

---

## THE BIOGENIC AMINES CONTENT OF CHEESE RIPENING UNDER THE SMEAR DURING PRODUCTION

Rejchrtová E., Zemánek L., Sládková P., Komprda T.

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

E-mail: xpetirov@node.mendelu.cz

---

### ABSTRACT

The biogenic amines (BA) are low-molecular basic nitrogen substances produced in food by bacteria possessing decarboxylase activity. Some BAs have important physiological functions in a human organism (nitrogen source, hormone precursors etc.). However, they can induce toxic effects when ingested in greater quantities in food. Samples of cheese ripening under the smear produced during a spring period were used. The samples were obtained during the production process, including samples from the raw materials. Biogenic amines (tyramine, histamine, phenylethylamine, cadaverine, putrescine, spermidine, spermine) were detected by the HPLC method (High Pressure Liquid Chromatography). The content of histamine and tyramine respectively did not exceed 100 mg.kg<sup>-1</sup>. Content of the sum of BA raw material was 9.7 mg.kg<sup>-1</sup>. Content of the sum of BA was significantly ( $P < 0.05$ ) influenced by the product shape, an effect of the cheese position in the ripening room on the sum of BA was not established, there was only tendency ( $P > 0.05$ ) to higher values regarding cheeses ripening in a great distance from the ripening room door.

**Key words:** biogenic amine, HPLC, cheese

## ÚVOD

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární bazické dusíkaté látky vznikající v potravinách a potravinových surovinách nejčastěji dekarboxylací aminokyselin působením dekarboxylačních enzymů. Některé z biogenních aminů mají v organismu člověka či živočichů i významné fyziologické funkce např. slouží jako zdroj dusíku nebo jako prekurzory některých hormonů. Jakmile jsou však aminy přijímány potravou v nadměrném množství, mohou vyvolat řadu nepříznivých reakcí (KALÁČ et. KŘÍŽEK, 2002). Toxické dávky BA je obtížné stanovit. Velice závisí na individuálních rozdílech mezi lidmi a na přítomnosti různých BA v potravě. Mezi toxikologicky nejvýznamnější biogenní aminy patří tyramin a histamin (Bover-Cid et al., 2000). U nefermentovaných potravin mohou být biogenní aminy indikátorem nežádoucí mikrobiální činnosti.

Vedle ryb jsou sýry nejčastěji uváděnou potravinou spojovanou s intoxikací BA. Sýry představují ideální prostředí pro tvorbu BA (Halász et.al,1994) a mohou obsahovat i významná množství biogenních aminů. Tvorba BA v sýrech je závislá na koncentraci volných aminokyselin nebo peptidů, na přítomnosti bakterií schopných dekarboxylovat aminokyseliny, pH, koncentraci solí a vodní aktivitě.

## MATERIÁL A METODIKA

V experimentu byly použity vzorky sýrů zrajících pod mazem odebírané během jarního období. Vzorky byly odebírány během výrobního procesu, a to včetně vzorků vstupní suroviny. Vzorky byly odebírány ve fázi vstupní suroviny (průmyslový tvaroh), upravené vstupní suroviny (nasolený průmyslový tvaroh), po formování. Zvolený druh sýrů je tzv. sýr zrající, proto byl další odběr prováděn během zrání, při fázi osušení a odvětrání. Poslední odběr byl proveden před balením výrobku, tedy po ukončení zrání ve zracích místnostech. V experimentu byl sledován vliv dvou různých tvarů výrobku (kolečka, tyčinky) stejného typu sýru a vliv různého umístění zracích stojanů ve zracích místnostech.

