

MONITORING VÝSKYTU BIOGENNÍCH AMINŮ VE FERMENTOVANÝCH MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH V ČR

Leona Buňková, Pavel Budinský, Gabriela Adamcová,
Pavel Pleva, František Buňka

Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Monitoring of the biogenic amines occurrence in fermented dairy products in the Czech Republic

Abstrakt

Cílem studie bylo sledování obsahu osmi biogenních aminů a polyaminů (histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, tryptaminu, putrescinu, kadaverinu, spermidinu a sperminu) v 55 vzorcích neochucených kysaných mléčných výrobků. Produkty byly testovány na konci doby minimální trvanlivosti. Ve vzorcích nebyl detekován histamin, fenyletylamin, tryptamin a spermidin. Zjištěná množství biogenních aminů byla poměrně nízká (do 30 mg/kg), pouze u 20 % testovaných jogurtů byl obsah BA ≥ 20 mg/kg. Množství biogenních aminů obsažených v testovaných výrobcích nepředstavuje riziko pro zdraví konzumentů.

Abstract

The aim of the study was to monitor the content of eight biogenic amines and polyamines (histamine, tyramine, phenylethylamine, tryptamine, putrescine, cadaverine, spermidine and spermine) in 55 samples of unflavoured fermented dairy products. Products were sampled at the end of shelf-life. Histamine, phenylethylamine, tryptamine and spermidine were not detected in samples tested. Observed amount of biogenic amines was evaluated as negligible (<30 mg/kg); the concentration of BA ≥ 20 mg/kg. was found only in 20% of yogurt tested. The amount of biogenic amines in the tested products was not the risk for a consumer health.

Úvod

Biogenní aminy (BA) jsou dusíkaté látky o nízké molekulární hmotnosti, které mají charakteristické fyziologické účinky v živých organizmech. Některé BA mají funkci hormonální, řada BA je považována za nervové mediátory nebo mohou být prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů a dalších metabolitů (Halász a kol., 1994; Silla Santos, 1996; Shalaby, 1996). Mezi nejdůležitější a v potravinách nejvíce sledované aminy patří histamin, tyramin, putrescin, tryptamin, 2-fenyletylamin, putrescin, kadaverin, agmatin, spermin a spermidin (Halász a kol., 1994; Silla Santos, 1996).

Biogenní aminy vznikají nejčastěji dekarboxylací z aminokyselin nebo aminací či transaminací aldehydů a ketonů. Dekarboxylace je katalyzována enzymy dekarboxylázami, které jsou buď přirozenou součástí živočišných a rostlinných organismů nebo častěji mikrobiálního původu. Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou se mohou do potravin dostat spontánně nebo jsou součástí zákysových kultur, které jsou do potravy přidávány záměrně (Silla Santos, 1996).

Pokud jsou BA přijaty potravou v malém množství, jsou obvykle metabolizovány ve střevech systémem mono- a diaminooxidáz. Histamin může být také detoxifikován metylací nebo acetylací. Míra schopnosti takto detoxifikovat BA je však velmi individuální, takže někteří jedinci mohou citlivě reagovat již na nižší obsah aminů v potravě. Na tento střevní systém mají také inhibiční účinky některé léky (inhibitory monoaminooxidáz - IMAO, antidepresiva) a alkohol (Novella-Rodríguez a kol., 2003; Spano a kol., 2010). Dojde-li k selhání detoxifikačního systému ve střevech, ať už vlivem nadměrného množství aminů v potravě, nebo jeho oslabení vlivem IMAO, dostávají se BA do krevního oběhu a mohou způsobovat mnohé nežádoucí účinky na organismus. Riziková je hlavně současná konzumace více rizikových potravin najednou (fermentované výrobky, pivo, víno) (Spano a kol., 2010).

Ve většině výrobků fermentovaných bakteriemi mléčného kvašení se nachází určité množství histaminu, kadaverinu, putrescinu a tyraminu. Z fermentovaných mléčných výrobků jsou z hlediska přítomnosti BA nejdůležitější sýry, které jsou také nejvíce sledovány. V mléku, jogurtech, tvarohu a nezrajících sýrech lze očekávat množství BA nepřesahující jednotky, případně desítky mg/kg (Halász a kol., 1994; Silla Santos, 1996). Vyšší množství BA by se mohlo ve fermentovaných mléčných výrobcích nacházet v případě mikrobiální kontaminace a kažení, při kterém často dochází k vyšší produkci dekarboxyláz (Halász a kol., 1994).

