JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
KATEDRA APLIKOVANÉ CHEMIE A UČITELSTVÍ CHEMIE

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VÝSKYT BIOLOGICKY AKTIVNÍCH POLYAMINŮ VE VYBRANÝCH POTRAVINÁCH

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Petra KRAUSOVÁ

2006

Školitel: **prof. Ing. Pavel KALAČ, CSc.**

Studijní obor: **4106V017 Zemědělská chemie**

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

V Českých Budějovicích dne 15.9. 2006

.....

Práce byla vypracována na katedře aplikované chemie a učitelství chemie Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v období září 2003 – srpen 2006.

Děkuji školiteli prof. Ing. Pavlu Kalačovi, CSc. za trpělivost při odborném vedení disertační práce a poskytnutí cenných rad k jejímu zdárnému dokončení. Dále bych chtěla poděkovat prof. Ing. Martinu Křížkovi, CSc. za radu a pomoc při validaci metody pro HPLC, doc. Ing. Jiřímu Špičkovi, CSc. za pomoc při statistickém vyhodnocování naměřených dat a Ing. Tamaře Pelikánové za pomoc při laboratorním zpracování vzorků.

OBSAH

Souhrn

Summary

Seznam použitých zkratek

1. **Úvod** 1

2. **Teoretická část** 2

2.1 Charakteristika, metabolismus a biologické účinky polyaminů 2

2.1.1 Charakteristika a metabolismus 2

2.1.1.1 Syntéza PA (anabolismus) 2

2.1.1.2 Oxidace PA (katabolismus) 4

2.1.2 Absorpce polyaminů střevní stěnou 5

2.1.3 Biologické role u člověka 6

2.1.3.1 Účast při růstu a obnově střevní stěny 7

2.1.3.2 Účast při rakovinném bujení 7

2.1.3.3 Další účinky polyaminů 9

2.2 Obsah polyaminů v potravinách 11

2.2.1 Maso, vnitřnosti, ryby a masné výrobky 11

2.2.2 Ostatní potraviny 14

3. **Cíl práce** 18

4. **Experimentální část** 19

4.1 Použité chemikálie, přístroje a zařízení 19

4.2 Odběr vzorků 20

4.2.1 Vzorky pro analýzu polyaminů v čerstvém mase, játrech a krvi 20

4.2.2 Vzorky pro ověření skladovatelnosti extraktů a derivatizovaných vzorků a ověření opakovatelnosti stanovení PA 22

4.2.3 Vzorky pro ověření rovnoměrnosti obsahu polyaminů v jaterních lalocích 23

4.2.4 Vzorky pro sledování změn obsahu PA při skladování jater 24

4.2.5 Vzorky pro sledování změn obsahu PA při skladování masa 26

4.2.6 Vzorky pro sledování změn obsahu PA při kuchyňských úpravách jater ... 26

4.2.7 Vzorky pro sledování změn obsahu PA při kuchyňských úpravách masa ... 28

4.3 Analytické postupy 29

4.3.1 Analýza metodou MECC 29

4.3.2 Analýza metodou HPLC 31
4.3.3 Statistické vyhodnocení 34
5. Výsledky a diskuse 35
5.1 Stanovení polyaminů 35
5.1.1 Optimalizace jednotlivých kroků stanovení 35
5.1.1.1 Opakovatelnost stanovení 35
5.1.1.2 Skladovatelnost extraktů a derivatizovaných vzorků 36
5.1.2. Porovnání metod benzoylace a MECC s dansylací a HPLC 40
5.2 Ověření rovnoměrnosti obsahu polyaminů v jaterních lalocích 44
5.3 Obsahy polyaminů v čerstvém mase a játrech a faktory, které je ovlivňují 45
5.3.1 Hovězí a vepřové maso 45
5.3.2 Hovězí a vepřová játra 47
5.3.3 Kuřecí játra 50
5.3.4 Ovčí játra 50
5.4 Faktory ovlivňující změny obsahu polyaminů v mase a játrech 52
5.4.1 Cladírenský způsob skladování 52
5.4.1.1 Vepřová játra 52
5.4.1.2 Vepřové maso 62
5.4.2 Mrazírenský způsob skladování 67
5.4.2.1 Vepřová játra 67
5.4.2.2 Vepřová pečeně 70
5.4.3 Kuchyňské úpravy 72
5.4.3.1 Vepřová játra 72
5.4.3.2 Vepřové maso 79
6. Závěr 86
7. Literatura 90
8. Seznam publikovaných prací 99
9. Přílohy

SOUHRN

Polyaminy přijímané potravou, putrescin (PUT), spermidin (SPD) a spermin (SPM), se významně podílejí na růstu buněk, a to včetně růstu zhoubných nádorů a na regeneraci tkání. Maso a játra představují významný zdroj polyaminů ve výživě člověka.

Polyaminy byly analyzovány v čerstvém mase a játrech (24 hodiny po porážce) metodou benzoylace / MECC. Pro sledování změn obsahu polyaminů ve skladovaném mase a játrech a při kuchyňských úpravách masa a jater byla použita metoda dansylace / HPLC.

V čerstvé vepřové pečeni (n=27) a čerstvém hovězím roštěnci (63 býčků a 8 krav) a čerstvé kýtě obou druhů zvířat byly zjištěny hodnoty SPM nepřesahující 30 $mg.kg^{-1}$. Hodnoty obsahu PUT a SPD byly ve většině vzorků pod mezí detekce. Vzájemné korelace mezi obsahem SPM v jednotlivých svalech býků a stářím zvířete, živou hmotností a typem užitkovosti nebyly zjištěny ($P < 0,05$). Významné rozdíly v obsahu SPM byly zjištěny v kýtě mezi prasničkami a vepříky ($P < 0,05$) a v obou svalech mezi kravami a býky ($P < 0,005$). Z mezidruhových rozdílů byl významný rozdíl zjištěn v průměrném obsahu SPM jen mezi kravami a prasničkami v roštěnci / pečeni ($P < 0,05$).

Játra jsou metabolicky aktivní orgán a je pro ně typické široké kolísání obsahu polyaminů. V čerstvých vepřových játrech byl nejčastější obsah SPD a SPM kolem 30 a 100 $mg.kg^{-1}$, zatímco v čerstvých hovězích játrech byl poměr obou polyaminů opačný. Nejčastější obsah SPD a SPM v hovězích játrech byl 100 – 150 a 40 $mg.kg^{-1}$. Obsah PUT v čerstvých játrech byl pod mezí detekce. Mezidruhové rozdíly SPD i SPM v játrech byly významné na hladině pravděpodobnosti $P < 0,001$. Obsah SPD a SPM v ovčích játrech a játrech jehňat byl srovnatelný s hodnotami vepřových jater. Průměrný obsah SPD a SPM v kuřecích játrech byl 57,3 a 117 $mg.kg^{-1}$. V hovězí a vepřové krvi byl obsah PUT, SPD i SPM pod mezí detekce, krev tedy nepředstavuje významný podíl polyaminů v mase a játrech. Významná vzájemná negativní korelace byla zjištěna mezi SPD a SPM v játrech býků ($P < 0,001$) a obsahu SPD ve vztahu k věku býků ($P < 0,01$). Zjištěny byly i významné rozdíly v obsahu SPD v játrech mezi jednotlivými typy užitkovosti býků: mléčné – masné ($P < 0,05$) a masné – kombinované ($P < 0,1$). Průměrný obsah SPD v játrech býků mléčného, kombinovaného a masného typu užitkovosti byl 96,1; 106 a 188 $mg.kg^{-1}$.

Syrové vepřové maso a játra byly skladovány chladírenským (při cca 2 °C) a mrazírenským (při cca -18 °C) způsobem. Při chladírenském způsobu byly zvoleny tři

způsoby balení: volně v PE-sáčku (skladování po dobu 9 dní), v ochranné atmosféře (70 % N_2 a 30 % CO_2) a vakuované fólii (skladování obou variant po dobu 21 dní).

Pokles obsahu SPD a SPM byl významný v játrech skladovaných v ochranné atmosféře i vakuu ($P < 0,05$) na cca 75 – 60 % výchozí hodnoty. Během volného skladování jater došlo k významnému poklesu SPD na cca 75 % původní hodnoty ($P < 0,05$), zatímco pokles SPM ve volně skladovaných játrech byl nevýznamný. Obsah SPM se během chladírenského skladování vepřového masa prakticky neměnil. Během skladování zmrazených vepřových jater po dobu 168 dnů při -18 °C došlo k postupnému poklesu obsahu SPD a SPM přibližně na 70 % výchozích hodnot. Naproti tomu obsah SPM ve zmrazené vepřové pečeni poněkud vzrostl, obsah SPD byl pod mezí detekce. Tyto změny byly na hranici významnosti ($P < 0,05$).

Dále byl sledován vliv tepelných úprav na změnu obsahu polyaminů v mase a játrech. Pro tyto potraviny byly zvoleny nejběžnější kuchyňské úpravy prováděné v ČR. Při třech způsobech kuchyňských úprav vepřových jater došlo k významnému poklesu ($P < 0,05$) obsahu polyaminů na 70 – 50 % původní hodnoty v syrovém vzorku. Mezi jednotlivými kuchyňskými úpravami z hlediska obsahu SPD nebyl podstatný rozdíl, největší ztráty obsahu SPM představovalo restování jater.

Během pěti různých tepelných úprav vepřové pečeně došlo podobně jako při kuchyňských úpravách jater k přibližně 50% poklesu SPM. Obsah SPD byl v čerstvém i tepelně upraveném mase pod mezí detekce. Mezi jednotlivými úpravami nebyl kromě pečení statistický rozdíl. Největší ztráty představovalo pečení jak čerstvého, tak šest dnů chladírensky skladovaného masa ($P < 0,05$). Ve vývarech a vydušené šťávě masa i jater byl obsah polyaminů pod mezí detekce.

Získané poznatky jsou určeny především dietologům a lékařům pro řízenou výživu pacientů, a to zejména při nádorových onemocněních či při hojení poranění.

Klíčová slova: potravní polyaminy; putrescin; spermidin; spermin; hovězí maso; vepřové maso; hovězí játra; vepřová játra; skladování; kuchyňské úpravy

SUMMARY

Dietary polyamines putrescine (PUT), spermidine (SPD) and spermine (SPM) participate significantly in the cell growth, including tumour growth and in the tissues regeneration. Meat and liver represent an important polyamine source for humans.

Polyamines were determined in fresh meat and liver 24 hours after slaughter by a benzoylation / MECC method, while a dansylation / HPLC method was used for the determination of changes in polyamine contents during meat and liver storage and culinary processing.

SPM contents did not exceed 30 mg kg^{-1} in fresh pork loin and leg (n=27) and bovine sirloin and rump (63 young bulls and 8 cows). Contents of SPD and PUT were in the most of samples below the limits of detection. No significant correlations at $P < 0.05$ between SPM contents in each muscle of young bulls and their age, live weight and type of efficiency were found. The difference in SPM contents in leg between the genders of pigs was significant ($P < 0.05$), likewise for SPM in both muscles of bulls and cows ($P < 0.05$). The significant inter-species difference ($P < 0.05$) in SPM content was found in loin only between gilts and cows.

Polyamine contents in livers ranged very widely. In fresh porcine livers were the most frequent SPD and SPM contents about 30 and 100 mg.kg^{-1}, respectively, while an inverse SPD / SPM ratio was found in bovine livers. The most frequent SPD and SPM contents in bovine livers were 100-150 and 40 mg kg^{-1}, respectively. PUT content in fresh livers was below the limit of detection. The inter-species differences of SPD and SPM contents in bovine and porcine livers were significant at $P < 0.001$. SPD and SPM contents in ovine livers were similar to those in porcine liver. Mean SPD and SPM contents in chicken livers were 57.3 and 117 mg kg^{-1}, respectively. PUT, SPD and SPM contents were below the limits of detection in bovine and porcine blood. Thus, blood does not represent a significant polyamine proportion in meat and livers. Significant negative correlations were found between SPD and SPM in livers of bulls ($P < 0.001$) and between SPD content and the age of bulls ($P < 0.01$). Mean SPD contents in liver were significantly different between the meat and dairy breeds (188 and 96.1 mg kg^{-1}, respectively) ($P < 0.05$) and between dairy and combined breeds (96.1 and 106 mg.kg^{-1}, respectively) ($P < 0.1$).

Raw pork loin and livers were chilled at 2 °C or frozen at -18 °C. Chilled meat and livers were stored in a protective atmosphere (OA; 70 % N_2 and 30 % O_2), vacuum packaged (VAK) or stored in a polyethylene bag (VOL) as an experimental control.

SPD and SPM contents in livers stored in the protective atmosphere and under vacuum significantly decreased ($P < 0.05$) to about 75 – 60 % of the initial values during 21 days, likewise SPD content in livers stored in the polyethylene bag during 9 days. Decrease of SPM content stored in the polyethylene bag was insignificant. SPM content in chilled loin in OA, VAK and VOL remained constant. SPD and SPM contents in frozen livers decreased significantly to about 70 % of the initial values during 168 days, while SPM in frozen pork loin mildly but insignificantly increased ($P < 0.05$). SPD content in frozen loin was below the limit of detection.

The influence of culinary processing on polyamine content changes in pork loin and livers was also surveyed. The most common culinary processing methods used in the Czech Republic were tested: boiling, stewing, roasting, baking and frying. SPM contents decreased significantly ($P < 0.05$) during thermal processing to 70 – 50 % of the initial values in unprocessed livers and pork. There were not significant differences among the individual culinary treatments, the greatest SPM losses were found during liver roasting and loin baking. In broth, contents of polyamines were below the detection limits.

The results may help mainly to dieticians and physicians for the controlled nutrition of patients, namely with tumour disorders or for wound healing.

Keywords: dietary polyamines; putrescine; spermidine; spermine; beef; pork; bovine liver; pork liver; storage; culinary processing

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BA	biogenní aminy
CAD	kadaverin
DUS	dušení
DUSV	dušení s malým množstvím vody
HEP	1,7 – diaminoheptan
HIM	histamin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KONT	kontrolní vzorek syrového masa
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MR	mražení
OA	ochranná atmosféra
PA	polyaminy
PEA	fenylethylamin
PEC	pečení
PUT	putrescin
REST	restování
RIZ	smažení v trojobalu (řízek)
SPD	spermidin
SPM	spermin
TRM	tryptamin
TYM	tyramin
VAK	vakuum
VAR	vaření
VOL	volné skladování v PE-sáčku

1. Úvod

Polyaminy (PA) putrescin (PUT), spermidin (SPD) a spermin (SPM) jsou přirozené sloučeniny, běžně se vyskytující v buňkách všech živých organismů od mikroorganismů po savce. V posledním desetiletí se začaly vyčleňovat ze skupiny biogenních aminů, a to především kvůli jejich specifickým biologickým účinkům. Účastní se růstu a dělení buněk, proto jsou jejich vlastnosti výrazné hlavně v rostoucích a rychle se dělících buňkách jako jsou mladá rostlinná pletiva, buňky střevního epitelu nebo nádorové buňky. Dříve se uvádělo (**BARDÓCZ, 1993**), že polyaminy nezbytné pro růst živočišných buněk jsou syntetizovány výlučně *in situ*. V 90. letech se prokázalo, že na růstu buněk se podílí významnou měrou rovněž polyaminy přijímané potravou a syntetizované střevní mikroflórou.

Vstřebávání PUT ze střev vzrůstá u jedinců postižených nádorovým onemocněním. Polyaminy jsou přednostně vstřebávány rychle rostoucími tkáněmi, jako jsou zhoubné nádory nebo hojící se rány. Důležité je, aby hlavně lékaři (onkologové a dietologové) měli k dispozici dostatek informací o výskytu polyaminů v potravinách a na základě toho mohli ovlivňovat výživu pacientů jak s nádorovým onemocněním, tak i pacientů v pooperačních stavech.

Doposud bylo publikováno jen několik prací zaměřených výhradně na obsah polyaminů v potravinách, častější jsou údaje o obsahu polyaminů zahrnutých mezi biogenní aminy. Publikované obsahy však často vycházely jen z analýzy 2 – 3 vzorků určité potraviny a výběr potravin byl přizpůsoben stravovacím návykům např. Skotska (**BARDÓCZ ET AL., 1995**), Norska (**ELIASSEN ET AL., 2002**) či Japonska (**OKAMOTO ET AL., 1997; NISHIBORI ET AL., 2006; NISHIMURA ET AL., 2006**). Velmi málo údajů existuje o faktorech ovlivňujících obsahy polyaminů v potravinových surovinách a při zpracování a skladování potravin.

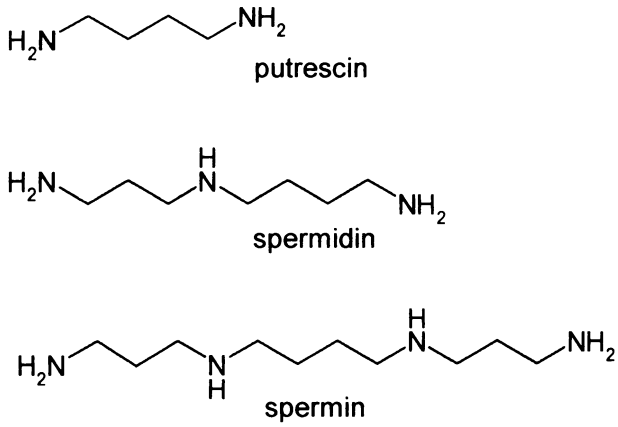
2. Teoretická část

2.1. Charakteristika, metabolismus a biologické účinky polyaminů

2.1.1 Charakteristika a metabolismus

Polyaminy (PA) jsou nízkomolekulární organické bazické sloučeniny s alifatickým řetězcem. Do skupiny biologicky aktivních polyaminů se řadí putrescin (1,4-diaminobutan), spermidin (*N*-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan) a spermin (*N*,*N*'-bis(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan). Jejich vzorce jsou uvedeny na obrázku 1.

Obr. 1 Vzorce polyaminů



Polyaminy jsou všudypřítomnými esenciálními složkami rostlinných i živočišných buněk, které jsou nezbytné pro růst, diferenciaci a proliferaci buněk. Putrescin, který je prekurzorem vyšších polyaminů (spermidinu a sperminu), a který rovněž vzniká při kažení potravin, stojí na pomezí skupiny biogenních aminů a polyaminů a řadí se do obou skupin. Při fyziologickém pH vytvářejí polyaminy na aminoskupinách dva až čtyři kladné náboje, díky kterým mohou vytvářet můstky se zápornými náboji na povrchu buňky a plnit tak řadu fyziologických funkcí (viz část 2.1.3).

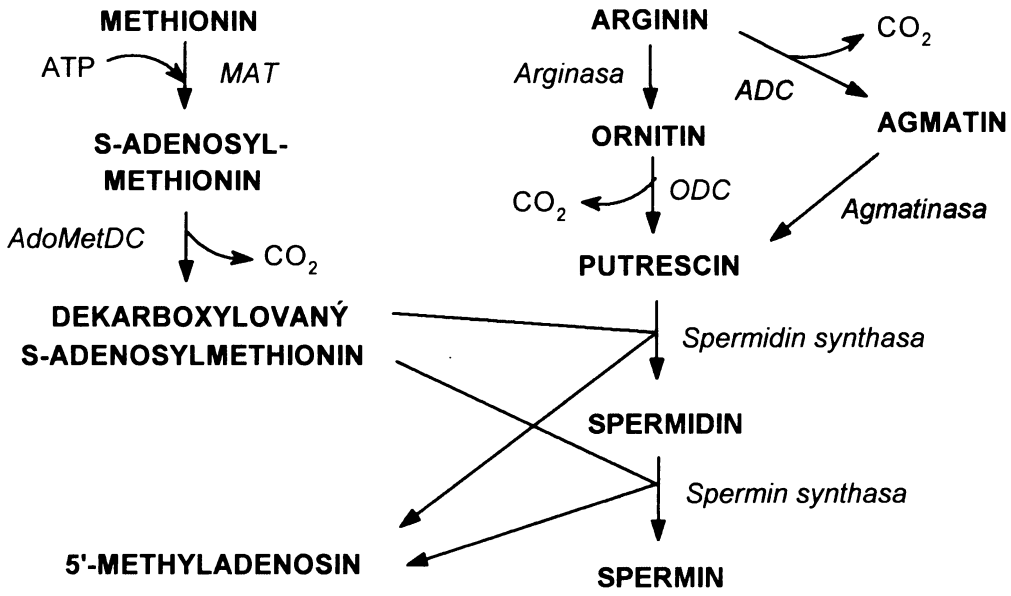
2.1.1.1 Syntéza PA (anabolismus)

Přiměřený obsah polyaminů v buňce je regulován rovnováhou mezi jejich syntézou, odbouráváním a příjmem z potravy (**GUGLIUCCI, 2005**). Polyaminy jsou v organismu syntetizovány buď *de novo*, nebo je syntetizuje střevní mikroflóra, která je schopná metabolizovat aminokyseliny z potravy (**TETI, VISALLI A MCNAIR, 2002**).

De novo syntéza

Biosyntéza je v savčích buňkách striktně regulována dvěma klíčovými enzymy (**HILLARY A PEGG, 2003**) ornithindekarboxylasou (ODC) a S-adenosyl-methionindekarboxylasou (AdoMetDC). Hlavními prekurzory vzniku PA v buňce jsou aminokyseliny ornithin a methionin. Schéma biosyntézy PA ukazuje obrázek 2.

Obr. 2 Schéma biosyntézy PA (podle **HILLARYHO A PEGGA, 2003**)



Dekarboxylace ornithinu za katalýzy ODC představuje přímou syntézu putrescinu, což se předpokládá jako jediná možná dráha vzniku putrescinu u živočichů a některých patogenních hub (**BAGNI A TASSONI, 2001**). Vyšší rostliny, mikroorganismy a ostatní houby dokáží syntetizovat putrescin i nepřímo účinkem arginindekarboxylasy (ADC) přes agmatin. Někteří autoři popisují přítomnost ADC i v savčích buňkách (**HILLARY A PEGG, 2003**), ale přesvědčivé důkazy chybějí.

Methionin poskytuje aminopropylovou skupinu, která je potřebná pro přeměnu putrescinu na vyšší polyaminy, spermidin a spermin. Methioninadenosyltransferasa (MAT) katalyzuje přeměnu methioninu na S-adenosylmethionin, který je následně dekarboxylován pomocí enzymu AdoMetDC za vzniku aminopropylového donoru, který reakcí s PUT dává postupně vznik vyšším aminům. Tyto reakce jsou katalyzovány SPD / SPM synthasami a jsou ireverzibilní.

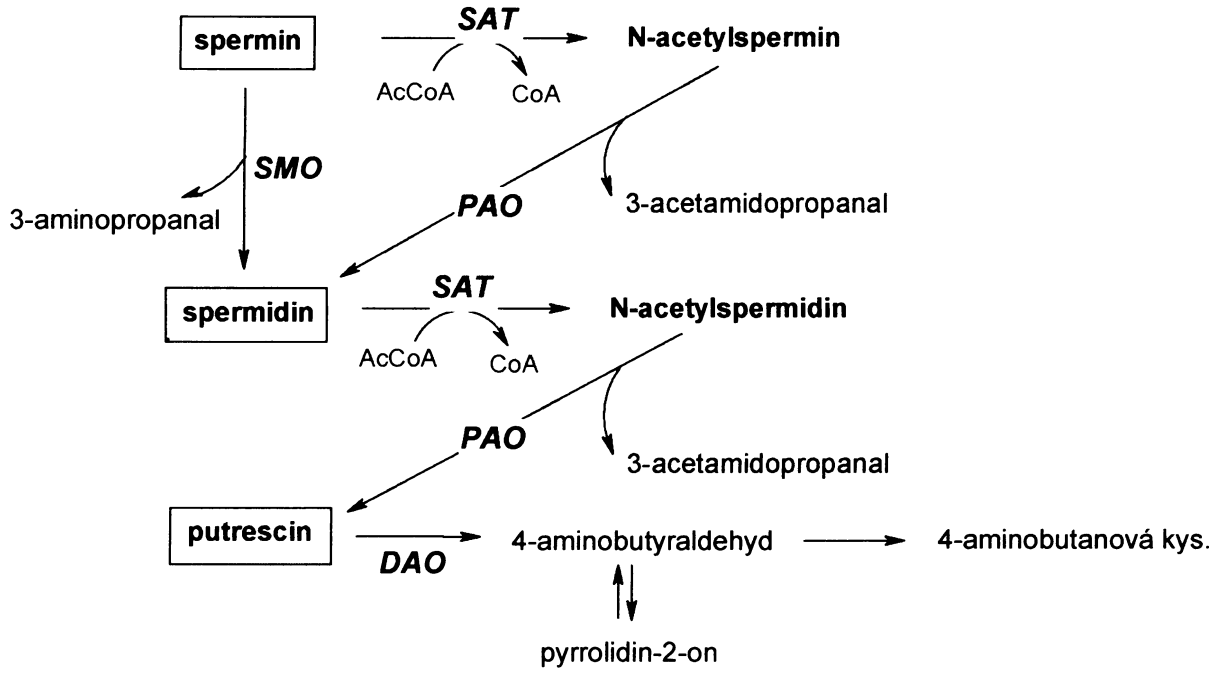
Tvorba PA střevní mikroflórou

Střevní bakterie rodů *Bacillus, Clostridium, Enterococcus, Klebsiella, Morganella* a *Proteus* a čeledi *Enterobacteriaceae* jsou schopné dekarboxylovat aminokyseliny za vzniku příslušných biogenních aminů. Putrescin jsou bakterie schopné syntetizovat nejen dekarboxylací ornithinu, ale i účinkem ADC přes agmatin. Z agmatinu vzniká PUT účinkem ureohydrolasy, enzymu, který se vyskytuje v savčích buňkách (**HILLARY A PEGG, 2003**).

2.1.1.2 Oxidace PA (katabolismus)

Mnoho enzymů dokáže oxidovat polyaminy. Některé z nich jsou extracelulární a není dosud jasné, jakou roli mohou hrát v buněčném metabolismu (**GUGLIUCCI, 2005**). Obsah PA v normálních zdravých buňkách je složitě regulován jak biosyntetickými enzymy, tak i enzymy katabolickými (**MITCHELL, 2003**). Klíčovými enzymy odbourávání polyaminů jsou SPM / SPD *N*-acetyltransferasy, polyaminoxidasy (PAO) a diaminoxidasy (DAO). Nejprve dochází k acetylaci a vzniklé *N*-acetylované polyaminy dále podléhají štěpení PAO nebo DAO. SPM se může dokonce odbourávat uvnitř erytrocytů na SPD přímo, bez acetylace (**SEILER, 2004**). Diaminoxidasy jsou specifické enzymy oxidující PUT a ostatní diaminy, ale také SPD. Polyaminoxidasy specificky oxidují SPM, SPD a další polyaminy (**BAGNI A TASSONI, 2001**). Polyaminoxidasy rozděluje **MORGAN (2001)** do dvou hlavních skupin. První skupina enzymů katalyzuje oxidativní deaminaci primární aminoskupiny, kdy vznikají cytotoxické aldehydy. Enzymy druhé skupiny katalyzují oxidaci sekundární aminoskupiny za vzniku netoxických produktů. Zjednodušené schéma odbourávání polyaminů je uvedeno na obrázku 3.

Obr. 3 Mechanismus oxidace polyaminů pomocí DAO a PAO (podle **SEILERA A RAULA, 2005**)



DAO ... diaminoxidasa; PAO ... polyaminoxidasa; SAT ... spermin / spermidin *N*-acetyltransferasa; SMO ... sperminoxidasa

2.1.2 Absorpce polyaminů střevní stěnou

V literatuře (**BARDÓCZ ET AL., 1995**) se uvádí hodnota denního příjmu polyaminů potravou mezi 350 – 500 mikromoly. Tento údaj se týká typické stravy ve Velké Británii. Do střeva však nepřicházejí polyaminy jen z potravy, ale jsou rovněž syntetizovány střevními bakteriemi a pocházejí i z odumřelých buněk střevního epitelu, nebo se do střeva dostávají s trávicími šťávami. Nicméně potrava je hlavním zdrojem polyaminů uvnitř tenkého střeva. Krátce po přijetí potravy – **MILOVIC (2001)** uvádí do 120 minut – je většina polyaminů vstřebána stěnou tenkého střeva mechanismem pasivní difúze a hodnoty obsahu polyaminů se tak dostávají na úroveň před jídlem. Vstřebávání probíhá hlavně v předních úsecích tenkého střeva, dvanáctníku a proximální části lačníku. Polyaminy jsou ve střevní stěně intenzivně metabolizovány dřív, než se dostanou do krevního oběhu. Zatímco ve střevě byly zjištěny milimolární koncentrace, jejich obsahy v krevním oběhu dosahují pouze 10 – 20 mikromolů.

Ovšem aktivita enzymu ODC a příjem polyaminů jsou kontrolovány vnitrobuněčnou koncentrací polyaminů. Vyčerpání intracelulárních polyaminů v důsledku inhibice ODC nebo AdoMetDC vede ke zvýšení jejich příjmu ze stravy. Poznatky o transportu a regulaci příjmu polyaminů v savčích buňkách shrnuje **SEILER ET AL. (1996)**.

Polyaminy z potravy jsou metabolizovány na polyaminové a nepolyaminové produkty pomocí střevních enzymů, a to v různém poměru. U krys bylo na základě dřívějších studií zjištěno (**BARDÓCZ, 1993; BARDÓCZ ET AL., 1993; BARDÓCZ ET AL., 1995**), že z dávky radioaktivně značených PA zavedených do trávicího traktu (inkubovaných) bylo po jedné hodině pouze 11 – 15 % z celkového množství PUT bylo zachováno jako PUT a více než 80 % PUT podlehlo přeměně na polyaminy a nepolyaminové produkty, hlavně aminokyseliny. Na SPD a SPM je PUT přeměňován ve střevě z 18 – 24 %. SPD a SPM, označované někdy jako „pravé polyaminy", které jsou lépe zachovány a ukládány pro pozdější využití tkáněmi na rozdíl od PUT, který je metabolizován hlavně na nepolyaminové metabolity. SPD zůstává v nepřeměněné formě ze 79 – 82 % a SPM ze 72 – 74 %. Pokud se počítá i s tím, že tyto polyaminy vznikají z putrescinu, tělo má k dispozici k pozdějšímu využití 87 – 96 % SPD a 79 – 82 % SPM U krys se SPD ukládá především v kosterní svalovině, trávicím traktu (játra, střeva, pankreas) a v ledvinách.

2.1.3 Biologické role u člověka

Jak již bylo uvedeno, přirozené polyaminy jsou flexibilní polykationty, které za fyziologického pH vytvářejí dva až čtyři kladné náboje, díky kterým jsou schopné interagovat se záporně nabitými strukturami na buněčném povrchu a mohou tak zajišťovat řadu specifických funkcí v buňce. Dosavadní poznatky týkající se účinků polyaminů v eukaryotické buňce shrnují **SEILER A RAUL (2005)**. Polyaminy se účastní různých pochodů nejen při růstu a dělení buňky, ale také při apoptóze. Jako apoptóza se označuje geneticky programovaná smrt buňky. Fyziologická apoptóza je nedílnou součástí např. embryonálního vývoje a také regulace homeostázy orgánů. Polyaminy jsou v buňce vázány na makromolekuly (hlavně nukleové kyseliny), jsou v rovnováze s volnými polyaminy a jejich celkový obsah v buňce dosahuje 7-10 % buněčného obsahu (**GUGLIUCCI, 2005**). Vazebná energie polyaminů vzrůstá s počtem kladných nábojů od PUT ke SPM, proto je SPM považován za biologicky nejúčinnější. Ovlivňují stabilitu subcelulárních struktur (ribozomy), stabilizují makromolekuly nukleových kyselin a chromatin, regulují pevnost a stabilitu

buněčných membrán a uplatňují se při proteosyntéze. SPM inhibuje endonukleasy, což jsou enzymy, které při apoptóze odbourávají DNA.

2.1.3.1 Účast při růstu a obnově buněk střevní stěny

Výstelka tenkého střeva je jednou z nejrychleji proliferujících tkání v těle, proto vyžaduje vysoký příjem polyaminů (**MILOVIC, 2001**). Polyaminy přijímané potravou hrají významnou roli v růstu a vývoji trávicího traktu savců a jsou rovněž nezbytné pro udržení normálních vlastností trávicího traktu u dospělých jedinců (**DELOYER, PEULEN A DANDRIFOSSE, 2001**). SPD a SPM ovlivňují vyzrávání střevní sliznice i ostatních orgánů trávicí soustavy, ke kterému dochází hlavně v prvních týdnech vývoje savců po narození. Tímto způsobem se organismus adaptuje na nové prostředí. Změny v trávicím traktu se týkají funkčních i morfologických modifikací, změn aktivity střevních enzymů a rozvoje střevního imunitního systému spojených s přechodem na tuhou stravu po ukončeném kojení. Vliv PUT na tyto změny nebyl zjištěn.

LUK ET AL.(1980) dokázal u krys (citují **DELOYER, PEULEN A DANDRIFOSSE, 2001**), že specifická aktivita ODC a koncentrace polyaminů ve střevní sliznici po odstavení vzrůstá. Pokud byl kojeným mláďatům krys dodáván SPD i SPM, došlo v jejich střevní sliznici k biochemickým i morfologickým změnám srovnatelným s těmi, ke kterým dochází u nekojených mláďat. Modifikace tkání ostatních orgánů trávicího traktu, jater a pankreatu, se týkají diferenciace buněk.

U dospělých jedinců jsou polyaminy důležitými stimulátory růstu a obnovy buněk střevní stěny. Dřívější výzkumy dokázaly, že dlouhodobý příjem potravin neobsahujících polyaminy způsobuje nedokonalý vývoj sliznice tenkého i tlustého střeva (hypoplázie).

2.1.3.2 Účast při rakovinném bujení

Polyaminy jsou přirozenými složkami buněk živého organismu, kde zastávají řadu metabolických funkcí. V normálních buňkách jsou jejich obsah i příjem složitě regulovány biosyntetickými a katabolickými enzymy. Jejich zvýšený obsah byl zjištěn nejen v rychle rostoucích a regenerujících tkáních, ale i v rakovinných buňkách. Tkáň zhoubného nádoru obsahuje rychle se dělící buňky a polyaminy urychlují jeho rozvoj. Koncentrace PUT, SPD a N-acetylsperminu byla v karcinomu tlustého střeva dvakrát vyšší než ve zdravé sliznici (**WEISS ET AL., 2002**). Také aktivita ODC byla dvojnásobná. Znatelně vyšší koncentrace PA

byly nalezeny ve středně diferencovaných nádorech než v nádorech nedokonale diferencovaných. Tyto poznatky ukazují na to, že obsah polyaminů závisí na stádiu zhoubného nádoru. Polyaminy však nevyvolávají procesy karcinogeneze, samy o sobě nejsou přímými karcinogeny.

Výzkum se v současné době soustřeďuje na látky blokující činnost enzymů biosyntézy polyaminů a na sloučeniny podobné polyaminům svojí strukturou, u kterých se předpokládá chemoterapeutický efekt. Látkami s takovými účinky jsou zejména inhibitory enzymů ODC, AdoMetDC nebo SPD / SPM-synthas (**SEILER, 2003A**) a strukturní analogy a deriváty polyaminů (**SEILER, 2003B**).

Silné účinky proti zhoubným buňkám ukázalo už v 80. letech použití kombinace inhibitorů dvou klíčových enzymů biosyntézy polyaminů (**WALACE, HUGHES A THOMPSON, 2001**). **WOLTER, ULRICH A STEIN (2004)** shrnují dosavadní poznatky o resveratrolu jako další látky s možným chemoterapeutickým účinkem. V důsledku jeho působení klesají aktivity různých enzymů (také ODC) a je brzděna exprese protoonkogenů v buněčném jádře. Resveratrol a jeho analogy inhibují enzymy biosyntézy PA, ale naopak zvyšují aktivitu enzymů, které odbourávají PA (polyaminoxidas). Zastavení růstu zhoubné tkáně je tedy ovlivněno nejen blokováním syntézy PA, ale také zvýšením jejich katabolismu (**WOLTER, TURCHANOWA A STEIN, 2003**).

Strukturní analogy nahrazují přirozené polyaminy v buňce, ale nejsou schopné zajišťovat jejich funkce v buněčném metabolismu, což má za následek selhání buněčného metabolismu a smrt buňky. Rakovinné buňky mají vyšší požadavek na přirozené polyaminy a předpokládá se, že jsou citlivější vůči účinku strukturních analogů polyaminů než buňky zdravé (**THOMAS A THOMAS, 2003**). Strukturní analogy s vyšší hustotou kladného náboje nebo s konformačním omezením interagují silněji se zápornými náboji na povrchu řetězce DNA než přírodní polyaminy. **BHATTACHARYA ET AL. (2004)** z porovnání cytotoxicity strukturních analogů polyaminů proti lidským nádorům vyvodili, že čím mají větší afinitu k DNA, tím jsou pro buňky toxičtější. Příkladem těchto látek jsou aminooxyderiváty polyaminů, které představují slibný způsob snížení obsahu polyaminů v buňkách karcinomu tlustého střeva. Pomocí těchto látek se podařilo zastavit proliferaci buněk, což by mohlo být zvráceno jen několikanásobnou fyziologickou koncentrací exogenního SPD (**MILOVIC ET AL., 2001**).

Zhoubné buňky jsou schopné ve zvýšené míře přijímat i polyaminy z extracelulárních zdrojů, z potravy a polyaminy syntetizované střevními bakteriemi, což tlumí efektivitu již zmiňovaných látek s chemoterapeutickými účinky. V 90. letech začal výzkum zaměřený na snížení obsahu polyaminů v organismu (**QUEMENER ET AL., 1994**). Kombinace omezení

příjmu exogenních PA spolu s inhibicí syntézy polyaminů ve zhoubných buňkách se jeví jako slibná strategie v boji proti rakovině. Vztah metabolismu PA v buňce a tvorby a rozvoje zhoubných nádorů shrnuli např. **THOMAS A THOMAS (2003)** a **TETI, VISALLI A MCNAIR (2002)**.

Biogenní aminy a polyaminy mohou být na druhou stranu nitrosovány nebo fungovat jako prekurzory sloučenin, z nichž mohou vznikat karcinogenní N-nitrosaminy (**SHALABY, 1996**). Za karcinogenní jsou považovány nitrosaminy vznikající z aminů obsahujících sekundární aminoskupiny, jakými jsou právě spermidin a spermin a také agmatin.

2.1.3.3 Další účinky polyaminů

Nedostatečný příjem polyaminů může vést ke vzniku alergií na potraviny. Mezi hlavní faktory patří vedle genetických dispozic i zvýšená propustnost střevní sliznice pro makromolekuly a nedostatečný vývoj imunitního systému střeva. Polyaminy jako faktory hrající roli ve vyzrávání střevní sliznice a rozvoji střevního imunitního systému, mohou hrát významnou úlohu v prevenci vzniku alergií na potraviny. Pravděpodobnost rozvinutí alergie dosahuje 80 %, jestliže průměrný obsah SPM v mateřském mléce je nižší než 2 $nmol.l^{-1}$ a je téměř nulová, jestliže jeho koncentrace převyšuje 13 $nmol.l^{-1}$ (**DELOYER, PEULEN A DANDRIFOSSE, 2001**). **BARDÓCZ ET AL. (1995)** na základě shrnutí dřívějších poznatků vyvozuje, že kojené děti přijímají v mateřském mléce denně podstatně větší koncentrace PA než děti nekojené. Mateřské mléko se tedy zřejmě uplatňuje v prevenci vzniku alergií právě díky vyššímu obsahu PA než mléko kravské. Polyaminy se používají podle výzkumů, které shrnuje **BARDÓCZ ET AL. (1995)**, i v některých kosmetických přípravcích k podpoře růstu vlasů a ochraně pokožky proti škodlivému UV záření, tedy jako účinné antioxidanty.

Současné studie (**DAS A MISRA, 2004; FUJISAWA A KADOMA, 2005**) potvrzují dřívější předpoklady, že polyaminy, mezi které autoři řadí spolu s putrescinem i kadaverin, mají antioxidační účinky. Ve fyziologických koncentracích jsou schopné zhášet hydroxylové radikály. Tri- a tetraaminy (SPD a SPM) jsou schopné částečně zhášet i singletový kyslík. Ve vyšších koncentracích zháší superoxidové anionty. Volné radikály a některé aldehydy (malondialdehyd) působí jako oxidační stres pro buňky a poškozují membránové lipidy a proteiny i nukleové kyseliny v jádře. Nejsilnější účinky v ochraně membrány erytrocytů (**FARRIOL ET AL., 2003**) a neuronů v mozku (**BELLÉ ET AL., 2004**) měl SPM a nejslabší naopak PUT. Díky svým vlastnostem fungují polyaminy také jako antioxidační obrana buňky.

V poslední době se sleduje vliv polyaminů na zánětlivá onemocnění trávicího traktu jako je např. ulcerózní kolitida nebo Crohnova choroba, jejichž charakteristickým znakem je poškození střevního epitelu. **WEISS ET AL. (2004)** zjistili ve střevní sliznici pacientů s těmito chorobami znatelně větší obsah PA a jejich N-acetylovaných derivátů než u zdravých lidí. Rozdíl byl zjištěn v obsahu SPM ve sliznici s chronickým a akutním zánětem. Při chronickém zánětu byl obsah SPM, který má protizánětlivé účinky, nižší. To by mohlo nemoc zhoršovat. Již dřívější výzkumy ukázaly, že polyaminy působí imunosupresivně. Tuto vlastnost mají díky N-acetylovaným derivátům, které vznikají acetylací polyaminů účinkem SPD / SPM *N*-acetyltransferas. Endogenní polyaminy uvolněné z poškozených nebo odumřelých buněk mohou regulovat zánětlivý proces. Současný výzkum je soustředěn na vliv orálně podávaného SPM na záněty střev pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou.

Zvýšená aktivita enzymu arginasy byla zjištěna při přecitlivělosti buněk dýchacích cest vyvolané alergeny (při astmatu). Vyšší aktivita tohoto enzymu zesiluje reaktivitu dýchacích cest tím, že blokuje produkci oxidu dusnatého, který působí jako bronchodilatátor. **RICCIARDOLO, ZAAGSMA A MEURS (2005)** shrnují současné poznatky o možné léčbě astmatu zaměřené na metabolismus argininu a polyaminů. Předpokládá se, že L-prolin a polyaminy, které vznikají z ornithinu, se mohou účastnit přeměny plicní tkáně především zrychlením proliferace buněk.

V současné době se také diskutuje o možné souvislosti zvýšeného obsahu polyaminů v nervové tkáni a Alzheimerovy choroby. Bylo zjištěno (**HYND, SCOTT A DODD, 2004**), že syntéza PA v mozku je aktivována různými patologickými stavy. Nervové buňky ve spánkové oblasti šedé kůry mozkové pacientů trpících Alzheimerovou chorobou produkovaly více SPM i SPD jako prekurzoru SPM a současně klesal obsah PUT. Předpokládá se negativní vliv PA na receptory postsynaptické membrány neuronů při této chorobě.

Polyaminy mají díky svým vlastnostem také afinitu k některým receptorům CNS, které blokuje ethanol při závislosti člověka na alkoholu. **FONT ET AL. (2005)** popisují účinky analogu sperminu, DCD, který byl schopen výrazně redukovat příjem ethanolu u krys a může představovat jednu z možností léčby závislosti na alkoholu.

2.2. Obsah polyaminů v potravinách

2.2.1 Maso, vnitřnosti, ryby a masné výrobky

2.2.1.1 Čerstvé maso a vnitřnosti

Hlavním polyaminem v živočišných potravinách (maso, ryby) je spermin (SPM), zatímco spermidin (SPD) převažuje v potravinách rostlinného původu (**BARDÓCZ, 1993**). Čerstvé maso teplokrevných zvířat má vysoký obsah SPM, obvykle v rozmezí 20 – 60 $mg.kg^{-1}$. Nižší obsahy SPM, většinou nepřesahují 30 $mg.kg^{-1}$, jsou v literatuře uváděny pro čerstvé maso ryb. Obsah SPD v čerstvém mase a rybách zřídka přesahuje 10 $mg.kg^{-1}$. **SILVA A GLÓRIA (2002)** a **BARDÓCZ (1993)** vysvětlují vyšší obsah SPD v kuřecích výrobcích vyšším přídavkem přísad rostlinného původu. Pro čerstvá masa a masné výrobky vyrobené za dobrých hygienických podmínek je typický velmi nízký obsah putrescinu (PUT), často nižší než 2 $mg.kg^{-1}$. Hodnoty obsahu polyaminů v hovězím a vepřovém mase a masných výrobcích shrnuje **KALAČ (2006)**. V příloze II je uveden přehled obsahu polyaminů v potravinách (**KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005**).

V roce 1977 Mietz a Karmas stanovili pro ryby a mořské plody tzv. index čerstvosti CQI (chemical quality index) jako poměr obsahů (v $mg.kg^{-1}$) PUT, CAD a HIM k obsahům SPD a SPM, jehož hodnota <1 zaručuje vysokou kvalitu a hodnota >10 znamená pokročilý stupeň kažení.

$$CQI = \frac{PUT + CAD + HIM}{SPD + SPM}$$

HERNÁNDEZ-JOVER ET AL. (1996) zahrnuli do čitatele Mietzova-Karmasova kritéria navíc tyramin (TYM), neboť tento amin vzniká při kažení masa a navrhli BAI (biogenic amine index). Jeho hodnota <5 vychází pro čerstvé maso a hodnota >50 pro maso zkažené.

$$BAI = \frac{PUT + CAD + HIM + TYM}{SPD + SPM}$$

SILVA A GLÓRIA (2002) použily pro kuřecí maso jako index kvality poměr polyaminů SPD / SPM. Zjistily, že poměr těchto polyaminů roste s časem. Jeho hodnota <0,5 charakterizuje vysoce kvalitní maso, zatímco pro maso zkažené vychází hodnota SPD / SPM > 0,7. Podle autorek je výhodou tohoto indexu, že závisí na růstu bakterií (četnosti), nikoli však na složení mikroflóry.

