

Záznam z vědecké rozpravy

při obhajobě disertační práce Mgr. Petry KRAUSOVÉ dne 14.12.2006

prof. P. Pipek:

- a) navázal na odpověď doktorandky oponentovi prof. Kolářovi a vysvětlil současnou situaci s aplikací glukono-delta-laktonu (GDL) v masném průmyslu. GDL (E575) se nepoužívá pro zvýšení údržnosti masa, ale pro výrobu levnějších druhů trvanlivých fermentovaných (a tepelně neošetřených) masných výrobků. Cílem je urychlit okyselení hmoty a tím zkrátit dobu fermentace. Aplikace je určována ekonomikou, nikoli technologickými hledisky,
- b) výskyt N-nitrosaminů by měl být zvažován u některých tavených sýrů, do nichž se přidávají dusitany.

doc. J. Tříška:

- a) Existují referenční materiály pro stanovení polyaminů a biogenních aminů ?
Odpověď: Bohužel ne. Výsledky uváděné v disertační práci však velmi dobře odpovídají hodnotám publikovaným zahraničními pracovišti.
Doplnění prof. M. Křížkem: Referenční materiály se bohužel nepodařilo vyvinout ani v rámci mezinárodních projektů COST 917 a 922.
- b) V disertační práci měl být variační koeficient spíše označován českým VK než anglickou zkratkou RSD.
Odpověď: Ano, souhlasím s připomínkou. Zkratku RSD jsem použila jako standardní v anglických textech a častou i v textech českých.
- c) Jsou známy výsledky testů na mutagenitu polyaminů ? To by bylo další významné hledisko při posuzování obsahu polyaminů v potravinách.
Odpověď: S údaji o mutagenitě polyaminů jsem se v literatuře nesečkala. Domnívám se proto, že není považována za významnou.
Doplnění prof. M. Křížkem: obsahy PA v potravě by měli dietologové posuzovat podle toho, komu je určena.

doc. I. Šafařík:

- Je známo využití příznivých účinků polyaminů ve formě farmaceutických preparátů ?
Odpověď: s tímto druhem použití jsem se nesečkala. Koncepce potlačení role polyaminů u pacientů se zhoubnými nádory je buď v potlačení aktivity enzymů podílejících se na jejich metabolismu, nebo v podávání analogů polyaminů, jak jsem uvedla již při prezentaci své práce.
Doplnění prof. P. Kalačem: Role potravních polyaminů ve vztahu k možnostem léčby pacientů je zřejmě lékařům dosud málo známa, a to nejen lékařům českým.

Doplnění doc. J. Pánkem: Vzhledem k obojetným účinkům polyaminů (mohou podporovat růst nádorů, ale na druhé straně urychlit obnovu poškozených tkání) je jejich použití jako léků principiálně problematické.

prof. P. Pipek: Počítalo se při skladování a kuchyňských úpravách vždy se změnami obsahu sušiny, ke kterým dochází ?

Odpověď: Ano, s tímto faktorem jsem od počátku počítala a všechny relativní údaje o změnách obsahu polyaminů byly přepočítávány přes obsahy sušiny.

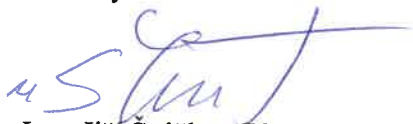
Písemné stanovisko prof. T. Komprdy z AF MZLU v Brně k autoreferátu disertační práce:

a) Proč byly pro stanovení obou použitých analytických metod použity dva druhy masa ?

Odpověď: Pro jednu metodu bylo použito hovězí maso, pro druhou vepřové. Oba tyto materiály pokládám za velmi podobné, přesto dotaz považuji za věcnou připomínku, kterou využiji při své další práci.

b) Co je příčinou změn obsahu spermidinu a sperminu během mrazírenského skladování ?

Odpověď: Existují svalové i bakteriální polyaminoxidasy, které oba polyaminy odbourávají. O jejich aktivitě v potravinách však téměř chybějí údaje. Řešení otázky vznikajících produktů a jejich biologických účinků jsem proto v závěru své disertační práce vytýčila jako jeden z námětů pro další výzkum.



Zapsal: doc. Ing. Jiří Špička, CSc.

Odpovědi na připomínky a náměty oponenta prof. Ing. Petra Pipka, CSc.

Terminologické poznámky a připomínky ke straně 12, 13, 16 a 26 plně respektuji a v příští práci se tímto nepřesnostem budu snažit vyvarovat.

