu masa se však neosvědčilo. Předpokládá se, že vhodným indikátorem jakosti kvalitně vakuově baleného masa by mohl být TYM, neboť v takto skladovaném hovězím mase koncentrace TYM a též PUT a CAD rostou.<sup>27</sup> Tento předpoklad vychází z toho, že laktobacily, které jsou dominantní ve vakuově baleném mase, přednostně vytvářejí právě zmíněný amin.

Ve většině případů je však za nejlepší kvalitativní kritérium považován obsah CAD. Při pokusech se skladováním rybího masa ošetřeného chloramfenikolem se prokázal retardační účinek tohoto antibiotika na tvorbu BA potvrzující, že aminy jsou vytvářeny činností bakteriálních a nikoli endogenních svalových dekarboxylas.<sup>30</sup>

K obdobným závěrům došli i další autoři, kteří experimentovali s inokulací masa různými druhy bakterií a prokázali, že obsah PUT je zvyšován především činností *Pseudomonas*, obsah CAD zase vlivem enterobakterií. Za nejlepší indikátor jakosti považují úhrnnou výši hladiny PUT a CAD.<sup>31</sup>

### 3.4.1 Biogenní aminy v rybím mase

Velká pozornost je v souvislosti s BA věnována rybímu masu. Zastoupení jednotlivých aminů u ryb je různé. Z toxikologického hlediska největší riziko představuje HIM, jehož výskyt ve svalovině ryb je podmíněn koncentrací volného histidinu. Pro rybí maso je ve Vyhlášce č. 305/2004 Sb. v platném znění určeno přípustné množství pouze pro HIM, a to hodnotou  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Zvýšené množství BA v potravě může po konzumaci vyvolávat prudké fyziologické odezvy, u vnímavějších osob může dojít až k těžkým migrénovým stavům. Počty mikroorganismů u skladovaných ryb závisí na počáteční kontaminaci suroviny a na teplotě a době skladování. Zvýšené hodnoty BA jsou v souladu se zvyšujícím se počtem mikroorganismů. Za nejlepší indikátor jakosti může být považována úhrnná výše hladiny PUT a CAD. Tyto BA se tak mohou stát indikátorem mikrobiální kontaminace.

Důvodem, proč se BA vyskytují ve větší míře u určitých druhů ryb, je jednak zvýšený obsah příslušných aminokyselin, a to především histidinu, a také fakt, že v rybách s tmavým masem je vyšší obsah volného histidinu než v bílém rybím mase nebo v mase jatečných zvířat.<sup>32</sup>

Za normálních okolností je HIM, který se dostane do střeva člověka, inaktivován a nevznikají žádné klinické příznaky onemocnění. Při příjmu velkého množství HIM jsou inaktivační mechanismy prolomeny a HIM se dostává do krve. Jsou známy dva hlavní enzymy, které metabolizují HIM. Je to jednak histamináza a histamin-*N*-metyltransferáza. Přítomnost dalších BA nebo užívání některých léků může inhibovat účinek těchto enzymů a zvyšovat účinek BA. To ve svém důsledku znamená, že účinek přijatých BA je dán jednak jejich množstvím, ale také dalšími faktory.

Největší nebezpečí tvorby BA je při vysoké mikrobiální kontaminaci ryb a při nedodržení správné teploty chlazení. Nejčastěji se BA tvoří ihned po vylovení ryb, které nejsou patřičně zchlazeny na teplotu kolem +1 °C. Další rizikovou operací je tepelné opracování, především uzení ryb, hlavně makrel. Záleží na době od přípravy ryb až k vlastnímu tepelnému ošetření (uzení). Pokud je tato doba dlouhá a ryby jsou vystaveny vyšším teplotám, dochází k pomnožování mikroorganismů. Uzení ryb probíhá za nižších teplot a některé mikroorganismy (např. laktobacily) proces uzení mohou přežít, ve vhodných podmínkách se pomnožovat a tvořit především HIM.<sup>32</sup>

Za hospodářsky nejvýznamnější druh naší sladkovodní tržní ryby je dlouhodobě považován kapr obecný (*Cyprinus carpio*), který tvoří téměř 85 % z naší celoroční produkce ryb. Zároveň je také nejčastěji konzumovanou sladkovodní rybou u nás, a to nejenom v období vánočních svátků. Rybí maso je obecně považováno za dieteticky velmi hodnotné a doporučované lékaři zejména při dietním stravování. Celkovou jakost rybího masa nelze ovšem posuzovat pouze na základě jeho nutriční hodnoty, ale jako komplex dalších parametrů, ke kterým patří zdravotní nezávadnost nebo technologické a sensorické vlastnosti mající vztah především k čerstvosti masa.<sup>33</sup>

Zdravotní nezávadnost rybí svaloviny je vymezena příslušnými platnými veterinárně hygienickými předpisy, ostatní parametry, jako jsou fyzikálně chemické vlastnosti mající vztah k látkovému složení nebo znakům čerstvosti, mohou být objektivně laboratorně stanoveny podle platných metodických postupů.<sup>33</sup>

Existují dva důvody pro sledování aminů v potravinách. Prvním důvodem je jejich potenciální toxicita a druhým důvodem je možnost jejich použití, jako ukazatele kvality

potravin. Otrava HIM je světově rozšířený lékařský problém a je pravděpodobně nejběžnějším případem otravy z ryb.<sup>34</sup> Zatímco mořské ryby byly prostudovány ve velkém rozsahu, sladkovodní ryby byly studovány v menším měřítku. Bakterie, přítomné ve vodním prostředí nebo vytvořené během skladování ryb, produkují dekarboxylázu histidinu, která převádí histidin na HIM. Tento proces je urychlen, jestliže ryby nejsou zamražené nebo drženy v chladu.<sup>35</sup> Význam mikrobiální kontaminace pro BA je evidentní. Vykuchaná mořská štika (*Merluccius merluccius*) uložená v ledu vykazovala 3–100 krát vyšší obsah BA a nižší senzoričké výsledky ve srovnání s rybou nevykuchanou.<sup>36</sup> Vykuchání ryb vede k nárůstu mikrobiální kontaminace rybí svaloviny, která se projevuje špatnými senzoričkými vlastnostmi. HIM je v důsledku synergie typičtější v přítomnosti zvýšených obsahů PUT či CAD. Tyto aminy mohou omezovat *in vivo* mechanismus detoxifikace HIM, hlavně účinkem oxidázy diaminu.<sup>37</sup> Otrava HIM je především spojována s konzumací obou rodů mořských ryb, Scombridae a Scomberesocidae.<sup>38</sup>

### 3.4.2 Rozkladné procesy biogenních aminů v rybím mase

BA mohou sloužit jako indikátory rozkladu rybího masa. Potenciální použití BA jako indikátorů kontroly kvality bylo studováno pro mořskou štikou, která byla uložena v kontrolované atmosféře obohacené kyslíkem a v ledu.<sup>39,40</sup> K produkci CAD evidentně došlo před začátkem mikrobiálního kažení. Hodnoty CAD obvykle rostly později než u PUT, ale konečná koncentrace CAD byla obecně vyšší. Tento jev byl pozorován nejenom u mořské štiky, ale také u kapra obecného (*Cyprinus carpio*).<sup>41</sup> Podobný trend byl pozorován také u mořského cejna (*Calamus bajonado*), ale ke konci skladování byly vyšší hodnoty PUT.<sup>42</sup> Hodnoty PUT, CAD a SPD u úhoře říční (*Anguilla anguilla*) během skladování vzrůstaly, zvláště u vzorků uložených bez ledu. Obsah PUT byl 50–90 mg.kg<sup>-1</sup>, CAD 30–90 mg.kg<sup>-1</sup>.<sup>43</sup> Pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) byly jako indikátory kvality určeny PUT, TYM, SPD a SPM. Zatím nebylo nalezeno žádné univerzální kritérium založené na obsahu BA, protože dynamika rozkladu souvisí s druhem ryby a s mikrobiální populací kontaminující rybu. Teplota hraje klíčovou roli v tvorbě BA. Vzorky makrel uložených při 0 a 10 °C obsahují srovnatelné koncentrace BA po 2 a 6 dnech.<sup>44</sup> Úprava atmosféry balení prodlužuje trvanlivost ryb. V experimentu s tuňákem velkookým (*Thunnus obesus*), uloženým při 2 °C, byla prodloužena trvanlivost úpravou atmosféry balení (60 % CO<sub>2</sub>, 15 % O<sub>2</sub>, 25 % N<sub>2</sub>) z 13 na 22 dnů. Tyto závěry byly učiněny na základě stanovení obsahu HIM, CAD a senzoričkých hodnot.<sup>45</sup>



## 3.5 Ošetření rybího masa zářením

### 3.5.1 Ozařování a bezpečnost potravin

Přítomnost mikrobiálních patogenů v potravinách je vážný globální problém. Dokonce ve vysoce industrializovaných a rozvinutých zemích mají potraviny kontaminované patogeny značný zdravotní a ekonomický dopad.

Více než 50 let se zkoumá bezpečnost a účinnost technologie ozařování potravin. Je to více než u jiných technologií používaných v dnešním průmyslu. Při ozařování potravin se používá přísně kontrolované množství ionizujícího záření (tj. záření majícího dostatečnou energii k vytváření kladně a záporně nabitých částic) ke zničení bakterií, patogenů a škodlivého hmyzu v potravinách a zemědělských produktech, čímž se značně snižuje nebezpečí onemocnění z potravin.<sup>46</sup>

#### 3.5.1.1 Typy ionizujícího záření

- gama záření radioaktivního izotopu kobaltu ( $^{60}\text{Co}$ ) a cézia ( $^{137}\text{Cs}$ ),
- urychlené elektrony o energii nepřevyšující 10 MeV ( $\beta$ -záření),
- rentgenové záření o energii nepřevyšující 5 MeV.

Žádný z těchto zdrojů záření nemá takovou energii, aby došlo k indukci radioaktivity, mají však dostatek energie k odstranění elektronů z atomů, přičemž vznikají ionty nebo volné radikály. Uvolněné elektrony narážejí do chemických vazeb v molekulách mikrobiální DNA, dochází k jejich přerušení a usmrcení mikroba.<sup>47</sup>

Množství energie ionizujícího záření pohlcené jednotkou hmotnosti ozářené látky v ozařovaném místě se označuje jako absorbovaná dávka ionizujícího záření. Jednotkou je 1 gray (Gy), který představuje absorbovanou energii záření 1 joule na 1 kilogram látky. Velikost dávky je přímo úměrná intenzitě záření a době expozice, dále záleží na druhu a energii záření i na složení (především hustotě) ozařované látky. Absorbované dávce je přímo úměrný počet vzniklých iontů, volných radikálů a tím i riziko a rozsah poškození biologicky aktivních látek v organismu.<sup>46</sup>

#### 3.5.1.2 Vliv dávky záření

Úroveň snížení mikroorganismů v potravine závisí na dávce, kterou příslušná potravina absorbovala. Gama záření a rentgenové záření má schopnost pronikat hlouběji do potraviny než záření beta. Pokud generátor elektronů dodává elektrony z jedné strany, pronikají

v potravině asi do hloubky 3,8 cm. Aplikací urychlených elektronů ze dvou stran se dosáhne maximální penetrace, tj. až do hloubky asi 8,9 cm.<sup>48</sup>

Ionizující záření poškozují nukleové kyseliny a v konečném důsledku usmrcuje mikroby přímými nebo nepřímými „kolizemi“. V případě nepřímé kolize dochází k poškození nukleových kyselin, když záření ionizuje přilehlou (sousední) molekulu, která pak reaguje s genetickým materiálem. Protože voda je hlavní složkou většiny potravin i mikrobů, je často onou sousední molekulou, která vede v konečném důsledku k usmrcení mikrobu. Ionizující záření způsobuje, že molekuly vody ztrácejí elektron a vzniká  $\text{H}_2\text{O}^+$  a elektron. Tyto produkty reagují s ostatními molekulami vody a vzniká řada sloučenin, např. vodíkový a hydroxylový radikál, molekulární vodík, kyslík a peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Hydroxylové radikály a peroxid vodíku jsou velmi reaktivní. Je známo, že ruší vazby mezi nukleovými kyselinami uvnitř jednoho řetězce i mezi protilehlými řetězci DNA. Ačkoliv biologické systémy mají schopnost napravovat přerušování (rozpojení) u jednotlivých řetězců DNA i mezi nimi, poškození způsobené ionizujícím zářením je náhodné a rozsáhlé. Proto bakteriální oprava radiačního poškození je téměř nemožná.<sup>49</sup>

Relativní citlivost různých mikroorganismů k ionizujícímu záření je založena na jejich příslušných hodnotách  $D_{10}$  (což je dávka potřebná ke snížení populace o 90 %). Nižší hodnota  $D_{10}$  udává větší citlivost organismu.

Mikrobiální buňky, patogenní nebo běžné mikroflóry potravin, vykazují rozdílnou odezvu na ionizující záření. Hlavními faktory, které ovlivňují rezistenci mikrobiálních buněk k ionizujícímu záření, jsou:

- velikost organismu: čím je cílový organismus menší, tím je odolnější k ionizujícímu záření,
- typ organismu, tj. charakteristika buněčné stěny, grampozitivní (G+) nebo gramnegativní (G-) povaha,
- počet a relativní „stáří“ buněk v potravině,
- přítomnost/nepřítomnost kyslíku.

Fyzikální a chemický stav potravin rovněž ovlivňuje odezvu mikrobu na záření. Jako příklad lze uvést vliv teploty u mletého krůtího masa, kdy se při snížení teploty ze 30 °C na -30 °C, hodnota  $D_{10}$  se zvyšuje z 0,16 kGy na 0,29 kGy. Hodnoty  $D_{10}$  se mění, jak se voda ve výrobku vymrazuje. Snižuje se rychlost migrace ionizačních produktů, např. volných radikálů a vyžaduje se větší dodávka energie, aby došlo ke kolizím nezbytným ke zničení mikrobů.<sup>50</sup>

### **3.5.1.3 Výhody ozařování**

Kromě zřetelného zvýšení bezpečnosti potravin v důsledku destrukce patogenů, poskytuje ozařování další prospěch, např. prodloužení údržnosti masa, ovoce a zeleniny. Zlepšení kvality ovoce a zeleniny je alternativou používání chemických prostředků zvláště pro dekontaminaci ovoce a zeleniny. Přináší rovněž ekonomické úspory v důsledku snížení případů onemocnění z potravin. I přes tyto výhody se uvedená technologie v potravinářském průmyslu využívá jen velmi omezeně.<sup>51</sup>

### **3.5.1.4 Problémy, které brání širokému využití ozařování v praxi**

Na základě četných rozsáhlých prověřování toxikologických a jiných údajů regulačních a zdravotních orgánů různých zemí, např. Health Canada (2003), US FDA (1986), Codex Alimentarius Commission (CAC, 1983), SCF Evropské komise (2003) bylo konstatováno, že ozařování potravin dávkou do 10 kGy je bezpečné. CAC v roce 2003 revidovala svůj „Všeobecný standard pro ozářené potraviny“ tak, že maximální absorbovaná dávka dodaná potravině by neměla překročit 10 kGy kromě situace, kdy je nezbytné dosáhnout legitimního technologického záměru.

V roce 1999 společná studijní skupina FAO (Food and Agricultural Organization), IAEA (International Atomic Energy Agency) a WHO (World Health Organization) došla k závěru, že potravina ozářená jakoukoliv dávkou vhodnou k dosažení zamýšleného technologického cíle je pro spotřebitele bezpečná i nutričně adekvátní. Tato skupina dospěla také k názoru, že není nezbytný horní limit absorbované dávky. Použití záření je totiž omezeno na takové dávky, které neovlivňují nežádoucím způsobem sensorické vlastnosti, čímž se vytváří prakticky limit asi 50–75 kGy.<sup>52</sup> Zpráva skupiny zahrnovala všechny relevantní studie na zvířatech (celkem 82), studie mutagenity (47 in vitro), různé typy potravin a druhy pokusných zvířat. Ačkoliv se u 14 studií projevil určitý vliv, příčina nebyla přisouzena ozařování, nýbrž deficitu ve výživě. Je třeba zmínit, že tyto pokusy zahrnovaly konzumaci stravy obsahující značné množství potravinových položek (průměrně 35–100 %) ozářených velmi vysokými dávkami, často až 59 kGy. Ve studiích mutagenity bylo pozorováno osm možných účinků vysokých dávek záření. Dvě studie zahrnovaly konzumaci ozářených olejů, ve kterých ozáření způsobilo značnou oxidaci a ztrátu karotenoidů. V ostatních šesti studiích byly použity ozářené roztoky jednoduchých cukrů (např. sacharózy, fruktózy, glukózy), o nichž je v současné době známo, že v nich dochází k tvorbě mutagenů chemickými mechanismy indukovanými ozářením.<sup>53</sup>

V roce 1976 provedl Raltech Scientific Services na žádost americké vlády rozsáhlé nutriční, genetické a toxikologické studie ozářených potravin. Myši, křečci, krysy a králíci dostávali kuřecí maso (tvořilo 35–70 % jejich stravy), které bylo ozářeno – minimální absorbovaná dávka činila 46 kGy. Prováděly se i studie mutagenity. Nebyly zjištěny žádné důkazy o genetické toxicitě neboli teratogenních účincích u těchto zvířat a nedošlo k žádným abnormalitám ani v multigeneračních studiích.<sup>54</sup>

Ačkoliv je metoda ozařování potravin známa již velmi dlouho, dosud se její uplatnění v praxi příliš nerozšířilo. V USA je povolen ošetřovat ionizujícím zářením širší sortiment potravin než v EU. V EU je všeobecně schváleno ozařování pouze jedné kategorie potravin: sušené byliny, koření a kořeníčích přípravky. Na základě národních legislativ povolují některé státy EU (Francie, Belgie, Nizozemí, Itálie, Velká Británie) ozařování podstatně širšího sortimentu výrobků. V ČR došlo po schválení nové vyhlášky č. 133/2004 Sb. z 12. března 2004 také k rozšíření sortimentu potravin, které lze ozařovat.

Naprostá většina důkazů získaných za posledních 50 let ukazuje na to, že ozařování potravin nepředstavuje zdravotní riziko pro spotřebitele a jeho použití vede ke zvýšení mikrobiální bezpečnosti dodávek potravin. Technologie ozařování byla shledána jako prospěšná pro regulaci patogenů, ale také pro zvyšování údržnosti potravin a zajišťování kvality potravin.

### 3.5.2 Ozáření rybího masa

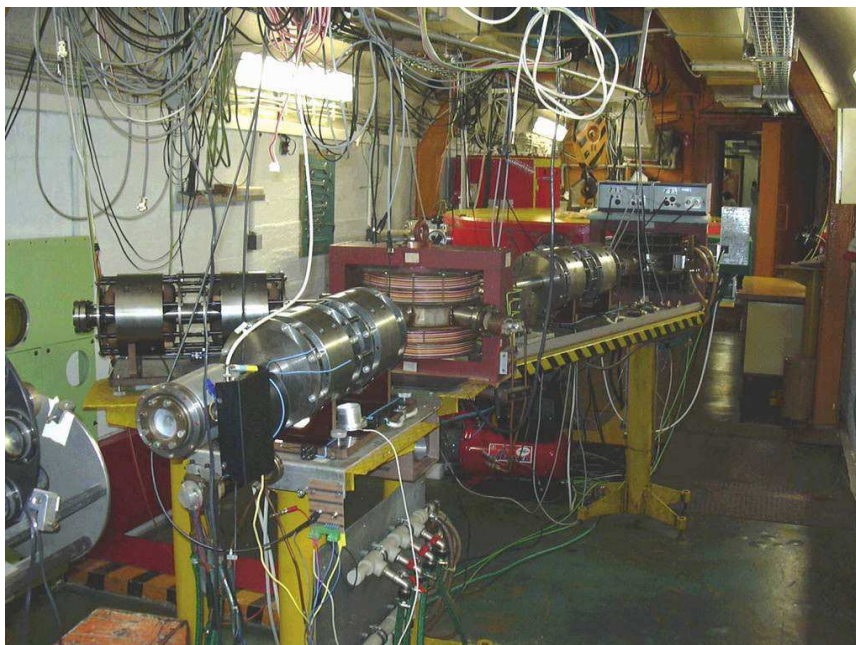
Vzrůstající požadované nároky na kvalitu potravin a potřeba delší doby trvanlivosti vedou k zavedení nových konzervačních technologií. Jednou z těchto nových technologií je již zmíněné ozařování potravin. Ozařování se zdá být efektivní pro kontrolu obsahu biogenních aminů u různých druhů potravin. Gamma záření, rentgenové záření a zrychlený proud (svazek) elektronů se používají jako zdroje ionizačního záření pro ochranu potravin. Běžně se aplikují dávky mezi 0,5 a 6 kGy. Použití určité dávky z tohoto rozmezí závisí na zpracovávaném materiálu. Dávky 4 a 6 kGy byly vyhodnoceny jako nejvíce efektivní pro sýr s modrou plísní<sup>55</sup> a zrající klobásy.<sup>56</sup> Fermentovaná sojová pasta byla ošetřena dávkami záření 5, 10 a 15 kGy. Bylo zjištěno, že není třeba používat dávky přesahující 5 kGy.<sup>57</sup>

Nízké dávky záření v kombinaci se zmrazením prodlužují trvanlivost a udržují kvalitu ryb.<sup>58</sup> Aplikace vakuového balení s následným ozářením španělské makrely (*Scomber japonicus*) potlačila tvorbu biogenních aminů na pětinu během 14 dnů uložení při 1 °C

v lednici. Test ukazuje, že ozáření optimalizuje senzorycké vlastnosti a prodlužuje trvanlivost o 7 dnů.<sup>59</sup> Nejvýznamnějším výsledkem bylo snížení obsahu HIM při vybrané dávce záření (1,5 kGy). Bylo uvedeno, že vzorky ošetřené nízkou dávkou záření zachovaly původní podíl jejich nenasycených mastných kyselin (poly-unsaturated fatty acids PUFA). Vyšší dávky (okolo 7 kGy) snížily podíl PUFA o 21 %. V dalším pokusu s pelamidou obecnou (*Sarda sarda*) při ozáření dávkou vyšší než 7,5 kGy, pokles HIM silně koreluje s použitou dávkou záření.<sup>60</sup> HIM díky své hygienické důležitosti je nejvíce sledovaný biogenní amin ve spojení s ozářením rybího masa. Nízká dávka záření 1 kGy byla dostatečná pro významný pokles BA v podrobné studii ozařování karase obecného (*Trachurus trachurus*).<sup>61</sup> Obecně je prodloužení trvanlivosti ovlivněno dávkou záření, metodou balení, teplotou skladování a druhem ryby společně s jejím vodním původem. Několika rozsáhlými toxikologickými recenzemi a dalšími dokumenty regulačních a zdravotních organizací bylo nařizeno, že potraviny ozařované dávkami pod 10 kGy jsou bezpečné.<sup>62</sup> V České Republice horní hranice pro ozařování ryb byla určena na 3 kGy.<sup>63</sup> Běžné experimentální dávky záření aplikované na rybí maso byly v rozsahu mezi 0,5 a 5 kGy.<sup>58</sup>

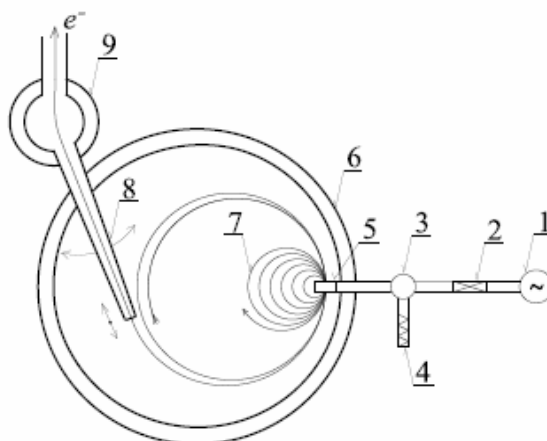
### 3.5.2.1 Zařízení pro ozáření rybího masa

V České Republice je sestaveno zařízení pro ozařování potravin proudem urychlených elektronů ( $\beta$ -záření). Toto zařízení se nazývá MT 25 mikrotron a patří Institutu jaderné fyziky v Praze, který spadá pod Akademii věd České Republiky.



**Obr. 5** Pohled na zařízení MT 25 Mikrotron.

MT 25 mikrotron je cyklický elektronový urychlovač s rezonátorem Kapitza. Částice jsou urychlovány vysokofrekvenčním elektrickým polem s konstantní frekvencí v konstantním homogenním poli. Elektrony se pohybují po kruhových drahách ve vakuové komoře a mají společný tečný bod. Schématické uspořádání je znázorněno na Obr. 6. Energie urychlených elektronů je proměnná v závislosti na počtu elektronových kol v komoře vakuového mikrotronu stejně jako na velikosti magnetické pole.<sup>64</sup>



**Obr. 6** Schématický plán Mikrotonu MT 25. 1 – magnetron, 2 – fázový posun, 3 cirkulátor, 4 – zatížení vodou, 5 – urychlovací dutina, 6 – vakuová komora, 7 – oběžné dráhy elektronů, 8 – nastavitelný proud paprsků, 9 – deflektor paprsků<sup>64</sup>

### 3.6 Ošetření rybího masa vysokým tlakem

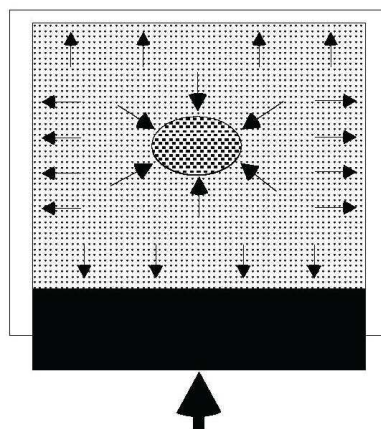
#### 3.6.1 Aplikace vysokého tlaku v potravinářství

Jedním z vhodných způsobů pro konzervaci rybího masa může být i vliv vysokého tlaku. Aplikace vysokého izostatického tlaku je známá jako potenciální konzervační koncovka pro potraviny a složky potravin. Vědecký základ pro úspěch tohoto procesu zahrnuje mnoho disciplín včetně chemie a mikrobiologie. Pro jeho komerční úspěch, podobně jako i u dalších potravinářských aplikací, je však třeba efektivní integrace s inženýrskými disciplínami zahrnujícími návrh a výrobu zařízení a výrobní schopnosti účinně a spolehlivě aplikovat vysoký tlak na pevné i kapalné potraviny.<sup>65</sup>

První vědecké práce zabývající se vysokým tlakem jsou datovány do 20. let 19. století, kdy Perkins zkoumal vliv tlaku na stlačitelnost vody. Ve 2. polovině 19. století udělali významný příspěvek, zvláště ve tvaru zařízení a měření vysokého tlaku, Cailletet a Amagat.<sup>66</sup> Přelom století znamenal velký nárůst zájmu o výzkum vysokého tlaku a jeho průmyslového využití.

Jednou z nejvýznamnějších osobností tohoto období byl nositel Nobelovy ceny P. W. Bridgman, jehož vědecká práce zahrnovala zkoumání vlastností materiálů pod vysokým tlakem, návrhy tvaru zařízení schopné pracovat s tlakem do 3 000 MPa, v některých případech i 10 000 MPa. Po 2. světové válce nastal velký nárůst v komerčním využití vysokotlakých procesů, jako např. výroba rozvětveného polyethylenu, izostatické lisování, izostatické stlačování za horka nebo vysokorychlostní proudové řezání.<sup>65</sup>

Praktické použití vysokých tlaků pro potraviny a další biotechnologické materiály vychází ze dvou základních principů. Je to jednak Le Chatelierův princip, který říká, že všechny jevy (fázové změny, chemické reakce, změny konformace molekul atd.) doprovázené zmenšením objemu jsou vysokým tlakem urychlovány a naopak. Druhým je zákon o šíření tlaku v kapalinách, podle kterého se tlak šíří konstantně všemi směry v celém objemu stlačeného vzorku.<sup>66, 67</sup>

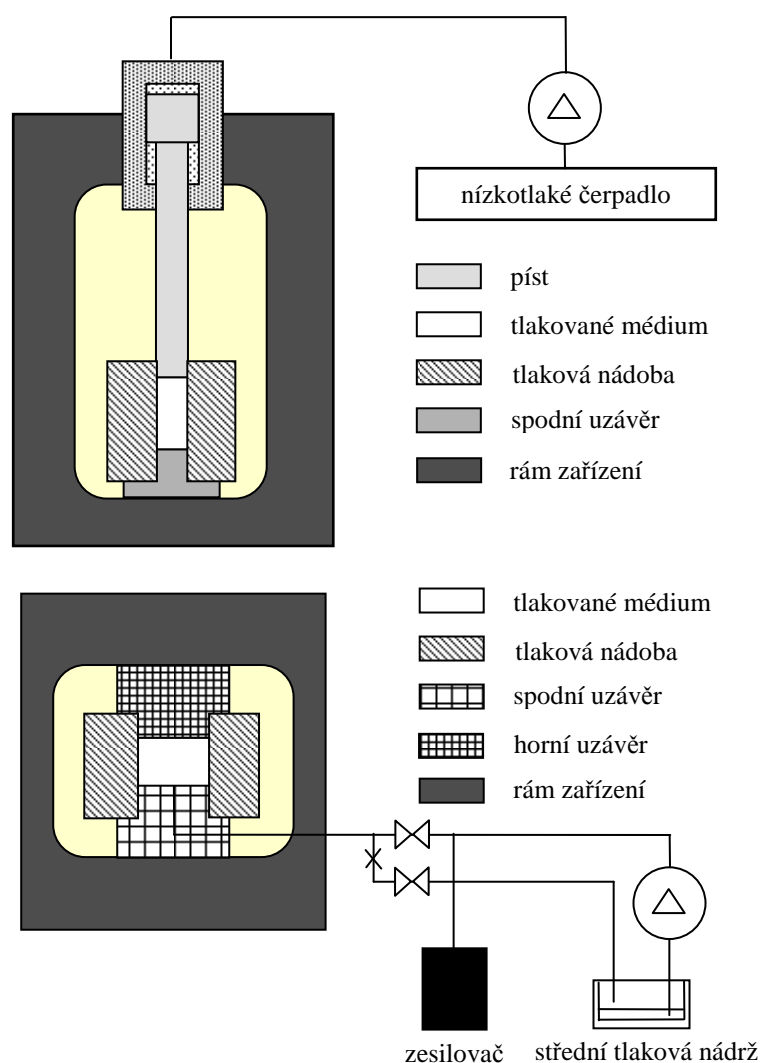


**Obr. 7** Princip ošetření izostatickým tlakem: potraviny jsou komprimovány stejným tlakem ze všech stran.<sup>68</sup>

Zpracovávaná potravina může být buď v přímém kontaktu s tlakovým médiem nebo hermeticky uzavřená ve flexibilním obalu, který přenáší tlak. Použití tlaku nezávisí na objemu zpracovávaných vzorků. Obvykle jsou používány hydrostatické generátory tlaku, kdy je tlak přenášen nízko-stlačitelnými kapalinami jako je voda nebo olej.

Hlavním cílem ošetřování potravin vysokým tlakem je jejich zpracování bez vystavení účinkům vyšších teplot a tím udržení sensorických a nutričních vlastností prakticky beze změn oproti výchozí surovině. Ošetření potravin vysokým tlakem je šetrnější než tradiční způsoby konzervace. Potravina si uchová svou nutriční hodnotu a nedochází u ní k poškození teplem nebo mrazem. Účinek vysokého tlaku na mikroorganismy závisí především na velikosti a době expozice, druhu mikroorganismu, teplotě procesu a prostředí, v němž

se daný mikroorganismus vyskytuje. Tyto faktory se musí uvážit předem, aby celý proces mohl být optimalizován a výsledkem byly kvalitní, zdravotně nezávadné potraviny.<sup>65</sup>



**Obr. 8** *Produkce vysokého tlaku prostřednictvím přímé (nahore) a nepřímé (dole) komprese.*<sup>68</sup>

### 3.6.1.1 Potenciální potravinářské aplikace vysokých tlaků

V současnosti se jako nadějně postupy zavádění vysokotlakých technologií v potravinářství jeví např. konzervace koření, kdy nedochází vlivem zvýšené teploty k zahájení oxidačních změn. Tlak do 400 MPa je účinný při sterilaci černého pepře (*Piper nigrum L.*), kdy přítomné mikroorganismy jsou významně redukovány, ale sensorické vlastnosti pepře zůstávají zachovány.<sup>69</sup> Byl také popsán případ tlakového ošetření cibule, kdy režim 300 MPa při 40 °C po dobu 30 minut redukoval mikrobiální počty o více než čtyři řády.<sup>70</sup>



Velmi významnou oblastí pro aplikaci vysokých tlaků se jeví též zpracování masa. Např. v Japonsku se stlačení běžně používá pro cílenou úpravu konzistence masa (především rybího) a potlačení aktivity zde přítomných enzymů.<sup>71,72</sup> Tlak 300 až 400 MPa při ošetření rybí pasty surimi způsobil usmrcení většiny přítomných mikroorganismů.<sup>73</sup> Popsány jsou též fyzikálně chemické vlastnosti tlakem ošetřeného kapřího masa.<sup>74</sup> Řada prací se věnuje vlivu vysokého tlaku na hovězí svalovinu.<sup>75</sup> Nevýhodou použití tlaků nad 300–350 MPa při zpracování masa je denaturace myoglobinu, což vede ke změně barvy z červené až růžové na šedo-hnědou.<sup>76</sup>

Neméně perspektivní se jeví použití vysokých tlaků při zpracování ovoce a zeleniny. Je popsána řada prací (opět především z Japonska) týkající se vysokotlaké pasterace ovocných šťáv, kdy tlak 300–900 MPa inaktivuje enzymy a mikroorganismy, ale zachová aroma a nutriční obsah. Zimmerman a Bergman uvádí, že takto ošetřená citrusová šťáva si nejen zachovala původní aroma, ale během následujících sedmnácti měsíců skladování nebyly zaznamenány žádné ztráty vitamínu C.<sup>77</sup> Kriterium účinnosti při vysokotlaké pasteraci těchto materiálů je inaktivace pektinestery, která v ovocných šťávách způsobuje tvorbu zákalů.

Popsány jsou případy vysokotlaké pasterace nejen tekutých, ale i kusovitých potravinářských materiálů. Např. Aleman et al. popisují vysokotlakou pasteraci čerstvě krájeného ananasu, kdy použitím různých tlakových (200 MPa, 270 MPa a 340 MPa), teplotních (4 °C, 21 °C a 38 °C) a časových režimů (5 min., 15 min. a 60 min.) byly zjištěny různé hodnoty decimální redukční doby pro přítomné mikroorganismy.<sup>78</sup>

Pro aplikaci vysokého tlaku při zpracování zeleniny byla publikována též řada prací, např. v oblasti vlivu předzpracování vysokým tlakem na sušení, dehydrataci, texturu a barvu zelených fazolí, brambor a mrkve,<sup>79</sup> kdy autoři srovnávají vliv vysokotlakého a klasického tepelného blanšírování a následného mražení zmíněných druhů zeleniny na uvedené fyzikální vlastnosti. Byla též publikována práce o vysokotlakém ošetření bramborových kostiček (400 MPa, 15 min., 5–50 °C) jako alternativy k blanšírování v horké vodě. Sledována byla inaktivace mikroorganismů a polyfenoloxidas, změny v textuře, ztráty vitamínu C a draslíku.<sup>80</sup>

Přes optimistický nástup v uplatnění technologie vysokých tlaků v potravinářství nelze zřejmě očekávat hned masivní rozšíření technologie ve všech popsáných oblastech. Vzhledem k poměrně vysoké ceně zařízení, poměrně nízké životnosti (obvykle umožňující omezený počet cyklů), omezené produktivitě (vsádkový, maximálně polokontinuální systém) apod. je počet komerčně vyráběných potravin ošetřených vysokým tlakem jen velmi malý. Vývoj

vysokotlakých zařízení s vyšší kapacitou, automatickým ovládním, teplotním řízením, lepší sanitací, zvýšenou odolností a nižší cenou jsou základní požadavky na úspěšnou aplikaci do průmyslové praxe. Pro ošetřování pevných i kapalných potravin je též požadován adekvátní obalový materiál (pryžové materiály, flexibilní polymerní materiály atd.) Zdá se tedy, že zmíněná technologie se patrně uplatní zejména u výrobků vyšší ceny, pravděpodobně u farmaceutických preparátů, kdy může přinést vyšší zhodnocení produktu. Z potravinářských aplikací jsou velmi perspektivní např. různé úpravy bílkovinných potravin, např. zhodnocení masa horší kvality a také kombinace aplikací vysokého tlaku se zmrazováním. Přestože si budeme muset ještě nějakou dobu na cenově dostupný výrobek udržitelný za normální teploty a s chutí např. čerstvého ovoce ještě počkat, představuje aplikace vysokých tlaků další rozšíření možností potravinářské technologie.



**Obr. 9** Zařízení pro ošetření vysokým tlakem, které se nachází na VÚPP.

### 3.6.2 Aplikace vysokého tlaku na rybí maso

Když je vysoký hydrostatický tlak (100–1000 MPa) aplikován na zabalené potraviny ponořené v kapalině, tlak je rovnoměrně rozšířen po celé potravine, tak že všechny části potraviny podléhají stejnému ošetření.<sup>81</sup> Pro inaktivaci většiny G– bakterií je dostatečný tlak okolo 300 MPa, plísně a kvasinky potřebují tlak okolo 400 MPa, G+ bakterie jsou zničeny při tlaku okolo 500 MPa. Bakteriální spory mohou být odolné velmi vysokým tlakům, vyšším než 1000 MPa.<sup>82</sup>

Efekt destrukce mikroorganismů vysokým tlakem je založen především na inaktivaci enzymů, poškození DNA, RNA, ribosomů a na destrukci membrán a buněčných stěn.

Destrukce je způsobena rychlými změnami v buněčném objemu a denaturací proteinů v membránách a buněčných stěnách.<sup>83,81</sup>

Informace o tvorbě BA v mase nebo masných produktech, které byly ošetřeny vysokým tlakem, jsou vzácné. BA byly určeny ve vzorcích uzené tresky (*Gadus morhua*), která byla ošetřena 400, 500 a 600 MPa.<sup>84</sup> Překvapivě, pouze TRM a SPM byly detekovány, zvýšený obsah TRM byl zejména ve vzorcích ošetřených vysokým tlakem. Změny v koncentracích BA nevykazují jednoznačný trend. Rozsáhlá studie byla provedena na masných produktech, na párcích, klobásách a šunce. Proti kontrolním vzorkům párků, TYM, PUT a CAD v ošetřených vzorcích 400 MPa nevykazovaly změny v koncentracích během skladovací doby.<sup>85</sup> Podobné výsledky vykazovaly vzorky sušených „chorizo“ klobás, ale navíc byl zaznamenán nárůst obsahu SPD.<sup>86</sup> Navzdory faktu, že mikroby se nerozmnožují ve vzorcích ošetřených vysokým tlakem, BA se mohou tvořit díky pokračující aktivitě dekarboxyláz v substrátu. Ve studii, zabývající se plátky vařené šunky, které byly ošetřeny tlakem 400 MPa, bylo testováno kolísání skladovacích teplot (2–12 °C). Experimenty s rozdílnými teplotami ukázaly, že TYM může být nejlepším ukazatelem kvality těchto procesů.<sup>87</sup>

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie, přístroje a zařízení

Pro analýzu BA byly kromě běžných laboratorních pomůcek a laboratorního skla používány následující chemikálie, přístroje a zařízení. Všechny použité chemikálie byly analytické nebo vyšší úrovně.

#### Chemikálie

- 1,7-heptandiamin, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Aceton, Penta, Chrudim, ČR
- Acetonitril pro HPLC (gradient grade), Merk, Německo
- Dansylchlorid, Sigma-Aldrich, Německo
- Destilovaná voda, Premier, Phoenix, AZ, USA
- Dusík (UN 1066), Linde Technoplyn, ČR
- Fenylethylamin hydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Histamin dihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Hydrogenuhličitan sodný, Lach-Ner, Neratovice, ČR
- Kadaverin dihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Kyselina chloristá, Acros, Geel, Belgie
- n-Heptan, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Prolin, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Putrescin dihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Spermidin trihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Spermin tetrahydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Tyramin hydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Tryptamin hydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo
- Uhličitan draselný, Penta, Chrudim, ČR
- Uhličitan sodný, Penta, Chrudim, ČR

### **Přístroje a zařízení**

- Analytické váhy, B 204, Mettler Toledo, Švýcarsko
- Kapalinový chromatograf (UPLC) Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC systém, Agilent Technologies, Německo
- Kolona pro UPLC Agilent Zorbax Eclipse XDB – C18 sloupec (50 mm x 4,6 mm ID, 1,8 µm velikost částic), Agilent Technologies, Německo,
- Odstředivka Sigma 2-5, Sigma Laborzentrifungen GmbH, Osterode am Harz, Německo
- Ponorný mixer, Braun, Polsko
- Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorax RK 31, Německo
- Vakuová balička Speedy 320 Boss, Německo
- Zařízení pro destilovanou vodu Premier, Phoenix, AZ, USA

## **4.2 Izolace biogenních aminů**

Obsah BA ve vzorcích bývá obvykle velmi malý a navíc srovnatelný s koncentracemi složek chemicky podobných. Citlivé stanovení zejména polyaminů se neobejde bez selektivní separace od příbuzných látek nesoucích rovněž aminovou funkční skupinu a bez vhodně zvolené derivatizace.<sup>88</sup>

Způsob izolace BA z přírodních vzorků je zpravidla méně náročnou částí jejich analytického stanovení. Takřka výhradně se využívá bazické povahy aminů. Homogenizace vzorku probíhá v prostředí extrahující zředěné minerální kyseliny, téměř vždy kyseliny chloristé nebo trichloroctové. V kyselých výluzích jsou aminy přítomny ve formě solí a tyto roztoky lze uchovávat beze změn zmrazené po dobu několika měsíců. Nutností při skladování kyselých extraktů před analýzou je použití plastických nádobek, neboť polyaminy se silně vážou na sklo. V poslední době se též často využívá k separacím BA či jejich derivátů z přírodních vzorků metoda extrakce na tuhou fázi „solid phase extraction” (SPE).

Přímé dělení jak na normální, tak na reverzní fázi není obvyklé, Důvodem jsou jejich výrazné protolytické vlastnosti, zejména však obtížná detekovatelnost komerčními detektory. Volné polyaminy neabsorbují záření v ultrafialové ani ve viditelné oblasti spektra, na němž je založena činnost většiny HPLC detektorů. Tvorbou derivátů se jednak snižuje protolytický charakter aminů a vhodným výběrem derivatizačních činidel se připravují sloučeniny absorbující záření příslušných vlnových délek.<sup>88</sup>

Nejrozšířenějšími činidly jsou chloridy organických kyselin, tvořící s aminovou funkční skupinou *N*-substituované amidy. Aromatické jádro zaručuje vysokou absorpci UV záření. Oblíbeným derivatizačním činidlem je tzv. dansylchlorid (5-dimethylamino-1-naftalen-sulfonylchlorid). Dansylderiváty lze dělit jak na reverzní, tak na polární stacionární fázi. Vzniklé deriváty můžeme detekovat jak fotometrickým ultrafialovým, tak fluorescenčním detektorem, na němž se dosahuje oproti absorpčnímu uspořádání až o tři řády nižších mezí detekce – 1 µg aminu/kg původního vzorku. Jistou nevýhodou je citlivost dansylderivátů vůči světlu.

Před reakcí s derivatizačním činidlem na bázi chloridů organických kyselin je nezbytné kyselý extrakt vzorků zalkalizovat. Při pH = 9–12 nastane vlastní derivatizace, zbytek činidla přejde na sůl příslušné organické kyseliny. Aby reakce proběhla kvantitativně, doporučuje se provést ji v prostředí ultrazvukové lázně. Po derivatizaci následuje extrakce vzniklých amidů do organického rozpouštědla, zpravidla etheru. Výhodou extrakce, kromě zakoncentrování stanovovaných látek, je i jejich oddělení od doprovodných rušivých složek, zejména aminokyselin, jejich deriváty se vzhledem k vysokému pH vodné fáze extrahovat nemohou.<sup>88</sup>

### 4.3 Obecné stanovení biogenních aminů

Metody pro stanovení BA v potravinách jsou četné. První vyvinuté postupy byly zaměřené na nejvíce toxikologicky významné aminy – HIM a TYM. Pro stanovení aminů byly navrženy metody, mezi které patří: chromatografie na tenké vrstvě (TLC), iontově výměnná chromatografie (IEC), plynová chromatografie (GC) a zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Dobré výsledky ohledně stanovení BA jsou také dosaženy pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE).<sup>1</sup>

Aminy jsou silné organické báze. Pro jejich správné stanovení je velmi důležitý první krok, a to oddělení od matrice vzorku. Za tímto účelem se jako extrakční činidlo široce používá kyselina chloristá.<sup>89</sup> Při použití LC technik jsou aminy oddělovány jako deriváty. Nejčastějším derivatizačním činidlem pro aminy je dansyl chlorid. Metoda TLC se neustále používá pro stanovení BA kvůli rychlosti, jednoduchosti a možnosti sledování několika vzorků najednou. Z tohoto důvodu může být metoda TLC účinně použita, např. v potravinářském průmyslu.<sup>90</sup> Pro TLC separace byla navržena široká škála organických rozpouštědel. Moderní metody upřednostňují netoxická rozpouštědla.

Iontová chromatografie je vhodná metoda zejména pro komplexní matrice. Extrakty kyseliny chloristé jsou injekčně podány bez dalších úprav na sloupec katexu a poté eluovány

roztokem methansulfonové kyseliny.<sup>91</sup> Velkou výhodou IEC je možnost použití analyzátoru aminokyselin.