2.2.1.2 Skladování a kuchyňské úpravy

Podle údajů literatury byl obsah SPD během skladování vepřového a kuřecího masa téměř stálý, zatímco obsah SPM mírně klesal. Tento pokles je vysvětlován tím, že SPM je využíván bakteriemi jako zdroj dusíku. Obsah PUT se při skladování masa zvyšuje. **EDWARDS, DAINTY A HIBBARD (1983)** zjistili nárůst obsahu PUT v hovězím, vepřovém a skopovém mase skladovaném při 5 °C spolu s nárůstem četnosti bakterií. Několikanásobně větší změna v obsahu PUT byla zjištěna v mletém mase. Složky mletého masa jsou přístupnější bakteriálním enzymům. Podobné změny během skladování hovězího masa zjistili **YANO ET AL. (1995)**. Nárůst PUT byl zjištěn po 13 dnech skladování při 10 °C, zatímco u vakuovaného masa skladovaného při 0 °C byl obsah PUT i po 39 dnech skladování pod mezí detekce. **VINCI A ANTONELLI (2002)** pozorovali změny obsahu polyaminů v bílém (kuřecím) a červeném (hovězím) mase. Rychlejší nárůst PUT byl zjištěn v kuřecím mase, neboť jeho kratší svalová vlákna jsou přístupnější proteolytickým enzymům. Uvolněné aminokyseliny podléhají dekarboxylačním reakcím. V obou těchto druzích masa obsah SPM během skladování klesl, zatímco obsah SPD se v hovězím mase mírně zvýšil. V kuřecím mase se po 30 dnech snížil obsah obou polyaminů na velmi nízké hodnoty. **VILLANUEVA-VALERO ET AL. (2005)** skladovali vakuované vepřové vnitřnosti – ledviny, játra a slezinu. Obsahy SPD a SPM vykazovaly mírný pokles bez ohledu na teplotu skladování. Maximální obsah PUT v játrech, slezině a ledvinách skladovaných při 0 °C (v původním materiálu) činil 68, 139 a 207 $mg.kg^{-1}$.

Jak už bylo uvedeno, v čerstvém rybím mase se vyskytují pouze přirozené polyaminy SPD a SPM. **BAXIAS-NOGUERAS ET AL. (2002)** při skladování hejka (*Merluccius merluccius*) ze Středozemního moře zaznamenali značný vzrůst obsahu PUT, který byl intenzivnější při 6 – 8 °C než při 0 °C, a mírný pokles obsahu SPD a SPM. Podobné výsledky byly zjištěny při skladování kapřího masa při 3 nebo 15 °C, kdy znatelně vzrostl obsah PUT, obsah SPD mírně poklesl, ale obsah SPM zůstal konstantní. Skladovatelnost rozmělněného rybího masa (tzv. separátu) se ukázala být o 2 – 3 dny kratší než u celých kapřích půlek při 3 °C (**KŘÍŽEK,**

PAVLÍČEK A VÁCHA, 2002). VECIANA-NOGUES, MARINÉ-FONT A VIDAL-CAROU (1997B) uvádějí značný pokles obsahu SPD a SPM během konzervace masa tuňáka sterilací, zatímco obsah PUT zůstal beze změny. Tatáž laboratoř (VECIANA-NOGUES ET AL., 2004) zjistila výrazné změny obsahů SPD a SPM ve vzorcích tuňáka inokulovaných bakteriemi *Morganella morganii* a *Klebsiella oxytoca*. Předpokládaná schopnost *Morganella morganii* vytvářet PUT nebyla prokázána při žádné z ověřovaných teplot 0, 4 a 20 °C. MENDES, GONÇALVES A NUNES (1999) sledovali proces zrání částečně a úplně vykuchaných sardinek, čerstvých a zmražených. Počáteční obsah obou těchto polyaminů (asi 20 $mg.kg^{-1}$) se během zrání (240 dní) příliš neměnil. Při skladování ančoviček v oleji, což je tepelně neupravený rybí produkt řazený mezi tzv. polokonzervy, se obsah SPD a SPM měnil různě v jednotlivých ověřovaných šaržích, zatímco obsah PUT byl po dobu devíti měsíců skladování při 8 – 10 °C stabilní. Tyto změny však nehrají příliš velkou roli z hlediska příjmu polyaminů (VECIANA-NOGUES, MARINÉ-FONT A VIDAL-CAROU, 1997A).

V čerstvém syrovém mase se obvykle vyskytují jen polyaminy SPD a SPM, biogenní aminy vznikají teprve činností bakterií. Při výrobě vařené vepřové šunky došlo k poklesu SPM a SPD zhruba na polovinu původního obsahu v čerstvé surovině (HERNÁNDEZ-JOVER ET AL., 1996). Během tepelných úprav čerstvé i skladované vepřové pečeně došlo k poklesu obsahu PUT na asi polovinu výchozího obsahu (PAULSEN, HAGEN A BAUER, 2006). Stejná laboratoř (HAGEN, BAUER A PAULSEN, 2005) nezaznamenala žádné výrazné změny obsahu SPM a SPD během kuchyňských úprav hovězího, vepřového, krůtího a rybího (losos) masa. Tepelná úprava v mikrovlnné troubě a pečení znamenaly největší pokles PUT.

2.2.1.3 Masné výrobky

Jak už bylo uvedeno, pro čerstvá masa a masné výrobky vyrobené za dobrých hygienických podmínek je typický velmi nízký obsah putrescinu (PUT). Výjimkou jsou v tomto směru rybí omáčky používané v různých zemích jako koření (STUTE ET AL., 2002), treščí jikry a konzervované krabí maso, kde obsah PUT dosahuje vyšších hodnot, často nad 100 $mg.kg^{-1}$. V rybích omáčkách STUTE ET AL. (2002) uvádí až 1260 $mg.kg^{-1}$ v sušině. Obsah PUT a dalších biogenních aminů, které vznikají činností bakterií v masných výrobcích, závisí na kvalitě a čerstvosti použitého masa. BOVER-CID, IZQUIERDO-PULIDO A VIDAL-CAROU (2000) toto potvrdily analýzou výrobků z mraženého vakuovaného a z chlazeného nevakuovaného vepřového masa. Maso ošetřené druhým způsobem umožnilo růst bakterií a výrobky z takového masa pak obsahovaly několikanásobné koncentrace BA oproti výrobkům

z masa ošetřeného prvním způsobem. Uzeniny vyrobené z masa skladovaného 11 dní obsahovaly mnohem víc PUT než produkty vyrobené z masa skladovaného 8 dní (**BOVER-CID ET AL., 2003**). Pokud se při výrobě masných výrobků používá vysoce kvalitní maso a dodržují se přísné hygienické normy, vznik nežádoucích BA je silně potlačen.

Při výrobě fermentovaných masných výrobků závisí obsah biogenních aminů na druhu použité startérové kultury mléčných bakterií a na době zrání výrobku. Startérové kultury se používají ke zkrácení doby zrání a k optimalizaci senzorických vlastností produktu. **BOVER-CID, IZQUIERDO-PULIDO A VIDAL-CAROU (2001A)** zjistily významné potlačení vzniku biogenních aminů s použitím kultury *Lactobacillus sakei*. Použití cukru (glukosa, laktosa nebo sacharosa) při výrobě uzenin může rovněž významně snížit vznik biogenních aminů (**BOVER-CID, IZQUIERDO-PULIDO A VIDAL-CAROU, 2001B**). Také přídavek glukono-delta-laktonu silně potlačil tvorbu PUT (**MAIJALA ET AL., 1993**). Siřičitan sodný používaný někdy jako konzervační látka při výrobě uzenin (byť v EU nepovolená) potlačuje růst plísní, kvasinek a gramnegativních bakterií. **BOVER-CID, MIGUÉLEZ-ARRIZADO A VIDAL-CAROU (2001)** nezjistili vztah mezi tvorbou PUT a množstvím této konzervační látky. Vyšší obsah PUT byl zjištěn uvnitř uzeniny než na jejím povrchu, přičemž tenčí salámy obsahovaly obecně méně biogenních aminů než salámy s větším průměrem (**BOVER-CID ET AL., 1999**). Vliv použití určité technologie při výrobě masných výrobků (vysoký tlak, balení v ochranné atmosféře nebo ve vakuu) uvádí **RUIZ-CAPILLAS A JIMENÉZ-COLMENERO (2004)**. Tvorba PUT byla zjištěna ve výrobcích v ochranné atmosféře. Nejnižší obsah všech BA měly výrobky vakuované.

2.2.2 Ostatní potraviny

Literární údaje o obsahu polyaminů v ostatních potravinách (mléko, mléčné výrobky, potraviny rostlinného původu a nápoje) shrnují tabulky v příloze II (**KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005**).

2.2.2.1 Mléko, mléčné výrobky a vejce

Obsahy PA a BA jsou velmi nízké v kravském mléce, jogurtu, mateřském mléce, zatímco v sýrech, hlavně zrajících, může obsah PUT dosahovat hodnot až několik set $mg.kg^{-1}$. **MOTYL ET AL. (1995)** sledovali několik faktorů ovlivňujících obsah SPD a SPM v kravském a prasečím mléce. Byly to hlavně vnitrodruhové a individuální vlastnosti zvířete, fáze laktace

a věk krávy. Nejvyšší hodnoty obou PA byly zjištěny v prvních fázích laktace (zejména v mlezivu - kolostru) a u mladších dojnic. U prasnic zjistili vztah mezi počtem selat a obsahem PA v mléce matky. Intenzivnější sekrece mléka znamenala vyšší obsah SPD a SPM v mléce.

NOVELLA-RODRÍGUEZ ET AL. (2003) na základě analýzy 100 vzorků různých druhů nezrajících a zrajících španělských sýrů zjistily rozdíly v obsahu biogenních aminů nejen mezi druhy sýrů, ale také mezi jednotlivými vzorky stejného druhu sýra. U nezrajících sýrů byl obsah PUT velmi nízký (kolem 3 $mg.kg^{-1}$), zatímco u tvrdých zrajících sýrů vyrobených z nepasterizovaného mléka byl velmi variabilní (od nestanovitelných obsahů až do 670 $mg.kg^{-1}$). Obsah PUT se rovněž měnil od povrchu směrem ke středu sýra podobně, jak bylo uvedeno u fermentovaných masných výrobků. Žádné významné rozdíly nebyly zjištěny pro SPD a SPM, neboť tyto aminy nejsou produkovány bakteriální mikroflórou. V nezrajících sýrech bylo zjištěno pouze velmi malé množství SPM. **NOVELLA-RODRÍGUEZ, VECIANA-NOGUÉS A VIDAL-CAROU (2000)** uvádějí v nezrajících sýrech stejně SPD jako SPM, ve zrajících sýrech SPD převažoval. **GENARO ET AL. (2003)** považují za účelné pro minimalizaci tvorby biogenních aminů včetně PUT při výrobě sýrů používat pasterizované mléko. Nežádoucí dekarboxylující bakterie se při tepelném ošetření mléka potlačí. Při výrobě kozích sýrů nebyly zjištěny rozdíly mezi sýry vyrobenými z pasterizovaného mléka a těmi, pro jejichž výrobu bylo použito mléko ošetřené vysokým tlakem. Zdá se, že rozhodujícím faktorem pro obsah PA a BA v kozích sýrech je kvalita použitého mléka (**NOVELLA-RODRÍGUEZ ET AL., 2002**).

Mateřské mléko je první potravinou novorozence. Jak už bylo uvedeno, polyaminy v mateřském mléce ovlivňují vyzrávání střevní sliznice v prvních týdnech po porodu a prevenci vzniku alergií na některé bílkoviny potravin u dětí. Obsah PA se během laktace mění. V prvních fázích je hladina PUT velmi nízká, zatímco obsah SPD a SPM po třech dnech dosahuje osmi- až dvanáctinásobku původní hodnoty. Po čtyřech měsících laktace obsah PUT klesá, zatímco hladiny SPD a SPM zůstávají přibližně stejné (**ROMAIN, DANDRIFOSSE, JEUSETTE A FORGET, 1992**). U kojících matek existují rozdíly v obsahu PA v mateřském mléce. Tyto individuální rozdíly mohou být dány geneticky a ovlivňovány stravou nebo životním stylem (**DANDRIFOSSE ET AL., 2000**).

Obsah polyaminů ve vařených slepičích vejcích je velmi nízký. **BARDÓCZ (1995)** a **OKAMOTO ET AL. (1997)** uvádějí obsah SPD i SPM nižší než 1 $mg.kg^{-1}$. Tato jediná dostupná literatura uvádí výsledky stanovení pouze u pěti vzorků.

2.2.2.2 Potraviny rostlinného původu

Polyaminy se běžně vyskytují ve všech částech rostlinného organismu, kde plní řadu fyziologických funkcí od aktivace organogeneze po ochranu rostliny proti stresu. Úlohu PA ve zvýšení životnosti skladovaného klimakterického a neklimakterického ovoce objasňují **VALERO, MARTÍNEZ-ROMERO A SERRANO (2002)** a **PERÉZ-VINCENTE ET AL., (2002)**. Polyaminy se v rostlinném materiálu vyskytují buď jako volné, nebo vázané ve formě konjugátů. PUT se nejčastěji váže s fenolovými kyselinami - kumarovou, kávovou nebo ferulovou. Diaminy a polyaminy vázané s kyselinou skořicovou byly nalezeny v řadě tříd rostlin. Také poměr mezi volnými a vázanými polyaminy závisí na druhu rostliny (**BAGNI A TASSONI, 2001**). Fyziologický účinek konjugovaných PA není dosud zcela objasněn.

Běžné PA v ovoci a zelenině (obecně v rostlinách) jsou PUT a SPD, zatímco SPM se většinou vyskytuje v nízkých množstvích. Obsahy polyaminů v různých potravinách rostlinného původu jsou uvedeny v příloze II (**KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005**). Obsah PUT je vysoký (kolem 40 $mg.kg^{-1}$) v některých druzích zeleniny a ovoce jako jsou například pomeranče, mandarinky, grapefruity a džusy z těchto citrusových plodů. Ze zeleniny nejvíce PUT obsahují především fermentované výrobky jako kysané zelí, kečup a sójové výrobky a také mražený zelený hrášek. Vysoký obsah SPD (často nad 30 $mg.kg^{-1}$) byl stanoven zejména v luštěninách, květáku a brokolici. Z ovoce je nejvíce SPD v hruškách. Tyto potraviny, hlavně luštěniny, obsahují zároveň vysoké množství SPM.

Vysoké množství PA v sójových výrobcích uvádějí např. **YEN (1986)** a **OKAMOTO ET AL.(1997)**. **STUTE ET AL. (2002)** publikovali údaje o vysokém obsahu PUT v sójových omáčkách.

Na obsah biogenních aminů v kysaném zelí mají vliv použité startérové bakteriální kultury. **ŠPIČKA ET AL. (2002)** testovali tři různé kultury: homofermentativní *Lactobacillus plantarum*, heterofermentativní *L. buchneri* a komerční směs čtyř mléčných bakterií Microsil. *L. buchneri* a *Enterococcus faecium z* Microsilu vykazovaly dekarboxylasovou aktivitu a umožnily vznik PUT, zatímco *L. plantarum* výrazně snížil produkci PUT, která byla vysoká u spontánně kvasícího zelí.

Změny obsahu PA zjistili **SIMON-SARKADI, HOLZAPFEL A HALÁSZ (1994)** v listové zelenině – čínském zelí, ledovém salátu a čekance – během skladování při 5 °C. Po 5 dnech se několikanásobně zvýšil obsah PUT, ale hladiny SPD a SPM zůstaly téměř beze změny.

Výrazné změny v obsahu PA byly zjištěny během pražení zelených kávových bobů (**CIRILO ET AL., 2003**) a závisely na způsobu pražení. V pražené kávě nebyl na rozdíl od kávy

zelené zjištěn PUT a SPM. Obsah SPD během pražení znatelně klesl. Tento pokles byl větší při americkém způsobu pražení (6 min) než při francouzském (12 min).

Dostupná literatura uvádí nízký obsah polyaminů i v bramborách, rýži a cereáliích. Obsah SPD v těchto potravinách zřídka přesahuje hodnotu 20 $mg.kg^{-1}$. Vyšší obsah PUT a SPD kolem 40 $mg.kg^{-1}$ uvádí **BARDÓCZ (1995)** v bramborových lupíncích.

Pivo ani víno nejsou významnými zdroji příjmu polyaminů. Nadměrný příjem těchto alkoholických nápojů může znamenat určité riziko z hlediska obsahu biogenních aminů, hlavně histaminu a tyraminu. Polyaminy v pivu mají původ hlavně ve sladu. Shrnující údaje o obsahu polyaminů a biogenních aminů v pivu uvádějí **KALAČ A KŘÍŽEK (2003)**. Obsah SPM a SPD byl v lahvovém pivu většinou pod mezí detekce (**KALAČ ET AL., 2002**). Putrescin spolu s histaminem a tyraminem je nejvíce se vyskytující amin ve vínech (**LOVAUD-FUNEL, 2001; ROMERO ET AL., 2002; BOVER-CID ET AL., 2005**). SPM a SPD jsou jediné vyskytující se aminy v hroznech vína. Jejich obsah se značně snižuje při kvašení vína (**BOVER-CID ET AL., 2005**).

3. Cíl práce

Na základě poznatků z literatury byly pro disertační práci vymezeny následující cíle:

1. Optimalizovat jednotlivé kroky stanovení PA v potravinách živočišného původu.
2. Stanovit obsahy PA v některých významných potravinách, pro které nejsou v literatuře věrohodné údaje.
3. Ověřit u vybraných potravinových surovin a potravin faktory ovlivňující obsah polyaminů.

V rámci prvního cíle, kdy je používán postup stanovení biogenních aminů (**KŘÍŽEK, PELIKÁNOVÁ, 1998**), při kterém se jako analytické koncovky používá micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC), je třeba zodpovědět tyto dílčí otázky:

- ověřit dobu skladovatelnosti izolovaných extraktů a derivatizovaných vzorků před vlastním měřením,
- porovnat vhodnost dvou postupů derivatizace - dansylaci a benzoylaci,
- porovnat vhodnost micelární elektrokinetické kapilární elektroforézy (MECC) s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Pokud jde o stanovení obsahu PA v potravinách:

- výběr bude zaměřen hlavně na potraviny, u kterých byl publikován vysoký obsah polyaminů, ale zatím jde o pouze ojedinělé údaje,
- polyaminy budou stanovovány v potravinách, které tvoří významnou složku výživy v ČR, ale u nichž nejsou v literatuře věrohodné údaje.

Z možných faktorů ovlivňujících obsah PA v potravinách bude pozornost zaměřena:

- na ověření vlivu plemene, pohlaví a stáří zvířat na obsah PA v hovězím a vepřovém mase a játrech po porážce,
- na ověření vlivu doby a způsobu skladování, různých kuchyňských a technologických úprav u vybraných potravin.

4. Experimentální část

4.1 Použité chemikálie, přístroje a zařízení

Pro analýzu polyaminů byly kromě běžných laboratorních pomůcek, laboratorního skla a chemikálií používány následující chemikálie, přístroje a zařízení. Všechny používané chemikálie byly analytické čistoty (p.a.).

Chemikálie

1,7-diaminoheptan, Sigma Aldrich, Německo,
Acetonitril pro HPLC (gradient grade), Merck, Německo,
Benzoylchlorid, Sigma Aldrich, Německo,
Dansylchlorid, Sigma Aldrich, Německo,
Diethylether, Penta, Chrudim, ČR,
Natriumdodecylsulfát, Sigma, St. Louis, MO, USA,
Dusík (UN 1066), Linde Technoplyn, ČR,
Helium (UN 1046), Linde Technoplyn, ČR,
Heptan, Fluka, Buchs, Švýcarsko,
Histamin dihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,
Hydrogenuhličitan sodný, Lachema, Neratovice, ČR,
Hydroxid sodný, Penta, Chrudim, ČR,
Kadaverin dihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,
Kyselina chloristá, Acros Organic, New Jersey, USA,
Prolin, Fluka, Buchs, Švýcarsko,
Putrescin dihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,
Spermidin trihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,
Spermin tetrahydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,
Tetraboritan sodný, Fluka, Buchs, Švýcarsko,
Tryptamin hydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,
Uhličitan draselný, Lachema, Neratovice, ČR,
Uhličitan sodný, Lachema, Neratovice, ČR,

Přístroje a zařízení

Analytické váhy, B 204, Mettler Toledo, Švýcarsko,

Automatický dávkovač vzorků ke kapalinovému chromatografu, Midas Spark, Holandsko,

Kapalinový chromatograf (HPLC) SpectraSYSTEM, TSP, USA

Kolona pro HPLC, RP-C_{18} (průměr zrna sorbentu 3 μm, vnitřní průměr kolony 2 mm, délka kolony 150 mm), Varian, Austrálie,

Mixer, Moulinex, Francie,

Odstředivka Sigma 2-5, Německo,

Ponorný mixer, Bosch, Německo,

Přístroj pro kapilární zónovou elektroforézu SpectraPHORESIS^{TM} 2000, TSP, USA,

Svářečka fólií, ETA, ČR,

Termostatová skříň Liebherr, Německo,

Topná deska Schott, Německo,

Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK 31, Německo,

4.2 Odběr vzorků

4.2.1 Vzorky pro analýzu polyaminů v čerstvém mase, játrech a krvi

Pro určení výchozích hodnot polyaminů v čerstvém mase a čerstvých játrech byly analyzovány vzorky hovězího a vepřového masa, hovězích, vepřových, ovčích a kuřecích jater, hovězí a vepřové krve. Krev byla analyzována z toho důvodu, že játra patří k orgánům nejvíce zásobovaným krví. Vzorky byly odebírány na jatkách firmy Maso v Plané nad Lužnicí a firmy Ing. Václav Kozel v Týně nad Vltavou.

Kosterní svalovina jatečných zvířat byla odebírána 24 hodiny po porážce po zchlazení v rychlozchlazovně na 3 °C během bourání vepřových půlek či hovězích čtvrtí a transportována v chladicí tašce do laboratoře. Játra byla odebírána na porážkové lince, transportována v chladicí tašce do laboratoře a tam skladována v chladničce při cca 4 °C do druhého dne. Krev byla odebrána během vykrvení zvířat na porážkové lince a bez přidání stabilizátoru (protisrážlivé látky) převezena v chladu do laboratoře, kde byla uložena v chladničce obdobně jako játra. Maso a játra byly analyzovány vždy po 24 hodinách po porážce pro určení výchozích hodnot obsahů polyaminů. Analýzy krve pro získání doplňujících údajů o výskytu polyaminů byly provedeny 24 hodiny po odběru.

Hovězí maso bylo získáno celkem z 63 mladých býků a 8 krav a hovězí krev ze 7 krav. Získávání vzorků z krav 24 hodiny po porážce bylo zkomplikováno veterinárními opatřeními v souvislosti s výskytem BSE. Hmotnost býků se pohybovala od 374 do 744 kg a stáří v rozmezí 15 – 28 měsíců. Býci byli rozděleni do třech skupin podle typu užitkovosti na masné, mléčné a kombinované skupiny s 9, 13 a 22 zvířaty. Všechna zvířata byli kříženci několika plemen, a tudíž nebylo možné porovnávat mezi sebou jednotlivá plemena. Devatenáct zvířat se nepodařilo zařadit ani do jedné skupiny z toho důvodu, že buď jejich genotyp nebyl znám, nebo nevyhovoval zařazení ani do jedné skupiny podle užitkovosti. Stáří krav se pohybovalo v širším rozmezí než u býků, mezi 41 až 114 měsíci, hmotnost od 564 do 830 kg. Vzhledem k málo početnému souboru nebyly krávy rozdělovány do skupin podle typu užitkovosti. Dva různé svaly - roštěnec (*musculus longissimus dorsi*) a kýta (*m. gluteus medius*) byly odebírány vždy z anatomicky stejného místa, z pravé zadní čtvrtě. Vzorek roštěnce byl odebrán v místě 9. hrudního obratle, tedy v místě, kde se při porážce provádí rozdělení jatečné půlky na dvě čtvrti.

Vepřové maso bylo získáno z 27 jatečných prasat (15 vepříků a 12 prasniček), jejichž porážková hmotnost se pohybovala od 93,4 do 147,1 kg (průměr 118,1 kg). Většina zvířat byla okolo šesti měsíců stará. Zvířata byla kříženci několika plemen. Analyzovány byly rovněž dva druhy svaloviny - pečeně (*m. longissimus dorsi*) a kýta (*m. psoas major*), které byly jako v případě hovězího masa odebírány vždy ze stejného místa.

Vepřová krev byla odebírána při vykrvení ze 7 zvířat a dopravena v chladící tašce do laboratoře. Analýzy vepřové krve byly provedeny také 24 hodiny po vykrvení jako v případě krve hovězí.

Obsahy polyaminů zjištěné u hovězích jater vyvolaly potřebu informativního zjištění obsahu polyaminů rovněž v játrech ovcí. Za obdobných podmínek jako u skotu či prasat byly odebrány vzorky jater třech bahnic a devíti jehňat asi tři měsíce starých – šesti beránků a třech jehniček.

Kuřecí játra byla odebrána ve firmě Jihočeská drůbež ve Vodňanech ze 38 kusů kuřat hybridu Cobb 500 bezprostředně po porážce, dopravena v chladicí tašce do laboratoře a uložena v chladničce. Analyzována byla obdobně jako játra skotu a prasat 24 hodiny po porážce.

4.2.2 Vzorky pro ověření skladovatelnosti extraktů a derivatizovaných vzorků a ověření opakovatelnosti stanovení PA

Skladovatelnost extraktů vzorků v kyselině chloristé byla ověřována oběma používanými metodami analýzy polyaminů a biogenních aminů, MECC a HPLC. Doba skladování extraktů a derivatizovaných vzorků byla zvolena podle kapacitních možností daného přístroje.

Metoda MECC

Skladovatelnost extraktů pro metodu MECC byla ověřována analýzou hovězího zadního masa a rybího masa. Rybí maso bylo ověřováno v souvislosti se souběžně probíhajícím výzkumem tvorby biogenních aminů ve svalovině některých sladkovodních ryb. Pro zvýšení obsahu putrescinu bylo hovězí maso po zakoupení skladováno 3 dny v chladničce při teplotě 4 ± 1 °C a následně 3 dny při laboratorní teplotě (cca 20 °C). Původ hovězího masa ani dobu skladování před zakoupením se nepodařilo zjistit. Rybí svalovina pocházela z kapra obecného (*Cyprinus carpio*), po zabití ryby byla skladována tři dny při laboratorní teplotě. Oba druhy masa byly skladovány v polyethylenových sáčcích. Z každého druhu svaloviny, hovězí i rybí, byl připraven extrakt, a ten byl následně skladován v chladničce při 4 ± 1 °C po dobu 6 – 8 týdnů. Každý týden skladování byly extrakty obou druhů svaloviny derivatizovány a ihned analyzovány. Extrakt rybího masa byl navíc derivatizován ihned po extrakci a tento derivatizovaný vzorek byl skladován v chladničce při 4 ± 1 °C také po dobu 6 – 8 týdnů. Každý týden skladování byla provedena analýza.

Opakovatelnost stanovení metodou MECC byla zjišťována analýzou 6 paralelních vzorků hovězího roštěnce a hovězích jater. Maso bylo zakoupeno v řeznictví. Roštěnec pocházel z krávy 35 měsíců staré, před zakoupením byl v obchodě skladován 7 dní v chladicím pultu (podmínky chlazení se nepodařilo zjistit). Původ jater a dobu jejich skladování před prodejem se rovněž nepodařilo zjistit. Oba druhy vzorků byly analyzovány v laboratoři ihned po nákupu, bez dodatečného skladování.

Metoda HPLC

Skladovatelnost extraktů pro HPLC byla ověřována analýzou vepřových jater a ledvin. Vzorky vepřových ledvin byly pro tento pokus použity z důvodu souběžně probíhajícího výzkumu obsahu polyaminů a biogenních aminů ve vepřových a hovězích vnitřnostech.

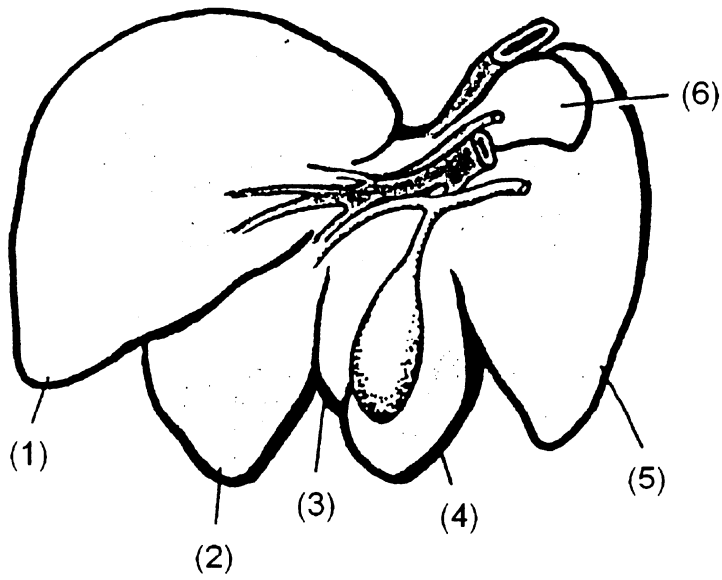
Čerstvé vnitřnosti byly zakoupeny v řeznictví a v laboratoři před extrakcí skladovány ještě 3 dny v PE sáčku při cca 3 °C. Kyselý extrakt byl skladován po dobu 8 týdnů při cca 3 °C v chladničce. Každý týden časové řady byla provedena derivatizace extraktů a vzorky byly ihned analyzovány metodou HPLC. Derivatizované vzorky pro tento pokus nebyly skladovány, byly analyzovány ihned po přípravě.

Opakovatelnost stanovení metodou HPLC byla zjišťována analýzou vždy osmi paralelních vzorků vepřové pečeně a vepřových jater. Čerstvé maso i játra byly zakoupeny rovněž v řeznictví. Pro zvýšení obsahu putrescinu (případně dalších biogenních aminů) bylo maso ponecháno v chladničce při cca 3 °C ještě 2 týdny po zakoupení.

4.2.3 Vzorky pro ověření rovnoměrnosti obsahu PA v jaterních lalocích

Játra (obecně všechny měkké orgány) mají velkou metabolickou rezervu. To znamená, že v daný okamžik metabolizuje např. jen 10 % z celého orgánu a zbytek odpočívá, regeneruje. Pro jaterní buňky je jejich funkce značně zatěžující. Právě metabolizující buňky jsou rozloženy v tkáni každého z laloků rovnoměrně, tedy nestává se, že by metabolizoval jen jeden lalok a ostatní regenerovaly. Kvůli tomu se teoreticky nepředpokládají rozdíly v obsahu polyaminů mezi jaterními laloky. Vepřová játra se anatomicky dělí na 6 laloků: levý laterální, levý mediální, kvadratický, pravý mediální, pravý laterální a ocasatý. Laloky kvadratický a ocasatý jsou velmi malé a při jatečném zpracování jsou vesměs natolik poškozené, že jsou z hlediska konzumace jen málo významné. Proto nebyly analyzovány. Anatomické rozdělení laloků vepřových jater je znázorněna na obrázku 4. Pro porovnání rozložení polyaminů v jednotlivých lalocích vepřových jater byla odebrána celá játra ze třech zvířat. Játra byla analyzována 24 hodiny po porážce. Orgán byl rozdělen na 4 velké laloky, každý lalok byl zhomogenizován mixerem Moulinex a byly provedeny 3 paralelní analýzy.

Obr. 4 Anatomie vepřových jater



(1) ... levý laterální, (2) ... levý mediální, (3) ... čtyřhranný, (4) ...pravý mediální, (5) ... pravý laterální, (6) ... ocasatý

4.2.4 Vzorky pro sledování změn obsahu PA při skladování jater

Pro tento pokus byla odebrána játra celkem ze 12 zvířat. Zvířata byla označena písmeny A až L. Játra ze třech zvířat byla použita pro volné skladování (VOL) v mikrotenovém sáčku jako v případě mražených vzorků, troje játra byla skladována v ochranné atmosféře (OA), další troje játra ve vakuovaném obalu (VAK) a dvoje játra byla zmražena (MR) v mikrotenovém sáčku určeném pro mražení potravin (nízkotlaký vysokohustotní polyethylen, tloušťka fólie 0,017 mm) při –18 °C. Játra v ochranné atmosféře, ve vakuovaném obalu a volně balená byla skladována při 2 °C v termostatové skříni Liebherr. Játra ze zvířete označeného A byla rozdělena na tři části, a to pro volné skladování (VOL), skladování v ochranné atmosféře (OA) a ve vakuovaném obalu (VAK) s pěti vzorky v rámci každé varianty, tzn. 15 vzorků po cca 120 g. U ostatních zvířat byla celá játra použita pouze pro jednu variantu s pěti vzorky, tzn. po cca 350 g. Toto řešení lépe odpovídalo malospotřebitelskému balení jater. Vakuování a balení do ochranné atmosféry bylo provedeno na jatkách v Týně n/Vlt. za obvyklých provozních podmínek (přístroj Vac-Star S 240 M) při

odběru vzorků (24 hodiny po porážce). Použitá ochranná atmosféra se skládala ze 70 % N_2 a 30 % CO_2. Maso a játra byly baleny do polyethylenové folie o tloušťce 80 μm. Propustnost pro kyslík byla mimořádně nízká (pod 0,02 ml / m^2 za den při tlaku 0,1 MPa). Tyto hodnoty změřila laboratoř Ústavu konzervace potravin a technologie masa VŠCHT v Praze. Pro maso a masné výrobky se doporučují obaly málo propustné pro plyny. Co se týká složení plynů OA, pro balení červeného masa je nevhodný čistý CO_2, neboť je rozpustný v potravinách a způsobuje pokles pH a snížení vaznosti masa. Proto se mísí s N_2. Vysoký obsah O_2 zase urychluje oxidaci tuků v mase a podporuje růst aerobních bakterií (**DOBIÁŠ A OPATOVÁ, 2004**). Játra pro skladování VOL a MR byla balena v laboratoři také ihned po odběru vzorků. Časové řady pro skladování uskladněných jater byly zvoleny následujícím způsobem:

VOL: 0 – 1 – 2 – 5 – 9 dní,
OA a VAK: 0 – 5 – 9 – 15 – 21 dní,
MR: 0 – 14 dní – 2 – 3 – 4 – 6 měsíců,
přičemž dobou „nula“ se rozumí játra balená 24 hodiny po porážce.

Časové řady byly zvoleny takto, neboť pro volné skladování v chladničce v domácích podmínkách se nepředpokládá delší doba než týden a pro mražení ne více než půl roku (poté už játra hořknou). Záruční doba vakuově baleného chlazeného masa a masných výrobků se uvádí 21 dní a v ochranné atmosféře 20 dní. Játra, která byla použita celá pro jeden typ skladování, byla rozdělena na tolik stejných částí, kolik je bodů časové řady (tj. játra VOL, OA a VAK na 5 částí a MR na 6 částí). První část z každých těchto jater byla ihned analyzována, tedy v čase t_0, což bylo 24 hodiny po porážce. Ostatní části byly zabaleny každá zvlášť a skladovány podle časové řady. Před extrakcí polyaminů byl celý vzorek skladovaných jater zhomogenizován mixerem Moulinex, protože kažení neprobíhá v celé skladované části potraviny rovnoměrně. Ve skladovaných játrech byl vzhledem k úbytkům hmotnosti (uvolňování šťávy, příp. i odpar, resp. sublimace u jater zmrazených) během skladování stanovován obsah sušiny. Pro tyto vzorky byla stanovována sušina sušením při 105 °C do konstantní hmotnosti.

4.2.5 Vzorky pro sledování změn obsahu PA při skladování masa

Pro tento pokus byly vybrány vzorky vepřové pečeně (*m. longissimus dorsi*). Tento sval byl odebrán celkem z 6 kusů prasat. Zvířata byla označena římskými číslicemi I až VI. Pečeně z prvních třech kusů byla zmražena a skladována po dobu 6 měsíců za obdobných podmínek jako vepřová játra. Pečeně č. IV, V a VI byly použity pro chladírenský způsob skladování. Celý sval z každého zvířete byl rozdělen přibližně na třetiny a ty následně na části po cca 200 g, které byly jednotlivě zabaleny. První třetina byla skladovaná volně v polyethylenovém sáčku (VOL), druhá zabalena do ochranné atmosféry (OA) a třetí do vakua (VAK). Metodika, použitý materiál i zařízení jsou shodné se skladováním vepřových jater.

4.2.6 Vzorky pro sledování změn obsahu PA při kuchyňských úpravách jater

Pro vepřová játra byly vybrány a provedeny nejběžnější kuchyňské úpravy, a to vaření, dušení a restování. Játra pro tento pokus byla odebrána na jatkách v den porážky a ihned po přivezení do laboratoře rozdělena na dvě poloviny. První polovina byla skladována do druhého dne při cca 3 °C v chladničce a druhá polovina byla skladována za stejných podmínek sedm dní. Kuchyňské úpravy byly tedy prováděny 24 hod po porážce a ještě opakovány pro srovnání po dalších šesti dnech skladování. Skladování před úpravou jater bylo zvoleno proto, aby byly co nejvěrohodněji napodobeny podmínky úpravy masa a vnitřností v domácnosti. Maso ani vnitřnosti obvykle nebývají upravovány ihned po zabití zvířete, ale určitou dobu skladovány. To platí zejména pro kosterní svalovinu, neboť je zapotřebí nechat maso vyzrát, aby po tepelné úpravě bylo křehké a senzoricky hodnotné. Při vaření a dušení bylo analyzováno jak maso, tak vývar. Vaření a dušení bylo prováděno u jater i masa stejným způsobem a vycházelo z postupu popsaného **PAULSENEM ET AL. (2006)**.

Pro vzorky jater i svaloviny analyzovaných po kuchyňských úpravách byla stanovována sušina sušením při 105 °C do konstantní hmotnosti.

- **Vaření**

Vaření jater probíhalo v zataveném polyethylenovém sáčku ve vodní lázni. Teplota vodní lázně byla udržována na 100 ± 1 °C. Do sáčku byla vložena část jater (150 g) nakrájené na kostičky přibližně 2 cm velké a zalita destilovanou vodou přibližně o téže hmotnosti (150 ml). Celý sáček byl ponořen do vroucí vody a obsah vařen po dobu 36 min. Doba vaření byla

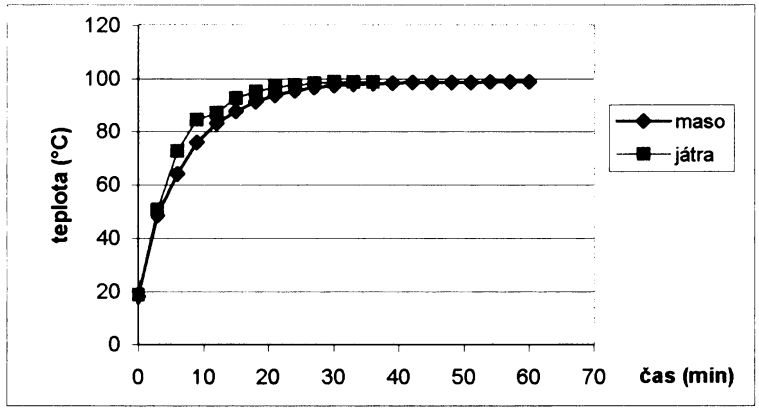
zvolena tak, aby se játra vařila alespoň půl hodiny nad tzv. hygienicky bezpečnou teplotou 70 °C, při které se ničí choroboplodné zárodky a dochází k inaktivaci většiny enzymů.

- **Dušení**

Tento pokus měl dvě části: dušení bez přídavku vody ve vlastní šťávě a s přídavkem malého množství vody (odpovídající čtvrtině hmotnosti jater). Dušení probíhalo za stejných podmínek jako vaření (souběžně v jedné vodní lázni). Hmotnost jater zatavovaných do sáčku byla také přibližně 150 g. V první variantě pokusu nebyla přidána žádná voda, ve druhé 37 ml vody. Sáčky s obsahem byly ponořeny do vroucí vody a obsah vařen také 36 min jako v předešlém případě.

Při obou těchto pokusech (vaření i dušení) byla měřena teplota vařených (dušených) jater vpichovým teploměrem a odečítána každé 3 minuty. Změny teploty během vaření a dušení jsou znázorněny graficky na obrázku 5.

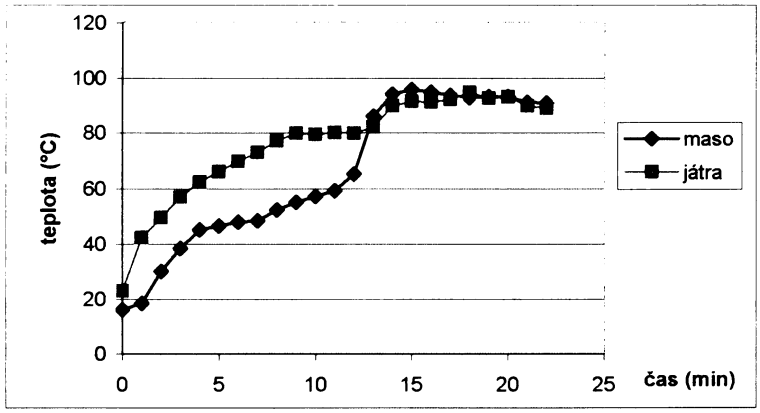
Obr. 5 Změna teploty masa a jater při vaření na vodní lázni při cca 100 °C



- **Restování**

Pro restování jater byla použita pánev z chirurgické oceli (BergHOFF). Zesílené pětivrstvé dno umožňuje dobrý přestup tepla. Jako zdroj tepla byla použita topná deska Schott. Na pánev předehřátou na cca 180 °C byl položen plátek jater o tloušťce asi 2 cm (přibližně 150 g) a nechal se bez tuku restovat 11 minut po každé straně. Teplota uvnitř steaku byla měřena vpichovým teploměrem a byla odečítána každou minutu. Změny teploty jater a masa během restování ukazuje obrázek 6.

Obr. 6 Změna teploty masa a jater při restování při cca 180 °C



4.2.7 Vzorky pro sledování změn obsahu PA při kuchyňských úpravách masa

Nejběžnější kuchyňské úpravy masa u nás jsou vaření, dušení, pečení, restování a smažení v trojobalu. Metodika vaření, dušení a restování byla shodná s metodikou těchto úprav u jater. Byla jen prodloužena doba vaření a dušení z 36 na 60 min s cílem uvařit maso do měkka. Dušení masa bylo prováděno jen jednou variantou, a to dušení bez vody ve vlastní šťávě. Pro tento pokus byla odebrána pečeně ze dvou kusů prasat (zvíře A a B) z jatek 24 hodin po porážce a dopraveny do laboratoře v chladicí tašce. Ihned po přivezení byla každá pečeně rozdělena na dvě poloviny. První polovina byla ihned zpracována uvedenými kuchyňskými úpravami a druhá byla skladovaná ještě 6 dní v chladničce při cca 3 °C. Důvod skladování před úpravami byl popsán výše. Oproti játrům byly navíc provedeny následující kuchyňské úpravy:

- **Pečení**

Plátek masa (cca 200 g) byl pečen v železném pekáči s poklicí v troubě při 250 °C bez přídavku tuku (tuk vadí hlavně při filtraci extraktu). Doba pečení byla zvolena 45 minut. Během této úpravy bylo maso několikrát podléváno malým množstvím destilované vody. Po vychladnutí byla provedena extrakce.

- **Smažení v trojobalu**

Tato úprava byla napodobena přesně tak, jak se provádí v domácnosti. Plátek masa (cca 200 g) jsem naklepala paličkou na maso a obalila postupně v mouce, rozšlehaném vejci a naposled ve strouhance. Pro smažení byla použita pánev BergHOFF z nerezové oceli se

zesíleným pětivrstvým dnem. Na rozpálený řepkový olej (vrstvička cca 0,5 cm; 180 °C) jsem vložila řízek a nechala smažit přibližně 10 minut po každé straně. Po vyjmutí z pánve byl řízek osušen od přebytečného tuku ubrouskem a po vychladnutí byl odstraněn trojobal.

4.3 Analytické postupy

Polyaminy byly stanovovány dvěma analytickými postupy, metodou micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC), kterou detailně popsali **KŘÍŽEK A PELIKÁNOVÁ (1998)** a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Potřeba vyvinout a využít metodu HPLC byla vyvolána omezenou kapacitou přístroje pro MECC. Metoda MECC byla použita pro analýzu souboru vzorků čerstvého masa a jater pro určení výchozích hodnot polyaminů, metoda HPLC pro sledování dynamiky PA při obvyklých způsobech skladování masa, rovnoměrnosti obsahu PA v jednotlivých jaterních lalocích a pro sledování změn obsahů PA během kuchyňských úprav masa a jater běžně prováděných v domácnostech. Skladovatelnost kyselých extraktů z biologických materiálů a opakovatelnost stanovení PA byla ověřována oběma analytickými postupy.

4.3.1 Analýza PA metodou MECC

Extrakce

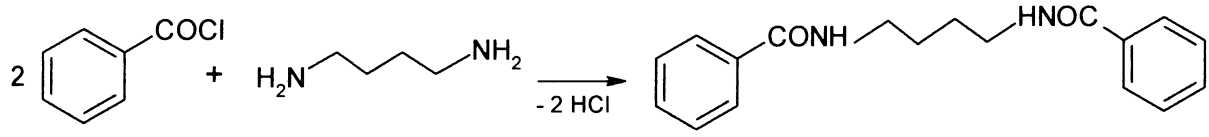
1) Navážíme **40 ± 1 g vzorku** masa a přelijeme nezbytně nutným objemem (přibližně 100 ml) **0,6M kyseliny chloristé**,
2) Směs zhomogenizujeme cca **3 min** kuchyňským ručním mixerem (Bosch, 600 W) a odstředíme (Sigma 2-5, průměr rotoru 272 mm) při 3500 otáčkách za minutu po dobu **10 minut**,
3) Supernatant filtrujeme přes skládaný filtrační papír (pro kvalitativní analýzu, nekrepovaný nehlazený) a celkový objem filtrátu doplníme do **140 - 150 ml** roztokem 0,6 M kyseliny chloristé.

Extrakty byly do doby analýzy skladovány v chladničce při teplotě 4 ± 1 °C. Běžná doba skladování byla kratší než jeden měsíc, ojediněle (např. při poruše přístroje pro MECC) až 2 měsíce.

Derivatizace

1) Odpipetujeme **2,5 ml kyselého extraktu**,
2) Přidáme **125 µl vnitřního standardu**, kterým je roztok 1,7-heptandiaminu v 0,6M $HClO_4$ (400 $mg.l^{-1}$),
3) Směs zalkalizujeme **1 ml 9,8M NaOH**,
4) Poté pipetujeme **100 µl benzoylchloridu p.a.** jako derivatizačního činidla (polyaminy jsou stanovovány jako příslušné *N*-benzamidy, mechanismus reakce je znázorněn na obrázku 7),
5) Po intenzivním třepání, při kterém probíhá reakce, vzorky necháme ještě **15 minut v ultrazvukové lázni** a následně protřepeme **1 minutu s 2,5 g NaCl**,
6) Přidáme **3 ml** čistého **diethyletheru**, do kterého vzniklé N-benzamidy polyaminů a biogenních aminů extrahujeme,
7) **Odebereme 1 ml supernatantu**, který vysušíme teplým vzduchem (vysoušeč vlasů),
8) Odparek rozpustíme v **400 µl roztoku methanolu ve vodě** (1:1, v/v).

