

VÝSKYT RODU *Lactobacillus* A BIOGENNÍCH AMINŮ V LABORATORNĚ VYROBENÉ MAJONÉZE A TATARSKÉ OMÁČCE

JANA FIALOVÁ^a, JANA CHUMCHALOVÁ^b,
KAMILA MÍKOVÁ^c, MÁRIA GREIFOVÁ^d
a GABRIEL GREIF^d

^a Ústav technologie mléka a tuků, ^b Ústav chemie ochrany prostředí, ^c Ústav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^d Ústav biotechnologie a potravinářství, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
jana.chumchalova@vscht.cz

Došlo 10.10.11, přijato 22.11.11.

Klíčová slova: *Lactobacillus*, biogenní aminy, majonéza, tatarská omáčka

Úvod

Majonéza je pravděpodobně jedna z nejstarších a nejvíce používaných studených emulgovaných omáček na světě. Používá se buď samostatně jako zdobící prvek nebo je výchozí surovinou pro výrobu lahůdkářských výrobků (různé pomazánky, saláty, omáčky). Tradiční majonéza^{1–3} je emulze olej ve vodě (o/v) a je směsí oleje, vody, žloutku (vajec), octa a koření (zejména hořčice) s obsahem tuku 680–820 g kg⁻¹. V současné době, se změnami stravovacích návyků konzumentů, je trend výrobců vyrábět majonézy se sníženým obsahem tuků (250–500 g kg⁻¹ tuku), což způsobuje nižší mikrobiální stálost výrobku díky vyššímu obsahu dostupné vody ve výrobku.

Mezi mikroorganismy, které se mohou množit v majonéze a podobných výrobcích, a tak nežádoucím způsobem měnit jejich vlastnosti, patří bakterie, kvasinky a plísně. V poslední době převažuje názor, že kažení výrobků je způsobeno hlavně bakteriemi mléčného kvašení (BMK), především rodem *Lactobacillus*^{3–5}. Ačkoliv BMK jsou zdravotně nezávadné, představují pro výrobce problém, jelikož v důsledku své metabolické činnosti v průběhu doby skladování výrobku negativně ovlivňují jeho sensorické vlastnosti (tvorba pachutí, pachů, plynu a změna konzistence), a tím výrazně zkracují dobu trvanlivosti. Na základě experimentálních měření bylo zjištěno, že maximální sensoricky přípustná koncentrace BMK ve výrobku je 10³ KTJ g⁻¹ (kolonie tvořící jednotku). Tato hodnota však nemusí být platná pro všechny rody BMK, v našem případě tuto hodnotu považujeme za limitní pro všechny rody BMK³.

Jedním z dalších nežádoucích projevů činnosti BMK ve výrobcích může být přítomnost biogenních aminů, jelikož BMK jsou známy schopností produkovat biogenní aminy, zejména tyramin v průběhu kažení potravin⁶. Biogenní aminy (BA) jsou látky zásaditého charakteru, přirozeně se vyskytující v přírodě. Jsou to organické báze rozmanité struktury s nízkou molekulovou hmotností, syntetizované mikrobiálním, rostlinným a živočišným metabolismem. Dnes je známo asi 40 sloučenin, z nichž neznámější jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin a tryptamin. Biogenní aminy jsou obsaženy zejména v rybách a rybích produktech, v sýrech, masu a fermentovaných potravinách⁷. Dále pak v pivu, vínu, ovoci, zelenině, ořechách a čokoládě^{8,9}. V ČR je legislativně stanovený obsah histaminu v rybách a rybích výrobcích 100 mg kg⁻¹, pro tyramin toto omezení neexistuje¹⁰. Přijatelný obsah tyraminu v potravině se udává v rozmezí 100–800 mg kg⁻¹. Přestože hladiny aminů v potravinách obvykle nedosahují toxické hodnoty, může být jejich výskyt problematický, jelikož aminy jsou přítomny v mnoha potravinách. Výsledně jejich konečná koncentrace při příjmu potravin může v některých případech přesáhnout bezpečnou hladinu a vyvolat alergickou reakci¹¹.

Cílem této práce bylo popsat výskyt laktobacilů v laboratorně vyrobené majonéze a tatarské omáčce v průběhu skladování při teplotě skladování 15 °C (maximální legislativně povolená teplota skladování¹²) a podat prvotní informace o výskytu biogenních aminů – histaminu a tyraminu – ve vyrobených omáčkách.

