

SOME MICROORGANISMS FORMING BIOGENIC AMINES IN DUTCH-TYPE SEMI-HARD CHEESE

MIKROORGANISMY PODÍLEJÍCÍ SE NA TVORBĚ BIOGENNÍCH AMINŮ V SÝRECH EIDAMSKÉHO TYPU

Cwiková O., Komprda T., Dohnal V.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: cwikova@node.mendelu.cz, komprda@mendelu.cz, dohnal@node.mendelu.cz

ABSTRACT

Counts of lactic acid bacteria (LAB), total anaerobes and enterococci were determined in the course of ripening in the edge part (E) and the core part (C) of Dutch-type semi-hard cheese produced with different fat content (30 and 45 %) by two different producers (H and R) using two different starter cultures (L and Y). Counts of LAB at the beginning of ripening (day 0) in H producer's samples were higher ($P < 0,01$) in comparison with the R producer's ones. Count of enterococci was the highest ($P < 0,05$) at the end of the ripening (176th day) in sample R30YE. Higher ($P < 0,01$) enterococci counts were in R producer's cheeses (in comparison with the H producer's ones). Enterococci contamination was higher ($P < 0,05$) in E-samples than C-samples. Content of the sum of all BA in cheese was negatively correlated ($P < 0,05$) with counts of lactic acid bacteria ($r = -0,24$) and counts of total anaerobes ($r = -0,23$). No correlation between the sum of BA content and enterococci counts was found.

Key words: biogenic amines, cheese, enterococci, lactic acid bacteria, total anaerobic microorganisms

ÚVOD

Biogenní aminy jsou skupinou alifatických, aromatických nebo heterocyklických bází odvozených od aminokyselin, která má různé biologické účinky. Některé z nich jsou tkáňovými hormony, stavebními látkami pro syntézu dalších hormonů, fytohormonů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů rostlin. Biogenní aminy jsou v nízkých koncentracích přirozenou součástí řady potravin (Velíšek, 2002). V potravinách většina z nich vzniká dekarboxylací volných aminokyselin působením bakteriálních enzymů (dekarboxylas) (Křížek, Kalač, 1998). Nejčastěji se dekarboxylasy aminokyselin vyskytují u rodů *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Kromě fyziologických funkcí mohou BA při nadměrném příjmu potravou vyvolávat v organismu projevy otravy. Některé BA, jako histamin a tyramin, vykazují vasoaktivní a psychoaktivní účinky, a proto může jejich přítomnost v potravinách ohrozit zdraví konzumenta (Roig-Sagués et al., 2002). Projevy intoxikace organismu se dělí na nervové a kožní. Jde zejména o nucení ke zvracení, dýchací potíže, bušení srdce, bolesti hlavy, zrudnutí v obličeji, pálení v ústech a červenou vyrážku na kůži (Křížek, Kalač, 1998). V sýrech bývají hlavními BA histamin, kadaverin, putrescin a tyramin (Novella-Rodríguez et al., 2003). K tvorbě těchto aminů dochází u sýrů zejména při zrání vlivem kontaminující mikroflóry, a to v provozech s nedostatečnou úrovní hygieny. Nejčastěji jsou v této souvislosti zmiňovány enterokoky, *Enterobacteriaceae* a laktobacily (Martuscelli et al., 2005). Předpokládá se, že na vzniku a hromadění BA v sýrech mají podíl i bakterie mléčného kvašení (LAB) ze startovacích kultur. Peptidázy, uvolněné rozpadem buněk startovacích LAB, mohou být pro vznik aminokyselin, které jsou prekurzory BA, nezbytné (Martuscelli et al., 2005). Vysoká koncentrace BA může být použita jako indikátor hygienické kvality sýrů (Novella-Rodríguez et al., 2003). Mezi faktory ovlivňující výskyt a hromadění BA v sýrech patří druh sýru (Martuscelli et al., 2005), teplota sýřeniny, pasterace mléka, doba zrání, startovací kultury (Schneller et al., 1997; Kalač, Krausová, 2005), hygiena při zpracování a část sýru (Novella-Rodríguez et al., 2004). Cílem pokusu bylo posoudit vliv výrobce a dalších faktorů na počty mikroorganismů v průběhu zrání sýru eidamského typu a zjistit, zda existuje vztah mezi obsahem biogenních aminů (BA) a počtem bakterií mléčného kvašení, enterokoků a anaerobů.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky sýrů eidamského typu byly odebírány v měsíčních intervalech a pocházely od dvou výrobců (H, R). Každý z výrobců vyprodukoval sýry o dvou tučnostech (30 a 45 %) při použití dvou startovacích kultur, označených jako „L“ a „Y“. Při každém odběru byly odebírány od dané výroby tři vzorky – bloky 1, 2 a 3. Od každého vzorku byl analyzován okraj a střed sýru. Vzorky byly dopraveny do laboratoře v chladícím boxu a sterilně rozporcovány.