Obr. 7 Schotten - Baumannova reakce



Analytická koncovka

Jako analytická koncovka byla použita metoda micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC). Analýza byla provedena na přístroji Spectraphoresis 2000 (Thermo Separation Products, Remont, CA, USA). Detekční limity pro tuto metodu jsou **2,1 $mg.kg^{-1}$** pro PUT; **1,0 $mg.kg^{-1}$** pro SPD; **1,4 $mg.kg^{-1}$** pro SPM. Spolu s polyaminy byly touto metodou stanovovány i další čtyři biogenní aminy, histamin, tyramin, tryptamin a kadaverin. Detekční limity pro tyto látky jsou 2,1; 3,5; 1,3 a 1,4 $mg.kg^{-1}$. Uvedené detekční limity byly spočítány pro vzorky kysaného zelí (**KŘÍŽEK A PELIKÁNOVÁ, 1998**). Opakovatelnost stanovení byla prověřována 6 paralelními analýzami vzorků roštěnce a hovězích jater a byla pro polyaminy počítána z výsledků analýz vzorků jater, neboť obsahy PUT a SPD byly v roštěnci pod mezí

detekce. Pro hovězí játra byla zjištěna následující opakovatelnost: PUT 24,4 %; SPD 9,5 % a SPM 9,1 %. Pro SPM v hovězím roštěnci byla zjištěna opakovatelnost analýzy 4,8 %.

4.3.2 Analýza PA metodou HPLC

Extrakty přírodních vzorků do 0,6M kyseliny chloristé byly připravovány výše uvedeným způsobem. Oba použité analytické postupy se liší způsobem derivatizace a v použití analytické koncovky.

Derivatizace

Extrakty byly derivatizovány podle Peulena (O. Peulen, Univerzita Liège, Belgie – písemné sdělení), původní metoda byla pro naše podmínky upravena.

Postup derivatizace pro tuhé vzorky:

1) Pipetujeme **1 ml extraktu** vzorku v 0,6M kyselině chloristé,
2) Přidáme **100 µl vnitřního standardu**, kterým je roztok 1,7-heptandiaminu v 0,6M $HClO_4$ o koncentraci 400 $mg.l^{-1}$,
3) Následně roztok neutralizujeme **1,5 ml uhličitanového roztoku**, který musí být vždy před analýzou čerstvý,

Příprava uhličitanového neutralizačního roztoku:

Počet vzorků	1	2	4	5	6	8	10
(g) K_2CO_3	0,666	1,332	1,998	2,664	3,33	4,664	5,328
(ml) roztoku AB	2	4	6	8	10	14	16

Příprava roztoku AB, který nemusí být pokaždé čerstvě připravován:

Roztok A: Na_2CO_3 **2,65 g ad 50 ml**

Roztok B: $NaHCO_3$ **4,2 g ad 100 ml**

4) Přidáme **1 ml derivatizačního činidla** (roztok 5 mg dansylchloridu na 1 ml acetonu); tento roztok musí být také před každou derivatizací čerstvě připraven. Reakční schéma znázorňující derivatizaci je na obrázku 8.
5) Po přidání roztoku dansylchloridu se vzorek nechá **třepat 20 hodin ve tmě** při laboratorní teplotě,

6) Poté dávkujeme **200 µl roztoku L-prolinu** (0,1 g v 1 ml vody) a pro zreagování nadbytečného činidla a třepe se ještě 1 hodinu ve tmě,
7) Přidáme **3 ml heptanu**, do kterého vzniklé deriváty polyaminů a biogenních aminů extrahujeme, a převracíme 2,5 minuty (Peulen následně vzorky odstřeďuje 5 min při 2000 ot .min^{-1} při 4 °C, ale podle zkušeností v naší laboratoři tento krok není nutný),
8) Po **odebrání 1 ml supernatantu** se vzorek odpaří do sucha pod dusíkem za laboratorní teploty,
9) Odparek se rozpustí v **1,5 ml roztoku acetonitrilu** ve vodě (68 %, v/v) a přefiltruje skleněným filtrem (velikost pórů 1,7 µm).

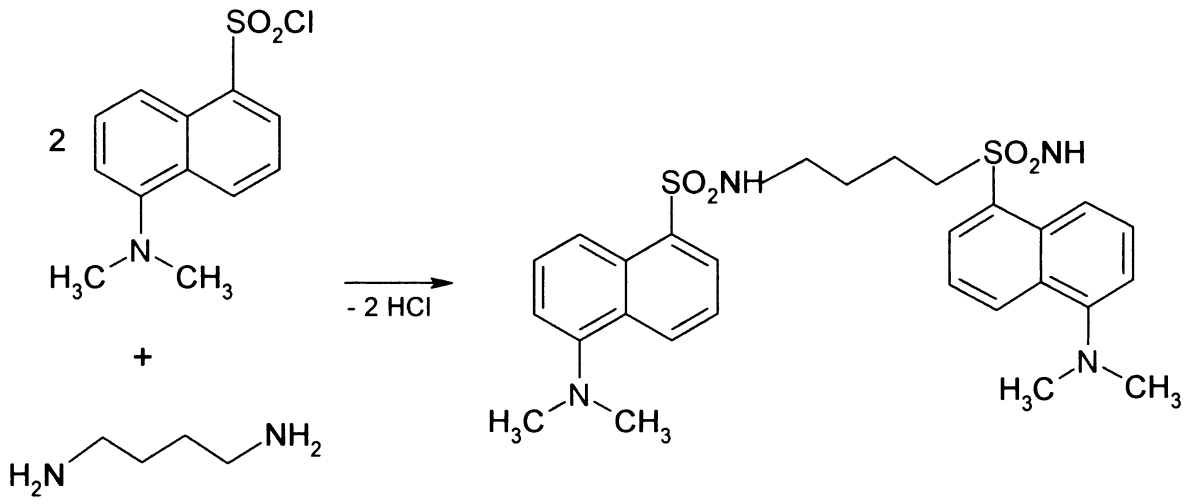
Postup derivatizace pro tekuté vzorky:

Pro vzorky vývarů z jater a masa byl postup stanovení PA upraven následujícím způsobem. Extrakce byla vynechána, neboť se jedná o tekutý vzorek.

1) **Filtrace vývaru** za sníženého tlaku přes mlynářské síto (filtrát byl ihned použit pro derivatizaci, neboť by se při skladování zkazil – došlo by k nárůstu obsahu biogenních aminů bakteriální činností),
2) Pipetujeme **10 ml vývaru** a přidáme 100 µl vnitřního standardu,
3) Dále přidáme **5 ml uhličitanového tlumivého roztoku** a **5 ml derivatizačního činidla**,
4) Třepeme ve tmě po dobu **20 hodin**,
5) Přidáme **1 ml roztoku L-prolinu** a po protřepání, které trvá ještě **1 hodinu ve tmě**, extrahujeme do **5 ml heptanu**,
6) Následuje odstředění po dobu **5 minut při 2000 ot.min^{-1}** a při laboratorní teplotě,
7) Odebereme **3 ml supernatantu** a po odfoukání pod dusíkem se vzorek rozpouští v obvyklém množství **1,5 ml roztoku acetonitrilu**.

Použité chemikálie v tomto postupu i jejich koncentrace zůstávají stejné jako v případě derivatizace tuhých vzorků.

Obr. 8 Reakce aminů s dansylchloridem



Analytická koncovka

Jako analytická koncovka byla použita metoda vysokoúčinné kapilární chromatografie (HPLC), přístroj SpectraSYSTEM (vysokotlaké čerpadlo P2000, Fluorescenční detektor FL3000 a UV detektor 3000HR). Vedle třech polyaminů bylo současně stanovováno pět biogenních aminů - tryptamin, fenylethylamin, tyramin, histamin a kadaverin. Jako mobilní fáze byly použity roztoky acetonitrilu ve vodě (roztok A: 50 % v/v a roztok B: 95 % v/v), rozdělení analyzovaných derivátů aminů bylo docíleno gradientovou elucí na koloně RP-C_{18}. Objem nastřikovaného vzorku byl 10 µl. Detekce probíhala na UV detektoru při vlnové délce 225 nm a na fluorescenčním detektoru při excitační vlnové délce 330 nm a emisní vlnové délce 500 nm. Profil gradientové eluce je znázorněn v tabulce 1.

Tab.1 Profil gradientové eluce při HPLC-analýze dansylovaných derivátů aminů

čas (min)	% A	% B	průtok mobilní fáze (ml.min^{-1})
0	60	40	0,25
8	30	70	0,25
9	0	100	0,25
20	0	100	0,25
21	60	40	0,25
36	60	40	0,25

Detekční limity pro tuto metodu jsou **1,2 mg.kg^{-1}** pro PUT; **1,7 mg.kg^{-1}** pro SPD; **2,4 mg.kg^{-1}** pro SPM. Hodnoty detekčních limitů (mg.kg^{-1}) pro ostatní stanovované biogenní aminy tryptamin, fenylethylamin, kadaverin, histamin a tyramin byly zjištěny 1,3; 2,2; 1,2; 1,2 a 1,4. Tyto hodnoty byly stanoveny jako dvojnásobek šumu základní linie. Opakovatelnost stanovení byla ověřována 8 paralelními analýzami vepřových jater a vepřové pečeně skladovaných 2 týdny v chladničce. Opakovatelnost stanovení vyšla pro vzorky jater následující: PUT 2,3 %; CAD 1,7 %; TYM 4,7 %; SPD 4,4 %; SPM 7,5 % a pro vzorky pečeně: CAD 4,7 %; TYM 5,9 % a SPM 5,3 %.

4.4 Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení výsledků analýz byl použit program Microsoft Excel, program STATISTICA a program NCSS. Obsah polyaminů v mase a játrech jatečných zvířat byl charakterizován aritmetickým průměrem, směrodatnou odchylkou (S_x), mediánem a rozpětím. Statistická významnost rozdílů byla testována Studentovým testem, ANOVA a Duncanovým testem. Pro testování statistické významnosti změn obsahů polyaminů v závislosti na čase byla použita regresní analýza na hladině významnosti $P < 0,05$.

5. Výsledky a diskuse

5.1 Stanovení polyaminů

5.1.1 Optimalizace jednotlivých kroků stanovení

V rámci optimalizace kroků stanovení byla ověřována jak skladovatelnost extraktů a derivatizovaných vzorků, tak i opakovatelnost stanovení. Skladovatelnost i opakovatelnost byly ověřovány oběma použitými metodami, tedy benzoylací / MECC a dansylací /HPLC.

5.1.1.1 Opakovatelnost stanovení

Jak už bylo uvedeno v experimentální části, opakovatelnost stanovení polyaminů metodou MECC byla ověřována šesti paralelními analýzami vzorků hovězího roštěnce a hovězích jater. V hovězím roštěnci byly hodnoty PUT a SPD pod mezí detekce. Opakovatelnost stanovení polyaminů byla odhadována jako relativní směrodatná odchylka (VK) a byla pro SPM a SPD v hovězích játrech nižší než 10 % a pro SPM v hovězím roštěnci nižší než 5 %. Pouze pro velmi nízké hodnoty PUT v játrech (průměrná hodnota 6,3 $mg.kg^{-1}$) byla hodnota opakovatelnosti 24,4 %. Průměrné obsahy PA v hovězích játrech a roštěnci, hodnoty směrodatných odchylek (S_x) a relativních směrodatných odchylek (VK) shrnuje tabulka 2.

Tab. 2 Opakovatelnost stanovení PA metodou MECC

	Hovězí játra			Hovězí roštěnec		
	Průměr ($mg.kg^{-1}$)	S_x ($mg.kg^{-1}$)	VK (%)	Průměr ($mg.kg^{-1}$)	S_x ($mg.kg^{-1}$)	VK (%)
PUT	6,3	1,5	24,4	-	-	-
SPD	142,2	13,5	9,5	-	-	-
SPM	35,8	3,3	9,1	19,1	0,9	4,8

Opakovatelnost stanovení polyaminů metodou HPLC byla ověřována osmi paralelními analýzami vepřové pečeně a vepřových jater. Vzorky byly před analýzou skladovány pro zvýšení obsahu biogenních aminů dva týdny v chladničce. Opakovatelnost stanovení byla odhadována pro putrescin, kadaverin, tyramin, spermidin a spermin jako

relativní směrodatná odchylka (VK). Obsahy PUT a SPD byly ve vepřové pečeni pod mezí detekce. Ve všech případech (kromě SPM v játrech) vyšla opakovatelnost stanovení nižší než 5 %. Pro SPM ve vepřových játrech byla opakovatelnost stanovení 7,5 %. Průměrné hodnoty PA ve vepřových játrech a pečeni, hodnoty směrodatných odchylek (S_x) a relativních směrodatných odchylek (VK) shrnuje tabulka 3.

Tab. 3 Opakovatelnost stanovení PA metodou HPLC

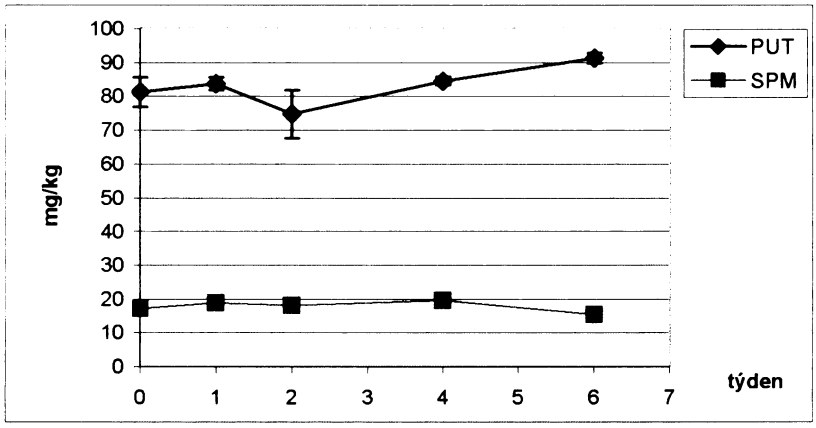
	Vepřová játra			Vepřová pečeně		
	Průměr ($mg.kg^{-1}$)	S_x ($mg.kg^{-1}$)	VK (%)	Průměr ($mg.kg^{-1}$)	S_x ($mg.kg^{-1}$)	VK (%)
PUT	8,9	0,2	2,3	-	-	-
CAD	30,3	0,5	1,7	2,6	0,1	4,7
TYM	96,5	4,5	4,7	6,5	0,4	5,9
SPD	14,5	0,6	4,4	-	-	-
SPM	77,4	5,8	7,5	19,1	1,0	5,3

5.1.1.2 Skladovatelnost extraktů a derivatizovaných vzorků

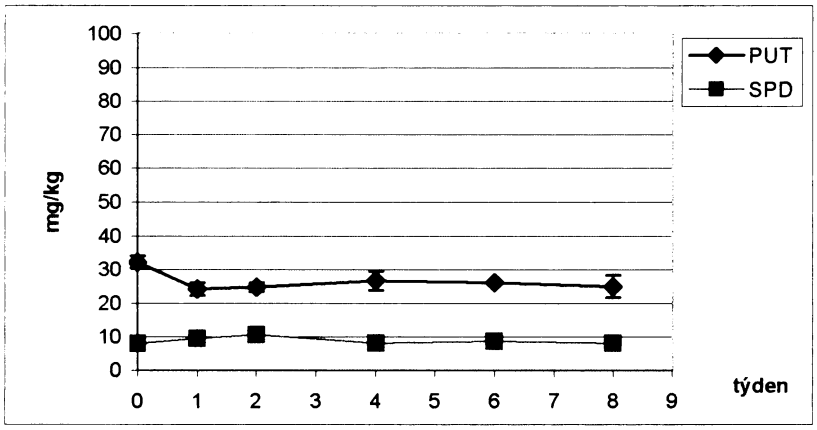
Z důvodu kapacity analytických metod MECC a HPLC bylo nutné ověřit dobu skladovatelnosti kyselých extraktů a derivatizovaných vzorků při cca 3 °C, aniž by došlo ke změnám obsahu sledovaných PA, což by znamenalo znehodnocení vzorků. V silně kyselém prostředí kyseliny chloristé jsou polyaminy zakonzervovány a nepředpokládá se bakteriální nebo enzymatická aktivita během skladování. Literatura uvádí možnost skladování těchto extraktů až několik měsíců beze změn koncentrace polyaminů a biogenních aminů (**SLOCUM ET AL., 1989**).

Pro ověření skladovatelnosti pro metodu MECC byly skladovány extrakty zkaženého hovězího zadního masa a zkažené rybí svaloviny (tato matrice byla ověřována pro souběžně probíhající výzkumný projekt sledování BA v mase sladkovodních ryb). Změny obsahu polyaminů během skladování extraktů jsou znázorněny na obrázcích 9 a 10.

Obr. 9 Změny obsahu PUT a SPM při skladování extraktu zkaženého hovězího masa

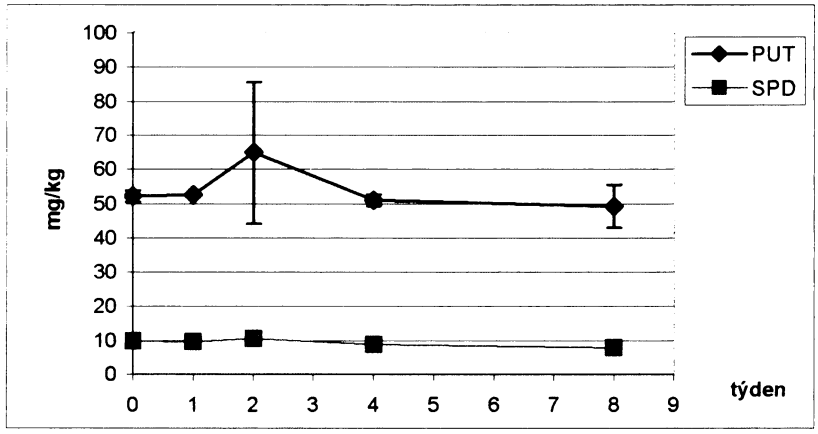


Obr. 10 Změny obsahu PUT a SPD při skladování extraktu zkažené rybí svaloviny



V následujícím grafu (obr 11) je znázorněna změna obsahu PUT a SPD během skladování derivatizovaného (benzoylovaného) extraktu rybí svaloviny.

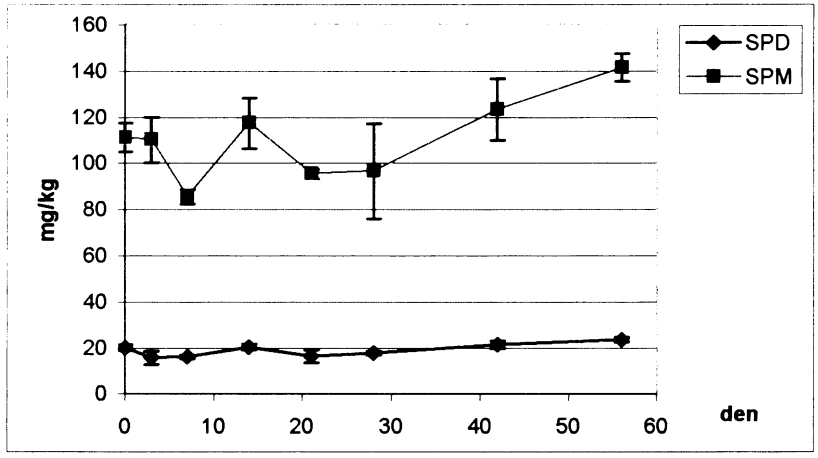
Obr. 11 Změny obsahu PUT a SPD v derivatizovaném vzorku zkažené rybí svaloviny



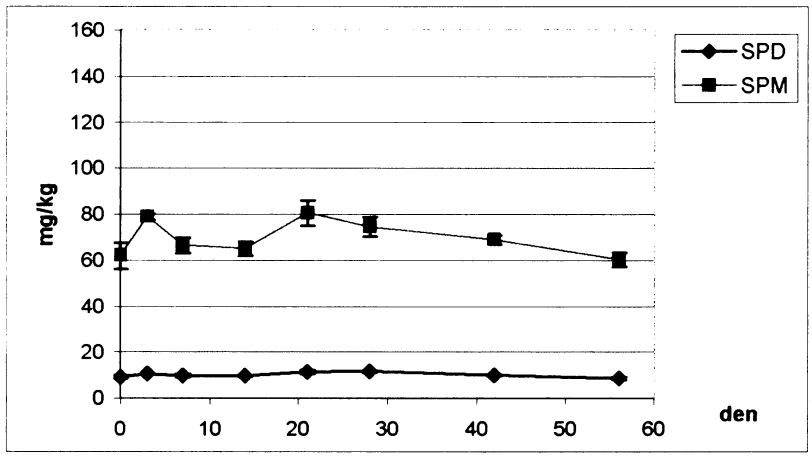
Jak je vidět z grafů, obsah SPM a SPD při skladování extraktů a derivatizovaných (benzoylovaných) vzorků po dobu 6 – 8 týdnů se významně nemění. Ani v případě PUT v rybím mase nebyla změna významná. Nárůst PUT ve druhém týdnu skladování derivatizovaného rybího extraktu můžeme zřejmě přiřadit chybě analytické metody. V případě skladování extraktu hovězího masa je z obrázku 9 vidět mírný nárůst PUT zejména ve 4. až 6. týdnu skladování. Ve všech případech byla testována strmost lineární regrese programem NCSS a nebyla prokázána odlišnost strmosti od nuly ani v jednom z nich ($P < 0,05$), což znamená, že se při skladování extraktů a derivatizovaných vzorků po dobu 6-8 týdnů v chladničce obsah polyaminů nemění.

Pro ověření skladovatelnosti pro metodu HPLC byly skladovány extrakty vepřových jater a ledvin (tato matrice je studována v navazující disertační práci). Derivatizované (dansylované) vzorky v tomto případě skladovány nebyly, protože kapacita HPLC-přístroje umožňovala všechny analyzované vzorky měřit ihned po derivatizaci. Změny obsahu polyaminů během skladování extraktů po dobu 8 týdnů (56 dnů) jsou graficky znázorněny v následujících obrázcích 12 a 13.

Obr. 12 Změny obsahu SPD a SPM během skladování extraktu vepřových jater



Obr. 13 Změny obsahu SPD a SPM během skladování extraktu vepřových ledvin



Jak je patrné z grafů 12 a 13, při skladování extraktů nedocházelo k významné změně v obsahu polyaminů s výjimkou obsahu SPM při skladování extraktu vepřových jater, kdy došlo k nárůstu ze 111 na 141 $mg.kg^{-1}$. K nejvýznamnějšímu nárůstu došlo během posledních dvou týdnů. Pro ověření významnosti tohoto nárůstu byla testována strmost lineární regrese programem NCSS. Nebyla prokázána odlišnost strmosti od nuly ani v jednom případě ($P < 0,05$).

Na základě provedených experimentů a jejich statistického vyhodnocení lze vyvodit, že je možné skladovat extrakty vzorků v chladničce při cca 3 °C po dobu až 8 týdnů, aniž by došlo ke statisticky významné změně obsahu polyaminů v extraktu.

5.1.2 Porovnání metod benzoylace a MECC s dansylací a HPLC

Polyaminy v mase a játrech byly analyzovány dvěma analytickými metodami, metodou MECC a metodou HPLC. Obě metody mají odlišnou nejen analytickou koncovku, ale i způsob derivatizace extraktu. Jak už bylo uvedeno v experimentální části, každá z těchto metod byla použita pro různé soubory vzorků, které spolu bezprostředně nesouvisejí. Pro určení výchozích hodnot obsahu polyaminů v mase a játrech byla použita metoda MECC a pro sledování dynamiky změn obsahu polyaminů při skladování a kuchyňských úpravách masa a jater byla použita metoda HPLC.

Pro porovnání výsledků zjištěných oběma těmito metodami byly analyzovány vzorky zkažených vepřových jater, ledvin a vepřové svaloviny. Smyslem mikrobiální zkázy bylo získat matrice se stanovitelnými obsahy biogenních aminů. Z každého vzorku byl získán jeden extrakt a pro každý extrakt bylo provedeno 5 paralelních derivatizací a měření příslušnou metodou. Rozdíl mezi získanými hodnotami PUT, SPD a SPM oběma metodami byl testován regresní analýzou. Obě metody, HPLC a MECC, poskytují významně odlišné výsledky pro všechny polyaminy ($P < 0,05$), přičemž dansylace s HPLC poskytuje poněkud nižší hodnoty. Významný rozdíl se projevuje hlavně ve vyšších obsazích (>100 $mg.kg^{-1}$), zatímco při nižších hodnotách jsou výsledky srovnatelné. Rozdíly v průměrných hodnotách polyaminů ve vzorcích masa, jater a ledvin udává tabulka 4.

Tab. 4 Rozdíly v průměrných obsazích polyaminů ($mg.kg^{-1}$) zjištěných metodami MECC a HPLC

	Benzoylace /MECC			Dansylace / HPLC		
	PUT	SPD	SPM	PUT	SPD	SPM
Játra	50,9 ± 3,5	35,7 ± 0,8	128,6 ± 3,1	31,9 ± 0,4	22,3 ± 0,5	105,4 ± 2,8
Ledviny	nd	22,9 ± 1,4	63,1 ± 1,2	nd	16,9 ± 0,3	58,9 ± 2,8
Maso	6,0	3,3 ± 1,6	22,5 ± 2,8	4,5	nd	21,7 ± 2,1

nd ... pod mezí detekce

Meze detekce

Následující tabulka shrnuje stanovené meze detekce biogenních aminů pro obě metody, metodu MECC a HPLC. Meze detekce pro metodu MECC stanovili **KŘÍŽEK A PELIKÁNOVÁ (1998)** pro vzorky kysaného zelí. Pro metodu HPLC byly meze detekce stanoveny jako dvojnásobek šumu základní linie pro vzorky vepřových jater. Meze detekce polyaminů (PUT, SPD a SPM) leží v rozmezí 1,0 až 2,5 $mg.kg^{-1}$ pro obě metody.

Tab. 5 Meze detekce biogenních aminů ($mg.kg^{-1}$) metodami MECC a HPLC

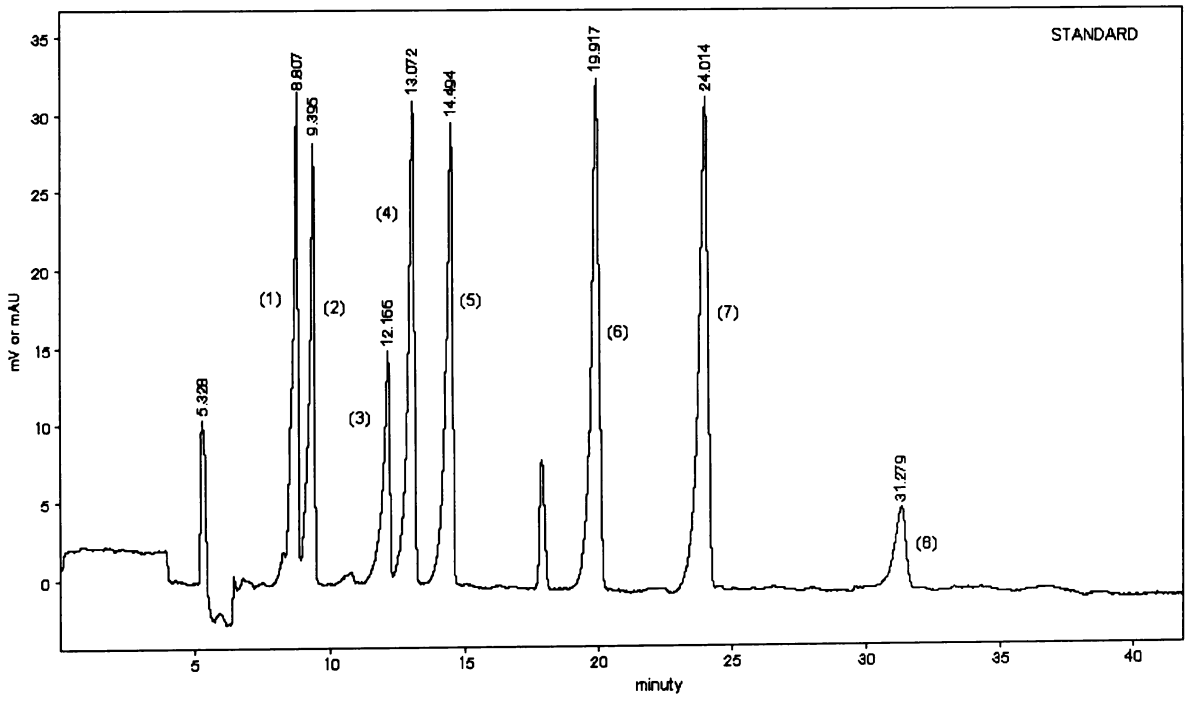
	PUT	CAD	HIM	TYM	TRM	PEA	SPD	SPM
Benzoylace (MECC)	2,1	1,4	2,1	3,5	1,3	-	1,0	1,4
Dansylace (HPLC)	1,2	1,2	1,2	1,4	1,3	2,2	1,7	2,4

Z pohledu aplikace výsledků stanovení PA i BA pro lidskou výživu jsou obsahy jak polyaminů, tak biogenních aminů v řádu jednotek $mg.kg^{-1}$ nevýznamné a meze detekce lze proto pokládat za vyhovující.

Analýza polyaminů

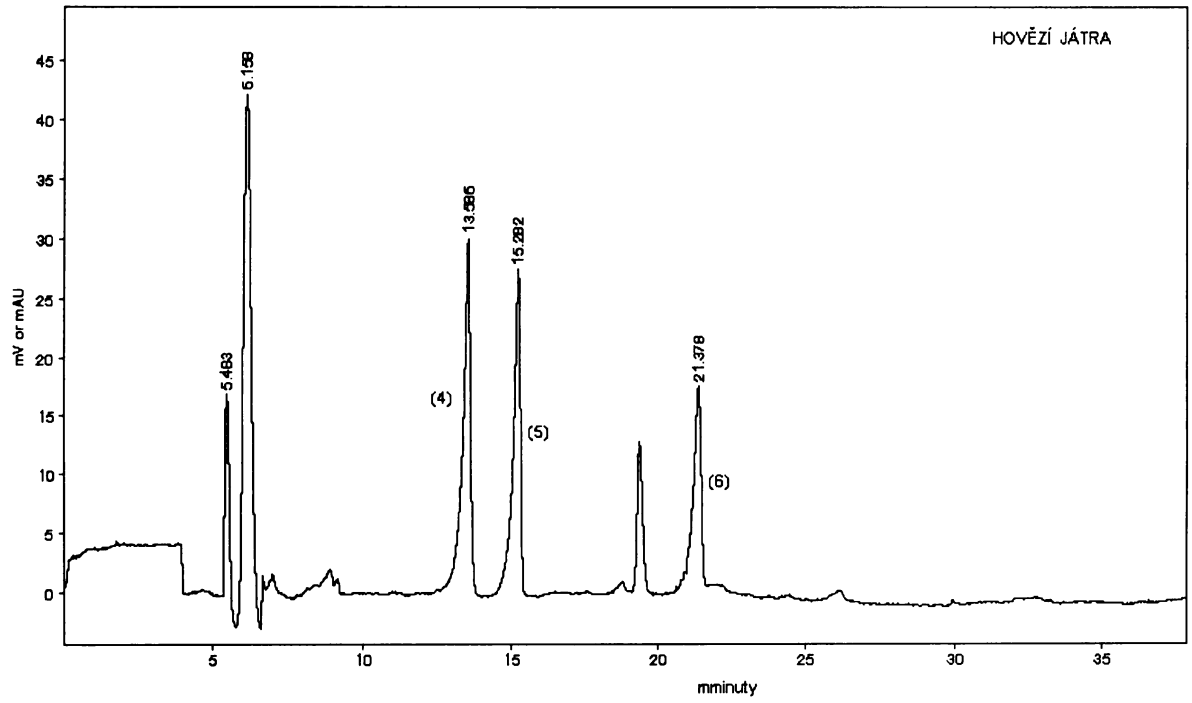
Postup analýzy biogenních aminů pro obě metody je detailně popsán v experimentální části. Metodou MECC bylo stanovováno 7 biogenních aminů: PUT, CAD, TRM, HIM, TYM, SPD a SPM. Metodou HPLC byl navíc stanovován fenylethylamin (PEA). V obou metodách byl používán jako vnitřní standard 1,7-diaminoheptan. Doba analýzy metodou MECC je 40 minut, doba analýzy metodou HPLC je 20 minut. Stanovení biogenních aminů metodami MECC a HPLC ukazují následující chromatogramy (obr. 14-17).

Obr. 14 Stanovení biogenních aminů ve standardním roztoku metodou MECC



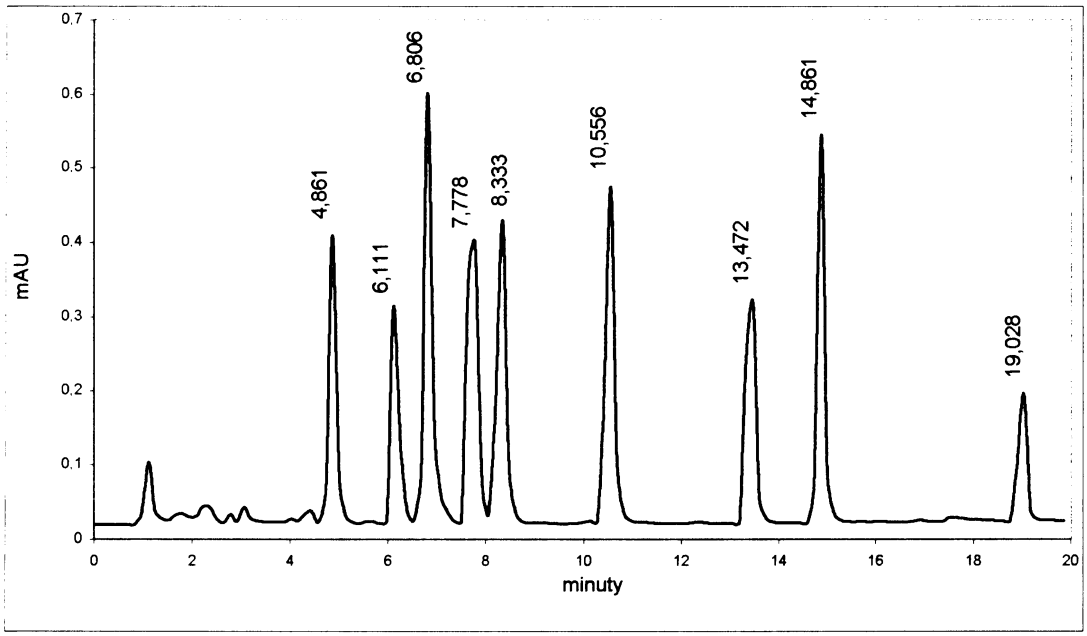
Biogenní aminy (zleva): 1. PUT, 2. CAD, 3. TRM, 4. SPD, 5. HEP (vnitřní standard), 6. SPM, 7. HIM a 8. TYM

Obr. 15 Stanovení biogenních aminů v biologickém vzorku (čerstvá hovězí játra) metodou MECC



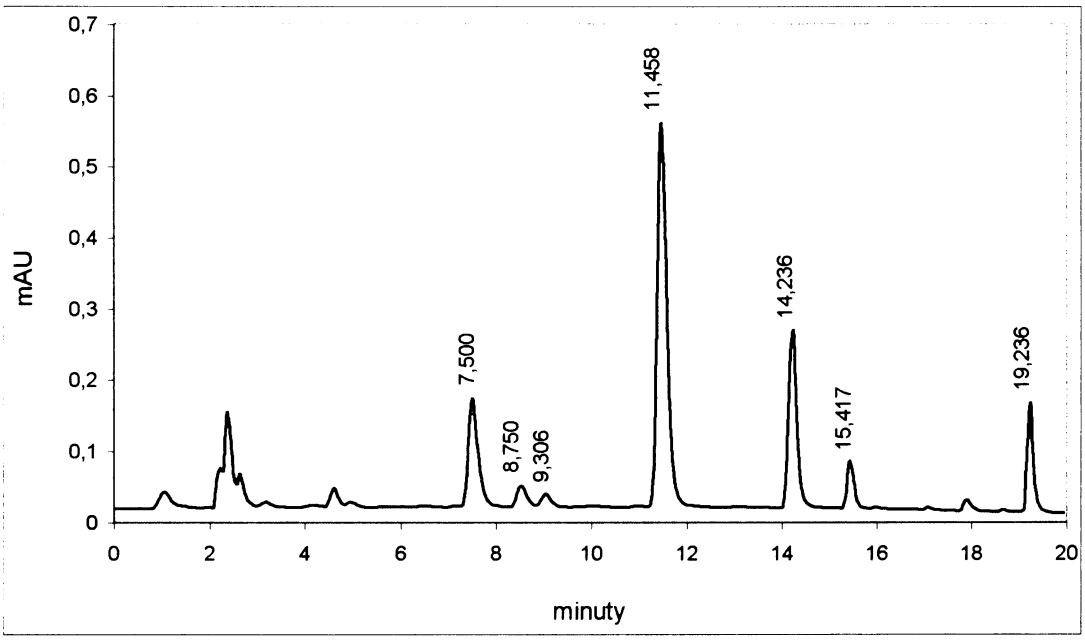
Polyaminy (zleva): 4. SPD, 5. HEP (vnitřní standard) a 6. SPM

Obr. 16 Stanovení biogenních aminů v roztoku standardu metodou HPLC



Biogenní aminy (zleva): TRM, PEA, PUT, CAD, HIM, HEP (vnitřní standard), TYM, SPD a SPM

Obr. 17 Stanovení biogenních aminů v biologickém vzorku (zkažená vepřová játra) metodou HPLC

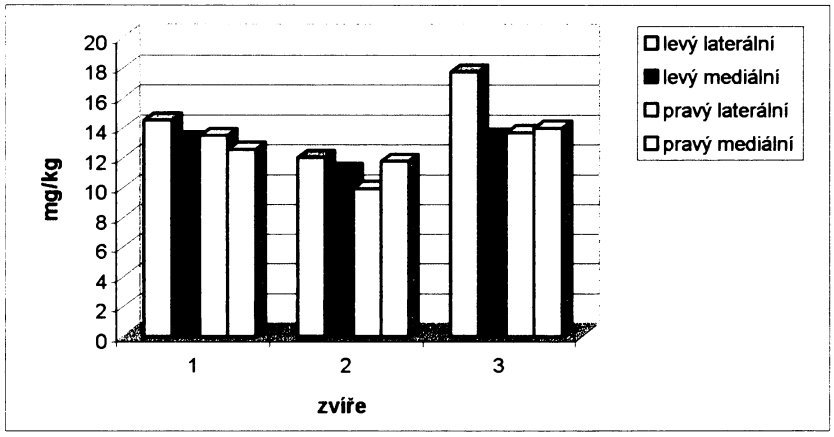


Biogenní aminy (zleva): PUT, CAD, HIM, HEP (vnitřní standard), TYM, SPD a SPM

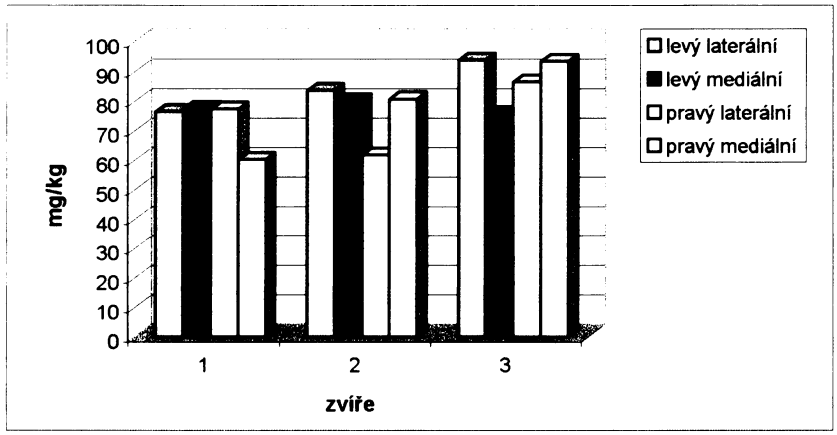
5.2 Ověření rovnoměrnosti obsahu polyaminů v jaterních lalocích

Játra jsou orgánem s velkou metabolickou rezervou, což znamená, že v daný okamžik pracuje jen jejich malá část a zbývající tkáň odpočívá, regeneruje. Buňky právě metabolizující tkáně jsou rozptýleny v celém orgánu, takže se nepředpokládají rozdíly v obsahu polyaminů mezi jednotlivými jaterními laloky. Ověření rovnoměrnosti obsahu PA v jaterních lalocích bylo nutné provést vzhledem k dalším pokusům (sledování změn obsahu PA při skladování a kuchyňských úpravách jater) pro vyloučení vlivu tohoto faktoru. Pro ověření rovnoměrnosti obsahu polyaminů v jaterních lalocích byla použita celá játra ze třech prasat. Výsledky analýzy jednotlivých laloků vepřových jater jsou znázorněny graficky na obr. 18 a 19. V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty třech paralelních analýz. Statistické vyhodnocení bylo provedeno analýzou rozptylu (ANOVA), dvoufaktorovou analýzou bez opakování. Rozdíly v obsahu SPD a SPM mezi jednotlivými laloky vepřových jater byly nevýznamné na hladině pravděpodobnosti $P < 0,05$. Z toho vyplývá, že pro následující výzkum změn obsahu polyaminů během skladování a tepelných úprav lze použít kteroukoli část jater.

Obr. 18 Rozdíly v obsahu SPD mezi jaterními laloky třech prasat



Obr. 19 Rozdíly v obsahu SPM mezi jaterními laloky třech prasat



5.3 Obsahy polyaminů v čerstvém mase a játrech a faktory, které je ovlivňují

5.3.1 Hovězí a vepřové maso

Výchozí hodnoty obsahu polyaminů v čerstvém hovězím a vepřovém mase 24 hodiny po porážce byly analyzovány ve vzorcích kýty a roštěnce (pečeně). Průměrné hodnoty SPM byly u obou druhů kosterních svalů podobné. Průměrný obsah SPM v roštěnci a kýtě skotu byl 21,7 a 22,0 $mg.kg^{-1}$ u býků, 12,2 a 15,8 $mg.kg^{-1}$ u krav. V pečeni a kýtě byly zjištěny průměrné hodnoty SPM 26,1 a 28,4 $mg.kg^{-1}$ u vepříků a 22,3 a 18,3 $mg.kg^{-1}$ u prasniček. Je však třeba zdůraznit, že obsahy obou polyaminů kolísaly ve značném rozsahu. Ve většině vzorků svaloviny obou sledovaných druhů jatečných zvířat byl obsah PUT a SPD pod mezí detekce. Jen u několika vzorků přesáhl PUT i SPD mez detekce, ale nebyl vyšší než 10 $mg.kg^{-1}$. Ostatní biogenní aminy CAD, TRM, HIM a TYM nebyly ve vzorcích čerstvého masa detekovány. Statistické údaje o obsahu polyaminů v kosterní svalovině jatečných zvířat jsou uvedeny v tabulkách v příloze II (**KRAUSOVÁ ET AL., 2006A**).

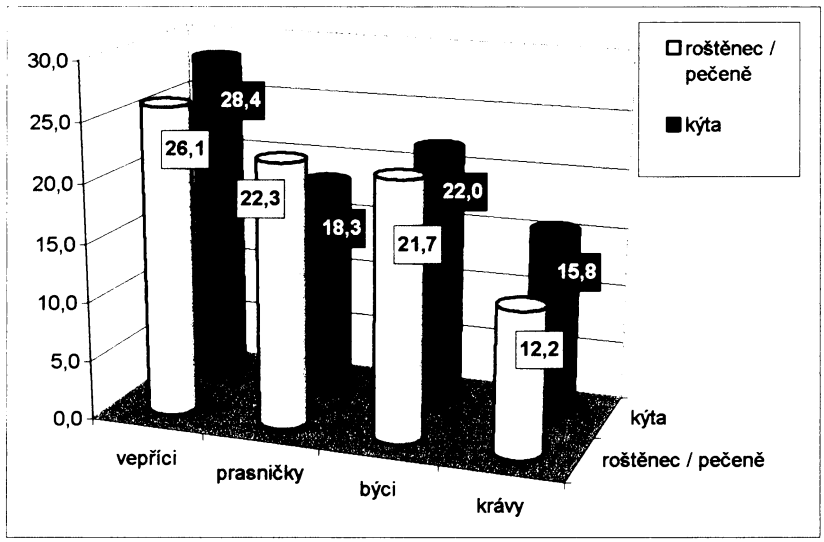
Zjištěné hodnoty jsou srovnatelné s dříve publikovanými údaji pro syrové čerstvé hovězí a vepřové maso, které se však vesměs týkají jen 3-5 vzorků (**BARDÓCZ ET AL., 1993; YANO ET AL., 1995; HERNÁNDEZ-JOVER ET AL., 1997; OKAMOTO ET AL., 1997; ELLIASSEN ET AL., 2002; HAGEN ET AL., 2005**). **BAUER A PAULSEN (2001)** uvádějí pro čerstvé nemleté hovězí a vepřové maso nižší hodnoty nepřesahující 2 $mg.kg^{-1}$ pro SPD a 16 $mg.kg^{-1}$ pro

SPM. **MIN ET AL. (2004)** naopak udávají pro čerstvé vepřové a hovězí maso hodnoty SPD 10,6 $mg.kg^{-1}$ a SPM přesahující 40 $mg.kg^{-1}$.

Býci byli rozděleni do skupin podle věku, živé hmotnosti a typu užitkovosti. Mezi průměrným obsahem SPM v jednotlivých svalech u býků i krav, mezi obsahem SPM a stářím býků, živou hmotností a typem užitkovosti byly zjišťovány korelace. Ani v jednom případě nebyla zjištěna významná korelace (při $P < 0,05$). Krávy nebylo možné do takových skupin rozdělit vzhledem k velmi malému souboru (8 kusů). Prasata taktéž nebyla rozdělována do skupin podle věku ani podle živé hmotnosti nebo podle plemene. Všechny kusy byly přibližně stejného stáří a hmotnosti. Plemennou příslušnost u jatečných prasat je prakticky nemožné zjistit, protože jde o různé hybridy několika plemen. U prasat byly testovány rozdíly mezi průměrným obsahem SPM a pohlavím v pečeni a kýtě a rozdíl v obsahu SPM v jednotlivých svalech. Významný rozdíl ($P < 0,01$) byl zjištěn v obsahu SPM v kýtě mezi vepříky a prasničkami, ostatní rozdíly byly nevýznamné ($P < 0,05$). Tento mezipohlavní rozdíl je zřejmě dán různě rychlým vývinem svalových skupin. Rychlejší vývin svalových komplexů byl zjištěn v prvních fázích vývoje u prasniček, ale v pokročilejších fázích růstu je podíl svalového komplexu kýty a hřbetu průkazně vyšší u vepříků (**ŠILER ET AL., 1980**). Polyaminy se významně podílejí při růstu a dělení buňky (**SEILER A RAUL, 2005**), za nejúčinnější je považován spermin. Proto v rychleji rostoucích svalech je obsah tohoto polyaminu vyšší než v pomaleji rostoucích svalových skupinách.