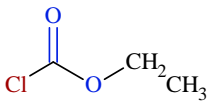
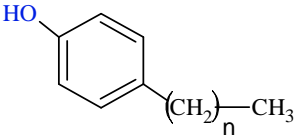
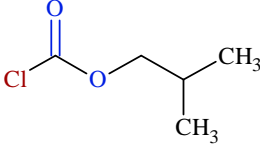
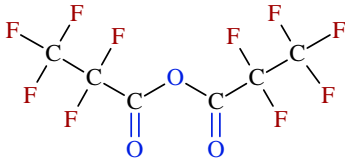
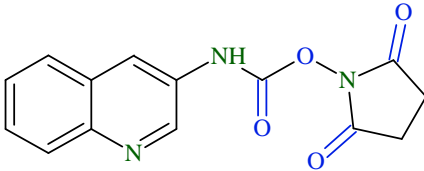
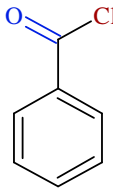
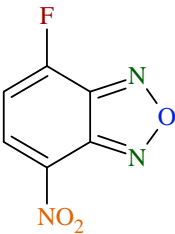
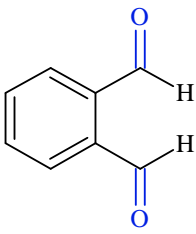
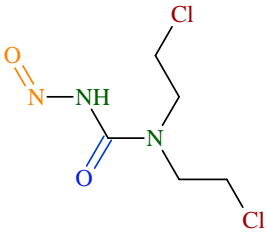
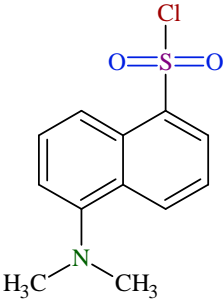
Plynová chromatografie není tak často používanou metodou pro stanovení BA. Metoda GC pro stanovení BA je spojována s řadou problémů. I zde se provádí derivatizace vzorků. V pivě a víně byla provedena dvoufázová *O*-ethoxykarbonylace s ethylchloroformiátem a alkyfenoly a následnou *N*-ethoxykarbonylací aminů.<sup>92</sup> Pro určení aminů v alkoholických nápojích byl navržen derivatizační postup s isobutylchloroformiátem.<sup>93</sup> Obě metody byly určeny pro detekci hmotnostní spektrometrie. BA ve vzorcích ryb byly derivatizovány pomocí anhydridu kyseliny pentafluoropropionové. Separace byla dosažena za použití kapilární kolony DB-1 s FID detektorem.<sup>94</sup>

Aromatické a heterocyklické BA lze snadno určit pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) bez derivatizace vzorků pomocí vlastní absorpce UV záření. Analýzy HIM jsou rychlé (doba migrace je mezi 4–9 min.), vzorky v roztoku jednoduchého pufru postupují křemičitou kapilárou. HIM v rybách byl stanoven ve fosfátovém pufru o pH = 2,5.<sup>95</sup> Vzorky rajčat nebo rajčatových protlaků byly stanoveny v citrátovém pufru o pH = 2,5.<sup>96</sup> Obecně platí, že aminy musí být derivatizovány v CZE. Pro potravinové vzorky byl navržen 6-aminochinolyn-*N*-hydroxysukcinimidyl karbamát. Sedm aminů – PUT, CAD, SPD, SPM, HIM, TYM a TRM, které se běžně vyskytují v potravinách, se podařilo stanovit během 25 minut.<sup>97</sup> Stejná skupina aminů byla stanovena v rámci 15 až 35 minut po derivatizaci pomocí benzoylchloridu.<sup>98</sup> Derivatizace pomocí 4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazolu s následnou fluorescenční detekcí umožňuje velmi citlivé stanovení aminů v rostlinných tkáních.<sup>99</sup>

HPLC zahrnuje před- nebo post-kolonovou derivatizaci. BA mohou být odděleny jako iontové páry na reverzní fázi HPLC. Octosulfonát sodný se často používá jako iontově párové činidlo a aminy jsou derivatizovány v post-kolonovém módu *o*-ftalaldehydem.<sup>4</sup> Pro derivatizaci BA před jejich dělením pomocí HPLC bylo navrženo mnoho činidel, např. 2-chlorethyl nitrosourea<sup>100</sup>, ale nejčastěji byl používán dansyl chlorid.<sup>5</sup>

Od roku 2004 je používána nová generace stacionární fáze u kapalinové chromatografie. Nové stacionární fáze odolávají velmi vysokým tlakům (až 1000 bar) a byly uvedeny na trh s LC systémem pod názvem Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC).<sup>101</sup> UPLC obsahuje velmi malé částice (< 2µm) umístěné v krátkých kolonách (5 cm), čímž výrazně snižuje dobu potřebnou pro analýzu bez ztráty účinnosti metody. V porovnání s konvenční

HPLC metodou, UPLC ukázala řadu výhod včetně snížení doby analýzy, menší spotřebu rozpouštědla a zvýšení maximální kapacity.<sup>102</sup>

 <p>ethylchloroformiát</p>	 <p>alkylfenol</p>	 <p>isobutylchloroformiát</p>
 <p>anhydrid kyseliny pentafluorpropionové</p>		 <p>6-aminochinolyn-<i>N</i>-hydroxysukcinimidyl karbamát</p>
 <p>benzoylchlorid</p>	 <p>4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol</p>	 <p><i>o</i>-ftalaldehyd</p>
 <p>2-chlorethyl nitrosourea</p>		 <p>dansyl chlorid</p>

**Obr. 10** Přehled výše popsaných derivatizačních činidel.

#### 4.4 Rybí maso jako pokusný materiál

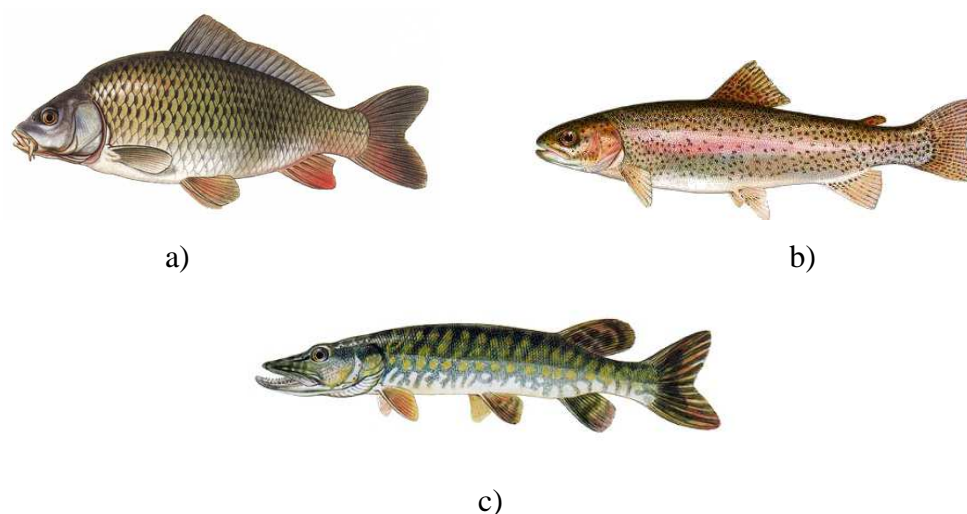
Ryby jsou bohatým zdrojem vysoce kvalitních bílkovin, základních vitamínů a zdraví prospěšných poly-nenasycených mastných kyselin. Vysoký obsah proteinů představuje nebezpečí při rozkladných procesech. Jejich rozkladem vznikají peptidy a aminokyseliny,



kteřé jsou náchylné k dalšímu rozkladu. Výsledkem těchto procesů jsou BA, které se mohou objevovat především v potravinách bílkovinné podstaty.

Pro stanovení biogenních aminů v rybím mase byly do této studie vybrány druhy sladkovodních ryb, které jsou běžně dostupné na trhu a oblíbené u spotřebitelů v České Republice. Mezi vybrané druhy patří:

- kapr obecný (*Cyprinus carpio*, 36 měsíců, tržní kapr, sádky Třeboň, Česká Republika)
- pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*, 16 měsíců, sádky Kaplice, Česká Republika)
- štika obecná (*Esox lucius*, 45 měsíců, sádky Třeboň, Česká Republika).



**Obr. 11** Analyzované druhy sladkovodních ryb: a) kapr obecný (*Cyprinus carpio*), b) pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), c) štika obecná (*Esox lucius*).

#### 4.5 Odběr vzorků

Pro stanovení BA v čerstvém rybím mase byly analyzované vzorky porcovány, baleny a ošetřeny vybranou konzervační technikou v jeden den. Celá série vzorků pro jeden experiment podstoupila stejné prvotní podmínky před uložením těchto vzorků do termostatu ke skladování.

Při zakládání experimentu byly ráno vyzvednuty ryby na sádkách. Živé ryby byly přepraveny do areálu Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, kde byly zabity a vykuchány. Dále následovalo porcování vykostěných filetů masa, vakuové balení a podrobné označení veškerých vzorků. Vzorky masa byly uloženy do přepravní lednice a dopraveny do Prahy, kde byly ošetřeny odlišnými konzervačními technikami, zářením a vysokým tlakem. Konzervace zářením byla prováděna ve spolupráci s Ústavem jaderné fyziky AV ČR a konzervace vysokým tlakem byla prováděna ve spolupráci s Výzkumným ústavem potravinářským Praha (VÚPP).

Po ošetření vzorků konzervační technikou byly vzorky téhož dne dopraveny zpět do areálu Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Zde byly uloženy do termostatu s předem nastavenou teplotu. V termostatu byly vzorky uskladněny po několik dnů až týdnů. Postupně se vzorky odebíraly k analýzám pro stanovení obsahu BA.

Pro danou dávku ozáření i vysokého tlaku byly připraveny tři paralelní vzorky, aby se jejich výsledky mohly správně statisticky zpracovat. Při zakládání pokusů byly vždy připraveny kontrolní vzorky, jak čerstvého masa, tak masa neošetřeného konzervační technikou.

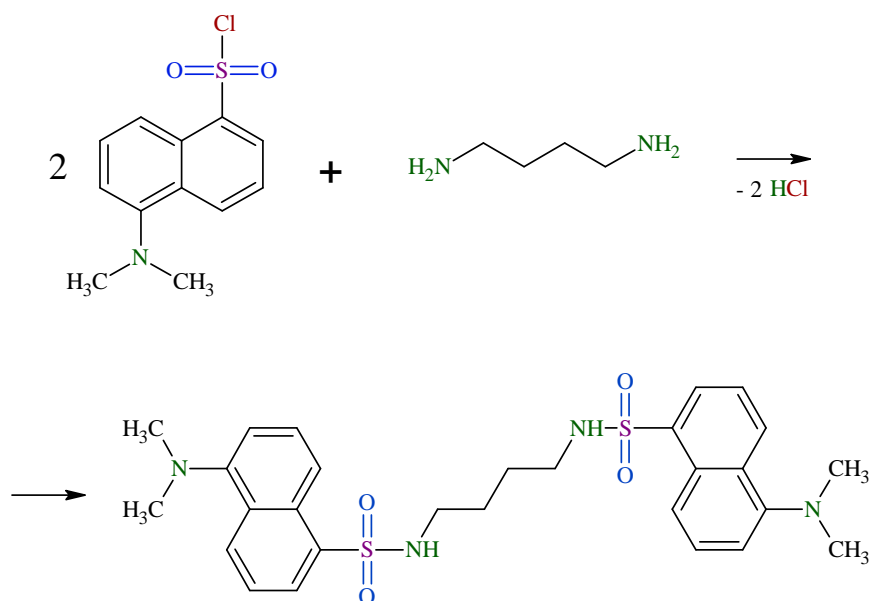
## **4.6 Příprava vzorků k měření**

Vzorky rybího masa byly homogenizovány ručním mixérem v plastové nádobě s kyselinou chloristou (0,6 M) po dobu tří minut. 40 g masa bylo mixováno ve 100 ml HClO<sub>4</sub> a 20 g masa v 50 ml HClO<sub>4</sub>. Vzniklý homogenát byl centrifugován po dobu 10 minut při 1800 g (3500 ot./min.) v centrifuze Sigma 2-5. Supernatant byl přefiltrován přes složený filtrační papír do odměrného válce. Objem každého filtrátu byl zaznamenán. Takto byly připraveny kyselé extrakty každého vzorku.

### **4.6.1 Derivatizace**

Do plastové kyvety byl odpipetován 1 ml kyselého extraktu, bylo přidáno 100 µl roztoku vnitřního standardu (IS), 1,5 ml uhličitanového pufru o pH = 11 (kapitola 4.6.1.1) a 2 ml roztoku dansylchloridu (Dns-Cl v acetonu 5 mg/ml). Vnitřní standard BA byl připraven o koncentraci 400 mg/l 1,7-heptandiaminu v 0,6M HClO<sub>4</sub>.

Uzavřená plastová kyveta byla umístěna do třepačky, kde byla třepána 20 hodin při pokojové teplotě a ve tmě. Poté bylo do kyvety přidáno 200 µl roztoku prolinu (100 mg/ml) a vzorek byl třepán další hodinu. Po dokončení třepání následovala extrakce 3 ml *n*-heptanu. Do skleněné kyvety byl odpipetován 1 ml supernatantu, který byl vysušen při 60 °C pod proudem dusíku. Vysušený zbytek byl rozpuštěn v 1,5 ml acetonitrilu. Nakonec byl roztok vzorku filtrován přes skleněný membránový filtr (1,7 µm) do uzavíratelných skleněných vialek. Tímto postupem byly připraveny všechny vzorky k měření na UPLC.



**Obr. 12** *Reakce putrescinu s dansylchloridem*

#### 4.6.1.1 Příprava uhličitanového pufru

Nejprve bylo smícháno 5 ml roztoku A (0,5 M NaHCO<sub>3</sub>) s 12 ml roztoku B (0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Hodnota pH vzniklého roztoku se nastavila na 9,2 pomocí přidavku malého objemu (cca 0,5 ml) roztoku B. Takto připravený pufr je stabilní po několik měsíců, při uskladnění v chladu. Vlastní tlumivý roztok pro derivatizaci je namíchán z připravené směsi roztoků A a B s roztokem K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Příprava je uvedena viz. Tabulka 1. Výsledný tlumivý roztok musí být vždy čerstvě připraven.

**Tabulka 1** Příprava čerstvého uhličitanového pufru smícháním K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> s roztokem A, B podle příslušného počtu vzorků.

Počet vzorků	1	2	4	5	6	8	10
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (g)	0,666	1,332	1,998	2,664	3,330	4,664	5,328
AB (ml)	2	4	6	8	10	14	16

#### 4.7 Analytická koncovka

Jako analytická koncovka byla použita ultra účinná kapalinová chromatografie UPLC (ultra performance liquid chromatography).

#### 4.7.1 Podmínky separace na UPLC

UPLC separace byla uskutečněna na kapalinovém chromatografu Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC systém s kolonou Agilent Zorbax Eclipse XDB – C<sub>18</sub> sloupec (50 mm x 4,6 mm ID, 1,8 µm velikost částic), která je vybavena RRLC vnitřním filtrem, 0,2 µm. Chromatografická separace byla uskutečněna v režimu gradientové eluce pomocí roztoku (A) acetonitril (100%) a roztoku (B) acetonitril (50%) následovně: 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%.

Vždy byla zachována lineární změna koncentrace. Průtoková rychlost kolonou byla 1 ml.min<sup>-1</sup>, teplota kolony 25 °C, nástřik 5 µl a detekce v UV oblasti při vlnové délce 225 nm.

**Tabulka 2** Profil gradientové eluce při UPLC-analýze dansylovaných derivátů aminů při průtoku mobilní fáze 1 ml.min<sup>-1</sup>.

čas [min]	A [%]	B [%]
0–2	40	60
2–3	40–80	60–20
3–4	80–90	20–10
4–6	90–95	10–5
6–7	95–40	5–60
7–12	40	60

#### 4.8 Stanovení a statistické vyhodnocení biogenních aminů

Pro stanovení obsahu BA v rybím mase byl použit program Agilent Chemstation pro LC a LC/MS systémy a program Chemexport. Pomocí těchto programů byly získány obsahy jednotlivých BA aminů v mg.kg<sup>-1</sup> ve vzorcích rybího masa.

Detekční limity obsahů jednotlivých BA pro metodu UPLC jsou 2,9 mg.kg<sup>-1</sup> pro TRM, 2,5 mg.kg<sup>-1</sup> pro PEA, 2,1 mg.kg<sup>-1</sup> pro PUT, 1,9 mg.kg<sup>-1</sup> pro CAD, 1,9 mg.kg<sup>-1</sup> pro HIM, 3,3 mg.kg<sup>-1</sup> pro TYM, 1,2 mg.kg<sup>-1</sup> pro SPD, 3,7 mg.kg<sup>-1</sup> pro SPM. Tyto hodnoty byly stanoveny jako dvojnásobek šumu základní linie.

Pro statistické vyhodnocení výsledků analýz byl použit program Microsoft Excel. Obsah BA v rybím mase byl charakterizován aritmetickým průměrem a směrodatnou odchylkou. Vždy byly připraveny tři paralelní vzorky pro statistické zpracování.

## 4.9 Konzervace rybího masa zářením

Při konzervaci rybího masa zářením bylo potřeba nejprve vytvořit zkušební série vzorků pro zjištění vhodné dávky záření, vhodné teploty a doby skladování. Pro tento typ konzervační techniky byly vybrány dva druhy sladkovodních ryb. Prvním druhem byl kapr obecný (*Cyprinus carpio*) a druhým druhem byl pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*).

### 4.9.1 Vzorky pro ověření vhodné dávky záření a skladovatelnosti vzorků

Pro zkušební sérii vzorků byl vhodnou sladkovodní rybou kapr obecný. Kapr obecný patří mezi široce rozšířenou sladkovodní rybu a z hlediska jeho proporcí patří mezi střední až velké ryby.

Kapří maso bylo rozporcováno. Z masa kapra byly připraveny vzorky o hmotnosti okolo 40 g (cca 7 x 6 x 2 cm). Všechny vzorky byly zabaleny pomocí vakuové baličky Speedy do vakuových sáčků (PA/PE, tloušťka 80  $\mu\text{m}$ ) a ozářeny  $\beta$ -zářením v cylindrické ionizační komoře (zařízení Mikrotron MT 25). Vzorky byly ozařovány ve spolupráci s Ústavem jaderné fyziky AV ČR v Praze. Kapří maso bylo prvním experimentálním materiálem, tudíž se u těchto vzorků vyzkoušela nejvyšší možná dávka záření 3 kGy, která je pro rybí maso přípustná podle vyhlášky č. 133/2004 sb., O podmínkách ozařování potravin a surovin, o nejvyšší dávce přípustné záření a o způsobu označení ozářených na obalu.

Po ozáření byly vzorky skladovány v termostatu po několik týdnů. Experiment se vzorky kapřího masa byl především zkušební, aby byla zjištěna vhodnost dávky záření, teploty skladování a časový rozsah skladovatelnosti. Vzorky kapra byly skladovány při 3,5 °C, což byla dostačující teplota pro uchování vzorků a zároveň vhodná teplota pro přiblížení se k teplotám chladících boxů v prodejních řetězcích či v domácnosti.

Vzorky byly odebírány k analýze po 5, 8, 14, 21, 28, 35 a 49 dnech skladování. Podle dosažených výsledků z tohoto prvotního experimentu, byly naplánované další experimenty s různými dávkami záření, s upravenými dobami skladování a s různými druhy sladkovodních ryb.

### 4.9.2 Vzorky pro sledování obsahu biogenních aminů v mase pstruha duhového

Z masa pstruha byly připraveny vzorky o hmotnosti okolo 20 g (cca 7 x 3 x 1 cm). Při srovnání hmotností zkušebních vzorků masa kapra a vzorků masa pstruha, mají vzorky pstruha poloviční hmotnost, z důvodu menší velikosti ryby. Při hmotnosti 40 g vzorků masa by u pstruha, docházelo k proporční nesrovnalosti s kaprem.

Hmotnost vzorků 20 g se jevila dostačující pro stanovení BA v rybím mase, tudíž se s touto hmotností pokračovalo ve všech ostatních experimentech a nedocházelo tak k nadbytečné spotřebě materiálu.

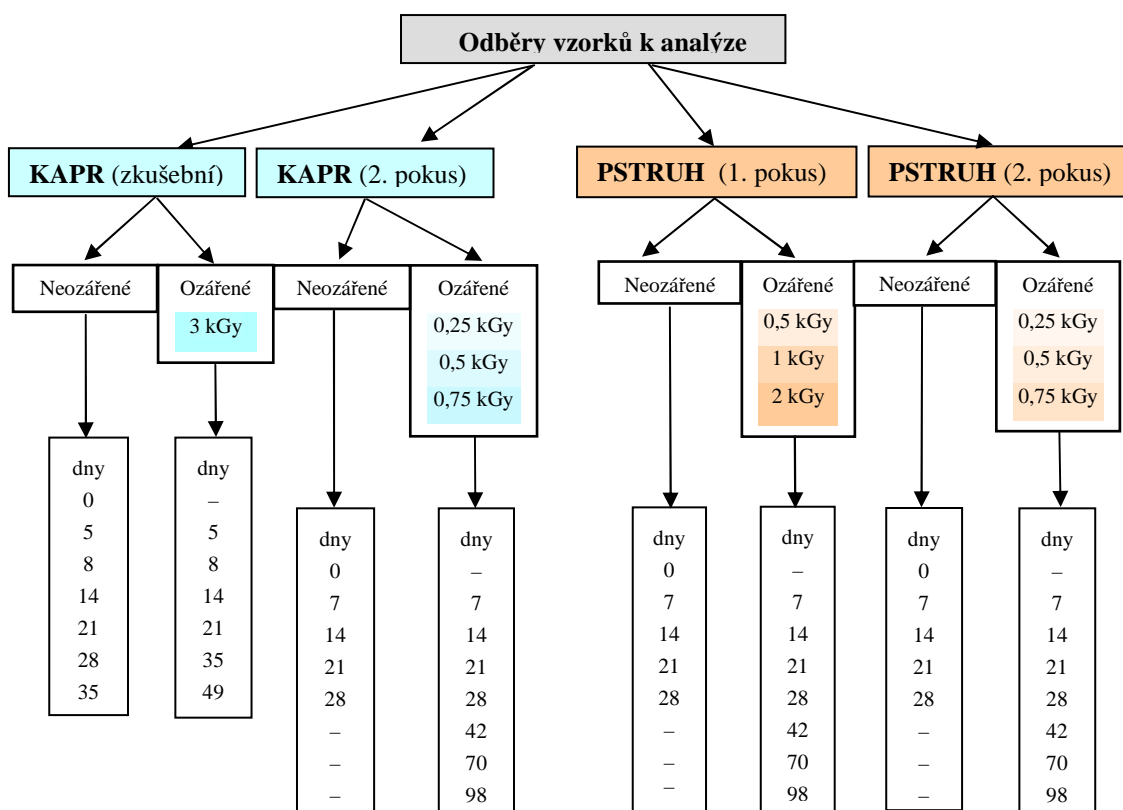
U masa pstruha byly provedeny dvě série experimentů. V první sérii byly vzorky ozářeny dávkami 0,5; 1 a 2 kGy a ve druhé sérii dávkami 0,25; 0,5 a 0,75 kGy. Dávky ozáření u pstruha jsou nižší, z toho důvodu, že ozáření 3 kGy u kapra se po prvních experimentech jevílo jako zcela dostačující pro konzervaci rybího masa.

Po ozáření byly vzorky skladovány v termostatu po několik týdnů při 3,5 °C. Ošetřené i neošetřené vzorky zářením byly odebírány k analýze po 7, 14, 21 a 28 dnech. Po 42, 70 a 98 dnech skladování byly odebírány k analýze pouze vzorky ošetřené zářením.

#### **4.9.3 Vzorky pro sledování obsahu biogenních aminů v mase kapra obecného**

Z masa kapra byly připraveny vzorky o hmotnosti okolo 20 g (cca 7 x 3 x 1 cm). U kapřího masa byla provedena pouze jedna série experimentů. V této době bylo zřejmé z předešlých experimentů kapra a pstruha, že dávky záření 3, 2 a 1 kGy jsou příliš vysoké pro konzervaci rybího masa. U těchto dávek záření nedocházelo k degradaci rybího masa i po dlouhodobém uskladnění. Z těchto důvodů byla zvolena pouze jedna série experimentů pro následující experiment s kapřím masem. U této série vzorků byly, jako vhodné dávky záření, vybrány hodnoty 0,25; 0,5 a 0,75 kGy.

Po ozáření byly vzorky opět skladovány v termostatu po několik týdnů při 3,5 °C. Ošetřené i neošetřené vzorky zářením byly odebírány k analýze po stejných časových intervalech, jako tomu bylo v předešlých experimentech se pstruhem duhovým (viz. Obr. 13).



**Obr. 13** Časový harmonogram odběrů vzorků rybího masa k analýze BA po konzervaci zářením. Vzorky byly skladovány při 3,5 °C.

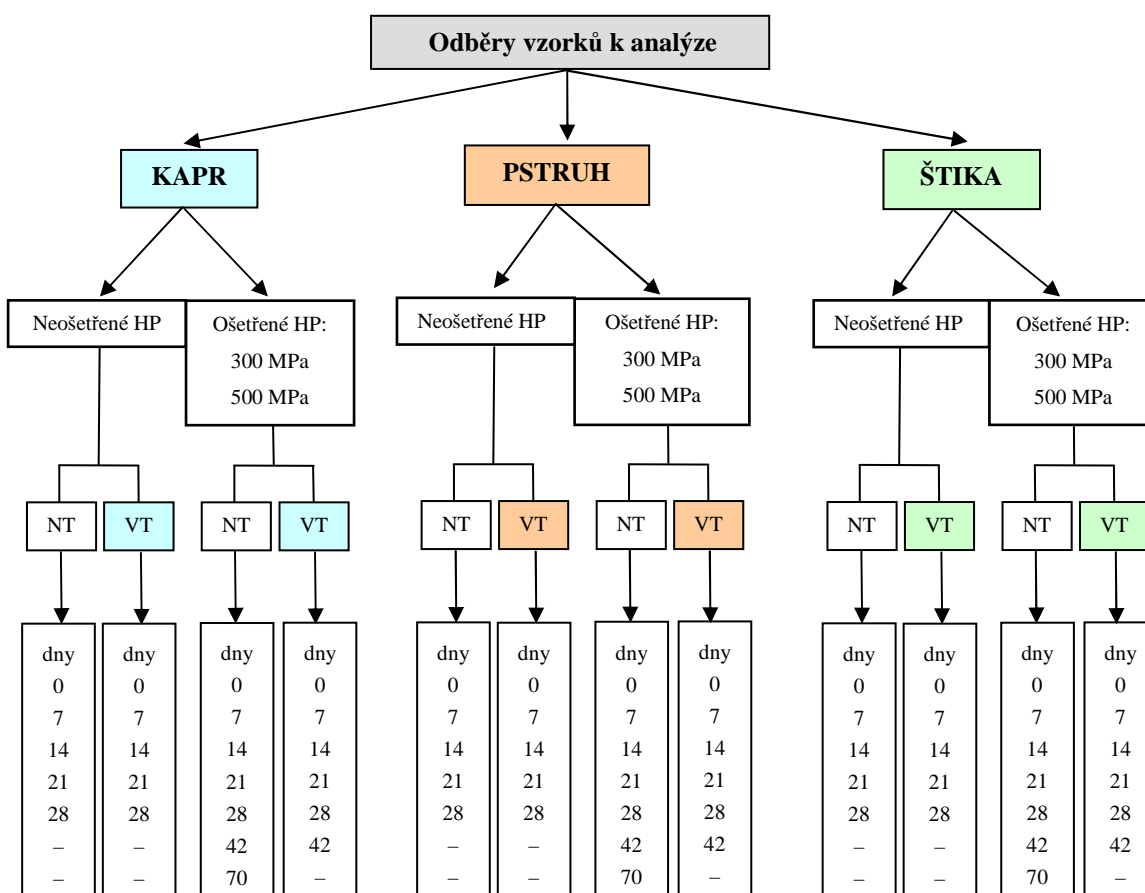
#### 4.10 Konzervace rybího masa vysokým tlakem

Pro konzervaci rybího masa vysokým tlakem byly vybrány tři druhy sladkovodních ryb. Pro tento typ konzervační techniky byl vybrán kapr obecný (*Cyprinus carpio*), pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) a štika obecná (*Esox lucius*). Konzervace vysokým tlakem probíhala na Výzkumném ústavu potravinářském Praha.

Ze zkušeností z předešlých experimentů při konzervaci rybího masa zářením nebylo třeba u konzervační techniky vysokým tlakem provádět zkušební sérii vzorků pro zjištění správné teploty a doby skladovatelnosti. Z dostupné literatury bylo zřejmé, že doba skladovatelnosti vzorků ošetřených vysokým tlakem bude kratší než skladovatelnost ozářených vzorků. Další důležitý poznatek byl, že vysoký tlak působí jako dobrá konzervační technika spíše při nižších teplotách uskladnění. Pro ověření těchto informací byly zvoleny dvě teploty skladování (nízká a vysoká teplota). Dále bylo skladování vzorků po ošetření vysokým tlakem zkráceno v porovnání se vzorky ošetřenými zářením z předešlých experimentů. Zkrácená doba skladování časově umožnila provést experimenty nejen na dvou druzích sladkovodních ryb (kapr obecný a pstruh duhový), jak tomu bylo v předešlých experimentech, ale také na dalším druhu sladkovodních ryb, a to na štice obecné.

#### 4.10.1 Vzorky pro sledování obsahu biogenních aminů v rybím masa kapra obecného, pstruha duhového a štika obecné

Z rybího masa (kapr obecný, pstruh duhový, štika obecná) byly připraveny vzorky o hmotnosti okolo 20 g (cca 7 x 3 x 1 cm). Vzorky byly ošetřeny vysokým tlakem 300 a 500 MPa po dobu 10 minut. Po konzervaci byly vzorky uloženy do dvou termostatů. Jeden byl nastaven na nižší teplotu 3,5 °C a druhý termostat byl nastaven na vyšší teplotu 12 °C. Ošetřené i neošetřené vzorky konzervační technikou byly odebírány po 7, 14, 21 a 28 dnech při nízké i vysoké teplotě skladování. Po 42 dnech skladování byly odebírány k analýze pouze vzorky ošetřené vysokým tlakem, skladované při nízké i vysoké teplotě. Po 70 dnech skladování byly odebrány vzorky ošetřené vysokým tlakem, ale skladované pouze při nízké teplotě (viz. Obr. 14).



**Obr. 14** Časový harmonogram odběrů vzorků rybího masa k analýze BA po konzervaci vysokým tlakem. Vzorky byly skladovány při 3,5 °C a 12 °C. (HP = high pressure, NT = nízká teplota, VT = vysoká teplota).



#### 4.11 Organoleptické vlastnosti

V rámci experimentů byly sledovány též organoleptické vlastnosti u všech vzorků. Organoleptické vlastnosti se stanovovaly pouze jako doplňující informace k obsahu BA u jednotlivých vzorků. Organoleptické vlastnosti byly vyjádřeny pomocí tří stupňů: dobré = 1, přijatelné = 2, špatné = 3, které jsou popsány níže viz Tabulka 3. Vyhodnocení bylo obecné na základě vzhledu, textury, barvy a vůně. Výsledky jednotlivých vzorků se skládaly ze tří paralelních posudků.

**Tabulka 3** Systém hodnocení organoleptických vlastností vzorků.

Organoleptické vlastnosti vzorků	Kvalita – organoleptické výsledky vzorků		
	dobré = 1	přijatelné = 2	špatné = 3
<i>vůně/zápach</i>	neutrální rybí	neutrální, mírný zápach ryby	odpudivý zápach ryby
<i>vzhled a tvar (barva/struktura)</i>	narůžovělá / pevná	mírně zavadlá / nepříliš pevná	zavadlá / měkká

Dalším velmi zajímavým hlediskem problematiky tvorby BA v mase vybraných druhů sladkovodních ryb, by mohlo být sledování činnosti mikroorganismů ve vakuově balených vzorcích rybiho masa. Sledování počtu mikroorganismů, které rostou na povrchu vzorků ošetřených i neošetřených konzervační technikou, by bylo pro disertační práci přínosem.

Nicméně školící pracoviště katedry aplikované chemie Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích nebylo vybaveno pro sledování mikrobiálního nárůstu a s ním spojenou tvorbou BA. Samotné experimenty s konzervačními technikami (vliv záření a vysokého tlaku) jsou časově náročné. Použité konzervační techniky nejsou dostupné na školícím pracovišti a byly prováděny ve spolupráci s Ústavem jaderné fyziky AV ČR v Praze (ozařování) a s VÚPP Praha (vysoký tlak), jak již bylo zmíněno dříve. Délka jednotlivých experimentů odpovídala 4–5 měsícům, dle časových možností a vzájemné domluvy se zmiňovanými pracovišti. Pouze doba skladování vzorků byla 3 měsíce. Po odběrech vzorků následovala jejich extrakce, derivatizace, samotné stanovení pomocí UPLC a vyhodnocení. Z důvodu této časové náročnosti experimentální části mé disertační práce nebyly plánované další experimenty, které by se zabývaly mikrobiální problematikou vzniku BA ani ve spolupráci s jiným pracovištěm.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

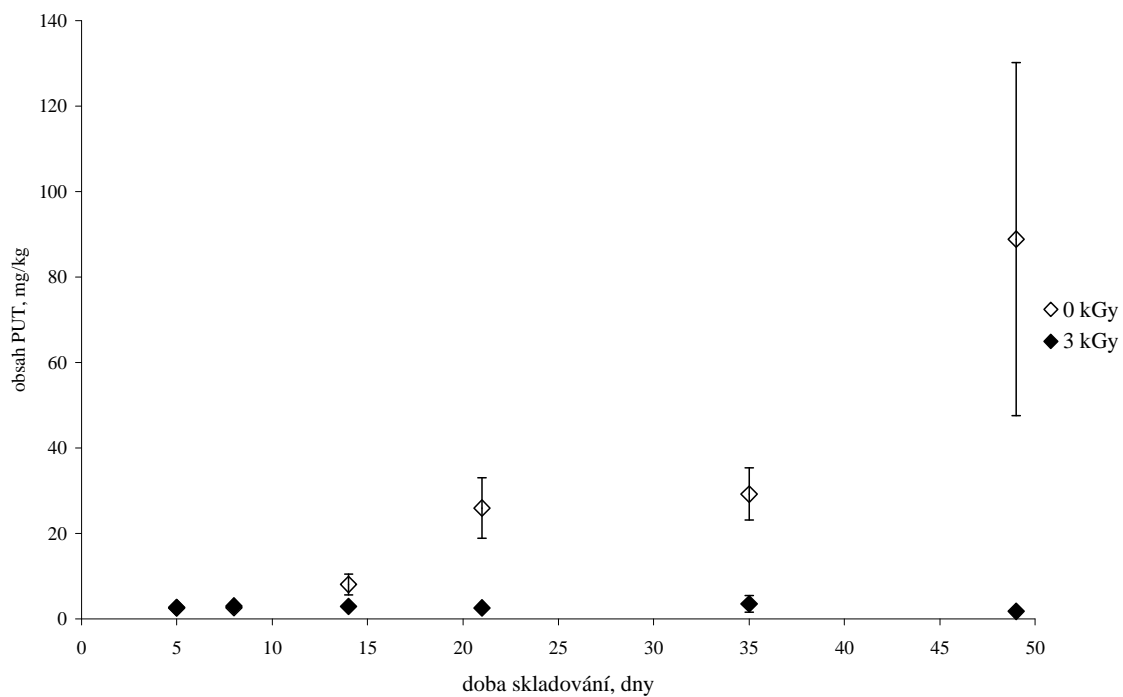
Pro prodloužení užitekosti čerstvého rybího masa, byly zvoleny dvě konzervační techniky. Rybí maso bylo vakuově zabaleno a uloženo do termostatu při zvolené skladovací teplotě po celou dobu probíhajících experimentů. Jednou z použitých technik byl vliv  $\beta$ -záření a druhou vliv vysokého hydrostatického tlaku. Obě z uvedených technik patří mezi moderní způsoby konzervace.

### 5.1 Vliv $\beta$ -záření na tvorbu biogenních aminů v mase sladkovodních ryb

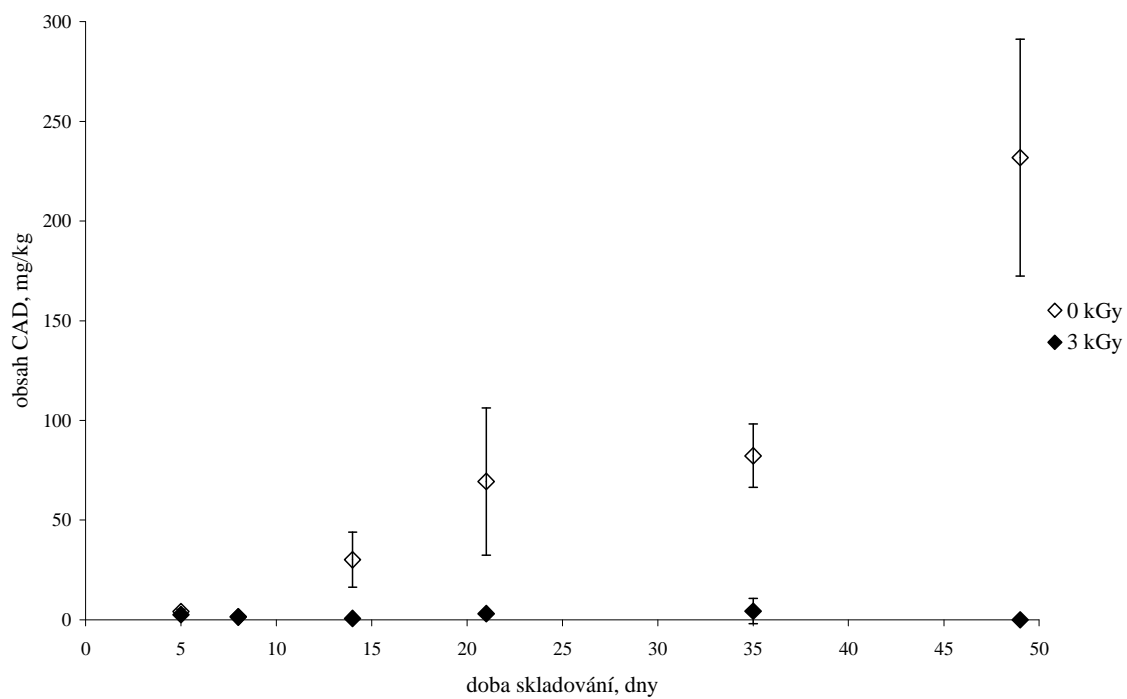
Z výsledků experimentů je patrné, že vliv  $\beta$ -záření na konzervaci rybího masa je zcela zásadní. Ve všech případech byl obsah BA v ozářených vzorcích výrazně nižší než u neozářených vzorků rybího masa. Tento jev je nejlépe patrný u PUT, CAD, HIM a TYM. U ostatních aminů TRM, PEA, SPD a SPM je změna jejich obsahu v mase v souvislosti s ozářením nízká nebo téměř zanedbatelná.

U kapřího masa se obvykle během skladování zvyšuje obsah převážně PUT a CAD. Tyto látky bývají považovány za ukazatele kvality či rozkladu. U masa pstruha nejvíce narůstal obsah PUT a TYM, proto jsou u tohoto druhu masa právě tyto aminy diskutovány v souvislosti s kvalitou. Při skladování neozářených vzorků pstruha, byl rovněž patrný i nárůst obsahů CAD a HIM. Skupina aminů PUT, CAD, HIM a TYM vypovídala nejlépe o postupu rozkladných procesů.

Vzorky kapra obecného, jak už bylo uvedeno, byly nejprve zkušební sérií pro zjištění vhodné doby skladování a optimální četnosti odebrání vzorků k analýze. Vzorky byly ozářeny dávkou 3 kGy. Nejprve byly ozářené a neozářené vzorky odebrány po 5, 8 a 14 dnech skladování. Obsah BA se v těchto vzorcích příliš nezvyšoval ve srovnání s obsahem těchto aminů v kontrolním neozářeném vzorku. Z tohoto důvodu byly další vzorky odebrány až po sedmi dnech skladování, čili po 21, 28 a 35 dnech u neozářených vzorků. U ozářených vzorků byl obsah vzniklých BA stále nízký, proto byl odběr vzorků po 28 dnech vynechán a následoval odběr po čtrnácti dnech, čili po 35 a 49 dnech. Nárůst obsahu BA, během skladování u ozářených i neozářených vzorků kapra, je znázorněn na níže uvedených grafech. Grafy byly vytvořeny pro aminy, které jsou obecně považovány za ukazatele kvality a rozkladu.



**Obr. 15** Obsah PUT v mase kapra obecného během skladování při 3,5 °C.



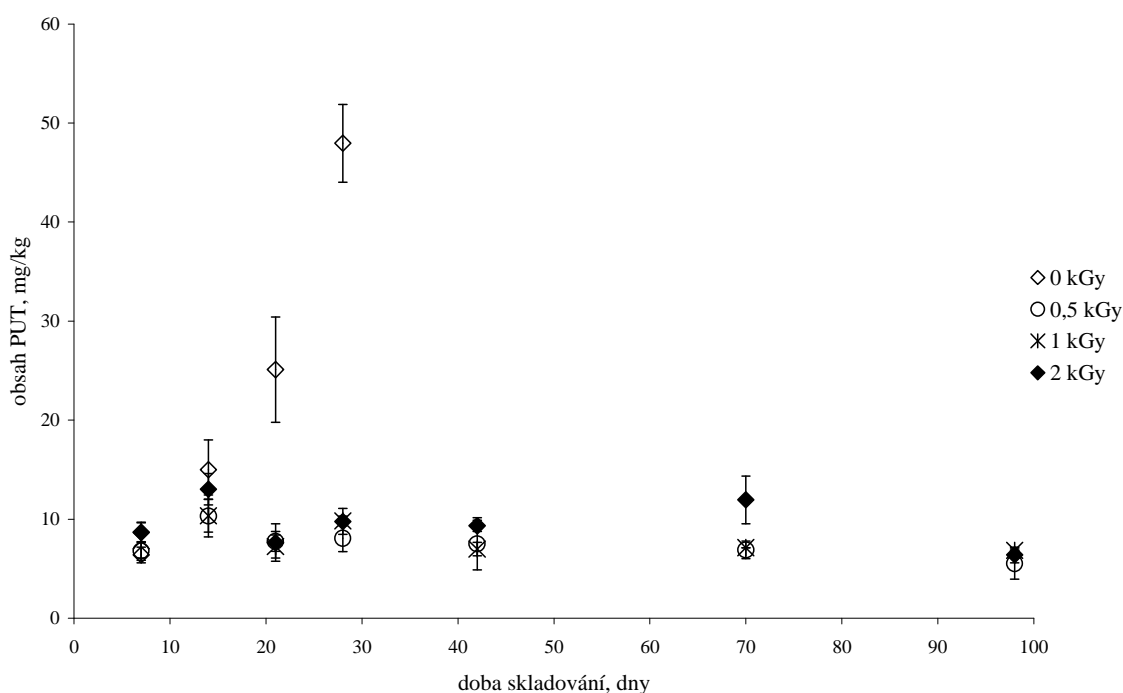
**Obr. 16** Obsah CAD v mase kapra obecného během jeho skladování při 3,5 °C.

Pro další série pokusů bylo vybráno maso pstruha duhového. Výběr pstruha namísto kapra byl proveden z důvodu běžnější konzumace těchto ryb v Evropě a ve světě.

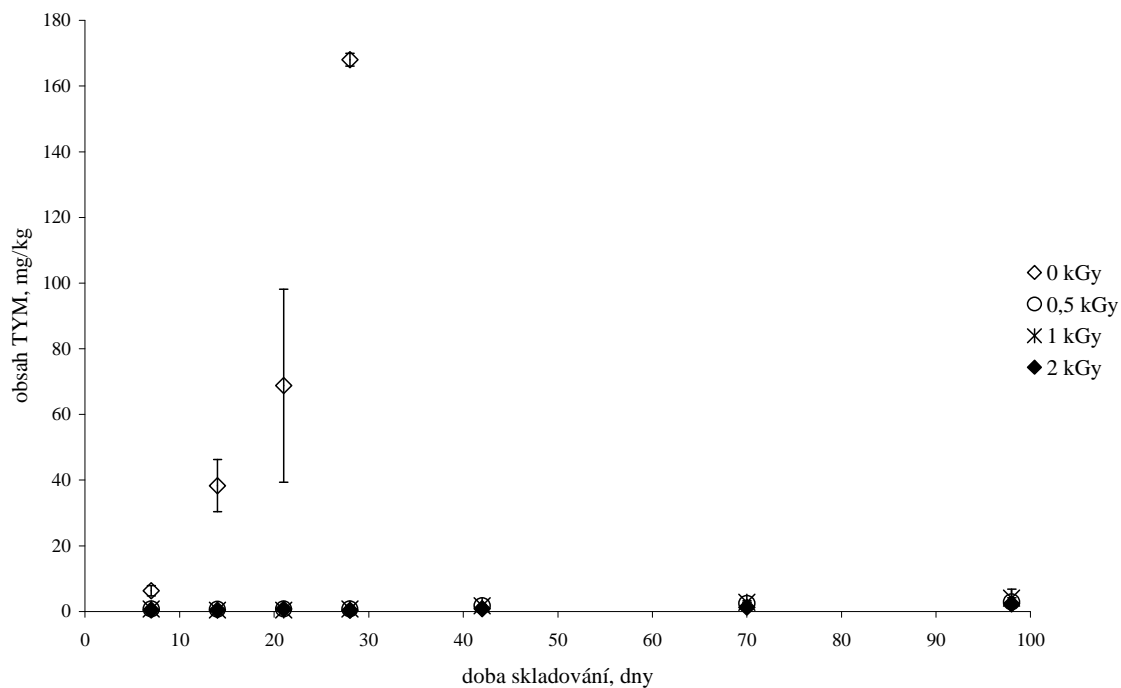
Experiment s masem pstruha byl proveden celkově dvakrát. U každého pokusu byly vzorky ozářeny různými dávkami  $\beta$ -záření. Ozáření dávkou 3 kGy u vzorků kapra se jeví jako dostačující až nadměrné. Z tohoto důvodu u vzorků pstruha se přistoupilo na nižší dávky. V prvním pokusu na dávky 0,5; 1 a 2 kGy, v druhém pokusu na dávky 0,25; 0,5 a 0,75 kGy.

Vzorky byly odebírány nejprve v týdenních intervalech. Na základě průběžně vyhodnocovaných dat, která ukazovala stále nízké obsahy BA, byla doba odběrů postupně prodloužena na 14 až 28 dnů. Ozářené vzorky byly tedy odebrány po 7, 14, 21, 28, 42, 70 a 98 dnech. Neozářené vzorky se kazily podstatně rychleji v porovnání s ozářenými, a proto byly odebrány pouze po 7, 14, 21 a 28 dnech. Poté již vzhledem k nízké kvalitě nebyly další odběry konány.

Nárůst BA v ozářených i neozářených vzorcích je znázorněn graficky. Grafy byly opět vytvořeny pro aminy, které jsou obecně považovány za ukazatele kvality.



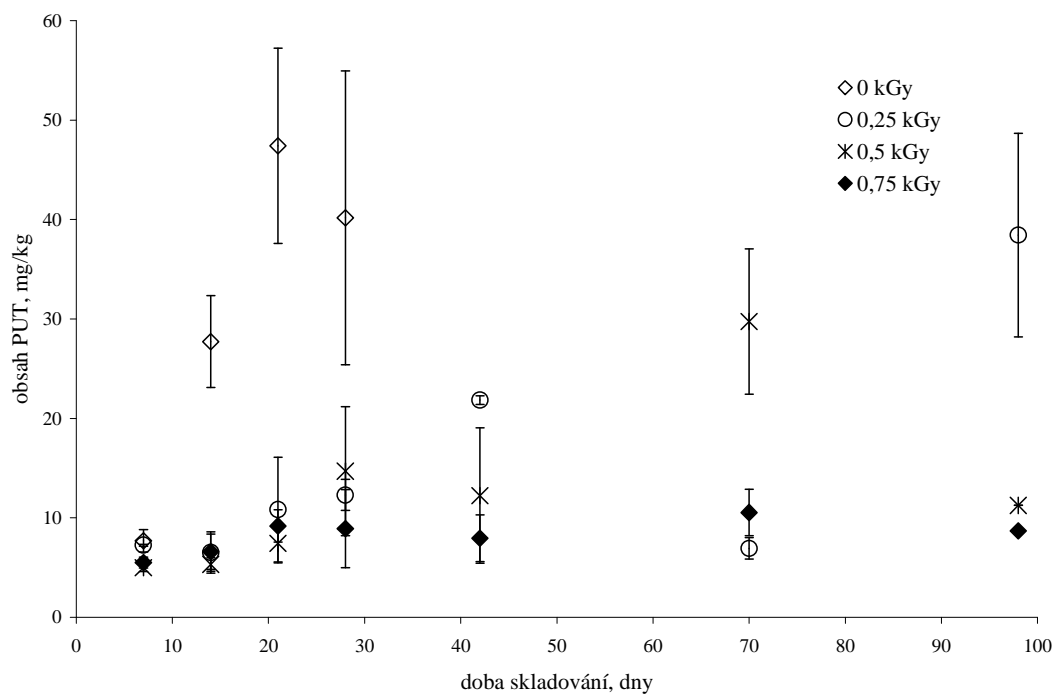
**Obr. 17** Obsah PUT v mase pstruha duhového (pokus 1) během jeho skladování při 3,5 °C.