Experimentální část

Materiál a metody

Výroba majonézy a tatarské omáčky

Majonéza a tatarská omáčka byla vyrobena ve výrobě Stephan UMC 5 Electronic při pokojové teplotě a za vakua, dle podnikových THN (technicko-hospodářské normy). Po smíchání všech složek následovalo rozplnění do vaniček a skladování při teplotě 15 °C. V průběhu skladování byly omáčky hodnoceny sensoricky a dále byl sledován celkový počet laktobacilů. Biogenní aminy byly stanoveny na konci doby skladování omáček.

Výsledné složení majonézy: voda, olej (obsah 40 hm.%), ocet, sušený žloutek, modifikovaný škrob, sůl, cukr, hořčice, stabilizátor a sorban draselný (konzervant).

Výsledné složení tatarské omáčky: voda, olej (obsah 49,5 hm.%), zeleninový základ, sušený žloutek, modifikovaný škrob, kyselina chlorovodíková, stabilizátor a sorban draselný (konzervant).

Stanovení celkového počtu laktobacilů

Do Erlenmayerovy baňky s 90 ml fyziologického roztoku o pH 7,0 bylo převedeno 10 g promíchaného vzorku, vše bylo následně zhomogenizováno důkladným protřepáním. Poté byla potřebná ředění vytvořena obvyklým desítkovým ředěním¹³.

Na petriho misku byla napipetována suspenze vhodného desítkového ředění o objemu 1 ml a přelita rozehřátým MRS agarem (de Man, Rogosa and Sharpe), který byl vytvořen z MRS bujónu (BK070, firma Biokar, Francie) a z bakteriologického agaru (L11, firma Oxoid, UK). Obsah misky byl poté důkladně promíchán a ponechán zatuhnout. Po kultivaci v Anaerostatu (Sanyo, Japonsko) při 37 °C po dobu 72 hodin anaerobně byly odečteny typické kolonie a spočítány kolonie laktobacilů ve vzorku¹⁴.

Stanovení aktivní kyselosti

Aktivní kyselost (pH) byla měřena na laboratorním pH-metru 3020 (Jenway, UK) se skleněnou elektrodou při pokojové teplotě.

Senzorické hodnocení vyrobených omáček

Změny senzorických vlastností vyrobených omáček (textury, pachu a barvy) byly v průběhu skladování hodnoceny smyslově.

Výpočet CIMSCEE rovnice¹⁵

Pro odhadnutí mikrobiální stability vyrobené majonézy a tatarské omáčky z hlediska výskytu laktobacilů byla použita CIMSCEE (Comité des Industries des Mayonnaises et Sauces Condimentaires de la Communauté Économique Européenne) rovnice:

$$\Sigma s = 15,75 (1-\alpha) (\% \text{ kyseliny octové}) + 3,08 (\% \text{ NaCl}) + (\% \text{ hexosy}) + 0,5 (\% \text{ disacharidů}) + 40 (4,0-\text{pH})$$

kde $(1-\alpha)$ je podíl kyseliny octové, která je v nedisociované formě a je vypočtena dle rovnice:

$$\text{nedisociovaná forma kyseliny} = 10 / (10^{\text{pH}-\text{pK}'_a} + 1)$$

$$\text{pK}'_a = \text{pK}_a - 2[(A \sqrt{I}) / (1 + 1,5 \sqrt{I})] + 0,175I$$

kde A je Debye-Hückel koeficient, I je molální iontová síla roztoku.

Za mikrobiálně stabilní výrobek je považován výrobek s hodnotou $\Sigma s > 63$.

Výpočet intervalu spolehlivosti průměru¹⁶

Interval spolehlivosti průměru byl spočítán s předpokladem, že správná hodnota leží s vysokou pravděpodobností v intervalu $(1-\alpha)$. Tento interval se nazývá $100(1-\alpha)$ procentní interval spolehlivosti, kde hodnota α je hladinou významnosti a $(1-\alpha)$ je koeficient spolehlivosti. Interval spolehlivosti průměru byl vypočten dle rovnice:

$$L_{1,2} = x \pm s(t_{\alpha}/\sqrt{n})$$

kde L_1 je dolní mez intervalu spolehlivosti, L_2 je horní mez intervalu spolehlivosti, x je aritmetický průměr měřených hodnot, s je směrodatná odchylka, t_{α}/\sqrt{n} je kritická hodnota studentova rozdělení.

Interval spolehlivosti průměru byl počítán z menšího počtu výsledků ($n < 50$), a proto bylo užito Studentova rozdělení. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ je hodnota koeficientu t_{α}/\sqrt{n} pro $n=3$ rovna 4,303 (cit.¹²).