Dále byly testovány mezidruhové a mezipohlavní rozdíly v obsahu SPM v jednotlivých svalech. Významné rozdíly byly zjištěny v roštěnci (pečeni) mezi kravami a prasničkami ($P < 0,05$) a v obou svalech mezi býky a kravami ($P < 0,005$). **ŠILER ET AL. (1980)** popisují mezipohlavní rozdíly v rychlosti růstu svalových skupin skotu tak, že u jaloviček je vyšší podíl svalstva v proximální oblasti kýty, hřbetu a břicha, zatímco u býčků je vyšší podíl svalů hrudníku a krku. K tomuto zvýraznění dochází až v závěrečné fázi růstu. Z toho se dá vyvodit závěr, že býci mají mohutnější muskulaturu než krávy, proto i obsah nejúčinnějšího z polyaminů (SPM) je u býků vyšší. Mezidruhové rozdíly a rozdíly mezi pohlavími v obsahu SPM jsou znázorněny na obrázku 20.

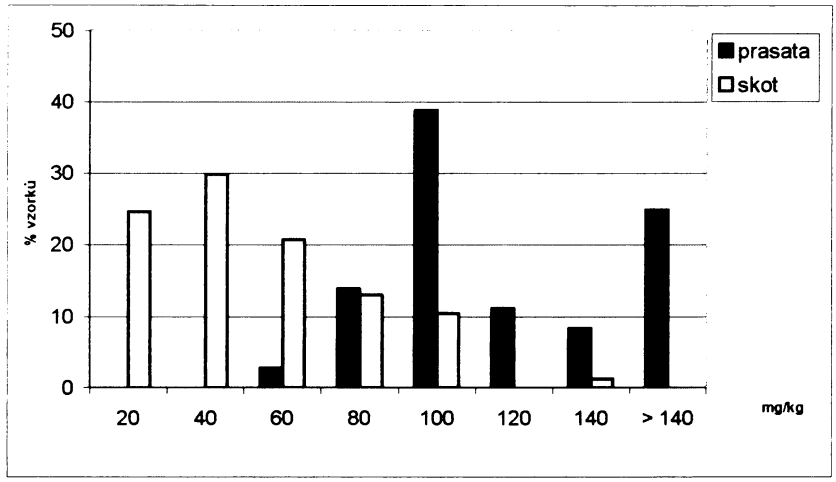
Obr. 20 Mezidruhové rozdíly a rozdíly mezi pohlavími v obsahu SPM jatečných zvířat



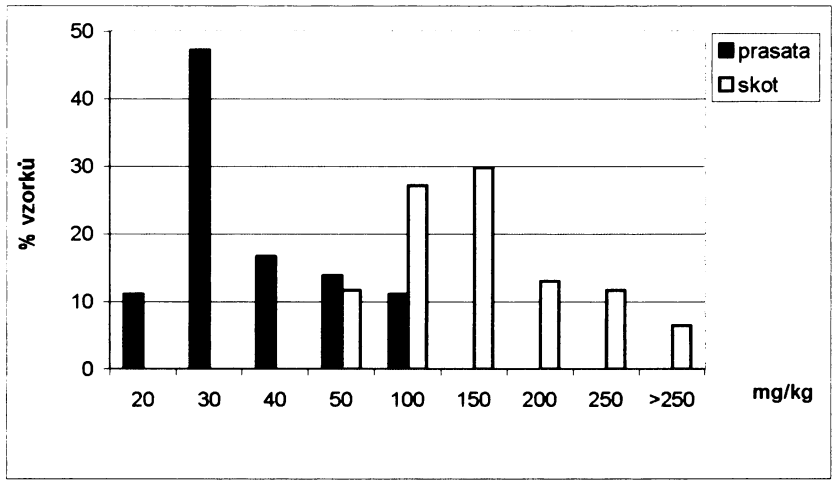
5.3.2 Hovězí a vepřová játra

Polyaminy byly analyzovány stejně jako v případě čerstvého masa ve vzorcích hovězích a vepřových jater 24 hodiny po porážce. Statistické údaje o obsahu polyaminů v čerstvých vepřových a hovězích játrech jsou uvedeny v příloze II (**KRAUSOVÁ ET AL., 2006B**). Průměrné hodnoty polyaminů pro hovězí játra jsou: 23,8; 122 a 44,0 $mg.kg^{-1}$ pro PUT, SPD a SPM v játrech býků a 25,4; 161 a 34,7 $mg.kg^{-1}$ v játrech krav. Průměrné hodnoty SPD a SPM ve vepřových játrech jsou: 32,1 a 115 $mg.kg^{-1}$ v játrech vepříků a 31,8 a 114 $mg.kg^{-1}$ v játrech prasniček. Tyto hodnoty patří mezi nejvyšší zjištěné hodnoty obsahu polyaminů v potravinách (**KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005**). Ve srovnání s kosterní svalovinou jsou obsahy polyaminů v játrech vyšší než v kýtě a roštěnci (pečeni) zvířat stejného biologického druhu. Obsah SPD a SPM v játrech značně kolísal vzorek od vzorku. V hovězích játrech byl obsah SPD v rozmezí 10 – 390 $mg.kg^{-1}$ a SPM 11 – 128 $mg.kg^{-1}$. Ve vepřových játrech bylo kolísání obsahu PA výrazné jako v játrech hovězích, rozmezí obsahu SPD bylo 14 – 57 $mg.kg^{-1}$ a SPM 53 – 219 $mg.kg^{-1}$. Játra jsou metabolicky velmi aktivní orgán, enzymatická aktivita může vzrůstat i post-mortem, čímž se dá vysvětlit toto široké kolísání. Literatura nepodává v tomto směru dostatek informací. Histogramy obsahu polyaminů v játrech jatečných zvířat jsou uvedeny v obrázcích 21 a 22.

Obr. 21 Histogram obsahu SPM ve vepřových a hovězích játrech

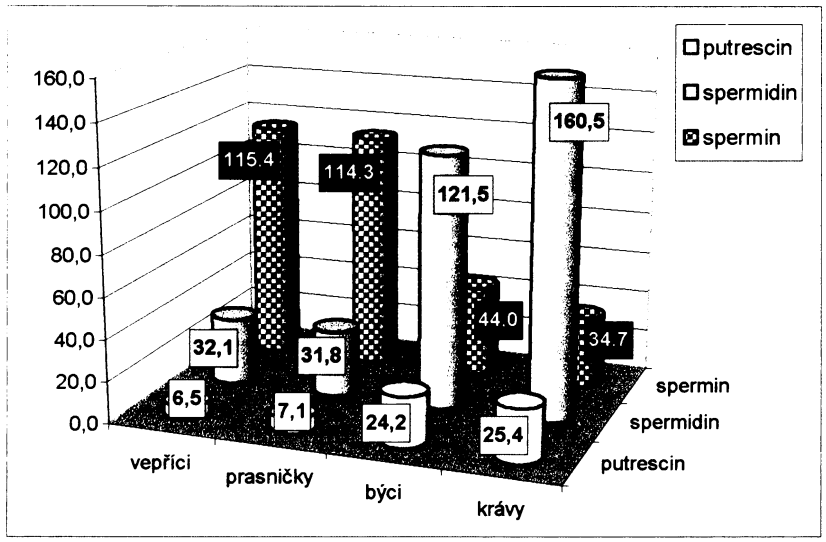


Obr. 22 Histogram obsahu SPD ve vepřových a hovězích játrech



Překvapivý byl opačný poměr SPM a SPD v játrech prasat a skotu. Pro potraviny živočišného původu je charakteristický vyšší obsah SPM než SPD, zatímco v potravinách rostlinného původu je tomu naopak (**KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005**). Mezidruhové rozdíly v obsahu polyaminů v játrech jatečných zvířat je znázorněn v grafu 23.

Obr. 23 Mezidruhové rozdíly v obsahu PA v játrech prasat a skotu



Obsah PUT byl v játrech prasat ve většině vzorků pod mezí detekce. Jen v několika vzorcích se objevila stanovitelná hodnota v rozmezí 2 – 24 $mg.kg^{-1}$. V játrech skotu byl obsah PUT poněkud vyšší než v játrech prasat a značně kolísal zejména v játrech býků. Průměrný obsah PUT v hovězích játrech byl 25 $mg.kg^{-1}$ s rozmezími 4 – 63 $mg.kg^{-1}$ u krav a 2 – 259 $mg.kg^{-1}$ u býků.

U jater byly testovány následující korelace:

a) mezi obsahy jednotlivých polyaminů v játrech býků,

b) obsahu SPM a SPD v játrech ve vztahu ke stáří, hmotnosti a typu užitkovosti u býků.

Byly zjištěny významné negativní korelace mezi obsahem SPD a SPM v játrech býků ($P < 0,001$) a korelace obsahu SPD ve vztahu k věku býků ($P < 0,01$). Významné byly také rozdíly v průměrných hodnotách obsahu SPD v játrech býků mezi mléčným a masným typem ($P < 0,05$) a mezi masným a kombinovaným typem užitkovosti ($P < 0,1$). Ostatní testované korelace byly nevýznamné. Průměrný obsah SPD v játrech mléčného, kombinovaného a masného typu užitkovosti byl 96,1; 106 a 188 $mg.kg^{-1}$.

Vzhledem k vysokému obsahu polyaminů v hovězích a vepřových játrech byly analyzovány i vzorky vepřové a hovězí krve, neboť játra jsou orgánem značně zásobeným krví. Proto bylo třeba ověřit možnost, že se polyaminy mohou do jater dostávat s krví. V hovězí i vepřové krvi byly obsahy SPD a SPM pod mezí detekce. Výsledky odpovídají publikovaným údajům, kdy v lidském krevním oběhu byly zjištěny hodnoty polyaminů o tři

řády nižší oproti hodnotám zjištěným ve střevě (**MILOVIC, 2001**). Krev tedy není zdrojem vysokého obsahu polyaminů v játrech skotu či prasat.

5.3.3 Kuřecí játra

Statistické údaje o obsahu polyaminů v čerstvých kuřecích játrech udává tabulka 6. Obsah putrescinu se pohyboval ve většině vzorků pod mezí detekce. Pouze v pěti vzorcích ze 40 analyzovaných byly jeho obsahy stanovitelné. Maximální obsah PUT v čerstvých kuřecích játrech byl 4,4 $mg.kg^{-1}$. Dostupná literatura neposkytuje informace o obsahu polyaminů v drůbežích játrech.

Tab. 6 Obsah polyaminů ($mg.kg^{-1}$) v kuřecích játrech 24 hodiny po porážce

	PUT	SPD	SPM
Průměr	3,6	57,3	117
S_x	1,0	15,0	45,0
Medián	3,9	57,6	117
Rozpětí	2,2 - 4,4	17,0 - 84,5	16,2 - 211

5.3.4 Ovčí játra

Vzhledem k opačnému poměru obsahu SPD a SPM v hovězích játrech oproti játrům vepřovým i kuřecím vyvstala otázka, jaký je obsah PA v játrech jiných přežvýkavců. Vyvstala hypotéza, že vyšší obsah SPD v hovězích játrech, což je největší metabolický orgán v těle, by mohl souviset se způsobem výživy přežvýkavců. V rostlinných pletivech je obsah SPD vyšší než v živočišných tkáních. Byla proto analyzována játra z 12 kusů ovcí, 3 dospělých ovcí a 9 jehňat, jak je uvedeno v experimentální části. Statistické údaje o obsahu SPM a SPD v ovčích játrech shrnuje tabulka 7. Obsah PUT byl v pod mezí detekce.

Tab. 7 Obsah polyaminů ($mg.kg^{-1}$) v ovčích játrech 24 hodiny po porážce

	SPD		SPM	
	Ovce	**Jehňata**	**Ovce**	**Jehňata**
Průměr	45,3	22,2	108	113
S_x	18,7	16,1	55,7	30,4
Medián	53,1	16,0	139	110
Rozpětí	24,0 - 58,8	7,7 - 57,0	44,2 - 143	63,2 - 165

Jak je patrné z tabulky 7, průměrný obsah polyaminů v játrech ovcí a jehňat je spíše srovnatelný s obsahem polyaminů v kuřecích a vepřových játrech. To znamená, že původní myšlenka, že vysoký obsah SPD oproti SPM v játrech skotu může souviset s příjmem objemné píce, se nepotvrdila. Příčina zjištěného rozdílu v obsahu PA v hovězích játrech a v játrech ostatních sledovaných zvířat zůstává nejasná.

5.4 Faktory ovlivňující změny obsahu PA v mase a játrech

5.4.1 Chladírenský způsob skladování masa a jater

Syrové vepřové maso (pečeně) a vepřová játra byly skladovány dvěma způsoby. Oba způsoby napodobovaly skladování v domácnostech. Při chladírenském způsobu skladování byly tyto potraviny skladovány vždy při cca 2 °C a byly použity tři způsoby balení – volně v polyethylenovém sáčku (VOL), ve vakuu (VAK) a v ochranné atmosféře (OA). Při mrazírenském (MR) způsobu bylo maso skladováno při -18 °C. Během skladování byly sledovány změny obsahu polyaminů a senzorické vlastnosti masa a jater. Podle pachu a vzhledu (barva, textura) byla kvalita masa hodnocena třemi stupni: čerstvé (1), ještě poživatelné (2) a zkažené (3). Popis vlastností je uveden v tabulce 8. Toto hodnocení je třeba chápat jako pomocné údaje, protože nebylo prováděno školenými hodnotiteli, ale třemi či čtyřmi pracovnicemi laboratoře, které posuzovaly senzorické vlastnosti ze spotřebitelského hlediska.

Tab. 8 Hodnocení senzorických vlastností masa a jater během skladování v chladničce

	Senzorické posouzení		
	Čerstvé (1)	Poživatelné (2)	Zkažené (3)
Pach	neutrální, po čerstvém mase	slabý pach	odpuzující pach zkaženého masa
Barva	játra – jasně červená maso – růžová	játra – nahnědlá maso – zastřená, našedlá	játra – hnědá maso – šedá, nazelenalá
Textura	tuhé	měkké, slizké	rozteklé

5.4.1.1 Vepřová játra

Chladírenské volné skladování

Při tomto způsobu skladování byla volně balená játra v polyethylenovém sáčku uložena v chladničce na dobu devíti dnů. Během skladování nebyly pozorovány žádné změny v senzorických vlastnostech, stupeň hodnocení (1) byl i poslední den skladování. Tuto příznivou skutečnost lze přisoudit hygienickému odběru na jatkách a následnému optimálnímu ošetření (zchlazení a udržování při stálé nízké teplotě). Graficky jsou změny obsahu PA při volném skladování znázorněny na obrázcích 24 a 25. Játra byla skladována celkem ze čtyř kusů prasat označených A, B, F a J. Všechny obsahy polyaminů zjištěné

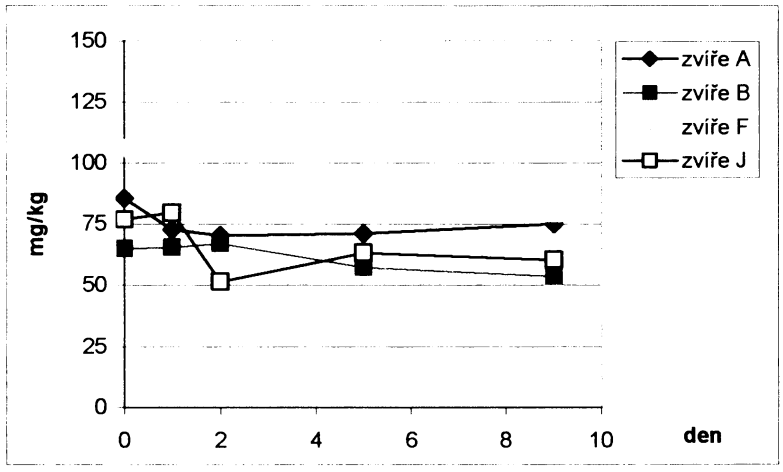
během skladování byly přepočítány na sušinu. Každý bod křivky je průměrnou hodnotou třech paralelních stanovení. Hodnoty sušiny v syrových volně skladovaných játrech se pohybovaly v rozmezí 26 – 29 %, jak je uvedeno v tabulce 9.

Tab. 9 Hodnoty sušiny (%) v játrech volně chladírensky skladovaných po dobu 9 dnů

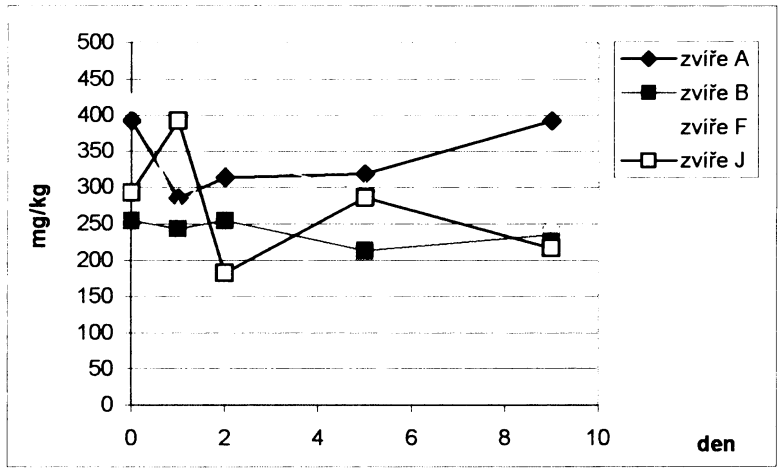
Hodnoty sušiny (%)				
Zvíře				
den	A	B	F	J
0	28,4	28,2	27,3	27,6
1	28,6	28,4	27,0	27,7
2	28,6	28,4	27,9	28,0
5	28,9	28,4	27,8	28,5
9	29,2	28,7	26,4	27,8

Změny obsahu polyaminů v čerstvé hmotě vepřových jater při volném skladování, které představují stanovené, avšak kvůli různé sušině ne plně srovnatelné údaje, shrnují tabulky PI/1 – PI/4. Obsah SPD se při skladování jater snížil z cca 25 na 16 $mg.kg^{-1}$ a obsah SPM z cca 110 na 60 $mg.kg^{-1}$. Biogenní aminy, které vznikají bakteriální činností, byly i po devátém dnu skladování pod mezí detekce.

Obr. 24 Změny obsahu SPD ($mg.kg^{-1}$ suš.) při volném chladírenském skladování vepřových jater

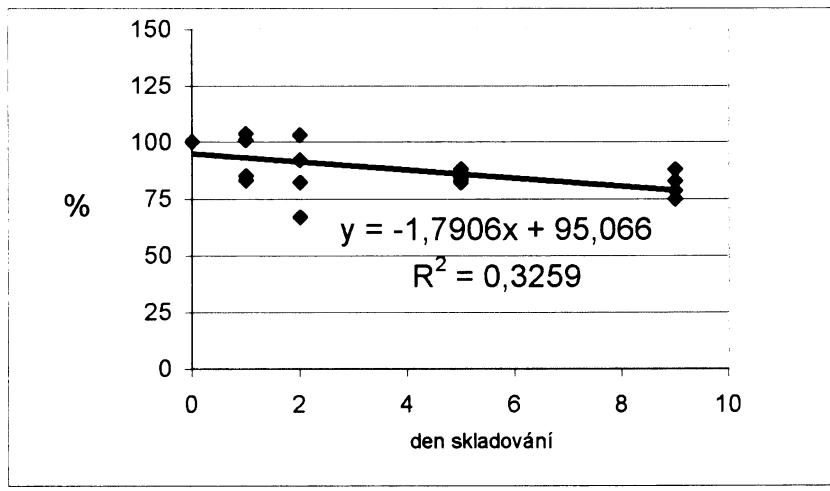


Obr. 25 Změny obsahu SPM (mg.kg^{-1} suš.) při volném chladírenském skladování vepřových jater

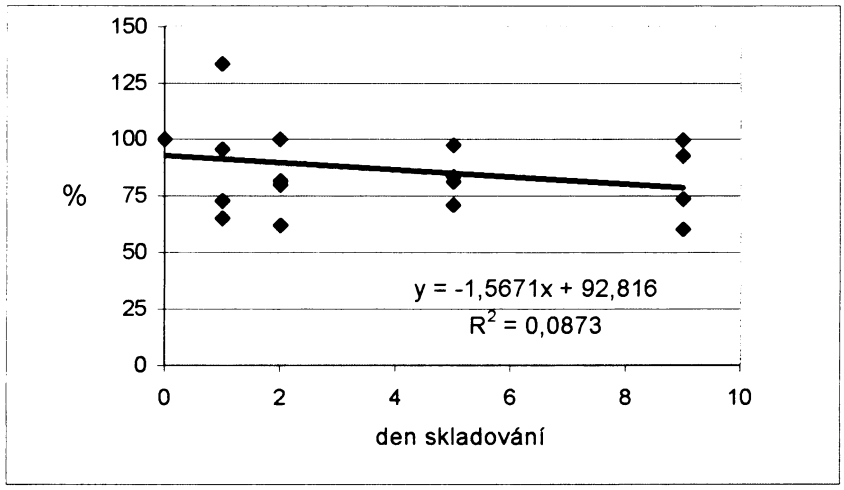


Jak je vidět z obrázků 24 a 25, dynamika polyaminů, zvláště SPM, při volném skladování vepřových jater v chladničce se liší zvíře od zvířete. Uvedené obsahy polyaminů v sušině byly přepočítány na relativní hodnoty (v %, přičemž výchozí hodnota v čerstvých játrech je 100 %) a byl statisticky testován pokles, případně nárůst SPD a SPM během skladování. Výsledky jsou znázorněny graficky (obr. 26 a 27). Regresní statistika ukázala, že obsah SPD ve vepřových játrech poklesl při volném skladování zhruba na 75 % výchozí hodnoty a úbytek je významný ($P < 0,05$), zatímco k významnému poklesu SPM na hladině $P < 0,05$ během tohoto způsobu skladování vepřových jater nedošlo.

Obr. 26 Pokles obsahu SPD při volném chladírenském skladování vepřových jater



Obr. 27 Pokles obsahu SPM při volném chladírenském skladování vepřových jater



Chladírenské skladování v ochranné atmosféře

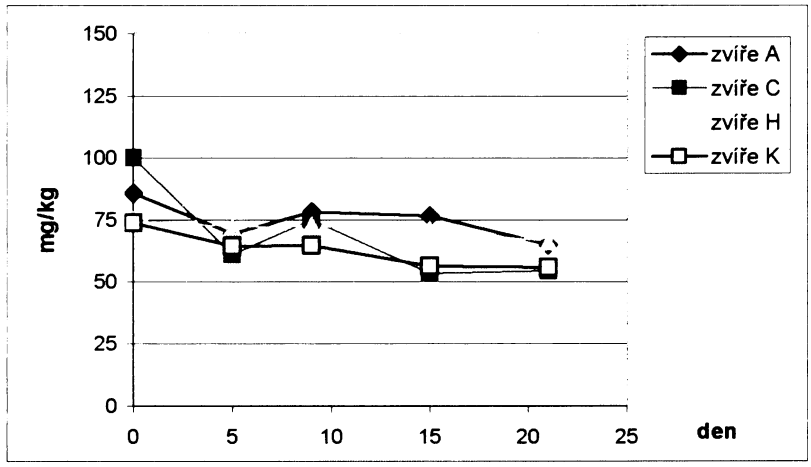
Vepřová játra pro tento typ skladování byla na jatkách zabalena do obalu s ochrannou atmosférou skládající se ze 70 % N_2 a 30 % CO_2. Skladována byla játra ze čtyř kusů prasat označených A, C, H a K. Dynamiky obsahu SPD a SPM během skladování jater v ochranné atmosféře po dobu 21 dnů jsou znázorněny graficky (obr. 28 a 29). Uvedené hodnoty polyaminů jsou přepočítány na sušinu. Hodnoty sušiny v syrových vepřových játrech skladovaných v ochranné atmosféře udává tabulka 10 a leží v rozmezí 26 – 30 %, podobně jako v játrech volně ložených.

Tab. 10 Hodnoty sušiny (%) v játrech chladírensky skladovaných v ochranné atmosféře během 21 dnů

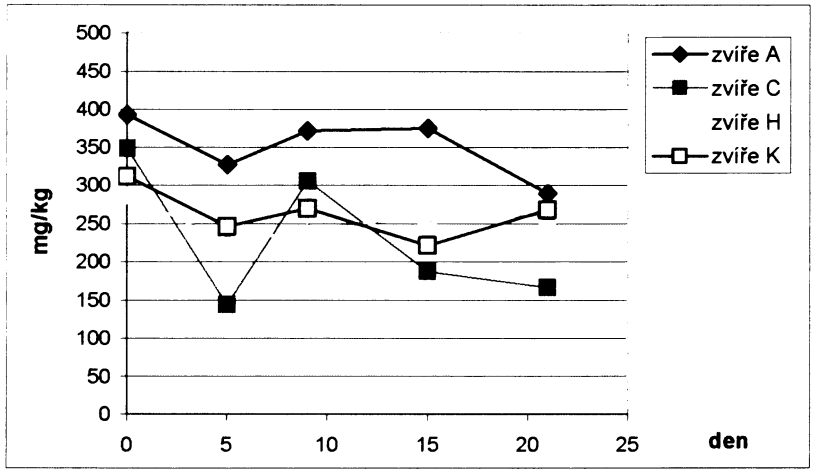
Hodnoty sušiny (%)				
	Zvíře			
den	A	C	H	K
0	28,4	28,6	27,8	26,5
5	29,3	29,3	27,3	26,6
9	28,7	29,0	27,9	27,1
15	29,1	29,1	28,2	27,1
21	29,0	29,7	27,8	27,1

Změny obsahu PA v čerstvé hmotě vepřových jater skladovaných v ochranné atmosféře jsou shrnuty v tabulkách PI/9 – PI/12. Obsah SPD se při skladování v OA pohyboval okolo 20 $mg.kg^{-1}$ a obsah SPM klesl z cca 100 na 60 $mg.kg^{-1}$, podobně jako v případě volného skladování. V posledních dnech skladování také došlo k nárůstu biogenních aminů, PUT, CAD, HIM a TYM. Detekovatelné hodnoty těchto aminů se objevily až v 15. dnu skladování. Zjištěné obsahy PUT a TYM byly v jednotlivých játrech odlišné, což zřejmě souvisí s různě velkou bakteriální kontaminací čerstvých jater. Mohlo by to také souviset s mírou hydrolýzy bílkovin tj. dostupností uvolněných aminokyselin pro bakterie. Během skladování došlo i ke změně senzorických vlastností jater. Po 15 dnech skladování v ochranné atmosféře byla kvalita jater hodnocena ještě známkou (1), po 21. dni byl už stupeň kvality (2). Nejvyšší obsah PUT byl 36,6 $mg.kg^{-1}$ a TYM 66,8 $mg.kg^{-1}$. Obsahy CAD a HIM byly na konci skladování nižší než 10 $mg.kg^{-1}$.

Obr. 28 Změny obsahu SPD ($mg.kg^{-1}$ suš.) při chladírenském skladování vepřových jater v OA

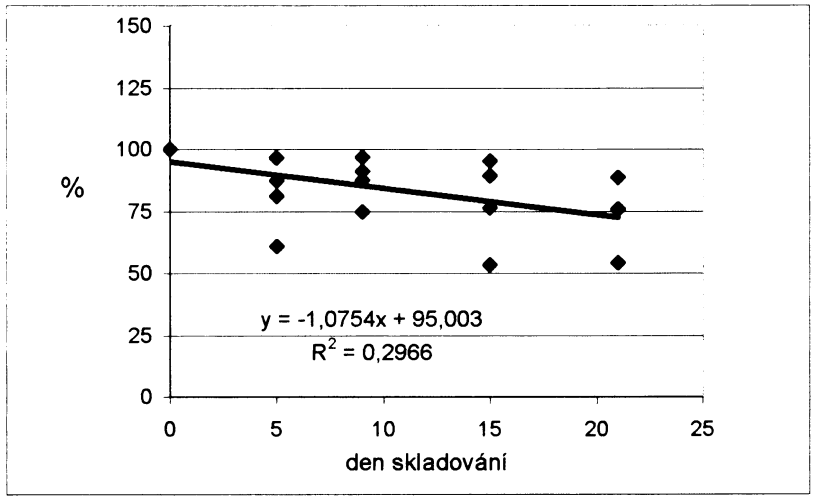


Obr. 29 Změny obsahu SPM (mg.kg^{-1} suš.) při chladírenském skladování vepřových jater v OA

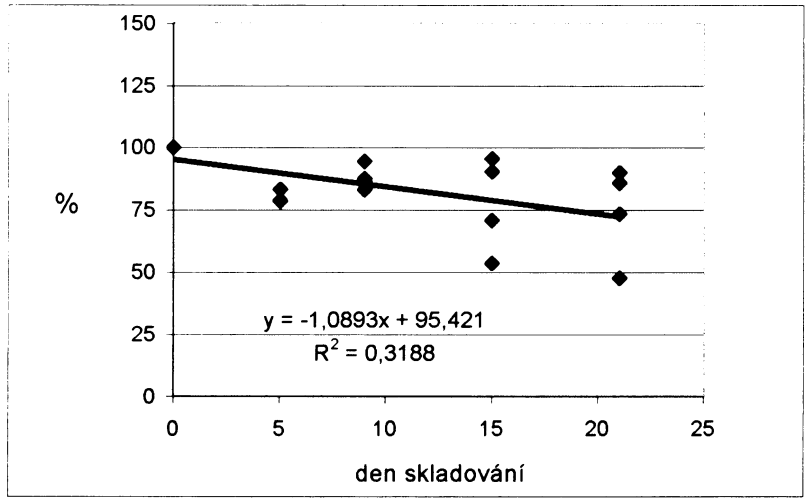


Z obr. 29 je vidět, že průběh dynamiky SPM při skladování vepřových jater v ochranné atmosféře během třech týdnů se liší zvíře od zvířete a vykazuje určitý pokles. Dynamika obsahu SPD se jeví podle obr. 28 vyrovnanější. Hodnoty PA v sušině byly přepočítány na relativní hodnoty (v %) a změny obsahu PA ve vepřových játrech během skladování v ochranné atmosféře byly statisticky testovány regresní statistikou. Během 21 dnů došlo k poklesu obou polyaminů, SPD i SPM, přibližně na 75 % původní hodnoty. Tento pokles byl v obou případech významný ($P < 0,05$). Relativní změny obsahu PA při skladování vepřových jater v ochranné atmosféře jsou znázorněny v následujících grafech (obr. 30 a 31).

Obr. 30 Pokles obsahu SPD při chladírenském skladování vepřových jater v OA



Obr. 31 Pokles obsahu SPM při chladírenském skladování vepřových jater v OA



Chladírenské skladování ve vakuu

Vakuovaná syrová vepřová játra byla skladována za stejných podmínek jako játra v ochranné atmosféře. Jednalo se opět o játra ze čtyř kusů prasat (zvířata označená A, D, G a L). Hodnoty PA zjištěné během skladování byly rovněž přepočítány na sušinu. Dynamiky obsahu SPD a SPM v sušině vepřových jater během skladování ve vakuu po dobu 21 dnů jsou graficky znázorněny v obr. 32 a 33 a je vidět, že značně kolísají v játrech různých zvířat. Obsah SPM vykazoval v játrech zvířat A a D značný pokles. Hodnoty sušiny v játrech skladovaných ve vakuu jsou shrnuty v tabulce 11.

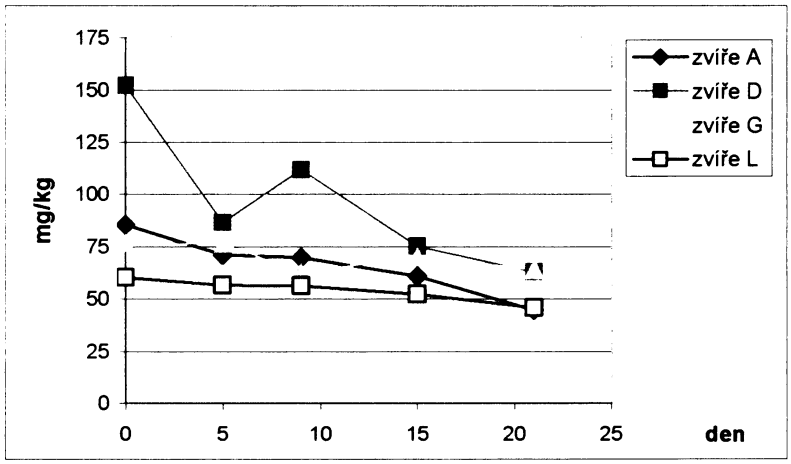
Tab. 11 Hodnoty sušiny (%) v játrech chladírensky skladovaných ve vakuu během 21 dnů

Hodnoty sušiny (%)				
	Zvíře			
den	A	D	G	L
0	28,4	27,9	26,6	25,8
5	28,8	28,5	26,7	27,6
9	28,7	28,8	26,9	27,7
15	29,0	28,9	27,5	28,9
21	29,5	29,6	26,9	28,5

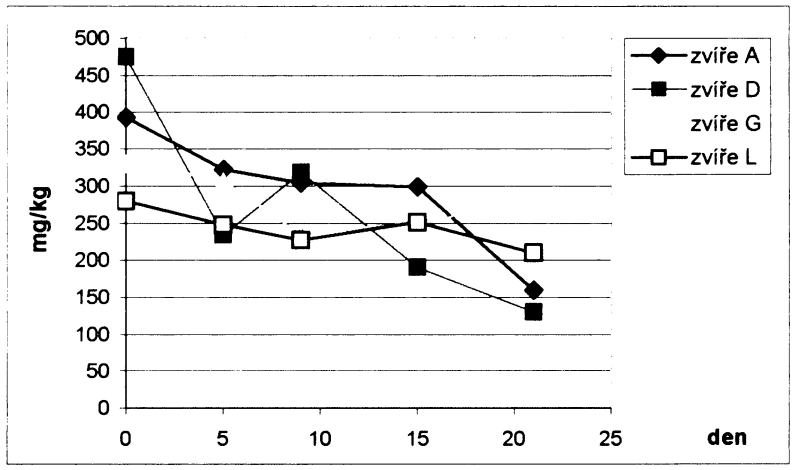
Změny obsahu PA v čerstvé hmotě skladovaných vakuovaných jater udávají tabulky PI/5 – PI/8. Obsah SPD se během skladování snížil z cca 20 na 15 $mg.kg^{-1}$, pouze v jednom případě byla naměřena výchozí hodnota vyšší, 42,3 $mg.kg^{-1}$. Obsah SPM v játrech poklesl

v případě zvířete D ze 132 na 38, v případě zvířete A ze 112 na 47 $mg.kg^{-1}$. Při skladování jater z ostatních dvou kusů nebylo snížení obsahu SPM tak výrazné. Nárůst obsahu biogenních aminů ve vakuovaných vepřových játrech, PUT, CAD, HIM a TYM, byl pozorován od 15. dne skladování a výrazně se lišil zvíře od zvířete. Obsah tyraminu ve dvou případech vzrostl na konci skladování na cca 60 $mg.kg^{-1}$, v jednom případě dokonce na 164 $mg.kg^{-1}$. Maximální naměřené hodnoty PUT byly 35 $mg.kg^{-1}$ a CAD 74 $mg.kg^{-1}$. Histamin v žádném z případů nevzrostl během 21 dnů skladování nad 10 $mg.kg^{-1}$. Co se týká senzorických vlastností jater skladovaných ve vakuu, platí to, co bylo uvedeno pro játra v ochranné atmosféře s tím rozdílem, že vakuovaná játra měla sytou červenou barvu i po třech týdnech skladování. Na konci skladování tedy barva odpovídala hodnocení (1), ale pach stupni hodnocení (2).

Obr. 32 Změny obsahu SPD ($mg.kg^{-1}$ suš.) při chladírenském skladování vakuovaných vepřových jater

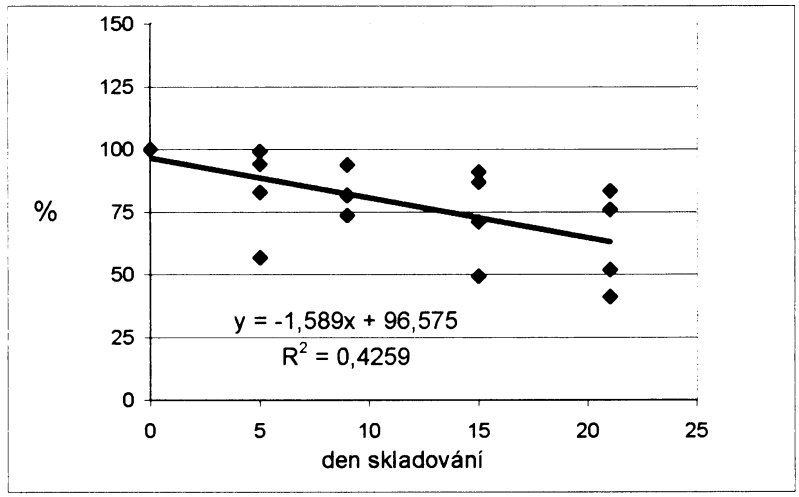


Obr. 33 Změny obsahu SPM (mg.kg^{-1} suš.) při chladírenském skladování vakuovaných vepřových jater

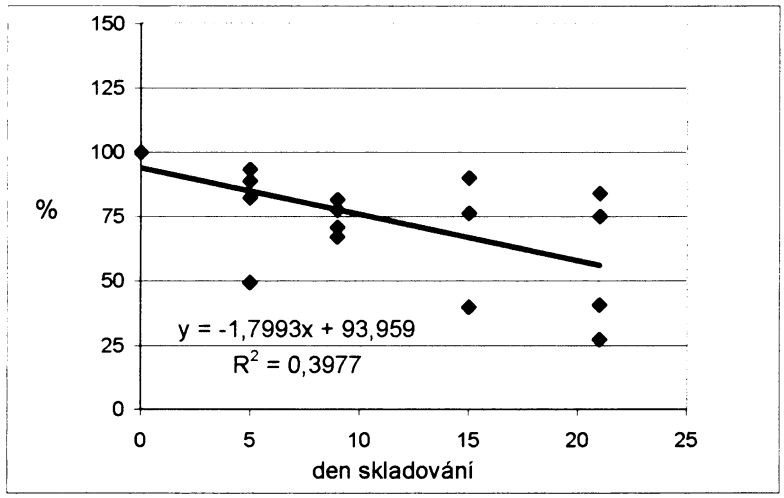


Významnost poklesu SPD a SPM byla testována regresní analýzou po přepočítání hodnot v sušině na relativní hodnoty. Výsledky jsou znázorněny v následujících grafech (obr. 34 a 35). Během skladování vepřových jater ve vakuu došlo oproti skladování v ochranné atmosféře k výraznějšímu poklesu obou polyaminů. Obsah SPD poklesl cca na 60 % a obsah SPM dokonce pod 60 % výchozí hodnoty. Pokles SPD i SPM byl významný ($P < 0,05$).

Obr. 34 Pokles obsahu SPD při chladírenském skladování vakuovaných vepřových jater



Obr. 35 Pokles obsahu SPM při chladírenském skladování vakuovaných vepřových jater



Rozdíly v poklesu SPD a SPM mezi jednotlivými způsoby chladírenského skladování byly testovány Studentovým testem. Každou křivkou vystihující dynamiku poklesu jednotlivých polyaminů v játrech jednotlivých vepřů byla proložena přímka a byly testovány rozdíly v hodnotách směrnic těchto přímek. Významný ($P < 0,05$) rozdíl byl zjištěn pouze ve změně obsahu SPD v játrech skladovaných volně a v ochranné atmosféře. Je tedy možné říci, že při chladírenském skladování vepřových jater dochází k významnému poklesu obou polyaminů, SPD i SPM. Tento pokles však nezávisí na způsobu balení potraviny. V dostupné literatuře je jen velmi málo údajů o změnách obsahu polyaminů během skladování vnitřností. Jediná dostupná práce (**VILLANUEVA-VALERO ET AL., 2005**) poskytuje výsledky chladírenského skladování pouze jednoho vzorku vakuovaných vepřových jater po dobu 21 dní. Uvádí mírný pokles SPD a SPM během skladování. Také počáteční hodnoty v čerstvých 29 $mg.kg^{-1}$ pro SPD a 103 $mg.kg^{-1}$ pro SPM játrech jsou srovnatelné s výsledky z naší laboratoře. Výrazný nárůst PUT, CAD a TYM také pozorovali po 14 dnech skladování, ale na konci skladování zjistili na rozdíl od našich výsledků vyšší obsah PUT než TYM. Velký nárůst TYM ve vakuovaných játrech a játrech skladovaných v ochranné atmosféře spíše odpovídá údajům publikovaným pro vepřové maso skladované ve vakuu a v OA (**BAUER A PAULSEN, 2001; RUIZ-CAPILLAS A JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004**).

5.4.1.2 Vepřové maso

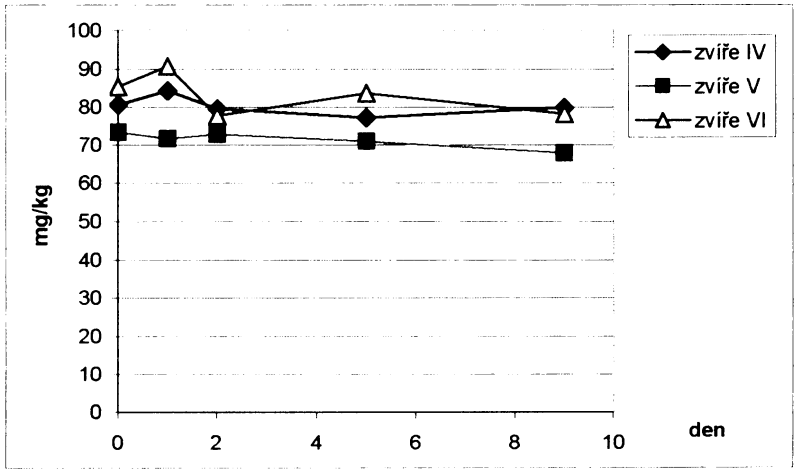
Chladírenské volné skladování

Vepřová pečeně (*m. longissimus dorsi*) byla skladována 9 dní v polyethylenovém sáčku při cca 2 °C. Během skladování nebyly pozorovány výrazné senzorické změny. Maso po 5. dni skladování bylo ještě čerstvé, hodnocení (1), ale po 9. dnu už jeho kvalita byla hodnocena stupněm (2). Pro skladování byla použita pečeně ze třech kusů prasat. Zvířata byla označena římskými číslicemi IV, V a VI. Během celé doby volného skladování masa byly všechny aminy kromě SPM pod mezí detekce. Změny obsahu SPM přepočítané na sušinu jsou znázorněny graficky (obr. 36). Obrázek 37 ukazuje změny obsahu SPM v sušině přepočítané – obdobně jako u jater - na relativní hodnoty (v %) při volném skladování. Hodnoty sušiny zjištěné během skladování shrnuje tabulka 12.

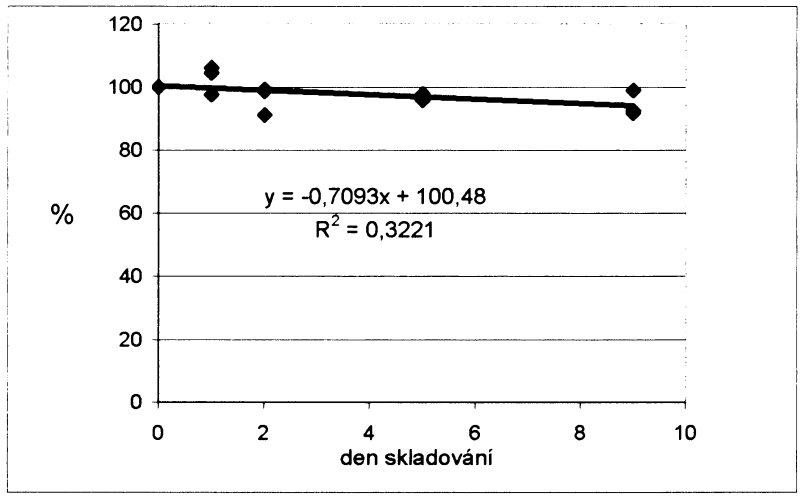
Tab. 12 Hodnoty sušiny (%) v syrové pečeni chladírensky skladované volně po dobu 9 dnů

Hodnoty sušiny (%)			
	Zvíře		
den	IV	V	VI
0	25,2	28,9	27,3
1	26,6	28,9	26,6
2	25,8	28,4	26,9
5	25,9	27,9	26,6
9	24,9	27,4	24,8

Obr. 36 Změny obsahu SPM ($mg.kg^{-1}$ suš.) při volném chladírenském skladování vepřové pečeně



Obr. 37 Pokles obsahu SPM při chladírenském skladování volně ložené vepřové pečeně



Jak je vidět z obr. 36 a 37, nedošlo při volném skladování pečeně v chladničce při cca 2 °C k významnému poklesu SPM (na hladině pravděpodobnosti $P < 0,05$). Obsah SPM se během skladování snížil přibližně na 95 % výchozí hodnoty v čerstvém stavu. Obsah SPM v čerstvé hmotě volně skladovaného masa poklesl z cca 23 na 18 $mg.kg^{-1}$, jak ukazují tabulky PI/15 – P/17. Zjištěné změny obsahu SPM při skladování volně baleného chlazeného masa odpovídají publikovaným údajům pro masa volně skladovaná: vepřové (**HERNÁNDEZ-JOVER, 1996**), hovězí (**YANO ET AL., 1994**) i kuřecí maso (**VINCI A ANTONELLI, 2002**). Literatura na rozdíl od našich výsledků uvádí značný nárůst PUT, CAD a TYM během chlazení masa. PUT a CAD vznikají činností bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a kmene *Pseudomonas*, přičemž CAD dominuje (**SLEMR A BEYERMANN, 1985; BAUER A PAULSEN, 2001; EDWARDS, DAINTY A HIBBARD, 1983**).