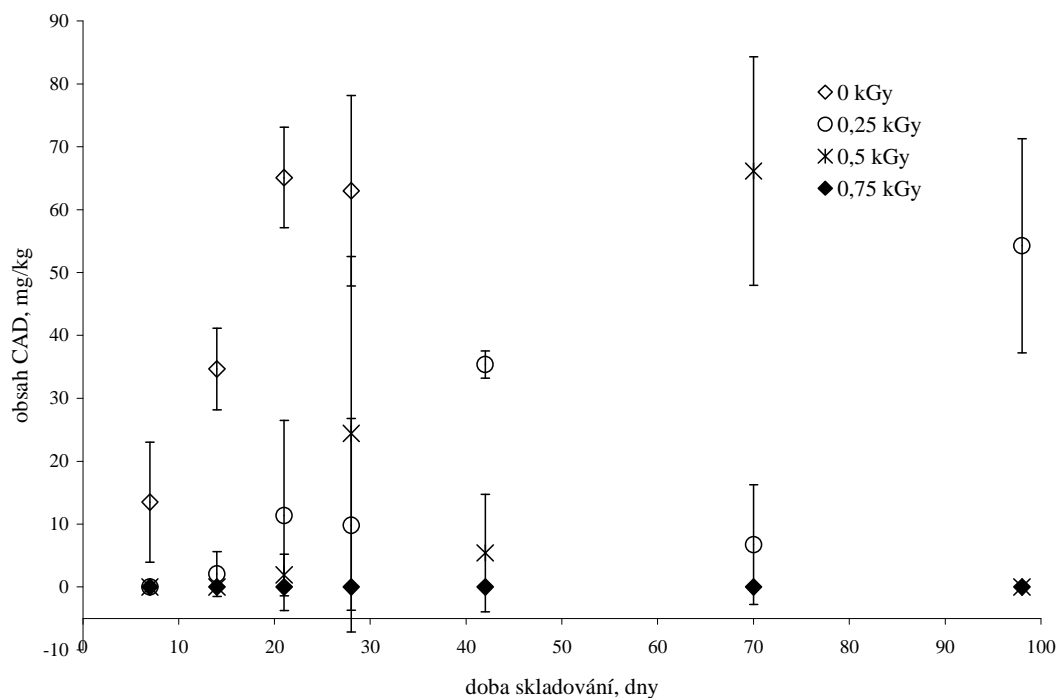
**Obr. 18** Obsah TYM v mase pstruha duhového (pokus 1) během jeho skladování při 3,5 °C.

Při porovnání výsledných dat ze vzorků pstruha s výsledky vzorků kapra, nebyly zjištěny výrazné odlišnosti v působení  $\beta$ -záření na oba druhy masa.

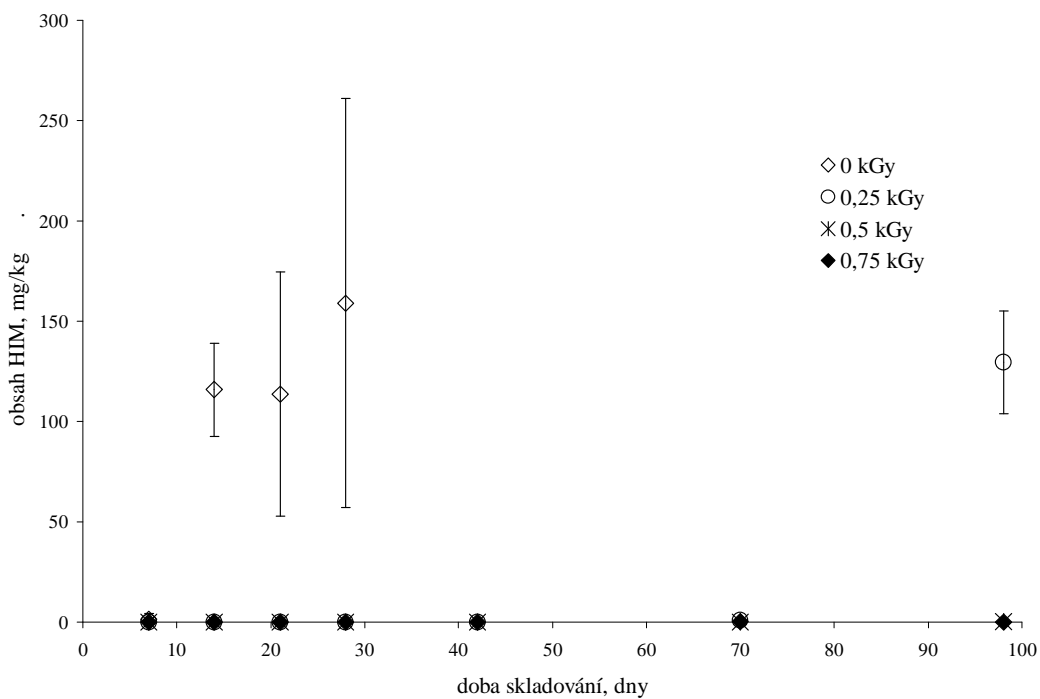
Po dokončení prvního pokusu se pstruhem bylo prokázáno, že i dávky 1 a 2 kGy jsou dostačující či dokonce nadbytečné pro konzervaci vzorků. Z tohoto důvodu byly v druhém pokusu dávky sníženy na 0,25; 0,5 a 0,75 kGy. Vzorky byly odebírány ve stejných časových intervalech, jako v prvním pokusu. U druhého pokusu je zřetelný vzestup obsahu PUT a TYM jako v prvním případě, ale také CAD a HIM.



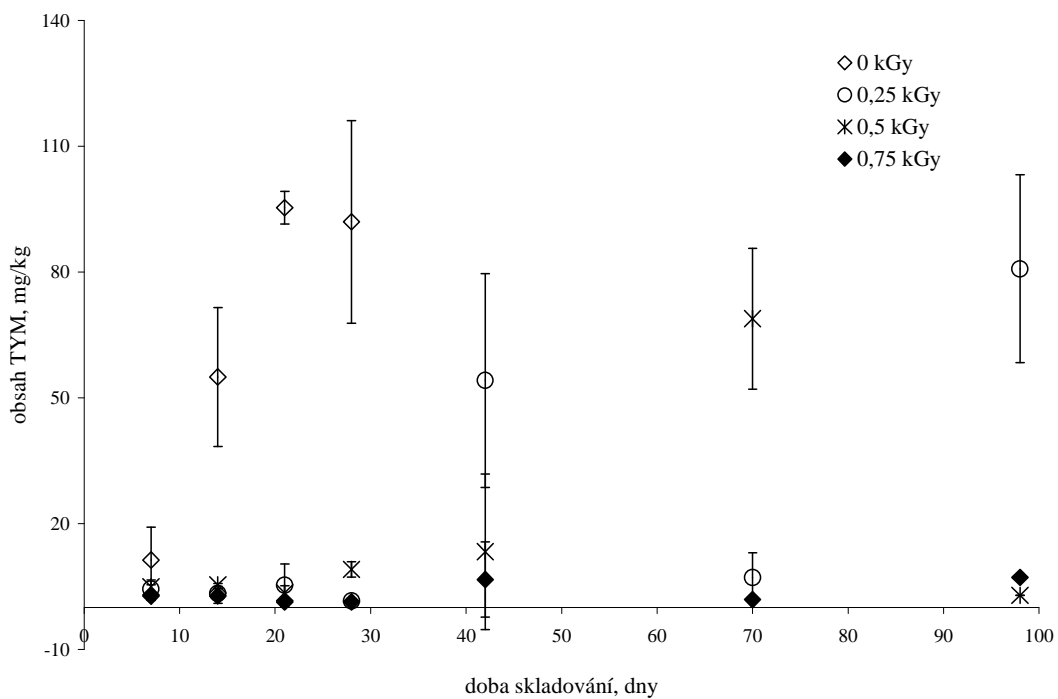
**Obr. 19** Obsah PUT v mase pstruha duhového (pokus 2) během jeho skladování při 3,5 °C.



**Obr. 20** Obsah CAD v mase pstruha duhového (pokus 2) během jeho skladování při 3,5 °C.

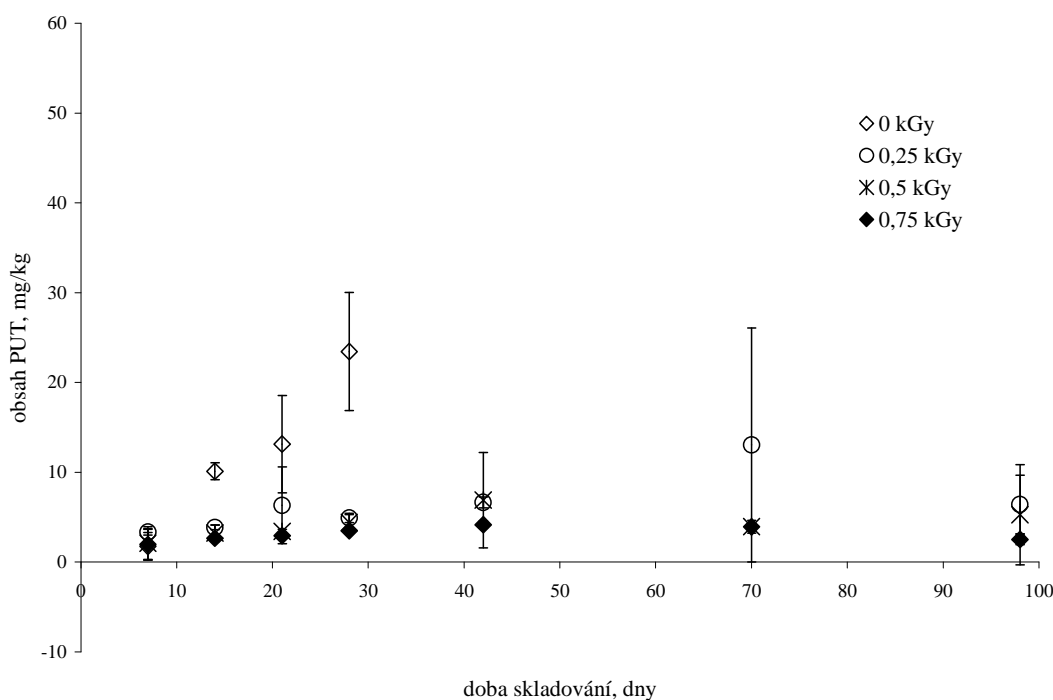


**Obr. 21** Obsah HIM v mase pstruha duhového (pokus 2) během jeho skladování při 3,5 °C.



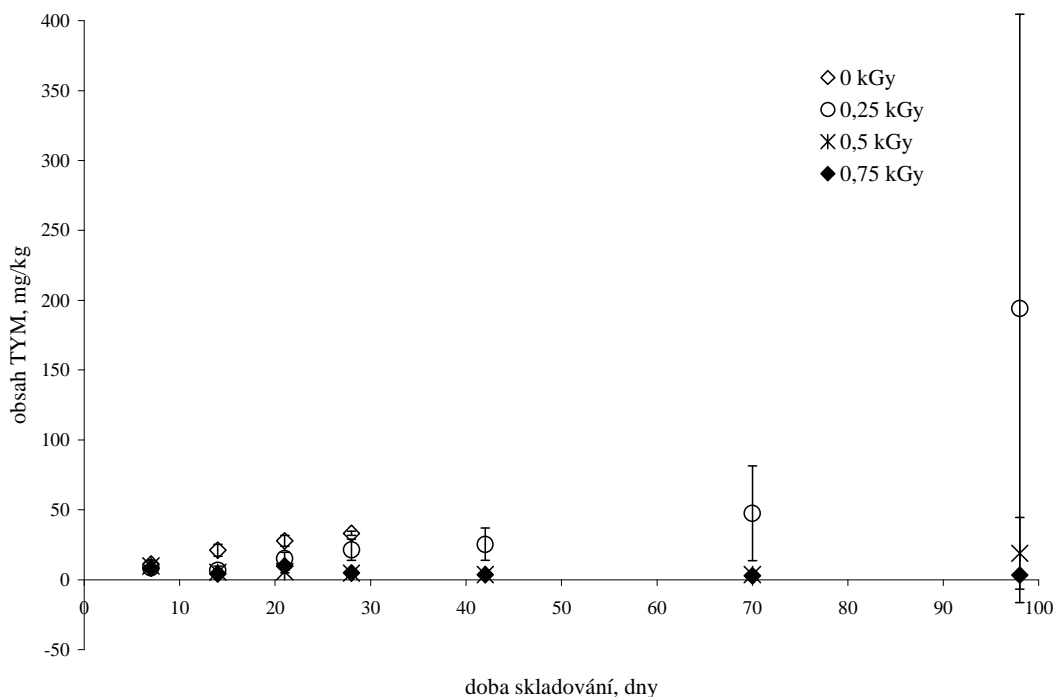
**Obr. 22** Obsah TYM v mase pstruha duhového (pokus 2) během jeho skladování při 3,5 °C.

Pro ucelení experimentu s  $\beta$ -zářením, jako konzervační technikou pro rybí maso, byl zopakován pokus s masem kapra obecného. Použity byly již pouze takové dávky  $\beta$ -záření, které byly na základě předchozích zkušeností shledány postačujícími. Vzorky kapřího masa byly ozářeny dávkou 0,25; 0,5 a 0,75 kGy a odebrány ve stejných časových intervalech jako v předešlých pokusech s masem pstruha. V druhém pokusu s kapřím masem PUT a TYM vykazovaly nejvyšší vzestup obsahu během skladování při 3,5 °C. Tyto výsledky zcela nekorrespondují s výsledky ze zkušební série vzorků s kapřím masem, kde hlavními ukazateli kvality byly PUT a CAD. Avšak tento druhý pokus s kapřím masem probíhal v jiném časovém období než pokus první (zkušební). Ryby byly dodány z jiného chovu, ale bylo dodrženo stejné stáří i původ ryb.



**Obr. 23** Obsah PUT v mase kapra obecného (pokus 2) během jeho skladování při 3,5 °C.





**Obr. 24** Obsah TYM v mase kapra obecného (pokus 2) během jeho skladování při 3,5 °C.

V rámci experimentů byly sledovány též organoleptické vlastnosti u všech vzorků. Z výsledků, které jsou diskutovány níže, je patrné, že organoleptické vlastnosti jednotlivých vzorků odpovídaly obsahům distribuovaných BA. Lze říci, že i velmi malá dávka  $\beta$ -záření (pod 0,75 kGy) zajišťuje dostatečnou konzervaci rybího masa po celé sledované období. Dále si můžeme povšimnout, že u vzorků ozářených dávkou 0,25 kGy, které byly skladovány po dobu 42 dnů, již zřejmě začíná docházet k degradaci rybího masa. Lze konstatovat, že dávka 0,25 kGy byla u našich pokusů nejnižší přijatelnou hodnotou ozáření pro dostatečnou konzervaci masa po uvedené dobu.

V dalších podkapitolách jsou podrobněji popsány získané výsledky, obsahů BA během skladování ozářených a neozářených vzorků při teplotě 3,5 °C. Výsledky jsou odděleně diskutovány, jak u kapra obecného (*Cyprinus carpio*), tak u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Výsledky jsou komentovány a shrnuty do tabulek. Každá tabulka je věnována jednotlivému aminu. Pro každou použitou dávku ozáření je zde uvedena průměrná hodnota obsahu sledovaného aminu v době odběru vzorku a její směrodatná odchylka ze tří měření. Všem výsledkům předchází tabulka s hodnotami BA u kontrolního vzorku v den založení experimentu. V některých případech, na místo hodnoty obsahu se nachází označení ND, které vyjadřuje, že naměřená hodnota je pod mezí detekce, čili hodnota není detekována.

### 5.1.1 Vliv nízké dávky záření na tvorbu biogenních aminů u vakuově baleného kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

#### 5.1.1.1 Zkušební série vzorků (pokus 1)

Hodnoty všech sledovaných BA u kontrolního vzorku jsou vyjádřeny v následující tabulce (Tabulka 4). Zde nejvyšší obsah vykazují polyaminy SPD a SPM. Polyaminy a PUT jsou přirozenou složkou všech živých buněk, a tak jejich přítomnost u kontrolního vzorku nebyla neočekávaná. Ostatní aminy jsou u kontrolního vzorku ve velmi nízkých až zanedbatelných koncentracích. Dokonce v případě TRM a HIM je jejich obsah pod mezí detekce.

**Tabulka 4** Hodnoty BA kontrolního vzorku kapra obecného (0 kGy) v den založení experimentu (0. den skladování).

Obsah BA, mg.kg <sup>-1</sup> (0 kGy ozáření, 0. den skladování).							
TRM	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
ND	1.6 ± 0.34	3.0 ± 0.46	3.0 ± 0.93	ND	4.2 ± 1.30	6.7 ± 1.65	5.5 ± 2.06

Vzorky se považují za čerstvé, pokud obsah BA nepřekračuje hodnotu 10 mg.kg<sup>-1</sup>. Za přijatelné jsou vzorky považovány, pokud se obsah BA nachází v rozmezí mezi 10–20 mg.kg<sup>-1</sup>. Nad touto hraniční hodnotou jsou vzorky považovány za nevyhovující.

PUT a CAD vykazovaly největší nárůst jejich obsahů u neozářených vzorků během skladování a byly tak určeny za ukazatele kvality kapřího masa. Obsah PUT se až do 14. dne skladování držel pod hodnotou 10 mg.kg<sup>-1</sup>. Od 21. dne skladování PUT překročil hodnotu 20 mg.kg<sup>-1</sup>. Od této doby, se obsah PUT zvyšoval až k 35. dnu skladování, kdy dosáhl hodnoty 88.9 mg.kg<sup>-1</sup>. Nárůst obsahu CAD byl výraznější ve srovnání s PUT. Již při 14. dnu skladování obsah CAD překročil hodnotu 20 mg.kg<sup>-1</sup> a jeho obsah se dynamicky navyšoval do 35. dne skladování, kdy jeho hodnota činila 232 mg.kg<sup>-1</sup>.

**Tabulka 5** Obsah PUT (mg.kg<sup>-1</sup>) v mase kapra (průměr ± SD, n = 3).

PUT	Doba skladování, dny						
	5	8	14	21	28	35	49
Dávka ozáření, kGy							
0	2.6 ± 0.38	2.6 ± 0.13	8.1 ± 2.46	25.9 ± 7.06	29.2 ± 6.12	88.9 ± 41.3	–
3	2.7 ± 0.31	3.0 ± 0.70	2.9 ± 0.30	2.6 ± 0.38	–	3.5 ± 1.94	1.8 ± 0.39

**Tabulka 6** Obsah CAD ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

CAD	Doba skladování, dny						
	5	8	14	21	28	35	49
Dávka ozáření, kGy							
0	4.1 $\pm$ 1.11	1.5 $\pm$ 0.37	30.1 $\pm$ 13.8	69.4 $\pm$ 37.0	82.3 $\pm$ 15.9	232 $\pm$ 59.3	–
3	2.6 $\pm$ 1.10	1.4 $\pm$ 0.08	0.7 $\pm$ 0.61	3.1 $\pm$ 0.96	–	4.4 $\pm$ 6.31	ND

Výrazný nárůst během skladování vykazoval i TYM. Stejně jako PUT, obsah TYM do 14. dne skladování se držel pod hodnotou  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Vzorky od 21. dne skladování vykazovaly známky rozkladu. Obsah TYM od 21. dne skladování úměrně narůstal s dobou skladování až do 35. dne, kdy dosáhl hodnoty  $67.9 \text{ mg.kg}^{-1}$  u neozářených vzorků. U ozářených vzorků obsah TYM dosáhl hodnoty  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  až při 35. dnu skladování a při nejdelší době skladování (49 dnů) dosáhl hodnoty  $15 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Ozářené vzorky nevykazovaly známky rozkladu po celou dobu skladování.

**Tabulka 7** Obsah TYM ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

TYM	Doba skladování, dny						
	5	8	14	21	28	35	49
Dávka ozáření, kGy							
0	6.8 $\pm$ 2.25	1.6 $\pm$ 1.08	2.9 $\pm$ 0.39	20.3 $\pm$ 8.83	41.8 $\pm$ 14.2	67.9 $\pm$ 28.1	–
3	1.5 $\pm$ 0.76	2.4 $\pm$ 0.33	2.9 $\pm$ 0.54	2.2 $\pm$ 2.01	–	10.3 $\pm$ 6.19	15.0 $\pm$ 4.95

Nejnižší nárůst během skladování vzorků vykazoval HIM, TRM a PEA. Obsah HIM se u neozářených i ozářených vzorků nepřiblížil k hodnotě  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  během celé doby skladování. Obsah TRM a PEA byl po celou dobu pokusu pod mezí detekce jak u vzorků neozářených, tak u vzorků ozářených.

**Tabulka 8** Obsah HIM ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

HIM	Doba skladování, dny						
	5	8	14	21	28	35	49
Dávka ozáření, kGy							
0	ND	0.2 $\pm$ 0.35	ND	ND	3.8 $\pm$ 2.49	1.9 $\pm$ 2.15	–
3	1.9 $\pm$ 0.35	1.7 $\pm$ 0.25	1.6 $\pm$ 0.48	ND	–	0.8 $\pm$ 0.29	0.9 $\pm$ 0.76

Obsahy polyaminů SPD a SPM, po celou dobu pokusu, jsou nezávisle proměnné s dávkou ozáření a dobou skladování. SPD a SPM jsou přirozenou složkou všech živých buněk, a proto nejsou vhodnými aminy pro stanovení rozkladných procesů. Ani v případě neozářených vzorků nevykazuje jejich obsah významný nárůst.

**Tabulka 9** Obsah SPD ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

SPD	Doba skladování, dny						
Dávka ozáření, kGy	5	8	14	21	28	35	49
0	$6.4 \pm 1.09$	$6.3 \pm 0.51$	$6.6 \pm 0.79$	$4.8 \pm 1.33$	$4.0 \pm 0.37$	$6.4 \pm 1.31$	–
3	$5.9 \pm 1.25$	$6.8 \pm 0.77$	$9.3 \pm 2.63$	$5.2 \pm 0.24$	–	$6.0 \pm 1.75$	$6.3 \pm 6.83$

**Tabulka 10** Obsah SPM ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

SPM	Doba skladování, dny						
Dávka ozáření, kGy	5	8	14	21	28	35	49
0	$6.7 \pm 2.93$	$5.1 \pm 0.34$	$5.0 \pm 0.76$	$4.8 \pm 1.28$	$2.3 \pm 0.85$	$3.9 \pm 0.65$	–
3	$5.7 \pm 2.85$	$5.5 \pm 1.64$	$7.8 \pm 1.38$	$5.0 \pm 1.46$	–	$3.2 \pm 1.40$	$9.3 \pm 3.47$

U zkušební série vzorků kapřího masa bylo zjištěno, že použitá dávka  $\beta$ -záření 3 kGy pro konzervaci rybího masa byla nadbytečná. Vzorky nepodléhaly známám kažení ani po nejdelší skladovací době, a to po 49 dnech uložení vzorků v termostatu při 3,5 °C. Tyto výsledky jsou v souladu i se sledovanými organoleptickými vlastnostmi těchto vzorků (viz. Tabulka 11). Na rozdíl od ozářených vzorků, vzorky neozařené  $\beta$ -zářením projevily první náznaky rozkladu po 21. dnu skladování (hodnota 2) a po 35. dnu skladování se jevily zcela zkažené (hodnota 3).

**Tabulka 11** Organoleptické vlastnosti vzorků kapra: kontrolní vzorky a vzorky ošetřené  $\beta$ -zářením.

Organoleptické vlastnosti	Doba skladování, dny						
Dávka ozáření, kGy	5	8	14	21	28	35	49
0	1	1	1	2	2–3	3	–
3	1	1	1	1	–	1	1

Pomocí tohoto pokusu se podařilo lépe odhadnout doby odběrů vzorků pro další experimenty. Bylo zjištěno, že neozařené vzorky vykazují značné známky rozkladu již při 28. dnu skladování. Odběry po 28. dnu skladování byly pro další experimenty zrušeny u neozařených vzorků.

Nejdelší doba skladování (49 dnů) neodhalila dobu, při níž se začínají kazit ozářené vzorky. U ozářených vzorků hodnota BA nepřekročila hodnotu  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  po 49. dnu skladování. Výjimkou je pouze obsah TYM po 49. dnu skladování, který byl  $15 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Tento obsah sice překročil hodnotu  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  pro čerstvé rybí maso, ale stále patří do rozmezí  $10\text{--}20 \text{ mg.kg}^{-1}$  pro přijatelně čerstvé rybí maso. Z těchto výsledků vyplývá, že pro další experimenty s ozářeným rybím masem musí být prodloužena doba skladování vzorků.

### 5.1.1.2 Série vzorků s vhodnými dávkami ozáření a vhodnou dobou skladování (pokus 2)

Tento opakovaný experiment s kapřím masem byl posledním pokusem, který se zabýval vlivem  $\beta$ -záření na rybí maso, v rámci experimentální části mé disertační práce. Mezi zkušební a touto sérií vzorků byly provedeny dva pokusy s masem pstruha. Výsledky těchto pokusů jsou popsány následně v kapitole 5.1.2. Během pokusů s rybím masem pstruha byly použity nižší dávky  $\beta$ -záření a změnil se doby odběrů vzorků. Zjištěné nejvhodnější dávky  $\beta$ -záření, pro konzervaci rybího masa a přijatelná doba skladování, pro správnou dynamiku degradačních procesů, byly použity při opakované sérii vzorků s kapřím masem.

Navzdory faktu, že podle časové osy provedených experimentů, by měl být tento experiment zařazen až za pokusy, které se zabývají rybím masem pstruha, je experiment s kapřím masem popsán v jedné kapitole se zkušební sérií vzorků, která se též týká rybího masa kapra obecného.

Hodnoty jednotlivých BA u kontrolního vzorku, který nebyl vystaven  $\beta$ -záření a byl odebrán ke zpracování v den založení experimentu, jsou uvedeny níže (viz. Tabulka 12). S výjimkou obsahu TYM jsou u kontrolního vzorku detekovány pouze PUT, SPD a SPM, které jsou přirozenými složkami živých buněk. Obsah TYM nepřekračuje hranici  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$ , která je považována za kritickou hodnotu, pro vznik degradačních procesů.

**Tabulka 12** Hodnoty BA kontrolního vzorku kapra obecného (0 kGy) v den založení experimentu (0. den skladování).

Obsah BA, $\text{mg.kg}^{-1}$ (0 kGy ozáření, 0. den skladování)							
TRM	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
ND	ND	$0.7 \pm 1.24$	ND	ND	$14.8 \pm 1.69$	$3.7 \pm 0.79$	$4.1 \pm 0.91$

PUT a TYM vykazují největší nárůsty jejich obsahu během skladování při teplotě  $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dynamika zvyšujícího se obsahu PUT a TYM v závislosti na době skladování je téměř vzorová v případě neozářených vzorků. PUT překračuje hodnotu  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  při 28. dnu skladování. Naproti tomu, u ozářených vzorků obsah PUT nepřekročil hodnotu  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  ani po 98 dnech skladování u všech dávek  $\beta$ -záření. Obsah TYM u neozářených vzorků překročil hodnotu  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  již při 14. dnu skladování. U vzorků ozářených dávkou 0,5 a 0,75 kGy nepřekročil obsah TYM hodnotu  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  ani po 98. dnu skladování. Avšak u dávky 0,5 kGy v 98. den skladování byl obsah TYM v rozmezí  $10\text{--}20 \text{ mg.kg}^{-1}$ , a to  $18,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Velmi zajímavé jsou výsledky obsahu TYM u vzorků ozářených dávkou 0,25 kGy, kde hranice  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  byla překročena již při 21. dnu skladování a hranice

20 mg.kg<sup>-1</sup> při 28. dnu skladování. K 98. dnu skladování obsah TYM narostl až na hodnotu 194 mg.kg<sup>-1</sup>.

**Tabulka 13** Obsah PUT (mg.kg<sup>-1</sup>) v mase kapra (průměr ± SD, n = 3).

PUT	Doba skladování, dny						
	7	14	21	28	42	70	98
Dávka ozáření, kGy							
<b>0</b>	1.8 ± 1.52	10.1 ± 0.96	13.1 ± 5.41	23.4 ± 6.57	–	–	–
<b>0,25</b>	3.3 ± 0.35	3.8 ± 0.26	6.3 ± 4.27	4.9 ± 0.52	6.6 ± 0.61	13.1 ± 13.0	6.4 ± 3.26
<b>0,5</b>	2.1 ± 1.82	3.2 ± 0.91	3.4 ± 0.21	4.4 ± 0.89	6.9 ± 5.32	3.9 ± 0.24	5.3 ± 5.59
<b>0,75</b>	2.0 ± 1.71	2.6 ± 0.12	3.0 ± 0.11	3.5 ± 0.16	4.2 ± 0.40	3.9 ± 0.72	2.5 ± 0.60

**Tabulka 14** Obsah TYM (mg.kg<sup>-1</sup>) v mase kapra (průměr ± SD, n = 3).

TYM	Doba skladování, dny						
	7	14	21	28	42	70	98
Dávka ozáření, kGy							
<b>0</b>	11.1 ± 2.54	21.2 ± 4.26	27.8 ± 3.97	33.2 ± 1.53	–	–	–
<b>0,25</b>	8.5 ± 1.10	6.7 ± 3.01	15.0 ± 4.47	21.4 ± 7.55	25.4 ± 11.5	47.5 ± 34.0	194 ± 211
<b>0,5</b>	9.8 ± 2.35	5.4 ± 2.29	5.9 ± 1.01	4.8 ± 0.59	3.8 ± 0.69	3.7 ± 0.03	18.9 ± 25.7
<b>0,75</b>	8.1 ± 0.42	4.1 ± 0.93	9.8 ± 2.45	4.9 ± 0.42	3.7 ± 1.15	2.8 ± 0.50	3.3 ± 0.12

Narozdíl od zkušební série vzorků kapřího masa, CAD v tomto pokusu nevystupuje jako ukazatel kvality rybího masa. Obsah CAD nenarůstá během skladování vzorků. Výrazný obsah CAD nebyl nalezen ani u neozářených vzorků skladovaných po dobu 21 a 28 dnů. Obdobné chování jako u CAD je pozorováno také u HIM.

**Tabulka 15** Obsah CAD (mg.kg<sup>-1</sup>) v mase kapra (průměr ± SD, n = 3).

CAD	Doba skladování, dny						
	7	14	21	28	42	70	98
Dávka ozáření, kGy							
<b>0</b>	ND	ND	8.4 ± 3.38	6.7 ± 3.60	–	–	–
<b>0,25</b>	ND	ND	ND	ND	2.8 ± 0.33	19.2 ± 30.1	1.5 ± 0.56
<b>0,5</b>	ND	ND	ND	ND	0.6 ± 0.13	1.7 ± 1.02	2.1 ± 3.55
<b>0,75</b>	ND	ND	ND	ND	0.6 ± 0.01	1.2 ± 0.78	1.3 ± 0.19

**Tabulka 16** Obsah HIM (mg.kg<sup>-1</sup>) v mase kapra (průměr ± SD, n = 3).

HIM	Doba skladování, dny						
	7	14	21	28	42	70	98
Dávka ozáření, kGy							
<b>0</b>	ND	ND	ND	ND	–	–	–
<b>0,25</b>	ND	ND	0.8 ± 1.38	3.8 ± 4.40	7.6 ± 7.14	9.6 ± 12.5	2.8 ± 1.43
<b>0,5</b>	ND	ND	ND	ND	0.1 ± 0.24	0.5 ± 0.04	ND
<b>0,75</b>	ND	ND	ND	ND	0.4 ± 0.38	0.2 ± 0.40	0.1 ± 0.23

SPD a SPM, stejně jako v předešlém experimentu, nemění svůj obsah v závislosti na dávce  $\beta$ -záření a době skladování vzorků. Jejich obsah se střídavě mění u všech analyzovaných vzorků, především v závislosti na jejich přirozené tvorbě. Výsledky opět pouze potvrzují, že SPD a SPM nejsou vhodnými aminy pro hodnocení čerstvosti rybího masa.

**Tabulka 17** Obsah SPD ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD, n = 3).

SPD	Doba skladování, dny						
	7	14	21	28	42	70	98
0	3.6 $\pm$ 0.38	4.8 $\pm$ 0.83	4.7 $\pm$ 1.22	4.9 $\pm$ 0.95	–	–	–
0,25	3.7 $\pm$ 0.34	5.5 $\pm$ 0.90	3.2 $\pm$ 0.14	3.6 $\pm$ 0.84	3.9 $\pm$ 1.07	5.1 $\pm$ 1.14	3.2 $\pm$ 1.00
0,5	3.4 $\pm$ 0.56	6.7 $\pm$ 2.25	4.2 $\pm$ 0.48	8.0 $\pm$ 1.00	7.0 $\pm$ 0.87	6.7 $\pm$ 0.53	6.4 $\pm$ 0.76
0,75	3.2 $\pm$ 0.31	7.9 $\pm$ 0.63	3.9 $\pm$ 0.10	7.4 $\pm$ 1.66	8.1 $\pm$ 0.73	9.2 $\pm$ 0.75	7.0 $\pm$ 1.43

**Tabulka 18** Obsah SPM ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD, n = 3).

SPM	Doba skladování, dny						
	7	14	21	28	42	70	98
0	3.2 $\pm$ 0.30	2.1 $\pm$ 0.39	3.3 $\pm$ 1.25	2.3 $\pm$ 0.48			
0,25	4.2 $\pm$ 0.37	3.0 $\pm$ 0.24	2.6 $\pm$ 0.49	4.8 $\pm$ 2.72	1.9 $\pm$ 0.36	2.0 $\pm$ 0.26	1.9 $\pm$ 0.59
0,5	3.9 $\pm$ 0.33	3.5 $\pm$ 0.38	4.1 $\pm$ 0.83	6.0 $\pm$ 1.93	4.4 $\pm$ 0.49	4.4 $\pm$ 0.76	5.3 $\pm$ 2.12
0,75	3.0 $\pm$ 0.66	7.1 $\pm$ 6.70	4.4 $\pm$ 1.05	4.2 $\pm$ 0.51	4.5 $\pm$ 0.83	4.5 $\pm$ 0.90	4.8 $\pm$ 1.10

Dosažené výsledky z opakovaného pokusu kapřího masa, které jsou uvedeny ve výše popsaných tabulkách, jsou v souladu s pozorovanými organoleptickými vlastnostmi jednotlivých vzorků. Podle sensorických hodnot docházelo k prvním známám rozkladu u neozářených vzorků od 21. dne skladování (hodnocení 2). Vzorky ozářené dávkou 0,25 kGy se začínaly kazit po 42. dnu skladování (hodnocení 2). Po 70. dnu skladování se vzorky jevily zcela nevyhovující (hodnocení 3).

**Tabulka 19** Organoleptické vlastnosti vzorků kapra: kontrolní vzorky a vzorky ošetřené různou dávkou záření.

Organoleptické vlastnosti	Doba skladování, dny						
	7	14	21	28	42	70	98
0	1	1	2	2	–	–	–
0,25	1	1	1	1	2	3	3
0,5	1	1	1	1	1	1	1
0,75	1	1	1	1	1	1	1

Při opakovaném pokusu s kapřím masem, byla jako nejvhodnější dávka  $\beta$ -záření pro konzervaci, vyhodnocena hodnota 0,5 kGy. Použitá dávka záření 0,25 kGy prodloužila

užitkovost masa kapra pouze na 28 dnů při skladovací teplotě 3,5 °C. 28 dnů odpovídá přibližně době jednoho měsíce. Aplikace nižší dávky  $\beta$ -záření je pro spotřebitele přijatelnější variantou pro konzervaci masa než maximální přípustná dávka záření 3 kGy.

Vzorky ošetřené vyšší dávkou  $\beta$ -záření 0,75 kGy, nevykazovaly známky začínajících rozkladných procesů ani po 98. dnu skladování. Z těchto získaných výsledků vyplývá, že dávka  $\beta$ -záření 0,75 kGy je nadměrná pro konzervaci rybího masa, stejně jako tomu bylo v případě 3 kGy.

### 5.1.2 Vliv nízké dávky ozáření na tvorbu biogenních aminů u vakuově baleného pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*)

Obsah PUT, CAD a TYM vykazuje stálý nárůst u kontrolních vzorků (0 kGy). Tento nárůst lze také pozorovat u HIM, ale se značně většími odchylkami naměřených hodnot. Obsah polyaminů nevykazoval statisticky významné změny v závislosti na čase. Vakuově balené kontrolní vzorky byly stabilní po dobu 7 dnů při zvolené teplotě 3,5 °C. Tyto vzorky vykazovaly první sensorické známky kažení od 14. dne skladování, kdy obsah PUT překročil rozhodující hodnotu 20 mg.kg<sup>-1</sup> pro dobrou kvalitu vzorků. V průběhu skladování PUT vykazoval obdobný trend při dalších odběrech, jak v nárůstu jeho obsahu, tak ve zhoršujících se organoleptických vlastnostech. Kontrolní vzorky nebyly analyzovány po 28. dnu skladování v důsledku jejich nežádoucích sensorických vlastností.

Obsahy všech sledovaných aminů u kontrolního vzorku v den založení experimentu jsou vyjádřeny v následující tabulce (Tabulka 20). Zde nejvyšší obsah vykazují polyaminy PUT, SPD a SPM. Ostatní aminy jsou u kontrolního vzorku pod mezí detekce s výjimkou TYM, jehož koncentrace je velmi nízká.

**Tabulka 20** Hodnoty BA kontrolního vzorku pstruha duhového (0 kGy) v den založení experimentu (0. den skladování).

Obsah BA, mg.kg <sup>-1</sup> (0 kGy ozáření, 0. den skladování)							
TRM	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
ND	ND	6.3 ± 0.88	ND	ND	1.9 ± 1.58	3.1 ± 1.59	2.8 ± 0.51



PUT byl detekován ve všech vzorcích. Obsah PUT a/nebo CAD má přímý vztah k rozkladu rybího masa. Vliv dávky záření má evidentní vliv na obsah PUT (viz. Tabulka 21) 0 ukazuje rozdílnou situaci při tvorbě CAD. CAD se uvolňuje z lysinu činností bakteriálních dekarboxyláz. V živých buňkách je přítomen v mnohem menším množství ve srovnání s jinými polyaminy. Z těchto důvodů není obsah CAD zjištěn v čerstvém mase pstruha. V každém případě se obsah CAD zvyšuje s rozpadem proteinů ve vzorku. Ve srovnání s PUT hodnoty CAD ukázaly větší rozptyl paralelně naměřených hodnot.

Podobně jako u PUT, zvýšení obsahu CAD vedlo ke zhoršení kvality uložených vzorků. Nicméně se zdá, že změny v obsahu PUT proběhly více plynule ve srovnání s CAD. Pro dynamiku tvorby CAD je typické, že kvalitní vzorky obsahují CAD pod detekčním limitem a u vzorků nižší kvality dochází k zvýšení obsahu CAD mnohem intenzivněji ve srovnání s PUT.

**Tabulka 21** Obsah PUT ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase pstruha (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

PUT	Doba skladování, dny						
	7	14	21	28	42	70	98
0	7.0 $\pm$ 0.99	21.4 $\pm$ 3.90	36.3 $\pm$ 7.89	43.3 $\pm$ 12.3	–	–	–
0,25	7.3 $\pm$ 0.10	6.5 $\pm$ 2.08	10.8 $\pm$ 5.25	12.3 $\pm$ 1.55	21.9 $\pm$ 0.42	6.7 $\pm$ 0.54	33.9 $\pm$ 7.73
0,5	5.9 $\pm$ 0.72	7.8 $\pm$ 1.56	7.6 $\pm$ 1.57	11.4 $\pm$ 4.68	10.3 $\pm$ 5.77	18.3 $\pm$ 5.20	8.4 $\pm$ 0.79
0,75	5.5 $\pm$ 0.54	6.6 $\pm$ 1.78	9.2 $\pm$ 1.64	8.9 $\pm$ 3.92	8.0 $\pm$ 2.35	10.6 $\pm$ 2.34	8.7 $\pm$ 0.00
1	7.9 $\pm$ 1.77	10.4 $\pm$ 1.65	7.2 $\pm$ 1.18	9.8 $\pm$ 0.48	7.0 $\pm$ 0.67	7.1 $\pm$ 0.00	6.9 $\pm$ 0.01
2	8.7 $\pm$ 1.03	13.0 $\pm$ 1.58	7.6 $\pm$ 1.88	9.8 $\pm$ 1.32	9.3 $\pm$ 0.58	12.0 $\pm$ 2.42	6.4 $\pm$ 0.80

**Tabulka 22** Obsah CAD ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase pstruha (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

CAD	Doba skladování, dny						
	7	14	21	28	42	70	98
0	6.7 $\pm$ 6.76	21.0 $\pm$ 5.47	40.8 $\pm$ 5.78	43.6 $\pm$ 13.1	–	–	–
0,25	ND	2.1 $\pm$ 3.56	11.4 $\pm$ 15.1	9.8 $\pm$ 17.0	35.4 $\pm$ 2.19	3.4 $\pm$ 4.77	33.5 $\pm$ 10.9
0,5	ND	ND	10.0 $\pm$ 2.34	12.8 $\pm$ 19.9	4.1 $\pm$ 7.65	33.6 $\pm$ 12.9	0.9 $\pm$ 0.78
0,75	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	ND	ND	ND	1.0 $\pm$ 0.28	2.6 $\pm$ 1.10	ND	2.0 $\pm$ 2.84
2	ND	ND	ND	1.2 $\pm$ 0.41	ND	ND	ND

TRM a PEA nebyl zjištěn v žádném vzorku. HIM se výrazně lišil od ostatních aminů. S několika málo výjimkami tento amin nebyl detekován ve vzorcích ošetřených zářením. I dávka 0,25 kGy účinně potlačila jeho tvorbu. Tvorba HIM, který je velmi typickým a sledovaným aminem u mořských ryb (zejména u druhu *scombroid*), byla pozorována pouze v neozářených vzorcích. Neozářené vzorky po 14 dnech skladování vykazovaly zhoršené organoleptické vlastnosti. Obsah HIM byl  $57.9 \text{ mg.kg}^{-1}$ , tato hodnota je výrazně nižší než obsah  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ , který je stanoveným hygienickým limitem.<sup>103</sup> Tento limit byl překročen po 28 dnech skladování. Po této době nejsou vzorky přijatelné pro spotřebitele.

Zajímavý trend byl pozorován u TYM. Tento amin byl zjištěn ve všech vzorcích, i když často v množství, blízcí se limitu detekce. Trend tvorby TYM byl velmi podobný jako u CAD v závislosti na době skladování a dávce ozáření. Biogenní aminy, které byly dominantní ve vzorcích se sníženou kvalitou, byly TYM, PUT a CAD. V ošetřených vzorcích zářením, obsah TYM nepřekročil hodnotu  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Tento jev je velmi podobný i u PUT nebo CAD. Vzorky vykazují první známky rozkladu při obsahu  $10\text{--}50 \text{ mg.kg}^{-1}$  TYM podle organoleptických vlastností. U nepoužitelných vzorků (hodnocení 3) obsah TYM překročil hodnotu  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Tvorba TYM bývá spojena s tvorbou laktobacilů. Tyto bakterie mohou kontaminovat rybí maso již ve zpracovatelském závodě, i přesto že jsou dodrženy správné hygienické postupy. Obsah tří sledovaných aminů PUT, CAD a TYM odpovídal sledovaným organoleptickým vlastnostem skladovaných a ozářených vzorků. U kvalitních vzorků obsah každého zmíněného aminu byl nižší než  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

**Tabulka 23** Obsah HIM ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase pstruha (průměr  $\pm$  SD, n = 3).

HIM	Doba skladování, dny						
Dávka ozáření, kGy	7	14	21	28	42	70	98
0	$0.8 \pm 1.88$	$57.9 \pm 16.4$	$56.8 \pm 43.1$	$103 \pm 85.0$	–	–	–
0,25	ND	ND	ND	ND	ND	$0.4 \pm 0.54$	$68.2 \pm 18.8$
0,5	ND	ND	ND	ND	ND	$0.4 \pm 0.19$	ND
0,75	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	ND	ND	$0.5 \pm 0.41$	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

**Tabulka 24** Obsah TYM ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase pstruha (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

TYM	Doba skladování, dny						
	7	14	21	28	42	70	98
<b>0</b>	8.8 $\pm$ 5.65	46.6 $\pm$ 13.0	82.1 $\pm$ 20.9	122 $\pm$ 19.8	–	–	–
<b>0,25</b>	4.4 $\pm$ 1.00	3.4 $\pm$ 1.18	5.4 $\pm$ 5.06	1.5 $\pm$ 0.75	54.2 $\pm$ 25.5	5.3 $\pm$ 4.91	86.2 $\pm$ 41.8
<b>0,5</b>	2.9 $\pm$ 1.21	3.0 $\pm$ 0.27	2.1 $\pm$ 1.17	4.9 $\pm$ 1.31	8.7 $\pm$ 15.2	35.6 $\pm$ 11.9	2.9 $\pm$ 4.61
<b>0,75</b>	2.7 $\pm$ 1.04	2.8 $\pm$ 1.73	1.3 $\pm$ 0.20	1.4 $\pm$ 0.27	6.7 $\pm$ 8.98	1.9 $\pm$ 0.76	7.2 $\pm$ 0.01
<b>1</b>	0.8 $\pm$ 0.48	0.4 $\pm$ 0.09	0.4 $\pm$ 0.10	0.7 $\pm$ 1.04	1.8 $\pm$ 0.35	2.8 $\pm$ 0.01	4.1 $\pm$ 2.72
<b>2</b>	0.5 $\pm$ 0.26	0.4 $\pm$ 0.05	0.7 $\pm$ 0.14	0.3 $\pm$ 0.02	0.9 $\pm$ 0.22	1.3 $\pm$ 0.18	2.3 $\pm$ 0.45

**Tabulka 25** Organoleptické vlastnosti vzorků pstruha: kontrolní vzorky a vzorky ošetřené různou dávkou záření.

Organoleptické vlastnosti	Doba skladování, dny						
	7	14	21	28	42	70	98
<b>0</b>	1	2	3	3	–	–	–
<b>0,25</b>	1	1	1	1	2	2	3
<b>0,5</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>0,75</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>1</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>2</b>	1	1	1	1	1	1	1

SPD a SPM jsou přirozenou součástí všech živých buněk, a proto nebylo překvapením, že jejich obsah ve vzorcích opět kolísá nezávisle jak s dobou skladování, tak s dávkou záření. Polyaminy jsou někdy spojené s kvalitou potravin. Snížení obsahu SPD a SPM ve vzorcích ošetřených zářením není pozorováno. Neobjevuje se ani statisticky významný nárůst obsahu SPD a SPM v neozářených vzorcích. Opět se potvrzuje, že SPD a SPM nejsou vhodné aminy pro posouzení degračních procesů.