Z každého vzorku bylo odváženo do plastového sáčku 10 g sýru, ke kterému bylo přidáno 90 ml Ringerova roztoku (Noack, Rakousko) přehřátého na 45 °C. Směs byla homogenizována, dokud nebyl sýr dokonale dispergován, a to po dobu 90–120 s (max. 3

min.). Z primárního ředění byla připravena řada dekadických ředění. U každého vzorku byl stanovován celkový počet mikroorganismů (CPM), počet enterokoků, bakterií mléčného kvašení (LAB), koliformních mikroorganismů (MO), plísní a kvasinek a anaerobů.

Stanovení CPM, počtu koliformních MO a plísní a kvasinek bylo provedeno v laboratoři každého z výrobců dle příslušných ČSN.

Bakterie mléčného kvašení byly stanoveny plotnovou metodou (ČSN ISO 15214). Objem vzorku (1ml) nebo jeho ředění bylo zalito MRS agarem (Biokar, Francie). Inokulované Petriho misky se nechaly zatusnout a poté byly zality druhou vrstvou MRS agaru pro dosažení mikroaerofilního prostředí. Půdy byly inkubovány při 30 °C po dobu 72 hodin.

K izolaci a stanovení počtu enterokoků bylo použito médium Slanetz–Bartley (Noack) obohacené suplemtem TTC (trifenyltetrazoliumchlorid), který udílí koloniím červenou barvu. Misky byly inkubovány při 37 °C po dobu 48 hodin (ČSN EN ISO 7899).

Anaerobní mikroorganismy byly stanovovány na Plate Count Agar (Biokar) při 30 °C a odečítány za 72 hodin. Anaerobních podmínek bylo dosaženo inkubací v anaerostatu AG 25 A (Oxoid, VB) za použití vyvíječe a indikátoru anaerobního prostředí (Oxoid).

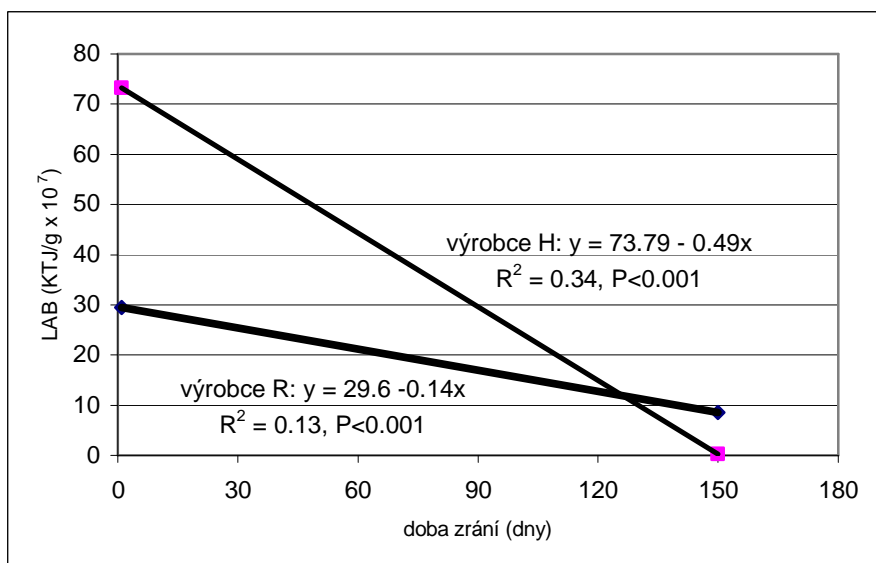
Pro stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* byl použit agar ENDO (Noack), kultivace proběhla při 37 °C po dobu 24 hodin.

Obsah histaminu, tryptaminu, tyraminu, putrescinu, phenyletylaminu, kadaverinu, spermidinu a sperminu byl stanoven vysokotlakou kapalinovou chromatografií s UV detekcí po derivatizaci dansylchloridem (Komprda et al., 2006).