Chladírenské skladování v ochranné atmosféře

Vepřové pečeně ze stejných třech prasat jako v předchozí pokusné variantě byly na jatkách průmyslově zabaleny do ochranné atmosféry stejného složení jako v případě jater (70 % N_2 a 30 % CO_2) a byly uloženy 21 dní při cca 2 °C. Změny obsahu SPM v sušině během skladování jsou znázorněny na obr. 38, obr. 39 ukazuje změnu obsahu SPM v sušině po přepočtu na relativní hodnoty. Hodnoty sušiny zjištěné při skladování v OA se pohybovaly v rozmezí 25 – 29 % (viz tab. 13). Maso už po 15. dni skladování mělo zhoršenou kvalitu,

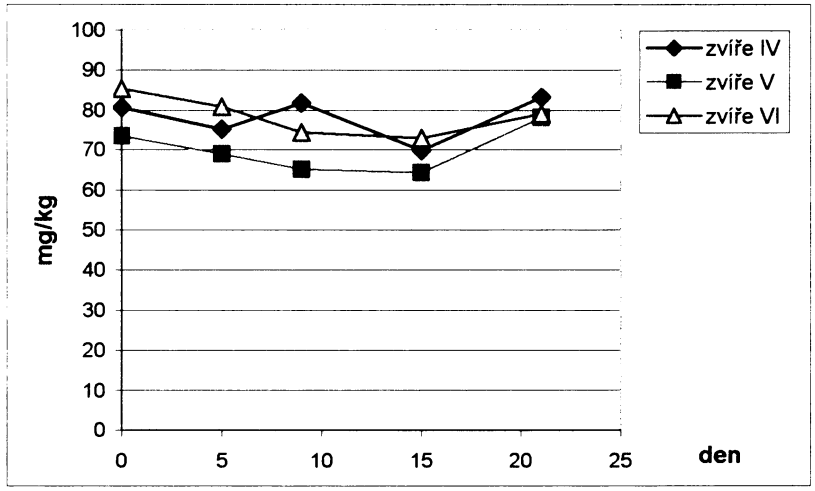
která byla senzoricky hodnocena stupněm (2). Intenzita zápachu i množství slizu záviselo na množství tuku ve svalovině. Prorostlejší maso mělo horší senzorické vlastnosti.

I přes zhoršené senzorické vlastnosti nevznikaly během skladování masa v OA žádné stanovitelné biogenní aminy a ani nedocházelo prakticky k žádné změně v obsahu SPM (na hladině pravděpodobnosti $P < 0,05$), jak je patrné z obr. 38 a 39. V čerstvé hmotě hodnota SPM kolísala kolem 20 $mg.kg^{-1}$. Změnu obsahu SPM v čerstvé hmotě chlazené pečeně v OA ukazují tabulky PI/15 – PI/17. Stejné složení ochranné atmosféry použili **BALAMATSIA ET AL. (2006)** pro skladování kuřecího prsního svalu. Po 17 dnech skladování pozorovali na rozdíl od nás mírný pokles SPM i SPD. Zjistili také poměrně vysoké počáteční hodnoty PUT a TYM, které se mnohem více zvýšily při volném skladování oproti skladování v OA.

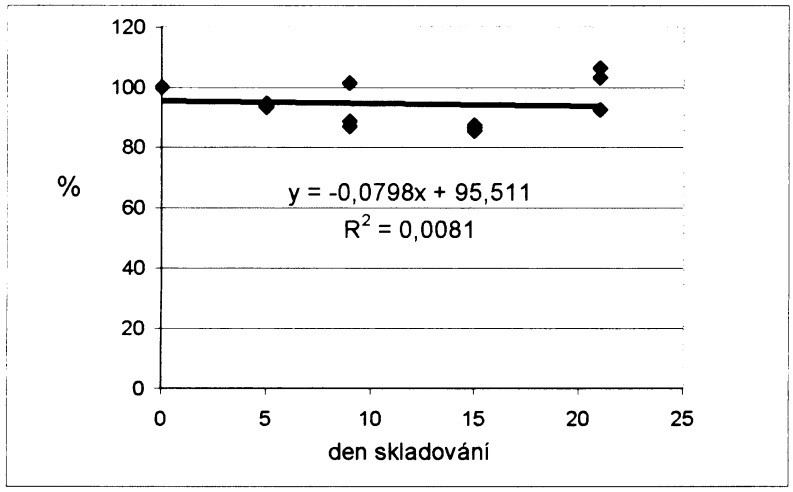
Tab. 13 Hodnoty sušiny (%) v syrové pečeni chladírensky skladované v OA po dobu 21 dnů

Hodnoty sušiny (%)			
	Zvíře		
den	IV	V	VI
0	25,2	28,9	27,3
5	25,8	28,6	25,9
9	25,2	29,2	26,8
15	26,2	27,9	26,6
21	25,4	27,8	26,7

Obr. 38 Změny obsahu SPM ($mg.kg^{-1}$ suš.) při chladírenském skladování vepřové pečeně v OA



Obr. 39 Změna obsahu SPM při chladírenském skladování vepřové pečeně v OA



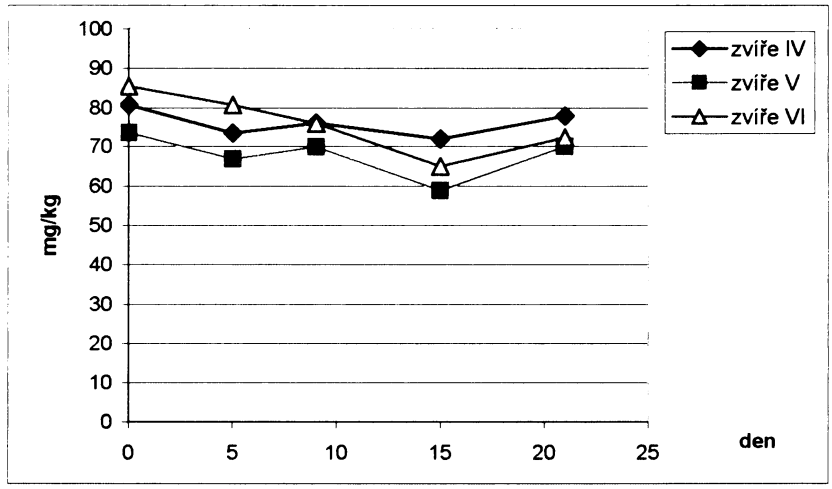
Skladování ve vakuu

Ve vakuu byly skladovány pečeně ze stejných třech kusů prasat jako v předešlých variantách po dobu 21 dnů za stejných podmínek jako pečeně volně ložené a skladované v ochranné atmosféře. Během skladování byla sledována pouze dynamika změn obsahu SPM a SPD. Obsahy PUT a biogenních aminů byly pod mezí detekce. Změnu obsahu SPM v sušině ukazuje obrázek 40 a změnu obsahu SPM vyjádřenou v relativních hodnotách obrázku 41. Hodnoty sušiny zjištěné během skladování shrnuje tabulka 14. Změnu obsahu SPM v čerstvé hmotě vakuově balené chlazené pečeně ukazují tabulky PI/15 – PI/17.

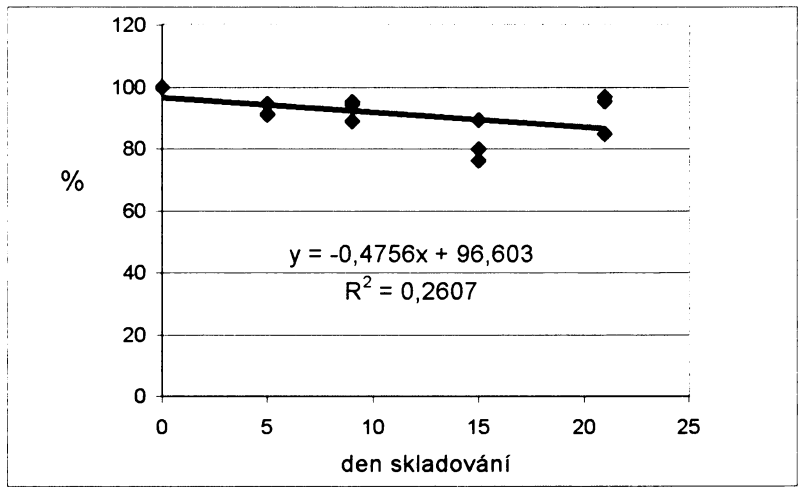
Tab. 14 Hodnoty sušiny (%) v syrové pečeni chladírensky skladované ve vakuu po dobu 21 dnů

Hodnoty sušiny (%)			
	Zvíře		
den	**IV**	**V**	**VI**
0	25,2	28,9	27,3
5	25,3	27,7	26,3
9	25,0	27,2	27,0
15	25,7	27,4	27,4
21	25,8	28,0	27,1

Obr. 40 Změny obsahu SPM (mg.kg^{-1} suš.) při chladírenském skladování vepřové pečeně ve vakuu



Obr. 41 Změna obsahu SPM při chladírenském skladování vepřové pečeně ve vakuu



Z obrázku 40 je patrné, že dynamika obsahu SPM při skladování vakuované vepřové pečeně vykazuje podobný trend jako při skladování tohoto masa v OA. Obsah SPM poklesl na cca 85 % výchozí hodnoty, což se ukázalo jako statisticky nevýznamné ($P < 0,05$), byť na samé hranici významnosti. Senzorické vlastnosti vakuované pečeně byly ve srovnání s masem skladovaným v ochranné atmosféře lepší. Vakuované maso mělo zhoršenou kvalitu až při analýze v posledním dnu skladování. Barva i 21. den zůstala prakticky nezměněna (1), pach i textura odpovídala hodnocení (2).

Podobné výsledky změn polyaminů poskytla práce zabývající se skladováním vakuovaného kapřího masa při cca 3 °C (**KŘÍŽEK ET AL., 2004**). Během skladování svaloviny

této ryby nepozorovali téměř žádné změny v obsahu SPD a SPM. Obsah PUT vzrostl během dvou týdnů přibližně čtyřnásobně při volném skladování oproti skladování svaloviny kapra ve vakuu. Vakuové balení masa tedy významně prodlužuje dobu použitelnosti.

5.4.2 Mrazírenský způsob skladování masa a jater

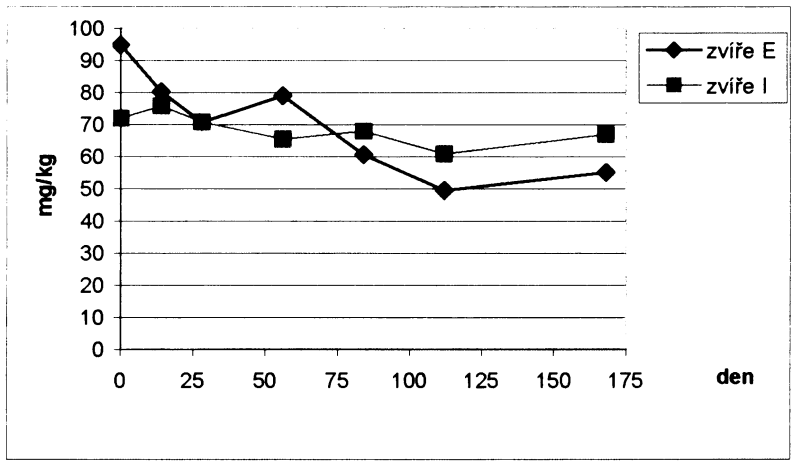
5.4.2.1 Vepřová játra

Při mrazírenském způsobu skladování byla játra ze dvou kusů prasat skladována po dobu 6 měsíců, tj. 168 dnů, v mrazicím boxu při -18 °C. Vzorky byly baleny do PE-sáčku určeného k mražení potravin. Vzorky pro analýzu byly rozmraženy uložením v chladničce přes noc a následující den ihned analyzovány. Ani poslední den časové řady nebyly u rozmražených jater pozorovány žádné změny v senzorických vlastnostech ve srovnání s játry čerstvými. Nebyla však ověřována chuť, u níž hrozí riziko hořknutí. Obsah biogenních aminů a PUT byl po celou dobu skladování zmrazených jater pod mezí detekce. Změny obsahu SPD v sušině udává obrázek 42 a změny obsahu SPM v sušině obrázek 43. Změny obsahu SPD a SPM v sušině vyjádřené v relativních hodnotách jsou znázorněny graficky na obrázcích 44 a 45. Hodnoty sušiny v jednotlivých dnech skladování jsou shrnuty v tabulce 15.

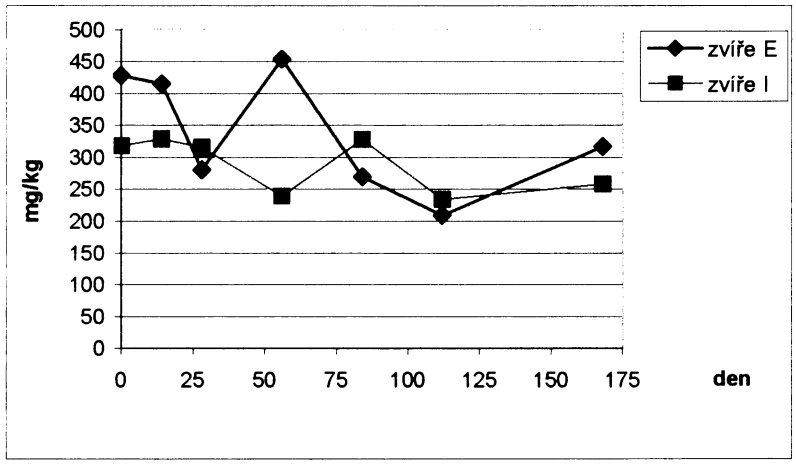
Tab. 15 Hodnoty sušiny (%) ve zmrazených játrech skladovaných po dobu 168 dnů

Hodnoty sušiny (%)							
Doba skladování (dny)							
Zvíře	**0**	**14**	**28**	**56**	**84**	**112**	**168**
E	28,1	28,2	28,0	28,1	27,4	27,5	27,9
I	28,6	28,5	28,5	28,8	29,3	29,7	29,0

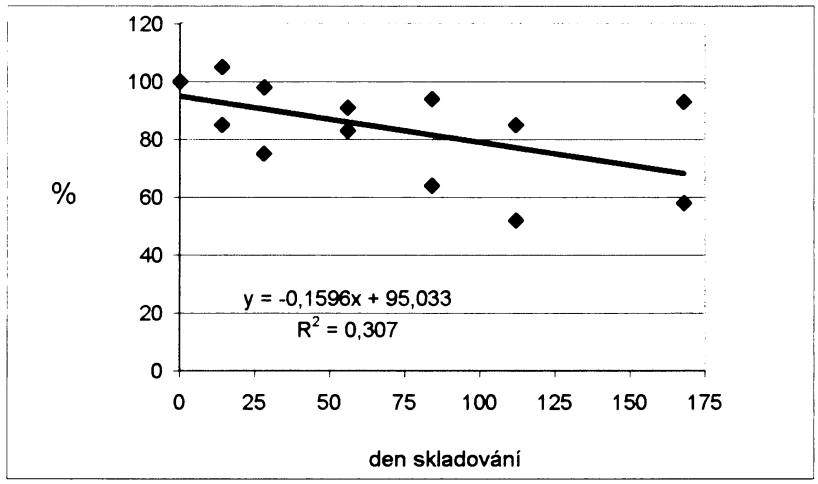
Obr. 42 Změny obsahu SPD (mg.kg^{-1} suš.) při skladování zmrazených vepřových jater



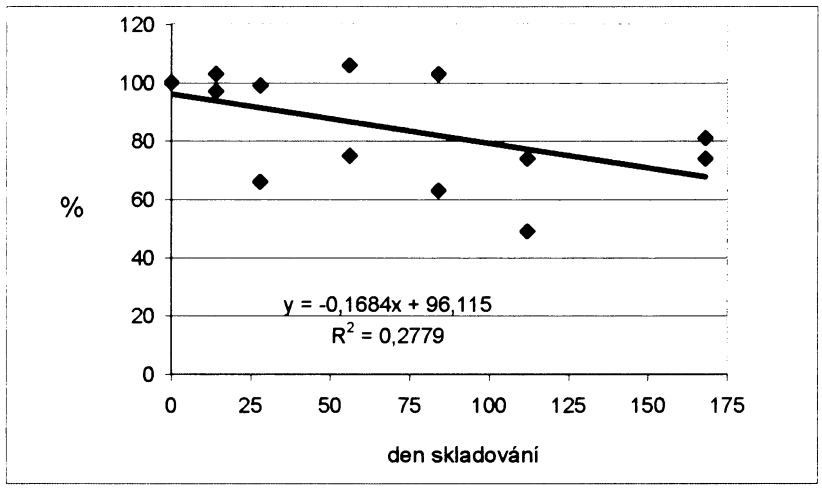
Obr. 43 Změny obsahu SPM (mg.kg^{-1} suš.) při skladování zmrazených vepřových jater



Obr. 44 Relativní změny obsahu SPD při skladování zmrazených vepřových jater



Obr. 45 Relativní změny obsahu SPM při skladování zmrazených vepřových jater



Během skladování zmrazených vepřových jater po dobu šesti měsíců při -18 °C došlo k poklesu obsahu SPD a SPM v sušině přibližně na 70 % výchozích hodnot, což je vidět na obrázcích 44 a 45. Významnost tohoto rozdílu byla testována regresní analýzou. Pokles obsahu SPD byl významný, zatímco pokles obsahu SPM nevýznamný ($P < 0,05$). V obou případech však výsledky regresní analýzy leží na hranicích významnosti.

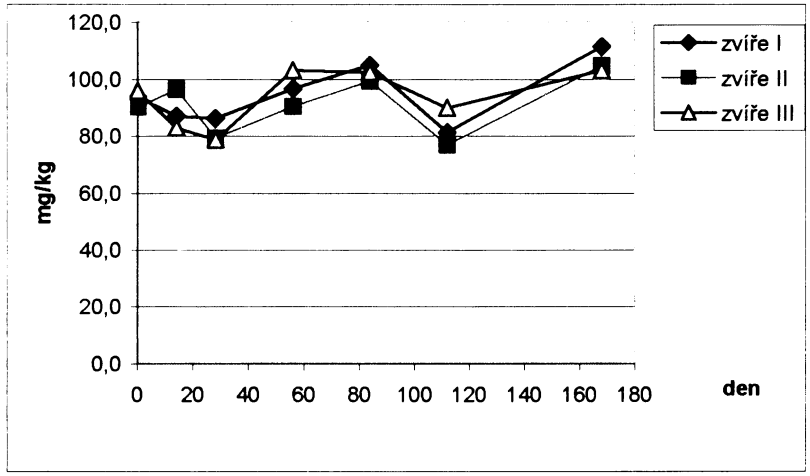
5.4.2.2 Vepřová pečeně

Pro způsob skladování zmrazené vepřové pečeně byla zvolena stejná časová řada a stejné podmínky jako v případě skladování zmrazených vepřových jater, tj. 168 dnů v mrazicím boxu při -18 °C. Vzorky byly odebrány ze třech kusů prasat a baleny do PE-sáčku určeného k mražení potravin. Rozmražení před analýzou bylo provedeno stejně jako u vepřových jater. Jako u mražených jater, ani při skladování mražené vepřové pečeně nebyly zjištěny změny v senzorických vlastnostech během celé časové řady. Ani v tomto případě nebyla posuzována chuť a textura. Jediným hodnotitelným aminem při tomto způsobu skladování byl SPM, neboť obsahy biogenních aminů, PUT a SPD byly ve všech vzorcích pod mezí detekce. Změny obsahu SPM v sušině udává obr. 46 a změny obsahu SPM v sušině vyjádřené v relativních hodnotách jsou znázorněny na obrázku 47. Hodnoty sušiny v jednotlivých dnech skladování zmrazeného masa jsou shrnuty v tab. 16.

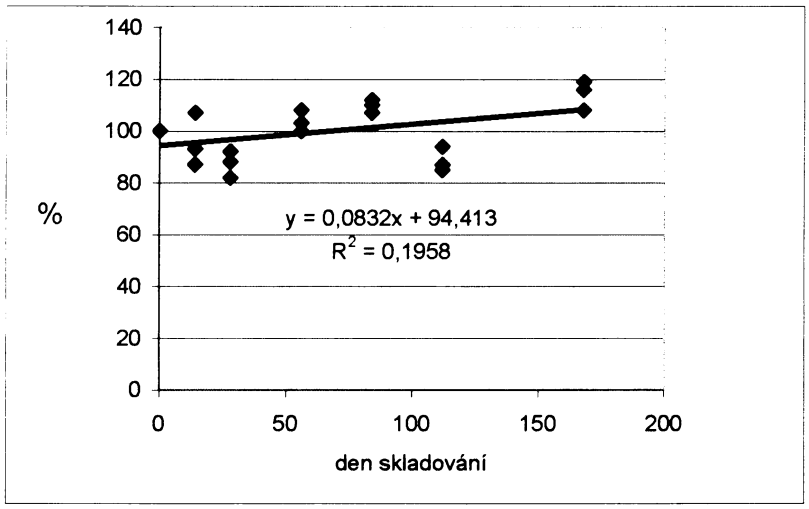
Tab. 16 Hodnoty sušiny (%) ve zmrazené pečeni skladované po dobu 168 dnů

Hodnoty sušiny (%)							
Doba skladování (dny)							
Zvíře	**0**	**14**	**28**	**56**	**84**	**112**	**168**
I	26,9	26,1	24,7	26,5	26,0	27,2	26,1
II	25,1	25,7	25,9	25,9	26,1	26,3	26,3
III	26,4	25,2	25,4	25,7	25,8	25,8	26,2

Obr. 46 Změny obsahu SPM (mg.kg^{-1} suš.) při skladování zmrazené vepřové pečeně



Obr. 47 Relativní změny obsahu SPM při skladování zmrazené vepřové pečeně



Změna obsahu SPM při mrazírenském způsobu skladování vepřové pečeně měla překvapivě opačný trend oproti změně obsahu tohoto polyaminu ve vepřových játrech skladovaných za stejných podmínek. Došlo k mírnému vzestupu obsahu SPM. Tento vzestup ukázala regresní analýza jako významný ($P < 0,05$), avšak na samé hranici významnosti.

Údaje v literatuře o změnách obsahu polyaminů během skladování zmrazeného masa jsou zatím jen velmi omezené. **CHEN, LIN A YEN (1994)** nezjistili během devítiměsíčního skladování zmrazeného vepřového masa při – 18 °C tvorbu biogenních aminů a změny obsahu polyaminů. V dalších pracích (**HALÁSZ ET AL., 1994; HERNÁNDEZ-JOVER ET AL., 1996**) bylo zmrazené maso skladováno pouze po dobu 8 či 12 dnů. Údaje o změnách obsahu polyaminů ve zmrazených vepřových játrech se nepodařilo v literatuře najít.

5.4.3 Kuchyňské úpravy

5.4.3.1 Vepřová játra

Kuchyňské úpravy vepřových jater byly zvoleny a v laboratoři napodobeny tak, jak se běžně v ČR provádějí v domácnostech. Játra byla vařena, dušena a restována podle postupu popsaném v experimentální části. Vaření a dušení probíhalo v zatavené fólii, aby nedocházelo ke ztrátám vody odpařováním. Dušení jater mělo dvě varianty, s přídavkem vody a ve vlastní šťávě. Pro kuchyňské úpravy byla použita celá játra ze dvou kusů prasat označených I a II. Experiment byl pro každá játra proveden dvakrát – po 24 hodinách po porážce a po 6 dnech (počítáno od porážky) skladování syrových jater v chladničce při cca 3 °C. Byla analyzována jak tepelně upravená játra, tak vývar a vydušená šťáva. Výsledky byly přepočítány na sušinu a porovnávány vzhledem ke kontrolnímu vzorku, tj. tepelně neupravenému. Hodnoty sušiny v tepelně upravených vzorcích vepřových jater ukazuje tabulka 17.

Tab. 17 Hodnoty sušiny (%) v tepelně upravených játrech

		Úprava				
Den	**Zvíře**	**Kontrola**	**Vaření**	**Dušení**	**Dušení s vodou**	**Restování**
1.	I.	27,5	35,6	37,0	36,1	35,8
	II.	27,5	32,6	35,5	33,8	39,0
6.	I.	27,8	37,2	40,9	39,1	39,3
	II.	27,9	32,7	35,9	33,8	38,2

Přehled průměrného obsahu polyaminů v čerstvé hmotě tepelně upravených vepřových jater ukazují tabulky 18 a 19. Obsah polyaminů ve vývarech byl pod mezí detekce. Obsah ostatních analyzovaných biogenních aminů, PUT, CAD, HIM, TYM, TRM a PEA, byl v tepelně upravených játrech také pod mezí detekce.

Tab. 18 Obsah SPD ($mg.kg^{-1}$) v tepelně upravených játrech

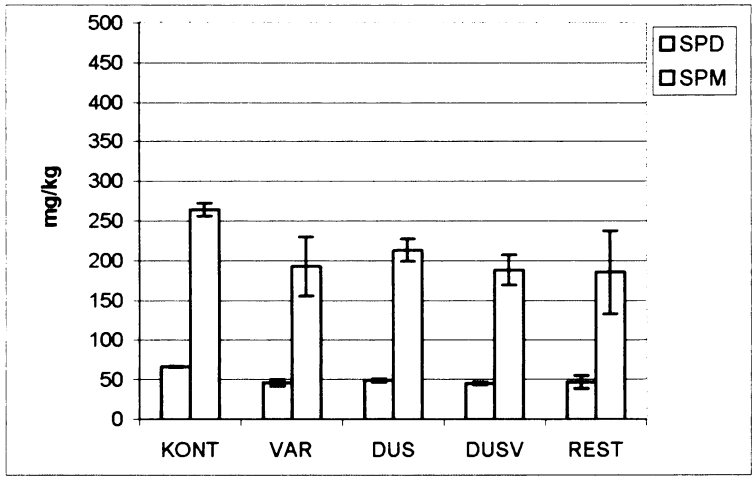
Zvíře	Den	Kontrola	Vaření	Dušení	Dušení s vodou	Restování
I.	1.	18,2	16,4	18,2	16,3	16,8
	6.	22,7	16,7	17,1	17,2	24,5
II.	1.	20,9	16,6	17,8	18,6	15,0
	6.	16,8	13,9	14,1	14,6	16,3

Tab. 19 Obsah SPM ($mg.kg^{-1}$) v tepelně upravených játrech

Zvíře	Den	Kontrola	Vaření	Dušení	Dušení s vodou	Restování
I.	1.	72,8	68,6	78,8	67,8	66,4
	6.	81,9	67,7	68,7	69,1	106
II.	1.	106	92,3	82,9	86,0	65,7
	6.	76,1	78,5	66,5	75,4	72,9

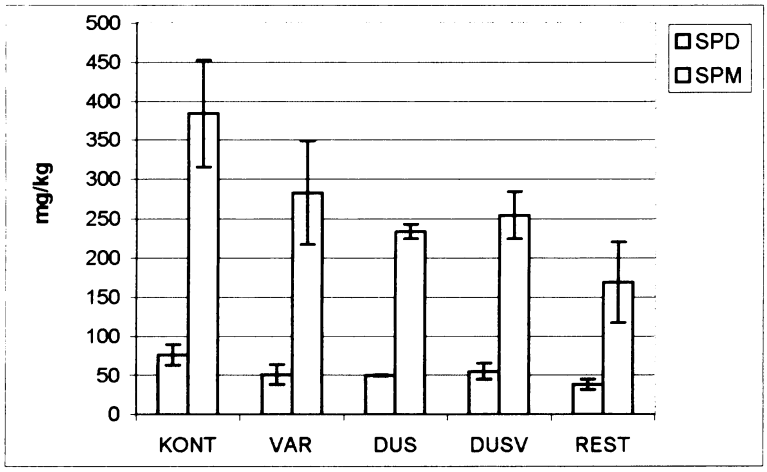
Obsah SPD a SPM v sušině tepelně upravených jater po 24 hodinách (1. den) a po 6 dnech skladování je patrný z následujících grafů (obr. 48 až 51). Změny obsahu polyaminů v sušině během kuchyňských úprav vyjádřené v procentech v porovnání s obsahem polyaminů v syrových, tepelně neupravených játrech udávají obrázky 52 až 55.

Obr. 48 Obsah PA ($mg.kg^{-1}$ suš.) v tepelně upravených játrech po 24 hodinách, zvíře I.

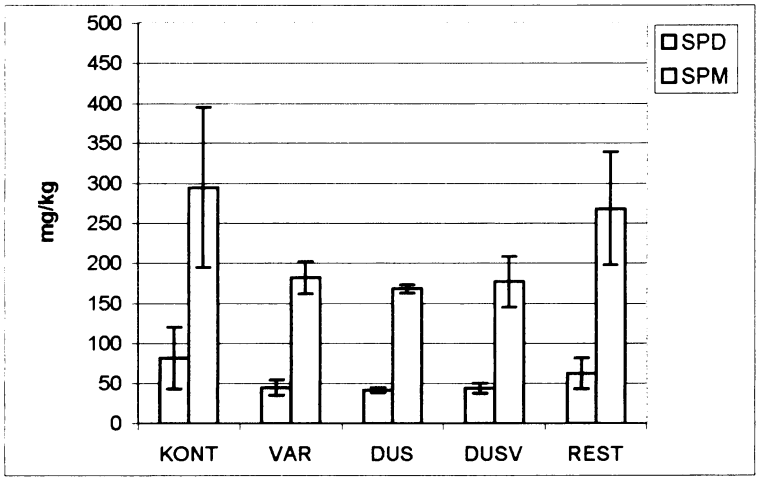


KONT ... kontrola, tepelně neupravená játra; VAR ... vaření; DUS ... dušení; DUSV ... dušení s vodou; REST ... restování

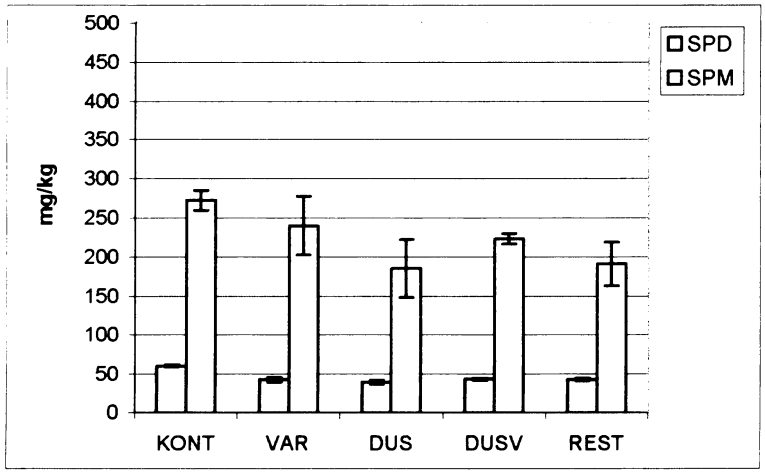
Obr. 49 Obsah PA (mg.kg^{-1} suš.) v tepelně upravených játrech po 24 hodinách, zvíře II.



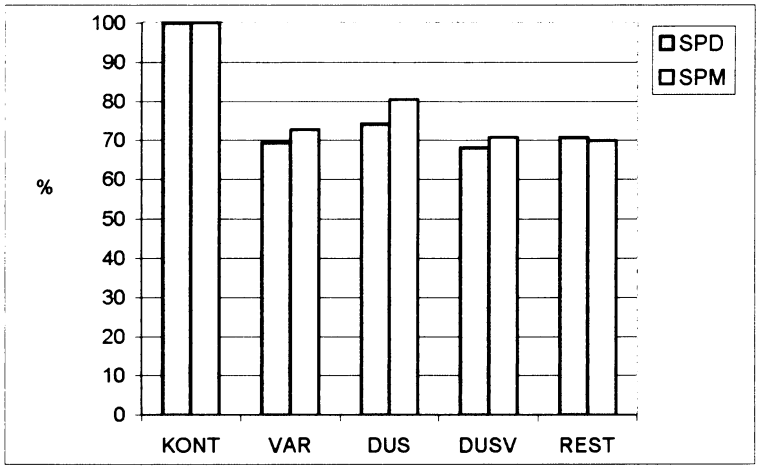
Obr. 50 Obsah PA (mg.kg^{-1} suš.) v tepelně upravených játrech po 6 dnech, zvíře I.



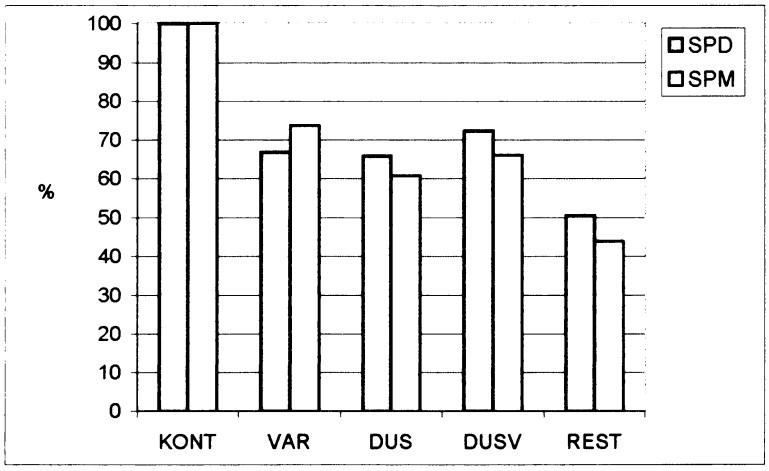
Obr. 51 Obsah PA (mg.kg^{-1} suš.) v tepelně upravených játrech po 6 dnech, zvíře II.



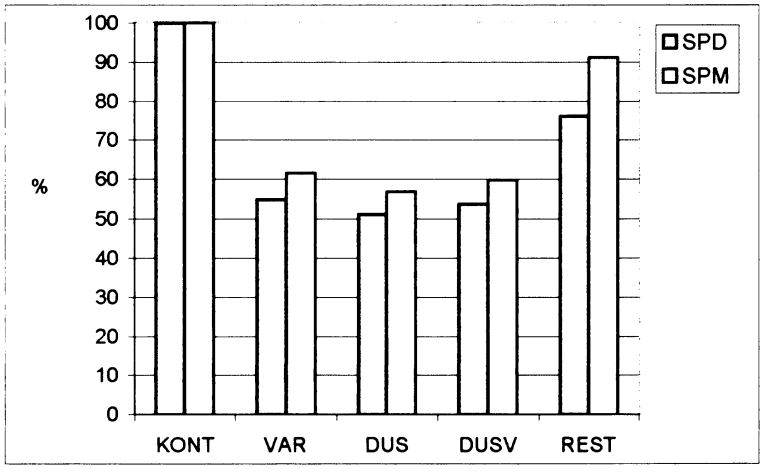
Obr. 52 Změny obsahu PA (%) v tepelně upravených játrech po 24 hodinách, zvíře I. (syrová játra = 100 %)



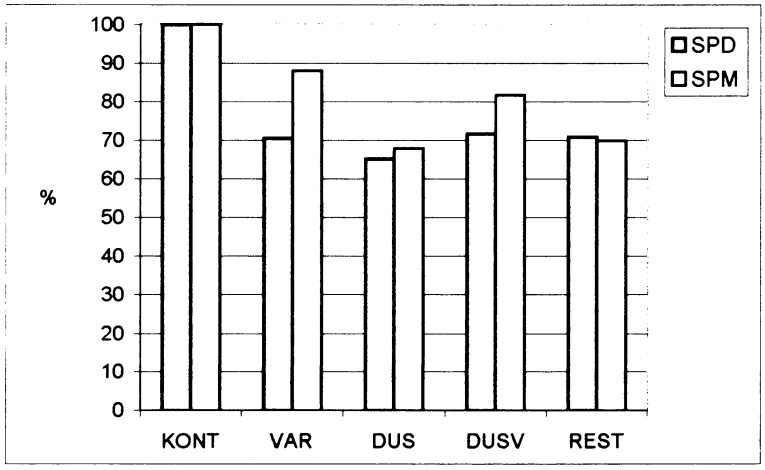
Obr. 53 Změny obsahu PA (%) v tepelně upravených játrech po 24 hodinách, zvíře II. (syrová játra = 100 %)



Obr. 54 Změny obsahu PA (%) v tepelně upravených játrech po 6 dnech, zvíře I. (syrová játra = 100 %)



Obr. 55 Změny obsahu PA (%) v tepelně upravených játrech po 6 dnech, zvíře II. (syrová játra = 100 %)



Z obrázků vyjadřujících procentuální změny v obsahu polyaminů je vidět, že při tepelných úpravách vepřových jater čerstvých i skladovaných 6 dnů v chladničce při cca 3 °C docházelo k poklesu obsahu SPD a SPM na 70 až 50 % původní hodnoty v kontrolním, tepelně neupraveném vzorku. Obsahy obou polyaminů klesaly při tepelných úpravách přibližně stejnou měrou. Duncanovým testem byly testovány rozdíly v poklesu obsahu polyaminů mezi jednotlivými kuchyňskými úpravami čerstvých jater a rozdíly mezi kuchyňskými úpravami jater skladovaných 6 dnů v chladničce. Pokles obsahu SPD vůči výchozí (kontrolní) hodnotě byl významný ($P < 0.05$) během kuchyňských úprav po 24 hodinách po porážce i po 6 dnech skladování (tab. 20 a 21). Rozdíl mezi jednotlivými kuchyňskými úpravami byl nevýznamný na stejné hladině významnosti.

Tab. 20 Statistické rozdíly mezi kuchyňskými úpravami čerstvých vepřových jater v obsahu SPD

Duncanův test			
Úprava	Průměr (%)	Homogenní skupiny	
Restování	60,8	x	
Vaření	68,5	x	
Dušení s vodou	70,2	x	
Dušení	70,3	x	
Kontrola	100		x

Tab. 21 Statistické rozdíly mezi kuchyňskými úpravami skladovaných vepřových jater v obsahu SPD

Duncanův test			
Úprava	Průměr (%)	Homogenní skupiny	
Dušení	59,5	x	
Vaření	64,3	x	
Dušení s vodou	64,6	x	
Restování	73,7	x	
Kontrola	100		x

Pokles SPM vůči výchozí (kontrolní) hodnotě byl významný ($P < 0,05$) stejně jako v případě SPD. Rozdíl mezi vařením a oběma variantami dušení čerstvých i skladovaných jater nebyl významný vzhledem ke změně obsahu SPM. Největší ztráty SPM představovalo restování ($P < 0,05$) čerstvých jater. Restování skladovaných chlazených jater znamenalo překvapivě nejnižší ztráty SPM v porovnání s vařením a oběma variantami dušení. Obsah SPM v játrech restovaných se vzhledem k obsahu SPM v kontrolním vzorku významně nelišil. Skladování před tepelnou úpravou nemělo vliv na pokles PA v játrech. Významný ($P < 0,05$) rozdíl poklesu obsahu SPM byl zjištěn během restování jater 24 hodiny po porážce a skladovaných 6 dní v chladničce. Výsledky Duncanova testu uvádí tabulky 22 a 23.

Tab. 22 Statistické rozdíly mezi kuchyňskými úpravami čerstvých vepřových jater v obsahu SPM

Duncanův test				
Úprava	Průměr	Homogenní skupiny		
Restování	56,9	x		
Dušení s vodou	68,6	x	x	
Dušení	70,6	x	x	
Vaření	73,2	x	x	
Kontrola	100			x

Tab. 23 Statistické rozdíly mezi kuchyňskými úpravami skladovaných vepřových jater v obsahu SPM

Duncanův test					
Úprava	Průměr	Homogenní skupiny			
Dušení	63,6	x	x		
Dušení s vodou	73,1	x	x		
Vaření	77,5	x	x		
Restování	80,6		x	x	
Kontrola	100			x	x

Dostupná literatura téměř postrádá údaje o obsahu polyaminů v kuchyňsky upravených vnitřnostech. **KALAČ ET AL. (2005)** uvádějí v restovaných játrech odebíraných z menzy JU obsah SPD přibližně dvojnásobný a obsah SPM téměř poloviční v porovnání s mými výsledky.

5.4.3.2 Vepřová pečeně

Pro vepřovou svalovinu (*m. longissimus dorsi*) bylo zvoleno pět v ČR nejběžnějších kuchyňských úprav: vaření, dušení ve vlastní šťávě, pečení, restování (steak) a smažení v trojobalu (řízek). Tyto úpravy byly v laboratoři provedeny tak, aby co nejvěrněji napodobily přípravu pokrmu v domácnosti. Z řízku byl před analýzou odstraněn trojobal. Tepelně byly upravovány pečeně ze dvou prasat označených A a B. Celý sval z každého kusu byl rozdělen na polovinu a experiment byl proveden 24 hodiny po porážce a po 6 dnech skladování v chladničce při cca 3 °C, stejně jako v případě jater. Hodnoty obsahu PA byly přepočítány na sušinu a změny obsahu PA při kuchyňských úpravách byly porovnávány k hodnotám PA v syrovém, kontrolním vzorku. Analyzovány byly také vývary a vydušená šťáva. Hodnoty sušiny v tepelně upravených vzorcích vepřových pečení udává tabulka 24.

Tab. 24 Hodnoty sušiny (%) v tepelně upravené vepřové pečeni

		úprava					
Den	**Zvíře**	**Kontrola**	**Vaření**	**Dušení**	**Pečení**	**Restování**	**Řízek**
1.	A	27,0	39,6	40,6	49,4	45,1	40,4
	B	26,7	37,8	39,9	59,0	45,6	40,7
6.	A	27,9	38,4	39,0	48,1	44,1	42,1
	B	26,8	37,2	39,1	57,3	43,6	40,6

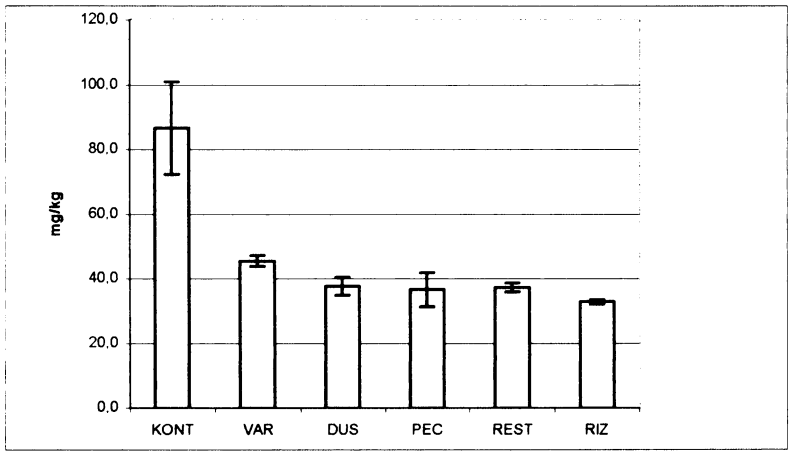
Průměrný obsah SPM v čerstvé hmotě vařeného, dušeného, pečeného, restovaného a smaženého vepřového masa shrnuje tabulka 25. Obsah SPD byl pod mezí detekce. Ostatní analyzované biogenní aminy, PUT, CAD, HIM, TYM, TRM a PEA, také nebyly detekovány. Ve vývarech a vydušené šťávě se nepodařilo detekovat žádný z analyzovaných aminů.

Tab. 25 Obsah SPM ($mg.kg^{-1}$) v tepelně upravené vepřové pečeni

Zvíře	Den	Kontrola	Vaření	Dušení	Pečení	Restování	Řízek
A	1.	23,4	18,0	15,3	18,1	16,8	13,3
	6.	21,2	15,3	18,6	16,1	20,1	18,1
B	1.	21,9	21,3	23,1	23,2	25,0	25,6
	6.	22,1	19,9	21,9	20,7	22,5	20,3

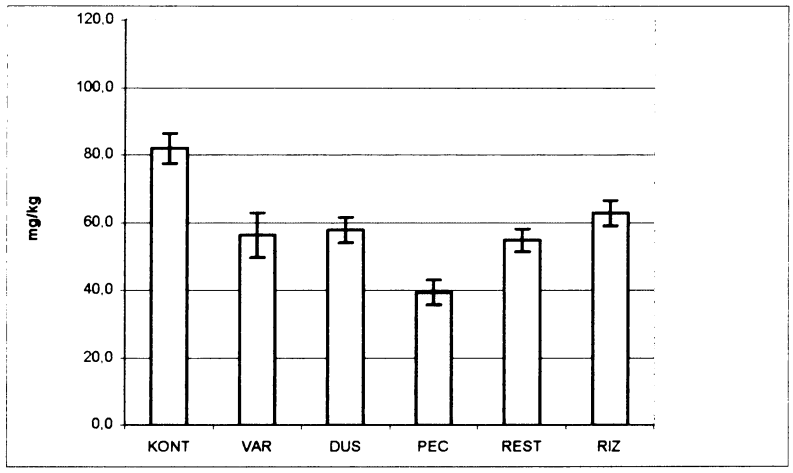
Následující grafy (obr. 56 až 59) udávají obsah SPM v sušině vepřové pečeně upravené jednotlivými kuchyňskými úpravami po 24 hodinách po porážce a po 6 dnech skladování syrové pečeně v chladničce při cca 3 °C. Změny obsahu SPM v sušině během kuchyňských úprav vyjádřené v procentech v porovnání s obsahem SPM v syrové, tepelně neupravené pečeni ukazují obrázky 60 až 63.

Obr. 56 Obsah SPM ($mg.kg^{-1}$ suš.) v tepelně upravené pečeni po 24 hodinách, zvíře A.

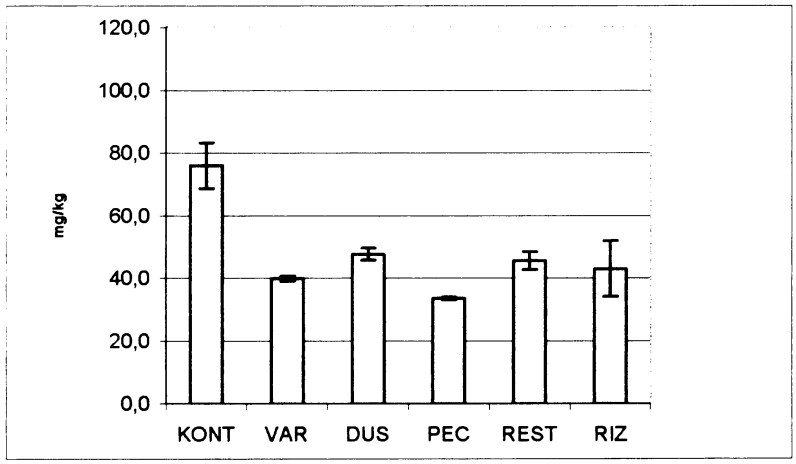


KONT ... kontrola, tepelně neupravené maso; VAR ... vaření; DUS ... dušení; PEC ... pečení; REST ... restování (steak); RIZ ... smažení v trojobalu (řízek)

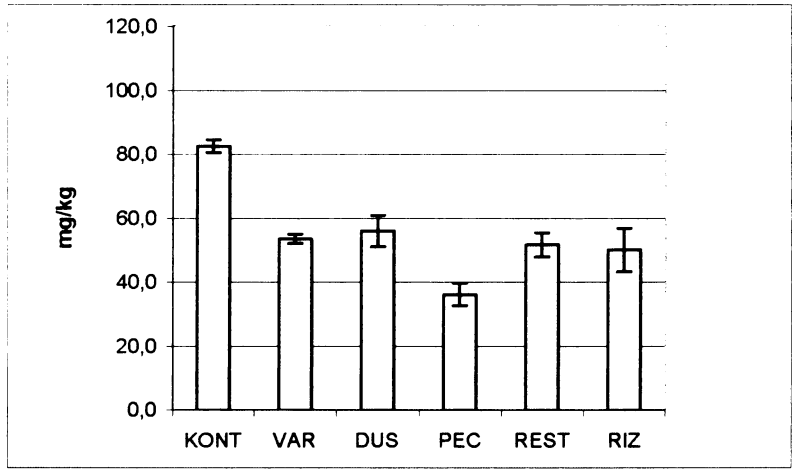
Obr. 57 Obsah SPM (mg.kg^{-1} suš.) v tepelně upravené pečeni po 24 hodinách, zvíře B.