**Tabulka 26** Obsah SPD ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase pstruha (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

SPD	Doba skladování, dny						
	7	14	21	28	42	70	98
<b>0</b>	3.1 $\pm$ 0.57	3.0 $\pm$ 0.58	2.5 $\pm$ 0.20	1.8 $\pm$ 0.50	–	–	–
<b>0,25</b>	4.6 $\pm$ 0.34	3.6 $\pm$ 1.07	3.3 $\pm$ 1.11	6.9 $\pm$ 5.74	2.7 $\pm$ 0.91	3.1 $\pm$ 0.07	2.4 $\pm$ 0.61
<b>0,5</b>	3.6 $\pm$ 0.44	4.8 $\pm$ 1.90	2.9 $\pm$ 0.84	3.1 $\pm$ 0.90	2.5 $\pm$ 1.00	3.2 $\pm$ 0.70	3.1 $\pm$ 0.45
<b>0,75</b>	3.1 $\pm$ 0.19	2.8 $\pm$ 0.51	4.3 $\pm$ 2.06	3.9 $\pm$ 2.69	2.6 $\pm$ 0.19	3.3 $\pm$ 1.16	3.8 $\pm$ 0.00
<b>1</b>	3.8 $\pm$ 0.92	7.1 $\pm$ 1.51	3.0 $\pm$ 0.35	6.3 $\pm$ 2.95	2.0 $\pm$ 0.25	2.7 $\pm$ 0.00	3.8 $\pm$ 0.38
<b>2</b>	3.9 $\pm$ 0.22	6.2 $\pm$ 0.91	3.4 $\pm$ 0.55	6.9 $\pm$ 1.34	3.4 $\pm$ 1.04	5.5 $\pm$ 0.56	3.6 $\pm$ 1.35

**Tabulka 27** Obsah SPM ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase pstruha (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

SPM	Doba skladování, dny						
	7	14	21	28	42	70	98
<b>0</b>	3.6 $\pm$ 0.20	1.7 $\pm$ 0.39	1.9 $\pm$ 0.14	1.5 $\pm$ 0.29	–	–	–
<b>0,25</b>	4.0 $\pm$ 0.31	4.1 $\pm$ 1.13	3.1 $\pm$ 0.62	4.6 $\pm$ 3.21	2.2 $\pm$ 0.30	3.2 $\pm$ 0.58	1.7 $\pm$ 0.18
<b>0,5</b>	3.8 $\pm$ 0.29	5.1 $\pm$ 0.93	4.2 $\pm$ 0.30	2.9 $\pm$ 0.53	3.9 $\pm$ 0.90	4.8 $\pm$ 1.53	6.2 $\pm$ 0.37
<b>0,75</b>	3.5 $\pm$ 0.08	3.8 $\pm$ 0.53	3.3 $\pm$ 1.58	3.3 $\pm$ 1.52	3.3 $\pm$ 0.62	2.9 $\pm$ 0.38	11.8 $\pm$ 0.55
<b>1</b>	3.7 $\pm$ 0.47	6.6 $\pm$ 0.79	3.2 $\pm$ 0.47	5.2 $\pm$ 2.01	5.6 $\pm$ 0.18	8.5 $\pm$ 0.00	9.0 $\pm$ 0.25
<b>2</b>	3.6 $\pm$ 0.29	4.9 $\pm$ 1.59	3.1 $\pm$ 0.17	9.1 $\pm$ 2.09	4.9 $\pm$ 1.31	9.0 $\pm$ 1.39	6.9 $\pm$ 0.25

Vliv záření na stabilitu vzorků pstruha duhového byl významný již u nejnižší možné dávky záření (0,25 kGy). Vzorky ošetřené dávkou 0,25 kGy nevykazovaly známky rozkladu až do 28. dne skladování. Nepatrné zhoršení bylo pozorováno ve 42. dnu skladování. Tyto vzorky byly stanoveny jako organolepticky nevhodné při 98. dnu skladování (hodnocení 3). Obsah PUT je vyšší než  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  od 42. dne. Od této doby se kvalita vzorků neustále snižovala. Ve stejnou dobu bylo pozorováno zvýšení obsahu CAD. V souvislosti s rybím masem je často sledován a diskutován obsah HIM, ale v tomto případě nebyl detekován. Pozoruhodné je zvýšení TYM při 42. dnu, ačkoliv je zde větší disperze naměřených hodnot.

Vzorky ošetřené dávkou 0,5 kGy nevykazovaly žádné sensorické příznaky rozkladu až do 42. dne skladování. Při srovnání s kontrolními vzorky se obsah BA ve vzorcích začal zvyšovat po 70. dnu skladování. Obsah PUT u vzorků ošetřených dávkou 0,5 kGy byl  $18,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  70. den skladování. Získané hodnoty jsou typické a ukazují počáteční rozklad bílkovinné matrice. Obsah CAD byl  $33,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a TYM  $35,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . HIM byl detekován v nízké koncentraci, a to  $0,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Obsahy BA a organoleptické vlastnosti ukázaly, že zvýšení dávek záření z 0,25 na 0,5 kGy posunulo začátek rozkladných procesů z 42. na 70. den.

Zvýšení obsahu aminů nebylo patrné pro dávku 0,75 kGy po celou dobu experimentu (3 měsíce). Obsah PUT nepřekročil  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , CAD a HIM nebyly detekovány a obsah TYM byl nižší než  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a často i nižší než  $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Obdobná situace nastala u vzorků ošetřených 1 a 2 kGy. Sensorické vlastnosti masa byly hodnoceny jako velmi dobré i přesto, že struktura vzorků skladovaných déle než 70 dnů vykazovala snížení pružnosti. Výsledky ukazují, že dávky záření v rámci rozsahu 0,25 až 0,5 kGy jsou příznivé pro prodloužení trvanlivosti masa pstruha. Dávky v rozmezí 0,75 až 2 kGy stabilizují maso pstruha po dlouhou dobu až 98 dní při teplotě  $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

S ohledem na požadavek pro použití minimální dávky záření, lze doporučit k ošetření tohoto druhu ryb dávku 0,5 kGy.

Obsah BA ve vzorcích vakuově baleného masa pstruha, které byly skladovány při 3,5 °C, byl výrazně snížen po ošetření  $\beta$ -zářením. U vzorků s dobrými organoleptickými vlastnostmi koncentrace toxikologicky významných aminů HIM a TYM nepřesáhla hodnotu 10 mg.kg<sup>-1</sup>. Obsah PUT a CAD u kvalitních vzorků nepřekročil hodnotu 10–20 mg.kg<sup>-1</sup>. S ohledem na obsah BA lze říci, že dávky  $\beta$ -záření v rozsahu 0,75–1 kGy prodloužila trvanlivost masa pstruha až o 70–98 dnů. Vyšší dávky ozáření se zdají být nadbytečné pro konzervaci rybího masa pstruha i přesto, že legislativa dovoluje maximální povolenou dávku záření pro rybí maso 3 kGy.

## **5.2 Vliv vysokého hydrostatického tlaku na tvorbu biogenních aminů v mase sladkovodních ryb**

Vedle účinku  $\beta$ -záření na konzervaci vakuově baleného rybího masa, byl pro další způsob konzervace vybrán vliv vysokého hydrostatického tlaku v rámci experimentální části této disertační práce. Pro založení experimentu s vysokým tlakem jako konzervační technikou, bylo důležité správně odhadnout velikost použitého vysokého tlaku, dobu aplikace, správnou skladovací teplotu a správně zvolené doby odběrů vzorků k analýze. Stejně tomu tak bylo, i u předešlých experimentů s účinkem  $\beta$ -záření, z nich byly získány podstatné informace, ze kterých se vycházelo pro založení experimentů s vysokým tlakem.

Vzorky byly odebírány ve stejných časových intervalech (7, 14, 21, 28, 42 a 70 dnů), ale doba skladování byla zkrácena o čtyři týdny (o odběr v 98. den skladování) ve srovnání s  $\beta$ -zářením. Bylo tak učiněno z toho důvodu, že vzorky ošetřené vysokým tlakem vykazovaly značné zhoršení kvality již po 42. a 70. dnu skladování a další jejich uchovávání již bylo nadbytečné.

Také u skladovací teploty se vycházelo z hodnot, které byly použity u pokusů s  $\beta$ -zářením. Ale vedle teploty 3,5 °C byla použita i vyšší teplota, a to 12 °C. Použití dvou rozdílných teplot (nižší a vyšší) bylo uvaženo po prostudování dostupné literatury, zabývající se konzervací vysokým tlakem. Z literárních zdrojů bylo zřejmé, že vliv vysokého tlaku na delší údržnost rybího masa, není přednostně závislý na době aplikace vysokého tlaku (5, 10, 15, 20 minut), spíše však na jeho úrovni (100–1000 MPa) a teplotě skladování. Konzervace vysokým tlakem je neúčinnější při vyšších tlacích a nižší skladovací teplotě.

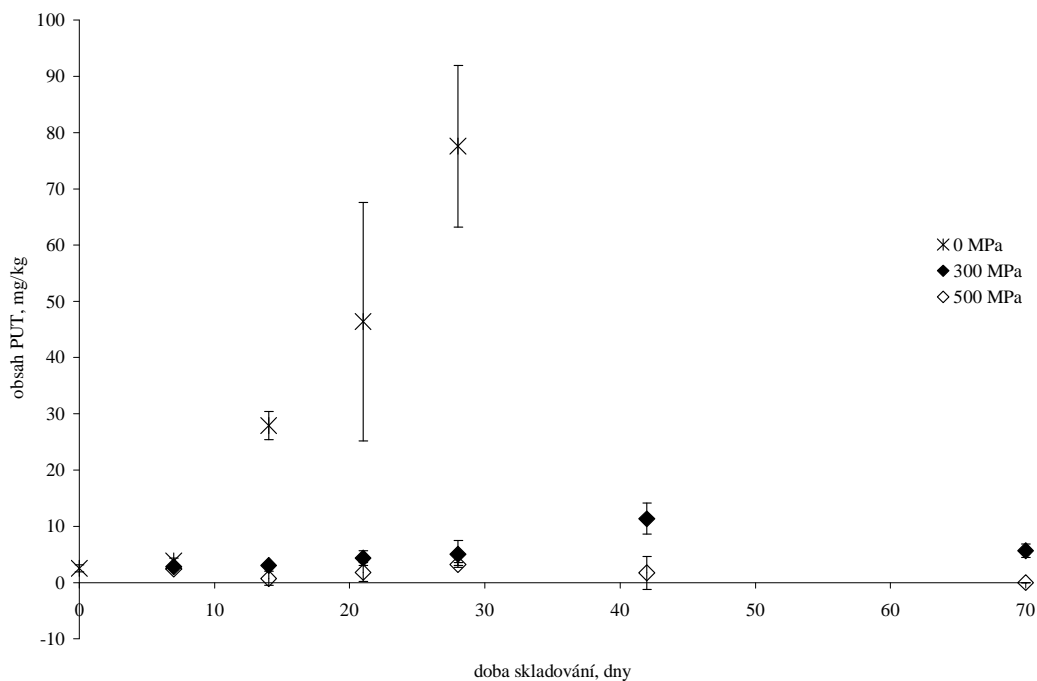
Činnost mikroorganismů ve vzorcích, které jsou skladovány při vyšší teplotě, není výrazně snížena pouze vlivem vysokého tlaku.

První pokusnou sladkovodní rybou byl kapr obecný (*Cyprinus carpio*). Úrovně vysokého tlaku zvolené pro pokusy s kapřím masem byly 300 a 500 MPa. Vzorky byly vystaveny vlivu vysokého tlaku po dobu 10 minut.

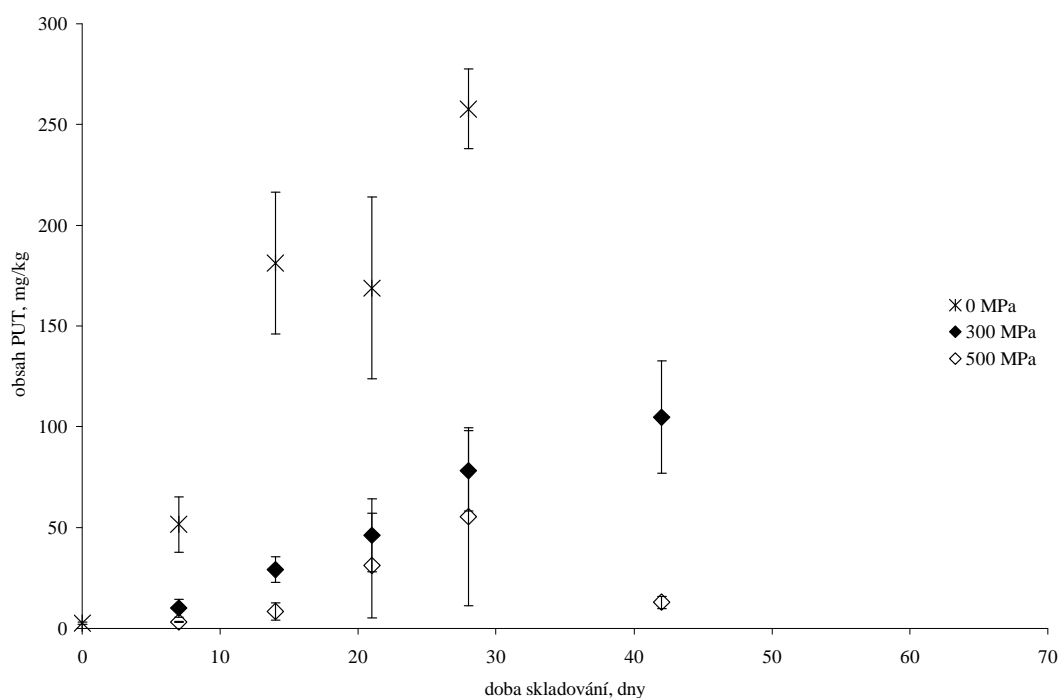
Z následujících vybraných grafů pro PUT, CAD a TYM je patrné, že vliv vysokého tlaku na prodloužení skladovatelnosti kapřího masa je značný. U kapřího masa PUT, CAD a TYM vykazovaly lineární nárůst jejich obsahů v závislosti na době skladování. Z tohoto důvodu jsou brány za ukazatele kvality kapřího masa v tomto experimentu.

Níže znázorněné grafy, popisující obsah PUT, CAD a TYM během skladování vzorků, jsou uvedené pro každý amin dvakrát. Jeden graf vždy popisuje závislost obsahu daného aminu na době skladování při teplotě 3,5 °C a druhý graf při teplotě 12 °C. Z důvodu velmi vysokého obsahu BA, byla nejdelší doba skladování při vyšší teplotě (12 °C) výrazně zkrácena na 42 dnů ze 70 dnů skladování při nižší teplotě (3,5 °C).

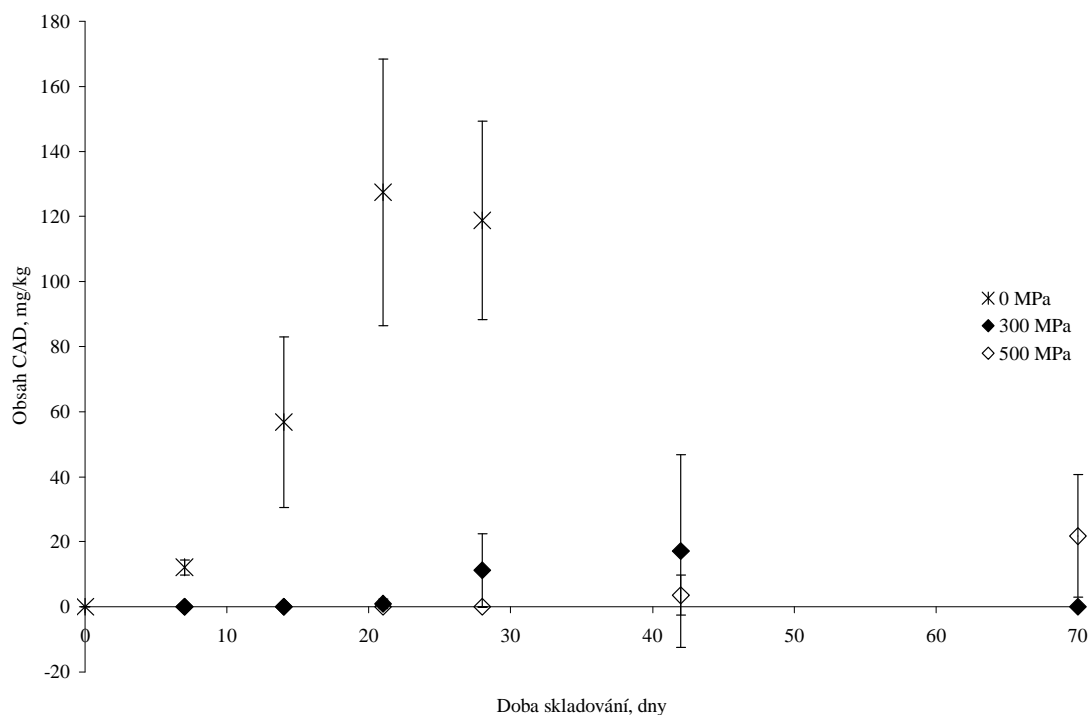
U vzorků neošetřených vysokým tlakem docházelo k překročení kritické hranice 20 mg.kg<sup>-1</sup> po 14 dnech skladování při 3,5 °C a po 7 dnech skladování při 12 °C. Po aplikaci vysokého tlaku, vzorky uložené při 3,5 °C nevykazovaly obsahy PUT a CAD vyšší jak 20 mg.kg<sup>-1</sup> po celou dobu skladování. Výjimku tvořil obsah TYM, který hodnotu 20 mg.kg<sup>-1</sup> překročil při 28. dnu po aplikaci 300 MPa a při 42. dnu po 500 MPa. Naproti tomu, vzorky skladované při 12 °C vykazovaly známky rozkladu již od 14. dne skladování u PUT a TYM. Podobné výsledky vykazoval i CAD, ale pouze u vzorků ošetřených 300 MPa. Vzorky ošetřené 500 MPa se jevily stabilní až do 42. dne skladování.



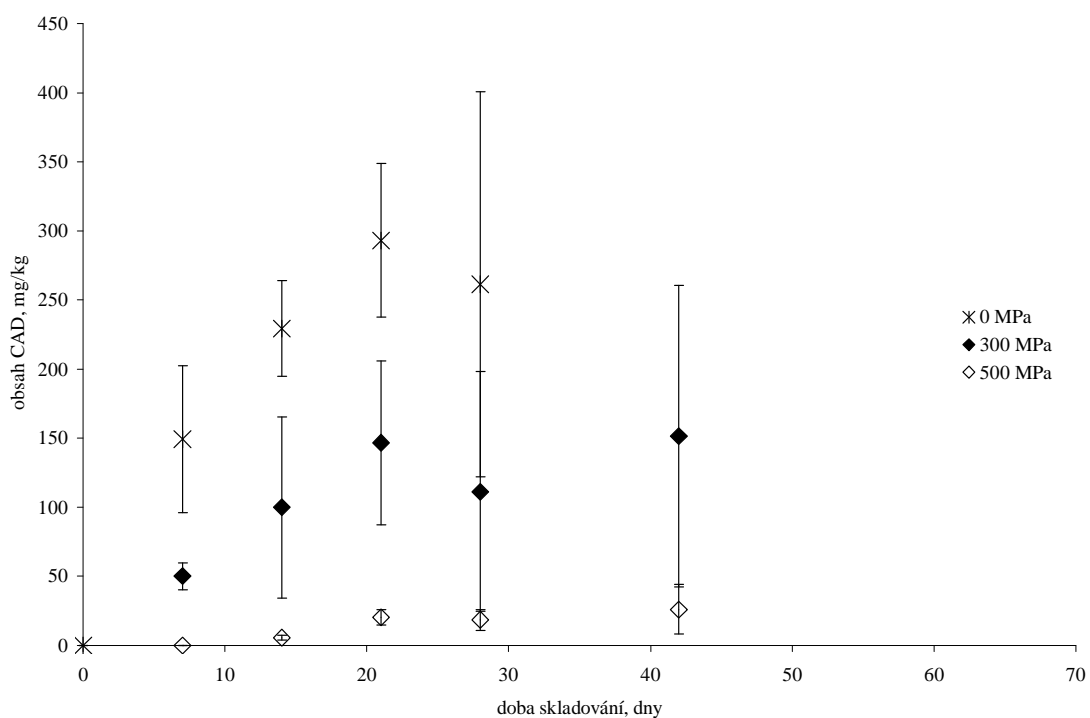
**Obr. 25** Obsah PUT ve vzorcích kapra obecného, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 3,5 °C.



**Obr. 26** Obsah PUT ve vzorcích kapra obecného, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 12 °C.

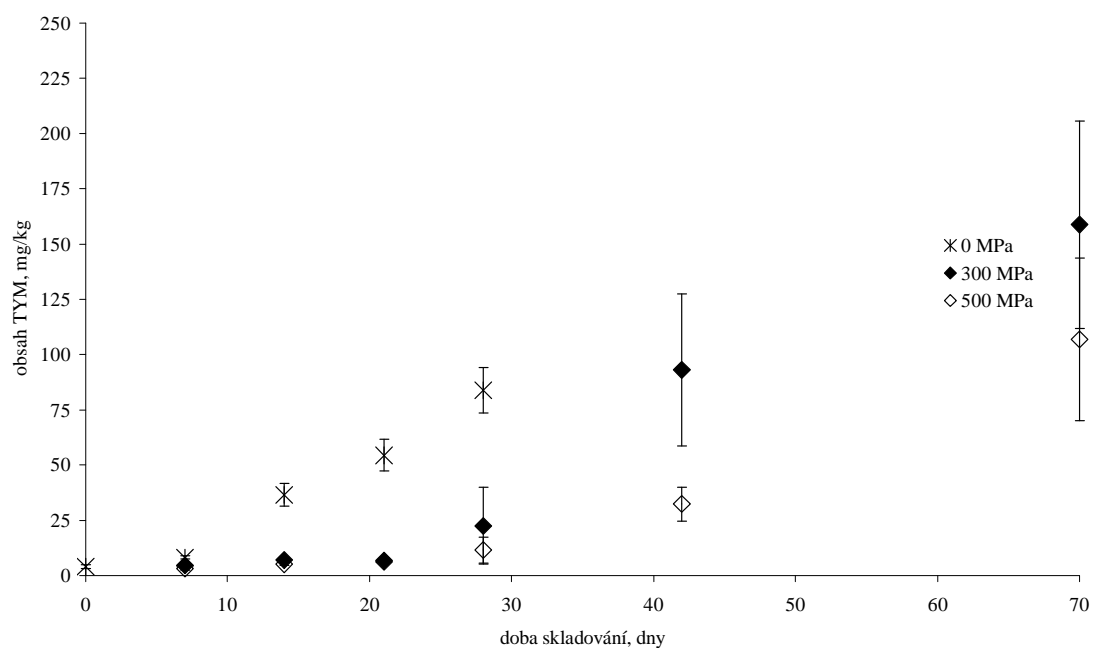


**Obr. 27** Obsah CAD ve vzorcích kapra obecného, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 3,5 °C.

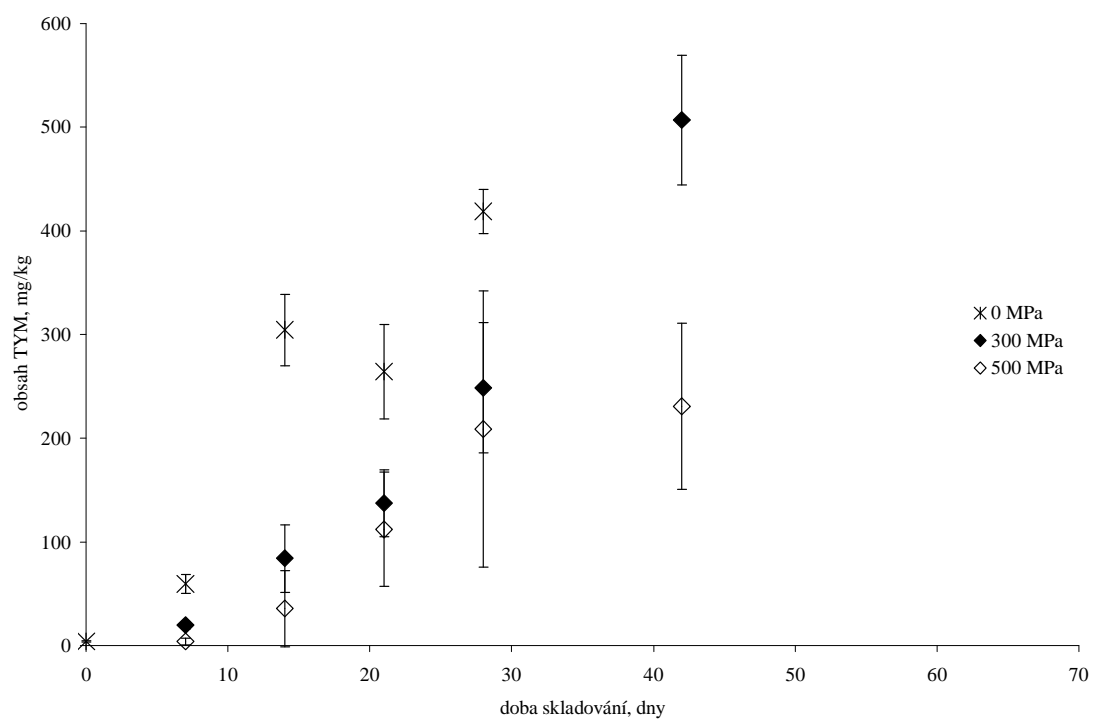


**Obr. 28** Obsah CAD ve vzorcích kapra obecného, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 12 °C.





**Obr. 29** Obsah TYM ve vzorcích kapra obecného, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 3,5 °C.



**Obr. 30** Obsah TYM ve vzorcích kapra obecného, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 12 °C.

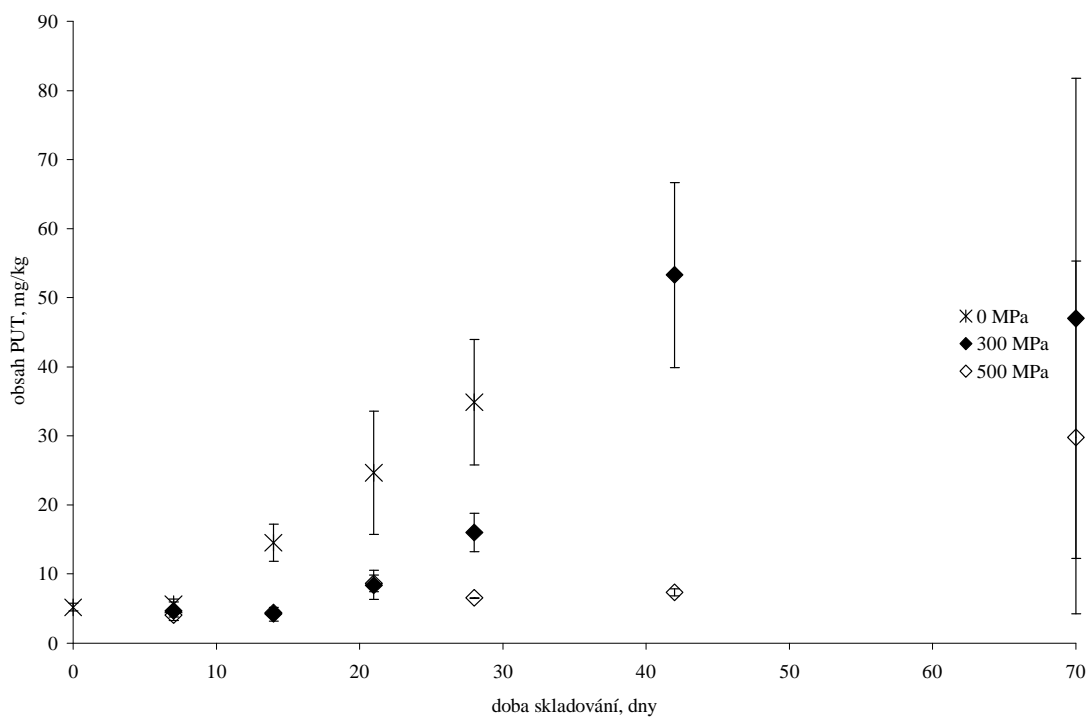
Další sladkovodní ryba, která byla vybrána pro experiment s vysokým tlakem, byl pstruh duhový, stejně jako tomu bylo i u předešlé konzervační techniky s  $\beta$ -zářením. Vysoký tlak o velikosti 300 a 500 MPa, aplikovaný po dobu 10 minut, byl vhodně zvolen, podle dosažených výsledků z pokusu s kapřím masem. Tudíž hodnoty těchto tlaků byly ponechány i pro pokusy s dalšími druhy sladkovodních ryb. Doba a teplota skladování zůstaly také stejné, jako v případě kapra obecného.

Na níže znázorněných grafech, pro vybrané aminy PUT, CAD a TYM, je evidentní, že účinek vysokého tlaku na konzervaci rybího masa pstruha duhového je stejný jako v případě kapra obecného, zvláště pro skladovací teplotu 3,5 °C. Při skladovací teplotě 12 °C je nárůst těchto BA dynamičtější ve srovnání s jejich narůstajícím obsahem při 3,5 °C.

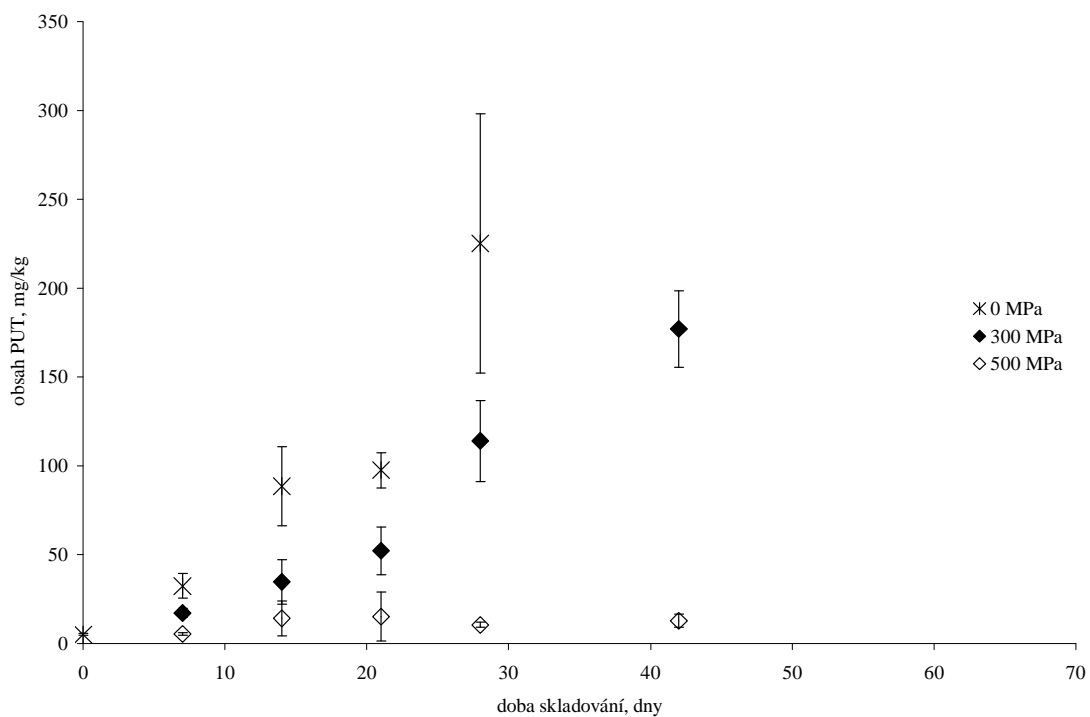
Vzorky, které nebyly vystaveny účinku vysokého tlaku, vykazovaly obsahy vybraných BA nad kritickou hranici 20 mg.kg<sup>-1</sup>, PUT a TYM po 14. dnu, CAD po 7. dnu skladování při 3,5 °C. Všechny výše popsané aminy překročily tuto kritickou hranici po prvním týdnu skladování při skladovací teplotě 12 °C.

Po ošetření vzorků 300 MPa obsah PUT a CAD překročil 20 mg.kg<sup>-1</sup> po 42. dnu skladování při 3,5 °C. Výjimku tvořil pouze TYM, který tuto hodnotu překročil již po 14. dnu. V případě vyšší skladovací teploty obsah PUT překročil kritickou hranici po 14. dnu, obsah CAD a TYM po prvním týdnu skladování.

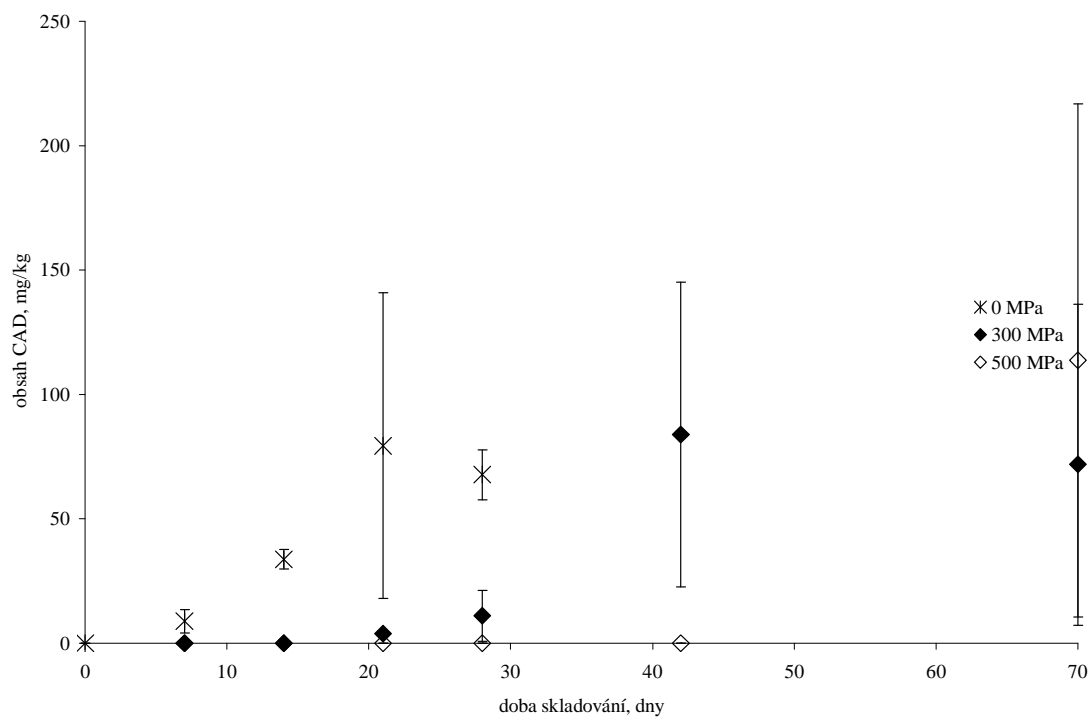
Aplikací 500 MPa docházelo k překročení hodnoty 20 mg.kg<sup>-1</sup> při nízké teplotě pouze po 70. dnu skladování u všech vybraných BA. Při vyšší skladovací teplotě nebyla tato hodnota v případě PUT překročena, obsah CAD byl pod mezí detekce (s výjimkou vzorků po 14. dnu skladování) a obsah TYM ji překročil po 21. dnu skladování.



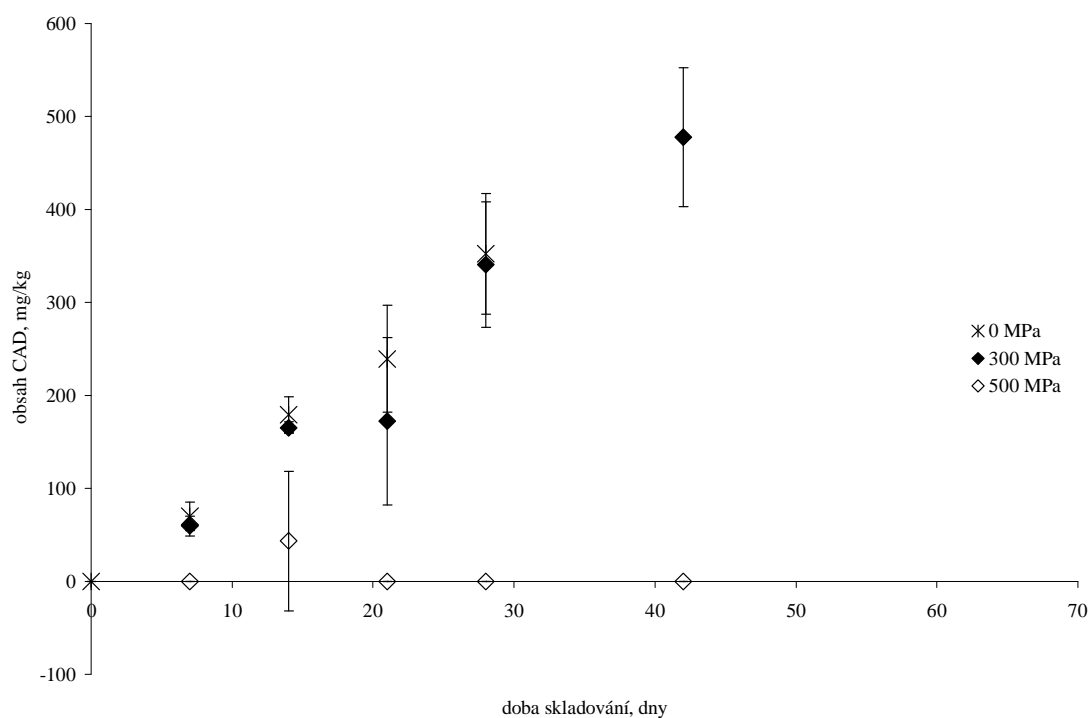
**Obr. 31** Obsah PUT ve vzorcích pstruha duhového, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 3,5 °C.



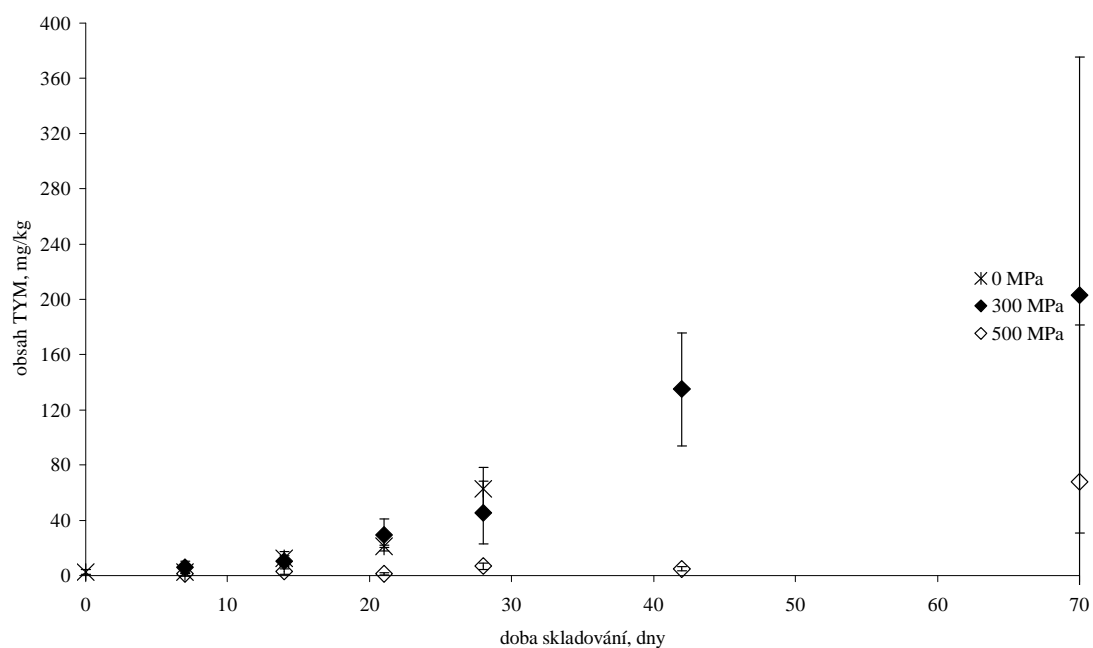
**Obr. 32** Obsah PUT ve vzorcích pstruha duhového, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 12 °C.



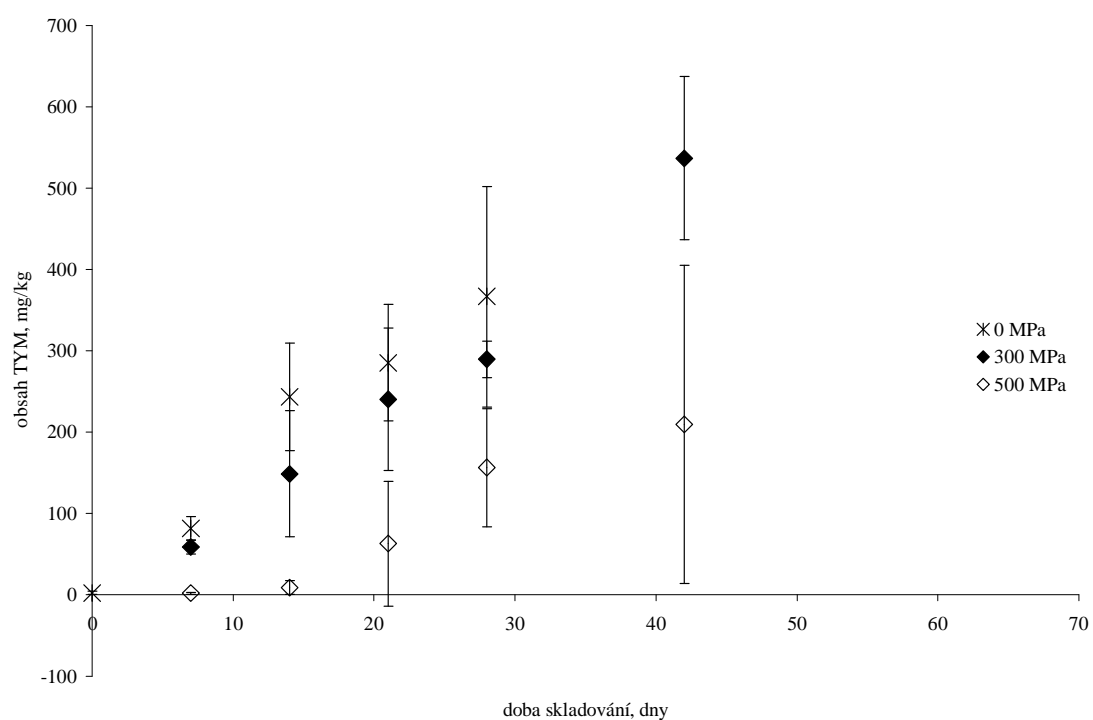
**Obr. 33** Obsah CAD ve vzorcích pstruha duhového, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 3,5 °C.



**Obr. 34** Obsah CAD ve vzorcích pstruha duhového, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 12 °C.



**Obr. 35** Obsah TYM ve vzorcích pstruha duhového, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 3,5 °C.



**Obr. 36** Obsah TYM ve vzorcích pstruha duhového, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 12 °C.

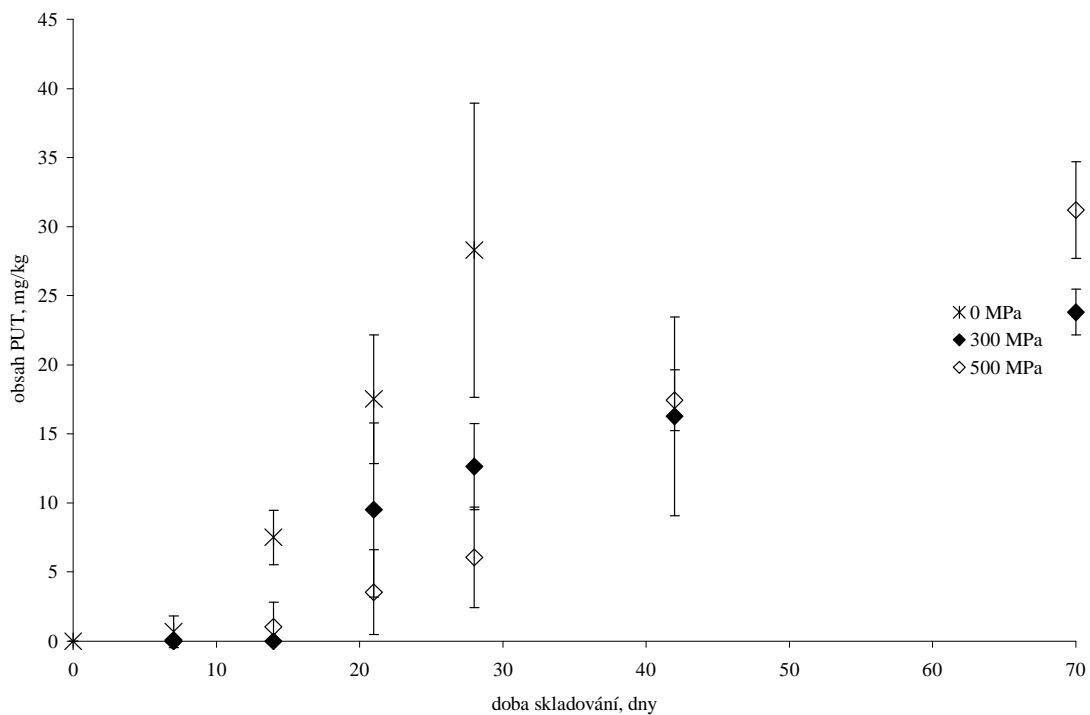
Posledním sladkovodním druhem ryby, který byl vybrán pro experiment s vysokým tlakem, byla štika obecná. Z důvodu možného srovnání veškerých získaných výsledků z předešlých experimentů, byly v pokusech se štikou obecnou, zachovány stejné podmínky a postupy, jak tomu bylo v případě kapra obecného a pstruha duhového. Vzorky byly odebírány k analýze ve stejných časových intervalech a byl použit vysoký tlak o velikosti 300 a 500 MPa, aplikovaný po dobu 10 minut.

Na následujících grafech je zobrazen nárůst obsahu PUT, CAD a TYM při nízké i vyšší teplotě skladování (3,5 °C, 12 °C). Opět tyto aminy byly vybrány jako ukazatelé kvality a rozkladu.