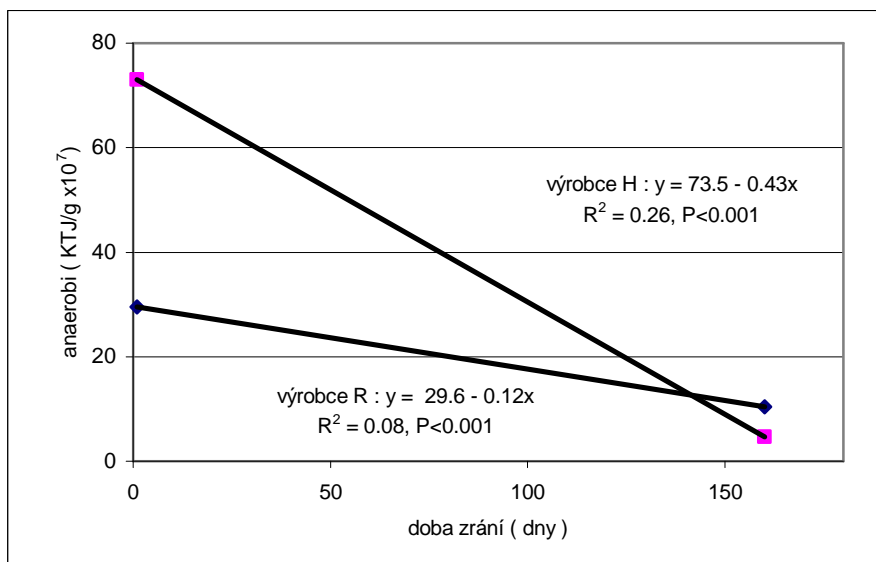
Naměřené hodnoty byly zpracovány statistickým programem Unistat, verze 4,53 (Londýn, VB). Byla použita metoda jednoduchého třídění analýzy rozptylu, vícenásobného třídění analýzy rozptylu a regresní a korelační analýzy.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Počet bakterií mléčného kvašení (LAB) byl na počátku zrání (den 0) u vzorků od výrobce H výrazně vyšší ($P < 0,01$) než u vzorků od výrobce R a pokles počtu LAB 3,5krát rychlejší (směrnice 0,49, resp. 0,14 v případě výrobce H, resp. R). Možným důvodem vyššího počtu LAB u výrobce H byla kontaminace sýrů nestratujícími bakteriemi mléčného kvašení různého původu, a to již při výrobě.



1: Závislost počtu kolonií tvořících jednotek (KTJ) bakterií mléčného kvašení (LAB) na době zrání sýrů eidamského typu



2: Závislost počtu anaerobních MO (KTJ) na době zrání sýrů eidamského typu

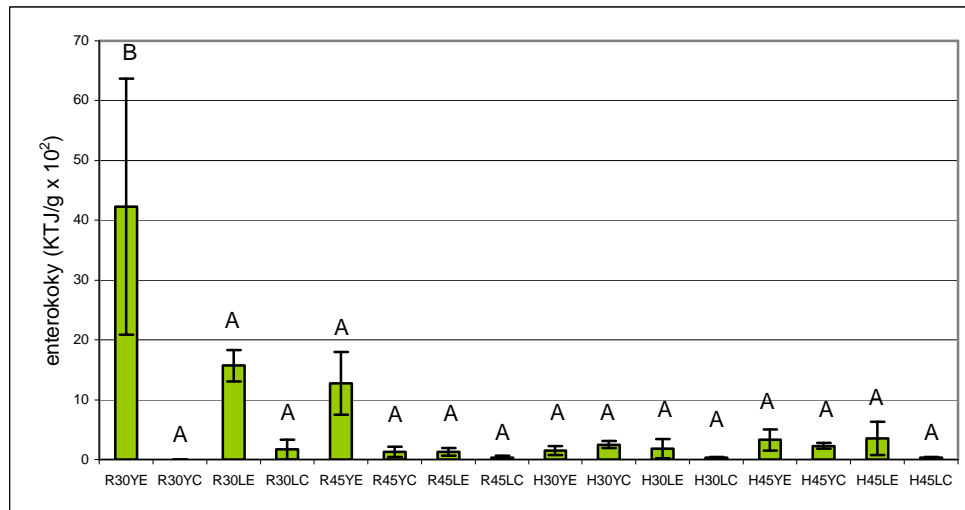
Počet anaerobních mikroorganismů klesal v průběhu zrání obdobně jako u bakterií mléčného kvašení (směrnice 0,43, resp. 0,12 v případě výrobce H, resp. R). Tento fakt lze vysvětlit tím, že LAB patří z hlediska nároku na kyslík mezi mikroorganismy fakultativně anaerobní, anaerobní nebo mikroaerofilní. To koresponduje s výsledky experimentu Bover-Cida a Holzapfela (1999), kdy při stanovení počtu LAB nebyly zjištěny rozdíly v kultivaci za aerobních a anaerobních podmínek (Obr. 2).