Proč první odběr masa nastal teprve 24 h p.m. a ne ihned po usmrcení či dokonce ve formě biopsie. Není tudíž známa výchozí koncentrace polyaminů. Jaká je „fyziologická“ hladina stanovovaných polyaminů?

Fyziologická hladina známa není. Všechny dosavadní literární údaje uvádějí hodnoty BA a PA pro maso koupené v obchodech bez znalosti předcházející doby skladování a často jsou to údaje analýzy několika málo vzorků. Naše laboratoř je první, kdo uvádí hodnoty obsahu PA v čerstvém masu 24 h p.m. pro tak velké soubory vzorků. Doba 24 h pro první (výchozí) analýzu PA byla zvolena z toho důvodu, že nebylo možné organizačně zajistit analýzu ihned po odběru vzorku, jde tedy o sjednocení času. Z hlediska masa jako potraviny, která se nekonzumuje ihned po porážce, nebylo třeba pro tyto účely fyziologický obsah zjišťovat. Toto je otázka spíše pro fyziology.

Co bylo důvodem použít ochrannou atmosféru ve složení 70% N₂ a 30% CO₂?

Uznávám, že vhodnější ochranná atmosféra pro balení čerstvého masa je směs O₂ a CO₂. Naše použitá atmosféra je vhodnější pro masné výrobky.

CO₂ je rozpustný v potravinách, problém může nastat při balení masa (negativně ovlivňuje vaznost masa, což vede k hmotnostním ztrátám v důsledku uvolňování šťávy). Způsobuje také pokles pH.

O₂ má u „červeného“ masa negativní důsledky pro urychlení oxidace tuků a podporuje růst aerobních bakterií.

Použitím směsi O₂ a CO₂ je inhibován růst bakterií rodu *Pseudomonas* a tím je potlačen vznik BA a zároveň zajistí stabilitu barvy „červeného“ masa. Tuto ochrannou atmosféru používá firma Drůbež Vodňany, ale kvůli veterinárním opatřením proti ptačí chřipce jsme nemohli vzorky balit v tomto podniku.

Podle jakých kritérií se býci třídili do skupin podle užitkovosti?

Býci byli tříděni do skupin masného, kombinovaného a mléčného typu podle genotypu, jak je uvedeno na str. 21. Všichni jedinci byli kříženci různých plemen, takže nebylo možno je rozdělit do skupin podle čistokrevného plemene. Byl znám genotyp býka i jeho rodičů. Tyto údaje poskytli pracovníci katedry speciální zootechniky ZF JU, kteří znali původ porážených kusů. Soubor těchto býků sloužil pro jejich výzkumné účely.

*Správný název pro zádový sval je *musculus thoracis et lumborum*, zde asi *pars lumborum*.*

Připomínku uznávám. Termín *musculus longissimus dorsi* jsem převzala z publikace Anatomie a morfologie hospodářských zvířat, což je veterinární vysokoškolská učebnice

zřejmě se starší terminologií. Měla jsem si opatřit novější vydání s aktuálními odbornými termíny.

Prasnička není vepř! Může autorka vysvětlit anatomický a terminologický rozdíl?

Správný název biologického druhu je prase domácí. Uznávám, že bylo vhodnější použít termín „jatečných prasat“ nebo „kusů“ místo „jatečných vepřů“. Prasnička je pohlaví samičí, vepřík pohlaví samčí, který je kastrován. Nekastrovaní samci prasete domácího jsou ponecháváni jen pro chovné účely.

Musculus psoas major je velký bedrovec, tedy svičková, v případě vepřového masa „panenská“.

Musculus psoas major je skutečně velký bedrovec, který patří mezi svaly kýty. Označení „svičková“ a u vepřového „panenka“ se používá pro *musculus quadratus*, tedy čtyřhranný sval bederní. Ten je umístěn z pohledu z břišní dutiny podél bederní části páteře a umožňuje flexi páteře směrem do stran. Patří mezi svalstvo hrudníku, nikoli mezi svalstvo zadní končetiny tedy kýty.

Jak bylo zajištěno vychlazení jater po odběru na jatkách – chladicí taška tento účel sotva splnila.

Pokud nebyly vzorky odebírány druhý den po porážce, ale přímo na porážkové lince (játra, krev), byly tyto vzorky uloženy 2 h v rychlochlazovně (tj. po dobu odběru vzorků) na jatkách. Poté byla vychlazená játra balena do ochranné atmosféry či ve vakuu a vzorky byly převezeny v chladicí tašce do laboratoře. Přeprava trvala 30 – 45 minut. Domnívám se, že vychlazení těchto vzorků bylo dostatečné.