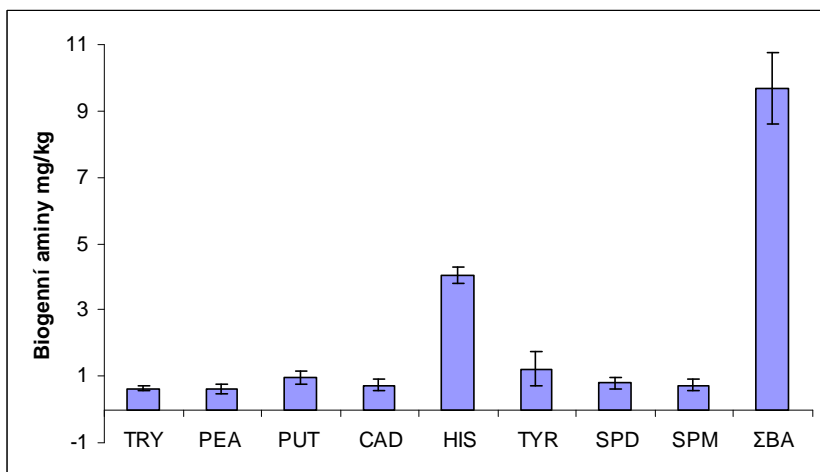
Po homogenizaci bylo od každého vzorku naváženo 10g ( $\pm 1$  mg) do 85 ml zkumavky, do níž bylo dále přidáno 0,5 ml vnitřního standardu (1,7-diaminoheptanu o koncentraci 1mg/ml) a vzorky byly extrahovány 2 minuty s 30 ml 0,1 M HCl. Vzniklá suspenze byla centrifugována po dobu 10 minut při 4° C a při 3000 otáčkách /min (HETTICH Universal 32R, Hettich, Německo). Supernatant byl filtrován přes papírový filtr a pevný podíl byl opět extrahován. Spojené supernatanty byly doplněny na 50 ml 0,1 M HCl. Z extraktu byl odebrán 1 ml do vialky (8 ml) k němu bylo přidáno 0,5 ml nasyceného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1 ml derivatizačního činidla dansylchloridu (5-dimethylaminoheptan-sulfonil chlorid, DCL), směs byla promíchána 1 minutu (MS2 Minishaker IKA, IKA Werme GmbH, Staufen, Německo). Derivatizace probíhala 1 hodinu při 40 °C. Po té došlo k přidání 0,250 ml roztoku NH<sub>3</sub> a k promíchání vzniklé suspenze. NH<sub>3</sub> zreagoval se zbytkem dansylchloridu, hydrofobní deriváty aminů byly pak následně extrahovány 3 krát 1 ml diethyletheru. Organická fáze byla odpařena dosucha dusíkem a vzniklý odparek byl rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu (ACN).

Roztok byl zfiltrován přes nylonový membranový filtr 0,45  $\mu\text{m}$  a nastříknut na chromatografickou kolonu. BA byly separovány pomocí kapalinového chromatografu HP 1100 (Agilent Technologies, Wilmington, USA) složeného z kvartérní pupy (G1311A), vakuového degaseru (G1322A), autosampleru (G1313A) a UV/VIS detektoru s proměnou vlnovou délkou (G1314A). Separace po derivatizaci DCL byla provedena pomocí gradientové eluce  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  na koloně Zorbax Elipse XDB C18 s předkolonou Meta Gard ODS-2 při průtoku  $0,8 \text{ ml min}^{-1}$  s použitím fotometrického UV/VIS detektoru při 245 nm. Byly stanoveny biogenní aminy: tyramin, histamin, phenylethylamin, kadaverin a polyaminy: putrescin, spermin a spermidin. Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny metodou jednoduchého třídění analýzy rozptylu (v programu Statistika verze 9 StatSoft.).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Obsah BA ve vstupní surovině je uveden na Obr.1. Množství jednotlivých stanovovaných BA se pohybovala okolo  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$ , výjimku tvořil histamin jehož hodnota překročila  $4 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Celková suma BA ve vstupní surovině byla  $9,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Obr.1 Obsah biogenních aminů ve vstupní surovině

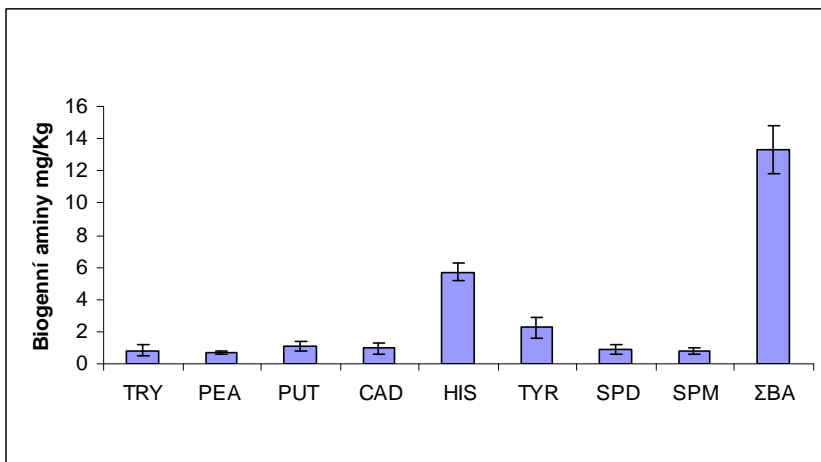


TRY - tryptamin, PEA - fenyletylamin, PUT - putrescin, CAD - kadaverin, HIS - histamin, TYR - tyramin, SPD - spermidin, SPM - spermin, ΣBA – Suma biogenních aminů

Obsah BA ve vzorcích po nasolení tvarohu je znázorněn na Obr.2. U jednotlivých biogenních aminů docházelo k mírnému navýšení

(o  $0,08 - 0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), výrazněji vzrostl pouze obsah tyraminu a histaminu. Jako příčinu vyšší četnosti otrav biogenními aminy uvádí KALACĚ et KŘÍŽEK (2005) vysoké obsahy tyraminu a nebo histaminu. Vyšší obsahy těchto aminů jsou v sýrech zrajících pod mazem a v sýrech poloměkkých a plísňových.