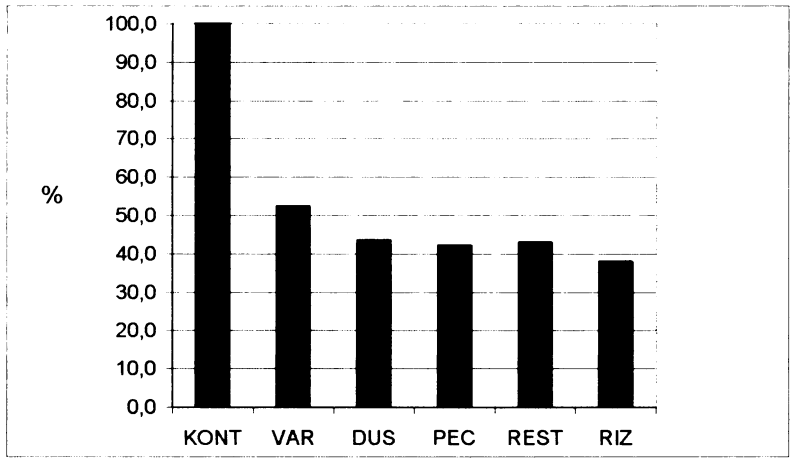
Obr. 58 Obsah SPM (mg.kg^{-1} suš.) v tepelně upravené pečeni po 6 dnech, zvíře A.



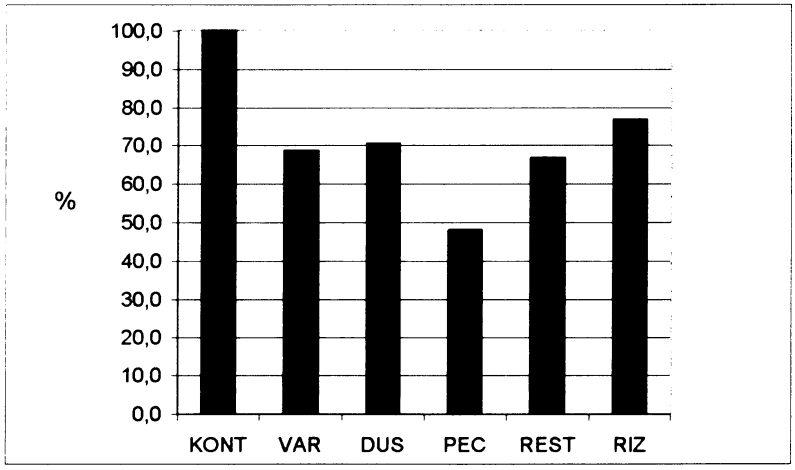
Obr. 59 Obsah SPM (mg.kg^{-1} suš.) v tepelně upravené pečeni po 6 dnech, zvíře B.



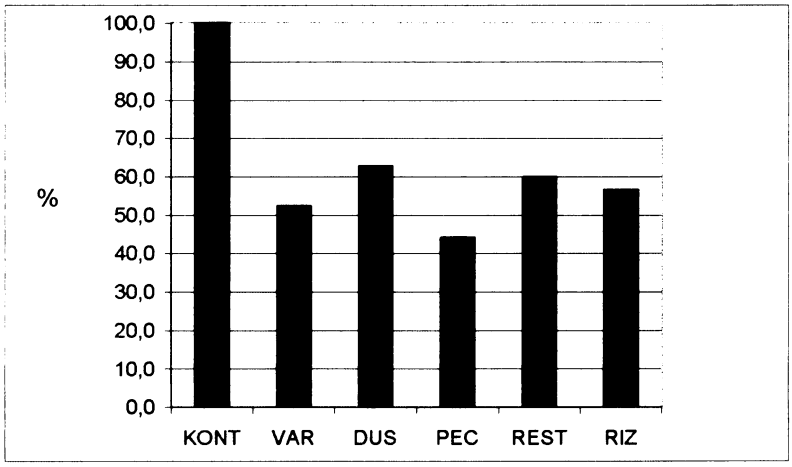
Obr. 60 Změny obsahu SPM (%) v tepelně upravené pečeni po 24 hodinách, zvíře A. (syrová pečeně = 100 %)



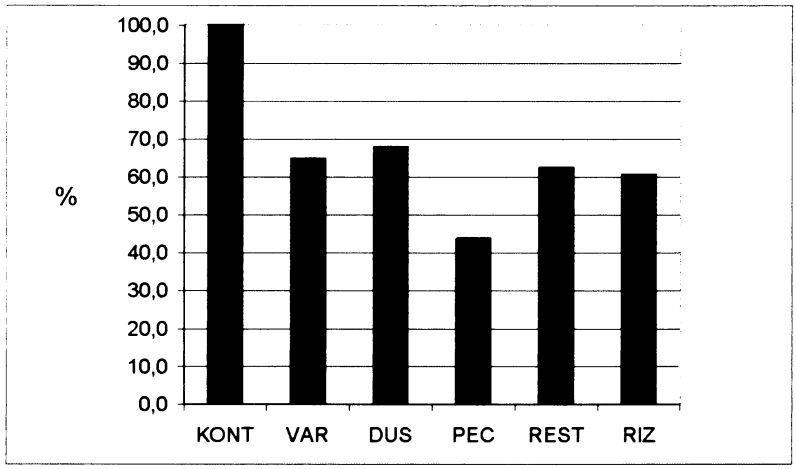
Obr. 61 Změny obsahu SPM (%) v tepelně upravené pečeni po 24 hodinách, zvíře B. (syrová pečeně = 100 %)



Obr. 62 Změny obsahu SPM (%) v tepelně upravené pečeni po 6 dnech, zvíře A. (syrová pečeně = 100 %)



Obr. 63 Změny obsahu SPM (%) v tepelně upravené pečeni po 6 dnech, zvíře B. (syrová pečeně = 100 %)



Z obrázků 60 až 63 je patrné, že při tepelné úpravě vepřového masa dochází k výraznému poklesu obsahu SPM. Obsah SPM klesal při kuchyňských úpravách na 70 – 40 % výchozí hodnoty v syrovém (kontrolním) vzorku. Duncanovým testem byly testovány rozdíly mezi kuchyňskými úpravami čerstvého masa (24 hodiny po porážce) a rozdíly mezi kuchyňskými úpravami skladovaného masa. Pokles obsahu SPM během kuchyňských úprav čerstvé i skladované pečeně byl významný ($P < 0,05$). Mezi jednotlivými úpravami kromě pečení není statistický rozdíl. Největší ztráty představuje pečení jak čerstvého, tak skladovaného masa. Výsledky Duncanova testu ukazují tabulky 26 a 27.

Tab. 26 Statistické rozdíly mezi kuchyňskými úpravami čerstvého vepřového masa v obsahu SPM

Duncanův test				
Úprava	Průměr	Homogenní skupiny		
Pečení	45,2	x		
Dušení	57,0	x	x	
Restování	57,5	x	x	
Smažení	61,2		x	
Vaření	62,5		x	
Kontrola	100			x

Tab. 27 Statistické rozdíly mezi kuchyňskými úpravami skladovaného vepřového masa v obsahu SPM

Duncanův test				
Úprava	Průměr	Homogenní skupiny		
Pečení	43,9	x		
Smažení	59,2		x	
Vaření	60,0		x	
Restování	61,7		x	
Dušení	66,0		x	
Kontrola	100			x

Výsledky analýzy vařené, dušené, restované, pečené a smažené vepřové pečeně jsou v souladu s publikovanými údaji pro tepelně upravené maso. **KALAČ ET AL. (2005)** uvádějí obsah SPM pro restované a vařené hovězí a vepřové maso v rozmezí 13,6 – 26,3 mg.kg $^{-1}$, ale obsah SPD uvádí nad mezí detekce, ne však vyšší než 10 mg.kg^{-1}. V restovaném kuřecím prsním svalu zjistili vyšší obsah SPM 54,1 mg.kg^{-1} i SPD 25,2 mg.kg^{-1}. Podobné výsledky publikovali i **HAGEN, BAUER A PAULSEN (2005)**. Během tepelných úprav však nezaznamenali výrazné úbytky polyaminů. Pokles obsahu SPD i SPM na polovinu výchozí hodnoty v čerstvé surovině zjistili **HERNÁNDEZ-JOVER ET AL. (1996)** během vaření vepřové šunky. Vaření, dušení a grilování znamenalo také pokles obsahu PUT přibližně na polovinu obsahu ve výchozí vepřové pečeni (**PAULSEN, HAGEN A BAUER, 2006**).

6. Závěr

Maso a játra představují pro člověka významný zdroj biologicky účinných polyaminů. Polyaminy – putrescin, spermidin a spermin – byly stanovovány v čerstvém vepřovém a hovězím mase, v čerstvých vepřových, hovězích, kuřecích a ovčích játrech 24 hodiny po porážce. Byly také vyhodnoceny některé faktory ovlivňující obsah polyaminů v mase a játrech. V čerstvém mase a játrech to byly: vliv plemene (u skotu typ užitkovosti), vliv stáří zvířete, pohlaví a mezidruhové rozdíly. Dále byl sledován vliv chladírenského a mrazírenského způsobu skladování vepřového masa a jater a vliv různých kuchyňských úprav vepřových masa a jater.

Polyaminy a biogenní aminy – histamin, tyramin, tryptamin a kadaverin – byly stanovovány dvěma analytickými metodami. Aminy v čerstvém mase a játrech byly stanovovány metodou MECC, kde jako derivatizační činidlo byl použit benzoylchlorid. Dynamika obsahu PA při skladování a kuchyňských úpravách byla zjišťována metodou dansylace s analytickou koncovkou HPLC. Potřeba zavést metodu HPLC pro stanovení polyaminů vyplynula hlavně z kapacitních důvodů přístroje pro kapilární elektroforézu. Výhodou HPLC oproti MECC je zejména kratší doba analýzy (u HPLC je to 20 minut, u MECC 40 minut) a možnost použití této metody pro analýzu velkých sérií vzorků. Nevýhodou dansylchloridu jako derivatizačního činidla je jeho malá stabilita na světle. Meze detekce biogenních aminů u obou metod jsou srovnatelné, pohybují se v rozmezí 1 – 2,5 $mg.kg^{-1}$. Na základě analýz 15 stejných vzorků oběma metodami vyplynul závěr, že metoda dansylace / HPLC poskytuje nižší hodnoty v porovnání s benzoylací / MECC, zvláště při obsazích PA nad 100 $mg.kg^{-1}$. Ověření opakovatelnosti stanovení biogenních aminů v mase a játrech metodou dansylace / HPLC poskytlo nižší hodnoty, tzn. tato metoda je přesnější ve srovnání s metodou benzoylace / MECC.

Spermin jako jediný z polyaminů byl zjištěn v čerstvém hovězím (n = 71) a vepřovém (n = 27) mase. Hodnoty jeho obsahu v roštěnci / vepřové pečeni a kýtě obou druhů zvířat nepřesahovaly 30 $mg.kg^{-1}$, což se shoduje s údaji literatury pro čerstvé maso. Obsah PUT v čerstvé svalovině byl pod mezí detekce. Vzájemné korelace mezi průměrným obsahem SPM v jednotlivých svalech býků a stářím zvířete, živou hmotností a typem užitkovosti nebyly zjištěny. Krávy nebylo možno rozdělit do skupin podle stáří, živé hmotnosti a typu užitkovosti vzhledem k malému souboru dat (8 kusů). Ani u prasat tyto korelace nebyly zjišťovány, neboť všechny kusy byly přibližně stejně staré a stejné hmotnosti. Významné

rozdíly v obsahu SPM byly zjištěny v kýtě mezi prasničkami a vepříky ($P < 0,05$) a v obou svalech mezi kravami a býky ($P < 0,005$). Jedinci samčího pohlaví obou druhů mají v kosterní svalovině vyšší obsah polyaminů pravděpodobně vzhledem k rychlejšímu růstu svalstva samců. Z mezidruhových rozdílů byl významný rozdíl zjištěn v průměrném obsahu SPM jen mezi kravami a prasničkami v roštěnci / pečeni ($P < 0,05$).

Játra jsou metabolicky velmi aktivní orgán, proto je pro ně typické široké kolísání obsahu polyaminů vzorek od vzorku. Byly analyzovány jednotlivé jaterní laloky s cílem ověřit vyrovnanost obsahu polyaminů v játrech prasat. Zjistilo se, že obsah polyaminů je v celých játrech vyrovnaný. To lze vysvětlit tím, že metabolizující tkáň je v celých játrech rovnoměrně rozložena a nestává se, že by pracoval jen jeden lalok, zatímco ostatní regenerují. Jednotlivé jaterní laloky se mezi sebou z hlediska obsahu PA neliší, tedy bylo možné pro další experimenty (skladování a kuchyňské úpravy) použít kteroukoli část jater nebo játra celá. V čerstvých vepřových játrech byl nejčastější obsah SPD a SPM kolem 30 a 100 $mg.kg^{-1}$, zatímco v čerstvých hovězích játrech byl poměr obou polyaminů opačný. Nejčastější obsah SPD a SPM v hovězích játrech byl 100 – 150 a 40 $mg.kg^{-1}$. Obsah PUT v čerstvých játrech byl pod mezí detekce. Mezidruhové rozdíly SPD i SPM v játrech byly významné na hladině pravděpodobnosti $P < 0,001$. Poměr obsahu obou polyaminů v hovězích játrech, který je typický pro rostliny, vyvolal domněnku, že by mohlo jít o souvislost s výživou přežvýkavců. Kvůli tomu byla analyzována játra ovcí. Výsledky analýzy ovčích jater však odpovídaly spíše hodnotám obsahu SPD a SPM v játrech prasat, tedy monogastrických živočichů. Otázka tak výrazných mezidruhových rozdílů obsahu polyaminů v játrech skotu a prasat zůstává stále nezodpovězena. Průměrný obsah SPD a SPM v kuřecích játrech byl 57,3 a 117 $mg.kg^{-1}$. V hovězí a vepřové krvi byl obsah PUT, SPD i SPM pod mezí detekce, krev tedy nepředstavuje významný podíl polyaminů v mase a játrech.

V játrech býků byly zjišťovány korelace mezi obsahy jednotlivých polyaminů a korelace obsahu SPD a SPM ve vztahu ke stáří, živé hmotnosti a typu užitkovosti býků. Byla zjištěna významná vzájemná negativní korelace mezi SPD a SPM u býků ($P < 0,001$) a významná negativní korelace obsahu SPD ve vztahu k věku býků ($P < 0,01$). Zjištěny byly i významné rozdíly v obsahu SPD mezi jednotlivými typy užitkovosti: mléčné – masné ($P < 0,05$) a masné – kombinované ($P < 0,1$). Průměrný obsah SPD v játrech mléčného, kombinovaného a masného typu užitkovosti byl 96,1; 106 a 188 $mg.kg^{-1}$. Masná plemena jsou šlechtěna pro rychlý růst mohutné svaloviny, což zřejmě souvisí s nejvyšším obsahem polyaminů v jejich mase oproti plemenům mléčným.

Syrové vepřové maso a játra byly skladovány chladírenským (při cca 2 °C) a mrazírenským (při cca -18 °C) způsobem. Při chladírenském způsobu byly zvoleny tři způsoby balení: volně v PE-sáčku (skladování po dobu 9 dní), v ochranné atmosféře (70 % N_2 a 30 % CO_2) a vakuované fólii (skladování po dobu 21 dní).

Při volném skladování jater po devíti dnech nebylo pozorováno zhoršení senzorických vlastností, nedošlo ani k nárůstu obsahu biogenních aminů. Během volného skladování došlo k významnému poklesu SPD na cca 75 % původní hodnoty ($P < 0,05$), zatímco pokles SPM ve volně skladovaných játrech byl nevýznamný. Při skladování jater v ochranné atmosféře a vakuované fólii došlo ke zhoršení senzorických vlastností a nárůstu obsahu PUT, CAD, HIM a TYM po 15. dni skladování. Pokles SPD a SPM byl významný v játrech skladovaných v OA i vakuu ($P < 0,05$) na cca 75 – 60 % výchozí hodnoty. V ochranné atmosféře játra po 21 dnech změnila barvu ve srovnání s játry vakuovanými.

Při chladírenském způsobu skladování vepřového masa byla sledována pouze dynamika obsahu SPM. Spermidin byl po celou dobu skladování pod mezí detekce. Během volného skladování v PE-sáčku, v ochranné atmosféře a vakuované fólii nedošlo k nárůstu obsahu biogenních aminů, přestože senzorické vlastnosti vakuovaného masa a masa skladovaného v OA byly už po 15. dni mírně zhoršené. Obsah SPM se během chladírenského skladování prakticky neměnil. Je tedy možné říci, že při skladování jater dochází k většímu poklesu polyaminů než při skladování masa, ale způsob balení na tento pokles nemá vliv.

Během skladování zmrazených vepřových jater po dobu 168 dnů při -18 °C došlo k poklesu obsahu SPD a SPM v sušině přibližně na 70 % výchozích hodnot. Naproti tomu obsah SPM ve zmrazené vepřové pečeni poněkud vzrostl, obsah SPD byl pod mezí detekce. Tyto změny jsou na hranici významnosti ($P < 0,05$).

Dalším faktorem, který ovlivňuje obsah polyaminů v mase a játrech jsou tepelné úpravy. Maso i játra byly tepelně upravovány jednak 24 hodiny po porážce, jednak po šestidenním skladování v chladničce. Pro vepřová játra byly zvoleny následující kuchyňské úpravy: vaření, dušení ve vlastní šťávě, dušení s přídavkem vody a restování. Při zvolených kuchyňských úpravách jater došlo k významnému poklesu ($P < 0,05$) polyaminů na 70 – 50 % původní hodnoty v syrovém vzorku. Obsahy obou polyaminů, SPD i SPM, klesaly stejnou měrou. Mezi jednotlivými kuchyňskými úpravami z hlediska obsahu SPD nebyl podstatný rozdíl, největší ztráty obsahu SPM představovalo restování čerstvých jater, zatímco restování skladovaných jater představovalo překvapivě nejnižší ztráty SPM.

Vepřová pečeně byla vařena, dušena ve vlastní šťávě, pečena, restována a smažena v trojobalu. Během těchto tepelných úprav došlo podobně jako při kuchyňských úpravách

jater k přibližně 50% poklesu SPM. SPD byl v čerstvém i tepelně upraveném mase pod mezí detekce. Mezi jednotlivými úpravami nebyl kromě pečení statistický rozdíl. Největší ztráty představuje pečení jak čerstvého, tak skladovaného masa ($P < 0,05$). Ve vývarech a vydušené šťávě masa i jater byl obsah polyaminů pod mezí detekce.

Z práce vyplynulo, že játra i maso patří mezi potraviny s nejvyššími obsahy SPM a SPD. Z hlediska využití výsledků pro řízenou výživu pacientů je problematické velké kolísání obsahů PA především v játrech. Nelze proto stanovit věrohodné „tabulkové hodnoty" obou polyaminů pro potřebu lékařů a dietologů.

Z hlediska dalšího výzkumu by bylo třeba zodpovědět některé otázky:

- příčinu obráceného poměru SPM a SPD v hovězích játrech ve srovnání s játry ostatních ověřovaných druhů hospodářských zvířat,
- jaký je mechanismus přeměn obou polyaminů během skladování a kuchyňských úprav – jaké vznikají produkty a jaká je jejich pravděpodobná biologická účinnost,
- zda dochází k obdobným ztrátám polyaminů během skladování a kuchyňských úprav i u dalších významných druhů masa a vnitřností.

7. Literatura

Bagni, N., Tassoni, A. (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plant. *Amino Acids, 20*, 301-317.

Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, 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*, 6504-6510.

Balamatsia, C.C., Paleologos, E.K., Kontominas, M.G., Savvaidis, I.N. (2006). Correlation between microbial flora, sensory changes and biogenic amines in fresh chicken meat stored aerobically or under modified atmosphere packaging at 4 °C: possible role of biogenic amines as spoilage indicators. *Antonie van Leeuvenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 89*, 9-17.

Bardócz S. (1993). The role of dietary polyamines. *European Journal of Clinical Nutrition, 47*, 683-690.

Bardócz, S., Duguid, T.J., Brown, D.S., Grant, G., Pusztai, A., White, A., Ralph, A. (1995). The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *British Journal of Nutrition, 73*, 819-828.

Bardócz, S., Grant, G., Brown, D.S., Ralph, A., Pusztai, A. (1993). Polyamines in food – implications for growth and health. *Journal of Nutritional Biochemistry, 4*, 66-71.

Bauer, F., Paulsen, P. (2001). Biogenic amines in meat and meat products. In Morgan, D.M.L., Milovic, V., Křížek, M., and White, A. (eds), COST Action 917: Biogenically active polyamines in food, Vol. V, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 88-94.

Bellé, N.A.V., Dalmolin, G.D., Fonini, G., Rubin, M.A., Rocha, J.B.T. (2004). Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. *Brain Research, 1008*, 245-251.

Bhattacharya, S., Sarkar, A., Frydman, B., Basu, H.S. (2004). Cytotoxicity of polyamine analogs is related to their DNA affinity as determined by polyacrylamide gel coelectrophoresis (pace) method. *Journal of Biological Systems 12*, 387-397.

Bover-Cid S., Miguelez-Arrizado M.J., Vidal-Carou M.C. (2001). Biogenic amine accumulation in ripened sausages affected by the addition of sodium sulphite. *Meat Science, 59*, 391-396.

Bover-Cid, S., Hernández-Jover, T., Miguélez-Arrizado, M.J., Vidal-Carou, M.C. (2003). Contribution of contaminant enterobacteria and lactic acid bacteria to biogenic amine accumulation in spontaneous fermentation of pork sausages. *Food Research and Technology, 216*, 477-482.

Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou, M.C. (2001b). Changes in biogenic amine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. *Meat Science, 57*, 215-221.

Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Mariné-Font, A. Carmen, M. (2005). Biogenic mono-, di- and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation. *Food Chemistry, 96*, 43-47.

Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. (2000). Influence of hygienic quality of raw materials on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages. *Journal of Food Protection, 63*, 1544-1550.

Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. (2001a). Effectiveness of *Lactobacillus sakei* culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality. *Journal of Food Protection, 64*, 367-373.

Bover-Cid, S., Shoppen, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. (1999). Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Science, 59*, 305-311.

Cirilo, M.P.G., Coelho, A.F.S., Araújo, C.M., Gonçalves, F.R.B., Nogueira, F.D., Glória, M.B.A. (2003). Profile and levels of bioactive amines in green and roasted coffee. *Food Chemistry, 82*, 397-402.

Dandrifosse, G., Peulen, O., El Khefif, N., Deloyer, P., Dandrifosse, A.C., Grandfils, C. (2000). Are milk polyamines preventive agents against food allergy ? *Proceedings of the Nutrition Society, 59*, 81-86.

Das, K.C., Misra, H.P. (2004). Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Molecular and Cellular Biochemistry, 262*, 127-133.

Deloyer, P., Peulen, O., Dandrifosse, G. (2001). Dietary polyamines and non-neoplastic growth and disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 13*, 1027-1032.

Dobiáš, J., Opatová, H. (2004). Možnosti balení v modifikované atmosféře při výrobě potravin. *Potravinářská Revue, 1*, č.2, 48-52.

Edwards, R.A., Dainty, R.H., Hibbard, C.M. (1983). The relationship of bacterial numbers and types to diamine concentration in fresh and aerobically stored beef, pork and lamb. *Journal of Food Technology, 18*, 777-788.

Eliassen, K.A., Reistad, R., Risøen, U., Rønning, H.F. (2002). Dietary polyamines. *Food Chemistry, 78*, 273-280.

Farriol, M., Segovia-Silvestre, T., Venero, Y., Orta, X. (2003). Antioxidant effectof polyamines on erythrocyte cell membrane lipoperoxidation after free-radical damage. *Phytotherapy Research, 17*, 44-47.

Font, M., Sanmartín, C., García, H., Contreras, S., Paeile, C., Bilbeny, N. (2005). A new polyamine derivative, a structural analog of spermine, with in vivo activity as an inhibitor of ethanol apetite. *Bioorganic and Medicinal Chemistry, 13*, 4375-4382.

Fujisawa, S., Kadoma, Y. (2005). Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer Research, 25*, 965-969.

Genaro, M.C., Gianotti, V., Marengo, E., Pattono, D., Turi, R.M. (2003). A chemometric investigation of the effects of the cheese-making process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). *Food Chemistry, 82*, 545-551.

Gugliucci, A. (2005). Alternative antiglycation mechanisms: are spermine and fructosamine-3-kinase part of a carbonyl damage control pathway? *Medical Hypotheses, 64*, 770-777.

Hagen, U., Bauer, F., Paulsen, P. (2005). Geringfügige Veränderungen von Amingehalten. Modellversuche zu Änderungen im Gehalt an biogenen Aminen und Polyaminen bei der Zubereitung von Fleisch und Fisch. *Fleischwirtschaft, 85*, č. 12, 128-130.

Halász, A., Barath, Á., Simon-Sarkadi, L. Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology, 5*, 42-49.

Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C. (1996). Biogenic amine sources in cooked cured shoulder pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44*, 3097-3101.

Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C. (1997). Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*, 2098-2102.

Hillary, R.A., Pegg, A.E. (2003). Decarboxylases involved in polyamine biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. *Biochimica et Biophysica Acta, 1647*, 161-166.

Hynd, M.R., Scott, H.L., Dodd, P.R. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International, 45*, 583-595.

Chen, C. M., Lin, L. C., Yen, G. C. (1994). Relationships between changes in biogenic amine contents and freshness of pork during storage at different temperatures. *Journal of Chinese Agricultural and Chemical Society, 32*, 47-60.

Kalač, P. (2006). Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: A review. *Meat Science, 73*, 1-11.

Kalač, P., Krausová, P. (2005). A rewiew of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry, 90*, 219-230.

Kalač, P., Křížek, M. (2003). A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the Institute of Brewing, 109(2)*, 123-128.

Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T., Langová, M.,Veškrna, O. (2005). Contents of polyamines in selected foods. *Food Chemistry, 90*, 561-564.

Kalač, P., Šavel, J., Křížek, M., Pelikánová, T., Prokopová, M. (2002). Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry, 79*, 431-434.

Krausová, P., Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T. (2006a). Content of polyamines in beef and pork after animal slaughtering. *European Food Research and Technology, 223*, 321-324.

Krausová, P., Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T. (2006b). Content of biologically active polyamines in livers of cattle, pigs and chickens after animal slaughter. *Meat Science, 73*, 640-644.

Křížek, M. Pelikánová, T. (1998). Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A, 815*, 243-250.

Křížek, M., Pavlíček, T., Vácha, F. (2002). Formation of selected biogenic amines in carp meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 82*, 1088-1093.

Křížek, M., Vácha, F.,Vorlová, L., Lukášová, J., Cupáková, Š. (2004). Biogenic amines in vacuum-packed and non-vacuum-packed flesh of carp (*Cyprinus carpio*)stored at different temperatures. *Food Chemistry, 88*, 185-191.

Lonvaud-Funel, A. (2001). Minireview. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters, 199*, 9-13.

Maijala, R.L., Eerola, S.H., Aho, M.A., Hirn, J.A. (1993). The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection, 56*, 125-129.

Mendes, R., Gonçalves, A., Nunes, M.L. (1999). Changes in free amino acids and biogenic amines during ripening of fresh and frozen sardine. *Journal of Food Biochemistry, 23*, 295-306.

Milovic, V. (2001). Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 13*, 1021-1025.

Milovic, V., Khomutov, A.R., Turchanowa, L., Khomutov, R.M., Caspary, W.F., Stein, J. (2001). Aminooxy analogues of natural polyamines are potent growth inhibitors in colon cancer cells. In *COST Action 917: Biogenically active polyamines in food*, eds.: Morgan, D.M.L., Milovic, V., Křížek, M., and White, A., Vol. V, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 37-40.

Min, J., Lee, S., Jang, A., Lee, M., Kim, Y. (2004). Production of biogenic amines by microflora inoculated in meats. *Animal Science, 17*, 1472-1478.

Mitchell, J.L.A. (2003). Regulation of polyamine metabolism. In *Health Implications of Dietary Amines,* eds. H. M. Wallace and A. Hughes, Vol. I, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 89-100.

Morgan, D.M.L. (2001). Polyamine oxidase and cancer - Some speculations on old data. In *COST Action 917: Biogenically active polyamines in food*, eds.: Morgan, D.M.L., Milovic, V., Křížek, M., and White, A., Vol. V, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 21-28.

Motyl, T., Płoszaj, T., Wojtasik, A., Kukulska, W., Podgurniak, M. (1995). Polyamines in cow's and sow's milk. *Comparative Biochemistry and Physiology B, 111*, 427-433.

Nishibori, Y., Fujihara, S., Akatuki, T. (2006). Amounts of polyamines in foods in Japan and intake by Japanese. *Food Chemistry, 100*, 491-497.

Nishimura, K., Shiina, R., Kashiwagi, K., Igarashi, K. (2006). Decrease in polyamines with ageing and their ingestion from food and drink. *Journal of Biochemistry, 139*, 81-90.

Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C. (2000). Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48,* 5117-5123.

Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M.T., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. (2003). Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Journal of Food Science, 68*, 750-755.

Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M.T., Trujillo-Mesa, A.J., Vidal-Carou, M.C. (2002). Profile of biogenic amines in goat cheese made from pasteurized and pressurized milks. *Journal of Food Science, 67*, 2940-2944.

Okamoto, A., Sugi, E., Koizumi, Y., Yanadiga, F., Udaka, S. (1997). Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61,* 1582-1584.

Paulsen, P., Hagen, U. Bauer, F. (2006). Changes in biogenic amine contents, non protein nitrogen and crude protein during curing and thermal processing of *m. longissimus, pars lumborum* of pork. *European Food Research and Technology,* DOI 10.1007/s00217-005-0240-6.

Peréz-Vincente, A., Martínez-Romero, D., Carbonell, A., Serano M., Riquelme, F., Guillén, F., Valero, D. (2002). Role of polyamines in extending shelf life and the reduction of mechanical damage during plum (*Prunus salicina* Lindl.) storage. *Postharvest Biology and Technology, 25*, 25-32.

Quemener, V., Blanchard, Y., Chamaillard, L., Havouis, R., Cipolla, B., Moulinoux, J.P. (1994). Polyamine deprivation – a new tool in cancer-treatment. *Anticancer Research, 14*, 443-448.

Ricciardolo, F.L.M., Zaagsma, J., Meurs, H. (2005). The therapeutic potential of drugs targeting the arginase pathway in asthma. *Expert Opinion on Investigational Drugs, 14*, 1221-1231.

Romain, N., Dandrifosse, G., Jeusette, F., Forget, P. (1992). Polyamine concentration in rat milk and food, human-milk, and infant formulas. *Pediatric Research, 32*, 58-63.

Romero, R., Sánchez-Viñas, M.,Gázquez, D., Bagur, M.G. (2002). Characterization of selected Spanish table vine samples according to their biogenic amine content from liquid chromatographic determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 4713-4717.

Ruiz-Capillas, C.,Jiménez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amine content in Spanish retail market meat products treated with protective atmosphere and high pressure. *European Food Research and Technology, 218,* 237-241.

Seiler N., Delcros J.G., Moulinoux J.P. (1996). Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int. J. Biochem. Cell Biology, 28*, 843-861.

Seiler, N. (2003a). Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. 1. Selective enzyme inhibitors. *Current Drug Targets, 4,* 537-564.

Seiler, N. (2003b). Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. 2. Structural analogues and derivatives. *Current Drug Targets, 4*, 565-585.

Seiler, N. (2004). How important is the oxidative degradation of spermine? Minireview article. *Amino Acids, 26*, 317-319.

Seiler, N., Raul, F. (2005). Polyamines and apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine, 9*, 623-642.

Shalaby, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International, 29*, 675-690.

Silva, C.M.G., Glória, M.B.A. (2002). Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 ± 1°C and in chicken-based meat products. *Food Chemistry, 78*, 241-248.

Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W.L., Halasz, A. (1994). Biogenic amine content and microbial contamination of leafy vegetables during storage at 5C. *Journal of Food Biochemistry, 17*, 407-418.

Slemr, J., Beyermann, K. (1985). Concentration profiles of diamines in fresh and aerobically stored pork and beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 33*, 336-339.

Slocum R.D., Flores H.E., Galston A.W., Weinstein L.H. (1989): Improved method for HPLC analysis of polyamines, agmatine and aromatic monoamines in plant tissues. *Plant Physiology*, 89: 512-517.

Stute, R., Petridis, K., Steinhart, H., Biernoth, G. (2002). Biogenic amines in fish and soy sauces. *European Food Research and Technology, 215*, 101-107.

Šiler, R., Kníže, B., Knížetová, H. (1980). Růst a produkce masa u hospodářských zvířat. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 280s.

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 Technology, 215*, 509-514.

Teti, D., Visalli, M., McNair, H. (2002). Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *Journal of Chromatography B, 781*, 107-149.

Thomas, T., Thomas, T.J. (2003). Polyamine metabolism and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine, 7*, 113-126.

Valero, D., Martínez-Romero, D., Serrano, M. (2002). The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. *Trends in Food Science and Technology, 13*, 228-234.

Veciana-Nogués, M.T., Bover-Cid, S., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C. (2004). Biogenic amine production by *Morganella morganii* and *Klebsiella oxytoca* in tuna. *European Food Research and Technology, 218*, 284-288.

Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C. (1997a). Changes in biogenic amines during the storage of Mediterranean anchovies immersed in oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*, 1385-1389.

Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C. (1997b). Biogenic amines in fresh and canned tuna. Effects of canning on biogenic amine contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*, 4324-4328.

Villanueva Valero, B., Bauer, F., Smulders, F.J.M., Ariño, A.,Hagen, U., Paulsen, P. (2005). Biogenic amines and polyamines and total aerobic count during storage of vacuum-packaged porcine kidney, liver and spleen. *Food Science and Technology International, 11*, 337-344.

Vinci, G., Antonelli, M.L. (2002). Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. *Food Control, 13*, 519-524.

Wallace, H.M., Hughes, A. and Thompson, K. (2001). The potential chemotherapeutic and chemopreventative benefits of modulating polyamine biosynthesis. In *COST Action 917: Biogenically active polyamines in food*, eds. Morgan, D.M.L., Milovic, V., Křížek, M., and White, A., Vol. V, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 29-36.

Weiss, T.S., Bernhardt G., Buschauer, A., Thasler W.E., Dolgner, D., Zirngibl, H., Jauch, K.W. (2002). Polyamine levels of human colorectal adenocarcinomas are correlated with tumor stage and grade. *International Journal of Colorectal Disease 17*, 381-387.

Weiss, T.S., Herfarth, H., Obermeier, F. et al. (2004). Intracellular polyamine levels of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases, 10*, 529-535.

Wolter, F., Turchanowa, L., Stein, J. (2003). Resveratrol-induced modification of polyamine metabolism is accompanied by induction of c-Fos. *Carcinogenesis 24*, 469-474.

Wolter, F., Ulrich, S., Stein, J. (2004). Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in colorectal cancer: Key role of polyamines? *Journal of Nutrition 134*, 3219-3222.

Yano, Y., Kataho, N., Watanabe, M., Nakamura, T., Asano, Y. (1995). Changes in the concentration of biogenic amines and application of tyramine sensor during storage of beef. *Food Chemistry, 54*, 155-159.

Yen, G-C. (1986). [Studies on biogenic amines in foods. I. Determination of biogenic amines in fermented soybean foods by HPLC]. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society, 24*, 211-227 (in Chinese).

8. Seznam publikovaných prací

Publikace týkající se disertační práce

a) vědecké práce

Kalač, P., **Krausová, P.** (2005). A rewiew of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry, 90*, 219-230. (IF 1,811)

Krausová, P., Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T. (2006a). Content of polyamines in beef and pork after animal slaughtering. *European Food Research and Technology, 223*, 321-324. (IF 1,173)

Krausová, P., Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T. (2006b). Content of biologically active polyamines in livers of cattle, pigs and chickens after animal slaughter. *Meat Science, 73*, 640-644. (IF 1,766)

b) postery na konferencích

Krausová, P. (2005). Biologicky aktivní polyaminy v hovězím a vepřovém mase a v játrech. *ChemZi 1/1,* 268-269. Zborník 57. zjazdu chemických spoločností, Vysoké Tatry.

Příloha I

Tab. PI/1
Průměrné obsahy polyaminů ($mg.kg^{-1}$) ve volně skladovaných játrech při 2 °C, **zvíře A**

Amin	Čas (dny)				
	0	1	2	5	9
Spermidin	24,3	20,8	20,1	20,5	21,9
Spermin	112	81,6	89,5	92,1	114

Tab. PI/2
Průměrné obsahy polyaminů ($mg.kg^{-1}$) ve volně skladovaných játrech při 2 °C, **zvíře B**

Amin	Čas (dny)				
	0	1	2	5	9
Spermidin	18,2	18,5	19,0	16,2	15,4
Spermin	71,6	68,9	72,4	60,3	67,6

Tab. PI/3
Průměrné obsahy polyaminů ($mg.kg^{-1}$) ve volně skladovaných játrech při 2 °C, **zvíře F**

Amin	Čas (dny)				
	0	1	2	5	9
Spermidin	29,0	23,8	27,3	24,9	21,0
Spermin	114	73,2	94,9	82,4	66,2

Tab. PI/4
Průměrné obsahy polyaminů ($mg.kg^{-1}$) ve volně skladovaných játrech při 2 °C, **zvíře J**

Amin	Čas (dny)				
	0	1	2	5	9
Spermidin	21,2	22,1	14,4	18,0	16,8
Spermin	81,0	109	51,0	81,6	60,1

Tab. PI/5
Průměrné obsahy biogenních aminů ($mg.kg^{-1}$) ve vakuovaných játrech skladovaných při 2 °C, **zvíře A**

Amin	Čas (dny)				
	0	5	9	15	21
Spermidin	24,3	20,4	20,0	17,6	13,1
Spermin	112	93,0	87,5	86,7	47,0
Putrescin	nd	nd	nd	11,7	12,4
Kadaverin	nd	nd	nd	nd	nd
Histamin	nd	nd	nd	nd	7,4
Tyramin	nd	nd	nd	5,6	18,5

Tab. PI/6
Průměrné obsahy biogenních aminů ($mg.kg^{-1}$) ve vakuovaných játrech skladovaných při 2 °C, **zvíře D**

Amin	Čas (dny)				
	0	5	9	15	21
Spermidin	42,3	24,6	32,2	21,6	18,5
Spermin	132	66,5	91,5	54,7	38,1
Putrescin	nd	nd	nd	3,2	17,0
Kadaverin	nd	nd	nd	nd	6,8
Histamin	nd	nd	nd	nd	2,6
Tyramin	nd	nd	nd	5,0	59,9

Tab. PI/7
Průměrné obsahy biogenních aminů ($mg.kg^{-1}$) ve vakuovaných játrech skladovaných při 2 °C, **zvíře G**

Amin	Čas (dny)				
	0	5	9	15	21
Spermidin	20,4	20,3	16,9	19,2	17,2
Spermin	87,8	82,1	62,9	69,1	74,6
Putrescin	nd	nd	nd	nd	nd
Kadaverin	nd	nd	nd	nd	3,2
Histamin	nd	nd	nd	nd	4,0
Tyramin	nd	nd	nd	15,0	68,5

Tab. PI/8
Průměrné obsahy biogenních aminů ($mg.kg^{-1}$) ve vakuovaných játrech skladovaných při 2 °C, **zvíře L**

Amin	Čas (dny)				
	0	5	9	15	21
Spermidin	15,5	15,6	15,6	15,1	13,0
Spermin	72,1	68,5	63,0	72,7	59,8
Putrescin	nd	nd	nd	2,3	35,1
Kadaverin	nd	nd	nd	3,4	73,8
Histamin	nd	nd	nd	3,0	18,9
Tyramin	nd	nd	nd	7,9	163,9

Tab. PI/9
Průměrné obsahy biogenních aminů (mg.kg^{-1}) v játrech skladovaných v OA při 2 °C, **zvíře A**

Amin	Čas (dny)				
	0	5	9	15	21
Spermidin	24,3	20,3	22,4	22,3	18,8
Spermin	112	95,6	107	109	83,7
Putrescin	nd	nd	nd	3,7	28,3
Kadaverin	nd	nd	nd	nd	2,5
Histamin	nd	nd	nd	nd	8,4
Tyramin	nd	nd	nd	1,5	23,0

Tab. PI/10
Průměrné obsahy biogenních aminů (mg.kg^{-1}) v játrech skladovaných v OA při 2 °C, **zvíře C**

Amin	Čas (dny)				
	0	5	9	15	21
Spermidin	28,6	17,8	21,7	15,5	16,1
Spermin	99,6	41,8	88,5	54,4	49,2
Putrescin	nd	nd	nd	8,0	36,6
Kadaverin	nd	nd	nd	nd	7,2
Histamin	nd	nd	nd	nd	4,6
Tyramin	nd	nd	nd	6,1	60,7

Tab. PI/11
Průměrné obsahy biogenních aminů (mg.kg^{-1}) v játrech skladovaných v OA při 2 °C, **zvíře H**

Amin	Čas (dny)				
	0	5	9	15	21
Spermidin	20,8	19,7	20,2	20,1	18,4
Spermin	80,0	61,8	66,9	73,4	72,0
Putrescin	nd	nd	nd	nd	nd
Kadaverin	nd	nd	nd	nd	nd
Histamin	nd	nd	nd	nd	nd
Tyramin	nd	nd	nd	4,5	66,8

Tab. PI/12
Průměrné obsahy biogenních aminů (mg.kg^{-1}) v játrech skladovaných v OA při 2 °C, **zvíře K**

Amin	Čas (dny)				
	0	5	9	15	21
Spermidin	19,6	17,8	17,9	16,3	15,9
Spermin	82,7	68,0	74,8	63,9	76,4
Putrescin	nd	nd	nd	4,5	9,5
Kadaverin	nd	nd	nd	nd	1,8
Histamin	nd	nd	nd	nd	5,5
Tyramin	nd	nd	nd	5,6	37,2

Tab. PI/13
Průměrné obsahy biogenních aminů ($mg.kg^{-1}$) v játrech mražených při -18 °C, **zvíře E**

Amin	Čas (dny)						
	0	14	28	56	84	112	168
Spermidin	26,6	22,6	19,8	22,2	16,6	13,6	15,4
Spermin	120	117	78,6	127	73,8	57,5	88,4
Putrescin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Kadaverin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Histamin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tyramin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tab. PI/14
Průměrné obsahy biogenních aminů ($mg.kg^{-1}$) v játrech mražených při -18 °C, **zvíře I**

Amin	Čas (dny)						
	0	14	28	56	84	112	168
Spermidin	20,6	21,6	20,1	18,8	19,9	18,0	19,4
Spermin	90,8	93,5	89,7	68,8	95,9	69,3	74,8
Putrescin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Kadaverin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Histamin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tyramin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tab. PI/15
Průměrné obsahy **SPM** ($mg.kg^{-1}$) v pečeni skladované při 2 °C, **zvíře IV.**

	Čas (dny)				
	0	1	2	5	9
Volně	20,3	22,4	20,5	20,0	19,9
	Čas (dny)				
	0	5	9	15	21
VAK	20,3	18,6	19,0	18,5	20,1
OA	20,3	19,4	20,6	18,3	21,1

Tab. PI/16
Průměrné obsahy **SPM** ($mg.kg^{-1}$) v pečeni skladované při 2 °C, **zvíře V.**

	Čas (dny)				
	0	1	2	5	9
Volně	21,2	20,7	20,7	19,8	18,6
	Čas (dny)				
	0	5	9	15	21
VAK	21,2	18,5	19,0	16,1	19,6
OA	21,2	19,7	19,0	17,9	21,7

Tab. PI/17
Průměrné obsahy **SPM** ($mg.kg^{-1}$) v pečeni skladované při 2 °C, **zvíře VI.**

	Čas (dny)				
	0	1	2	5	9
Volně	23,3	24,1	20,9	22,2	19,4
	Čas (dny)				
	0	5	9	15	21
VAK	23,3	21,2	20,5	17,8	19,6
OA	23,3	20,9	19,9	19,4	21,1

Tab. PI/18
Průměrné obsahy **SPM** ($mg.kg^{-1}$) ve zmrazené pečeni

	Čas (dny)						
	0	14	28	56	84	112	168
zvíře I.	25,2	22,7	21,3	25,6	27,3	22,1	29,1
zvíře II.	22,6	24,7	20,5	23,4	25,9	20,2	27,5
zvíře III.	25,3	20,9	20,0	26,5	26,4	23,2	27,0

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Food Chemistry 90 (2005) 219–230
Food Chemistry
www.elsevier.com/locate/foodchem

Review

A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods

Pavel Kalač *, Petra Krausová

Department of Chemistry, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

Received 9 December 2003; received in revised form 22 March 2004; accepted 22 March 2004

Abstract

The polyamines putrescine, spermidine and spermine commonly occur in the cells of living organisms where they fulfil an array of physiological roles. Their participation in human cell growth and proliferation has been of great interest for their role in tumour growth. However, polyamines could be useful for post-operation patients, during wound healing and for growth and development of neonate digestive system. Both endogenous and dietary polyamines participate in such processes. Data on polyamine contents in foods are limited and diffused in literature and dieticians have thus limited plausible information. This review briefly summarizes current knowledge on the biological implications of dietary polyamines for human health and collects the data on their formation and contents in manifold foods. While putrescine content increases by bacterial activity during inappropriate storage and processing of foods of animal origin, spermidine and spermine originate mainly from raw materials. Higher contents of spermidine as compared to spermine are typical for foods of plant origin, while an opposite relation is characteristic for foods of animal origin. The highest contents of all polyamines were determined in cheeses, mainly in ripened types. High putrescine levels were reported in citrus fruits and juices, sauerkraut, ketchup, fermented soybean products and fish sauce. Legumes, cauliflower and broccoli are foods with high spermidine content, while meat, meat products and legumes are high in spermine. Commonly, polyamine contents range widely within the individual food items. Extensive research is needed to extend the current limited database.
© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Polyamines; Putrescine; Spermidine; Spermine; Foods

Contents

1. Introduction 220
2. Polyamines formation and catabolism 220
3. Biological roles in man 221
   3.1. General 221
   3.2. Participation in tumour growth 221
   3.3. Effects on non-neoplastic intestinal growth 221
   3.4. Other effects 221
   3.5. Toxicity 221
4. Absorption of polyamines from intestinal lumen 221
5. Content of polyamines in foods 222
   5.1. General 222

* Corresponding author. Tel.: +420-38-777-2657; fax: +420-38-531-0405/420-38-530-0405.
E-mail address: kalac@zf.jcu.cz (P. Kalač).