Výsledky jsou vyjádřeny ve formě přehledných grafů a jsou statisticky vyhodnoceny a komentovány ve výsledkové části. Komentář je však především konstatování faktů o statistické významnosti či nevýznamnosti, poněkud mi chybí hlubší analýza příčin a důsledků, a to v konfrontaci s literaturou. Tak by význam práce ještě více vynikl.

Údaje v potravinářské literatuře o mechanismech přeměn polyaminů chybí, nebylo tedy možné výsledky konfrontovat s dostupnou literaturou. Údaje o polyaminech v rámci fyziologie uvádějí jejich rozklad působením polyaminoxidas (PAO). Tyto enzymy jsou rozšířené mezi organismy včetně bakterií. Dělí se na dvě skupiny: PAO katalyzující oxidace na primární aminoskupině a PAO katalyzující oxidace na sekundární aminoskupině. SPD je tedy odbouráván na 3-aminopropanal a na 1,3-propandiamin. Takto zřejmě mohou být polyaminy odbourávány bakteriálními enzymy během skladování.

Jakým způsobem se dosáhlo teploty vodní lázně 101 °C při nadmořské výšce Českých Budějovic 381 m n. m.?

Na str. 26 je uvedeno, že teplota vodní lázně byla udržována na 100 ± 1 °C. 101 °C dosaženo nikdy nebylo. Uvedla jsem nevhodně charakteristiku použitého teploměru. Teplota vodní lázně po dobu vaření dosahovala maximálně 98 °C.

Jakým způsobem byla měřena teplota masa zataveného v plastu?

Teplota masa zataveného v plastovém sáčku při vaření na vodní lázni byla měřena vpichovým teploměrem. Místo vpichu bylo staženo gumičkou, aby neunikala pára.

Má autorka vysvětlení pro podivný průběh teplot, jak je uvedeno na obrázku na str. 28?

Tento obrázek demonstruje změny teplot při restování steaku. Podivný průběh je dán tím, že steak jsem opékala po obou stranách stejnou dobu. Teplotnímu výkyvu v polovině měřeného času odpovídá obrácení steaku na pánvi.

Postup izolace je popsán nejasně. Etherová vrstva se oddělila v odstředivce nebo v děličce? Proč se nepoužila vakuová odparka k odpaření diethyletheru?

Celý postup derivatizace pomocí benzoylchloridu, jak je uveden v metodické části, probíhal jako zkumavková reakce. K oddělení etherové vrstvy po protřepání došlo samovolně. Poté byl odebrán 1 ml této vrstvy do plastové eppendorfky o objemu 1,5 ml a diethylether byl odpařen proudem chladného vzduchu v digestoři. Vzhledem k malým objemům pipetovaných chemikálií by bylo použití děličky a vakuové odparky bezpředmětné.

Je neprůkaznost nárůstu PUT (obr. 11 na str. 39) dána skutečnou fyzikálně-chemickou podstatou, nebo se jen statistika deformovala vysokou směrodatnou odchylkou? Neměla být uvedená skutečnost ověřena větším počtem vzorků?

Myslím, že z průběhu grafu, který je znázorněn na obrázku 11, je zřejmé, že nedocházelo k nárůstu PUT během skladování extraktu po dobu 6 týdnů. „Výkyv“ po druhém týdnu skladování je charakterizován vysokou směrodatnou odchylkou. Myslím, že po vypuštění tohoto bodu by statistické vyhodnocení deformováno nebylo a nárůst putrescinu během skladování by byl nevýznamný. Uznávám však, že by bývalo lepší uvedenou skutečnost ověřit větším počtem paralelních analýz.

Kapitola 5.1.2 – autorka konstatuje rozdíly mezi oběma metodami. Postrádám hlubší vysvětlení rozdílů a závěry z toho plynoucí.

Cílem disertační práce nebyl vývoj analytických metod, ale vypracovat postup metody pro HPLC jako prostředek pro vypracování vlastních cílů disertační práce. Jsem přesvědčena, že nižší hodnoty PA stanovené metodou HPLC (oproti MECC) nezkrusují výsledky části DP týkající se změn PA během skladování a kuchyňských úprav, kde šlo pouze o relativní změny.

Bohužel zatím neexistuje obecně používaná metoda stanovení BA a PA a nejsou k dispozici referenční materiály.