Stanovení biogenních aminů pomocí HPLC

Příprava vzorků

K 10 g vzorku testované omáčky bylo přidáno 30 ml 5% trichloroctové kyseliny, směs byla důkladně promíchána a nechána stát přes noc v chladu (4 °C) pro oddělení fázi. Fáze obsahující trichloroctovou kyselinu s rozpuštěnými biogenními aminy byla odebrána a odstředěna při 7000 ot min⁻¹ po dobu 15 min. Tento krok byl opakován 2×. Fáze s trichloroctovou kyselinou (600 μl) byla smíchána s 200 μl NaCO₃ (nasycený roztok) a 200 μl deionizované vody (aminy jsou v zásaditém prostředí nedisociovány) a poté byl přidán 1 ml acetonitrilu, vše bylo opět důkladně promícháno. Následně bylo přidáno 100 μl dansyl chloridu (rozpuštěný v acetonu, 50 mg ml⁻¹), směs byla důkladně promíchána a inkubována na vodní lázni při 40 °C po dobu 1 hodiny za neustálého míchání. K odstranění přebytečného dansyl chloridu byl použit roztok glutamátu sodného (50 mg ml⁻¹), který byl přidán v objemu 100 μl, směs byla důkladně promíchána a inkubována na vodní lázni při 40 °C po dobu 1 hodiny za neustálého míchání. Po inkubaci byla směs ochlazená na 20 °C, poté byl přidán 1 ml ethyl esteru kyseliny octové a směs byla promíchána (extrakce biogenních aminů do organické fáze). Organická fáze (vrchní fáze) byla následně oddělena od vodné fáze. Organická fáze (100 μl) byla přenesena do čisté zkumavky obalené v alobalu a doplněna na 1 ml methanolem. Takto připravená směs byla dávkována na kolonu. Se vzorky se současně zpracovával standard odpovídajícího biogenního aminu. Přítomnost histaminu nebo tyraminu ve vzorku byla zjišťována porovnáním elučního času analytu s elučním časem standardu příslušného aminu. Množství biogenního aminu bylo úměrné ploše daného píku.

Použitá aparatura

Pumpa DeltaChromTM SD 030 (Watrex, Bratislava, SR); dávkovač LCI 30 s dávkovací smyčkou 20 μl (Laboratorní přístroje, Praha, ČR); UV detektor Applied Biosystems 759A ($\lambda = 210$ nm) (San Diego, CA, USA); termostat kolon (Watrex, Bratislava, SR); sběrač dat a zpracování výsledků DataApex (Praha, ČR).

Chromatografické podmínky

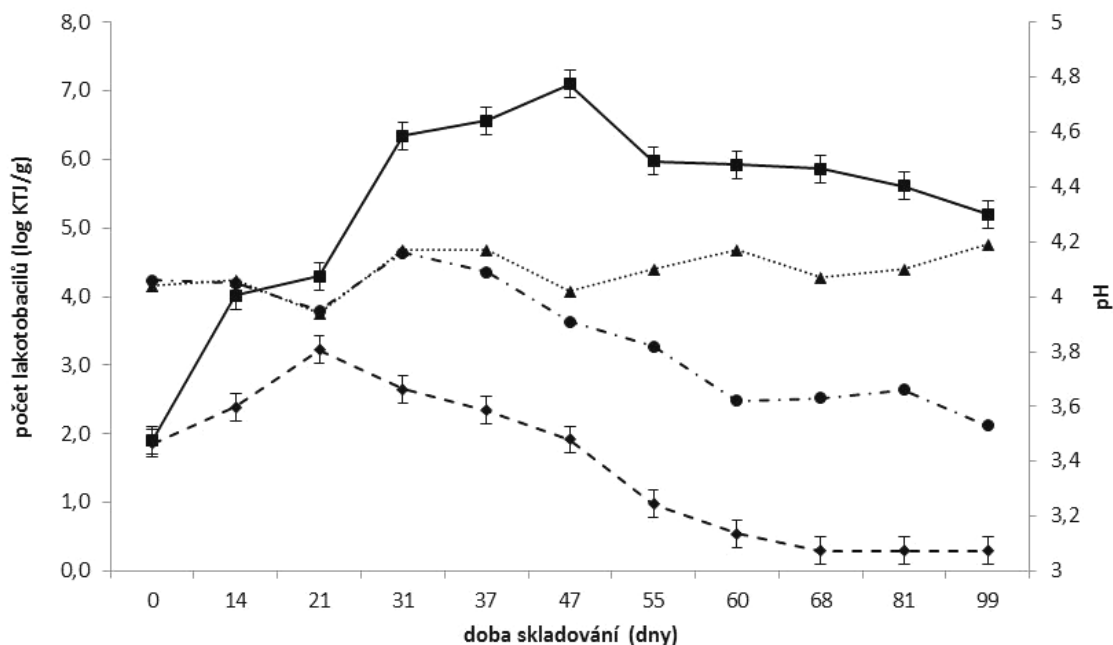
Analytická kolona Nucleosil C18 (250 × 4 mm) 5 μm; předkolonka Nucleosil C18 (50 × 4 mm) 5 μm, (Watrex, Bratislava, SR); mobilní fázi tvořila směs methanolu, acetonitrilu a vody v poměru 2:1:1 (v/v/v); průtok mobilní fáze 1,0 ml min⁻¹; teplota kolony 40 °C.