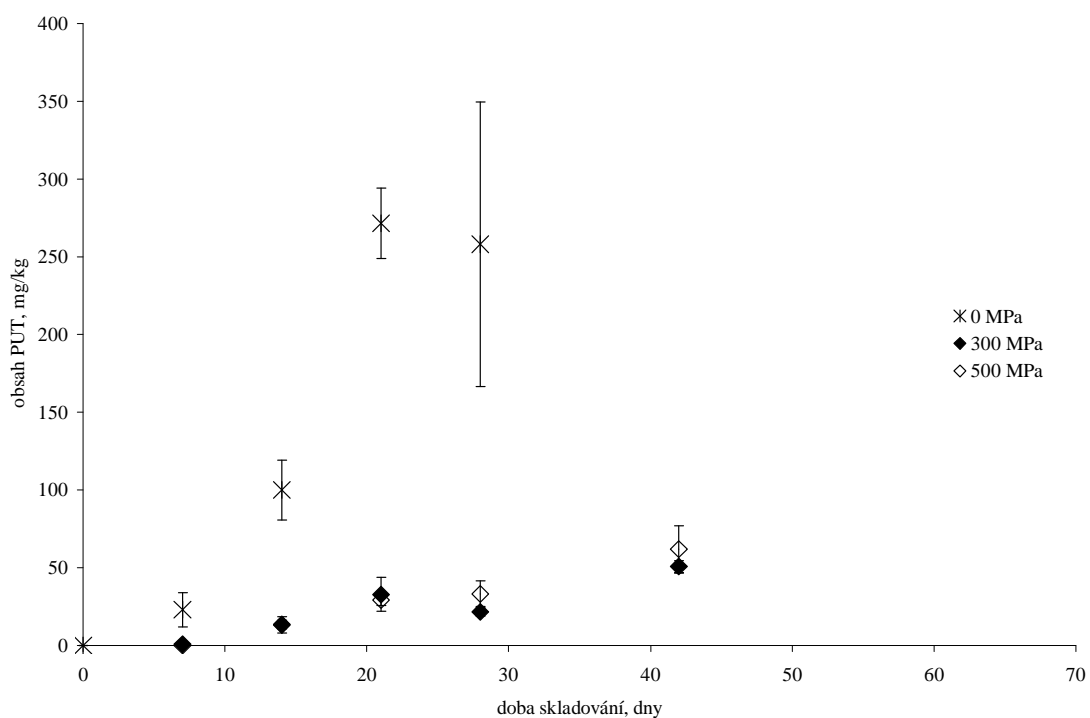
Nejprokazatelněji může být sledován vliv vysokého tlaku na délku skladovatelnosti u PUT. Obsah PUT překračuje kritickou hodnotu 20 mg.kg<sup>-1</sup> u vzorků neošetřených vysokým tlakem v 28. den skladování při 3,5 °C a již v 7. den skladování při 12 °C. V případě vzorků, které byly ošetřeny vysokým tlakem 300 a 500 MPa, byla kritická hodnota překročena při nižší teplotě až v 70. den skladování a při vyšší teplotě v 21. den skladování.

U dalšího sledovaného aminu CAD, lze říci, že vzorky neošetřené vysokým tlakem překročily hodnotu 20 mg.kg<sup>-1</sup> ve stejný den, jak tomu bylo v případě PUT. Kritická hodnota byla překročena 28. den skladování při 3,5 °C a 7. den při 12 °C. Překvapivé jsou výsledky vzorků, které byly ošetřeny vysokým tlakem 300 a 500 MPa, jak při nízké, tak i při vysoké teplotě. Podle výsledků z předchozích experimentů se očekávalo, že obsah CAD po ošetření vysokým tlakem 300 MPa bude vyšší než jeho obsah ve vzorcích ošetřených 500 MPa. V případě CAD u štiky obecné je tomuto předpokladu naopak. Hodnota 20 mg.kg<sup>-1</sup> byla při nízké teplotě a 300 MPa překročena 42. den skladování, při vyšší teplotě a 300 MPa byla překročena 14. den skladování. V případě vzorků, které byly ošetřeny 500 MPa byla kritická hodnota překročena v 21. den skladování při 3,5 °C a v 14. den skladování při 12 °C.

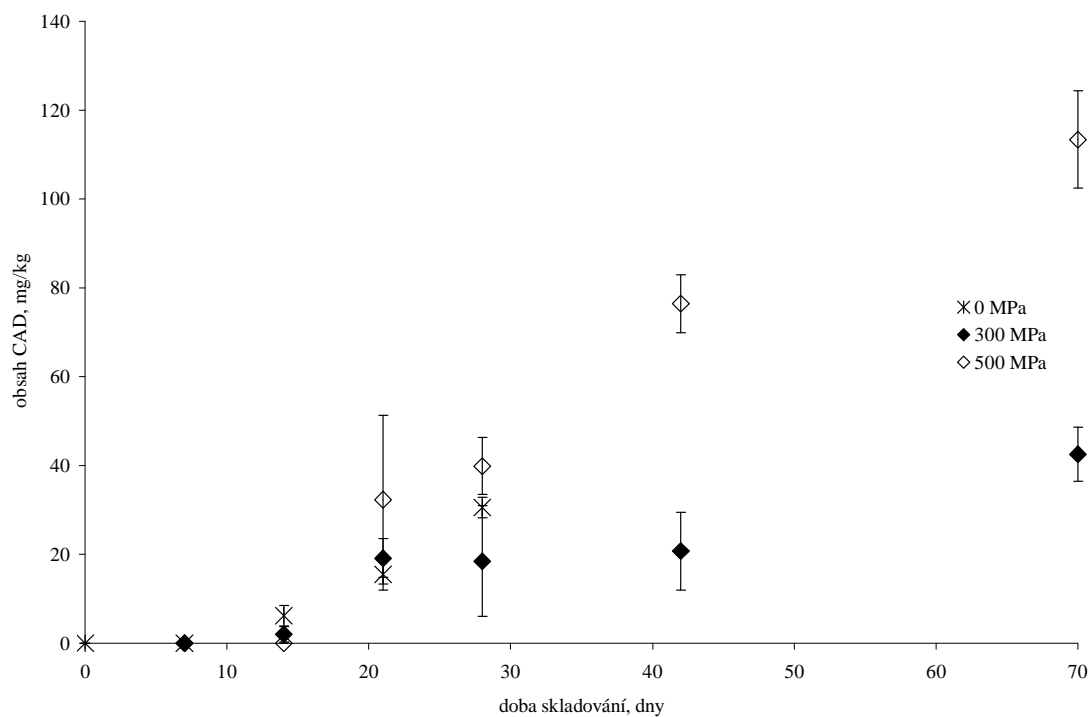
Biogenní amin TYM se jevil jako nejvýznamnější ukazatel kvality a rozkladu stejně tak, jak tomu bylo i v předešlých experimentech s dalšími druhy sladkovodních ryb. Dynamiku nárůstu obsahu TYM při nízké teplotě a vysoké teplotě můžeme sledovat na níže znázorněných grafech. V případě neošetřených vzorků byla hodnota 20 mg.kg<sup>-1</sup> překročena 21. den skladování při 3,5 °C a v 7. den skladování při 12 °C. Obsah TYM u vzorků ošetřených vysokým tlakem 300 MPa překročil kritickou hodnotu 21. den skladování při nižší teplotě a 14. den při vyšší teplotě. Po ošetření 500 MPa byla hodnota 20 mg.kg<sup>-1</sup> překročena 28. den skladování při 3,5 °C a 14. den skladování při 12 °C.



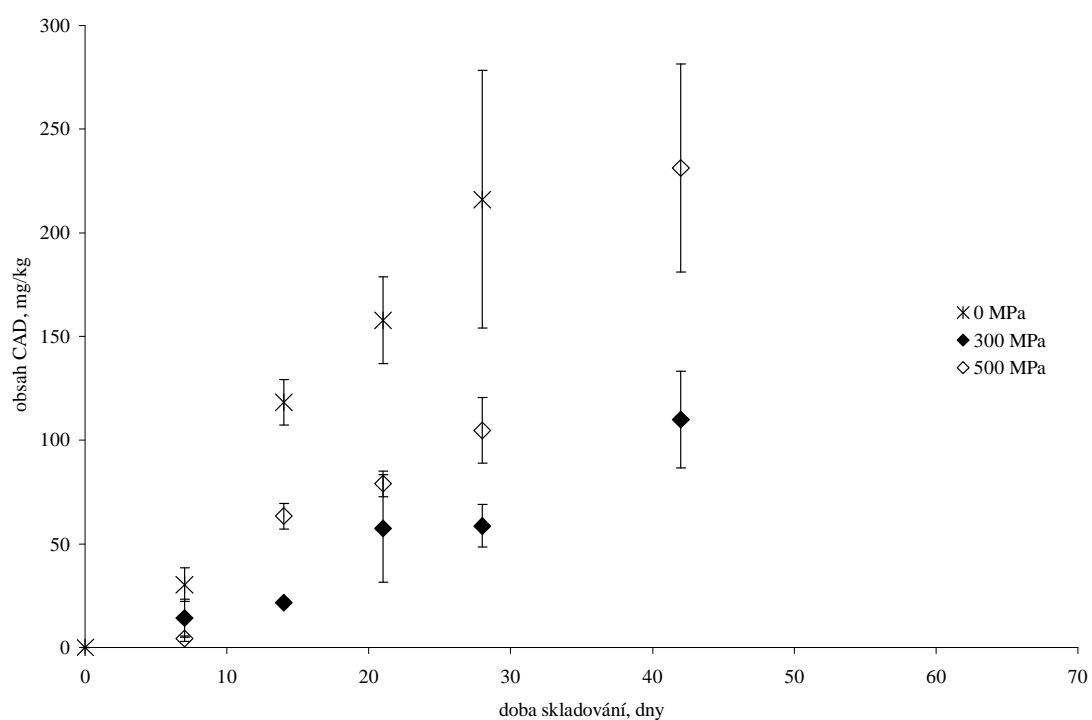
**Obr. 37** Obsah PUT ve vzorcích štiky obecné, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 3,5 °C.



**Obr. 38** Obsah PUT ve vzorcích štiky obecné, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 12 °C.

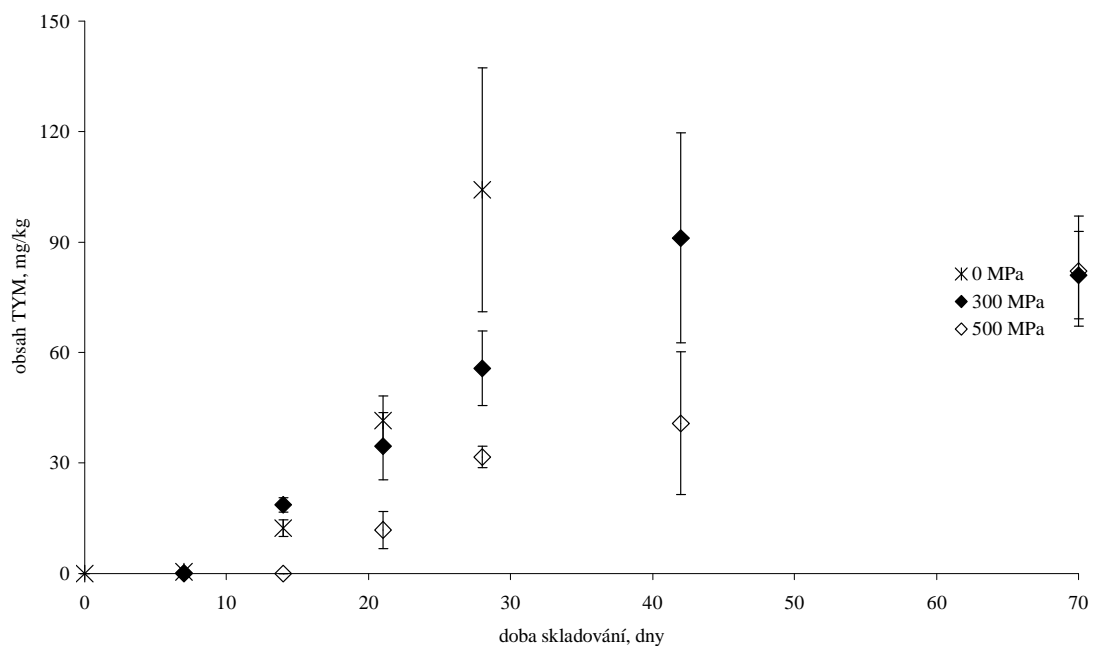


**Obr. 39** Obsah CAD ve vzorcích štiky obecné, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 3,5 °C.

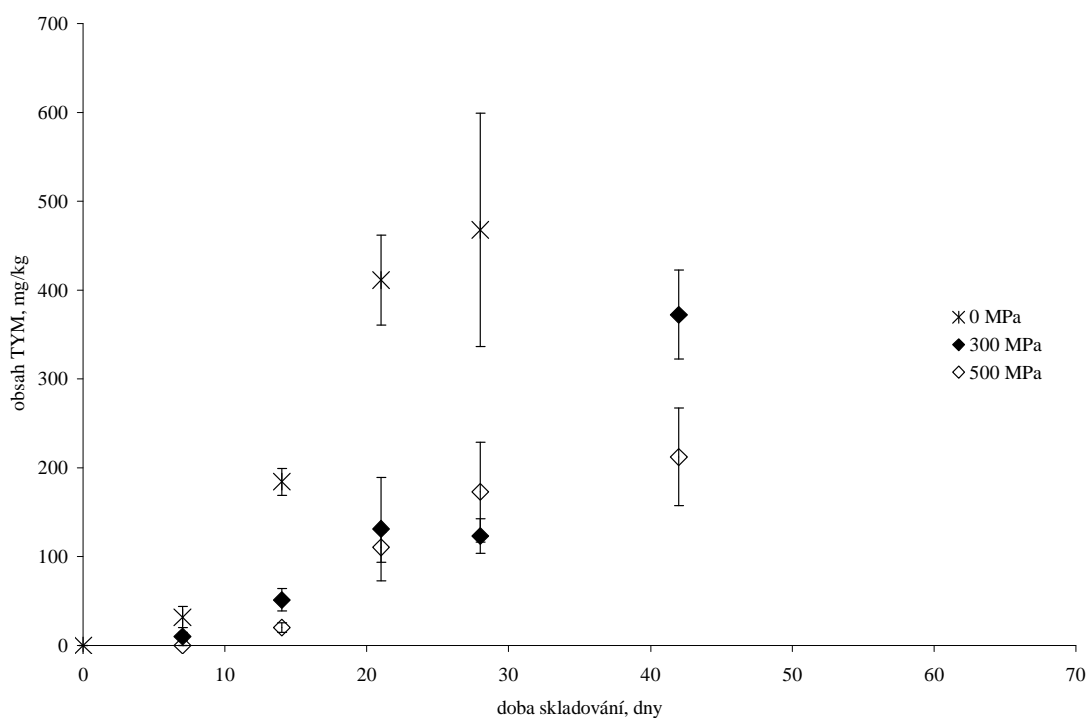


**Obr. 40** Obsah CAD ve vzorcích štiky obecné, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 12 °C.





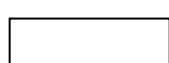
**Obr. 41** Obsah TYM ve vzorcích štiky obecné, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 3,5 °C.



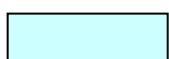
**Obr. 42** Obsah TYM ve vzorcích štiky obecné, které byly ošetřeny vysokým tlakem a skladovány při 12 °C.

### 5.2.1 Vliv vysokého tlaku na tvorbu biogenních aminů u vakuově baleného kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

Pro jednotlivé odběry vzorků kapra obecného byly vybrány tři paralelní vzorky k jejich zpracování a následné analýze. V následující tabulce (Tabulka 28) jsou zaznamenány hodnoty BA v čerstvém mase kapra obecného. Na rozdíl od PUT, SPD a SPM jsou obsahy všech aminů v kontrolních vzorcích pod mezí detekce. Výjimku tvoří pouze TYM, jehož obsah v čerstvém mase je  $4,02 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Vzorky byly skladovány při dvou rozdílných teplotách,  $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $12 \text{ }^\circ\text{C}$ . V tabulkách se stanovenými obsahy BA jsou tyto teploty barevně odlišeny z důvodu snadnější orientace ve výsledcích.



$T_1$  = hodnoty BA, které se nacházejí v bílém poli, byly stanoveny ve vzorcích kapra skladovaných při nižší teplotě, tj.  $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$



$T_2$  = hodnoty BA, které se nacházejí v modrém poli, byly stanoveny ve vzorcích kapra skladovaných při vyšší teplotě, tj.  $12 \text{ }^\circ\text{C}$

Tabulku s hodnotami BA v kontrolních vzorcích následuje tabulka (Tabulka 29) se souhrnem hodnocení kvality všech vzorků podle organoleptických vlastností, které vzorky vykazovaly během celého experimentu. Podle zaznamenaných hodnot lze říci, že vzorky, které nebyly vystaveny vlivu vysokého tlaku, vykazovaly první známky rozkladu po 21. dnu skladování při  $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$  a po 7. dnu skladování při  $12 \text{ }^\circ\text{C}$ . Při nízké teplotě ( $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) po použití vysokého tlaku 300 a 500 MPa byla skladovatelnost vzorků prodloužena ze 14. dne na 28. až 42. den. V případě vyšší teploty ( $12 \text{ }^\circ\text{C}$ ) byla skladovatelnost prodloužena ze 7. dne na 14. den při aplikaci tlaku 300 MPa, popřípadě na 21. den při aplikaci 500 MPa.

**Tabulka 28** Hodnoty BA kontrolních vzorků kapra obecného (0 MPa) v den založení experimentu (0. den skladování).

Obsah BA, $\text{mg.kg}^{-1}$ (0 MPa, 0. den skladování)							
TRM	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
ND	ND	$2.5 \pm 0.61$	ND	ND	$4.0 \pm 0.78$	$6.8 \pm 0.83$	$6.0 \pm 0.18$

BA, které se v experimentu s kapřím masem jeví jako nejvýznamnější ukazatelé kvality a rozkladu, jsou PUT, CAD a TYM, stejně jak tomu bylo i ve všech předchozích experimentech s rybím masem. Vliv vysokého tlaku na konzervaci kapřího masa je velmi dobře prokazatelný. Vzorky ošetřené vysokým tlakem vykazují menší obsahy PUT, CAD a TYM. Naopak u vzorků, které nebyly vystaveny vlivu vysokého tlaku, dynamicky narůstají obsahy těchto aminů během celé doby skladování vzorků.

**Tabulka 29** Organoleptické vlastnosti vzorků kapra: kontrolní vzorky a vzorky ošetřené různou úrovní vysokého tlaku.  $T_1 = 3,5\text{ °C}$ ,  $T_2 = 12\text{ °C}$ .

Organoleptické vlastnosti		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	1	1	2	3	–	–
300	$T_1$	1	1	1	1–2	2	2
500	$T_1$	1	1	1	1–2	1–2	2
0	$T_2$	2	3	3	3	–	–
300	$T_2$	1	2	3	3	3	–
500	$T_2$	1	1–2	2	2	2	–

PUT vykazoval hodnotu  $27,9\text{ mg.kg}^{-1}$  ve 14. den skladování vzorků při  $3,5\text{ °C}$ , které nebyly ošetřeny vysokým tlakem a  $51,5\text{ mg.kg}^{-1}$  v 7. den skladování při  $12\text{ °C}$ . U vzorků ošetřených tlakem 300 a 500 MPa a jejich následném skladování při  $3,5\text{ °C}$  nebyla v žádném případě překročena kritická hodnota  $20\text{ mg.kg}^{-1}$ . Při vyšší skladovací teplotě ( $12\text{ °C}$ ) a tlaku 300 MPa obsah PUT ve 14. den skladování byl  $29,2\text{ mg.kg}^{-1}$ . Při tlaku 500 MPa v 21. den skladování obsah PUT dosahoval hodnoty  $31,3\text{ mg.kg}^{-1}$ .

Obsah CAD dosahuje podobných hodnot ve srovnání s obsahem PUT zejména ve vzorcích, které nebyly vystaveny vlivu vysokého tlaku. V případě nízké teploty a použití tlaku 300 a 500 MPa byly obsahy CAD velmi nízké, v některých případech dokonce pod mezí detekce. Zcela naopak tomuto jevu bylo v případě vysoké teploty. Zde je zřetelná dynamika tvorby CAD zejména při tlaku 300 MPa.

**Tabulka 30** Obsah PUT ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ °C}$ ,  $T_2 = 12\text{ °C}$ .

PUT		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	$3.8 \pm 0.53$	$27.9 \pm 2.55$	$46.4 \pm 21.2$	$77.6 \pm 14.3$	–	–
300	$T_1$	$2.9 \pm 0.41$	$3.1 \pm 0.14$	$4.4 \pm 1.32$	$5.1 \pm 2.39$	$11.4 \pm 2.79$	$5.7 \pm 1.20$
500	$T_1$	$2.4 \pm 0.19$	$0.7 \pm 1.27$	$1.9 \pm 1.63$	$3.3 \pm 0.28$	$1.7 \pm 2.95$	ND
0	$T_2$	$51.5 \pm 13.7$	$181 \pm 35.3$	$169 \pm 45.2$	$258 \pm 19.8$	–	–
300	$T_2$	$10.0 \pm 4.42$	$29.2 \pm 6.25$	$46.2 \pm 18.1$	$78.2 \pm 20.0$	$104 \pm 27.8$	–
500	$T_2$	$3.1 \pm 0.21$	$8.4 \pm 4.29$	$31.3 \pm 25.9$	$55.3 \pm 44.2$	$13.0 \pm 3.02$	–

**Tabulka 31** Obsah CAD ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

CAD		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	$12.1 \pm 2.30$	$56.8 \pm 26.2$	$127 \pm 41.0$	$119 \pm 30.5$	–	–
300	$T_1$	ND	ND	$1.0 \pm 1.45$	$11.2 \pm 11.3$	$17.1 \pm 29.6$	ND
500	$T_1$	ND	ND	ND	ND	$3.6 \pm 6.17$	$21.8 \pm 18.9$
0	$T_2$	$149 \pm 53.1$	$229 \pm 34.6$	$293 \pm 55.6$	$261 \pm 139$	–	–
300	$T_2$	$50.1 \pm 9.67$	$99.9 \pm 65.5$	$147 \pm 59.2$	$111 \pm 86.7$	$151 \pm 109$	–
500	$T_2$	ND	$5.7 \pm 1.78$	$20.2 \pm 5.59$	$18.5 \pm 7.69$	$26.2 \pm 17.8$	–

Obsah TYM téměř lineárně narůstá v závislosti na době skladování, jak u vzorků ošetřených vysokým tlakem, tak u vzorků neošetřených vysokým tlakem. Dynamika tvorby TYM je výraznější u vzorků skladovaných při  $12\text{ }^\circ\text{C}$  než při  $3,5\text{ }^\circ\text{C}$ . V případě vzorků, které nebyly vystaveny vlivu vysokého tlaku, obsah TYM překročil hodnotu  $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ve 14. den skladování při  $3,5\text{ }^\circ\text{C}$  a v 7. den skladování při  $12\text{ }^\circ\text{C}$ . U vzorků ošetřených vysokým tlakem 300 MPa byla tato hodnota překročena při nízké teplotě v 28. den skladování a při vyšší teplotě ve 14. den skladování. Nejúčinnější úroveň vysokého tlaku byla 500 MPa. Při  $3,5\text{ }^\circ\text{C}$  byla kritická hodnota obsahu TYM překročena až 42. den skladování. Při  $12\text{ }^\circ\text{C}$  byla hodnota překročena 14. den skladování. Stejně tomu bylo při použití vysokého tlaku 300 MPa, ale dosažená hodnota obsahu TYM byla podstatně nižší v případě aplikace 500 MPa. Při 300 MPa, obsah TYM dosahoval  $84,1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a při 500 MPa, dosahoval  $35,7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

**Tabulka 32** Obsah TYM ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

TYM		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	$8.2 \pm 0.72$	$36.5 \pm 5.06$	$54.5 \pm 7.11$	$83.9 \pm 10.3$	–	–
300	$T_1$	$4.7 \pm 0.33$	$7.0 \pm 1.05$	$6.7 \pm 1.38$	$22.5 \pm 17.5$	$93.1 \pm 34.4$	$159 \pm 46.9$
500	$T_1$	$3.2 \pm 0.78$	$5.2 \pm 0.68$	$6.1 \pm 0.59$	$11.5 \pm 5.73$	$32.4 \pm 7.70$	$107 \pm 36.8$
0	$T_2$	$59.5 \pm 9.39$	$305 \pm 34.3$	$264 \pm 45.5$	$419 \pm 21.4$	–	–
300	$T_2$	$19.5 \pm 3.39$	$84.1 \pm 32.5$	$137 \pm 32.3$	$249 \pm 62.7$	$507 \pm 62.6$	–
500	$T_2$	$3.8 \pm 2.95$	$35.7 \pm 36.7$	$112 \pm 55.2$	$209 \pm 133$	$231 \pm 80.4$	–

SPD a SPM, jsou polyaminy, běžně přítomné ve všech živých buňkách. Z tohoto důvodu se ve všech vzorcích vyskytují v určitém množství bez ohledu na způsob konzervace během skladování kapřího masa. Statisticky významné hodnoty těchto polyaminů nebyly zaznamenány ani s postupem času ani se zvyšujícím se vysokým tlakem.

**Tabulka 33** Obsah SPD ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

SPD		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	$5.2 \pm 1.25$	$4.3 \pm 1.02$	$6.4 \pm 1.19$	$4.9 \pm 0.37$	–	–
300	$T_1$	$7.5 \pm 0.46$	$6.7 \pm 0.64$	$7.6 \pm 0.07$	$6.9 \pm 2.25$	$14.2 \pm 18.3$	$3.7 \pm 0.97$
500	$T_1$	$7.9 \pm 0.38$	$3.5 \pm 0.38$	$7.4 \pm 0.51$	$7.2 \pm 0.99$	$8.7 \pm 8.04$	$4.3 \pm 2.38$
0	$T_2$	$5.4 \pm 0.70$	$6.2 \pm 3.07$	$2.5 \pm 2.57$	$4.7 \pm 1.63$	–	–
300	$T_2$	$6.0 \pm 0.20$	$2.3 \pm 0.54$	$3.2 \pm 1.03$	$4.0 \pm 5.09$	$0.7 \pm 1.27$	–
500	$T_2$	$7.8 \pm 0.08$	$2.6 \pm 1.83$	$7.5 \pm 0.99$	$4.8 \pm 3.42$	$8.2 \pm 3.68$	–

**Tabulka 34** Obsah SPM ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

SPM		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	$6.0 \pm 0.74$	$5.9 \pm 1.31$	$5.6 \pm 1.38$	$4.8 \pm 0.98$	–	–
300	$T_1$	$7.3 \pm 0.59$	$8.3 \pm 1.07$	$9.3 \pm 1.53$	$8.7 \pm 2.19$	$5.2 \pm 1.62$	$5.2 \pm 3.28$
500	$T_1$	$6.9 \pm 0.32$	$8.3 \pm 0.88$	$13.9 \pm 0.83$	$14.0 \pm 2.12$	$13.1 \pm 6.66$	$6.1 \pm 2.98$
0	$T_2$	$6.0 \pm 0.63$	$2.5 \pm 0.80$	$0.7 \pm 1.25$	$2.1 \pm 1.85$	–	–
300	$T_2$	$6.3 \pm 0.48$	$3.8 \pm 1.50$	$4.2 \pm 1.63$	$1.8 \pm 1.52$	$0.7 \pm 1.25$	–
500	$T_2$	$7.6 \pm 2.50$	$5.9 \pm 3.39$	$9.7 \pm 4.88$	$6.5 \pm 1.04$	$4.2 \pm 3.69$	–

Mezi BA, které prokazatelně nejsou dobrými ukazateli kvality, patří HIM, TRM a PEA. Při skladovací teplotě  $3,5\text{ }^\circ\text{C}$  obsahy těchto aminů jsou velmi nízké nebo dokonce jsou pod mezí detekce u většiny vzorků. Jedinou výjimku tvoří PEA, jehož obsah při  $3,5\text{ }^\circ\text{C}$  v 70. den skladování dosahuje hodnoty  $28\text{ mg.kg}^{-1}$ .

V případě vyšší teploty ( $12\text{ }^\circ\text{C}$ ), obsah HIM vykazuje dynamický nárůst u vzorků ošetřených tlakem 300 MPa a dále zejména u vzorků, které nebyly vlivu vysokého tlaku vystaveny. Obsah TRM překračuje kritickou hodnotu  $20\text{ mg.kg}^{-1}$  ve 14. den skladování u vzorků neošetřených vysokým tlakem a ve 28. den u vzorků ošetřených 500 MPa. Při použití tlaku 300 MPa byly obsahy TRM velmi nízké nebo pod mezí detekce. Obsahy PEA při vyšší skladovací teplotě, jak u vzorků neošetřených tlakem, tak u vzorků vystavených vlivu 300 a 500 MPa, jsou velmi nízké nebo blízké hodnotě  $20\text{ mg.kg}^{-1}$  po celou dobu skladování.

**Tabulka 35** Obsah HIM ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

HIM		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	ND	ND	ND	ND	–	–
300	$T_1$	ND	ND	ND	$1.3 \pm 2.16$	$7.0 \pm 12.2$	ND
500	$T_1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	$T_2$	$8.5 \pm 7.93$	$175 \pm 162$	$94.0 \pm 94.7$	$315 \pm 60.3$	–	–
300	$T_2$	$13.0 \pm 13.7$	$117 \pm 52.1$	$345 \pm 121$	$79.4 \pm 85.2$	$189 \pm 233$	–
500	$T_2$	ND	ND	ND	ND	ND	–

**Tabulka 36** Obsah TRM ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

TRM		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	ND	ND	ND	ND	–	–
300	$T_1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
500	$T_1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	$T_2$	ND	$22.4 \pm 25.4$	$92.9 \pm 25.1$	$49.2 \pm 85.3$	–	–
300	$T_2$	ND	ND	$8.3 \pm 11.3$	ND	ND	–
500	$T_2$	ND	$8.0 \pm 13.8$	$4.6 \pm 8.03$	$22.2 \pm 15.8$	ND	–

**Tabulka 37** Obsah PEA ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase kapra (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

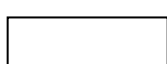
PEA		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	ND	ND	$3.7 \pm 1.59$	$7.5 \pm 1.84$	–	–
300	$T_1$	ND	ND	ND	$0.8 \pm 1.38$	$13.1 \pm 13.3$	$28.0 \pm 35.0$
500	$T_1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	$T_2$	$2.7 \pm 0.62$	$16.1 \pm 1.65$	$13.9 \pm 2.00$	$24.6 \pm 4.84$	–	–
300	$T_2$	ND	$1.3 \pm 2.23$	$4.0 \pm 6.85$	$15.6 \pm 5.51$	$20.0 \pm 9.79$	–
500	$T_2$	ND	$23.6 \pm 40.8$	$23.1 \pm 40.0$	$20.1 \pm 30.8$	$5.7 \pm 9.80$	–

Vysoký hydrostatický tlak výrazně snižuje obsah BA ve vakuově baleném mase kapra. Toxikologicky významný amin HIM nebyl detekován u většiny vzorků, které byly skladovány při  $3,5\text{ }^\circ\text{C}$ . Obsah TYM nepřesahoval hodnotu  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ve vzorcích s dobrými sensorickými vlastnostmi. Výjimku TYM tvoří 14. den skladování při  $3,5\text{ }^\circ\text{C}$  u vzorků neošetřených vysokým tlakem, kde je jeho obsah  $36,5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  i přes dobré hodnocení organoleptických vlastností. Obsah CAD u vzorků dobré kvality nebyl detekován a obsah PUT nepřesahoval  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Aplikace vysokého tlaku (300 a 500 MPa) je méně účinná konzervační technika s následným skladováním vzorků při vyšší teplotě (12 °C). Obsahy PUT, CAD a TYM rychle narůstají při skladovací teplotě 12 °C. Při porovnání tlaků 300 a 500 MPa lze konstatovat, že tlak 300 MPa do určité míry snižuje nárůst těchto aminů, ale není dostačující pro prodloužení užitečnosti masa kapra o dobu delší než 1 týden. Vysoký tlak 500 MPa prodlužuje dobu skladování o 2–3 týdny.

### 5.2.2 Vliv vysokého tlaku na tvorbu biogenních aminů u vakuově baleného pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*)

Vzorky pstruha byly analyzovány po trojicích. Obsahy BA v čerstvém masa pstruha (0 den) jsou zaznamenány níže (viz. Tabulka 38). Vzorky byly skladovány při nízké teplotě 3,5 °C a vyšší teplotě 12 °C v termostatu. Rozdílné teploty u masa pstruha jsou v tabulkách se zjištěnými obsahy BA barevně odlišeny pro lepší přehlednost výsledků.



$T_1$  = hodnoty BA, které se nacházejí v bílém poli, byly stanoveny ve vzorcích pstruha skladovaných při nižší teplotě, tj. 3,5 °C



$T_2$  = hodnoty BA, které se nacházejí v poli pleťové barvy, byly stanoveny ve vzorcích pstruha skladovaných při vyšší teplotě, tj. 12 °C

PUT, CAD a TYM jsou dominantními aminy v masa pstruha, dosahují nízkých hodnot jejich obsahů u vzorků ošetřených vysokým tlakem, skladovaných při nižší teplotě. U většiny vzorků byl patrný stálý nárůst obsahu PUT, CAD a TYM při skladování bez ohledu na skladovací teplotu, přičemž podstatou pro zjištěné rozdíly v rozsahu formace aminů byl použitý tlak.

Vakuově balené kontrolní vzorky pstruha byly stabilní po dobu 7–14 dnů při teplotě 3,5 °C. Tyto vzorky vykazovaly první známky rozkladu k 21. dnu skladování dle organoleptických vlastností. Při dalších odběrech zvýšený obsah PUT a zhoršené senzoričké vlastnosti vzorků vykazovaly obdobný trend. Kontrolní vzorky nebyly analyzovány po 28. dnu skladování z důvodu velmi špatných senzoričkých vlastností.

**Tabulka 38** Hodnoty BA kontrolních vzorků pstruha duhového (0 MPa) v den založení experimentu (0. den skladování).

Obsah BA, mg.kg <sup>-1</sup> (0 MPa, 0. den skladování)							
TRM	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
ND	ND	5.2 ± 0.56	ND	ND	2.5 ± 1.77	3.0 ± 0.70	4.3 ± 1.91

Vliv tlaku na stabilitu vzorků je podstatný, především je důležitá velikost použitých tlaků. Vzorky ošetřené tlakem 300 MPa nevykazovaly známky kažení do 28. dne skladování. Organoleptické známky kažení byly pozorovány od 42. dne (hodnocení 2). Avšak obsah PUT k 28. dnu byl  $16 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Tento obsah PUT odhalil začínající vznik rozkladu. Rovněž ve 28. dnu skladování byl odhalen obsah CAD přesahující  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Vzorky ošetřené 300 MPa byly označeny jako sensoricky nevhodné při 70. dnu skladování (hodnocení 3). Z tohoto důvodu experiment nepokračoval déle než 70 dnů. Zvýšení obsahu PUT a CAD nad  $10\text{--}20 \text{ mg.kg}^{-1}$  předcházely organoleptické vlastnosti v kontrolních vzorcích a vzorcích ošetřených 300 MPa. První známky rozkladu vzorků udržovaných při  $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$  a ošetřených tlakem 500 MPa byly patrné při 42. dnu skladování (hodnocení 2). V této době, oproti očekávání, obsah PUT nepřekročil hodnotu  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  a CAD stále nebyl detekován.

Při  $12 \text{ }^\circ\text{C}$  docházelo k rychlejšímu rozkladným procesům, které vedly k vyšším hodnotám obsahu PUT a CAD v kratším časovém úseku. Kontrolní vzorky, které nebyly ošetřeny vysokým tlakem, vykazovaly pokles v kvalitě od počátku skladování. Nepříznivé organoleptické vlastnosti se ukázaly v prvním časovém profilu (hodnocení 3). V tuto dobu jsou obsahy PUT a CAD srovnatelné s hodnotami jejich obsahů v 28. dnu skladování při  $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Srovnatelné úrovně obsahů PUT a CAD kontrolních vzorků udržovaných při vyšší teplotě se dosáhlo čtyřikrát rychleji než u vzorků skladovaných při  $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tlak 300 MPa se nezdá být dostatečně účinný při teplotě  $12 \text{ }^\circ\text{C}$ . S výjimkou prvního časového profilu (7 dnů), obsah PUT je vyšší než  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Od 14. dne skladování je zaznamenané sensorické hodnocení 3 ve všech časových profilech. Tento stav byl podobně signalizován u obsahu PUT a CAD, jejich konečné hodnoty dosahují stovek  $\text{mg.kg}^{-1}$ . Při vyšších skladovacích teplotách se mohou mikroorganismy snadno rozmnožovat a to může mít za následek více progresivní rozklad. Výsledky při tlaku 500 MPa ( $12 \text{ }^\circ\text{C}$ ) byly poměrně překvapivé. Hodnoty PUT neprokázaly žádný zřetelný nárůst navzdory tomu, že sensorické vlastnosti se postupně zhoršovaly z hodnoty 1 (7. den) do hodnoty 3 (21. den). Obdobně nebyl zjištěn nárůst CAD s výjimkou 14. dne. Nárůsty obsahu BA plně neodpovídají zaznamenaným trendům u vzorků skladovaných při  $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , ale jak již bylo uvedeno výše, u některých vzorků takového chování bylo zaznamenáno i při nižší teplotě. Důvod slabé korelace mezi obsahem PUT a CAD ve vzorcích s jejich sensorickými vlastnostmi není objasněn. Pravděpodobně procesy, které vedou ke zhoršení sensorických parametrů, nemusejí být založeny pouze na dekarboxylačních vlastnostech bakteriálního kažení.



**Tabulka 39** Organoleptické vlastnosti vzorků pstruha: kontrolní vzorky a vzorky ošetřené různou úrovní vysokého tlaku.  $T_1 = 3,5\text{ °C}$ ,  $T_2 = 12\text{ °C}$ .

Organoleptické vlastnosti		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	1	1	2	2–3	–	–
300	$T_1$	1	1	1	1	2	3
500	$T_1$	1	1	1	1	2	3
0	$T_2$	3	3	3	3	–	–
300	$T_2$	2	3	3	3	3	–
500	$T_2$	1	2	3	3	3	–

Nejstrmější nárůst PUT a CAD byl nalezen zejména v kontrolních vzorcích. Obsah PUT a CAD vykazuje minimální nárůst ve vzorcích ošetřených tlakem 500 MPa, bez ohledu na teplotu skladování. Vliv vysokého tlaku a zvolené teploty skladování jsou evidentní k dynamice vzniku PUT a CAD. PUT byl nalezen ve všech vzorcích narozdíl od CAD, což není překvapující, protože PUT je amin přítomný ve všech živých buňkách. Nepřítomnost CAD, zejména ve vzorcích ošetřených tlakem zpočátku skladování, je způsobena tím, že v tkáních je CAD přítomen v mnohem nižším množství ve srovnání s jinými polyaminy. CAD je uvolněn z lysinu působením bakteriálních dekarboxyláz. Z tohoto důvodu nebyl detekován v čerstvém mase pstruha dobré kvality. V mase kapra obecného (*Cyprinus carpio*) byl obsah PUT nižší než  $10\text{ mg.kg}^{-1}$  typický pro kvalitní vzorky, obsah PUT mezi  $10\text{--}20\text{ mg.kg}^{-1}$  souvisel s nástupem kažení a hodnoty PUT vyšší než  $20\text{ mg.kg}^{-1}$  byly většinou nalezeny ve vzorcích s nízkou kvalitou dle Křížek et al., 2002.<sup>104</sup>

Navzdory tomu, že TYM není polyaminem, dynamika jeho tvorby může být poněkud obdobná jako u PUT a CAD. Tvorbě TYM ve vzorcích velmi dobře odpovídaly sledované organoleptické vlastnosti. U kvalitních vzorků by měl být obsah TYM nižší než  $10\text{ mg.kg}^{-1}$ . Tato podmínka je v souladu s aktuálními výsledky. V kontrolních vzorcích, skladovaných při  $3,5\text{ °C}$ , byl tento limit překročen po 14. dnu (hodnocení 1). Kontinuální zvýšení TYM můžeme sledovat u vzorků ošetřených vysokým tlakem 300 MPa a udržovaných při  $3,5\text{ °C}$ , a to navzdory skutečnosti, že sensorické vlastnosti vykazují hodnotu 1 až do 28. dne. Obsah TYM se stále a pravidelně zvyšuje s dobou skladování a jeho zvýšenému obsahu často předchází organoleptické náznaky rozkladu. Podobně jako PUT a CAD, tak i TYM se vyskytuje v malém množství u vzorků ošetřených vysokým tlakem 500 MPa (až do  $10\text{ mg.kg}^{-1}$ ) do 70. dne skladování s výjimkou některých specifických vzorků. Celkové sensorické vlastnosti vzorků skladovaných při  $12\text{ °C}$  odpovídaly obsahu TYM. Jeho

koncentrace byla v desetinách a stovkách  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Je zajímavé, že na rozdíl od PUT a CAD obsah TYM koreluje lépe s rychlým zhoršením rozkladných procesů u těchto vzorků.

**Tabulka 40** Obsah PUT ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase pstruha (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

PUT		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	$5.7 \pm 0.74$	$14.6 \pm 2.68$	$24.6 \pm 8.90$	$34.9 \pm 9.10$	–	–
300	$T_1$	$4.7 \pm 1.34$	$4.2 \pm 1.00$	$8.4 \pm 2.11$	$16.0 \pm 2.76$	$53.3 \pm 13.4$	$47.0 \pm 37.7$
500	$T_1$	$4.1 \pm 0.28$	$4.4 \pm 0.36$	$8.7 \pm 1.22$	$6.5 \pm 0.07$	$7.4 \pm 0.50$	$29.8 \pm 25.5$
0	$T_2$	$32.4 \pm 6.79$	$88.5 \pm 22.2$	$97.4 \pm 9.95$	$225 \pm 73.1$	–	–
300	$T_2$	$17.3 \pm 2.58$	$34.7 \pm 12.5$	$52.2 \pm 13.6$	$113 \pm 22.6$	$177 \pm 21.5$	–
500	$T_2$	$5.4 \pm 0.64$	$14.1 \pm 9.79$	$15.0 \pm 13.9$	$10.6 \pm 1.51$	$12.9 \pm 3.69$	–

**Tabulka 41** Obsah CAD ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase pstruha (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

CAD		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	$8.8 \pm 4.78$	$33.7 \pm 4.03$	$79.4 \pm 61.5$	$67.7 \pm 10.0$	–	–
300	$T_1$	ND	ND	$3.7 \pm 0.42$	$11.0 \pm 10.3$	$84.0 \pm 61.3$	$71.8 \pm 64.6$
500	$T_1$	ND	ND	ND	ND	ND	$114 \pm 103$
0	$T_2$	$69.9 \pm 15.6$	$179 \pm 19.4$	$239 \pm 57.6$	$352 \pm 65.3$	–	–
300	$T_2$	$59.3 \pm 10.4$	$165 \pm 6.26$	$172 \pm 90.2$	$341 \pm 67.4$	$478 \pm 74.5$	–
500	$T_2$	ND	$43.3 \pm 75.1$	ND	ND	ND	–

**Tabulka 42** Obsah TYM ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase pstruha (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

TYM		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	$2.4 \pm 2.83$	$12.4 \pm 5.04$	$21.2 \pm 0.96$	$62.9 \pm 15.3$	–	–
300	$T_1$	$6.3 \pm 4.00$	$10.4 \pm 3.80$	$29.6 \pm 11.6$	$45.7 \pm 22.6$	$137 \pm 41.1$	$203 \pm 172$
500	$T_1$	$1.5 \pm 0.32$	$3.0 \pm 2.00$	$1.5 \pm 0.86$	$6.7 \pm 2.41$	$4.9 \pm 1.44$	$67.8 \pm 113$
0	$T_2$	$81.8 \pm 14.7$	$243 \pm 66.2$	$286 \pm 71.6$	$367 \pm 135$	–	–
300	$T_2$	$58.8 \pm 8.84$	$149 \pm 77.7$	$240 \pm 87.5$	$290 \pm 22.6$	$537 \pm 100$	–
500	$T_2$	$2.0 \pm 1.21$	$9.0 \pm 8.65$	$63.1 \pm 76.8$	$156 \pm 72.6$	$210 \pm 196$	–

Polyaminy SPD a SPM se nacházely ve většině vzorků, i když obvykle ve velmi nízkých koncentracích. Statisticky významné výkyvy obsahu SPD a SPM nebyly zaznamenány ani s postupem času ani se zvyšujícím se tlakem. Pokles obsahu SPD a SPM ve spojení s rozkladem rybího masa byl popsán dříve.<sup>28</sup> Ve studiích, o ošetření masa pstruha vysokým tlakem, tento trend nebyl sledován. Nebyl prokázán statisticky významný pokles SPD a SPM. Nízké obsahy těchto aminů se objevily i v kontrolních vzorcích, které ztrácely svou kvalitu

nejrychleji. Na druhé straně, v kontrolních vzorcích a vzorcích ošetřených 300 MPa, které byly udržovány při 12 °C (vzorky nižší kvality), hladiny SPD a SPM byly nižší, a někdy nebyly jejich obsahy vůbec zjištěny oproti vzorkům, které byly skladovány při 3,5 °C. V každém případě, při srovnání dochází ke snížení obsahu polyaminů při 12 °C, které při 3,5 °C nebylo sledováno. Podobně jako u jiných autorů<sup>105, 106</sup> zdá se, že tyto polyaminy nejsou vhodné pro hodnocení degradačních procesů kvůli jejich nízkému obsahu a drobným změnám v průběhu procesu skladování.

**Tabulka 43** Obsah SPD (mg.kg<sup>-1</sup>) v mase pstruha (průměr ± SD, n = 3). T<sub>1</sub> = 3,5 °C, T<sub>2</sub> = 12 °C.

SPD		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	T <sub>1</sub>	2.4 ± 0.14	2.3 ± 0.48	2.1 ± 2.00	2.2 ± 2.00	–	–
300	T <sub>1</sub>	2.4 ± 0.26	2.7 ± 0.60	5.1 ± 1.97	3.1 ± 0.74	3.3 ± 1.34	2.3 ± 0.41
500	T <sub>1</sub>	1.9 ± 0.29	2.6 ± 0.63	5.7 ± 2.07	4.9 ± 1.22	4.0 ± 2.34	2.4 ± 0.66
0	T <sub>2</sub>	1.1 ± 0.70	ND	0.5 ± 0.90	ND	–	–
300	T <sub>2</sub>	1.9 ± 0.28	ND	1.2 ± 1.05	ND	1.8 ± 3.17	–
500	T <sub>2</sub>	2.2 ± 0.34	2.4 ± 0.29	1.6 ± 0.43	2.2 ± 3.88	2.0 ± 3.45	–

**Tabulka 44** Obsah SPM (mg.kg<sup>-1</sup>) v mase pstruha (průměr ± SD, n = 3). T<sub>1</sub> = 3,5 °C, T<sub>2</sub> = 12 °C.