Co se týká enterokoků, vyšší počty byly zjištěny u vzorků od výrobce R ($P < 0,01$) než u vzorků od výrobce H (vzorky z celého období zrání byly brány jako jeden soubor).

Při porovnání, kdy všechny okraje (E), resp. středy (C) sýru byly uvažovány jako jeden soubor (oba výrobci, obě tučnosti, obě kultury), byly v E vzorcích zjištěny průkazně vyšší počty enterokoků ($P < 0,05$) ve srovnání s C vzorky ($13,7$ resp. $2,3 \times 10^2$ KTJ/g). Distribuce enterokoků v sýru může být podle Schnellera et al., (1997) nehomogenní. Námí

zjištěný vyšší počet enterokoků v okrajové části sýrů ukazuje na sekundární kontaminaci v průběhu výroby.

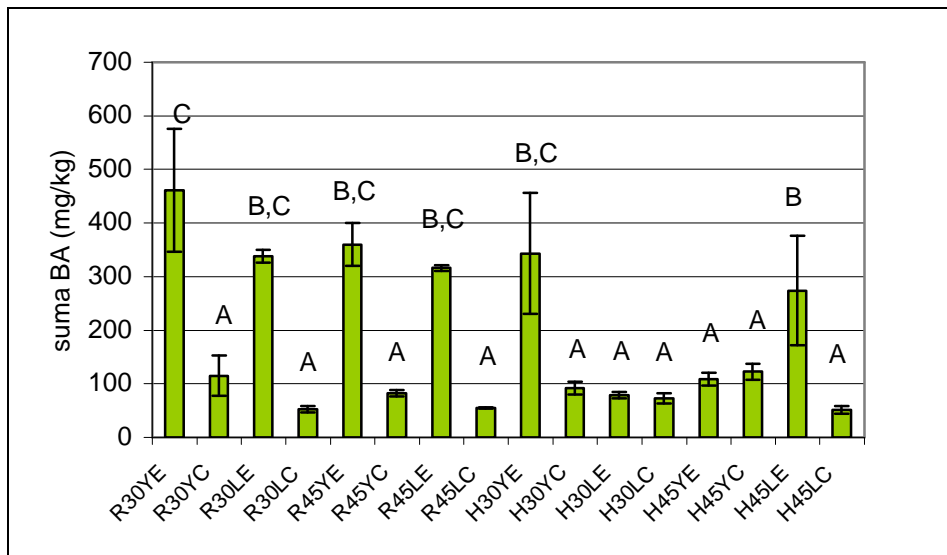
Počet enterokoků v jednotlivých vzorcích sýru na konci zrání (po 176 dnech) je znázorněn na obr. 3. Z obrázku je patrné, že nejvyšší počet enterokoků ($P < 0,05$) byl u vzorků od výrobce R, a to u vzorku okraje (E) sýru s 30% tučností při použití startovací kultury Y ($4,2 \times 10^3$ KTJ/g). To je mnohem méně než uvádí Schneller et al., (1997). Ten zjistil v polotvrdých sýrech vyrobených z pasterovaného mléka po dvou měsících zrání hodnotu $8,7 \times 10^6$ KTJ/g.



3: Počet enterokoků u jednotlivých vzorků sýru na konci zrání (po 176 dnech) v okrajové (E) a středové (C) části sýru vyrobeného dvěma výrobci (H, R) při dvou různých tučnostech (30 a 45 %) za použití dvou startovacích kultur (L, Y). Průměry označené různými písmeny se liší při $P < 0,05$

Obsah sumy biogenních aminů po 176 dnech zrání byl u výrobce R ve srovnání s výrobcem H vyšší v případě vzorků E s 30 % tuku, s použitím kultury L (338 vs. 79 mg/kg) a u vzorků E s 45 % tuku, kulturou Y (360 vs. 109 mg/kg). Při porovnání ostatních vzorků nebyly rozdíly mezi oběma výrobci statisticky průkazné. Vyšší hodnotu udává Martuscelli et al., (2005), který stanovil v ovčích sýrech vyrobených z pasterovaného mléka s přidavkem startovacích LAB po 60ti dnech zrání celkový obsah BA 1086 mg/kg. Naproti tomu Schneller et al., (1997) zjistil v polotvrdých sýrech s přidavkem běžně používané startovací kultury po 5 měsících zrání celkový obsah BA 51 mg/kg.