Výsledky a diskuse

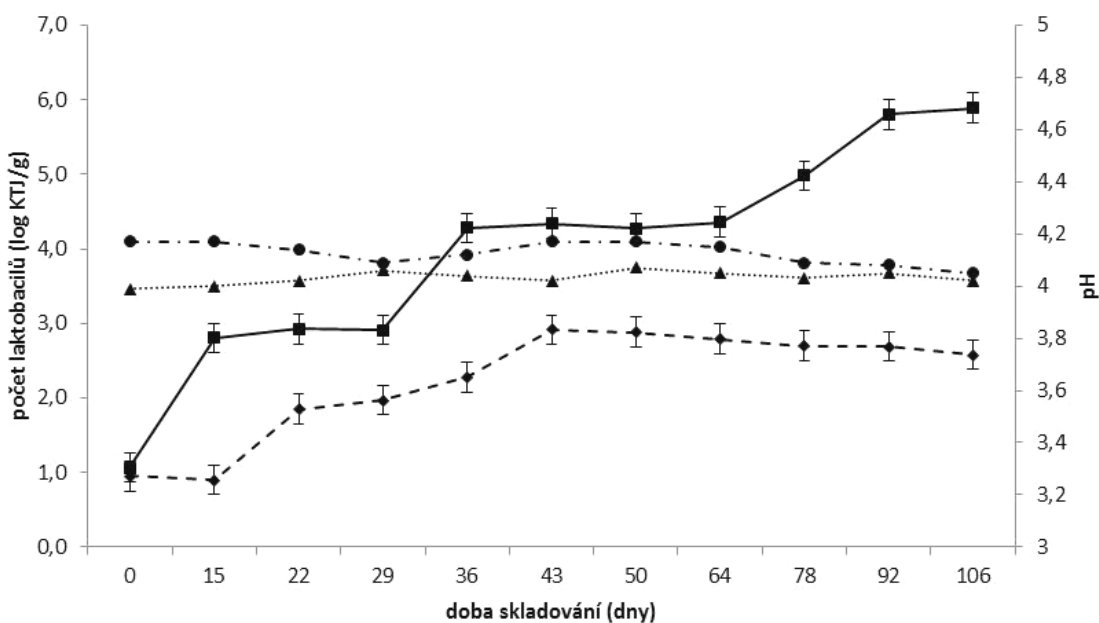
Byly vyrobeny dvě šarže majonézy a tatarské omáčky, vyrobené omáčky byly skladovány při teplotě 15 °C (maximální legislativně povolená teplota skladování) po dobu 99 resp. 106 dní. V průběhu skladování se ve vyrobených omáčkách hodnotily změny počtu laktobacilů v závislosti na době skladování. Dále se hodnotila změna

pH, změna sensorických vlastností jednotlivých omáček a mikrobiální stabilita výrobků dle CIMSCEE rovnice. Na konci doby skladování se v jednotlivých omáčkách zjišťoval obsah histaminu a tyraminu.

Na obr. 1 a 2 jsou uvedeny změny počtu laktobacilů a změny pH v průběhu skladování v jednotlivých omáčkách. Z jednotlivých obrázků vyplývá, že v majonéze a tatarské omáčce výroby č. 1 a 2 se zvýšil počet lakto-



Obr. 1. Počty laktobacilů a hodnoty pH v majonéze a tatarské omáčce výroby č. 1 v průběhu skladování; počet laktobacilů v tatarské omáčce (■), počet laktobacilů v majonéze (◆), pH tatarské omáčky (●), pH majonézy (▲)