SPM		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	T <sub>1</sub>	3.3 ± 0.46	3.3 ± 0.54	2.3 ± 0.50	2.3 ± 1.97	–	–
300	T <sub>1</sub>	6.8 ± 1.41	9.7 ± 2.27	7.0 ± 1.67	9.6 ± 2.07	8.4 ± 4.21	2.4 ± 2.48
500	T <sub>1</sub>	3.8 ± 0.97	4.6 ± 1.22	6.7 ± 1.35	13.6 ± 1.55	12.7 ± 2.94	2.1 ± 0.90
0	T <sub>2</sub>	1.8 ± 0.39	ND	ND	4.5 ± 7.8	–	–
300	T <sub>2</sub>	2.3 ± 0.47	ND	4.0 ± 1.17	ND	ND	–
500	T <sub>2</sub>	4.2 ± 0.64	3.8 ± 0.33	2.2 ± 0.81	3.1 ± 5.4	4.4 ± 7.64	–

HIM, TRM a PEA nebyly v mase pstruha detekovány při 3,5 °C s výjimkou tří kontrolních vzorků a jedním vzorkem se sensorickým hodnocením 3 (500 MPa). Celkové organoleptické hodnocení vzorků uchovávaných při 3,5 °C bylo obecně lepší ve srovnání se vzorky skladovanými při vyšší teplotě 12 °C. Tento aspekt by mohl být důvodem pro nepřítomnost těchto, jinak typických BA pro rozklad. Vzorky, které byly skladovány při 12 °C, vykazovaly špatné sensorické vlastnosti o hodnotě 3 již na začátku skladování. Obsah HIM v těchto vzorcích překročil 100 mg.kg<sup>-1</sup>. Obě úrovně tlaku 300 a 500 MPa měly významný dopad na potlačení tvorby HIM při této teplotě. Nicméně HIM se nejeví, jako nejvhodnější biogenní amin signalizující začátek rozkladných procesů. V každém případě, toxikologicky významná

koncentrace HIM (méně než  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) byla dosažena pouze ve vzorcích nižší kvality. Tudiž tento amin v mase pstruha nepředstavuje obdobné riziko pro spotřebitele jako je tomu v případě makrelovitých ryb. Podobná situace byla pozorována u TRM a PEA. Byly nalezeny pouze ve vzorcích udržovaných při  $12 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vzorky, ošetřené tlakem vykazují nižší obsah TRM a PEA. S dvěma výjimkami byly tyto aminy nalezeny pouze ve vzorcích se senzoričnými hodnotami 3.

**Tabulka 45** Obsah HIM ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase pstruha (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12 \text{ }^\circ\text{C}$ .

HIM		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	ND	$1.1 \pm 1.95$	$2.4 \pm 4.07$	$17.5 \pm 6.86$	–	–
300	$T_1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
500	$T_1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	$T_2$	$133 \pm 95.0$	$212 \pm 51.9$	$150 \pm 79.1$	$113 \pm 48.8$	–	–
300	$T_2$	$2.0 \pm 3.49$	$7.0 \pm 6.78$	$0.9 \pm 1.60$	$2.4 \pm 4.21$	$5.1 \pm 5.34$	–
500	$T_2$	ND	ND	$36.7 \pm 34.2$	$2.5 \pm 4.25$	$13.9 \pm 24.2$	–

**Tabulka 46** Obsah TRM ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase pstruha (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12 \text{ }^\circ\text{C}$ .

TRM		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	ND	ND	ND	ND	–	–
300	$T_1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
500	$T_1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	$T_2$	ND	$22.3 \pm 11.7$	$18.4 \pm 18.2$	$35.7 \pm 27.9$	–	–
300	$T_2$	ND	$7.1 \pm 12.3$	$2.0 \pm 3.42$	$3.6 \pm 6.28$	$4.2 \pm 3.66$	–
500	$T_2$	ND	$2.0 \pm 3.53$	ND	$13.4 \pm 23.1$	ND	–

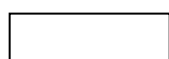
**Tabulka 47** Obsah PEA ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) v mase pstruha (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12 \text{ }^\circ\text{C}$ .

PEA		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	ND	ND	ND	ND	–	–
300	$T_1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
500	$T_1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	$T_2$	ND	$4.2 \pm 5.88$	$12.2 \pm 6.97$	$21.5 \pm 8.10$	–	–
300	$T_2$	ND	$1.5 \pm 2.52$	$9.2 \pm 4.87$	$20.0 \pm 16.0$	$28.1 \pm 21.5$	–
500	$T_2$	$1.4 \pm 2.43$	$2.5 \pm 4.31$	ND	$18.1 \pm 31.4$	$5.9 \pm 10.2$	–

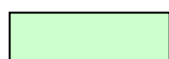
Obsah BA ve vakuově baleném mase pstruha lze výrazně snížit použitím vysokého hydrostatického tlaku. Koncentrace většiny toxikologicky významných aminů HIM a TYM nepřekročila obsah 2–13 mg.kg<sup>-1</sup> u vzorků s dobrými organoleptickými vlastnostmi. PUT a CAD nepřekročily obsah 10–35 mg.kg<sup>-1</sup> u kvalitních vzorků. Doporučená skladovací doba pro vakuově balené maso pstruha, doporučená výrobcí je 5–6 dnů při teplotě 3,5 °C. Aplikace vysokého hydrostatického tlaku může výrazně prodloužit dobu skladování přibližně čtyřikrát, na 21 až 28 dnů. Ošetření vzorků vysokým hydrostatickým tlakem bylo mnohem méně účinné při skladovací teplotě 12 °C. Obsah PUT, CAD a TYM se rychleji zvyšuje při teplotě skladování 12 °C. Při použití hydrostatického tlaku 300 MPa tyto BA nejlépe korelovaly s jejich organoleptickými vlastnostmi. Při ošetření vzorků tlakem 500 MPa (skladovací teplota 12 °C) obsah PUT a CAD přesně neodpovídal sensorickým hodnotám. V těchto vzorcích byl pouze TYM jediný amin, který nejlépe koreloval s organoleptickými výsledky. Vysoký tlak, jako konzervační technika pro rybí maso neposkytuje dostatečnou míru ochrany pro vzorky, které jsou skladovány při teplotě 12 °C.

### 5.2.3 Vliv vysokého tlaku na tvorbu biogenních aminů u vakuově balené štiky obecné (*Exos lucius*)

Vzorky štiky obecné byly analyzovány v triplikátech. Počáteční obsahy BA v čerstvém mase štiky (0. den skladování) jsou zaznamenány v níže uvedené tabulce (viz. Tabulka 48). Střední hodnoty obsahů aminů u kontrolních a tlakem ošetřených vzorků pro obě teploty jsou uvedeny v následujících tabulkách. Velikost použitého tlaku, teploty a délka doby skladování měly rozhodující vliv na stav vzorků. Opět pro snadnější přehlednost i v případě štiky obecné jsou obě použité skladovací teploty odlišeny barevně.



T<sub>1</sub> = hodnoty BA, které se nacházejí v bílém poli, byly stanoveny ve vzorcích štiky skladovaných při nižší teplotě, tj. 3,5 °C



T<sub>2</sub> = hodnoty BA, které se nacházejí v zeleném poli, byly stanoveny ve vzorcích štiky skladovaných při vyšší teplotě, tj. 12 °C

**Tabulka 48** Hodnoty BA kontrolních vzorků štiky obecné (0 MPa) v den založení experimentu (0. den skladování).

Obsah BA, mg.kg <sup>-1</sup> (0 MPa, 0. den skladování)							
TRM	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.9 ± 0.87	1.2 ± 0.16

První organoleptické známky poškození kontrolních vzorků při 3,5 °C byly zaznamenány po 14 dnech skladování (hodnocení 2). Vzorky ošetřené tlakem 300 MPa vykazovaly obdobné výsledky po 28 dnech a vzorky ošetřené tlakem 500 MPa po 70 dnech skladování. Při teplotě 12 °C se snížená kvalita vzorků (hodnocení 2) projevila již při první odběru v 7. den, vzorky ošetřené tlakem 300 MPa v 14. den a vzorky pod tlakem 500 MPa v 28. den skladování. Tyto výsledky poukazují na prokazatelně pozitivní vliv nízké teploty a použití vysokého tlaku. Při 3,5 °C a 300 MPa byla doba použitelnosti prodloužena ze 7 na 21 dnů (hodnocení 1), po aplikaci 500 MPa i na 42 dnů. Při 12 °C pozitivní vliv vysokého tlaku není tak výrazný. Vzorky ošetřené tlakem 300 a 500 MPa vykazují stále dobrou kvalitu (hodnocení 1) pouze po dobu 7 až 21 dnů.

**Tabulka 49** Organoleptické vlastnosti vzorků štiky: kontrolní vzorky a vzorky ošetřené různou úrovní vysokého tlaku.  $T_1 = 3,5\text{ °C}$ ,  $T_2 = 12\text{ °C}$ .

Organoleptické vlastnosti		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	1	2	2	3	–	–
300	$T_1$	1	1	1	2	3	3
500	$T_1$	1	1	1	1	1	2
0	$T_2$	2	3	3	3	–	–
300	$T_2$	1–2	2	2	2–3	3	–
500	$T_2$	1	1	1	2	3	–

Bez ohledu na různé chemické struktury, dynamika vzniku TYM je obdobná jako u PUT a CAD. Koncentrace nárůstu PUT, CAD a TYM koresponduje s prohlubujícími se rozkladnými procesy ve vzorcích. Účinek vysokého tlaku a teploty na tvorbu PUT, CAD a TYM je zřejmý. Tyto trendy jsou v dobrém souladu i s organoleptickými vlastnostmi.

Narozdíl od PUT, CAD není přirozenou složkou buněčné tkáně. Z těchto důvodů nebyl pravděpodobně zjištěn v čerstvém mase štiky, ve vzorcích skladovaných 7 dnů při 3,5 °C. Obsah CAD vyšší jak 20 mg.kg<sup>-1</sup> poukazuje na pokročilý stav rozkladu, stejně tak tomu bylo u PUT a TYM. Celkové trendy zmíněných BA byly podobné těm, které vykazovaly PUT, CAD a TYM v těle kapra obecného. Obsah TYM nižší než 10 mg.kg<sup>-1</sup> byl typický pro vzorky dobré kvality. Dobrá kvalita vzorků byla zřídka pozorována, když obsah TYM dosahoval vyšších hodnot.

Tvorba PUT velmi dobře koresponduje s organoleptickými vlastnostmi. Zejména při 3,5 °C je vliv vysokého tlaku jasně viditelný. Aplikace vysokého tlaku způsobila potlačení

obsahu PUT zejména na počátku skladování, přibližně až do 28. dne. Rozdíly mezi účinky tlaků 300 a 500 MPa byly malé. Kontrolní vzorky uchovávané při 12 °C vykazovaly zvýšený obsah PUT již v prvním týdnu skladování (7. den). Tyto vzorky vykazovaly známky kažení od samého počátku skladování a navzdory jejich vakuovému zabalení, dynamika jejich rozpadu byla velmi rychlá. Při této skladovací teplotě se obsah aminů ve vzorcích, ošetřených tlakem 300 a 500 MPa, výrazně nelišil. Při 12 °C tlakování prodloužilo životnost do 14. dne skladování, bez ohledu na velikost aplikovaného vysokého tlaku. Z dostupné literatury nebyl nalezen žádný důkaz o tom, že zvýšenému obsahu PUT předchází zhoršení organoleptických vlastností. Zvyšující se koncentrace PUT spíše kopíruje pokles senzoričké kvality masa. Z těchto důvodů lze obsah PUT stěží použít pro predikci změny kvality masa štiky. Obecně platí, že vzorky ošetřené vysokým tlakem obsahují srovnatelný obsah PUT bez ohledu na velikost aplikovaného tlaku.

**Tabulka 50** Obsah PUT (mg.kg<sup>-1</sup>) v mase štiky (průměr ± SD, n = 3). T<sub>1</sub> = 3,5 °C, T<sub>2</sub> = 12 °C.

PUT		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	T <sub>1</sub>	0.7 ± 1.16	7.5 ± 1.97	17.5 ± 4.66	28.3 ± 10.7	–	–
300	T <sub>1</sub>	ND	ND	9.5 ± 6.31	12.6 ± 3.12	16.3 ± 7.18	23.8 ± 1.67
500	T <sub>1</sub>	ND	1.0 ± 1.79	3.6 ± 3.08	6.0 ± 3.63	17.4 ± 2.20	31.2 ± 3.50
0	T <sub>2</sub>	22.9 ± 11.0	99.9 ± 19.2	272 ± 22.6	258 ± 91.4	–	–
300	T <sub>2</sub>	0.9 ± 1.63	13.5 ± 2.85	32.8 ± 11.0	21.5 ± 2.82	50.6 ± 4.12	–
500	T <sub>2</sub>	ND	13.2 ± 5.19	29.3 ± 3.35	33.1 ± 8.30	62.0 ± 14.9	–

Absence CAD je typická pro vzorky o velmi dobré kvalitě. CAD nebyl zjištěn u žádného vzorku, který byl uložen při 3,5 °C v 7. den skladování. Podobně jako u PUT, CAD vykazoval nejintenzivnější nárůst koncentrace v kontrolních vzorcích, zejména při 12 °C. Na rozdíl od PUT byly zvýšené obsahy CAD (vyšší než 20 mg.kg<sup>-1</sup>) nalezeny i ve vzorcích, které byly ošetřeny tlakem při obou teplotách a to i přes dobré senzoričké vlastnosti. Příčinou může pravděpodobně být vliv matrice. Např. u uzenin tlakování inhibovalo CAD a zároveň potlačilo tvorbu TYM.<sup>107</sup> Při 3,5 °C byly rozdíly obsahu CAD u kontrolních a tlakovaných vzorků statisticky nevýznamné až do 28. dne skladování. Obsah CAD se plynule zvyšoval s dobou skladování. Při 12 °C se zvýšení obsahu projevilo především v kontrolních vzorcích. Vysoký obsah CAD ve 14. a 21. den skladování je překvapivý (12 °C, 500 MPa), především z důvodu, že senzoričké vlastnosti jsou dobré. Vzorky ošetřené tlakem 500 MPa obsahují koncentraci CAD, srovnatelnou s hodnotami CAD u vzorků ošetřených 300 MPa.

**Tabulka 51** Obsah CAD ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase štiky (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

CAD		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	ND	$6.1 \pm 2.29$	$15.5 \pm 3.50$	$30.6 \pm 2.23$	–	–
300	$T_1$	ND	$2.0 \pm 1.77$	$19.1 \pm 4.39$	$18.5 \pm 12.5$	$20.7 \pm 8.72$	$42.6 \pm 6.09$
500	$T_1$	ND	ND	$32.3 \pm 19.0$	$39.9 \pm 6.45$	$76.4 \pm 6.50$	$113 \pm 11.0$
0	$T_2$	$30.3 \pm 8.00$	$118 \pm 11.0$	$158 \pm 20.9$	$216 \pm 62.2$	–	–
300	$T_2$	$14.1 \pm 9.20$	$21.5 \pm 0.66$	$57.4 \pm 26.0$	$58.7 \pm 10.3$	$110 \pm 23.3$	–
500	$T_2$	$4.2 \pm 1.29$	$63.4 \pm 6.16$	$78.9 \pm 6.24$	$105 \pm 15.8$	$231 \pm 50.3$	–

Na rozdíl od CAD, tvorba TYM při  $3,5\text{ }^\circ\text{C}$  byla více potlačena použitím vyšší hodnoty tlaku. Podobně jako CAD, TYM ukázal nárůst koncentrace v závislosti na čase i přes přetrvávající dobré sensorické vlastnosti ( $3,5\text{ }^\circ\text{C}$ , 300 a 500 MPa). Vliv vyšší teploty měl s prodlužující se dobou skladování podobný účinek. Například obsah TYM je desetkrát vyšší při  $12\text{ }^\circ\text{C}$  ve srovnání s  $3,5\text{ }^\circ\text{C}$  (500 MPa, 21. den), ale sensorické hodnocení je stejné (1). Zvýšený obsah TYM, podobně jako CAD, může znamenat ztrátu čerstvosti masa navzdory přetrvávajícím dobrým sensorickým vlastnostem. Tyto jevy byly pozorovány také při tlakování klobás a mohou být vysvětleny pokračování činnosti dekarboxyláz v substrátu při skladování.<sup>86</sup>

TYM je toxikologicky významná látka. Ve vzorcích masa pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) obsah TYM překročil  $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  i přes organoleptické hodnocení 1. Např. obsah TYM byl  $29,6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  21. den skladování ( $3,5\text{ }^\circ\text{C}$ , 300 MPa). Situace v mase štiky je poněkud odlišná. Obsah TYM ve vzorcích se stejným sensorickým hodnocením (1) se postupně zvyšuje až na  $40,8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $3,5\text{ }^\circ\text{C}$ , 500 MPa) 42. den skladování, nebo až na  $110\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $12\text{ }^\circ\text{C}$ , 500 MPa) 21. den skladování. Obsah TYM, větší než  $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  je z toxikologického hlediska problematický a nelze podceňovat.

**Tabulka 52** Obsah TYM ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v mase štiky (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

TYM		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	$0.4 \pm 0.75$	$12.3 \pm 2.25$	$41.6 \pm 6.61$	$104 \pm 33.1$	–	–
300	$T_1$	$0.2 \pm 0.39$	$18.7 \pm 1.92$	$34.6 \pm 9.10$	$55.8 \pm 10.1$	$91.2 \pm 28.4$	$81.1 \pm 11.9$
500	$T_1$	ND	ND	$11.8 \pm 5.00$	$31.7 \pm 2.92$	$40.8 \pm 19.4$	$82.1 \pm 14.9$
0	$T_2$	$31.8 \pm 11.7$	$184 \pm 15.1$	$411 \pm 50.6$	$468 \pm 131$	–	–
300	$T_2$	$10.0 \pm 4.64$	$51.5 \pm 12.4$	$131 \pm 58.2$	$123 \pm 19.4$	$372 \pm 50.1$	–
500	$T_2$	ND	$20.1 \pm 5.19$	$110 \pm 16.9$	$173 \pm 56.2$	$212 \pm 54.9$	–



Nízké koncentrace SPD a SPM byly zjištěny v čerstvém masa štiky (den 0) a ve většině vzorů, které byly odebrány k analýze v 7. a 14. den skladování. Na rozdíl od masa pstruha, kde obsah SPD a SPM vykazoval minimální výkyvy v závislosti na době skladování, v masa štiky se oba polyaminy vyskytovaly převážně ve vzorcích na počátku skladování. Jejich obsah neprokázal statisticky významný trend nárůstu koncentrace s časem a v průběhu skladování vymizely z většiny vzorků. S ohledem na nízké koncentrace polyaminů a jejich málo znatelné změny koncentrace v masa štiky, je hodnocení jejich obsahů nevýznamné s ohledem na kvalitu masa.

**Tabulka 53** Obsah SPD ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v masa štiky (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

SPD		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	$2.6 \pm 0.31$	ND	ND	ND	–	–
300	$T_1$	$1.6 \pm 0.38$	ND	ND	ND	ND	ND
500	$T_1$	$1.2 \pm 0.15$	$2.5 \pm 0.95$	$0.7 \pm 1.26$	ND	$0.5 \pm 0.83$	$0.6 \pm 0.96$
0	$T_2$	$0.8 \pm 0.66$	ND	ND	ND	–	–
300	$T_2$	ND	$0.6 \pm 1.07$	ND	ND	ND	–
500	$T_2$	$1.1 \pm 1.10$	$1.5 \pm 1.48$	ND	ND	ND	–

**Tabulka 54** Obsah SPM ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v masa štiky (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12\text{ }^\circ\text{C}$ .

SPM		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	$1.8 \pm 0.13$	$1.7 \pm 0.20$	$0.4 \pm 0.68$	ND	–	–
300	$T_1$	$1.4 \pm 0.19$	$1.4 \pm 1.32$	ND	ND	ND	$0.5 \pm 0.81$
500	$T_1$	$1.3 \pm 0.18$	$2.4 \pm 0.44$	$0.5 \pm 0.86$	$0.3 \pm 0.57$	$0.5 \pm 0.85$	$1.8 \pm 0.27$
0	$T_2$	$1.9 \pm 0.37$	$1.2 \pm 1.06$	ND	ND	–	–
300	$T_2$	ND	$1.3 \pm 1.12$	ND	ND	ND	–
500	$T_2$	$1.4 \pm 0.13$	$1.5 \pm 0.09$	ND	ND	ND	–

HIM nebyl nalezen v žádném vzorku masa štiky, který byl skladován při  $3,5\text{ }^\circ\text{C}$ . Obsah tohoto aminu byl nízký i ve vzorcích udržovaných při  $12\text{ }^\circ\text{C}$  ( $<20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) a to ne jenom ve vzorcích s dobrými organoleptickými vlastnostmi (hodnocení 1), ale i ve vzorcích s nejhorším sensorickým hodnocením (3). Celkově je hodnocení vzorků, které byly skladovány při nižší teplotě lepší v porovnání s těmi, co byly skladovány při  $12\text{ }^\circ\text{C}$ . HIM se nejeví jako amin, který dostatečně předpovídá počátek rozkladných procesů. V každém případě toxikologicky významná koncentrace HIM ( $>100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) nebyla dosažena ani ve vzorcích se sníženou kvalitou masa. Tudíž tento amin nepředstavuje v masa štiky obdobné

riziko pro spotřebitele, jak je tomu v případě makrelovitých ryb. TRM nebyl nalezen v žádném vzorku. PEA byl zjištěn pouze u dvou vzorků 21. den v obsahu  $9,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a 28. den v obsahu  $8,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Oba vzorky vykazovaly sníženou kvalitu masa (hodnocení 3).

**Tabulka 55** Obsah HIM ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v masě štiky (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  $T_1 = 3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = 12 \text{ }^\circ\text{C}$ .

HIM		Doba skladování, dny					
Tlak, MPa	Teplota	7	14	21	28	42	70
0	$T_1$	ND	ND	ND	ND	–	–
300	$T_1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
500	$T_1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0	$T_2$	ND	$10.4 \pm 2.51$	$14.6 \pm 2.40$	$15.9 \pm 7.29$	–	–
300	$T_2$	ND	ND	$1.7 \pm 3.00$	$2.6 \pm 4.59$	ND	–
500	$T_2$	ND	ND	ND	$8.4 \pm 7.41$	$13.4 \pm 11.8$	–

Použitím vysokého hydrostatického tlaku lze výrazně snížit obsah BA ve vakuově baleném masě štiky. Toxikologicky nejvýznamnější amin HIM nepředstavuje riziko pro spotřebitele rybího masa štiky obecné. HIM nebyl detekován ani v nekvalitních vzorcích masa. Na druhé straně, obsah TYM se plynule zvyšoval, a to i ve vzorcích s nejlepšími organoleptickými vlastnostmi. Vzorky ošetřené tlakem 500 MPa, se senzoričným hodnocením 1, dosahovaly obsahu TYM  $40,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a  $110 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (pro teplotu  $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $12 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Při prodloužení trvanlivosti masa štiky vysokým tlakem musí být brán v úvahu zvyšující se obsah TYM. Zvýšený obsah TYM a CAD byl nalezen ve vzorcích, které byly skladovány po delší dobu a/nebo při vyšší teplotě. Vyšší obsah TYM, podobně jako CAD, může znamenat ztrátu čerstvosti masa a to navzdory dobrému senzoričnému hodnocení. Na rozdíl od TYM a CAD, obsah PUT je v souladu se senzoričnými vlastnostmi. Z tohoto důvodu PUT může být méně vhodný pro predikci změny kvality masa štiky. Doporučená skladovací lhůta pro vakuově balené maso štiky, specifikovaná výrobcem, je asi 5 dní při teplotě  $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Použitím vysokého hydrostatického tlaku může být doba skladování podstatně prodloužena, zhruba čtyřikrát při použití 300 MPa a osmkrát při 500 MPa, respektive do 21 nebo 42 dnů. Konzervace vysokým hydrostatickým tlakem je méně účinná pro skladování při  $12 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 6 ZÁVĚR

Disertační práce byla zaměřena na stanovení biogenních aminů ve vybraných druzích sladkovodních ryb, které jsou u nás nejčastěji konzumovány. Cílem práce bylo studovat vliv moderních konzervačních technik na tvorbu aminů ve vybraných druzích rybího masa a jejich následné stanovení pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC). Konzervačními technikami vybranými pro disertační práci byly radioaktivní záření a vysoký tlak. Vedle samotného vlivu konzervace (dávka záření, hodnota vysokého tlaku) byla pozornost věnována podmínkám skladování (doba a teplota). U všech experimentů byly sledovány též organoleptické vlastnosti jednotlivých vzorků rybího masa (vůně/zápach, vzhled a struktura).

Jako rozhodující se pro kvalitu rybího masa u všech experimentů jevíly PUT, CAD a TYM, a to jak v případě konzervace  $\beta$ -zářením, tak v případě konzervace vysokým tlakem. U ostatních aminů HIM, TRM, PEA, SPD a SPM je změna jejich obsahu v mase v souvislosti s ozářením a/nebo vysokým tlakem nízká nebo nevýznamná. Obsahy HIM, TRM a PEA ovšem mohou být v ojedinělých případech zvýšeny. Nárůst jejich obsahů můžeme sledovat především u vzorků, které nebyly vystaveny vlivu ani jedné ze sledovaných konzervačních technik nebo v případě vzorků, které byly ošetřeny vysokým tlakem a poté následně skladovány při vyšší teplotě. Ve výsledcích se u sladkovodních ryb HIM neprojevuje jako amin, který by byl typický pro začátek rozkladných procesů rybího masa. U mořských ryb představuje obsah HIM riziko pro spotřebitele při koncentraci vyšší než  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . V těchto koncentracích nebyl u sladkovodních ryb detekován HIM v žádném z konzervovaných vzorků, které byly skladovány při  $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . HIM nepředstavuje v mase sladkovodních ryb riziko pro spotřebitele na rozdíl od makrelovitých ryb.

Polyaminy SPD a SPM se vyskytují ve všech živých buňkách. Jejich obsahy kolísají ve všech vzorcích, ale pouze ve velmi nízkých koncentracích. Během všech experimentů nebyly zaznamenány statisticky významné výkyvy obsahů SPD a SPM ani s postupem času ani se zvyšující se dávkou  $\beta$ -záření nebo hodnotou vysokého tlaku. Nejméně frekventovanými biogenními aminy, jak ve vzorcích ošetřených konzervační technikou, tak ve vzorcích neošetřených, byly TRM a PEA. Obsah těchto aminů byl velmi nízký a velmi často pod mezí detekce. Jedinou výjimkou byly vzorky ošetřené vysokým tlakem a následně skladované při vyšší teplotě ( $12 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

## 6.1 Konzervace rybího masa $\beta$ -zářením

Účinek  $\beta$ -záření byl sledován u dvou druhů sladkovodních ryb, u kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Rozvaha experimentů s ozařováním byla založena na zkušební sérii vzorků s kapřím masem. Pro jednotlivé experimenty byly vždy zároveň připraveny vzorky, které nebyly vystaveny účinkům  $\beta$ -záření, ale byly skladovány za stejných podmínek jako vzorky ozářené. Neozářené vzorky byly již 28. den skladování hodnoceny jako zkažené a z tohoto důvodu se s nimi nepokračovalo v dalších časových profilech odběrů vzorků k analýze.

Bylo zjištěno, že účinek  $\beta$ -záření má zásadní vliv na zpomalení degradace rybího masa. Všechny ozářené vzorky vykazovaly značně nižší obsahy biogenních aminů při srovnání s neozářenými vzorky. Podle vyhlášky č. 133/2004 sb., je nejvyšší možná dávka záření pro rybí maso stanovena na 3 kGy. Na základě výsledků lze říci, že veškeré použité dávky  $\beta$ -záření větší než 0,75 kGy (včetně) byly dostačující či dokonce nadbytečné pro konzervaci masa u obou druhů ryb po dobu několika týdnů až měsíců při 3,5 °C.

Naopak u dávky 0,25 kGy můžeme sledovat nárůst obsahu aminů po 42 dnech skladování. V tuto dobu byl obsah PUT u pstruha duhového 21.9 mg.kg<sup>-1</sup>, CAD 35.4 mg.kg<sup>-1</sup> a TYM 54.2 mg.kg<sup>-1</sup>. V případě kapra obecného obsahy PUT a CAD vykazovaly velmi nízké hodnoty 42. den, které nepřesahovaly 10 mg.kg<sup>-1</sup>. Pouze obsah TYM byl 21.2 mg.kg<sup>-1</sup> již 14. den skladování. Z výsledků, lze vyvodit, že účinek 0,25 kGy může být považován za nejnižší možnou dávku záření, která je v limitním případě dostačující pro konzervaci rybího masa. Dávka 0,25 kGy prodloužila skladovatelnost rybího masa v maximálním případě o pět týdnů, čili ze 7. na 42. den skladování.

Ve všech případech se jako nejvhodnější dávka  $\beta$ -záření jeví 0,5 kGy, a to jak pro maso pstruha duhového, tak pro kapra obecného. Obsah PUT, CAD a TYM po celou dobu skladování vykazoval velmi nízké hodnoty pod 10 mg.kg<sup>-1</sup> u obou druhů sladkovodních ryb. Výjimkou byl TYM u kapra obecného, jeho obsah byl 98. den skladování 18,9 mg.kg<sup>-1</sup>. Po aplikaci 0,5 kGy lze konstatovat, že údržnost rybího masa byla prodloužena o třináct týdnů i přes malý nárůst TYM v 98. den skladování.

U ostatních vzorků, které byly ozářeny vyšší dávkou  $\beta$ -záření (0,75; 1; 2 a 3 kGy) je obsah aminů i po 98 dnech skladování velmi nízký a vzorky nevykazují jakékoliv známky začínajících rozkladných procesů u obou druhů sladkovodních ryb. Tyto dávky prodloužily „čerstvost“ rybího masa minimálně o třináct týdnů při 3,5 °C skladování.

Tyto výsledky nám potvrzují i organoleptické vlastnosti jednotlivých vzorků. Organoleptické vlastnosti jednotlivých vzorků odpovídají obsahům stanovovaných aminů.

## 6.2 Konzervace rybího masa vysokým tlakem

Vliv vysokého tlaku byl sledován u tří druhů sladkovodních ryb, u kapra obecného (*Cyprinus carpio*), pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a štiky obecné (*Esox lucius*). Všechny druhy sladkovodních ryb byly vystaveny účinku 300 a 500 MPa po dobu 10 minut. Pro jednotlivé experimenty byly zároveň připraveny vzorky, které nebyly následně ošetřeny vysokým tlakem. Tyto vzorky byly ze stejného důvodu jako v případě  $\beta$ -záření odebírány pouze do 28. dne skladování (po 4 týdnech skladování bylo rybí maso zkažené). Vzorky masa všech tří druhů ryb byly skladovány při dvou teplotách (3,5 °C a 12 °C). Podle výsledků z předešlých experimentů s  $\beta$ -zářením byly časové profily, odběrů vzorků k analýze (7, 14, 21, 28, 42 a 70 dnů) považovány za vyhovující i pro experimenty s vysokým tlakem. Obsahy sledovaných aminů, které určují kvalitu rybího masa ve vzorcích (PUT, CAD a TAM), byly 70. den skladování vysoko nad kritickou hodnotou 20 mg.kg<sup>-1</sup>. Z tohoto důvodu byl odběr vzorků 98. den skladování zrušen. V případě skladování při 12 °C byl zrušen i odběr v 70. den (nevyhovující organoleptické vlastnosti).

Obsahy biogenních aminů ve vzorcích skladovaných při vyšší teplotě (12 °C) byly výrazně vyšší než při nižší teplotě (3,5 °C) u všech druhů sladkovodních ryb. Například obsah PUT u kapra obecného 21. den skladování po účinku 500 MPa byl při 3,5 °C 1.9 mg.kg<sup>-1</sup> a při 12 °C byl 31.3 mg.kg<sup>-1</sup>. Není překvapivé, že teplota 3,5 °C je vhodná pro skladování rybího masa. Koncentrace sledovaných aminů byla při těchto podmínkách velmi nízká. Na rozdíl od nižší teploty skladování, kdy se obsah PUT nepřibližoval ke kritické hodnotě 10 mg.kg<sup>-1</sup>, při vyšší teplotě (12 °C) byla tato hodnota třikrát překročena. TYM u štiky obecné 21. den skladování po aplikaci 500 MPa při vyšší skladovací teplotě (12 °C) překročil kritickou hodnotu více než desetkrát (obsahem 110 mg.kg<sup>-1</sup>) ve srovnání s jeho koncentrací při nízké teplotě (3,5 °C), která byla 11.8 mg.kg<sup>-1</sup>. Ukazuje se, že konzervace vysokým tlakem selhává při vyšších teplotách (12 °C).

Použité úrovně vysokého tlaku (300 a 500 MPa) vykazovaly obdobné výsledky, jak u kapra obecného, tak u pstruha duhového při nižší i vyšší skladovací teplotě (3,5 a 12 °C). U obou druhů sladkovodních ryb byla účinnější aplikace 500 MPa a to jak s ohledem na zpomalení nárůstu obsahu aminů, tak s ohledem na organoleptické vlastnosti. Účinek 300 MPa zajišťoval prodloužení skladovatelnosti vzorků o kratší časový interval ve srovnání s 500 MPa. Úroveň 300 MPa prodloužila uživatelnost rybího masa kapra a pstruha o tři týdny a 500 MPa o čtyři týdny při teplotě 3,5 °C. Obsah CAD u kapra obecného 28. den skladování při 3,5 °C po účinku 300 MPa byl 11.2 mg.kg<sup>-1</sup>, po aplikaci 500 MPa nebyl CAD detekován. Při vyšší skladovací teplotě účinek vysokého tlaku výrazně nesnižuje koncentraci aminů, jak

již bylo popsáno výše. 300 MPa neprodlužuje skladovatelnost masa ani o jeden týden a 500 MPa maximálně o jeden až dva týdny. Například pro srovnání, obsah TYM u pstruha duhového 14. den skladování při 12 °C po aplikaci 300 MPa byl 149 mg.kg<sup>-1</sup>, po 500 MPa byl 9 mg.kg<sup>-1</sup>.

V případě štiky obecné bylo zjištěno, že získané výsledky obsahů sledovaných aminů, v neošetřených vzorcích a vzorcích po aplikaci 300 MPa, korespondují s výsledky z předešlých pokusů s masem kapra obecného a pstruha duhového, a to jak při nižší, tak i při vyšší skladovací teplotě. Avšak u tohoto druhu sladkovodní ryby dochází k určité anomálii při 500 MPa. Tento jev je nejspíše důsledkem strukturních změn matrice (rybího masa štiky) po použití vysokého tlaku. Vzorky ošetřené 300 MPa vykazují nižší obsahy aminů (převážně CAD) než vzorky, které byly vystaveny 500 MPa. Například obsah CAD byl 21. den skladování po účinku 300 MPa 19.1 mg.kg<sup>-1</sup>, po 500 MPa 32.3 mg.kg<sup>-1</sup> při 3,5 °C.

Veškeré organoleptické hodnocení jednotlivých vzorků během experimentů s vysokým tlakem odpovídá stavu masa všech sledovaných druhů sladkovodních ryb, který byl vyhodnocen dle obsahu sledovaných aminů. V nesouladu se získanými koncentracemi aminů bylo pouze sensorické hodnocení vzorků štiky po účinku 500 MPa. I přes zjištěnou anomálii u masa štiky obecné, vzorky této ryby vykazovaly dobré organoleptické vlastnosti.

Celkově z výsledků vyplývá, že účinek vysokého tlaku je další účinnou technikou pro konzervaci rybího masa při nízkých skladovacích teplotách (3,5 °C). Při vyšší skladovací teplotě (12 °C) vysoký tlak nezabraňuje zcela degradaci rybího masa. Účinek vysokého tlaku nezaručuje skladovatelnost masa sladkovodních ryb po celou dobu experimentu (70 dnů), pouze jí prodlužuje v optimálním případě o 2–3 týdny, maximálně však o 5 týdnů v případě použití vyšší úrovně vysokého tlaku (500 MPa). Dále ze zjištěných výsledků lze soudit, že maximální vhodná délka skladování vakuově baleného masa při 3,5 °C po ošetření 300 MPa je 14 dnů a po ošetření 500 MPa je 42 dnů. Při 12 °C není hodnota 300 MPa dostačující pro konzervaci vakuově baleného rybího masa, které bude skladováno po dobu delší než-li 7 dnů. 500 MPa prodlužuje užitek vakuově baleného rybího masa maximálně na 21 dnů skladování při 12 °C.

Při srovnání vlivu  $\beta$ -záření a vysokého tlaku na konzervaci rybího masa je patrné, že i nejnižší aplikovaná dávka  $\beta$ -záření zajišťuje trvanlivost masa po několik měsíců oproti použitým hodnotám vysokého tlaku (300 a 500 MPa), které prodlužují užitek masa o dva až tři týdny. Z těchto výsledků vyplývá, že  $\beta$ -záření je vhodnější konzervační technikou. Na druhou stranu, je nutné podotknout, že tato konzervační technika má stále problémy s jejím rozšířením. Hlavním důvodem jsou legislativní požadavky na velmi výrazné radioaktivní označení na obalech potravin, které byly touto technikou ošetřeny. I přesto, že potraviny jsou podle norem ošetřeny přípustnou dávkou radioaktivního záření, která v žádném případě nepředstavuje zdravotní riziko pro spotřebitele, je pravdou, že označení radioaktivního záření na obalu potravin odrazuje spotřebitele, kteří nejsou seznámeni s problematikou ozařování potravin. Pro takového spotřebitele bude zatím přijatelnější konzervační technikou vysoký tlak.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

---

- 1 Dadáková, E., Křížek, M. a Pelikánová, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. **2009**, *116*, 365–370.
- 2 Křížek, M. a Kalač, P. Biogenic amines in foods and their role in human nutrition. *Czech Journal of Food Sciences*. **1998**, *16*, 151–159.
- 3 Kebary K. M. K., El-Sonbaty A. H. a Badawi R. M. Effects of heating milk and accelerating ripening of low fat ras cheese on biogenic amines and free amino acids development. *Food Chemistry*. **1999**, *64*, 67–75.
- 4 Santos, W. C., Souza, M. R., Cerqueira, M. M. O. P. a Glória, M. B. A. Bioactive amines formation in milk by lactococcus in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry*. **2003**, *81*, 595–606.
- 5 Hernández-Borges, J., D’Orazio, G., Aturki, Z. a Fanali, S. Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines. *Journal of Chromatography A*. **2007**, *1147*, 192–199.
- 6 Smělá, D., Pechová, P., Komprda, T., Klejdus, B. a Kubáň, V. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. **2004**, *98*, 432–437.
- 7 Ruiz-Capillas, C. a Jiménez-Colmenero, F. Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2004**, *44*, 489–499.
- 8 Valsamaki K., Michaelinou A. a Polychroniadou A. Biogenic amine production in feta cheese. *Food Chemistry*. **2000**, *71*, 259–266.
- 9 Innocente, N., Biasutti, M., Padovese, M. a Moret, S. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extrakt. *Food Chemistry*. **2007**, *101*, 1285–1289.
- 10 Vítová E. V *Hygiena potravin*, 1. vydání; Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně 2004. ISBN 8021426802.



- 
- 11 Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L. a Holzapfel, W. Biogenic amines and their production by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*. **1994**, 5, 42–49.
- 12 Standarová, E., Borkovcová, I. a Vorlová, L. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství*. **2008**, 58, 735–739.
- 13 Smith, T.A. Plant amines. *Encyclopedia of Plant Physiology*. **1980**, 8, 433–460.
- 14 Smith T.A., Negrel J. a Bird C.R. The cinnamic acid amides of the di- and polyamines. *In Advances in Polyamine Research*. **1983**, 4, 347–370.
- 15 Miyazaki, J. H. a Yang, S. F. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamide biosynthesis. *Physiologia Plantarum*. **1987**, 69, 366–370.
- 16 Torrigiani, P., Serafini – Fracassini, D. a Bagni, N. Polyamine biosynthesis and effect of dicyclohexylamine during the cell cycle of helianthus tuberosus tuber. *Plant Physiology*. **1987**, 84, 148–152.
- 17 Smith, T. A. Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology*. **1985**, 36, 117–143.
- 18 Davídek, J. V *Natural toxic compounds of foods*, CRC Press, Boca Raton, London, UK 1995. ISBN 0849346231.
- 19 Luten, J. B. V 13. ann. meet. West Eur. fish technol. assocn., Ijmuiden, **1983**, 1–25.
- 20 Franz, Ch. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. a Holzapfel, W. H. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. **2003**, 88, 105–122.
- 21 Giraffa, G. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. **2003**, 88, 215–222.
- 22 Ogier, J. C. a Serror, P. Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus. *International Journal of Food Microbiology*. **2008**, 126, 291–301.
- 23 Fortina, M. G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P.L., Arends, K., Schiwon, K., Abajy, M.Y. a Grohmann, E. A survey on biotechnological potential and safety of the novel Enterococcus species of dairy origin, *E. italicus*. *International Journal of Food Microbiology*. **2008**, 123, 204–211.

- 
- 24 Giraffa, G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*. **2002**, *26*, 163–171.
- 25 Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S. a Guéguen, M. The Lactobacillus genus. Safety assessment of dairy microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. **2008**, *126*, 278–285.
- 26 Sayem El-Daher, N., Simard, R.E., Jillion, J. a Roberge, A.G. Extraction and determination of biogenic amines in ground beef and their relation to microbial quality. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. **1984**, *17*, 20–23.
- 27 Edwards, R. A., Dainty, R. H., Hibbard, C. M. a Ramantanis, S. V. Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*. **1987**, *63*, 427–434.
- 28 Mietz, J. L. a Karmas, E. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. **1978**, *61*, 139-145.
- 29 Rosier, J. a Van Peteghem, C. V. A screening method for the simultaneous determination of putrescine, cadaverine, histamine, spermidine and spermine in fish by means of high pressure liquid chromatography of the 5-dimethylaminophthalene-1-sulphonyl derivates. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. **1988**, *186*, 25–28.
- 30 Yamanaka, H., Shiomi, K. a Kikuchi, T. Cadaverine as a potential index for decomposition of salmonid fishes. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. **1989**, *30*, 170–174.
- 31 Slemr, J. Biogene amine als potentieller chemischer qualitätsindikator für fleisch. *Fleischwirtsch*. **1981**, *61*, 921–926.
- 32 Steinhäuserová, I. Otravy biotoxiny ryb a mořských živočichů. *Veterinářství*. **2004**, *54*, 172–175.
- 33 Buchtová, H. a Vorlová, L. Jakostní a hygienické parametry požitelných částí kapra obecného. *Veterinářství*. **2001**, *51*, 472–476.

- 
- 34 Wu, M. L., Yang, C. C., Yang, G. Y., Ger, J. a Deng, J. F. Scombroid fish poisoning: An overlooked marine food poisoning. *Veterinary and Human Toxicology*. **1997**, *39*, 236–241.
- 35 Lehane, L. Update on histamine fish poisoning. *Medical Journal of Australia*. **2000**, *173*, 149–152.
- 36 Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, M. T. a Vidal-Carou, M. C. Effect of gutting on microbial loads, sensory properties, and volatile and biogenic amine contents of European hake (*Merluccius merluccius* var. *Mediterraneus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*. **2009**, *72*, 1671–1676.
- 37 Joosten, H. M. L. J. The biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. **1988**, *42*, 25–42.
- 38 Veciana-Nogues, M. T., Albala-Hurtado, S., Marine-Font, A. a Vidal-Carou, M. C. Changes in biogenic amines during the manufacture and storage of semipreserved anchovies. *Journal of Food Protection*. **1996**, *59*, 1218–1222.
- 39 Ruiz-Capillas, C. a Moral, A. Effect of controlled atmospheres enriched with O<sub>2</sub> in formation of biogenic amines in chilled hake (*Merluccius merluccius* L.). *European Food Research and Technology*. **2001a**, *212*, 546–550.
- 40 Ruiz-Capillas, C. a Moral, A. Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius*, L.) stored in ice. *Journal of Food Science*. **2001b**, *66*, 1030–1032.
- 41 Křížek, M., Vácha, F., Vorlová, L., Lukášová J. a Cupáková, S. Biogenic amines in vacuum-packed and non-vacuum-packed flesh of carp (*Cyprinus carpio*) stored at different temperatures. *Food Chemistry*. **2004**, *88*, 185–191.
- 42 Kuley, E., Ozogul, F. a Ozogul, Y. Effects of aluminium foil and cling film on biogenic amines and nucleotide degradation products in gutted sea bream stored at 2 + or – 1 degrees C. *European Food Research and Technology*. **2005**, *221*, 582–591.
- 43 Ozogul, Y., Ozogul, F. a Gokbulut, C. Quality assessment of wild European eel (*Anguilla anguilla*) stored in ice. *Food Chemistry*. **2006**, *95*, 458–465.

- 
- 44 Mackie, I. M., Pirie, L., Ritchie, A. H. a Yamanaka, H. The formation of nonvolatile amines in relation to concentrations of free basic amino acids during postmortem storage of the muscle of scallop (*Pecten maximus*), herring (*Clupea harengus*) and mackerel (*Scomber scombrus*). *Food Chemistry*. **1997**, 60, 291–295.
- 45 Ruiz-Capillas, C. a Moral, A. Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chemistry*. **2005**, 89, 347–354.
- 46 Kvasničková, A. *Ozařování potravin*. Ústav zemědělské ekonomiky a informací. Praha, ČR, 2006. Informační přehled ÚZPI.
- 47 Olson, D.G. Irradiation of food. *Food Technology*. **1998**, 52, 56–62.
- 48 GAO. *Food irradiation: Available research indicates that benefits outweigh risks*. General Accounting Office, Washington, D.C., USA, **2000**. GAO/RCED-00-217.
- 49 Razskazovskiy, Y., Debije, M.G., Howerton, S.B., Williams, L.D. a Bernhard, W.A. Strand breaks in X-irradiated crystalline DNA: Alternating CG oligomers. *Radiation Resistance Research*. **2003**, 160, 334–339.
- 50 Thayer, D.W. Irradiation of food – Helping to ensure food safety. *The New England Journal of Medicine*. **2004**, 350, 1811–1812.
- 51 Thayer, D.W. a Rajkowski, K.T. Developments in irradiation of fruits and vegetables. *Food Technology*. **1999**, 53, 62–65.
- 52 WHO. *High-dose irradiation: Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy*. Report of a joint FAO/IAEA/WHO study group. WHO technical report series 890. World Health Organization, Geneva, Switzerland. **1999**.
- 53 Fan, X. Ionizing radiation induces formation of malonaldehyde, formaldehyde, and acetaldehyde from carbohydrates and organic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 5946–5949.
- 54 Thayer, D.W., Christopher, J.P., Campbell, L.A., Ronning, D.C., Dahlgren, R.R., Thomson, G.M. a Wierbicki, E. Toxicology studies of irradiation-sterilized chicken. *Journal of Food Protection*. **1987**, 50, 278–288.

- 
- 55 Rabie, M. A., Siliha, H. I., El-Saidy, S. M., El-Badawy, A. A. a Malcata, F. X. Effect of gamma-irradiation upon biogenic amine formation in blue cheese during storage. *International Dairy Journal*. **2011**, *21*, 373–376.
- 56 Rabie, M. A., Siliha, H., El-Saidy, S., El-Badawy, A. A. a Malcata, F. X. Effects of gamma-irradiation upon biogenic amine formation in Egyptian ripened sausages during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. **2010**, *11*, 661–665.
- 57 Kim, J. H., Ahn, H. J., Kim, D. H., Jo, C., Yook, H. S. a Park, H. J. Irradiation effects on biogenic amines in Korean fermented soybean paste during fermentation. *Journal of Food Science*. **2003**, *68*, 80–84.
- 58 Ozogul, F., Ozden, O., Ozogul, Y. a Erkan, N. Nucleotide degradation products of gamma-irradiated sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*. **2010**, *45*, 2290–2296.
- 59 Mbarki, R., Ben Miloud, N., Selmi, S., Dhib, S. a Sadok, S. Effect of vacuum packaging and low-dose irradiation on the microbial, chemical and sensory characteristics of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Food Microbiology*. **2009**, *26*, 821–826.
- 60 Mbarki, R., Sadok, S. a Barkallah, I. Influence of gamma irradiation on microbiological, biochemical, and textural properties of Bonito (*Sarda sarda*) during chilled storage. *Food Science and Technology International*. **2008**, *14*, 367–373.
- 61 Mendes, R., Silva, H. A., Nunes, M. L. a Empis, J. M. A. Effect of low-dose irradiation and refrigeration on the microflora, sensory characteristics and biogenic amines of Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *European Food Research and Technology*. **2005**, *221*, 329–335.
- 62 Smith, J. S. a Pillai, S. Irradiation and food safety. *Food Technology*. **2004**, *58*, 48–55.
- 63 Anonymous. Vyhláška o podmínkách ozařování potravin a surovin, o nejvyšší přípustné dávce ozáření a o způsobu označení ozáření na obalu. *Sbírka zákonů*. **2004**, *133*, 1758–1762.
- 64 Krist, P. a Bila J. A mathematical model of the MT 25 microtron. *Journal of Instrumentation*. **2011**, *6*, T10005.