Při posouzení všech analyzovaných vzorků jako jednoho souboru, koreloval obsah sumy biogenních aminů s počtem LAB ($r = -0,24$, $P < 0,05$) a počtem anaerobních mikroorganismů ($r = -0,23$, $P < 0,05$). Negativní vztah mezi počty uvedených MO a obsahem sumy BA lze vysvětlit tím, že tvorba BA není záležitostí rodů a druhů MO, ale pouze určitých kmenů v rámci druhu (Bover-Cid et al., 2000). Mezi počtem enterokoků a obsahem sumy BA nebyl vzájemný vztah zjištěn ($r = 0,04$, $P = 0,23$).



4: Suma BA (mg/kg) u jednotlivých vzorků sýru po 176 dnech zrání

ZÁVĚR

Cílem pokusu bylo posoudit vliv výrobce a dalších faktorů na počty mikroorganismů v průběhu zrání sýru eidamského typu a zjistit, zda existuje vztah mezi obsahem biogenních aminů (BA) a počtem bakterií mléčného kvašení, enterokoků a anaerobů.

Počet bakterií mléčného kvašení (LAB) byl na počátku zrání (den 0) u vzorků od výrobce H výrazně vyšší ($P < 0,01$) než u vzorků od výrobce R a pokles počtu LAB 3,5krát rychlejší (směrnice 0,49, resp. 0,14 v případě výrobce H, resp. R). Počet anaerobních mikroorganismů klesal v průběhu zrání obdobně jako u bakterií mléčného kvašení (směrnice 0,43, resp. 0,12 v případě výrobce H, resp. R).

Co se týká enterokoků, vyšší počty byly zjištěny u vzorků od výrobce R ($P < 0,01$) než u vzorků od výrobce H, kdy hodnoty z celého období zrání (0-176 dní), byly brány jako jeden soubor. Při porovnání, kdy všechny okraje (E), resp. středy (C) sýru byly uvažovány jako jeden soubor (oba výrobci, obě tučnosti, obě kultury), byly v E vzorcích zjištěny průkazně vyšší počty enterokoků ($P < 0,05$) ve srovnání s C vzorky ($13,7$ resp. $2,3 \times 10^2$ KTJ/g). Na konci zrání (176. den) byl nejvyšší počet enterokoků ($P < 0,05$) zjištěn u vzorků R30YE.

Při posouzení všech analyzovaných vzorků jako jednoho souboru koreloval obsah sumy biogenních aminů s počtem LAB ($r = -0,24$, $P < 0,05$) a počtem anaerobních mikroorganismů ($r = -0,23$, $P < 0,05$). Mezi počtem enterokoků a obsahem sumy BA nebyl vzájemný vztah zjištěn ($r = 0,04$, $P = 0,23$).

LITERATURA

- Bover-Cid S., Holzapfel W. H. (1999): Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 53, 33–41.
- 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 sausage. *Journal of Food Protection* 63, 1544–1550.
- Komprda T., Smělá D., Novická K., Kalhotka L., Šustová K., Pechová P. (2007): Content and distribution of biogenic amines in Dutch – type hard cheese. *Food Chemistry* 102, 129–137.
- Křížek M., Kalač P. (1998): Biogenic amines in foods and their roles in human nutrition. *Czech Journal of Food Science* 16, 151–159.
- Martuscelli M. et al., (2005): Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal* 15, 6–9: 571–578.
- Novella-Rodríguez S. et al., (2004): Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *Journal of Dairy Research* 71, 245–252.
- Roig-Sagués A.X. et al., (2002): Histamine and tyramine forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research and Technology* 215, 96–100.
- Schneller R., Good P., Jenny M. (1997): Influence of pasteurised milk, raw milk and different cultures on biogenic amine concentrations in semi-soft cheeses during ripening. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A* 204, 265–272.
- Velíšek J.: *Chemie potravin* 3. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 368 s. ISBN 80-86659-03-8.