Cílem této studie bylo stanovit obsah osmi BA (histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, tryptaminu, putrescinu, kadaverinu, spermidinu, sperminu) ve vybraných fermentovaných mléčných výrobcích na konci doby trvanlivosti. Tyto výrobky byly zakoupeny v běžné obchodní síti v ČR.

Materiál a metody

Vzorky fermentovaných mléčných výrobků

V období září až listopadu 2011 bylo v běžné obchodní síti zakoupeno celkem 55 vzorků kysaných mléčných výrobků. Jednalo se o 28 jogurtů, 14 zakysaných smetan, 4 acidofilní mléka, 4 kefirová mléka, 2 kysaná podmáslí a 3 kysaná mléka včetně jogurtového (Tabulka 1). Všechny výrobky byly bez příchutě. Vzorky byly po dobu 7 - 30 dnů uskladněny v chladničce při teplotě 6 ± 2 °C a analyzovány na konci doby použitelnosti.

Stanovení obsahu biogenních aminů

Každý vzorek byl nejprve zhomogenizován promícháním a poté lyofilizován (přístroj Christ Alpha 1-4). Lyofilizovaná

Tab. 1 Obsah biogenních aminů v kysaných mléčných výrobcích

Výrobek	Počet vzorků	Biogenní aminy (mg/kg)*			
		Suma	Tyramin	Putrescin	Kadaverin
Jogurt bílý a jogurt bílý smetanový	20	0,4-29,4	20/0,3-6,3	10/1,9-26,1	ND**
Jogurt se sníženým obsahem tuku a jogurt nízkotučný	8	1,1-13,3	7/0,3-2,1	4/5,0-11,6	1/4,3±0,6
Zakysaná smetana	14	5,5-15,4	12/5,5-15,4	2/8,6-8,8	ND
Acidofilní mléko	4	2,9-7,5	3/2,6-7,5	1/4,1±0,4	ND
Kysané mléko	3	3,2-6,2	3/3,2-6,2	ND	ND
Kysané podmáslí	2	4,6-5,0	2/4,6-5,0	ND	ND
Kefírové mléko	4	3,4-15,3	3/0,8-4,0	3/3,4-14,3	ND

* Jednotlivé biogenní aminy - počet pozitivních vzorků/rozmezí detekovaného množství BA Výsledky uvedeny jako aritmetický průměr (n=18).

** ND - biogenní amin(y) nedetekován(y)

hmota byla udržována do okamžiku analýzy při -70 °C. Roztokem kyseliny chloristé (0,6 mol/l) byla provedena trojnásobná extrakce BA. Metodou kapalinové chromatografie (přístroje LabAlliance a Agilent Technologies) byl po předchozí derivatizaci dansylchloridem stanoven obsah BA. Derivatizace, chromatografická separace (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 150 x 4,6 mm, 3,5 µm, Agilent Technologies) a detekce (spektrofotometricky; $\lambda = 254$ nm) byly provedeny podle Dadákové a kol. (2009). Každý lyofilizát byl extrahován třikrát (3 samostatné extrakce), každý extrakt dvakrát derivatizován a každá derivatizovaná směs třikrát nanesena na kolonu (n = 18). Meze detekce se pro jednotlivé aminy pohybovaly v rozmezí (0,24-1,39 mg/kg). Výsledky byly přepočteny na hmotu před lyofilizací.

Výsledky a diskuze

Ve všech testovaných neochucených kysaných mléčných výrobcích byly detekovány BA v celkovém množství 0,4-29,4 mg/kg. Zjištěna byla přítomnost 4 biogenních aminů - tyraminu, putrescinu, kadaverinu a sperminu.

V polotučných a smetanových jogurtech se celkové množství BA pohybovalo do 30 mg/kg (Tabulka 1). U 12 testovaných bílých jogurtů bylo zjištěno celkové množství BA do 10 mg/kg, více než 20 mg/kg BA bylo detekováno pouze u 3 vzorků této skupiny. Ve všech testovaných vzorcích byl zjištěn tyramin, avšak v poměrně nízkých koncentracích do 6,5 mg/kg. V polovině testovaných vzorků byl detekován putrescin, avšak ve vyšších koncentracích než tyramin (do cca 26 mg/kg). V 1 jogurtu byla zjištěna přítomnost sperminu v množství cca 1 mg/kg.