- 
- 65 Strohalm, J., Houška, M., Novotná, P., Kýhos, K., Grée, R., Brůna, D. a Čapek, F. Application of high pressure by food treating, *Czech Journal of Food Sciences*. **1998**, *16*, 221–226.
- 66 Crossland, B. The development of high pressure equipment. *High Pressure Processing of Foods* (eds D.A. Ledward et al.), *Nottingham University Press*. **1995**, 7–26.
- 67 Hermans, K. High pressure effects on biomolecules. *High Pressure Processing of Foods* (eds D.A. Ledward et al.), *Nottingham University Press*, Loughborough. **1995**, 81–98.
- 68 Yordanov, D. G. a Angelova, G. V. High Pressure processing for foods preserving. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. **2010**, *24*, 1940–1945.
- 69 Kowalski, E., Ludwig, H. a Tausche, B. Hydrostatic pressure to sterilize foods 1. application to pepper (*Piper nigrum* L). *Deutsche Lebensmittel Rundschau*. **1992**, *88*, 74–75.
- 70 Butz, P., Koller, W.D., Tauscher, B. a Wolf, S. Ultra-high pressure processing of onions: chemical and sensory changes. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. **1994**, *27*, 463–467.
- 71 Ohmori, T., Shigehisa, T., Taji, S. a Hayashi, R. Effect of high pressure on the protease activities in meat. *Agricultural and Biological Chemistry*. **1991**, *55*, 357–361.
- 72 Suzuki, A., Watanabe, M., Iwamura, K., Ikeuchi, Y. a Saito, M. Effects of high pressure treatment on the ultrastructure and myofibrillar protein of beef skeletal muscle. *Agricultural and Biological Chemistry*. **1990**, *54*, 3085–3090.
- 73 Miyao, S., Shindoh, T., Miyamori, K. a Arita, T. Effects of high pressurisation on the growth of bacteria derived from surimi (fish paste). *Japanese Society for Food Science and Technology*. **1993**, *40*, 478–484.
- 74 Iso, S., Mizuno, H., Ogawa, H., Mochizuki, Y., Mihori, T., a Iso, N. Physicochemical properties of pressurised carp meat. *Fisheries science*. **1994**, *60*, 89–91.
- 75 Carlez, A., Rosec, J., Richard, N. a Cheftel, J. High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **1993**, *26*, 357–363.

- 
- 76 Carlez, A., Veciana-Nogués, M. T. a Cheftel, J.C. Changes in colour and myoglobin of minced meat due to high pressure processing. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*. **1995**, 28, 528–538.
- 77 Zimmerman, F. a Bergman, C. Isostatic high-pressure equipment for food preservation. *Food Technology*. **1993**, 47, 162-163.
- 78 Aleman, G., Farkas, D. F., Torres, J. A., Wilhelmsen, E. a McIntyre, S. Ultra-high pressure pasteurization of fresh cut pineapple. *Journal of Food Protection*. **1994**, 57, 931–934.
- 79 Eshtiaghi, R., Stute, R. a Knorr, D. High-pressure and freezing pretreatment effects on drying, rehydration, texture and color of green beans, carrots and potatoes. *Journal of Food Science*. **1994**, 59, 1168–1170.
- 80 Eshtiaghi, M. N. a Knorr, D. Potato cubes response to water blanching and high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*. **1993**, 58, 1371–1374.
- 81 Fellows, P. J. *Food processing technology – principles and practice*. Woodhead Publishing Limited a CRC Press. Oxford, **2009**, 761–767.
- 82 Cheftel, J. C. Effects of high hydrostatic pressure of food constituents: an overview. V Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. a Masson, P. (Eds.) High pressure and biotechnology. *London Colloque INSERM/John Libbey a Co. Ltd*. **1992**, 224, 195–209.
- 83 Cheftel, J. C. a Culioli, J. Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Science*. **1997**, 46, 211–236.
- 84 Montiel, R., De Alba, M., Bravo, D., Gaya, P. a Medina, M. Effect of high pressure treatments on smoked cod quality during refrigerated storage. *Food Control*. **2012**, 23, 429–436.
- 85 Ruiz-Capillas, C., Carballo, J. a Jimenez-Colmenero, F. Consequences of high-pressure processing of vacuum-packaged frankfurters on the formation of polyamines: Effect of chilled storage. *Food Chemistry*. **2007b**, 104, 202–208.

- 
- 86 Ruiz-Capillas, C., Colmenero, F. J., Carrascosa, A. V. a Munoz, R. Biogenic amine production in Spanish dry-cured ‘‘chorizo’’ sausage treated with highpressure and kept in chilled storage. *Meat Science*. **2007c**, 77, 365–371.
- 87 Ruiz-Capillas, C., Carballo, J. a Colmenero, F. J. Biogenic amines in pressurized vacuum-packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions. *Meat Science*. **2007a**, 75, 397–405.
- 88 Křížek, M. *Biogenní aminy v silážích a poživatinách*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. České Budějovice, **1996**, 91. Habilitační práce.
- 89 Moret, S. a Conte, L. S. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods – An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography*. **1996**, 729, 363–369.
- 90 Shakila, R. J., Vasundhara, T. S. a Kumudavally, K. V. A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chemistry*. **2001**, 75, 255–259.
- 91 Favaro, G., Pastore, P., Saccani, G. a Cavalli, S. Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au electrode. *Food Chemistry*. **2007**, 105, 1652–1658.
- 92 Paik, M. J., Choi, Y. M. a Kim, K. R. Simultaneous profiling analysis of alkylphenols and amines by gas chromatography and gas chromatography – mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **2006**, 560, 218–226.
- 93 Fernandes, J. O., Judas, I. C., Oliveira, M. B., Ferreira, I. a Ferreira, M. A. A GC–MS method for quantitation of histamine and other biogenic amines in beer. *Chromatographia*. **2001**, 53, 327–331.
- 94 Du, W. X., Lin, C. M., Phu, A. T., Cornell, J. A., Marshall, M. R. a Wei, C. I. (2002). Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): Effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *Journal of Food Science*. **2002**, 67, 292–301.



- 
- 95 Rossano, R., Mastrangelo, L., Ungaro, N. a Riccio, P. 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*. **2006**, 830, 161–164.
- 96 Bolygo, E., Cooper, P. A., Jessop, K. M. a Moffatt, F. Determination of histamine in tomatoes by capillary electrophoresis. *Journal of AOAC International*. **2000**, 83, 89–94.
- 97 Kovacs, A., Simon-Sarkadi, L. a Ganzler, K. Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. **1999**, 836, 305–313.
- 98 Křížek, M. a Pelikánová, T. Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1998**, 815, 243–250.
- 99 Zhang, L. Y., Tang, X. C. a Sun, M. X. 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*. **2005**, 820, 211–219.
- 100 Vandenberghe, O., Garrelly, L., Ghelfenstein, M., Commeyras, A. a Mion, L. 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*. **1998**, 795, 239–250.
- 101 Nguyen, D. T. T., Guillarme, D., Heinisch, S., Barrioulet, M. P., Rocca, J. L. a Rudaz, S. High throughput liquid chromatography with sub-2  $\mu$  m particles at high pressure and high temperature. *Journal of Chromatography A*. **2007**, 1167, 76–84.
- 102 Liu, M., Li, Y. G., Chou, G. X., Cheng, X. M., Zhang, M. a Wang, Z. T. Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae Miltiorrhizae*. *Journal of Chromatography A*. **2007**, 1157, 51–55.
- 103 Anonymous. Council Directive 91/493/EEC. *Official Journal of the European Communities*. **1991**, 268, 15–34.

- 
- 104 Křížek, M., Pavlíček, T. a Vácha, F. Formation of selected biogenic amines in carp meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2002**, 82, 1088–1093.
- 105 Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, M. T., Marine-Font, A. a Vidal-Carou, M. C. Biogenic amine index for freshness evaluation in iced Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Food Protection*. **2005**, 68, 2433–2438.
- 106 Veciana-Nogues, M. T., Bover-Cid, S., Marine-Font, A. a Vidal-Carou, M. C. Biogenic amine production by *Morganella morganii* and *Klebsiella oxytoca* in tuna. *European Food Research and Technology*. **2004**, 218, 284–288.
- 107 Simon-Sarkadi, L., Pasztor-Huszar, K., Istvan, D. a Kisko, G. Effect of high hydrostatic pressure processing on biogenic amine content of sausage during storage. *Food Research International*. **2012**, 47, 380–384.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>ADC</b>	arginindekarboxylasa
<b>AV ČR</b>	Akademie věd České Republiky
<b>BA</b>	biogenní aminy
<b>BAI</b>	index obsahu biogenních aminů
<b>CAC</b>	„Codex Alimentarius Commission“ (komise pro potravinový kodex)
<b>CAD</b>	kadaverin
<b>CZE</b>	„capillary zone electrophoresis“ (kapilární zónová elektroforéza)
<b>ČR</b>	Česká republika
<b>D<sub>10</sub></b>	dávka potřebná ke snížení populace mikroorganismů o 90 %
<b>DAO</b>	diaminooxidáza
<b>DCHA</b>	dicyklohexylaminu
<b>DNA</b>	„deoxyribonucleic acid“ (deoxyribonukleová kyselina)
<b>Dns-Cl</b>	dansylchlorid
<b>EFSA</b>	„European Food Safety Authority“ (Evropský úřad pro bezpečnost potravin)
<b>EU</b>	Evropská unie
<b>FAO</b>	„Food and Agricultural Organization“ (Organizace pro výživu a zemědělství)
<b>G+</b>	grampozitivní
<b>G-</b>	gramnegativní
<b>GC</b>	„gas chromatography“ (plynová chromatografie)
<b>GI</b>	gastrointestinální
<b>GRAS</b>	„generally recognized as safe“ (všeobecně „bezpečné“)
<b>HIM</b>	histamin
<b>HP</b>	„high pressure“ (vysoký tlak)
<b>HPLC</b>	„high performance liquid chromatography“ (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
<b>IAEA</b>	„International Atomic Energy Agency“ (Mezinárodní agentura pro atomovou energii)
<b>IEC</b>	„ion exchange chromatography“ (iontově výměnná chromatografie)
<b>IS</b>	„internal standard“ (vnitřní standard)
<b>LAB</b>	„lactic acid bacteria“ (bakterie mléčného kvašení)
<b>LC</b>	„liquid chromatography“ (kapalinová chromatografie)
<b>MAO</b>	monoaminooxidáza
<b>MTA</b>	5'-methylthioadenosin
<b>ND</b>	„not detected“ (pod mezí detekce)
<b>NT</b>	nižší teplota (3,5 °C)
<b>ODC</b>	ornitindekarboxylasa

<b>PAO</b>	polyaminoxidasa
<b>PEA</b>	2-fenylethylamin
<b>PUFA</b>	„poly-unsaturated fatty acids“ (nenasycené mastné kyseliny)
<b>PUT</b>	putrescin
<b>RNA</b>	„ribonucleic acid“ (ribonukleová kyselina)
<b>RRLC</b>	„rapid resolution liquid chromatography“ (kapalinová chromatografie s rychlým rozlišením)
<b>SAM</b>	S-adenosylmethionin
<b>SAMDC</b>	S-adenosylmethionindekarboxylasa
<b>SCF</b>	„Scientific Committee on Food“ (Vědecký výbor pro potraviny, poradní orgán Evropské komise)
<b>SD</b>	směrodatná odchylka
<b>SPD</b>	spermidin
<b>SPM</b>	spermin
<b>TLC</b>	„thin layer chromatography“ (chromatografie na tenké vrstvě)
<b>TRM</b>	tryptamin
<b>TYM</b>	tyramin
<b>UPLC</b>	„ultra performance liquid chromatography“ (ultraúčinná kapalinová chromatografie)
<b>US FDA</b>	„United States Food and Drug Administration“ (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
<b>USA</b>	„United States of America“ (Spojené státy americké)
<b>VT</b>	vyšší teplota (12 °C)
<b>VÚPP</b>	Výzkumný ústav potravinářský Praha
<b>WHO</b>	„World Health Organization“ (Světová zdravotnická organizace)
<b><math>\beta</math>-záření</b>	beta záření

## 9 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Publikace související s tématem disertační práce

- Křížek, M., Matějková, K., Vácha, F., Dadáková, E. Effect of low-dose irradiation on biogenic amines formation in vacuum-packed trout flesh (*Oncorhynchus mykiss*). Food Chemistry. **2012**, 132, 367–372.
- Matějková, K., Křížek, M., Vácha, F., Dadáková, E. Effect of high-pressure treatment on biogenic amines formation in vacuum-packed trout flesh (*Oncorhynchus mykiss*). Food Chemistry. **2013**, 137, 31–36.
- Křížek, M., Matějková, K., Vácha, F., Dadáková, E. Biogenic amines formation in high-pressure processed pike flesh (*Esox lucius*) during storage. Food Chemistry. (v recenzním řízení)



## Effect of low-dose irradiation on biogenic amines formation in vacuum-packed trout flesh (*Oncorhynchus mykiss*)

Martin Křížek<sup>a,\*</sup>, Kateřina Matějková<sup>a</sup>, František Vácha<sup>b</sup>, Eva Dadáková<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Agriculture, Department of Applied Chemistry, University of South Bohemia, Branišovská 31a, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>b</sup> Faculty of Fisheries and Protection of Waters, Institute of Aquaculture, University of South Bohemia, Branišovská 31a, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 July 2011

Received in revised form 14 September 2011

Accepted 25 October 2011

Available online 2 November 2011

#### Keywords:

Biogenic amines

Polyamines

Putrescine

Histamine

Trout

Fish

Irradiation

Quality changes

### ABSTRACT

The effects of vacuum packaging followed by high-energy electron beam irradiation on the shelf-life of fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were examined. Samples were irradiated at doses of 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 and 2.0 kGy. The control and treated packs were stored at 3.5 °C for up to 28, 42, 70 and 98 days (control – 0, 0.25, 0.50 and >0.50 kGy respectively). The content of seven biogenic amines (putrescine, cadaverine, spermidine, spermine, histamine, tyramine and tryptamine) were determined. Putrescine, cadaverine and tyramine showed very good correspondence with the irradiation dose and organoleptic properties. Samples of good quality contained less than 10 mg/kg of each of these amines. The polyamines spermidine and spermine did not show statistically significant changes with the irradiation dose and the time of storage. With few exceptions, histamine was not detected in the samples treated with radiation. Tryptamine was not detected in any of the samples.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Biogenic amines (BAs) – e.g. putrescine (PUT), cadaverine (CAD), spermidine (SPD), spermine (SPM), histamine (HIM), tyramine (TYM) and tryptamine (TRM) are non-volatile organic bases which occur in protein rich food. BAs are found at low levels in tissues of fresh fish, but their formation in larger quantities is associated with decomposition of fish muscles (Kordiovská et al., 2006; Křížek, Pavlíček, & Vácha, 2002; Ozogul, Kuley, & Kenar, 2011). In spoiling fish, BAs are produced from free amino acids liberated from proteins and peptides. Bacterial decarboxylases take part in these processes rather than the tissue endogenous enzymes (Brink, Damink, Joosten, & Huis int Veld, 1990). The high content of proteins in the fish meat represents a risk of rapid formation of BAs.

#### 1.1. Biogenic amines in fish

There are two main reasons for the determination of BAs in fish: the first is their potential toxicity; the second is the possibility of using them as fish quality markers. Histamine poisoning is a world-wide medical problem and is probably the most common cause of fish poisoning (Wu, Yang, Yang, Ger, & Deng, 1997). While

marine fish have been studied in great detail, fresh water fish were studied to a much smaller extent. Bacteria, present in the water environment or introduced during the fish handling, produce histidine decarboxylase, which converts histidine to HIM, a process which is accelerated if fish are not kept chilled or frozen (Lehane, 2000). The importance of microbial contamination for the BAs formation was evident. Gutted hake (*Merluccius merluccius*) stored in ice contained 3–100 times higher contents of BAs and showed lower sensory scores compared to ungutted fish (Baixas-Nogueras, Bover-Cid, Veciana-Nogues, & Vidal-Carou, 2009). Gutting leads to an increase in the microbial contamination of the fish muscle, which results in liberation of BAs, and this is reflected in the lower sensory properties. HIM is more toxic in the presence of other BAs, viz. PUT and CAD, since these diamines may inhibit the *in vivo* mechanisms of HIM detoxification, mainly by the action of diamine oxidase (Joosten, 1988). HIM poisoning is related especially to the consumption of marine fish belonging to both Scombridae and Scomberesocidae families (Veciana-Nogues, Albala-Hurtado, Marine-Font, & Vidal-Carou, 1996).

#### 1.2. Biogenic amines and decomposition processes

Biogenic amines can serve as indicators of decomposition of fish. The potential use of BAs as quality control indices was studied for hake stored in controlled atmospheres enriched with oxygen or

\* Corresponding author. Tel.: +420 387 772 655; fax: +420 385 310 405.

E-mail address: [krizek@zf.jcu.cz](mailto:krizek@zf.jcu.cz) (M. Křížek).

stored in ice (Ruiz-Capillas & Moral, 2001a,b). The production of CAD occurred before the beginning of an evident microbial spoilage. The levels of CAD usually increased later than that of PUT, but final concentrations of CAD were generally higher. This was observed not only for hake, but also for carp (*Cyprinus carpio*) (Křížek, Vácha, Vorlová, Lukášová, & Cupáková, 2004). Similar trends were observed by Kuley, Ozogul, and Ozogul (2005) for sea bream (*Calamus bajonado*), but levels of PUT were higher at the end of storage. PUT, CAD and SPD levels increased throughout the storage period of European eel (*Anguilla anguilla*) especially in samples stored without ice. The levels present at the time the samples were rejected were 50–90 mg/kg for PUT and 30–90 mg/kg for CAD (Ozogul, Ozogul, & Gokbulut, 2006). For rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), PUT, TYM, SPD and SPM were recommended as quality indicators (Ozogul et al., 2006). No universal criterion based on BAs content has been found so far, because the dynamics of decomposition is dependent on the fish species and on the microbial population contaminating the flesh. Temperature plays the key role in BAs formation. Samples of mackerel, stored at 10 and 0 °C contained similar concentrations of BAs after 2 and 6 days, respectively (Mackie, Pirie, Ritchie, & Yamanaka, 1997). Modified atmosphere packing extends the shelf-life of the flesh. In experiments with big eye tuna (*Thunnus obesus*) stored at 2 °C, the modified atmosphere packing mixture (60% CO<sub>2</sub>, 15% O<sub>2</sub> and 25% N<sub>2</sub>) prolonged the shelf-life from 13 to 22 days, based on HIM and CAD contents and sensory evaluation (Ruiz-Capillas & Moral, 2005).

### 1.3. Irradiation of the fish flesh

The increasing quality demands required of foods, and the need for longer shelf-life periods, has led to the introduction of new preservation techniques. Irradiation was proved effective in controlling BAs levels in various foods. For food preservation, gamma rays, X-rays and accelerated electron beams can be used as sources of ionising radiation. The applied doses usually range between 0.5 and 6 kGy depending on the processed material. Doses of 4 and 6 kGy were found to be the most effective for blue cheese (Rabie, Siliha, El-Saidy, El-Badawy, & Malcata, 2011) and ripened sausage (Rabie, Siliha, El-Saidy, El-Badawy, & Malcata, 2010). Fermented soybean paste was treated with radiation doses of 5, 10 and 15 kGy. It was found that there was no need to use doses exceeding 5 kGy (Kim et al., 2003). Low-dose irradiation combined with refrigeration extends the shelf-life and keeping quality of fish (Ozogul, Ozden, Ozogul, & Erkan, 2010). Application of vacuum packaging and irradiation on chub mackerel (*Scomber japonicus*) was found to suppress the formation of BAs by five times the original value during 14 days of refrigerated storage (1 °C). The acceptability test showed that irradiation optimised the sensory quality and extended the shelf-life of the flesh by 7 days (Mbarki, Ben Miloud, Selmi, Dhib, & Sadok, 2009). The most significant result was the reduction of HIM at the selected irradiation dose (1.5 kGy). It was stated, that samples treated by low irradiation doses preserved their original fraction of poly-unsaturated fatty acids (PUFA). Higher doses (above 7 kGy) can reduce the PUFA contents by 21%. In another trial with bonito (*Sarda sarda*) irradiated at doses of up to 7.5 kGy, the HIM decrease strongly correlated with the applied dose level (Mbarki, Sadok, & Barkallah, 2008). HIM, due to its hygienic importance, is the main amine studied in connection with fish meat irradiation. A low irradiation level of 1 kGy was sufficient to effectively decrease the level of BAs content in a detailed study of irradiated Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*) (Mendes, Silva, Nunes, & Empis, 2005). Generally, the shelf-life prolongation is affected by the radiation dose, method of packaging, storage temperature and the fish species together with its aquatic origin. Several extensive reviews of toxicological

and other data by regulatory and health organisations have determined that food irradiated below 10 kGy is safe (Smith & Pillai, 2004). In the Czech Republic, the upper irradiation dose limit for fish meat is 3 kGy (Anonymous, 2004). Typical experimental doses applied on fish meat range between 0.5 and 5 kGy (Ozogul et al., 2010). This study was undertaken to assess the influence of irradiation on the formation of BAs in vacuum-packed flesh of carp. One of the objectives was to find the lowest, but still efficient dose of irradiation, sufficient for suppressing the formation of BAs and prolonging the shelf-life of carp flesh.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fish samples

#### 2.1.1. Fish production

The trout samples (*O. mykiss*) were obtained from a fish farm in Kaplice (south Bohemia, 20 km from České Budějovice). In order to ensure the best uniformity of the natural microbial load, all fish were caught in the same fish pond and were treated in the same way. The 16 month old fish of average body mass 280 g (250–310 g) were slaughtered, gutted and, after decapitation and trimming away the fishtail, the body was cut into two halves (fillets). Portions of about 20 g of muscles from the chest area served as samples.

#### 2.1.2. Sample packaging and storage

Samples were wrapped in PA/PE foil (thickness 80 μm) and sealed under vacuum, level 10 (99%). This was performed using a professional wrapping machine, Speedy 320 (BossVakuum, Bad Homburg, Germany). After irradiation, samples were placed in a refrigerated box with the thermostat set at 3.5 °C.

#### 2.1.3. Irradiation of samples

Packed samples surrounded with cooling cartridges were placed in a polystyrene box and transported immediately to the Institute of Nuclear Physics, Academy of Sciences, Prague. The overall transportation time was 5 h and the temperature in the box was maintained between 0 and 2 °C. Samples were processed in a high-energy electron beam irradiation facility using a Microtron MT 25 (cyclic electron accelerator) at a fixed energy of 10 MeV, with a dose rate of 90 Gy/min. The irradiation doses for groups of samples were: 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 and 2.0 kGy.

#### 2.1.4. Sampling

Samples were analysed in triplicate after 0 (fresh meat), 7, 14, 21, 28, 42, 70 and 98 days of storage. The experiments were designed to be dynamic. Irregular intervals of sampling were chosen due to previous experience with various food samples. At the onset of storage, the changes in contents of amines are hardly predictable. The control samples were not analysed after the 28th day of storage due to their poor sensory properties. For the same reason, samples irradiated with doses of 0.25 and 0.50 kGy were not analysed after the 42nd and 70th day respectively. The initial contents of BAs in fresh meat (day 0) were: PUT: 6.28 ± 0.90 mg/kg, CAD: ND, SPD: 3.14 ± 1.85 mg/kg, SPM: 2.82 ± 0.57 mg/kg, HIM: ND, TYM: 1.85 ± 1.97 mg/kg, TRM: ND.

### 2.2. Analytical method

#### 2.2.1. Sample extraction and derivatisation

The samples were homogenised with Ultra-Turrax T25 homogeniser (Ika Labor Technik, Staufen, Germany). Biogenic amines were extracted from homogenised material with diluted perchloric acid, p.a. (0.6 M). After filtration the volume was made up to 150 ml with perchloric acid. The amines were determined as dansyl

derivatives after derivatisation with dansyl chloride by UPLC. The procedure has been described in detail by Dadáková, Křížek, and Pelikánová (2009).

### 2.2.2. Apparatus

UPLC analyses were carried out on an Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). The system was equipped with binary pumps, a micro-vacuum degasser, a high performance autosampler and a diode array detector. Data processing was performed using ChemStation for LC 3D systems (Agilent Technologies).

### 2.3. Statistical evaluation

Samples were prepared in triplicate from one batch of fish and each sample was analysed twice. Statistical parameters were calculated using Statistica (data analysis software system) v. 9.0, StatSoft Inc. (2009).

### 2.4. Sensory tests

As 10 trained panellists are needed for fully valid evaluation, our sensory results can be understood only as complementary to the main objective of this study – the determination of chemical changes in the flesh – and were simplified to three levels: good (1), acceptable (2) and poor (3). A sensory panel consisting of three panellists evaluated the meat samples; each panellist tested all samples twice. The organoleptic properties were based on general appearance, texture, colour and odour (Table 1).

## 3. Results and discussion

In control samples (0 kGy), a steady increase in the content of PUT and TYM, and also CAD was clearly evident (Tables 2–4). The increase was observable in the HIM contents as well but there was also a considerably larger variation of measured values. The content of polyamines SPD and SPM did not show a statistically significant change with time. The vacuum-packed control samples were stable for 7 days at the selected temperature of 3.5 °C. These samples showed the first sensory signs of decay by the 14th day of storage. The PUT content exceeded the value of 20 mg/kg which was found to be critical for samples of good quality (Křížek et al., 2004). In subsequent samplings, the increase of the PUT content and the worsening of sensory indices showed similar trends. The control samples were not analysed after the 28th day due to their adverse sensory properties. The effect of radiation on the stability of samples was crucial and it was already evident at the lowest radiation doses (0.25 kGy). The samples treated with a dose of 0.25 kGy did not show signs of decay up to the 28th day. Slight deterioration was observed in the 42nd day. These samples were discarded as organoleptically unsuitable in the 70th day. On the 42nd day, when the quality of samples began to decrease, the PUT content exceeded the value of 20 mg/kg. At the same time the increase of the CAD content was also observed. HIM, which has been often monitored and discussed in relation to fish meat quality (Hwang et al., 2010; Ozogul, Kuley, & Ozogul, 2009), was not detected. Compared to the previous samplings, a remarkable

increase of TYM was found on the 42nd day, although the dispersion of measured values was larger in this sampling profile.

The samples treated with the dose of 0.50 kGy did not show any sensory signs of decay until the 42nd day of storage. These samples began to differ, significantly, in the levels of BAs, from the 0.25 kGy samples and the untreated samples (controls) after the 70th day of storage. The PUT content for the samples irradiated at a dose of 0.50 kGy ranged from 10 to 20 mg/kg (18.3 mg/kg). These values are typical and show the initial decomposition of the proteinaceous matrix (Křížek et al., 2002). The situation was similar for the CAD content (33.6 mg/kg). HIM was also detected, but in quite low concentrations (0.4 mg/kg). The TYM content exceeded 10 mg/kg (35.6 mg/kg). Both the BAs content and the organoleptic properties showed that the increase of radiation doses from 0.25 to 0.50 kGy extended the onset point of the decomposition processes from the 42nd to the 70th day.

An increase of the BAs content was not apparent for doses of 0.75 kGy for the whole experimental period of 3 months. The content of PUT did not exceed 10 mg/kg, CAD and HIM were not detected and the TYM content was below 10 mg/kg and frequently below 5 mg/kg. A similar situation was recorded in the samples treated with 1.0 and 2.0 kGy. The sensory properties of the flesh were assessed as very good (1) (Table 5), although the texture of samples stored longer than 70 days showed a decrease in elasticity.

The results reveal that radiation doses within the range of 0.25–0.50 kGy are applicable to increase the short-term shelf-life of trout flesh. Doses ranging from 0.75 to 2.0 kGy stabilise trout flesh for longer time, for a period of up to 98 days at temperature of 3.5 °C. Given the understandable requirement to use minimal radiation doses, it can be recommended to treat this kind of fish flesh by doses within the range of 0.75–1.0 kGy. A dose exceeding 1.0 kGy does not seem to be necessary. Due to the limitations (4.5 kGy for chilled uncooked meat; 3 kGy for fish meat) given by government and USDA regulations (Anonymous, 2004; Smith & Pillai, 2004), a dose within the range 0.75–1.0 kGy represents 1/4–1/3 of these permissible levels.

Polyamines SPD, SPM and PUT are natural constituents of living cells (Bardocz, 1995; Halasz, Barath, Simon-Sarkadi, & Holzapfel, 1994), so it was not surprising to find them in all the samples. Fluctuations of SPD and SPM contents were not recorded neither with the progress of time nor with the irradiation dose. These polyamines are sometimes linked with the food quality. A decrease in the SPD and SPM contents with continuing decomposition of flesh was described earlier (Mietz & Karmas, 1978). In trials with irradiated trout flesh, this trend was not observed. No statistically important decrease of SPD and SPM appeared even in the non-irradiated samples which were showing the most rapid decay. Similarly to other authors (Baixas-Nogueras, Bover-Cid, Veciana-Nogues, Marine-Font, & Vidal-Carou, 2005; Veciana-Nogues, Bover-Cid, Marine-Font, & Vidal-Carou, 2004), it seems that these polyamines are not suitable for evaluating the degradation processes. PUT was also detected in all samples. Earlier works reveal that the content of PUT and/or CAD is directly related to the decomposition of fish flesh (Baixas-Nogueras et al., 2005; Křížek et al., 2004; Ozogul et al., 2009). The influence of radiation dose to PUT content is very evident from Table 2. This table also shows the different situation applying to CAD formation. CAD is liberated from lysine by the

**Table 1**  
Sensory scheme applied by three panellists.

	Quality (sensory score)		
	Good (1)	Acceptable (2)	Poor (3)
Odour	Meaty, neutral	Neutral, slightly spicy	Fishy, repulsive
Appearance (colour/texture)	White/tightly elastic	Greyish/solid	Grey/muddy



**Table 2**  
Content of putrescine and cadaverine (mg/kg) in meat of trout (mean  $\pm$  SD;  $n = 3$ ).

	Time (days)						
	7	14	21	28	42	70	98
<i>Putrescine</i>							
0 kGy	7.0 $\pm$ 0.97 <sup>Aa</sup>	21.4 $\pm$ 3.90 <sup>Ba</sup>	36.3 $\pm$ 7.89 <sup>Ca</sup>	43.3 $\pm$ 12.3 <sup>Da</sup>	–	–	–
0.25 kGy	7.3 $\pm$ 0.10 <sup>Aabc</sup>	6.5 $\pm$ 2.08 <sup>Ab</sup>	10.8 $\pm$ 5.25 <sup>ABb</sup>	12.3 $\pm$ 1.55 <sup>Bb</sup>	21.9 $\pm$ 0.42 <sup>Ca</sup>	–	–
0.50 kGy	5.9 $\pm$ 0.72 <sup>Ab</sup>	7.8 $\pm$ 1.56 <sup>Bb</sup>	7.6 $\pm$ 1.57 <sup>Bb</sup>	11.4 $\pm$ 4.68 <sup>Bb</sup>	10.3 $\pm$ 5.77 <sup>ABbc</sup>	18.3 $\pm$ 5.20 <sup>Ca</sup>	–
0.75 kGy	5.5 $\pm$ 0.54 <sup>Ab</sup>	6.6 $\pm$ 1.78 <sup>ABb</sup>	9.2 $\pm$ 1.64 <sup>Bb</sup>	8.9 $\pm$ 3.92 <sup>ABb</sup>	8.0 $\pm$ 2.35 <sup>ABbc</sup>	10.6 $\pm$ 2.34 <sup>ABb</sup>	8.7 $\pm$ 0.01 <sup>Ba</sup>
1.0 kGy	7.9 $\pm$ 1.77 <sup>ABCabc</sup>	10.4 $\pm$ 1.65 <sup>ABCbc</sup>	7.2 $\pm$ 1.18 <sup>ABb</sup>	9.8 $\pm$ 0.48 <sup>Cb</sup>	7.0 $\pm$ 0.67 <sup>ABC</sup>	7.13 $\pm$ 0.05 <sup>Ba</sup>	6.9 $\pm$ 0.01 <sup>Ab</sup>
2.0 kGy	8.7 $\pm$ 1.03 <sup>Ac</sup>	13.0 $\pm$ 1.58 <sup>Bc</sup>	7.6 $\pm$ 1.88 <sup>ACb</sup>	9.8 $\pm$ 1.32 <sup>ABb</sup>	9.3 $\pm$ 0.58 <sup>Ab</sup>	12.0 $\pm$ 2.42 <sup>ABb</sup>	6.4 $\pm$ 0.80 <sup>Cb</sup>
<i>Cadaverine</i>							
0 kGy	6.7 $\pm$ 6.76 <sup>Aa</sup>	21.0 $\pm$ 5.47 <sup>Ba</sup>	40.8 $\pm$ 5.78 <sup>Ca</sup>	43.6 $\pm$ 13.1 <sup>Ca</sup>	–	–	–
0.25 kGy	ND	2.1 $\pm$ 3.56 <sup>Ab</sup>	11.4 $\pm$ 15.1 <sup>Ab</sup>	9.8 $\pm$ 17.0 <sup>Ab</sup>	35.4 $\pm$ 2.19 <sup>Ba</sup>	–	–
0.50 kGy	ND	ND	0.95 $\pm$ 2.34 <sup>Ab</sup>	12.8 $\pm$ 19.9 <sup>ABb</sup>	4.1 $\pm$ 7.65 <sup>Ab</sup>	33.6 $\pm$ 12.9 <sup>B</sup>	–
0.75 kGy	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1.0 kGy	ND	ND	ND	1.0 $\pm$ 0.28 <sup>Ab</sup>	2.6 $\pm$ 1.10 <sup>Ab</sup>	ND	2.0 $\pm$ 2.84 <sup>A</sup>
2.0 kGy	ND	ND	ND	1.2 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	ND	ND	ND

ND: Not detected; Means indicated by different capital letters in the same row differ significantly ( $P < 0.05$ ). Means indicated by different lowercase letters in the same column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

**Table 3**  
Content of spermidine and spermine (mg/kg) in meat of trout (mean  $\pm$  SD;  $n = 3$ ).

	Time (days)						
	7	14	21	28	42	70	98
<i>Spermidine</i>							
0 kGy	3.1 $\pm$ 0.57 <sup>Abc</sup>	3.0 $\pm$ 0.58 <sup>Aab</sup>	2.5 $\pm$ 0.20 <sup>Aa</sup>	1.8 $\pm$ 0.50 <sup>Ba</sup>	–	–	–
0.25 kGy	4.6 $\pm$ 0.34 <sup>Aa</sup>	3.6 $\pm$ 1.07 <sup>Aab</sup>	3.3 $\pm$ 1.11 <sup>Aa</sup>	6.9 $\pm$ 5.74 <sup>ABbc</sup>	2.7 $\pm$ 0.91 <sup>Aab</sup>	–	–
0.50 kGy	3.6 $\pm$ 0.44 <sup>ABb</sup>	4.8 $\pm$ 1.90 <sup>Aac</sup>	2.9 $\pm$ 0.84 <sup>ABa</sup>	3.1 $\pm$ 0.90 <sup>ABb</sup>	2.5 $\pm$ 1.00 <sup>Bab</sup>	3.2 $\pm$ 0.70 <sup>ABa</sup>	–
0.75 kGy	3.1 $\pm$ 0.19 <sup>Ac</sup>	2.8 $\pm$ 0.51 <sup>ABCb</sup>	4.3 $\pm$ 2.06 <sup>ABCa</sup>	3.9 $\pm$ 2.69 <sup>ABCabc</sup>	2.6 $\pm$ 0.19 <sup>Ba</sup>	3.3 $\pm$ 1.16 <sup>ABCab</sup>	3.8 $\pm$ 0.05 <sup>Ca</sup>
1.0 kGy	3.8 $\pm$ 0.92 <sup>ABabc</sup>	7.1 $\pm$ 1.51 <sup>Cabc</sup>	3.0 $\pm$ 0.35 <sup>Ba</sup>	6.3 $\pm$ 2.95 <sup>ABCabc</sup>	2.0 $\pm$ 0.25 <sup>Ab</sup>	2.7 $\pm$ 0.02 <sup>Ba</sup>	3.8 $\pm$ 0.38 <sup>BCa</sup>
2.0 kGy	3.9 $\pm$ 0.22 <sup>ABb</sup>	6.4 $\pm$ 0.91 <sup>Cc</sup>	3.4 $\pm$ 0.55 <sup>Aa</sup>	6.9 $\pm$ 1.34 <sup>BCc</sup>	3.4 $\pm$ 1.04 <sup>ADab</sup>	5.5 $\pm$ 0.56 <sup>CDb</sup>	3.6 $\pm$ 1.35 <sup>ADa</sup>
<i>Spermine</i>							
0 kGy	3.6 $\pm$ 0.20 <sup>Aa</sup>	1.7 $\pm$ 0.39 <sup>Bca</sup>	1.9 $\pm$ 0.14 <sup>Ba</sup>	1.5 $\pm$ 0.29 <sup>Ca</sup>	–	–	–
0.25 kGy	4.0 $\pm$ 0.31 <sup>Aa</sup>	4.1 $\pm$ 1.13 <sup>ABabc</sup>	3.1 $\pm$ 0.62 <sup>ABabc</sup>	4.6 $\pm$ 3.21 <sup>ABabc</sup>	2.2 $\pm$ 0.30 <sup>Ba</sup>	–	–
0.50 kGy	3.8 $\pm$ 0.29 <sup>Aa</sup>	5.1 $\pm$ 0.93 <sup>Bc</sup>	4.2 $\pm$ 0.30 <sup>Bc</sup>	2.9 $\pm$ 0.53 <sup>Cb</sup>	3.9 $\pm$ 0.90 <sup>ABb</sup>	4.8 $\pm$ 1.53 <sup>ABa</sup>	–
0.75 kGy	3.5 $\pm$ 0.08 <sup>Aa</sup>	3.8 $\pm$ 0.53 <sup>Ab</sup>	3.3 $\pm$ 1.58 <sup>Aabc</sup>	3.3 $\pm$ 1.52 <sup>Aab</sup>	3.3 $\pm$ 0.62 <sup>Aab</sup>	2.9 $\pm$ 0.38 <sup>Ab</sup>	11.8 $\pm$ 0.05 <sup>Ba</sup>
1.0 kGy	3.7 $\pm$ 0.47 <sup>Aa</sup>	6.6 $\pm$ 0.79 <sup>BCbc</sup>	3.2 $\pm$ 0.47 <sup>Ab</sup>	5.2 $\pm$ 2.01 <sup>ABCabc</sup>	5.6 $\pm$ 0.18 <sup>Bc</sup>	8.5 $\pm$ 0.05 <sup>Cc</sup>	9.0 $\pm$ 1.99 <sup>BCab</sup>
2.0 kGy	3.6 $\pm$ 0.29 <sup>Aa</sup>	4.9 $\pm$ 1.59 <sup>ABabc</sup>	3.1 $\pm$ 0.17 <sup>Ab</sup>	9.1 $\pm$ 2.09 <sup>BCc</sup>	4.9 $\pm$ 1.31 <sup>ABabc</sup>	9.0 $\pm$ 1.39 <sup>Cc</sup>	6.9 $\pm$ 0.96 <sup>BCb</sup>

**Table 4**  
Content of histamine and tyramine (mg/kg) in meat of trout (mean  $\pm$  SD;  $n = 3$ ).

	Time (days)						
	7	14	21	28	42	70	98
<i>Histamine</i>							
0 kGy	0.77 $\pm$ 1.88 <sup>A</sup>	57.9 $\pm$ 16.37 <sup>B</sup>	56.8 $\pm$ 43.07 <sup>Ba</sup>	103 $\pm$ 85.0 <sup>B</sup>	–	–	–
0.25 kGy	ND	ND	ND	ND	ND	–	–
0.5 kGy	ND	ND	ND	ND	ND	0.4 $\pm$ 0.19	–
0.75 kGy	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1.0 kGy	ND	ND	0.5 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND
2.0 kGy	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Tyramine</i>							
0 kGy	8.8 $\pm$ 5.65 <sup>Aa</sup>	46.6 $\pm$ 13.0 <sup>Ba</sup>	82.1 $\pm$ 20.9 <sup>Ca</sup>	122 $\pm$ 19.8 <sup>Da</sup>	–	–	–
0.25 kGy	4.4 $\pm$ 1.00 <sup>Ab</sup>	3.4 $\pm$ 1.18 <sup>ABb</sup>	5.4 $\pm$ 5.06 <sup>ABCbc</sup>	1.5 $\pm$ 0.75 <sup>Bbc</sup>	54.2 $\pm$ 25.5 <sup>Cabc</sup>	–	–
0.5 kGy	2.9 $\pm$ 1.21 <sup>Ab</sup>	3.0 $\pm$ 0.27 <sup>Ab</sup>	2.1 $\pm$ 1.17 <sup>Ab</sup>	4.9 $\pm$ 1.31 <sup>Bd</sup>	8.7 $\pm$ 15.2 <sup>ABabc</sup>	35.6 $\pm$ 11.9 <sup>Ca</sup>	–
0.75 kGy	2.7 $\pm$ 1.04 <sup>ABbc</sup>	2.8 $\pm$ 1.73 <sup>ABbc</sup>	1.3 $\pm$ 0.20 <sup>ABb</sup>	1.4 $\pm$ 0.27 <sup>ABc</sup>	6.7 $\pm$ 1.98 <sup>ACa</sup>	1.9 $\pm$ 0.76 <sup>Bbc</sup>	7.2 $\pm$ 0.05 <sup>Ca</sup>
1.0 kGy	0.8 $\pm$ 0.48 <sup>Ac</sup>	0.4 $\pm$ 0.09 <sup>Ac</sup>	0.4 $\pm$ 0.10 <sup>Ac</sup>	0.7 $\pm$ 1.04 <sup>ABCbc</sup>	1.8 $\pm$ 0.35 <sup>Bb</sup>	2.8 $\pm$ 0.05 <sup>Cb</sup>	4.1 $\pm$ 2.72 <sup>ABCab</sup>
2.0 kGy	0.5 $\pm$ 0.26 <sup>Ac</sup>	0.4 $\pm$ 0.05 <sup>Ac</sup>	0.7 $\pm$ 0.14 <sup>Ac</sup>	0.3 $\pm$ 0.02 <sup>Ab</sup>	0.9 $\pm$ 0.22 <sup>ABC</sup>	1.3 $\pm$ 0.18 <sup>Bc</sup>	2.3 $\pm$ 0.45 <sup>Cb</sup>

action of bacterial decarboxylases. In living cells, it is present in much lower quantities compared to other polyamines (Kusano, Berberich, Tateda, & Takahashi, 2008). For these reasons it was not detected in fresh trout meat and in samples of good quality. In any case, the CAD content increases with the disintegration of sample proteins. By comparison with PUT, the CAD values showed a larger dispersion of values measured in parallel. Similarly to PUT,

the increase of the CAD content followed the worsening of quality of stored samples. However, it appears that changes in the content of PUT took place more fluently compared to that of CAD. It was typical for the dynamics of CAD formation that good quality samples contained this amine below the detection limit; the increase of CAD in samples of inferior quality was much more intensive compared with that of PUT.

**Table 5**  
Sensory score of samples (1 is the best).

	Time (days)						
	7	14	21	28	42	70	98
0 kGy	1	2	3	–	–	–	–
0.25 kGy	1	1	1	2	2	–	–
0.5 kGy	1	1	1	1	1	2	3
0.75 kGy	1	1	1	1	1	1	1
1.0 kGy	1	1	1	1	1	1	1
2.0 kGy	1	1	1	1	1	1	1

TRM was not detected in any of the samples while HIM differed markedly from the other amines. With few exceptions, this amine was not detected in the samples treated with radiation. Even a dose of 0.25 kGy effectively suppressed its formation. The formation of HIM, which has been very typical and monitored for marine fish – especially scombroid species, was observed only in non-irradiated trout samples. Non-irradiated samples stored for 14 days showed signs of beginning sensory deterioration. The HIM content was 57.9 mg/kg, which is markedly below the 100 mg/kg limit that is set by the regulation (Anonymous, 1991). This limit was exceeded after 28 days of storage, at a time when samples would not be acceptable by the consumer. The HIM content did not precede the sensory changes of samples so it does not seem to be a good quality marker for trout meat. However, HIM in trout flesh does not represent a similar risk for consumers as it does in the case of scombroid fish.

An interesting trend was observed for TYM. This amine was detected in all samples, though often in amounts near the detection limits. The trends in TYM formation in relation to the storage period and the irradiation dose were very similar to that of PUT and CAD. The dominance of TYM, PUT and CAD in samples of inferior quality resembled the results of Baixas-Nogueras et al. (2009) working with gutted and ungutted hake. In irradiated samples of good quality, the TYM content did not exceed the value of 10 mg/kg, which is very similar value to PUT or CAD. Samples showing the first sensory signs of decay contained 10–50 mg/kg of TYM. In spoiled samples (sensory level 3), the TYM content exceeded the value of 50 mg/kg. The formation of TYM used to be associated with the action of lactobacilli (Roig-Sagues, Ruiz-Capillas, Espinosa, & Hernandez, 2009). These micro-organisms may contaminate the fish flesh in processing plants even when good hygiene practices are followed. The contents of three of the monitored BAs – PUT, CAD and TYM corresponded very well with the organoleptic characteristics of the stored samples and the radiation dose used. For high quality samples the contents of each of these amines was below 10 mg/kg.

#### 4. Conclusions

The contents of biogenic amines in vacuum-packed trout meat stored at 3.5 °C can be noticeably reduced by the application of high-energy electron beam irradiation. The concentrations of the most toxicologically important biogenic amines HIM and TYM did not exceed the value of 1 and 10 mg/kg respectively for those samples with good organoleptic properties. The samples of good quality did not exceed 10–20 mg/kg of either PUT or CAD. Considering the biogenic amines content, the doses within the range of 0.75–1.0 kGy prolonged the shelf-life of the trout flesh by up to 70–98 days respectively. Higher irradiation doses, though within the regulation rules, seem to be redundant.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the projects 600 766 5806 from the Czech Ministry of Education, P503/11/

1417 of the Czech Science Foundation GACR, NAZV QH71011 and GAJU 067/2010/Z.