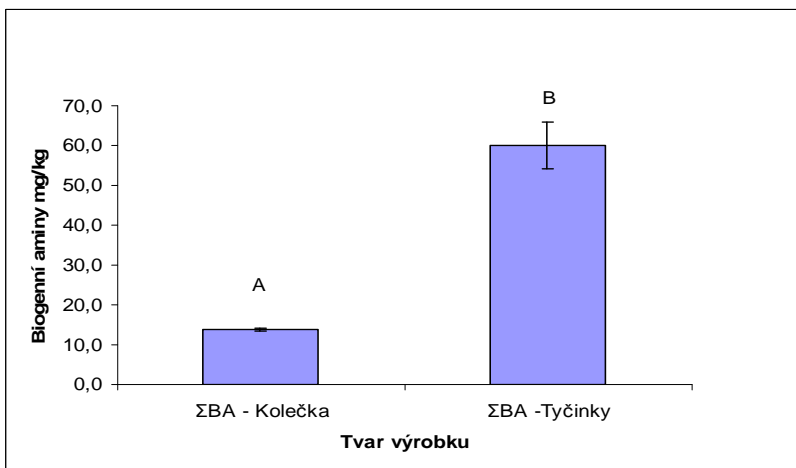
Obr.2 Obsah biogenních aminů v surovině po nasolení



TRY - tryptamin, PEA - fenyletylamin, PUT - putrescin, CAD - kadaverin, HIS - histamin, TYR - tyramin, SPD - spermidin, SPM - spermin, ΣBA – Suma biogenních aminů

Porovnáním dvou různých tvarů výrobků (Obr.3) jsme prokázali ( $P < 0,05$ ) vyšší obsah sumy BA u tyčinek.

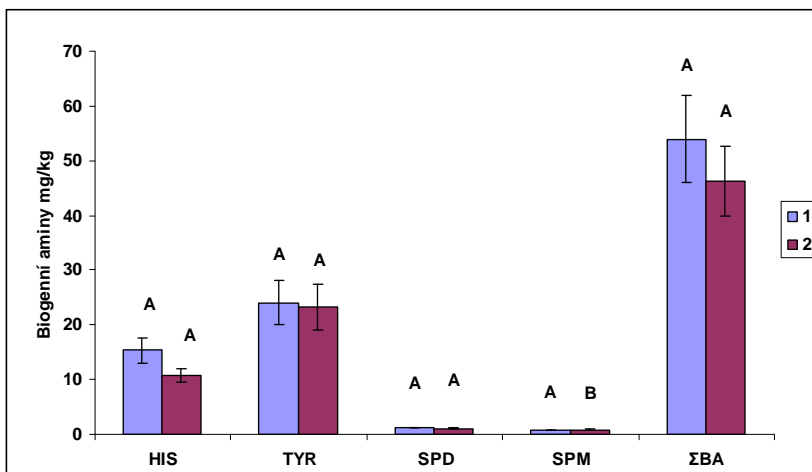
Obr.3 Vliv tvaru výrobků na obsah biogenních aminů



Průměry označené různými písmeny (A,B) se pro dané aminy průkazně liší ( $P < 0,05$ )

Sýry zrající pod mazem jsou po formování umístěny do zraticích místností. Součástí našeho experimentu bylo také zjištění vlivu umístění výrobku ve zraticích místnostech na obsah BA. Stojan 1 byl umístěn co nejdále od dveří a stojan 2 naopak co nejbliže. Z Obr.4 plyne, že vzorky zrající dále ode dveří (1) jevíly tendenci ( $P > 0,05$ ) k vyšším obsahům BA ve srovnání se vzorky zrajícími blíže dveří (2). V případě sperminu byl tento rozdíl průkazný ( $P < 0,05$ ).