0308-8146/$ - see front matter © 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.foodchem.2004.03.044

5.2. Polyamines in foods of plant origin 222
5.3. Polyamines in meat, fish and meat products 225
5.4. Polyamines in milk and milk products, human breast milk and eggs 227

Acknowledgements 229

References 229

1. Introduction

Putrescine (1,4-diaminobutane), spermidine (*N*-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane) and spermine (*N*,*N*′-bis-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane) (Fig. 1) form a group of polycationic amines referred to as physiological polyamines. Traditionally they have been classified within the group of biogenic amines. However, particularly due to their specific biological roles in eucaryotic cells they are now becoming set apart as a peculiar group. Among their biological roles, the participation in cell growth and proliferation has been of extraordinary interest, as polyamines, both formed endogenously and taken from diet, can be involved in tumour development. Medical and physiological research of polyamines has thus been very dynamic. However, data on the formation and content of dietary polyamines in foods have been relatively scarce and diffuse in the literature.

The aim of the article is to review briefly current knowledge on biological implications of dietary polyamines for human health and to collect data on polyamine formation and contents in foods.

2. Polyamines formation and catabolism

Polyamines are ubiquitous constituents occurring in microbial, plant and animal cells. Mammalian biosynthetic pathways were reviewed by Hillary and Pegg (2003). Their biosynthesis (Fig. 2) is very highly regulated by the activities of two key enzymes, ornithine decarboxylase (ODC) and *S*-adenosylmethionine decarboxylase (AdoMetDC) and polyamines are formed from methionine and arginine. The major pathway for putrescine formation in mammalian cells is via the activity of ornithine decarboxylase. Methionine provides the aminopropyl groups needed to convert putrescine into the higher polyamines. The synthesis is carried out by two aminopropyltransferase enzymes, spermidine synthase and spermine synthase.

Plants and many microorganisms can also produce putrescine via the activity of arginine decarboxylase (ADC). However, dietary arginine does not appear to be essential for the maintenance of the homeostasis of free polyamine levels in adult mice, which emphasises the importance of endogenous arginine synthesis in preserving the polyamine body pool (Teixeira, Santaolaria, Meneu, & Alonso, 2002).

In normal healthy cells, polyamine levels are intricately controlled by the biosynthetic and catabolic enzymes (Mitchell, 2003). The latter enzymes include spermidine/spermine acetyltransferase, flavin-containing polyamine oxidase (PAO), copper containing diamine oxidase (DAO), and possibly other amino oxidases.

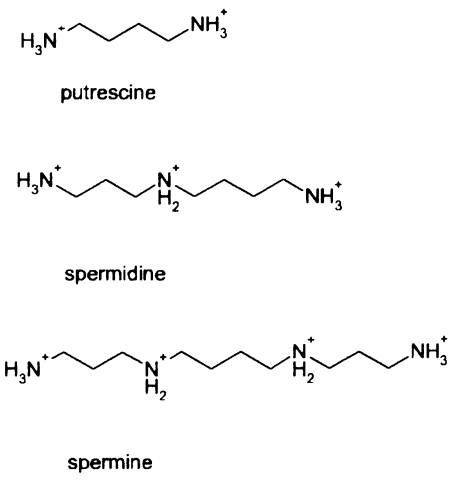


Fig. 1. Formulae of polyamines.

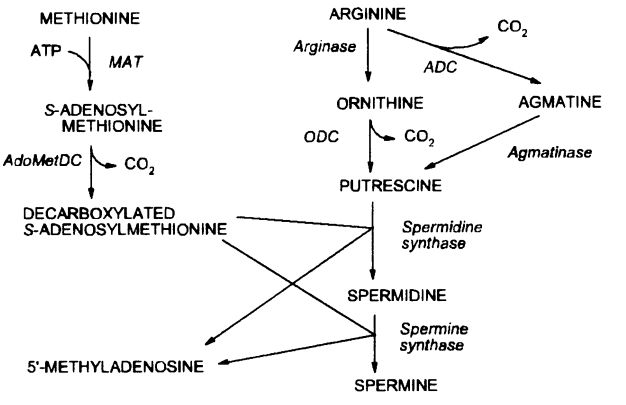


Fig. 2. Mammalian polyamine biosynthetic pathway (adapted from Hillary & Pegg, 2003). The pathway via agmatin, existing in plants, has been proposed also for mammals. The enzymes are written in italic (ADC, arginine decarboxylase; AdoMetDC, *S*-adenosylmethionine decarboxylase; MAT, methionine adenosyltransferase; ODC, ornithine decarboxylase).

iple abnormalities in the control of polyamine bolism and uptake might be responsible for in- ed levels of polyamines in cancer cells as compared at of normal cells (for review see Thomas & Tho- 2003).

ological roles in man

General

utrescine, spermine and spermidine are flexible cations, which exhibit under physiological condi- s 2, 3 or 4 positive charges, respectively. They fulfil irray of specific roles that make them essential for vth and cell proliferation. Moreover, polyamines interact with negatively charged structures of cells.

Participation in tumour growth

olyamines are ubiquitous cell components with ral intracellular targets including nucleic acids and nbrane constituents. Their metabolism is of much rest as they are required for cell growth and prolif- ion. High levels of polyamines are therefore ob- ed in rapidly divided cells and tissues such as tumour s. Drugs interfering with polyamine biosynthesis or r biological role thus have considerable potential as apeutic agents. Investigated chemopreventive or i-neoplastic agents include ornithine decarboxylase ibitors (Seiler, 2003a) and polyamine structural an- gues and derivatives (Seiler, 2003b). However, tu- ur cells have the ability to uptake extracellular yamines, both dietary and produced by gastrointes- il bacteria, and compensate effects of the mentioned rapeutic agents. Another approach thus started in the 0s – deprivation of exogenous polyamines (Quem- r et al., 1994). Polyamine deprivation, combining the ibition of polyamine synthesis in tumour cells and uction of the main exogenous sources including food l microflora-derived polyamines, has shown to be a mising therapeutic strategy. Stimulation of the anti- noural immune response is an additional effect of lyamine deprivation (Catros-Quemener, Chamaillard, Bouet, 1999). However, it has not yet been experi- ntally proved that altering of the dietary polyamine ake can help cancer patients.

The stimulation of putrescine uptake and metabolism enterocytes of tumour-bearing animals can be an aptation to compensate energy deficit caused by the mpetition with a tumour for nutrients (Desury, Mo- noux, & Delcros, 2002). Comprehensive data on re- ionships between polyamine metabolism and cancer re reviewed by Catros-Quemener et al. (1999), Teti, salli, and McNair (2002) and Thomas and Thomas 003).

3.3. Effects on non-neoplastic intestinal growth

As reviewed by Deloyer, Peulen, and Dandrifosse (2001), polyamines provided by food have a potential role in growth and development of the digestive system in neonatal mammals, and they also seem to be necessary for the maintenance of normal growth and general properties of the adult digestive tract. Dietary and luminal polyamines were observed to be the important local factors for growth and development of small intestinal and colonic mucosa in suckling rats (Löser, Eisel, Harms, & Folsch, 1999). In immature rats, spermidine and spermine are maturation factors that can reproduce the same increase in intestinal glycoprotein galactosylation that is normally observed during weaning (Greco et al., 2001). Maintenance of intestinal mucosal integrity requires polyamines, which regulate epithelial paracellular barrier function (Guo et al., 2003).

3.4. Other effects

Insufficient polyamine intake could play a role in the induction of sensitisation to dietary allergens as was observed both in suckling rats and in children. The probability of developing an allergy can reach 80% if the mean spermine content in milk is below 0.4 $mg\,l^{-1}$, and it is negligible if the mean spermine content is higher than 2.6 $mg\,l^{-1}$. Spermine increases proliferation and differentiation of lymphocytes isolated from childrens' tonsils (Dandrifosse et al., 2000). In an experiment with transgenic rats, insufficient hepatic pools of spermine and spermidine failed to initiate the regenerative process following partial hepatectomy (Rasanen et al., 2002). An increased intake of dietary polyamines seems to have a favourable potential for post-operation patients or during wound healing.

3.5. Toxicity

Oral acute and subacute toxicity of the individual polyamines was determined in Wistar rats. The acute toxicity was observed to be 2000, 600 and 600 $mg\,kg^{-1}$ body weight for putrescine, spermidine and spermine, respectively. The no-observed-adverse-effect level (NOAEL) was 180, 83 and 19 $mg\ kg^{-1}$ body weight for putrescine, spermidine and spermine, respectively (Til, Falke, Prinsen, & Willems, 1997). However, such extreme intakes of dietary amines cannot be supposed.

4. Absorption of polyamines from intestinal lumen

Bardócz et al. (1995) reported daily intake between 350 and 500 micromoles of polyamines in an adult from a typical British diet. Moreover, in the lumen of the upper

ıall bowel are also present polyamines originating from :estinal bacteria, sloughed cells and pancreatic, bile d intestinal secretions. Shortly after a meal, the ma- rity of luminal polyamines disappear from the duode- l and jejunal lumen by a mechanism of passive ffusion. The majority of luminal polyamines are de- aded in the gut before reaching systemic circulation.)lyamines are absorbed and distributed throughout the)dy, and then utilised for cellular growth in remote 'gans and tissues, including the gut, as reviewed by ilovic (2001). The most abundant polyamine in the ıall intestinal and colonic lumen, putrescine, is not only pidly taken up but also rapidly converted to meta-)lically active spermidine and spermine.

The gastrointestinal tract can represent a significant)urce of polyamines in the body. In a study by Bena- ıouzig, Mahe, Luengo, Rautureau, and Tome (1997), a)nsiderable amount of polyamines were observed in the ımen of human gut during the fasting state, suggesting ıdogenous secretion. Significantly higher contents were etermined in the jejunum than in the ileum, which ıggests proximal absorption. Full absorption of dietary olyamines from a yoghurt test meal was also observed.

. Content of polyamines in foods

.1. General

Although intake of dietary polyamines has been :nown for years as an important factor of health and lisease, data on polyamine contents in foods are limited ınd dispersed in the literature. Up to now, only a few)apers have dealt specifically with the topic (Bardócz, Grant, Brown, Ralph, & Pusztai, 1993; Bardócz et al., 1995; Okamoto, Sugi, Koizumi, Yanadiga, & Udaka, 1997; Hernández-Jover, Izquierdo-Pulido, Veciana-Nogués, Mariné-Font, & Vidal-Carou, 1997; Eliassen, Reistad, Risøen, & Rønning, 2002). In addition, the selection of foods was rather characteristic for the respective dietary habits in Scotland, Japan, Spain and Norway. Moreover, a part of the published data was based only on 2–3 samples of the individual food items. Very limited data have been available on the effects of food processing and storage on changes in polyamine contents. Thus, nutritionists have not yet the reliable information on which to base advice.

Polyamines exist in cells in both free and conjugated forms (Bagni & Tassoni, 2001). Growth responses have been postulated to depend on the level of free polyamines, while conjugate formation is a way for regulation of cellular pool of free polyamines. In the conjugates, polyamines are bound covalently to a partner molecule (e.g., plant phenolics or membrane phospholipids) and can be released by hydrolysis with a strong acid. Even in perchloric acid extracts of plant matrices, often prepared for polyamines isolation during analytical procedures, conjugates occur in both soluble and insoluble forms. Nevertheless, most of recently accessible data do not differentiate free and conjugated polyamines in foods of plant origin. Commonly, increased spermidine and spermine levels can be supposed in metabolically highly active tissues. High putrescine contents are usually connected with high activity of several groups of bacteria, mainly *Enterobacteriaceae* and *Clostridium* spp. (for a review see Shalaby, 1996).

5.2. Polyamines in foods of plant origin

Putrescine, spermine and spermidine universally occurring in plant organs are involved in a wide array of processes, ranging from triggering organogenesis to protecting against stress. Comprehensive information on different aspects of polyamine roles in plant physiology is available in recent reviews. Mechanisms of polyamine action implicated in plant response to environmental challenges were reviewed by Bouchereau, Aziz, Larher, and Martin-Tanguy (1999), in resistance to plant pathogens by Walters (2003a, 2003b) and in the improvement of the shelf life of fruit by Valero, Martínez-Romero, and Serrano (2002). Literature data on polyamine contents in potato, vegetables, fruits, cereals, legumes and beverages are collected in Tables 1–3.

Putrescine contents are commonly the highest among polyamines. Some of the tested foods have a considerably high mean putrescine level (above 40 $mg\,kg^{-1}$), namely oranges, orange juice, mandarins, grapefruit juice and the processed foods sauerkraut, ketchup, frozen green peas and fermented soy products. Spermidine contents in plant foods are commonly higher than spermine levels. Legumes, mainly soybean, pear, cauliflower and broccoli belong to food items with the highest spermidine content, usually above 30 $mg\,kg^{-1}$. The same foods, mainly legumes, also have the highest spermine level. Moreover, the increased content of polyamines were reported by Okamoto et al. (1997) and Yen (1986) for several Chinese and Japanese fermented soy products. Wide variations of polyamine contents within the individual foods are common. Such situations can be observed in Tables 1–3 in food items with a high number of samples. Similar fluctuation of polyamine contents is characteristic also in foods of animal origin. This complicates the applicability of the literature data by dieticians.

A proportion of polyamines leaches to cooking water. For putrescine, approximately 20–25% leaches from broccoli and celery and about 40% from cauliflower and asparagus. Similarly for spermidine, 10–20% leaches from broccoli, savoy and celery, and 20–30% from cauliflower and asparagus (Ziegler et al., 1994).

Simon-Sarkadi, Holzapfel, and Halasz (1994) observed changes in polyamines during the storage of fresh

able 1
ontent of polyamines (mg kg^{-1}) in potato, vegetables and fruits

Product	n	Putrescine				Spermidine				Spermine				References
		x	S_x	x_{min}	x_{max}	x	S_x	x_{min}	x_{max}	x	S_x	x_{min}	x_{max}	
Potato, fresh	3	9.7	–	–	–	11.2	–	–	–	3.0	–	–	–	Bardócz et al. (1993)
	3	17.6	–	–	–	13.5	–	–	–	ND	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
	6	9.7	2.1	5.8	12.8	11.3	1.7	8.3	13.6	2.6	1.2	0.8	4.0	Eliassen et al. (2002)
Cooked	3	21.6	–	–	–	15.2	–	–	–	5.2	–	–	–	Bardócz et al. (1993)
	4	3.9	–	ND	6.9	23.5	–	13.6	35	–	–	–	–	Ziegler, Hahn, and Wallnöfer (1994)
	4	8.5	2.3	5.6	12.4	10.9	2.2	9.1	15.7	2.2	1.2	ND	3.4	Eliassen et al. (2002)
Chips	4	21.6	–	–	–	24.8	–	–	–	2.6	–	–	–	Bardócz et al. (1995)
Potato crisps	3	–	–	38.4	41.9	–	–	35.2	39.9	–	–	4.2	5.1	Bardócz et al. (1995)
Vegetables														
Cauliflower, fresh	3	–	–	3.1	4.5	–	–	21.7	27.8	–	–	2.0	2.8	Bardócz et al. (1993)
	7	4.9	–	2.2	7.6	31.2	–	17.1	42.8	–	–	–	–	Ziegler et al. (1994)
	5	5.3	2.1	3.3	8.9	28.3	6.5	21.3	39.3	6.1	1.6	4.6	8.9	Eliassen et al. (2002)
Cooked	4	4.0	1.2	2.6	5.9	26.2	10.6	19.0	45.2	6.3	2.8	4.4	11.3	Eliassen et al. (2002)
Broccoli, fresh	4	9.0	–	7.0	10.5	33.2	–	31.8	36.0	–	–	–	–	Ziegler et al. (1994)
	5	6.4	2.9	3.4	10.8	41.3	9.1	24.5	51.8	9.9	3.2	5.8	15.9	Eliassen et al. (2002)
Cooked	4	5.6	2.9	2.5	8.9	27.3	6.4	17.3	33.1	7.1	1.4	5.3	8.9	Eliassen et al. (2002)
Cabbage	3	–	–	0.4	1.6	–	–	3.2	5.1	–	–	3.2	3.6	Bardócz et al. (1993)
	4	–	–	–	–	14.4	–	13.2	16.6	–	–	–	–	Ziegler et al. (1994)
Sauerkraut	121	146	99.0	2.8	529	8.2	6.6	ND	47.0	–	–	–	–	Kalač, Špička, Křížek, Steidlová, and Pelikánová (1999)
Savoy	4	–	–	–	–	11.6	–	10.6	13.0	–	–	–	–	Ziegler et al. (1994)
Spinach, frozen purée	32	12.9	–	ND	119	7.3	3.8	1.3	15.4	2.2	1.8	ND	3.8	Kalač, Švecová, and Pelikánová (2002)
Cucumber	3	3.2	–	–		1.5	–	–	–	0.4	–	–	–	Bardócz et al. (1993)
	5	6.9	1.4	5.5	8.7	7.4	1.6	5.4	10.3	1.2	0.8	ND	2.8	Eliassen et al. (2002)
Carrot	3	–	–	1.2	1.8	–	–	7.7	8.3	–	–	2.0	2.8	Bardócz et al. (1993)
	4	2.8	–	2.0	3.9	4.5	–	4.3	4.7	–	–	–	–	Ziegler et al. (1994)
	2	3.5	–	–	–	8.0	–	–	–	ND	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
	6	1.5	0.7	0.7	2.7	6.7	2.3	3.6	11.9	0.6	1.2	ND	3.8	Eliassen et al. (2002)
Tomato	3	–	–	9.3	122	–	–	1.6	2.5	ND	–	–	–	Bardócz et al. (1993)
	2	10.6	–	–	–	1.7	–	–	–	ND	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
Concentrated tomato pasta	19	25.9	8.2	7.9	41.1	8.4	3.7	ND	15.8	–	–	ND	2.9	Kalač et al. (2002)
Ketchup	24	52.5	54.1	ND	165	6.1	9.0	ND	33.4	–	–	ND	12.1	Kalač et al. (2002)
Onion	3	–	–	5.5	7.2	–	–	5.5	8.1	–	–	0.8	1.2	Bardócz et al. (1993)
Lettuce	3	–	–	3.3	4.8	–	–	4.2	8.3	ND	–	–	–	Bardócz et al. (1993)
	3	5.6	1.3	4.5	7.3	9.1	1.5	7.4	10.3	0.8	0.8	ND	1.8	Eliassen et al. (2002)
Celeriac	3	6.1	–	3.7	7.7	26.7	–	19.7	34.7	–	–	–	–	Ziegler et al. (1994)
Asparagus	3	2.9	–	2.0	3.8	10.3	–	9.2	10.9	–	–	–	–	Ziegler et al. (1994)
Fruits														
Apple	3	–	–	0.4	1.7	–	–	2.2	2.8	ND	–	–	–	Bardócz et al. (1993)
	2	ND	–	–	–	1.0	–	–	–	ND	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
Pears	3	–	–	23.6	24.2	–	–	30.2	76.0	–	–	8.1	49.3	Bardócz et al. (1993)
Orange	3	–	–	95.1	140	–	–	8.8	9.7	ND	–	–	–	Bardócz et al. (1993)
	2	117	–	–	–	1.9	–	–	–	1.6	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
	5	137	11.3	119	153	4.1	4.0	0.4	11.6	0.2	0.2	ND	1.4	Eliassen et al. (2002)
Orange, canned	3	–	–	27.0	30.0	–	–	0.7	1.0	ND	–	–	–	Bardócz et al. (1993)
Mandarin	10	122	44.2	67.3	200	2.3	1.3	ND	4.5	0.4	0.8	ND	3.0	Eliassen et al. (2002)

n, number of samples; x, mean value; S_x, standard deviation; ND, content below detection limit.

Chinese cabbage, endive, iceberg lettuce and radicchio at 5 °C over five days. Only the putrescine content increased 3–8-fold during this period, while spermidine and spermine levels did not change significantly.

An investigation of polyamine content changes during the ageing of red wine variety Merlot over 250 days showed an increase of putrescine content from 9 to 16 mg l^{-1} and a steady level of spermine 1.4 mg l^{-1}. No

Table 2
Content of polyamines (mg kg^{-1}) in cereals and legumes

Product	n	Putrescine				Spermidine				Spermine				References
		x	S_x	x_{min}	x_{max}	x	S_x	x_{min}	x_{max}	x	S_x	x_{min}	x_{max}	
Cereals														
Wheat flour	2	1.5	–	–	–	9.6	–	–	–	5.3	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
Bread, white	3	–	–	1.5	1.8	–	–	5.0	5.2	–	–	3.4	3.8	Bardócz et al. (1993)
Whole grain	3	–	–	0.5	0.9	–	–	21.3	27.4	–	–	7.1	9.1	Bardócz et al. (1993)
	5	3.4	0.5	2.5	4.0	13.1	1.5	10.2	14.8	6.3	2.0	3.4	8.7	Eliassen et al. (2002)
Pasta, cooked	3	–	–	1.0	1.1	–	–	7.0	7.3	–	–	10.5	12.9	Bardócz et al. (1993)
Breakfast cereals, mixed	10	–	–	2.0	2.2	–	–	24.1	24.4	–	–	6.1	6.7	Bardócz et al. (1995)
Rice, polished	2	<0.9	–	–	–	3.9	–	–	–	<4.1	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
Cooked	3	–	–	1.0	1.3	–	–	1.3	1.6	–	–	8.1	10.1	Bardócz et al. (1993)
Legumes														
Green peas, frozen	14	46.3	27.0	11.7	107	46.6	23.5	2.9	88.4	3.8	2.0	ND	8.5	Kalač et al. (2002)
Cooked	3	–	–	5.4	5.9	–	–	62.1	68.2	–	–	33.5	71.7	Bardócz et al. (1993)
Green beans, cooked	3	–	–	4.3	5.4	–	–	7.7	8.8	–	–	4.6	5.5	Bardócz et al. (1993)
Red kidney bean	3	–	–	0.3	0.4	–	–	19.0	20.0	–	–	22.8	25.7	Bardócz et al. (1993)
Soybean, dried	3	–	–	1.6	6.5	–	–	33.2	62.1	–	–	29.7	34.3	Bardócz et al. (1993)
	1	17.0	–	–	–	128	–	–	–	–	–	–	–	Ziegler et al. (1994)
	2	41	–	–	–	207	–	–	–	69	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
Soybean miso	11	51.1	40.7	9.8	143.1	–	–	–	–	–	–	–	–	Yen (1986)
	2	20.2	–	–	–	11.7	–	–	–	2.0	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
Soy sauce	22	88.1	129	ND	514	–	–	–	–	–	–	–	–	Yen (1986)
Koikuchi	2	47.5	–	–	–	14.5	–	–	–	<1.0	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
Different	23	–	–	ND	205	–	–	–	–	–	–	–	–	Stute, Petridis, Steinhart, and Biernoth (2002)

Table 3
Content of polyamines (mg l^{-1} or mg kg^{-1}) in beverages

Product	n	Putrescine				Spermidine				Spermine				References
		x	S_x	x_{min}	x_{max}	x	S_x	x_{min}	x_{max}	x	S_x	x_{min}	x_{max}	
Beer	Hundreds	~4	–	<0.3	30.7	~0.7	–	ND	6.8	~0.3	–	ND	3.9	Kalač and Křížek (2003)
Wine, red	8	11.6	14.7	1.9	49.0	0.7	0.4	ND	1.3	ND	–	–	–	Eliassen et al. (2002)
Red	6	9.6	5.6	–	–	ND	–	–	–	0.16	0.25	–	–	Romero, Sánchez-Viñas, Gázquez, and Bagur (2002)
Rosé	7	6.0	3.0	–	–	0.1	0.0	–	–	ND	–	–	–	Romero et al. (2002)
White	6	4.3	4.2	–	–	ND	–	–	–	ND	–	–	–	Romero et al. (2002)
Grapefruit juice	3	98.6	–	–	–	ND	–	–	–	ND	–	–	–	Bardócz et al. (1993)
Orange juice, w/pulp	3	85.0	11.4	76.6	100	2.5	0.9	1.9	3.8	ND	–	–	–	Eliassen et al. (2002)
Preserved	3	54.6	2.6	51.3	57.4	1.9	0.15	1.7	2.0	ND	–	–	–	Eliassen et al. (2002)
Tea, black leaves	3	–	–	14.4	16.1	–	–	36.5	39.7	–	–	57.8	60.0	Bardócz et al. (1995)
Infusion	3	ND	–	–	–	0.2	–	–	–	ND	–	–	–	Bardócz et al. (1995)
Black leaves	2	7.0	–	–	–	11.4	–	–	–	19.0	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
Oolong leaves	2	–	–	8.8	30.8	–	–	20.3	47.9	11.7	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
Coffee, green	?	10.3	1.0	9.1	16.3	6.0	0.7	5.1	6.8	4.4	0.8	4.2	7.3	Cirilo et al. (2003)
Granules	3	–	–	2.9	3.3	–	–	2.6	3.5	–	–	0.2	0.6	Bardócz et al. (1995)
Infusion	3	0.1	–	–	–	ND	–	–	–	ND	–	–	–	Bardócz et al. (1995)

rences were observed between ageing in barrels from erican oak or French oak (Moreno, Goñi, & Azpi-eta, 2003).

During the roasting of green coffee, the complete loss utrescine and spermine was observed and a consid-le decrease of spermidine content. Spermidine losses e higher under conditions of American roasting for 6 as compared with French roasting for 12 min (Ci- et al., 2003).

rradiation of Korean soybean paste prior to fer-itation suppressed significantly the formation of rescine and supported the decrease of spermidine tent, while spermine levels were unaffected as com-ed to an untreated control (Kim et al., 2003).

Polyamines in meat, fish and meat products

Literature data on polyamine contents in beef, pork l chicken meat and meat products and in fish are en in Table 4. In contrast to foods of plant origin, levels of putrescine are typical for well-treated foods animal origin. Fish sauces, cod roe and canned crab the reported exceptions. High spermine contents, ually between 20 and 60 mg kg^{-1}, are usual in meat l meat products of warm-blooded animals. Lower rmine contents, commonly below 10 mg kg^{-1}, were orted in fish. Spermidine levels in meat and fish rarely eed 10 mg kg^{-1}. Thus, an opposite relation between rmidine and spermine contents is typical for foods of mal origin as compared with plant products. Silva d Glória (2002) explain higher spermidine than rmine contents in their samples of chicken-based at products (see Table 4) by the incorporation of a nsiderable proportion of vegetable components.

The literature information on changes of polyamine ntents during meat storage is not unequivocal. Ed-rds, Dainty, and Hibbard (1983) observed an increase putrescine contents in intact beef, pork and lamb and minced beef stored at 5 °C, consistent with the total unt of viable aerobic bacteria. Contents of putrescine, ermidine and spermine increased significantly, some-hat increased and remained stable, respectively, in inced meat of non-specified origin incubated for seven ys at 20–22 °C. Addition of glucono-delta-lactone ppressed significantly the formation of putrescine Maijala, Eerola, Aho, & Hirn, 1993). Similar results ere reported by Yano et al. (1995), who observed a nsiderable increase of putrescine content over 13 days storage, while no changes in spermidine and spermine ntents during storage up to 39 days in vacuum-packed eef sirloin at 0, 5 or 10 °C. Vinci and Antonelli (2002) so reported an increase of putrescine levels in beef and icken meat stored at 4 °C for 36 days, while spermine ntent decreased in both beef and chicken meat. Ini-ally a low spermidine content increased in beef but ecreased in chicken meat. In minced and sliced pork meat stored at 6–8 °C for eight days the putrescine content increased quickly and significantly, spermidine content remained stable and spermine content decreased gradually (Hernández-Jover, Izquierdo-Pulido, Veciana-Nogués, Mariné-Font, & Vidal-Carou, 1996).

Suzzi and Gardini (2003) reviewed numerous articles dealing with the effects of multiple factors on the formation of biogenic amines in dry fermented sausages. Contents of putrescine, spermidine and spermine in this very variable group of meat products are usually in tens or hundreds, ones and tens of mg kg^{-1}, respectively. The most important change, as compared to meat, is a very high level of putrescine. In a classical work, Mietz and Karmas (1978) included polyamines as indicators of seafood decomposition. They observed that spermidine and spermine contents decreased during storage, while putrescine content increased. In recent years, similar changes were observed in Mediterranean hake. Putrescine content increased significantly during storage for 29 days, being more intensive at 6–8 °C than at 0 °C (in ice). Spermidine and spermine contents somewhat decreased from the initial levels 4 and 10 mg kg^{-1}, respectively (Baixas-Nogueras, Bover-Cid, Veciana-Nogués, & Vidal-Carou, 2002). Similarly, an extensive formation of putrescine and a slight decrease of spermidine content were determined in carp meat, while spermine content remained stable during storage at 3 or 15 °C until spoilage (Křížek, Pavlíček, & Vácha, 2002).

Veciana-Nogués et al. (1997b) reported a significant decrease of spermidine and spermine content during the canning process of tuna, while putrescine level remained stable. The same laboratory (Veciana-Nogués, Bover-Cid, Mariné-Font, & Vidal-Carou, 2004) observed insignificant changes of spermidine and spermine contents in tuna fish inoculated with *Morganella morganii* and *Klebsiella oxytoca* as compared with an aseptic control. The variants were stored in ice, under refrigeration and at room temperature. The potential ability of *M. morganii* to form putrescine was not shown in the inoculated samples, regardless of the storage temperature.

Putrescine and spermidine contents increased considerably to about 20 mg kg^{-1} during the initial stage of fresh nobbed sardines maturation and the matured fish were stable at 22–24 °C until day 240 of storage. Changes of both polyamines were limited during maturation of fresh gutted and of both frozen nobbed and gutted fish (Mendes, Gonçalves, & Nunes, 1999). Anchovy immersed in oil is a semi-preserved fish product prepared without heating. Putrescine content was stable during anchovy storage at 8–10 °C or at 20 ± 1 °C for nine months, whereas spermidine and spermine contents changed differently in three different tested commercial brands (Veciana-Nogués et al., 1997a). Nevertheless, the changes seem to be unimportant from the nutritional point of view.

Table 4
Content of polyamines (mg kg^{-1}) in beef, pork and chicken meat, meat products and in fish and fish products

Product	n	Putrescine				Spermidine				Spermine				Reference
		x	S_x	x_{min}	x_{max}	x	S_x	x_{min}	x_{max}	x	S_x	x_{min}	x_{max}	
Beef														
Raw, lean	3	–	–	5.5	5.9	–	–	18.3	19.7	–	–	30.7	42.0	Bardócz et al. (1993)
	2	0.5	–	–	–	2.6	–	–	–	28.3	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
	6	–	–	–	–	3.1	0.8	1.9	4.2	39.8	5.8	28.7	44.6	Hernández-Jover et al. (1997)
	5	10.1	14.3	0.8	38.5	5.5	3.2	2.6	12.0	27.3	4.4	16.8	26.0	Eliassen et al. (2002)
Ground	3	8.8	–	–	–	–	–	70.6	72.9	–	–	46.3	47.5	Bardócz et al. (1993)
	8	4.0	5.7	0.8	18.7	3.0	0.7	2.2	4.8	20.8	3.6	13.3	26.7	Eliassen et al. (2002)
Cooked	3	–	–	1.9	2.8	–	–	5.7	6.8	–	–	22.8	33.3	Bardócz et al. (1993)
Fried	2	–	–	1.4	30.2	–	–	2.6	5.7	–	–	26.1	36.2	Eliassen et al. (2002)
Sirloin, raw	6	–	–	–	–	1.5	–	–	–	30	–	–	–	Yano, Kataho, Watanabe, Nakamura, and Asano (1995)
	7	2.1	3.2	0.6	12.8	2.2	0.6	1.0	3.0	17.0	6.7	6.1	29.1	Eliassen et al. (2002)
Pork														
Raw, lean	3	3.1	–	–	–	–	–	2.9	4.9	–	–	30.1	70.3	Bardócz et al. (1993)
	2	1.1	–	–	–	4.6	–	–	–	28.3	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
	13	–	–	–	–	3.0	1.0	0.8	4.5	33.5	4.4	27.3	40.6	Hernández-Jover et al. (1997)
Chops, raw	5	0.2	0.3	ND	0.7	2.8	0.7	2.0	4.1	22.4	7.5	14.5	34.5	Eliassen et al. (2002)
Meat products														
Sausage	3	–	–	13.8	14.5	–	–	5.8	6.4	–	–	24.0	25.9	Bardócz et al. (1993)
Sausage, wiener	5	0.9	0.3	0.4	1.1	2.3	0.7	1.2	3.5	9.9	2.0	5.0	12.5	Eliassen et al. (2002)
Mortadella (cooked salami)	20	–	–	ND	5.7	4.0	2.3	1.0	8.9	17.2	7.5	7.6	32.2	Hernández-Jover et al. (1997)
Pork ham, smoked	3	–	–	4.0	4.3	–	–	2.0	8.8	–	–	40.2	50.3	Bardócz et al. (1993)
Roasted	3	9.0	–	–	–	6.1	–	–	–	–	–	40.2	60.4	Bardócz et al. (1993)
Cooked	20	–	–	ND	12.4	2.1	0.6	1.4	3.5	21.4	8.4	6.4	35.7	Hernández-Jover et al. (1997)
Dry-cured	23	–	–	ND	17.4	5.6	0.9	4.4	7.3	35.7	8.2	24.9	62.1	Hernández-Jover et al. (1997)
Ripened dry fermented Spanish sausage "chorizo"	20	–	–	2.6	416	4.1	2.5	1.9	10.0	26.1	8.1	13.8	43.5	Hernández-Jover et al. (1997)
	3	–	–	0.8	185	–	–	6.7	8.2	–	–	39.1	58.8	Ruiz-Capillas and Jiménez-Colmenero (2004)
Different Spanish meat products	17	–	–	0.2	10	–	–	1.7	7.6	–	–	17.8	59.3	Ruiz-Capillas and Jiménez-Colmenero (2004)
Game (stored at 4 °C for 7 days)														
Roe deer	3	19.3	17.4	–	–	14.7	2.9	–	–	54.3	7.4	–	–	Dičáková et al. (2003)
Red deer	3	9.0	7.6	–	–	17.0	7.0	–	–	59.3	2.3	–	–	Dičáková et al. (2003)
Fallow deer	3	38.0	17.8	–	–	14.7	2.7	–	–	60.7	0.7	–	–	Dičáková et al. (2003)
Pheasant	3	ND	–	–	–	21.0	1.0	–	–	83.0	6.9	–	–	Dičáková et al. (2003)
Chicken														
Raw	3	2.9	–	–	–	9.3	–	–	–	59.2	–	–	–	Bardócz et al. (1993)
	2	<0.4	–	–	–	2.9	–	–	–	62.6	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
Grilled	5	2.0	0.5	1.3	2.7	17.3	3.9	13.2	25.7	44.4	6.1	33.7	53.1	Eliassen et al. (2002)
Chicken breast, raw	4	<0.8	–	–	–	7.3	0.8	–	–	17.9	1.3	–	–	Silva and Glória (2002)
Chicken thigh, raw	4	<0.8	–	–	–	7.2	1.8	–	–	16.2	0.9	–	–	Silva and Glória (2002)
Chicken based frankfurter	10	0.6	–	ND	1.4	15.8	–	11.9	26.6	10.8	–	6.0	17.1	Silva and Glória (2002)
Mortadella	10	2.6	–	ND	19.2	10.8	–	4.9	24.3	10.1	–	6.4	15.9	Silva and Glória (2002)
Hamburger	10	0.6	–	ND	1.9	12.6	–	4.2	24.4	9.2	–	4.5	15.6	Silva and Glória (2002)

le 4 (*continued*)

roduct	*n*	Putrescine				Spermidine				Spermine				Reference
		x	S_x	x_{min}	x_{max}	x	S_x	x_{min}	x_{max}	x	S_x	x_{min}	x_{max}	
/arious poultry meat based products	51	–	–	ND	6.2	–	–	ND	8.9	–	–	–	–	Dičáková, Sokol, Cabadaj, and Bystrický (1999)
Fish														
Cod, raw	3	–	–	26.4	29.7	–	–	1.0	1.6	–	–	3.0	6.5	Bardócz et al. (1993)
	9	1.4	0.9	0.5	3.1	0.6	0.9	ND	3.8	0.6	0.8	ND	2.2	Eliassen et al. (2002)
Salted	5	4.9	3.0	2.1	9.6	1.5	1.0	ND	2.5	2.6	1.6	ND	3.8	Eliassen et al. (2002)
Cod roe	6	90.9	17.8	79.3	129	13.6	4.2	7.8	18.8	20.0	6.5	9.9	26.9	Eliassen et al. (2002)
Salmon, raw	9	2.7	1.0	1.6	4.6	1.5	0.7	0.4	3.3	0.8	0.8	ND	3.2	Eliassen et al. (2002)
Mackerel, raw	7	2.4	0.7	1.3	3.5	2.9	0.9	1.6	4.1	3.0	2.4	ND	7.7	Eliassen et al. (2002)
n tomato, canned	5	7.4	2.1	3.9	9.7	3.0	1.2	1.4	4.4	1.4	1.4	ND	4.2	Eliassen et al. (2002)
Tuna, fresh	20	–	–	ND	4.8	–	–	1.2	11.7	–	–	7.3	37.0	Veciana-Nogués, Mariné-Font, and Vidal-Carou (1997b)
Canned	38	–	–	ND	2.2	–	–	1.5	10.0	–	–	2.2	35.2	Veciana-Nogués et al. (1997b)
	10	5.6	7.1	1.3	25.4	5.4	1.6	1.9	8.0	7.9	1.6	5.3	10.3	Eliassen et al. (2002)
Anchovies, immersed in oil	3	5.0	–	2.3	7.6	2.2	–	2.1	2.3	7.7	–	7.5	7.9	Veciana-Nogués, Mariné-Font, and Vidal-Carou (1997a)
Crab, canned	2	–	–	110	134	–	–	1.2	1.5	–	–	2.0	2.2	Eliassen et al. (2002)
Trout	3	–	–	1.8	1.9	–	–	3.9	4.2	–	–	8.7	9.1	Bardócz et al. (1993)
Fish sauces (mg kg^{-1} dry matter)	45	–	–	ND	1260	–	–	–	–	–	–	–	–	Stute et al. (2002)

4. *Polyamines in milk and milk products, human breast ilk and eggs*

Polyamine contents in further foods of animal origin nd in human milk are given in Table 5. Levels of all olyamines are very low in cow milk, yoghurt, human ilk and hen eggs. However, contents of all polyamines an reach an extremely high level in cheeses, mainly in atured types. Motyl et al. (1995) observed large mul-factorial variations in cow milk spermidine and permine contents: cow to cow, lactation phase related, nd milk yield dependent variability. The highest con-nts of both amines were in colostrum. Contents of oth spermidine and spermine increased during the ctic acid fermentation of milk inoculated with *Lacto-occus lactis* starter cultures. The addition of rennet romoted spermidine and putrescine formation, while he addition of 0.5 g l^{-1} common salt slowed the rate of ormation of both all polyamines and biogenic amines. Temperature should be below 20 °C during the process Santos et al., 2003).

In a survey of 100 samples of a non-matured cheese nd four types of matured Spanish cheeses (Table 5), Novella-Rodríguez et al. (2003) found out that poly-mine contents decreased in order putrescine ≫ sper-midine > spermine, varying among different types of ipened cheeses and also within the same type of cheese. In a study trying to identify conditions of cheese-making that minimised contents of the four main biogenic amines, including putrescine, the effects of three factors were tested: using raw or pasteurised milk, thermophilic or mesophilic starter bacteria and unheated or heated curd. The best conditions seemed to be the use of pasteurised milk, mesophilic starters and heated curd (Genaro, Gianotti, Marengo, Pattono, & Turi, 2003). However, optimum conditions were different for the individual amines and spermidine and spermine contents were not determined.

Novella-Rodríguez, Veciana-Nogués, Trujillo-Mesa, and Vidal-Carou (2002) compared the effects of high-pressure treatment and of pasteurisation of goat milk on formation of biogenic amines and polyamines in cheese during 45 days of maturation. Pressure treatment can cause higher proteolysis than pasteurisation, leading to a higher release of free amino acids as the precursors the amine formation. The effect of pressure treatment proved to be minimal, differences between the amine contents in the both variants were low.

The literature dealing with polyamine contents in human milk was reviewed by Löser (2000). Content of polyamines varies during the suckling period. During the first week postpartum, putrescine levels remained very low, while spermidine and spermine contents rose markedly during the initial three days, reaching plateau

Table 5
Content of polyamines (mg l^{-1} or mg kg^{-1}) in milk, milk products, human breast milk and eggs

Product	n	Putrescine				Spermidine				Spermine				References
		x	S_x	x_{min}	x_{max}	x	S_x	x_{min}	x_{max}	x	S_x	x_{min}	x_{max}	
Cow milk														
Full cream	3	0.09	–	–	–	–	–	0.15	0.45	–	–	0.2	0.6	Bardócz et al. (1993)
Semi-skimmed	3	–	–	0.09	0.18	–	–	0.3	0.6	–	–	0.2	0.4	Bardócz et al. (1993)
Full cream	5	–	–	–	–	–	–	0.25	0.85	–	–	0.4	1.6	Motyl, Płoszaj, Wojtasik, Kukulska, and Podgurniak (1995)
Unspecified	5	ND	–	–	–	0.17	–	0.16	0.18	ND	–	–	–	Novella-Rodríguez, Veciana-Nogués, and Vidal-Carou (2000)
Reconstituted powdered	4	–	–	–	–	0.75	–	–	–	0.2	–	–	–	Santos, Souza, Cerqueira, and Glória (2003)
Yoghurt,plain														
	5	ND	–	–	–	–	–	ND	0.43	–	–	ND	0.34	Novella-Rodríguez et al. (2000)
	5	0.3	0.4	0	0.9	0.7	0.6	0	1.3	0.8	1.0	0	2.2	Eliassen et al. (2002)
Cheeses														
Cheddar, fresh	3	–	–	10.1	20.0	–	–	80.8	109	–	–	23.8	39.2	Bardócz et al. (1993)
Cheddar, matured	3	653	–	–	–	–	–	197	202	–	–	23.2	40.0	Bardócz et al. (1993)
Camembert	2	ND	–	–	–	<1.5	–	–	–	ND	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
Gouda	2	ND	–	–	–	ND	–	–	–	ND	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
Blue, Japanese	2	6.7	–	–	–	20.3	–	–	–	ND	–	–	–	Okamoto et al. (1997)
Blue, Norwegian	3	16.4	2.7	12.6	20.2	23.8	4.1	20.2	29.3	0.4	0.8	0	2.0	Eliassen et al. (2002)
Unripened, Spanish	10	–	–	ND	1.4	–	–	0.39	0.82	–	–	ND	1.12	Novella-Rodríguez et al. (2000)
Ripened, Spanish	10	–	–	ND	612	–	–	ND	43.0	–	–	ND	18.7	Novella-Rodríguez et al. (2000)
Unripened, Spanish	20	–	–	ND	3.1	–	–	ND	0.8	–	–	ND	1.1	Novella-Rodríguez, Veciana-Nogués, Izquierdo-Pulido, and Vidal-Carou (2003)
Hard-ripened from raw milk, Spanish	20	–	–	ND	670	–	–	ND	39.6	–	–	ND	21.5	Novella-Rodríguez et al. (2003)
Hard-ripened from pasteurised milk, Spanish	20	–	–	ND	612	–	–	ND	43.0	–	–	ND	18.7	Novella-Rodríguez et al. (2003)
Blue, Spanish	20	–	–	3.0	257	–	–	ND	71.6	–	–	ND	18.9	Novella-Rodríguez et al. (2003)
Goat, Spanish	20	–	–	ND	192	–	–	ND	14.5	–	–	ND	3.6	Novella-Rodríguez et al. (2003)
Human breast milk														
		0.02	–	–	–	0.32	0.09	–	–	0.63	0.03	–	–	Buts, De Keyser, De Deraemaeker, Collette, and Sokal (1995)
Eggs, boiled														
	3	–	–	0.26	0.35	–	–	0	0.15	–	–	0.2	0.6	Bardócz et al. (1995)
	2	<0.4	–	–	–	<1.4	–	–	–	<1.1	–	–	–	Okamoto et al. (1997)

levels that were 12 and 8 times higher, respectively, than the values determined on the initial day of lactation. The mean values are given in Table 5 (Buts et al., 1995). After four months of lactation, putrescine content slightly increased, whereas spermine and spermidine contents remained almost stable (Romain, Dandrifosse, Jeusette, & Forget, 1992). Mothers seem consistently to have relatively high or relatively low contents of spermidine and spermine in their milk. These individual variations may be due to diet, lifestyle or genetic background (Dandrifosse et al., 2000). Spermidine and spermine contents in infant powdered formulas were observed to be consid-

/ lower than values usual in breast milk (Buts et al., Romain et al., 1992). Polyamine contents in boiled were found to be very low, however, only values of amples were reported (Table 5).

owledgements

ıe authors acknowledge financial support of the ct 525/02/1077 of the Grant Agency of the Czech ıblic and of the project COST 922 of the European mission and thank Mr. Chris Ash for language ction of the manuscript.

rences

, N., & Tassoni, A. (2001). Biosynthesis, oxidation and conjution of aliphatic polyamines in higher plant. *Amino Acids, 20*, 1–317.

s-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, T., & Vidal-ırou, M. C. (2002). Chemical and sensory changes in Mediterraan hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6–8 °C) and ɔred in ice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 6504–10.

ɔcz, S., Grant, G., Brown, D. S., Ralph, A., & Pusztai, A. (1993). ɔlyamines in food – implications for growth and health. *Journal Nutritional Biochemistry, 4*, 66–71.