V nízkotučných jogurtech anebo v jogurtech se sníženým obsahem tuku byl zjištěn zhruba poloviční celkový obsah BA (do 13,3 mg/kg) oproti jogurtům s obsahem tuku vyšším než 3 %. Kromě jednoho nízkotučného jogurtu byl ve všech ostatních testovaných vzorcích detekován v nízkých koncentracích tyramin (Tabulka 1). V polovině vzorků této skupiny byl zjištěn putrescin, a to v množství nepřevyšující 12 mg/kg. V jednom jogurtu byl rovněž zaznamenán kadaverin (4,3±0,6 mg/kg).

V testovaných vzorcích zakysané smetany byl detekován vždy jeden amin - tyramin (12 vzorků) nebo putrescin (2 vzorky). Na rozdíl od jiných testovaných kysaných mléčných výrobků byla ve všech zakysaných smetanách zjištěná koncentrace BA vyšší než 5 mg/kg (Tabulka 1). Ve

dvou vzorcích byl zaznamenán tyramin v koncentraci >10 mg/kg.

Ve vzorcích acidofilního mléka byla rovněž zjištěna přítomnost putrescinu (1 vzorek; 4,1±0,4 mg/kg) nebo tyraminu (3 vzorky). V této skupině výrobků byl tyramin detekován v nejvyšších koncentracích (dva vzorky s obsahem cca 7,5 mg/kg) ze všech testovaných fermentovaných mléčných výrobků. Oba aminy byly rovněž zjištěny i ve 4 vzorcích kefírového mléka, přičemž ve 2 vzorcích byla zjištěna přítomnost jak tyraminu, tak i putrescinu (Tabulka 1). Celkový obsah BA ve vzorcích kefírového mléka se pohyboval v rozmezí 3,4-15,3 mg/kg.

Ve dvou testovaných vzorcích kysaného podmáslí a třech vzorcích kysaného mléka byl zaznamenán pouze jeden BA - tyramin v koncentracích 3,2-6,2 mg/kg.

Vzhledem k povaze kysaných mléčných výrobků, jejich složení a způsobu výroby bylo možno očekávat výskyt určitého množství BA, protože zde existují příznivé podmínky pro jejich vznik (přítomnost volných aminokyselin, mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou, vhodné pH, teplota, apod.) (Halász a kol., 1994; Silla Santos, 1996; Spano a kol., 2010). Řada autorů uvádí, že v kysaných mléčných výrobcích se nachází nízké množství biogenních aminů, obvykle nepřesahujících 1 mg/kg (Halász a kol., 1994; Linares a kol., 2011). Výsledky této práce u mnoha vzorků tuto hranici přesahují. Celkové množství BA se pohybovalo v rozmezí 0,4 - 29,4 mg/kg. Obsah biogenních aminů nižší než 1 mg/kg byl naměřen pouze ve 3 vzorcích.

Z hlediska možných negativních dopadů na lidské zdraví jsou nejvýznamnější BA v potravinách histamin a tyramin (Shalaby, 1996). Histamin nebyl detekován u žádného z 55 vzorků fermentovaných mléčných výrobků. Naopak tyramin byl přítomen ve všech analyzovaných vzorcích v rozmezí 0,3 - 15,4 mg/kg. Shalaby (1996) udává jako hranici toxicity pro tyramin 100 mg/kg. Tomuto množství se žádný z testovaných výrobků nepřiblížil. V případě pacientů léčených IMAO je udávána bezpečná hranice 6 mg/kg tyraminu. Přes tuto hranici se dostalo 15 testovaných vzorků. Nejvyšší obsah tyraminu vykazovaly především zakysané smetany, u 11 z nich byl obsah tohoto BA vyšší než 6 mg/kg. Významné množství tyraminu bylo naměřeno také u 2 vzorků acidofilního mléka. Vzhledem k tomu, že jsou kysané mléčné výrobky obvykle konzumovány v množství maximálně několika set gramů (mililitrů), nemělo by toto množství představovat riziko pro

zdraví konzumentů. Potenciální nebezpečí by hrozilo pouze v případě současné konzumace jiných na BA bohatých potravin (zrající sýry, ryby, pivo, víno atd.) (Halász a kol., 1994, Shalaby, 1996; Spano a kol., 2010).

Polyaminy spermin a spermidin jsou přirozenou součástí mléka, proto se jejich produkce obvykle nepřipisuje přítomným mikroorganismům, ale předpokládá se, že pochází z původního materiálu. Spermin byl v této studii detekován pouze v jednom bílém jogurtu ($1,1 \pm 0,1$ mg/kg). Hladiny putrescinu se u kysaných mléčných výrobků pohybovaly mezi 1,9 mg/kg a 26,1 mg/kg. Produkce putrescinu bývá často spojována s činností kontaminujících mikroorganismů (často gramnegativních). Lze tedy předpokládat, že obsah putrescinu u těchto výrobků pochází spíše z dekarboxylázové činnosti přítomných mikroorganismů, než aby pocházel z mléka. Na druhou stranu je obsah putrescinu u těchto výrobků nižší než např. v sýrech (Buňková a kol., 2010), protože kysané mléčné výrobky nejsou vhodným prostředím pro rozvoj gramnegativních bakterií.