#### References

- Anonymous (1991). Council Directive 91/493/EEC Official Journal of the European Communities, 268, 15–34.
- Anonymous (2004). Vyhláška o podmínkách ozařování potravin a surovin, o nejvyšší přípustné dávce záření a o způsobu označení ozáření na obalu. *Sbírka zákonů*, vol. 133 (pp. 1758–1762).
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, M. T., Marine-Font, A., & Vidal-Carou, M. C. (2005). Biogenic amine index for freshness evaluation in iced Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Food Protection*, 68(11), 2433–2438.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, 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. *Mediterraneus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*, 72(8), 1671–1676.
- Bardocz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science & Technology*, 6(10), 341–346.
- Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., & Huis int Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11(1), 73–84.
- Dadáková, E., Křížek, M., & Pelikánová, T. (2009). Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, 116(1), 365–370.
- Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., & Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 5(2), 42–49.
- Hwang, C. C., Lee, Y. C., Huang, Y. R., Lin, C. M., Shiau, C. Y., Hwang, D. F., et al. (2010). Biogenic amines content, histamine-forming bacteria and adulteration of bonito in tuna candy products. *Food Control*, 21(6), 845–850.
- Joosten, H. M. L. J. (1988). The biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 42(1), 25–42.
- Kim, J. H., Ahn, H. J., Kim, D. H., Jo, C., Yook, H. S., Park, H. J., et al. (2003). Irradiation effects on biogenic amines in Korean fermented soybean paste during fermentation. *Journal of Food Science*, 68(1), 80–84.
- Kordiovská, P., Vorlová, L., Borkovcová, I., Karpíšková, R., Buchtová, H., Svobodová, Z., et al. (2006). The dynamics of biogenic amine formation in muscle tissue of carp (*Cyprinus carpio*). *Czech Journal of Animal Science*, 51(6), 262–270.
- Křížek, M., Pavlíček, T., & Vácha, F. (2002). Formation of selected biogenic amines in carp meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(9), 1088–1093.
- 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.
- Kuley, E., Ozogul, F., & Ozogul, Y. (2005). Effects of aluminium foil and cling film on biogenic amines and nucleotide degradation products in gutted sea bream stored at 2 ± 1 degrees C. *European Food Research and Technology*, 221(5), 582–591.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: Essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367–381.
- Lehane, L. (2000). Update on histamine fish poisoning. *Medical Journal of Australia*, 173(3), 149–152.
- Mackie, I. M., Pirie, L., Ritchie, A. H., & Yamanaka, H. (1997). The formation of non-volatile amines in relation to concentrations of free basic amino acids during postmortem storage of the muscle of scallop (*Pecten maximus*), herring (*Clupea harengus*) and mackerel (*Scomber scombrus*). *Food Chemistry*, 60(3), 291–295.
- Mbarki, R., Ben Miloud, N., Selmi, S., Dhib, S., & Sadok, S. (2009). Effect of vacuum packaging and low-dose irradiation on the microbial, chemical and sensory characteristics of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Food Microbiology*, 26(8), 821–826.
- Mbarki, R., Sadok, S., & Barkallah, I. (2008). Influence of gamma irradiation on microbiological, biochemical, and textural properties of Bonito (*Sarda sarda*) during chilled storage. *Food Science and Technology International*, 14(4), 367–373.
- Mendes, R., Silva, H. A., Nunes, M. L., & Empis, J. M. A. (2005). Effect of low-dose irradiation and refrigeration on the microflora, sensory characteristics and biogenic amines of Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *European Food Research and Technology*, 221(3–4), 329–335.
- Mietz, J. L., & Karmas, E. (1978). Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 61(1), 139–145.
- Ozogul, F., Kuley, E., & Kenar, M. (2011). Effects of rosemary and sage tea extract on biogenic amines formation of sardine (*Sardina pilchardus*) filets. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(4), 761–766.
- Ozogul, Y., Kuley, E., & Ozogul, F. (2009). Quality changes of marinated Tench (*Tinca tinca*) during refrigerated storage. *Food Science and Technology International*, 15(5), 513–521.
- Ozogul, F., Ozden, O., Ozogul, Y., & Erkan, N. (2010). Nucleotide degradation products of gamma-irradiated sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(11), 2290–2296.
- Ozogul, Y., Ozogul, F., & Gokbulut, C. (2006). Quality assessment of wild European eel (*Anguilla anguilla*) stored in ice. *Food Chemistry*, 95(3), 458–465.
- Rabie, M. A., Siliha, H., El-Saidy, S., El-Badawy, A. A., & Malcata, F. X. (2010). Effects of gamma-irradiation upon biogenic amine formation in Egyptian ripened sausages during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(4), 661–665.

- Rabie, M. A., Siliha, H. I., El-Saidy, S. M., El-Badawy, A. A., & Malcata, F. X. (2011). Effect of gamma-irradiation upon biogenic amine formation in blue cheese during storage. *International Dairy Journal*, 21(5), 373–376.
- Roig-Sagues, A. X., Ruiz-Capillas, C., Espinosa, D., & Hernandez, M. (2009). The decarboxylating bacteria present in foodstuffs and the effect of emerging technologies on their formation. In G. Dandriofosse (Ed.), *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates* (pp. 1–30). Trivandrum, India: Transworld Research Network.
- Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. (2001a). Effect of controlled atmospheres enriched with O<sub>2</sub> in formation of biogenic amines in chilled hake (*Merluccius merluccius* L.). *European Food Research and Technology*, 212(5), 546–550.
- Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. (2001b). Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius*, L.) stored in ice. *Journal of Food Science*, 66(7), 1030–1032.
- Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. (2005). Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chemistry*, 89(3), 347–354.
- Smith, J. S., & Pillai, S. (2004). Irradiation and food safety. *Food Technology*, 58(11), 48–55.
- Veciana-Nogues, M. T., Albala-Hurtado, S., Marine-Font, A., & Vidal-Carou, M. C. (1996). Changes in biogenic amines during the manufacture and storage of semipreserved anchovies. *Journal of Food Protection*, 59(11), 1218–1222.
- Veciana-Nogues, M. T., Bover-Cid, S., Marine-Font, A., & Vidal-Carou, M. C. (2004). Biogenic amine production by *Morganella morganii* and *Klebsiella oxytoca* in tuna. *European Food Research and Technology*, 218(3), 284–288.
- Wu, M. L., Yang, C. C., Yang, G. Y., Ger, J., & Deng, J. F. (1997). Scombroid fish poisoning: An overlooked marine food poisoning. *Veterinary and Human Toxicology*, 39(4), 236–241.



## Effect of high-pressure treatment on biogenic amines formation in vacuum-packed trout flesh (*Oncorhynchus mykiss*)

Kateřina Matějková<sup>a</sup>, Martin Křížek<sup>a,\*</sup>, František Vácha<sup>b</sup>, Eva Dadáková<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Agriculture, Department of Applied Chemistry, University of South Bohemia, Branišovská 31a, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>b</sup> Faculty of Fisheries and Protection of Waters, Institute of Aquaculture, University of South Bohemia, Branišovská 31a, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 July 2012

Received in revised form 6 September 2012

Accepted 8 October 2012

Available online 16 October 2012

#### Keywords:

Biogenic amines

Polyamines

Putrescine

Histamine

Trout

Fish

High pressure processing

High hydrostatic pressure

HHP

Quality changes

### ABSTRACT

The effects of vacuum packaging followed by high pressure processing on the shelf-life of fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were examined. Samples were pressure-treated at 300 and 500 MPa and were stored at 3.5 and 12 °C for up to 28 days (control – 0 MPa) and 42 or 70 days (pressure-treated; 12 and 3.5 °C resp.). The content of eight biogenic amines (putrescine, cadaverine, spermidine, spermine, histamine, tyramine, tryptamine and phenylethylamine) were determined. Putrescine, cadaverine and tyramine showed very good correspondence with the level of applied pressure and organoleptic properties. Samples of very good quality contained less than 10 mg/kg of each of these amines. Polyamines spermidine and spermine did not show statistically significant changes with the level of applied pressure and the time of storage. Tryptamine, phenylethylamine and histamine (with the single exception of a sample stored for 70 days) were not detected in pressure-treated samples kept at 3.5 °C.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Biogenic amines (BAs) – such as putrescine (PUT), cadaverine (CAD), spermidine (SPD), spermine (SPM), histamine (HIM), tyramine (TYM), tryptamine (TRM) and phenylethylamine (PEA) are widely distributed in proteinaceous foods. BAs are formed by decarboxylation of amino acids as a result of metabolic processes in plants and microorganisms. In stored flesh, amines are generated by the action of spoilage bacteria decarboxylases. There are two main reasons for amine determination in foods. The first is their potential toxicity, the second is the possibility to use them as decomposition markers.

#### 1.1. Biogenic amines in fish

Amines are found at very low levels in fresh fish, and their accumulation is associated with bacterial spoilage (Prester, 2011). The quality of the raw material, time and temperature of storage are critical to the accumulation of BAs (Pons-Sanchez-Cascado, Veciana-Nogues, & Vidal-Carou, 2003). Gutting of fish leads to an increase in the microbial contamination of its flesh, which results

in liberation of BAs, and this is reflected in the lower sensory properties.

Biogenic amines can serve as indicators of decomposition of fish. PUT, CAD, HIM and TYM are most often discussed in this context (Gokoglu, Yerlikaya, & Cengiz, 2004). CAD may be regarded as the specific spoilage marker for hake (*Merluccius merluccius*) stored at chilling temperatures, however, for this kind of preservation the sum of PUT, CAD, HIM and TYM contents seems to be a better indicator of spoilage (Baixas-Nogueras, Bover-Cid, Veciana-Nogues, Marine-Font, & Vidal-Carou, 2005). The levels of CAD usually increase later than that of PUT, but final concentrations of CAD are generally higher. These trends were observed not only for marine, but also for fresh water species (Baixas-Nogueras, Bover-Cid, Veciana-Nogues, & Vidal-Carou, 2002; Kuley, Ozogul, & Ozogul, 2005; Křížek, Vácha, Vorlová, Lukášová, & Cupáková, 2004). While marine fish have been studied in great detail, fresh water fish have been studied to a much smaller extent. For rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), PUT, TYM, SPD and SPM were recommended as quality indicators (Chytiri, Paleologos, Savvaidis, & Kontominas, 2004). The calculated, combined criterion correlated with the sensory rejection time for rainbow trout (Katikou, Georgantelis, Paleologos, Ambrosiadis, & Kontominas, 2006) and for carp (Křížek, Pavlíček, & Vácha, 2002). PUT, CAD and SPD levels increased throughout the storage period of European eel (*Anguilla*

\* Corresponding author. Tel.: +420 387 772 655; fax: +420 385 310 405.

E-mail address: [krizek@zf.jcu.cz](mailto:krizek@zf.jcu.cz) (M. Křížek).

*anguilla*), especially in samples stored without ice. The levels present at the time the samples were rejected were 50–90 mg/kg for PUT and 30–90 mg/kg for CAD (Ozogul, Ozogul, & Gokbulut, 2006b). For rainbow trout (*O. mykiss*), PUT, TYM, SPD and SPM were recommended as quality indicators (Ozogul, Ahmad, Hole, Ozogul, & Deguara, 2006a).

### 1.2. Influence of high-pressure treatment on foods

When high hydrostatic pressures (100–1000 MPa) are applied to packages of food submerged in a liquid, the pressure is distributed uniformly throughout the food, so that all parts receive the same treatment (Fellows, 2009). For inactivation of most of the gram-negative bacteria, sufficient pressures are around 300 MPa, yeasts and moulds need pressures around 400 MPa, gram-positive bacteria are destroyed at pressures above 500 MPa. Bacterial spores can be resistant to very high pressures, even higher than 1000 MPa (Cheftel, 1992).

Destructive effect of high pressure on microorganisms is based primarily on inactivation of enzymes, damage of DNA, RNA, ribosomes, and the destruction of membranes and cell walls. Destruction is caused by rapid changes in cell volume and denaturation of proteins in membranes and cell walls (Cheftel & Culioli, 1997; Fellows, 2009).

Information on the formation of BAs in meat or meat products that were treated by high pressure is scarce. BAs were determined in samples of smoked cod (*Gadus morhua*), treated at 400, 500 and 600 MPa (Montiel, De Alba, Bravo, Gaya, & Medina, 2012). Surprisingly, only TRM and SPM were detected, elevated contents of TRM were found especially in high-pressure treated samples. Changes in BAs concentration did not show a clear tendency as a result of the storage period. An extensive study was performed on meat products – frankfurters, sausages and ham. Contrary to control samples of frankfurter, TYM, PUT and CAD in processed samples (400 MPa) did not exhibit concentration changes throughout the storage period (Ruiz-Capillas, Carballo, & Jimenez-Colmenero, 2007b). Similar results were found in samples of dry-cured “chorizo” sausage, but moreover, an increase of SPD content was recorded (Ruiz-Capillas, Colmenero, Carrascosa, & Munoz, 2007c). In spite of the fact that microbial load did not increase in the pressurized samples, the BAs load did, possibly due to continuing decarboxylase activity in the substrate. In a study of vacuum-packaged cooked sliced ham treated by 400 MPa the fluctuation of storage temperature was tested (2–12 °C). This simulation of temperature abuses showed, that TYM might be the best marker of such processes (Ruiz-Capillas, Carballo, & Colmenero, 2007a). Similarly to preserved vegetable foodstuffs (sauerkraut fermented shredded cabbage) (Kalač, Špička, Křížek, & Pelikánová, 2000; Špička, Kalač, Bover-Cid, & Křížek, 2002), experiments with the inoculation of trout fillets with lactic acid bacteria were conducted (Kuley, Ozogul, Ozogul, & Akyol, 2011). Contrary to the example of sauerkraut inoculated with lactic acid bacteria, in inoculated trout fillets the suppression of BAs formation was not observed.

The aim of this work is extending knowledge of the dynamics of decomposition processes in fish flesh preserved by less traditional technology.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fish samples

#### 2.1.1. Fish production

The trout samples (*O. mykiss*) were obtained from a fish farm in Kaplice (south Bohemia). In order to ensure the best uniformity of the natural microbial load, all fish were caught in the same fish

pond and were treated in the same way. The 16-month-old fish of average body mass 280 g (250–310 g) were slaughtered, gutted and, after decapitation and cutting off the caudal part, the body was cut into two halves. Portions of about 20 g of muscles from the dorsal to abdominal side, ca 3 cm wide with the skin and bones were used as samples.

#### 2.1.2. Sample packaging and storage

Samples were wrapped in PA/PE foil (thickness 80 µm) and sealed under vacuum, level 10 (99%). This was performed using a professional wrapping machine, Speedy 320 (BossVakuum, Bad Homburg, Germany). After high-pressure treatment, samples were placed in two refrigerated boxes with thermostats set at 3.5 and 12 °C.

#### 2.1.3. High-pressure treatment

Packed samples surrounded with cooling cartridges were placed in a polystyrene box and transported immediately to the Food Research Institute, Prague. The overall transportation time was 5 h and the temperature in the box was maintained between 0 and 2 °C. The packed samples were HP-treated at 300 and 500 MPa for 10 min at 20 °C in a high-pressure processor (CYX 6/0103, made by ZDAS, Žďár n. Sázavou, Czech Republic) using water as the pressure-transmitting medium. The pressure vessel (diameter 90 mm, height 320 mm) had a 2 l capacity and the maximum operating pressure was 600 MPa. The rate of pressure increase was 8.3 MPa/s, and the depressurization time was less than 4 s. The control samples were held for 10 min at ambient pressure (0.1 MPa) at 20 °C.

#### 2.1.4. Sampling

Samples were analysed in triplicate after 0 (fresh meat), 7, 14, 21, 28, 42 and 70 of storage. The experiments were designed to be dynamic. Irregular intervals of sampling were chosen due to previous experience with various food samples. At the onset of storage, the changes in contents of amines are hardly predictable. The control samples were not analysed after the 28th day of storage due to their poor sensory properties. For the same reason, HP-treated samples kept at 12 °C were not analysed after the 42nd day.

## 2.2. Analytical method

### 2.2.1. Sample extraction and derivatisation

The samples were homogenised with an Ultra-Turrax T25 homogeniser (Ika Labortechnik, Staufen, Germany). Biogenic amines were extracted from the homogenised material with diluted perchloric acid, p.a. (0.6 M) (Acros, Geel, Belgium). After filtration, the volume was made up to 150 ml with perchloric acid (0.6 M). The amines were determined as dansyl derivatives after derivatisation with dansyl chloride by UPLC (column: Agilent Zorbax Eclipse XDB C<sub>18</sub>; 50 × 4.6 mm ID, 1.8 µm particle size). The procedure has been described in detail by Dadáková, Křížek, and Pelikánová (2009).

### 2.2.2. Apparatus

UPLC analyses were carried out on an Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). The system was equipped with binary pumps, a microvacuum degasser, a high performance autosampler and a diode array detector. Data processing was performed using a ChemStation for LC 3D systems (Agilent Technologies).

## 2.3. Statistical evaluation

Samples were prepared in triplicate from one batch of fish and each sample was analysed twice. The statistical parameters were

**Table 1**  
Sensory scheme applied by three panellists.

	Quality (sensory score)		
	Good (1)	Acceptable (2)	Poor (3)
Odour	Meaty, neutral	Neutral, slightly spicy	Fishy, repulsive
Appearance (colour/texture)	White/tightly elastic	Greyish/solid	Gray/muddy

calculated using Statistica (data analysis software system) v. 9.0, Stat-Soft Inc. (2009).

#### 2.4. Sensory tests

As 10 trained panellists are needed for fully valid evaluation, our sensory results can be understood only as complementary to the main objective of this study – the determination of chemical changes in the flesh – and were simplified to three levels: good (1), acceptable (2) and poor (3). A sensory panel consisting of three panellists evaluated the meat samples; each panellist tested all samples twice. The organoleptic properties were based on general appearance, texture, colour and odour (Table 1).

**Table 2**  
Content of putrescine and cadaverine (mg/kg) in meat of trout (mean  $\pm$  SD;  $n = 3$ ).  $T_1 = 3.5$  °C,  $T_2 = 12$  °C.

	Time (days)					
	7	14	21	28	42	70
<i>Putrescine</i>						
0 MPa ( $T_1$ )	5.7 $\pm$ 0.74 <sup>Aa</sup>	14.6 $\pm$ 2.68 <sup>Ba</sup>	24.6 $\pm$ 8.90 <sup>BCa</sup>	34.9 $\pm$ 9.10 <sup>Ca</sup>	–	–
300 MPa ( $T_1$ )	4.7 $\pm$ 1.34 <sup>Aa</sup>	4.2 $\pm$ 1.00 <sup>Ab</sup>	8.4 $\pm$ 2.11 <sup>Ab</sup>	16.0 $\pm$ 2.76 <sup>Ba</sup>	53.3 $\pm$ 13.4 <sup>Ca</sup>	47.0 $\pm$ 37.7 <sup>ABCa</sup>
500 MPa ( $T_1$ )	4.1 $\pm$ 0.28 <sup>Aa</sup>	4.4 $\pm$ 0.36 <sup>Ab</sup>	8.7 $\pm$ 1.22 <sup>Bb</sup>	6.5 $\pm$ 0.07 <sup>Bb</sup>	7.4 $\pm$ 0.50 <sup>Bb</sup>	29.8 $\pm$ 25.5 <sup>ABa</sup>
0 MPa ( $T_2$ )	32.4 $\pm$ 6.79 <sup>Aa</sup>	88.5 $\pm$ 22.2 <sup>Ba</sup>	97.4 $\pm$ 9.95 <sup>Ba</sup>	225 $\pm$ 73.1 <sup>Ba</sup>	–	–
300 MPa ( $T_2$ )	17.3 $\pm$ 2.58 <sup>Ab</sup>	34.7 $\pm$ 12.5 <sup>ABb</sup>	52.2 $\pm$ 13.6 <sup>Bb</sup>	113 $\pm$ 22.6 <sup>Ca</sup>	177 $\pm$ 21.5 <sup>Da</sup>	–
500 MPa ( $T_2$ )	5.4 $\pm$ 0.64 <sup>Ac</sup>	14.1 $\pm$ 9.79 <sup>ABb</sup>	15.0 $\pm$ 13.9 <sup>ABc</sup>	10.6 $\pm$ 1.51 <sup>Bb</sup>	12.9 $\pm$ 3.69 <sup>ABb</sup>	–
<i>Cadaverine</i>						
0 MPa ( $T_1$ )	8.8 $\pm$ 4.78 <sup>A</sup>	33.7 $\pm$ 4.03 <sup>B</sup>	79.4 $\pm$ 61.5 <sup>ABCa</sup>	67.7 $\pm$ 10.0 <sup>Ca</sup>	–	–
300 MPa ( $T_1$ )	ND	ND	3.7 $\pm$ 0.42 <sup>Aa</sup>	11.0 $\pm$ 10.3 <sup>Ab</sup>	84.0 $\pm$ 61.3 <sup>A</sup>	71.8 $\pm$ 64.6 <sup>Aa</sup>
500 MPa ( $T_1$ )	ND	ND	ND	ND	ND	114 $\pm$ 103 <sup>a</sup>
0 MPa ( $T_2$ )	69.9 $\pm$ 15.6 <sup>Aa</sup>	179 $\pm$ 19.4 <sup>Ba</sup>	239 $\pm$ 57.6 <sup>BCa</sup>	352 $\pm$ 65.3 <sup>Ca</sup>	–	–
300 MPa ( $T_2$ )	59.3 $\pm$ 10.4 <sup>Aa</sup>	165 $\pm$ 6.26 <sup>Ba</sup>	172 $\pm$ 90.2 <sup>ABCa</sup>	341 $\pm$ 67.4 <sup>CDa</sup>	478 $\pm$ 74.5 <sup>D</sup>	–
500 MPa ( $T_2$ )	ND	43.3 $\pm$ 75.1 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	–

ND: not detected; Means indicated by different capital letters in the same row differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Means indicated by different lowercase letters in the same column (for respective temperature) differ significantly ( $P < 0.05$ ).

**Table 3**  
Content of histamine and tyramine (mg/kg) in meat of trout (mean  $\pm$  SD;  $n = 3$ ).  $T_1 = 3.5$  °C,  $T_2 = 12$  °C.

	Time (days)					
	7	14	21	28	42	70
<i>Histamine</i>						
0 MPa ( $T_1$ )	ND	1.1 $\pm$ 1.95	2.4 $\pm$ 4.07	17.5 $\pm$ 6.86	–	–
300 MPa ( $T_1$ )	ND	ND	ND	ND	ND	ND
500 MPa ( $T_1$ )	ND	ND	ND	ND	ND	1.8 $\pm$ 3.06
0 MPa ( $T_2$ )	133 $\pm$ 95.0 <sup>Aa</sup>	212 $\pm$ 51.9 <sup>Aa</sup>	150 $\pm$ 79.1 <sup>Aa</sup>	113 $\pm$ 48.8 <sup>Aa</sup>	–	–
300 MPa ( $T_2$ )	2.0 $\pm$ 3.49 <sup>Aa</sup>	7.0 $\pm$ 6.78 <sup>Ab</sup>	0.9 $\pm$ 1.60 <sup>Aa</sup>	2.4 $\pm$ 4.21 <sup>Ab</sup>	5.1 $\pm$ 5.34 <sup>Aa</sup>	–
500 MPa ( $T_2$ )	ND	ND	36.7 $\pm$ 34.2 <sup>Aa</sup>	2.5 $\pm$ 4.25 <sup>Ab</sup>	13.9 $\pm$ 24.2 <sup>Aa</sup>	–
<i>Tyramine</i>						
0 MPa ( $T_1$ )	2.4 $\pm$ 2.83 <sup>Aa</sup>	12.4 $\pm$ 5.04 <sup>Ba</sup>	21.2 $\pm$ 0.96 <sup>Ba</sup>	62.9 $\pm$ 15.3 <sup>Ca</sup>	–	–
300 MPa ( $T_1$ )	6.3 $\pm$ 4.00 <sup>Aa</sup>	10.4 $\pm$ 3.80 <sup>Aa</sup>	29.6 $\pm$ 11.6 <sup>Aa</sup>	45.7 $\pm$ 22.6 <sup>Aab</sup>	137 $\pm$ 41.1 <sup>Ba</sup>	203 $\pm$ 172 <sup>ABa</sup>
500 MPa ( $T_1$ )	1.5 $\pm$ 0.32 <sup>Aa</sup>	3.0 $\pm$ 2.00 <sup>ABa</sup>	1.5 $\pm$ 0.86 <sup>Ab</sup>	6.7 $\pm$ 2.41 <sup>ABb</sup>	4.9 $\pm$ 1.44 <sup>Bb</sup>	67.8 $\pm$ 113 <sup>ABa</sup>
0 MPa ( $T_2$ )	81.8 $\pm$ 14.7 <sup>Aa</sup>	243 $\pm$ 66.2 <sup>Ba</sup>	286 $\pm$ 71.6 <sup>Ba</sup>	367 $\pm$ 135 <sup>ABa</sup>	–	–
300 MPa ( $T_2$ )	58.8 $\pm$ 8.84 <sup>Aa</sup>	149 $\pm$ 77.7 <sup>ABab</sup>	240 $\pm$ 87.5 <sup>ABb</sup>	290 $\pm$ 22.6 <sup>Ba</sup>	537 $\pm$ 100 <sup>Ca</sup>	–
500 MPa ( $T_2$ )	2.0 $\pm$ 0.21 <sup>Ab</sup>	9.0 $\pm$ 8.65 <sup>Bb</sup>	63.1 $\pm$ 76.8 <sup>Bb</sup>	156 $\pm$ 72.6 <sup>Ba</sup>	210 $\pm$ 196 <sup>Ba</sup>	–

ND: not detected; Means indicated by different capital letters in the same row differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Means indicated by different lowercase letters in the same column (for respective temperature) differ significantly ( $P < 0.05$ ).

### 3. Results and discussion

Samples of trout flesh were analyzed in triplicate. The initial contents of BAs in fresh meat of trout (day 0) were: PUT:  $5.21 \pm 0.56$  mg/kg, CAD: ND, SPD:  $2.98 \pm 0.70$  mg/kg, SPM:  $4.27 \pm 1.91$  mg/kg, HIM: ND, TYM:  $2.52 \pm 1.77$  mg/kg, TRM: ND. The mean amine contents for control and pressure-treated samples at both temperatures are given in Tables 2–5.

#### 3.1. Putrescine, cadaverine and tyramine

PUT, CAD and TYM, the dominant amines in trout flesh, reached lower values during the storage of pressure treated samples at lower temperature (3.5 °C). In most of the samples, a steady increase of the content of PUT, CAD and TYM was evident during the storage, regardless of temperature and the applied pressure. Substantial differences were found in the extent of amines formation.

In the current study of trout flesh, at the selected temperature of 3.5 °C, vacuum-packed control samples were stable for 7–14 days. These samples showed the first sensory signs of decay by the 21st day of storage. In subsequent samplings, the increase of PUT content and the worsening of sensory indices showed similar trends (Tables 2 and 6). Control samples were not analyzed after the 28th day due to their adverse sensory properties. The

**Table 4**  
Content of spermidine and spermine (mg/kg) in meat of trout (mean  $\pm$  SD;  $n = 3$ ,  $T_1 = 3.5$  °C,  $T_2 = 12$  °C).

	Time (days)					
	7	14	21	28	42	70
<i>Spermidine</i>						
0 MPa ( $T_1$ )	2.4 $\pm$ 0.14 <sup>Aa</sup>	2.3 $\pm$ 0.48 <sup>Aa</sup>	2.1 $\pm$ 2.00 <sup>Aa</sup>	2.2 $\pm$ 2.00 <sup>Aa</sup>	–	–
300 MPa ( $T_1$ )	2.4 $\pm$ 0.26 <sup>Aa</sup>	2.7 $\pm$ 0.60 <sup>Aa</sup>	5.1 $\pm$ 1.97 <sup>Aa</sup>	3.1 $\pm$ 0.74 <sup>Aa</sup>	3.3 $\pm$ 1.34 <sup>Aa</sup>	2.3 $\pm$ 0.41 <sup>Aa</sup>
500 MPa ( $T_1$ )	1.9 $\pm$ 0.29 <sup>Aa</sup>	2.6 $\pm$ 0.63 <sup>ABa</sup>	5.7 $\pm$ 2.07 <sup>ABa</sup>	4.9 $\pm$ 1.22 <sup>Ba</sup>	4.0 $\pm$ 2.34 <sup>ABa</sup>	2.4 $\pm$ 0.66 <sup>ABa</sup>
0 MPa ( $T_2$ )	1.1 $\pm$ 0.70 <sup>Aa</sup>	ND	0.5 $\pm$ 0.90 <sup>Aa</sup>	ND	–	–
300 MPa ( $T_2$ )	1.9 $\pm$ 0.28 <sup>Aa</sup>	ND	1.2 $\pm$ 1.05 <sup>Aa</sup>	ND	1.8 $\pm$ 3.17 <sup>Aa</sup>	–
500 MPa ( $T_2$ )	2.2 $\pm$ 0.34 <sup>Aa</sup>	2.4 $\pm$ 0.29 <sup>A</sup>	1.6 $\pm$ 0.43 <sup>Aa</sup>	2.2 $\pm$ 3.88 <sup>A</sup>	2.0 $\pm$ 3.45 <sup>Aa</sup>	–
<i>Spermine</i>						
0 MPa ( $T_1$ )	3.3 $\pm$ 0.46 <sup>Aa</sup>	3.3 $\pm$ 0.54 <sup>Aa</sup>	2.3 $\pm$ 0.50 <sup>Aa</sup>	2.3 $\pm$ 1.97 <sup>Aa</sup>	–	–
300 MPa ( $T_1$ )	6.8 $\pm$ 1.41 <sup>ABb</sup>	9.7 $\pm$ 2.27 <sup>Ab</sup>	7.0 $\pm$ 1.67 <sup>ABb</sup>	9.6 $\pm$ 2.07 <sup>Ab</sup>	8.4 $\pm$ 4.21 <sup>ABa</sup>	2.4 $\pm$ 2.48 <sup>Ba</sup>
500 MPa ( $T_1$ )	3.8 $\pm$ 0.97 <sup>Aa</sup>	4.6 $\pm$ 1.22 <sup>ABa</sup>	6.7 $\pm$ 1.35 <sup>BCb</sup>	13.6 $\pm$ 1.55 <sup>Db</sup>	12.7 $\pm$ 2.94 <sup>CDa</sup>	2.1 $\pm$ 0.90 <sup>Aa</sup>
0 MPa ( $T_2$ )	1.8 $\pm$ 0.39 <sup>Aa</sup>	ND	ND	4.5 $\pm$ 7.8 <sup>Aa</sup>	–	–
300 MPa ( $T_2$ )	2.3 $\pm$ 0.47 <sup>Aa</sup>	ND	4.0 $\pm$ 1.17 <sup>Aa</sup>	ND	ND	–
500 MPa ( $T_2$ )	4.2 $\pm$ 0.64 <sup>Ab</sup>	3.8 $\pm$ 0.33 <sup>AB</sup>	2.2 $\pm$ 0.81 <sup>Ba</sup>	3.1 $\pm$ 5.4 <sup>ABa</sup>	4.4 $\pm$ 7.64 <sup>AB</sup>	–

ND: not detected; Means indicated by different capital letters in the same row differ significantly ( $P < 0.05$ ).  
Means indicated by different lowercase letters in the same column (for respective temperature) differ significantly ( $P < 0.05$ ).

**Table 5**  
Content of tryptamine and phenylethylamine (mg/kg) in meat of trout (mean  $\pm$  SD;  $n = 3$ ,  $T_1 = 3.5$  °C,  $T_2 = 12$  °C).

	Time (days)					
	7	14	21	28	42	70
<i>Tryptamine</i>						
0 MPa ( $T_1$ )	ND	ND	ND	ND	–	–
300 MPa ( $T_1$ )	ND	ND	ND	ND	ND	ND
500 MPa ( $T_1$ )	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0 MPa ( $T_2$ )	ND	22.3 $\pm$ 11.7 <sup>Aa</sup>	18.4 $\pm$ 18.2 <sup>Aa</sup>	35.7 $\pm$ 27.9 <sup>Aa</sup>	–	–
300 MPa ( $T_2$ )	ND	7.1 $\pm$ 12.3 <sup>Aa</sup>	2.0 $\pm$ 3.42 <sup>Aa</sup>	3.6 $\pm$ 6.28 <sup>Aa</sup>	4.2 $\pm$ 3.66 <sup>A</sup>	–
500 MPa ( $T_2$ )	ND	2.0 $\pm$ 3.53 <sup>Aa</sup>	ND	13.4 $\pm$ 23.1 <sup>Aa</sup>	ND	–
<i>Phenylethylamine</i>						
0 MPa ( $T_1$ )	ND	ND	ND	ND	–	–
300 MPa ( $T_1$ )	ND	ND	ND	ND	ND	ND
500 MPa ( $T_1$ )	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0 MPa ( $T_2$ )	ND	4.2 $\pm$ 5.88 <sup>Aa</sup>	12.2 $\pm$ 6.97 <sup>ABa</sup>	21.5 $\pm$ 8.10 <sup>Ba</sup>	–	–
300 MPa ( $T_2$ )	ND	1.5 $\pm$ 2.52 <sup>Aa</sup>	9.2 $\pm$ 4.87 <sup>Aa</sup>	20.0 $\pm$ 16.0 <sup>Aa</sup>	28.1 $\pm$ 21.5 <sup>Aa</sup>	–
500 MPa ( $T_2$ )	1.4 $\pm$ 2.43 <sup>A</sup>	2.5 $\pm$ 4.31 <sup>Aa</sup>	ND	18.1 $\pm$ 31.4 <sup>Aa</sup>	5.9 $\pm$ 10.2 <sup>Aa</sup>	–

ND: not detected; Means indicated by different capital letters in the same row differ significantly ( $P < 0.05$ ).  
Means indicated by different lowercase letters in the same column (for respective temperature) differ significantly ( $P < 0.05$ ).

**Table 6**  
Sensory score of samples (1 is the best).

	Time (days)					
	7	14	21	28	42	70
0 MPa ( $T_1$ )	1	1	2	2–3	–	–
300 MPa ( $T_1$ )	1	1	1	1	2	3
500 MPa ( $T_1$ )	1	1	1	1	2	3
0 MPa ( $T_2$ )	3	3	3	3	–	–
300 MPa ( $T_2$ )	2	3	3	3	3	–
500 MPa ( $T_2$ )	1	2	3	3	3	–

effect of pressurization on the stability of samples was substantial and it was evident at both pressure levels. Samples treated with 300 MPa did not show signs of decay up to the 28th day. The organoleptic signs of deterioration were observed at the 42nd day (sensory score 2), however the PUT level on the 28th day (16 mg/kg) revealed some onset of decomposition. CAD contents exceeding 10 mg/kg were also detected on the 28th day. Samples treated with 300 MPa were discarded as organoleptically unsuitable on the 70th day (sensory score 3, experiments had not been designed for more than 70 days). The increase of PUT and CAD contents above 10–20 mg/kg precede organoleptic signals of decay in control samples

and samples treated with 300 MPa. The first signs of decay of samples kept at 3.5 °C treated with 500 MPa were apparent on the 42nd day of storage (sensory score 2). Contrary to expectations, at this time profile, PUT content did not exceed 10 mg/kg and CAD was still not detected.

Faster decomposition processes at 12 °C gave rise to higher levels of PUT and CAD in less time. Control samples, which were not treated by high pressure, declined in quality at the very beginning of storage. Even in the first time profile (7th day), they showed adverse sensory properties – sensory score 3. The levels of PUT and CAD at that time were comparable to those at the 28th day of storage for samples kept at 3.5 °C. In other words, comparable levels of PUT and CAD in control samples kept at higher temperature were reached four times faster than in samples kept at 3.5 °C. The pressure level of 300 MPa does not seem to be sufficiently effective at 12 °C. With the exception of the first time profile (7th day), contents of PUT exceeded 20 mg/kg. From the 14th day forward, the sensory scores were “3” in all time profiles. This status was similarly signalled by the contents of PUT and CAD, finally reaching hundreds of mg/kg. At higher storage temperatures the remaining microorganisms can easily propagate. This results in a more progressive decomposition. The results at the pressure level of 500 MPa (12 °C) were rather surprising. The PUT levels did not

show any distinct increase in spite of the fact, that sensory properties were gradually worsening from 1 (the 7th day) to 3 (the 21st day). Similarly CAD, with the exception of the 14th day, was not detected. These trends do not fully correspond with trends recorded on samples kept at 3.5 °C, but, as mentioned above, some indication of such behaviour was also recorded in the lower temperature. The reason for poor correlation between the PUT and CAD contents and sensory properties in samples pressurized to 500 MPa, especially at 12 °C is not clear. Probably, those processes that lead to the worsening of (more complex) sensory parameters need not be based only on bacteria possessing decarboxylative properties.

The steepest increase in the contents of PUT and CAD was found especially in the control samples. For pressure-treated samples, PUT and CAD showed minimal increase in samples treated by 500 MPa, regardless of temperature. The effects of high pressure and temperature levels on the dynamics of PUT and CAD formation are clearly evident. Unlike CAD, PUT was found in all samples, which was not surprising, because PUT is a substance present in all living cells (Halasz, Barath, Simon-Sarkadi, & Holzapfel, 1994). The absence of CAD, especially in pressure-treated samples at the beginning of storage, is caused by the fact, that in tissues CAD is present in much lower quantities compared to other polyamines (Kusano, Berberich, Tateda, & Takahashi, 2008). CAD is liberated from lysine by the action of bacterial decarboxylases. For these reasons, it was not detected in fresh trout meat and in stored samples of good quality. In carp flesh (*Cyprinus carpio*), contents of PUT at <10 mg/kg were typical for samples of good quality, PUT contents of 10–20 mg/kg were related to the onset of spoilage, and values exceeding 20 mg/kg were usually found in samples of inferior quality (Křížek et al., 2002).

Despite the fact, that TYM is not a polyamine, the dynamics of its formation may be somewhat similar to PUT or CAD. Contrary to the possible formation of HIM, TRM, PEA and even CAD, TYM was found in all samples. The formation of TYM corresponded very well with the organoleptic properties. It was shown earlier (Baixas-Nogueras, Bover-Cid, Veciana-Nogues, & Vidal-Carou, 2009; Křížek, Matějková, Vácha, & Dadáková, 2012), that samples of good quality usually do not contain more than 10 mg/kg of TYM. This is in accordance with current results. In control samples kept at 3.5 °C, this proposed limit was exceeded by the 14th day (sensory score 1). A continuous increase in TYM content can be seen in pressure-treated samples (300 MPa, 3.5 °C), despite the fact that the sensory score remains “1” up to the 28th day. TYM content very steadily increases with the storage time and its elevated content often precedes the organoleptic signs of decay. Similarly to PUT and CAD in this study, samples pressurized to 500 MPa (3.5 °C) contained low amounts of TYM (up to 10 mg/kg), with the exception of some specific sample in the 70th day. The overall sensory status of samples kept at 12 °C corresponded well with the TYM content. Its concentration was in tenths and hundreds of mg/kg. It is interesting that, contrary to PUT and CAD, the contents of TYM correlated better with the rapid deteriorative process in these samples (500 MPa, 12 °C).

### 3.2. Spermidine and spermine

Similarly to PUT, SPD and SPM are polyamines naturally occurring in all cells (Halasz et al., 1994), so it was not surprising to find them in most of the samples, although usually in low concentrations. Statistically important fluctuations of SPD and SPM contents were not recorded - neither with the progress of time nor with the pressure level (Table 4). These polyamines are sometimes linked with food quality. A decrease of SPD and SPM contents with continuing decomposition of flesh was described earlier (Mietz & Karmas, 1978). In trials with pressure-treated trout flesh, this trend was not

clearly observed. No statistically important decrease of SPD and SPM appeared even in the control samples which were losing their quality most rapidly. On the other hand, in the control samples and in those 300 MPa samples kept at 12 °C (which were of inferior quality), SPD and SPM levels were lower and sometimes these polyamines were not detected contrary to those samples kept at 3.5 °C. In any case a comparison of these reduced contents of polyamines at 12 °C with that at 3.5 °C was not statistically important. Similarly to other authors (Baixas-Nogueras et al., 2005; Veciana-Nogues, Bover-Cid, Marine-Font, & Vidal-Carou, 2004), it seems that these polyamines are not suitable for evaluating the degradation processes because of their low contents and minor changes during the storage process.

### 3.3. Histamine, tryptamine and phenylethylamine

With the exception of three control samples and one sample with a sensory score of 3 (500 MPa), HIM, TRM and PEA were not found in trout flesh kept at 3.5 °C. The overall sensory status of samples kept at lower temperature was generally better, compared to those kept at higher temperature, so this might be the reason for the absence of those amines which are typical for deep decay. Control samples kept at 12 °C were of sensory grade 3 from the very beginning of storage. HIM contents in these samples exceeded 100 mg/kg. Both pressure levels had an important impact on the suppression of HIM formation at this temperature. However HIM does not appear to be a substance that would adequately signal or predict the beginning of degradation processes. In any case, the toxicologically important concentration of HIM (>100 mg/kg) (Hungerford, 2010) was reached in samples of inferior quality, so this amine in trout flesh does not represent a similar risk for consumers as it does in the case of scombroid fish. Similar situation was observed for TRM and PEA. They were found only in samples kept at 12 °C. Pressure-treated samples tended to contain less TRM and PEA. With two exceptions, these amines were found only in samples of sensory score 3.

## 4. Conclusions

The contents of biogenic amines in vacuum-packed trout meat can be noticeably reduced by the application of high hydrostatic pressure. The concentrations of the most toxicologically important biogenic amines HIM and TYM did not exceed the value of 2 and 13 mg/kg respectively for those samples with good organoleptic properties. Samples of good quality did not exceed 10–35 mg/kg of either PUT or CAD. The recommended storage time limit for vacuum-packaged trout meat, specified by producers, is about 5–6 days at the temperature of 3.5 °C. The application of high hydrostatic pressure can substantially extend this period - by approximately four times, to 21–28 days. High hydrostatic pressure treatment was much less effective at 12 °C. At 300 MPa, contents of PUT, CAD and TYM, amines that correlated best with sensory properties, increased more rapidly at this temperature. At 500 MPa (12 °C), contents of PUT and CAD did not correspond well with the sensory score. In these samples TYM was the only one which kept a close correlation with the organoleptic status of samples. It seems that application of high pressure does not provide sufficient degree of protection to samples stored at 12 °C.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the projects 600 766 5806 from the Czech Ministry of Education, P503/11/1417 of the Czech Science Foundation GACR, CENAKVA CZ 1.05/2.1.00/01.0024, GA JU 047/2010/Z and GA JU 067/2010/Z.



## References

- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, M. T., Marine-Font, A., & Vidal-Carou, M. C. (2005). Biogenic amine index for freshness evaluation in iced Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Food Protection*, 68(11), 2433–2438.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, 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. *mediterraneus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*, 72(8), 1671–1676.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, T., & Vidal-Carou, M. C. (2002). Chemical and sensory changes in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6–8 °C) and stored in ice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6504–6510.
- Cheftel, J. C. (1992). Effects of high hydrostatic pressure of food constituents – An overview. In C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, & P. Masson (Eds.), *High pressure and biotechnology* (Vol. 224, p. 195). Coll. INSERM Paris.
- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science*, 46(3), 211–236.
- Chytiri, S., Paleologos, E., Savvaidis, I., & Kontominas, M. G. (2004). Relation of biogenic amines with microbial and sensory changes of whole and filleted freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored on ice. *Journal of Food Protection*, 67(5), 960–965.
- Dadáková, E., Křížek, M., & Pelikánová, T. (2009). Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, 116(1), 365–370.
- Fellows, P. J. (2009). *Food processing technology*. Oxford: Woodhead Publ. Ltd., CRC Press.
- Gokoglu, N., Yerlikaya, P., & Cengiz, E. (2004). Changes in biogenic amine contents and sensory quality of sardine (*Sardina pilchardus*) stored at 4 and 20 °C. *Journal of Food Quality*, 27(3), 221–231.
- Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., & Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 5(2), 42–49.
- Hungerford, J. M. (2010). Scombroid poisoning: A review. *Toxicology*, 56(2), 231–243.
- Kalač, P., Špička, J., Křížek, M., & Pelikánová, T. (2000). Changes in biogenic amine concentrations during sauerkraut storage. *Food Chemistry*, 69(3), 309–314.
- Katikou, P., Georgantelis, D., Paleologos, E. K., Ambrosiadis, I., & Kontominas, M. G. (2006). Relation of biogenic amines' formation with microbiological and sensory attributes in *Lactobacillus*-inoculated vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4277–4283.
- Křížek, M., Matějková, K., Vácha, F., & Dadáková, E. (2012). Effect of low-dose irradiation on biogenic amines formation in vacuum-packed trout flesh (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry*, 132(1), 367–372.
- Křížek, M., Pavlíček, T., & Vácha, F. (2002). Formation of selected biogenic amines in carp meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(9), 1088–1093.
- 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.
- Kuley, E., Ozogul, F., & Ozogul, Y. (2005). Effects of aluminium foil and cling film on biogenic amines and nucleotide degradation products in gutted sea bream stored at 2+/-1 °C. *European Food Research and Technology*, 221(5), 582–591.
- Kuley, E., Ozogul, F., Ozogul, Y., & Akyol, I. (2011). The function of lactic acid bacteria and brine solutions on biogenic amine formation by foodborne pathogens in trout filets. *Food Chemistry*, 129(3), 1211–1216.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: Essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367–381.
- Mietz, J. L., & Karmas, E. (1978). Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 61(1), 139–145.
- Montiel, R., De Alba, M., Bravo, D., Gaya, P., & Medina, M. (2012). Effect of high pressure treatments on smoked cod quality during refrigerated storage. *Food Control*, 23(2), 429–436.
- Ozogul, Y., Ahmad, J. I., Hole, M., Ozogul, F., & Deguara, S. (2006a). The effects of partial replacement of fish meal by vegetable protein sources in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on postmortem spoilage of filets. *Food Chemistry*, 96(4), 549–561.
- Ozogul, Y., Ozogul, F., & Gokbulut, C. (2006b). Quality assessment of wild European eel (*Anguilla anguilla*) stored in ice. *Food Chemistry*, 95(3), 458–465.
- Pons-Sanchez-Cascado, S., Veciana-Nogues, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2003). Effect of delayed gutting on biogenic amine contents during ripening of European anchovies. *European Food Research and Technology*, 216(6), 489–493.
- Prester, L. (2011). Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: A review. *Food Additives and Contaminants Part A – Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 28(11), 1547–1560.
- Ruiz-Capillas, C., Carballo, J., & Colmenero, F. J. (2007a). Biogenic amines in pressurized vacuum-packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions. *Meat Science*, 75(3), 397–405.
- Ruiz-Capillas, C., Carballo, J., & Jimenez-Colmenero, F. (2007b). Consequences of high-pressure processing of vacuum-packaged frankfurters on the formation of polyamines: Effect of chilled storage. *Food Chemistry*, 104(1), 202–208.
- Ruiz-Capillas, C., Colmenero, F. J., Carrascosa, A. V., & Munoz, R. (2007c). Biogenic amine production in Spanish dry-cured "chorizo" sausage treated with high-pressure and kept in chilled storage. *Meat Science*, 77(3), 365–371.
- 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. *European Food Research and Technology*, 215(6), 509–514.
- Veciana-Nogues, M. T., Bover-Cid, S., Marine-Font, A., & Vidal-Carou, M. C. (2004). Biogenic amine production by *Morganella morganii* and *Klebsiella oxytoca* in tuna. *European Food Research and Technology*, 218(3), 284–288.