Byly rozdíly mezi býky a kravami dány pohlavím nebo jde o rozdíl věku? Nehraje zde rozdíl i průběh postmortálních změn? Jaký je věk krav? Je možné vyvozovat závěry pouze z 8 jedinců neurčité užitkovosti?

Stáří krav se pohybovalo v rozmezí 41 – 114 měsíců, jak je uvedeno na str. 21. Byl zjištěn rozdíl v obsahu SPM mezi býky a kravami ($P < 0,05$) v obou druzích masa, roštěnci a kýtě. Faktory věku i pohlaví zde zřejmě jdou proti sobě. Býci byli podstatně mladší (15 – 28 měsíců). Aby bylo možné říci, zda tento rozdíl je dán skutečně pohlavím, bylo by třeba získat větší soubor zvířat stejného stáří jako býků, tedy jaloviček. Důvodem proč byl soubor krav tak úzký, byla spolupráce s katedrou speciální zootechniky ZF JU, která odebírala maso pouze z býků. Porážené krávy téměř vždy staršího věku. Dalším důvodem vysvětlujícím úzký soubor krav byla opatření proti nebezpečí BSE, což uvádím na str. 21. Je také pravděpodobné, že dochází k různě rychlým postmortálním změnám ve svalovině býků a krav, ale tuto otázku si netroufám zodpovědět. To by byla otázka spíše pro fyziology.

9.12.2006

Mgr. Petra Krausová

Odpovědi na připomínky a náměty oponenta prof. Ing. Ladislava Koláře, DrSc.

Překvapil mne v publikaci Kalač, Krausová 2005 a v práci na str. 15 uváděný extrémně vysoký obsah putrescinu u tvrdých zrajících sýrů z nepasterizovaného mléka a skutečnost, že glukono-delta-lakton silně potlačil tvorbu PUT při výrobě fermentovaných masných výrobků (str. 14). Použití GDL při výrobě mléčné sýřeniny je významné v mlékárenských malotechnologiích, které v LFA oblastech by mohly zachránit alespoň zbytky zemědělských výrob, pokud by výrobky regionální a kvalitativně výjimečné. Dal by se inhibiční vliv GDL na tvorbu PUT očekávat také při výrobě zrajících sýrů, které by zde byly asi jediným perspektivním sortimentem?

Díky potlačení technologicky rizikových bakterií (*Streptococcus sp.* a *Enterococcus faecalis*) a poklesu pH v důsledku ošetření čerstvého masa přísadkou GDL došlo k významnému poklesu produkce PUT, HIM a TYM, jak uvádí Majjala et al., 1992. Použití takto ošetřeného masa do masných výrobků pak znamená menší nárůst BA během fermentace. Při výrobě masných výrobků se doporučuje spíše rychlé zchlazení čerstvého masa ihned po porážce používaného jako surovina a dodržování přísné hygieny. Používání siřičitanů, které mají stejné účinky jako GDL, je dokonce zakázáno.

Také u sýrů je známo, že každé technologické opatření, které obecně zvyšuje hygienu produkce sýrů, vede ke snížení obsahu BA, zejména TYM, PUT a CAD. Zkvalitní se surovina pro výrobu sýra, ale netroufám si zodpovědět otázku, zda účinnost GDL se projeví po celou dobu zrání sýrů.

V roce 1973 vzbudila obavy zpráva Fazia a spolupracovníků, kteří našli N-nitrosopyrrolidin ve vařeném bakanu, zatímco v syrovém nalezen nebyl. Velíšek (Chemie potravin, 3, str. 213) uvádí, že N-nitrosopyrrolidin může vzniknout z prolinu přes pyrrolidin a analogicky z putrescinu přes aminobutan či spermidinu. Není zde nebezpečí při tepelné úpravě zrajících sýrů, která se dnes uplatňuje jako kulinářská specialita?

Rizika vzniku karcinogenních látek typu nitrosaminů z PA se občas vyskytují i v soudobé literatuře v rámci pokusů s laboratorními zvířaty. Tyto publikace však nejsou příliš četné a nejsou ani častěji citovány, takže zřejmě nepředstavují významnější zdravotní riziko. Ve zrajících sýrech je přítomen PUT, obsahy SPD a SPM jsou minimální (do $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). S údaji o vzniku netěkavých nitrososloučenin při tepelné úpravě zrajících sýrů jsem se v dostupné literatuře setkala pouze s jediným článkem. Korejští autoři (2005) vznik N-nitrosopyrrolidinu z biogenních aminů ověřovali na fermentovaném výrobku z mořských ryb, kde je zvláště velký obsah BA. Sledovali vznik N-nitrosopyrrolidinu za podmínek přidání dusitanu sodného a zahřátí. Zjistili, že tvorba této látky z PUT a SPD byla nízká, že SPM nevznikal N-nitrosopyrrolidin vůbec. Proto považují toto riziko u tepelně upravených sýrů za nevýznamné.