V porovnání s dalšími mléčnými výrobky (například zrajícími sýry), dosahuje množství BA v námi testovaných výrobcích o několik řádů nižších hodnot (prakticky <30 mg/kg). V případě zrajících sýrů se obsah BA může pohybovat i v jednotkách gramů na kilogram (Buňková a kol., 2010; Novella-Rodríguez a kol., 2003), Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben podmínkami při výrobním procesu a skladování. Kysané mléčné výrobky procházejí procesem fermentace za teplot příznivých pro růst bakterií a tvorbu BA jen po dobu několika málo hodin. Poté jsou zchlazeny a uchovávány při chladírenských teplotách, které nejsou optimální pro růst mikroorganismů a tudíž ani pro tvorbu BA. Také doba jejich použitelnosti a tím i doba, po kterou mohou ve výrobcích BA vznikat, je relativně krátká a většinou nepřesahuje 3 až 4 týdny.

Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou Národní agentury pro zemědělský výzkum, projekt QJ1210300 programu Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 a interního grantu UTB ve Zlíně č. IGA/FT/2012/027 financovaného z prostředků specifického vysokoškolského výzkumu.

Použitá literatura

- BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., MANTLOVÁ, G., ČABLOVÁ, A., SEDLÁČEK, I., ŠVEC, P., PACHLOVÁ, V., KRÁČMAR, S. (2010): The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiol.*, 27(7), s. 880-888.
- DADÁKOVÁ, E., KRÍŽEK, P., PELIKÁNOVÁ, T. (2009): Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chem.*, 116, s. 365-370.
- HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. (1994): Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.*, 5, s. 42-49.
- LINARES, D.M., MARTIN, M.C., LADERO, V., ALVARES, M.A., FERNÁNDES, M. (2011): Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, s.691-703 -
- NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M.T., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C. (2003): Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *J. Food Sci.*, 68(3), s. 750-755.

SHALABY, A.R. (1996): Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.*, 29, s. 675-69.

SILLA SANTOS, M.H. (1996): Biogenic amines: their importance in food. *Int. J. Food Microbiol.* 29, s. 213-231.

SPANO, G., RUSSO, P., LONVAUD-FUNEL, A., LUCAS, P., ALEXANDRE, H., GRANDVALET, C., COTON, E., COTON, M., BARNAVON, L., BACH, B., RATTRAY, F., BUNTE, A., MAGNI, C., LADERO, V., ALVAREZ, M., FERNANDEZ, M., LOPEZ, P., DE PALENCIA, P.F., CORBI, A., TRIP, H., LOLKEMA, J.S. (2010): Biogenic amines in fermented foods. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 64, S95-S100.

Přijato do tisku 11. 7. 2012

Lektorováno 10. 9. 2012

IMUNOMAGNETICKÁ DETEKCE PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ V SÝRECH

Ivo Šafařík^{1,2,*}, Mirka Šafaříková¹

¹ Oddělení nanobiotechnologie, Ústav nanobiologie a strukturní biologie CVGZ AVČR, Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice

² Katedra medicínské biologie, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská universita, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

ivosaf@yahoo.com

www.nh.cas.cz/people/safarik

Immunomagnetic detection of pathogenic microorganisms in cheeses

Abstrakt

V článku jsou popsány základní principy imunomagnetické separace patogenních mikroorganismů v sýrech. Jsou uvedeny typické příklady provedených analýz sýrů.

Klíčová slova: imunomagnetická separace, patogenní mikroorganismy, sýry, mléčné výrobky, kontaminace

Abstract

Basic principles of immunomagnetic separations of microbial pathogens in cheeses are described. The typical examples of cheeses analyses are presented.

Úvod

Sýry patří mezi významné a zdraví prospěšné potraviny; jejich světová výroba i spotřeba mají vzrůstající tendenci. Stejně jako jiné potraviny, mohou být i sýry v některých případech kontaminovány řadou patogenních mikroorganismů. Tato kontaminace může být způsobena přítomností patogenních mikroorganismů v mléku použitém při výrobě sýra a jejich přežitím při výrobě a skladování sýra. Další možností je kontaminace sýrů v procesu jejich výroby