Obr.4 Vliv umístění výrobků ve zraticích místnostech na obsah biogenních aminů



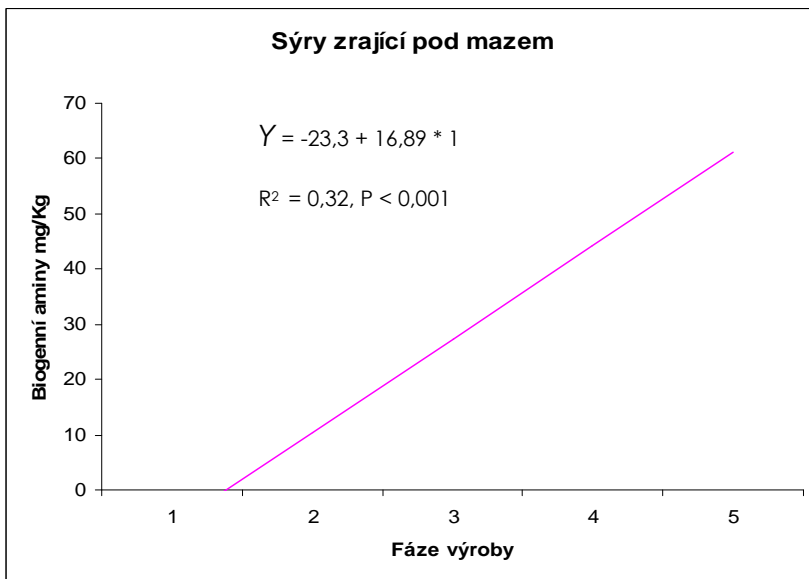
HIS - histamin, TYR - tyramin, SPD - spermidin, SPM - spermin, ΣBA – Suma biogenních aminů

Průměry označené různými písmeny (A,B) se pro daný amin průkazně liší ( $P < 0,05$ )

1 - stojan stojící ve zraticích místnostech co nejdále od dveřím, 2- stojan stojící ve zraticích místnostech co nejbliže u dveřím,

K nejdůležitějším faktorům ovlivňujícím množství BA ve fermentovaných výrobcích patří doba skladování patří doba skladování: s rostoucí dobou skladování se obsah BA v potravě zvyšuje (KOMPRDA,2005). V souladu s tímto zjištěním docházelo i v našem experimentu v průběhu výrobního procesu u sýrů zrajících pod mazem ke zvyšování obsahu BA (Obr.5). Ani ve fázi výroby 5 však ani obsah histaminu ani obsah tyraminu nepřekročili toxikologický limity (100 mg/kg).

Obr.5 Obsah biogenních aminů v průběhu výroby



1 - vstupní surovina, 2 – vstupní surovina po nasolení, 3 – formování, 4 – po sušení a odvětrání, 5 – po zrání (před balením výrobku)

## ZÁVĚR

Sýry jsou dobrým substrátem pro tvorbu biogenních aminů, ale minimální výskyt otrav z nich ukazuje, že při zachování správných technologických postupů se možnosti tvorby BA minimalizují (Gorner et. Valík, 2004). V našem experimentu bylo potvrzeno, že obsah biogenních aminů během výrobního procesu narůstal avšak toxikologicky významné BA (histamin, tyramin) nepřekročily hodnoty

100 mg.kg<sup>-1</sup>. Suma obsahu BA ve vstupní surovině byla 9,7 mg.kg<sup>-1</sup>. Z toho hodnota histaminu dosáhla 4 mg.kg<sup>-1</sup>, zatímco ostatní sledované BA se pohybovaly okolo hodnoty 1mg.kg<sup>-1</sup>. Bylo statisticky prokázáno (P< 0,05), že obsah BA byl ovlivněn tvarem výrobku, což se výrazně projevilo na konci zrání (před balením výrobků), kdy se hodnoty BA u tyčinek a koleček lišily u některých BA až o desítky mg.kg<sup>-1</sup>. Vliv umístění sýrů ve zracích místnostech na obsah BA se neprokázal, i když hodnoty ze stojanů **1** jevíly tendenci k vyšším hodnotám (P>0,05).

**LITERATURA**

Bover-cid, S., Huga, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. (2000): Amino-acid decarboxylase aktivity of bakteria izolátér from fermented pork sausages. InternationalJ. Food Mikrobiology, vol. 6, p. 185-189

Gorner, F., Valík, L.: Aplikovaná mikrobiologie poživatin, Malé centrum Bratislava 2004, 528 stran

Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms. Trends Food Sci Technik ;5:42-49

Kalač, P., Křížek, M.(2002): Biogenní aminy a polyamidy v potravinách, Výživa a potraviny 12 - 13:53-56

Kalač, P., Křížek, M.(2005): Biogenní aminy a polyamidy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví, Výživa a potraviny 40 – 42:53-56

Komprda, T.: Obecná hygiena potravin, MZLU v Brně, 146 stran

Roig-Sagués, A. X., Molina, A. P., Hernández-Herrero, M. (2002): Histamine and tyramine forming microorganisms in Spanish traditional cheese .Eur Food Res Technol;25:95-100.