ɔcz, S., Duguid, T. J., Brown, D. S., Grant, G., Pusztai, A., 'hite, A., & Ralph, A. (1995). The importance of dietary ɔlyamines in cell regeneration and growth. *British Journal of utrition, 73*, 819–828.

mouzig, R., Mahe, S., Luengo, C., Rautureau, J., & Tome, D. 997). Fasting and postprandial polyamine concentrations in the uman digestive lumen. *American Journal of Clinical Nutrition, 65*, 56–770.

hereau, A., Aziz, A., Larher, F., & Martin-Tanguy, J. (1999). olyamines and environmental challenges: Recent development. *lant Science, 140*, 103–125.

J. P., De Keyser, N., De Deraemaeker, L., Collette, E., & Sokal, . M. (1995). Polyamine profiles in human-milk, infant artificial ɔrmulas, and semielemental diets. *Journal of Pediatric Gastroenɛrology and Nutrition, 21*, 44–49.

os-Quemener, V., Chamaillard, L., & Bouet, F. (1999). Les ɔlyamines: Rôle diagnostique et cible thérapeutique en cancérolɡie. *M/S – Médecine/Sciences, 15*, 1078–1085 (in French).

o, M. P. G., Coelho, A. F. S., Araújo, C. M., Gonçalves, F. R. B., Nogueira, F. D., & Glória, M. B. A. (2003). Profile and levels of ɔioactive amines in green and roasted coffee. *Food Chemistry, 82*, 97–402.

drifosse, G., Peulen, O., El Khefif, N., Deloyer, P., Dandrifosse, ۱. C., & Grandfils, C. (2000). Are milk polyamines preventive ıgents against food allergy? *Proceedings of the Nutrition Society, 59*, 81–86.

ɔyer, P., Peulen, O., & Dandrifosse, G. (2001). Dietary polyamines ınd non-neoplastic growth and disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 13*, 1027–1032.

ury, G., Moulinoux, J. P., & Delcros, J. G. (2002). Alteration of intestinal putrescine uptake in tumour-bearing rats. *International Journal of Oncology, 21*, 569–576.

áková, Z., Paulsen, P., Bystrický, P., Sokol, J., & Laczkóová, S. (2003). Determination of biogenic amines and free amino acids in game meat during storage. In P. Bystrický, J. Nagy, & D. Máté (Eds.), *Hygiena Alimentorum* (XXIV, pp. 97–99). Slovakia: Štrbské Pleso.

Dičáková, Z., Sokol, J., Cabadaj, R., & Bystrický, P. (1999). The levels of biogenic amines in poultry meat products. *Folia Veterinaria, 43*, 121–124.

Edwards, R. A., Dainty, R. H., & Hibbard, C. M. (1983). The relationship of bacterial numbers and types to diamine concentration in fresh and aerobically stored beef, pork and lamb. *Journal of Food Technology, 18*, 777–788.

Eliassen, K. A., Reistad, R., Risøen, U., & Rønning, H. F. (2002). Dietary polyamines. *Food Chemistry, 78*, 273–280.

Genaro, M. C., Gianotti, V., Marengo, E., Pattono, D., & Turi, R. M. (2003). A chemometric investigation of the effects of the cheesemaking process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). *Food Chemistry, 82*, 545–551.

Greco, S., Niepceron, E., Hugueny, I., George, P., Louisot, P., & Biol, M. C. (2001). Dietary spermidine and spermine participate in the maturation of galactosyltransferase activity and glycoprotein galactosylation in rat small intestine. *Journal of Nutrition, 131*, 1890–1897.

Guo, X., Rao, J. N., Liu, L., Zou, T. T., Turner, D. J., Bass, B. L., & Wang, J. Y. (2003). Regulation of adherens junctions and epithelial paracellular permeability: A novel function for polyamines. *American Journal of Physiology – Cell Physiology, 285*, C1174–C1187.

Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A., & Vidal-Carou, M. C. (1996). Biogenic amine sources in cooked cured shoulder pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44*, 3097–3101.

Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A., & Vidal-Carou, M. C. (1997). Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*, 2098–2102.

Hillary, R. A., & Pegg, A. E. (2003). Decarboxylases involved in polyamine biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. *Biochimica et Biophysica Acta, 1647*, 161–166.

Kalač, P., & Křížek, M. (2003). A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the Institute of Brewing, 109*, 123–128.

Kalač, P., Špička, J., Křížek, M., Steidlová, Š., & Pelikánová, T. (1999). Concentrations of seven biogenic amines in sauerkraut. *Food Chemistry, 67*, 275–280.

Kalač, P., Švecová, S., & Pelikánová, T. (2002). Levels of biogenic amines in typical vegetable products. *Food Chemistry, 77*, 349–351.

Kim, J. H., Ahn, H.-J., Kim, D.-H., Jo, C., Yook, H.-S., Park, H.-J., & Byun, M.-W. (2003). Irradiation effects on biogenic amines in Korean fermented soybean paste during fermentation. *Journal of Food Science, 68*, 80–84.

Křížek, M., Pavlíček, T., & Vácha, F. (2002). Formation of selected biogenic amines in carp meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 82*, 1088–1093.

Löser, C. (2000). Polyamines in human and animal milk. *British Journal of Nutrition, 84*, S55–S58.

Löser, C., Eisel, A., Harms, D., & Folsch, U. R. (1999). Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut, 44*, 12–16.

Maijala, R. L., Eerola, S. H., Aho, M. A., & Hirn, J. A. (1993). The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection, 56*, 125–129.

Mendes, R., Gonçalves, A., & Nunes, M. L. (1999). Changes in free amino acids and biogenic amines during ripening of fresh and frozen sardine. *Journal of Food Biochemistry, 23*, 295–306.

Mietz, J. L., & Karmas, E. (1978). Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition. *Journal of AOAC International, 61*, 139–145.

Milovic, V. (2001). Polyamines in the gut lumen: Bioavailability and biodistribution. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 13*, 1021–1025.

chell, J. L. A. (2003). Regulation of polyamine metabolism. In H. M. Wallace & A. Hughes (Eds.), *Health implications of dietary amines* (Vol. I, pp. 89–100). Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.

reno, N. J., Goñi, D. T., & Azpilicueta, C. A. (2003). Changes in amine concentrations during aging of red wine in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*, 5732–5737.

tyl, T., Płoszaj, T., Wojtasik, A., Kukulska, W., & Podgurniak, M. (1995). Polyamines in cow's and sow's milk. *Comparative Biochemistry and Physiology B, 111*, 427–433.

vella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2000). Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*, 5117–5123.

vella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., Trujillo-Mesa, A. J., & Vidal-Carou, M. C. (2002). Profile of biogenic amines in goat cheese made from pasteurized and pressurized milks. *Journal of Food Science, 67*, 2940–2944.

vella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M. C. (2003). Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Journal of Food Science, 68*, 750–755.

amoto, A., Sugi, E., Koizumi, Y., Yanadiga, F., & Udaka, S. (1997). Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61*, 1582–1584.

iemener, V., Blanchard, Y., Chamaillard, L., Havouis, R., Cipolla, B., & Moulinoux, J. P. (1994). Polyamine deprivation – a new tool in cancer-treatment. *Anticancer Research, 14*, 443–448.

isanen, T. L., Alhonen, L., Sinevirta, R., Keinanen, T., Herzig, K. H., Suppola, S., Khomutov, A. R., Vepsalainen, J., & Janne, J. (2002). A polyamine analogue prevents acute pancreatitis and restores early liver regeneration in transgenic rats with activated polyamine catabolism. *Journal of Biological Chemistry, 277*, 39867–39872.

omain, N., Dandrifosse, G., Jeusette, F., & Forget, P. (1992). Polyamine concentration in rat milk and food, human-milk, and infant formulas. *Pediatric Research, 32*, 58–63.

omero, R., Sánchez-Viñas, M., Gázquez, D., & Bagur, M. G. (2002). Characterization of selected Spanish table wine samples according to their biogenic amine content from liquid chromatographic determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 4713–4717.

uiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amine content in Spanish retail market meat products treated with protective atmosphere and high pressure. *European Food Research and Technology, 218*, 237–241.

antos, W. C., Souza, M. R., Cerqueira, M. M. O. P., & Glória, M. B. A. (2003). Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry, 81*, 595–606.

eiler, N. (2003a). Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. 1. Selective enzyme inhibitors. *Current Drug Targets, 4*, 537–564.

eiler, N. (2003b). Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. 2. Structural analogues and derivatives. *Current Drug Targets, 4*, 565–585.

halaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International, 29*, 675–690.

Silva, C. M. G., & Glória, M. B. A. (2002). Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 ± 1 °C and in chicken-based meat products. *Food Chemistry, 78*, 241–248.

Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. L., & Halasz, A. (1994). Biogenic amine content and microbial contamination of leafy vegetables during storage at 5 °C. *Journal of Food Biochemistry, 17*, 407–418.

Stute, R., Petridis, K., Steinhart, H., & Biernoth, G. (2002). Biogenic amines in fish and soy sauces. *European Food Research and Technology, 215*, 101–107.

Suzzi, G., & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: A review. *International Journal of Food Microbiology, 88*, 41–54.

Teixeira, D., Santaolaria, M. L., Meneu, V., & Alonso, E. (2002). Dietary arginine slightly and variably affects tissue polyamine levels in male Swiss albino mice. *Journal of Nutrition, 132*, 3715–3720.

Teti, D., Visalli, M., & McNair, H. (2002). Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *Journal of Chromatography B, 781*, 107–149.

Thomas, T., & Thomas, T. J. (2003). Polyamine metabolism and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine, 7*, 113–126.

Til, H. P., Falke, H. E., Prinsen, M. K., & Willems, M. I. (1997). Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food and Chemical Toxicology, 35*, 337–348.

Valero, D., Martínez-Romero, D., & Serrano, M. (2002). The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. *Trends in Food Science and Technology, 13*, 228–234.

Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A., & Vidal-Carou, M. C. (1997a). Changes in biogenic amines during the storage of Mediterranean anchovies immersed in oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*, 1385–1389.

Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A., & Vidal-Carou, M. C. (1997b). Biogenic amines in fresh and canned tuna. Effects of canning on biogenic amine contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*, 4324–4328.

Veciana-Nogués, M. T., Bover-Cid, S., Mariné-Font, A., & Vidal-Carou, M. C. (2004). Biogenic amine production by *Morganella morganii* and *Klebsiella oxytoca* in tuna. *European Food Research and Technology, 218*, 284–288.

Vinci, G., & Antonelli, M. L. (2002). Biogenic amines: Quality index of freshness in red and white meat. *Food Control, 13*, 519–524.

Walters, D. (2003a). Resistance to plant pathogens: Possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. *New Phytologist, 159*, 109–115.

Walters, D. R. (2003b). Polyamines and plant disease. *Phytochemistry, 64*, 97–107.

Yano, Y., Kataho, N., Watanabe, M., Nakamura, T., & Asano, Y. (1995). Changes in the concentration of biogenic amines and application of tyramine sensor during storage of beef. *Food Chemistry, 54*, 155–159.

Yen, -C. (1986). Studies on biogenic amines in foods. I. Determination of biogenic amines in fermented soybean foods by HPLC. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society, 24*, 211–227 (in Chinese).

Ziegler, W., Hahn, M., & Wallnöfer (1994). Changes in biogenic amine contents during processing of several plant foods. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 90*, 108–112 (in German).

·Food Res Technol (2005) 00
I 10.1007/s00217-005-0206-8

RIGINAL PAPER

tra Krausová · Pavel Kalač · Martin Křížek ·
mara Pelikánová

ontent of polyamines in beef and pork after animal slaughtering

:eived: 2 September 2005 / Revised: 23 November 2005 / Accepted: 28 November 2005
Springer-Verlag 2005

ıstract Dietary polyamines putrescine (PUT), spermi-
ıe (SPD) and spermine (SPM) participate in an array
important human physiological roles, including tumour
›wth. Physicians and dieticians thus need reliable infor-
ıtion on polyamine contents in foods. However, data for
th fresh and processed beef and pork are limited. We
:refore, determined the initial content of the polyamines,
h after slaughtering, in sirloin and rump of 63 young
lls and in loin and leg of 27 pigs of both genders.
·lyamines were determined as *N*-benzamides by micel-
· electrokinetic capillary chromatography (MECC). PUT
d SPD contents in most of the meat samples were neg-
ible. Mean SPM contents were about 22±6 mg kg^{-1} in
loin and rump. No significant correlations at $P<0.05$
:re found between the SPM contents in sirloin and
mp, likewise between SPM contents and the age and
tween live weight and type of the efficiency of the
lls. Mean SPM contents in loin and legs of barrows
:re 26.1±7.0 and 28.4±8.5 mg kg^{-1}, respectively, while
e corresponding values in gilts were 22.3±10.6 and
3.3±9.3 mg kg^{-1}.Between the genders the difference in
›M contents in the legs was significant. SPM contents
latively vary widely within the individual kinds of meat,
hich complicates application of the results for the con-
›lled human nutrition.

eywords Dietary polyamines · Putrescine ·
›ermidine · Spermine · Beef · Pork

troduction

mines putrescine (PUT, 1,4-diaminobutane), spermidine
›PD, *N*-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane) and sper-

Krausová · P. Kalač (✉) · M. Křížek · T. Pelikánová
epartment of Chemistry, Faculty of Agriculture, University of
outh Bohemia,
70 05 České Budějovice, Czech Republic
-mail: kalac@zf.jcu.cz
el.: +420-3877-72657
ax: +420-3853-10405

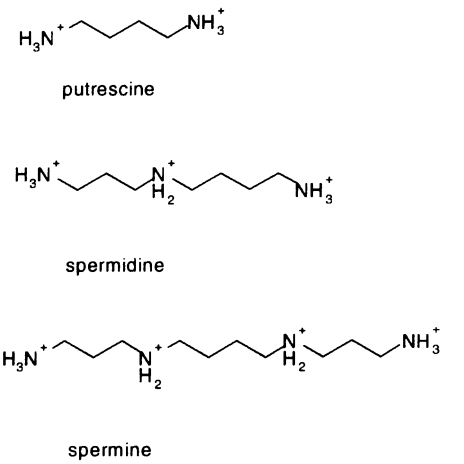


Fig. 1 Formulas of polyamines in their cationic forms

mine (SPM, *N*, *N'*-bis(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane) (Fig. 1) were separated from the group of biogenic amines during the 1990s due to their essentiality for the growth and function of normal cells. Putrescine, although being diamine by its structure, has been classified as a polyamine as it is the precursor of both the physiological polyamines (PUT → SPD → SPM). The polyamines fulfill an array of important physiological roles due to their both electrostatical and covalent interactions with various macromolecules. They participate in cell proliferation and differentiation and thus have been of a great interest within the research of tumour growth (e.g. [1, 2]). Nevertheless, the polyamines may be useful for wound healing and for growth, maturation and regeneration of the intestinal mucosa. Both endogenous and dietary polyamines participate in such processes [3]. The polyamines are recruited either by *de novo* synthesis through activation of key enzyme *ornithine decarboxylase* or by an uptake from the extracellular sources. The main roles of the polyamines in health and disease was recently reviewed [4, 5].

Thus, information on the content of the polyamines in different foods and beverages would be of great importance

ble 1 Literature data on content of spermidine and spermine (mg kg^{-1}) in fresh beef and pork

ɔduct	Country	No. of samples (n)	Spermidine			Spermine			Reference
			Mean value (x)	Standard deviation (S_x)	Range	Mean value (x)	Standard deviation (S_x)	Range	
ef									
Sirloin	Japan	6	1.5	–	–	30.0	–	–	[8]
	Norway	7	2.2	0.6	1.0–3.0	17.0	6.7	6.1–29.1	[9]
Lean	Scotland	3	–	–	18.3–19.7	–	–	30.7–42.0	[10]
	Japan	2	2.6	–	–	28.3	–	–	[11]
	Spain	6	3.1	0.8	1.9–4.2	39.8	5.8	28.7–44.6	[12]
	Norway	5	5.5	3.2	2.6–12.0	27.3	4.4	16.8–26.0	[9]
Fresh slices/at expiry date	Austria	19	2	–	–	8	–	–	[13]
			2	–	–	8	–	–	
ɔrk									
Lean	Scotland	3	–	–	2.9–4.9	–	–	30.1–70.3	[10]
	Japan	2	4.6	–	–	28.3	–	–	[8]
	Spain	13	3.0	1.0	0.8–4.5	33.5	4.4	27.3–40.6	[12]
Chops	Norway	5	2.8	0.7	2.0–4.1	22.4	7.5	14.5–34.5	[9]
Fresh slices/at expiry date	Austria	27	<1	–	–	11	–	–	[13]
			2	–	–	35	–	–	

ıtrescine contents were usually negligible or were not reported

ɔr physicians and dieticians. As resulted from our reviews f the polyamines occurrence and formation in foods [6,], higher SPM contents, as compared to SPD contents, are ɣpical for foods of animal origin, mainly for meat, while an pposite relation is observed in foods of plant origin. While 'UT content increases during an inappropriate storage and ırocessing of foods due to bacterial activity, SPD and SPM ıriginate mainly from raw materials and most probably hese are not produced by bacterial activity. However, the iterature data for most of the food items, including fresh neat, were obtained only from a limited number of sam- ɔles (Table 1). Moreover, time lag between slaughtering ınd meat sampling was not usually reported, additional in- ɔrmation on meat origin, such as on gender, age and breed ɔf animals, was lacking. Red meat and meat products have ɔeen included among the main dietary sources of SPM [3].

The objective of our survey was to determine the natural ɔontent of the polyamines in fresh beef and pork shortly ıfter slaughtering, prior to storage and processing or a culi- nary treatment.

Materials and methods

Sampling

Meat samples were taken from carcasses of 63 young bulls and 27 pigs slaughtered in an abattoir. The bulls were slaughtered during September–November 2003 and the pigs in May and June 2004 and February 2005. The bulls were of 15–28 months of age, of 374–744 kg live weight, of dairy, meat and dual purposes breeds (13, 9 and 22 animals, respectively, while the breed of 19 animals was not identified). The carcasses were chilled rapidly to inner temperature of 4–5°C and were stored in a cold store. Sirloin (*musculus longissimus dorsi*) and rump (*m. gluteus medius*) were sampled from the same part of the muscles during chopping up of the carcasses 20 h after slaughtering of the animals.

Pork samples were taken from 27 pigs (15 barrows, castrated males and 12 gilts, females) of mean live weight 118.1 kg (range, 93.4–147.1 kg), mostly 6 months old, likewise 20 h after slaughtering. The pigs were hybrids of several meat breeds. Chilled loin (*m. longissimus dorsi*) and leg (*m. psoas major*) were sampled.

The meat samples were transported to the laboratory in a cooling box. Isolation of the polyamines started within 4 h after the sample separatied from the muscles. In total, analyses started 24 h after the animals slaughtering.

Polyamines determination

Acid extracts for the polyamine determination were prepared from 40±1 g of a sample, which was homogenised using a kitchen hand blender with addition of 70–90 ml of 0.6 mol l^{-1} perchloric acid. The mixture was diluted with the perchloric acid and centrifuged at 3000 rpm (rotor diameter 240 mm) for 10 min. The supernatant was filtered through a filter paper under a reduced pressure. The filtrate was adjusted with the perchloric acid up to a final volume of 150 ml. The extracts were stored in PE-bottles in a refrigerator at 4°C until analysis, maximally for 8 weeks in sporadic events. As we proved, no significant changes of the polyamine contents occurred under such storage conditions. Unlike plant materials, in which the polyamines

ıle 2 Polyamine contents ; kg^{-1}) in sirloin and rump ıulls

	n (range)[a]		Spermine			
	Putrescine	Spermidine	Mean	Standard deviation	Median	Range
Sirloin (n=63)	1 (4.1)	15 (1.0–2.9)	21.7	5.8	22.8	2.1–31.5
Rump (n=57)	2 (2.7–4.3)	13 (1.2–2.4)	22.0	5.6	21.4	10.0–75.0

mber of samples (n) with tent above limit of detection)D)

partially conjugated mainly with phenolic acids, to the ıt of our knowledge, data on stable conjugates in foods animal origin are not available in literature.

The polyamines were determined as *N*-benzamides after ivatisation with benzoyl chloride. The method of micel- electrokinetic capillary chromatography (MECC) was ed, described in detail by Křížek and Pelikánová [14]. Spectraphoresis 2000 apparatus (Thermo Separation ducts, Fremont, CA) was used. The detection limits re 2.1, 1.0 and 1.4 mg kg^{-1} for PUT, SPD and SPM, pectively. The limits are relatively high as compared HPLC methods, however, they can be considered as ceptable for data of the survey aimed at human nutrition. Simultaneously, four biogenic amines, histamine, tyra- ne, tryptamine and cadaverine, with detection limits 2.1, 5, 1.3 and 1.4 mg kg^{-1}, respectively, were determined. l chemicals used were of analytical grade.

Repeatability of the analytical procedure was tested by parallel analyses of a sirloin purchased in a local butch- y. The meat originated from a 35-months-old heifer and ıs stored at temperatures 4–6°C for 7 days after slaughter- g. The determined mean content and standard deviation ere 19.0±1.4 mg kg^{-1} for SPM. Contents of PUT and 'D were below the detection limits.

atistical methods

ıe polyamine contents in meat are characterised by the ithmetical mean and median values, standard deviation ıd range. Statistical significance of the differences be- veen mean polyamine contents in the data sets of the ıalysed meats was tested by Student's *t*-test. Correlation efficients between SPM contents in the individual mus- es and between SPM contents and several parameters of ıe bulls (age, live weight and type of efficiency) were ılculated.

Results and discussion

Statistical characteristics of the polyamine contents in sirloin and rump of bulls are given in Table 2. PUT and SPD contents in both the muscles were mostly either below the limits of detection or they were very low. Mean SPM contents and standard deviations were very similar in the both the muscles, about 22±6 mg kg^{-1}. No significant correlations at $P<0.05$ were found between SPM contents in sirloin and rump, likewise between SPM contents and the age and between live weight and type of the efficiency of the bulls.

The observed polyamine contents are very comparable with the data published previously for raw beef, however, reporting a limited number of analysed samples [8–12]. Data of Bauer and Paulsen [13] for SPM contents are considerably lower (Table 1).

Similarly as in the bulls, PUT and SPD contents in the both porcine muscles were below the detection limits or these were very low (Table 3). Mean SPM contents and standard deviations in loin and legs of barrows were 26.1±7.0 and 28.4±8.5 mg kg^{-1}, respectively, while corresponding values in gilts were 22.3±10.6 and 18.3±9.3 mg kg^{-1}. Between the genders the difference in SPM contents in the legs was found to be significant at $P<0.01$. The significant correlations were found between SPM contents in the both muscles: $P<0.01$ in barrows and $P<0.05$ in gilts. The lower SPM contents in the meat of gilts can be at least partly attributed to the commonly accepted opinion that young and metabolically active tissues contain increased polyamine levels [3]. The growth rate of barrows is higher than that of gilts, which can participate in higher SPM contents in the meat of barrows.

The determined PAs contents are in a good agreement with the limited data published in the literature [8–10, 12], however, SPM contents are higher than those reported for fresh pork by Bauer and Paulsen [13] (Table 1). SPM

able 3 Polyamine contents ng kg^{-1}) in loin and legs of arrows (n=15) and gilts =12)

	n (range)[a]		Spermine			
	Putrescine	Spermidine	Mean	Standard deviation	Median	Range
Loin						
Barrows	3 (3.3–12.1)	8 (1.1–6.6)	26.1	7.0	26.6	7.7–35.1
Gilts	2 (3.1–3.6)	2 (1.4–4.7)	22.3	10.6	23.7	4.3–41.4
Leg						
Barrows	3 (2.4–3.5)	13 (1.3–5.3)	28.4[b]	8.5	28.7	8.2–42.2
Gilts	0 (–)	5 (1.3–5.6)	18.3[b]	9.3	20.0	3.0–29.5

Number of samples with ontent above limit of detection LOD)

The means are statistically ifferent at $P<0.01$

ntents in the tested beef and pork seem to be comparable. nfortunately, widely different counts of animals in data ts for bulls and pigs do not allow a reliable statistical mparison of the polyamines content between the species. None of the concurrently determined biogenic amines, stamine, tyramine, tryptamine and cadaverine, was esent in the analysed samples at detectable levels. This dicates a negligible activity of bacteria able to decarboxy-te the corresponding amino acids during the observed itial storage of fresh meat.

In conclusion, both fresh beef and pork have high SPM ntent, while PUT and SPD content seem to be of lower nportance from nutritional point of view. The increased PM levels can be supposed in the meat of young and uickly growing animals. However, similarly as in many her foods [6], SPM contents vary relatively widely within e individual kinds of meat. It makes application of the sults by physicians and dieticians even more difficult.

Further work in testing the polyamine changes in beef nd pork under different storage and processing conditions ill be continued.

cknowledgements The authors acknowledge the financial support r the projects MSM 6007665806/2/6 from the Czech Ministry of ducation and COST 922 of the European Commission. Sampling / Dr. J. Voříšková, Dr. N. Kernerová and M. Ježková was highly knowledged.

References

1. Bachrach U (2004) Amino Acids 26:307–309
2. Thomas T, Thomas TJ (2003) J Cell Mol Med 7:113–126
3. Bardócz S (1995) Trends Food Sci Technol 6:341–346
4. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A (2003) Biochem J 376:1–14
5. Moinard C, Cynober L, de Bandt J-P (2005) Clin Nutr 24:184–197
6. Kalač P, Krausová P (2005) Food Chem 90:219–230
7. Kalač P (2006) Meat Science Direct, DOI 10.1016/j.meatsci.2005.11.001
8. Yano Y, Kataho N, Watanabe M, Nakamura T, Asano Y (1995) Food Chem 54:155–159
9. Eliassen KA, Reistad R, Risøen U, Rønning HF (2002) Food Chem 78:273–280
10. Bardócz S, Grant G, Brown DS, Ralph A, Pusztai A (1993) J Nutr Biochem 4:66–71
11. Okamoto A, Sugi E, Koizumi Y, Yanadiga F, Udaka S (1997) Biosci Biotechnol Biochem 61:1582–1584
12. Hernández-Jover T, Izquierdo-Pulido M, Veciana-Nogués MT, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC (1997) J Agric Food Chem 45:2098–2102
13. Bauer F, Paulsen P (2001) Biogenic amines in meat and meat products. In: Morgan DML, Milovič V, Křížek M, White A (eds), Biogenically active amines in food, vol 5. Office for Offic, Publication of the European Communities, Luxembourg, pp 88–94
14. Křížek M, Pelikánová T (1998) J Chromatogr A 815:243–250

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT
Meat Science 73 (2006) 640–644
MEAT SCIENCE
www.elsevier.com/locate/meatsci

Content of biologically active polyamines in livers of cattle, pigs and chickens after animal slaughter

P. Krausová, P. Kalač *, M. Křížek, T. Pelikánová

Department of Chemistry, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

Received 10 October 2005; received in revised form 6 February 2006; accepted 9 March 2006

ct

tary polyamines putrescine (PUT), spermidine (SPD) and spermine (SPM) participate in an array of important human physiolog-
les, including tumour growth. Physicians and dieticians thus need reliable information on polyamine contents in foods. However,
ɔr livers are lacking. We determined therefore the content of these polyamines 24 h after slaughter in livers of young bulls, cows,
ıd chicken in 58, 19, 36 and 38 samples, respectively. Polyamines were determined as *N*-benzamides by micellar electrokinetic cap-
:hromatography. Mean PUT contents about 25 mg kg^{-1} were found in cattle livers, while very low or negligible contents were
ıined in livers of the other animals. Extremely high mean SPD contents of 122 and 161 mg kg^{-1} were found in livers of bulls
ɔws, respectively and mean levels of 32 and 57 mg kg^{-1} in livers of pigs and chicken. An opposite relation was observed for
Its mean contents were 43, 35, 115 and 120 mg kg^{-1} for bulls, cows, pigs and chicken livers, respectively. Thus, livers of the tested
l species belong among foods with the highest polyamine contents. However, the contents ranged very widely, that makes appli-
of the results for the control of human nutrition rather difficult. Polyamine contents in bovine blood were found to be below the
ion limits of 2.1, 1.0 and 1.4 mg kg^{-1} for PUT, SPD and SPM, respectively. Thus, the blood content did not contribute to the
ntial polyamine contents in bovine liver found in this study.
6 Elsevier Ltd. All rights reserved.

rds: Dietary polyamines; Putrescine; Spermidine; Spermine; Bovine liver; Pork liver; Chicken liver; Bovine blood

roduction

ılyamines putrescine (PUT; 1,4-diaminobutane), sper-
ıe (SPD; *N*-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane) and
nine (SPM; *N*,*N*'-bis-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobu-
are essential for the growth and function of normal
Due to both their electrostatic and covalent interac-
with various macromolecules they fulfil an array of
rtant physiological roles. They participate in cell pro-
tion and differentiation and thus have been of a great
est to research on tumour growth (e.g., Bachrach,
: Thomas & Thomas, 2003). Nevertheless, the polyam-
may be useful for wound healing and for the growth,
ıration and regeneration of the intestinal mucosa. Both endogenous and dietary polyamines participate in such processes (Bardócz, 1995). Polyamines are recruited either by de novo synthesis through activation of their key enzyme ornithine decarboxylase or by uptake from extracellular sources. Knowledge of the main roles of the polyamines in health and disease were recently reviewed (Moinard, Cynober, & de Bandt, 2005; Wallace, Fraser, & Hughes, 2003).

Thus, information on the content of the polyamines in different foods and beverages would be useful for physicians and dieticians. As our reviews of polyamines formation, occurrence and changes in foods (Kalač, 2006; Kalač & Krausová, 2005) demonstrated, higher SPM as compared to SPD contents are typical in foods of animal origin, mainly for muscle, while an opposite relation was observed in foods of plant origin. While PUT content increases during inappropriate storage and processing of

ɔrresponding author. Tel.: +420 389 032 657; fax: +420 385 310 405.
mail address: kalac@zf.jcu.cz (P. Kalač).

1740/$ - see front matter © 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.
).1016/j.meatsci.2006.03.005

ls of animal origin due to bacterial activity, SPD and
l originate mainly from the raw materials. However,
literature data for many food items, including offal,
: been lacking or are very limited.
'he objective of our work was therefore to determine
nitial content of polyamines in raw liver of cattle, hogs
chicken shortly after slaughter, prior to storage and
:essing or a culinary treatment.

laterials and methods

Sampling

amples were taken from liver of 58 young bulls, 19
s, 36 pigs, 38 chickens, nine lambs and three sheep
ghtered in an abattoir between 2003 and 2005. The
s were 15–29 months of age, 374–785 kg live weight
of dairy, meat and combined breed types (13, 9 and
animals, respectively, while breed of 14 animals was
identified). Additionally, livers of 19 cows aged 28–
(mean 61) months and live weight 358–768 kg were
ıpled. Liver samples taken during slaughter from the
ıt lobe were chilled, transported to the laboratory in a
l box and analysed 24 h after slaughter. Samples of
:rial blood were taken from seven cows during slaugh-
No anticoagulant was used. Samples were chilled and
lysed 24 h after sampling.
Right lateral lobe of pork livers were taken from 36 ani-
ls, 19 barrows (castrated males) and 17 gilts (females),
ing slaughter. The animals were mostly about 6 months
, of live weight 93–147 kg and different hybrids of sev-
l breeds. Sheep livers were sampled from three ewes
l lamb livers from six males and three females, about
ıonths old. Sample handling was the same as with the
/ine livers.
Chicken livers were sampled in a poultry-processing
nt immediately after the hybrid Cobb 500 were slaugh-
:d and drawn. The livers were chilled and the polyam-
s were analysed 24 h after slaughter. We analysed 38
nples of the whole livers, weighing about 35 g each.

. *Polyamines determination*

Acid extracts for the polyamines determination were
:pared from 40 ± 1 g of a sample which was homogen-
d using a kitchen hand blender with addition of 70–
ml of 0.6 M perchloric acid. Coagulated blood was
mogenised using the blender, 50 ± 1 g was blended with
rchloric acid. For three blood samples, 100 ± 1 g was also
alysed. The mixture was diluted with perchloric acid and
ıtrifuged at 3000 rpm (rotor diameter 240 mm) for
min. The supernatant was filtered through a filter paper
der reduced pressure and adjusted with perchloric acid
a final volume of 150 ml. The extracts were stored in
ılyethylene bottles in a refrigerator until analysis, maxi-
ally for 8 weeks in sporadic events. We found no signifi-
nt changes in the polyamines content under such storage
conditions. Unlike plant tissues, in which amines are conjugated mainly with phenolic acids, no such conjugates have been reported in samples of animal origin.

The polyamines were determined as *N*-benzamides after derivatisation with benzoyl chloride. A method of micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) was used, described in detail by Křížek and Pelikánová (1998). A Spectraphoresis 2000 apparatus (Thermo Separation Products, Fremont, CA) was used. The detection limits were 2.1, 1.0 and 1.4 mg kg^{-1} for PUT, SPD and SPM, respectively. Simultaneously, four biogenic amines, histamine, tyramine, tryptamine and cadaverine with detection limits 2.1, 3.5, 1.3 and 1.4 mg kg^{-1}, respectively, were determined. All chemicals were of analytical grade.

Repeatability of the analytical procedure was tested by 6 parallel analyses of bovine liver purchased in a butchery. Liver originated from a 25 months old bull and was stored at a temperature 4–6 °C for 4 days after slaughter. The determined mean contents and standard deviations were 7.3 ± 1.8, 142 ± 13.5 and 37.8 ± 4.4 mg kg^{-1} for PUT, SPD and SPM, respectively.

2.3. Statistical methods

The polyamine contents in livers are reported as the arithmetical mean value, standard deviation, median value and range. Statistical significance of the differences between mean polyamine contents in the observed groups of samples was tested by Student's test. Correlation coefficients between polyamine contents and several parameters of the young bulls (age, live weight and breed type) were calculated.

3. Results and discussion

The polyamine contents in bovine liver are given in Table 1. Mean contents of about 122 and 43 mg kg^{-1} of SPD and SPM, respectively are among the highest levels ever reported in foods (for the reviews see Kalač, 2006;

Table 1
Polyamine contents (mg kg^{-1}) in bovine liver

Polyamine	Young bulls, $n = 58$	Cows, $n = 19$
Putrescine		
Mean	23.8	25.4
Standard deviation	41.7	17.8
Median	8.8	17.3
Range	2.2–259	4.1–63.0
Spermidine		
Mean	121.5	160.5
Standard deviation	82.0	62.5
Median	108.3	160.1
Range	9.9–390	70.7–331
Spermine		
Mean	43.1	34.7
Standard deviation	26.5	19.6
Median	38.5	30.6
Range	11.5–128	13.4–82.2

& Krausová, 2005). To the best of our knowledge, ıation on the polyamine contents in bovine liver have ːt been published.

yamine levels are commonly higher in young animals ıetabolically active tissues (Bardócz, 1995). Enzymes ipating in amino acid, protein and amine metabolism ːry active in liver. Surprisingly, SPD contents were · than those of SPM in bovine livers. Such a relation ɔical in tissues of animal origin. The polyamine con- were determined 24 h after slaughter. Enzyme activi- ıcrease post-mortem and extensive changes in the mine contents and composition in liver can thus be ted during the storage period. However, such infor- n has been lacking till now. Moreover, Bardócz) suggested that SPD and SPM could be degraded g storage by being used as a nitrogen source by a part microflora.

e polyamine contents in liver were considerably r compared with those in sirloin and rump of the animals. PUT and SPD contents in both muscles mostly either below the limits of detection or they very low. Mean SPM contents and standard devia- were very similar in the both muscles, about 22 ± 6 mg kg^{-1} (Krausová, Kalač, Křížek, & Pelikánová, 2006).

Distribution of the individual polyamines in livers of young bulls is given in Figs. 1–3.

A question arose as to whether the high polyamine levels in liver could be affected by a high proportion of blood. Nevertheless, the polyamine contents were below the detection limits even if 100 g of bovine blood was taken for the analyses. Thus, the contribution of blood polyamines to the overall contents in bovine liver seems to be very limited. Similarly as for liver, we did not find in the literature any information on the polyamine level in bovine blood. In our opinion, the high polyamine levels observed in liver can be ascribed to hepatocytes, the cells with very extensive metabolic activity.

Correlations between the individual polyamines in liver and between SPM contents in sirloin and rump (data given in Krausová et al., 2006) and liver were tested, together with correlations between the age, live weight and breed type of young bulls and the contents of the individual polyamines. Only two significant negative correlations were found: between SPD and SPM contents in liver ($P < 0.001$) and between the age of bulls and SPD content

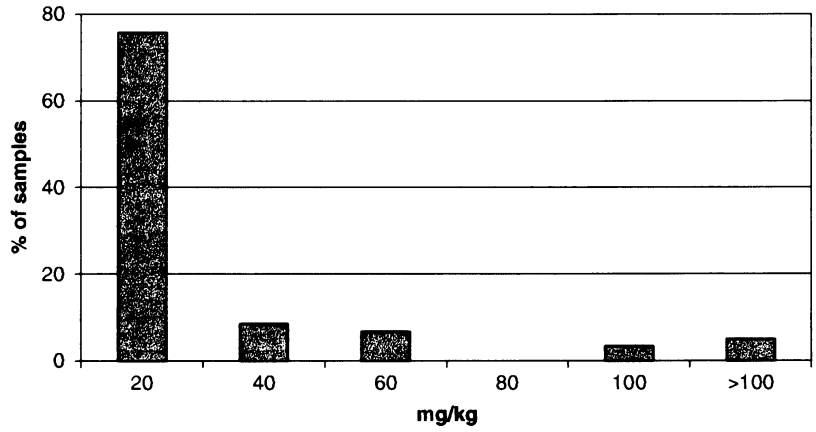


Fig. 1. Distribution (%) of putrescine in livers of bulls ($n = 58$).

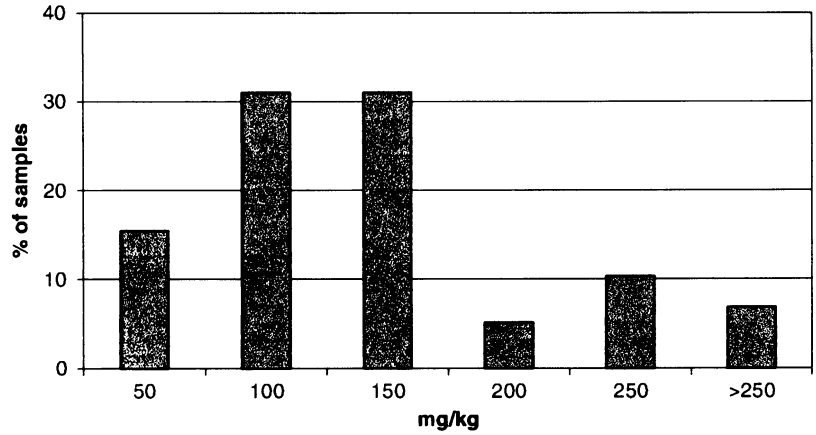


Fig. 2. Distribution (%) of spermidine in livers of bulls ($n = 58$).

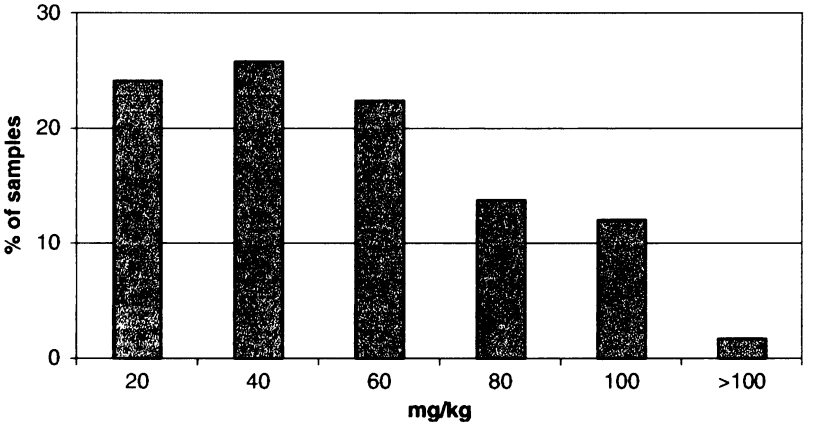


Fig. 3. Distribution (%) of spermine in livers of bulls ($n = 58$).

iver ($P < 0.01$). Mean SPD contents in liver were signif-
ıtly different between the meat and dairy breeds (188
l 96.1 mg kg^{-1}, respectively) ($P < 0.05$) and between
ry and combined (96.1 and 106 mg kg^{-1}, respectively)
eds ($P < 0.1$). The higher mean value of meat breeds
be explained by the genetically given preconditions
a more extensive growth including higher metabolic
ivity of liver enzymes and formation of the polyamines.
Comparing polyamine contents in livers of young bulls
l cows (Table 1), median values seem to be more helpful
n the means. SPD contents were significantly ($P < 0.05$)
her in cow livers than in young bull livers. This was sur-
sing given the above mentioned and commonly accepted
ınion that the polyamine levels are higher in tissues of
ıng animals (Bardócz, 1995).

Statistical data on the polyamine contents in pig livers
: given in Table 2. Unlike bovine livers, PUT contents
re detectable in only 39% of samples, mostly at very
v levels. Mean contents about 32 and 115 mg kg^{-1} of
D and SPM, respectively, were found, very similar for
th barrows and gilts. This is a reverse relation of SPD
d SPM compared with bovine livers. Data on polyamine
ntents in fresh pork livers are very scarce. Contents

ble 2
lyamine contents (mg kg^{-1}) in pig liver

lyamine	Barrows, $n = 19$	Gilts, $n = 17$
trescine		
· LOD[1]	6	8
nge for $n >$ LOD	3.1–11.8	2.2–24.3
ermidine		
ean	32.1	31.8
ındard deviation	11.6	11.5
edian	28.3	30.0
ınge	15.7–56.6	14.3–56.5
ermine		
ean	115.4	114.3
andard deviation	49.4	40.8
edian	92.4	110.3
ange	65.4–207	53.4–219

[1] Number of samples with content above the limit of detection (LOD).

2.3 ± 1.2, 29 ± 3.1 and 103.5 ± 12.8 mg kg^{-1} for PUT, SPD and SPM were reported by Villanueva-Valero et al. (2005). A different relation of the polyamines, 45.6 ± 25.2 and 32.7 ± 10.0 mg kg^{-1} for SPD and SPM, respectively, was observed in roasted pig livers (Kalač, Křížek, Pelikánová, Langová, & Veškrna, 2005).

An overall statistical evaluation of differences between mean polyamine contents in bovine and porcine livers is given in Table 3.

In chicken livers putrescine contents were above the limit of detection in only 13% of samples with a maximum level of 4.4 mg kg^{-1} (Table 4). Mean SPD content was about twice as high than in pig livers, although considerably lower than in livers of young bulls and cows. Mean SPM contents were comparable in chicken and pork livers. Polyamine contents in chicken livers thus seem to be more similar to the contents in pig livers than in the livers of cattle. A highly significant correlation ($P < 0.001$) was observed between SPD and SPM contents in chicken livers. Data on polyamine contents in poultry livers are lacking in the literature.

The great differences between polyamine contents in cattle livers as compared with livers of pigs and chickens suggest a possibility that difference could result from the

Table 3
An overall statistical evaluation of differences between mean polyamine contents (mg kg^{-1}) in bovine and porcine livers

Animals	Putrescine	Spermidine	Spermine
By genders			
Bulls	23.8	121.5	43.1
Cows	25.4	160.5*	34.7
Barrows	–	32.1	115.4
Gilts	–	31.8	114.3
By species			
Bulls	–	121.5	43.1
Barrows	–	32.1***	115.4***
Cows	–	160.5	34.7
Gilts	–	31.8***	114.3***

* $P < 0.05$.
*** $P < 0.001$.

ne contents (mg kg^{-1}) in chicken, sheep and lamb livers

ne	Chicken, $n = 38$	Sheep, $n = 3$	Lamb, $n = 9$
ne			
D[1]	5	0	0
or $n >$ LOD	2.0–4.4	–	–
line			
	56.9	45.3	22.2
d deviation	15.1	18.7	16.1
	57.7	–	16.0
	17.0–84.5	24.0–58.8	7.7–57.0
ne			
	119.6	108.5	113.4
rd deviation	43.0	55.7	30.4
	117.7	138.5	109.8
	35.2–211	44.2–143	63.2–165

nber of samples with content above the limit of detection (LOD).

ent nutrition of ruminant (herbivorous) and mono- c (omnivorous) animals. Pilot data were therefore mined in livers of three ewes (Table 4). Polyamine nts were more comparable with chicken and porcine than with cattle livers. Thus, the atypical relation D and SPM contents in cattle livers remains unclear. over, polyamines were also determined in livers of lambs of about 3 months old (Table 4). At that age, nction of rumen is not yet fully developed. SPM con- vas very comparable with the ewes, while SPD content ower. However, the results for both sheep and lambs obtained from a very limited number of samples.

one of the determined biogenic amines, histamine, nine, tryptamine and cadaverine, was present in the sed livers at detectable levels.

conclusion, livers of all the tested animals belong ng foods with the highest content of SPD and SPM. larly as in many food items, the polyamine contents widely in livers of the tested animals. It makes appli- n of the results for controlled human nutrition rather cult.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support of the projects MSM 6007665806 of the Czech Ministry of Education and COST 922 of the European Commission. Sampling by Dr. J. Voříšková, Dr. N. Kernerová and M. Ježková was highly acknowledged, as were valuable comments of Dr. T. Weiss from the University of Regensburg, Germany.

References

Bachrach, U. (2004). Polyamines and cancer: minireview article. *Amino Acids, 26*, 307–309.

Bardócz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology, 6*, 341–346.

Kalač, P. (2006). Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: a review. *Meat Science, 77*, 1–11.

Kalač, P., & Krausová, P. (2005). A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry, 90*, 219–230.

Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T., Langová, M., & Veškrna, O. (2005). Contents of polyamines in selected foods. *Food Chemistry, 90*, 561–564.

Krausová, P., Kalač, P., Křížek, M., & Pelikánová, T. (2006). Content of polyamines in beef and pork after animal slaughtering. *European Food Research and Technology, 223*, doi:10.1007/s00217-005-0206-8.

Křížek, M., & Pelikánová, T. (1998). Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A, 815*, 243–250.

Moinard, C., Cynober, L., & de Bandt, J.-P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition, 24*, 184–197.

Thomas, T., & Thomas, T. J. (2003). Polyamine metabolism and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine, 7*, 113–126.

Villanueva-Valero, B., Bauer, F., Smulders, F. J. M., Ariño, A., Hagen, U., & Paulsen, P. (2005). Biogenic amines and polyamines and total aerobic count during storage of vacuum-packaged porcine kidney, liver and spleen. *Food Science and Technology International, 11*, 337–344.

Wallace, H. M., Fraser, A. V., & Hughes, A. (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochemical Journal, 376*, 1–14.