9.12.2006

Mgr. Petra Krausová

Odpovědi na připomínky a náměty doc. Ing. Jana Pánka, CSc.

Jak lze vysvětlit nepříznivě vysokou hodnotu opakovatelnosti u stanovení PUT metodou MECC?

Hodnota opakovatelnosti 24,4 % pro stanovení PUT metodou MECC byla zjištěna pro průměrnou hodnotu $6,3 \text{ mg.kg}^{-1}$, což je hodnota blízká se mezi detekce ($2,1 \text{ mg.kg}^{-1}$). U velmi nízkých hodnot je chyba (nejistota) stanovení podstatně vyšší než u vysokých hodnot.

Meze detekce pro MECC byly stanoveny pro jiné potraviny než meze detekce pro HPLC.

Dlouhodobá zkušenost naší laboratoře svědčí o velmi blízkých mezích detekce pro druhy biologických materiálů zpracovávaných v laboratoři.

K metodice a výsledkům mám poměrně zásadní připomínku. U hodnocení nově zaváděné metodiky by měla být, kromě detekčních limitů a opakovatelnosti, stanovena i hodnota výtěžnosti (recovery) metody.

Uznávám připomínku, že se výtěžnost stanovení PA metodou HPLC měla provést. Obě metody, MECC i HPLC, mají shodnou přípravu extraktu (do $0,6\text{M HClO}_4$). Recovery pro metodu MECC byla prováděna (Křížek a Pelikánová, 1998) s hodnotami 89,5 % pro PUT, 94,7 % pro SPD a 93,6 % pro SPM. Pro metodu MECC výtěžnost vycházela shodně jak s použitím vnitřního standardu, tak i s použitím standardního přídatku (spike). Vyplývá z toho potřeba ověřit rozdíly dansylační a benzoylační reakce. Tuto otázku bude řešit naše laboratoř a výsledky budou dle potřeby korigovány.

10.12.2006

Mgr. Petra Krausová



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: **Mgr. Petra Krausová**
Narozen(a): 6.10.1978 v Sušici

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Zemědělská chemie
Forma studia: prezenční

Název disertační práce: **Faktory ovlivňující výskyt biologicky účinných polyaminů ve vybraných potravinách**

Výsledek obhajoby:

Vyhověl (a)

~~**Nevyhověl(a)**~~

Komise:

	JMÉNO	PODPIS
Předseda:	prof. Ing. Martin Křížek, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
Členové:	prof. Ing. Ladislav Kolář, DrSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. Ing. Jan Pánek, CSc., VŠCHT Praha	
	prof. Ing. Petr Pipek, CSc., VŠCHT Praha	
	doc. Ing. Ivo Šafařík, DrSc., ÚSBE AV ČR	
	doc. Ing. Jiří Špička, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. Ing. Jan Tříška, CSc., ÚSBE AV ČR Č. Budějovice	
Školitel:	prof. Ing. Pavel Kalač, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	

V Českých Budějovicích dne 14.12.2006



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: **Mgr. Petra Krausová**
Narozen(a): 6.10.1978 v Sušici

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Zemědělská chemie
Forma studia: prezenční

Výsledek hlasování:

Počet členů komise:

počet přítomných členů komise: 7

počet platných hlasů: 7

kladných: 7

záporných: 0

počet neplatných hlasů: 0

Komise:

	JMÉNO	PODPIS
Předseda:	prof. Ing. Martin Křížek, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
Členové:	prof. Ing. Ladislav Kolář, DrSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. Ing. Jan Pánek, CSc., VŠCHT Praha	
	prof. Ing. Petr Pipek, CSc., VŠCHT Praha	
	doc. Ing. Ivo Šafařík, DrSc., ÚSBE AV ČR	
	doc. Ing. Jiří Špička, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. Ing. Jan Tříška, CSc., ÚSBE AV ČR Č. Budějovice	
Školitel:	prof. Ing. Pavel Kalač, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	

V Českých Budějovicích dne 14.12.2006