Obr. 2. Počty laktobacilů a hodnota pH v majonéze a tatarské omáčce výroby č. 2 v průběhu skladování; počet laktobacilů v tatarské omáčce (■), počet laktobacilů v majonéze (◆), pH tatarské omáčky (●), pH majonézy (▲)

bacilů, senzoričky přijatelná hodnota laktobacilů (10^3 KTJ g^{-1}) ve výrobku byla ve všech případech překročena a lze říci, že laktobacily jsou schopny za daných podmínek růst, přežít a způsobovat kažení (změnu senzoričkových vlastností) majonézy a tatarské omáčky. Toto je v souladu s literaturou, dle studie⁵ jsou saláty obsahující majonézu převážně kaženy BMK s heterofermentativním metabolismem. U testovaných výrobců byly rovněž zjištěny změny senzoričkových vlastností. Také další studie^{4,17,18} poukázaly na rozvoj laktobacilů v majonéze a ve výrobcích obsahujících majonézu a tomu odpovídající kažení těchto výrobců. Růst laktobacilů v majonézových výrobcích podporuje nízký obsah kyslíku, nepřítomnost kompetitivní mikroflóry (kyselé prostředí potlačující růst dalších mikroorganismů) a vyšší skladovací teplota.

U tatarské omáčky v porovnání s majonézou bylo zjištěno rychlejší kažení výrobku, způsobené vyšším nárůstem laktobacilů. U majonézy resp. tatarské omáčky výroby č. 1 byla senzoričky přijatelná hodnota počtu laktobacilů ve výrobku dosažena v kratším čase (21. den resp. 14. den od výroby) než u majonézy resp. tatarské omáčky výroby č. 2 (senzoričky přijatelná hodnota počtu laktobacilů byla překročena 43. den resp. 22. den od výroby). Dále byly u omáček výroby č. 1 detegovány vyšší počáteční koncentrace laktobacilů (majonéza – $72,5$ KTJ g^{-1} , tatarská omáčka 81 KTJ g^{-1}) než u omáček výroby č. 2 (majonéza – $8,85$ KTJ g^{-1} , tatarská omáčka $11,6$ KTJ g^{-1}), z čehož lze usuzovat, že suroviny použité pro výrobu omáček č. 1 byly více kontaminovány laktobacily než suroviny použité při výrobě omáček č. 2. Tento předpoklad byl potvrzen analýzou výchozích surovin použitých pro jednotlivé výroby omáček, kdy byly v surovinách použitých při výrobě č. 1 nalezeny vyšší počty laktobacilů než u surovin použitých

při výrobě č. 2 (data neuvedena).

Změny senzoričkových vlastností (řidká konzistence, produkce plynu, zápach a oddělování vody) u tatarské omáčky výroby č. 1 byly zaznamenány 37. dne skladování, u majonézy resp. tatarské omáčky č. 2 byly zjištěny 43. resp. 36. den skladování.

Výpočtem rovnice CIEMSCEE lze předpovědět mikrobiální stabilitu finálního produktu z hlediska výskytu patogenních mikroorganismů ve výrobcích obsahující kyselinu octovou¹⁵. Tato rovnice byla použita pro odhadnutí chování laktobacilů ve vyrobených omáčkách. Dle CIEMSCEE rovnice je majonéza resp. tatarská omáčka obsahující běžný konzervant ocet mikrobiálně nestabilní produkt ($\Sigma s < 63$), viz tab. I.

Obsah histaminu a tyraminu byl sledován na konci doby skladování omáček metodou HPLC. Tato metoda byla úspěšně použita při zjišťování vlivu různých koncentrací NaCl a pH na produkci biogenních aminů *Enterobacter* spp., v modelových podmínkách¹⁹.

Rozdíly v obsahu histaminu a tyraminu v tatarské omáčce výroby č. 1 a č. 2 jsou zanedbatelné (viz tab. II). V případě majonézy nebyl histamin zjištěn ani u výroby č. 1 ani č. 2. Vyšší množství tyraminu ($2,3$ mg kg^{-1}) bylo detegováno v majonéze výroby č. 2. Je velmi pravděpodobné, že tyramin vznikl v majonéze v průběhu skladování výrobků (BMK jsou odpovědné za akumulaci tyraminu v průběhu kažení potravin⁶), jelikož majonéza a tatarská omáčka výroby č. 2 byly vyrobeny současně za použití stejných surovin.

Zjištěné množství histaminu a tyraminu ve vyrobených omáčkách je velmi malé a nepředstavuje riziko pro konzumenty. Toto je v souladu se studií²⁰, která také poukázala, že množství biogenních aminů v majonéze je malé. Ve studii se zabývali vlivem laktobacilů, s prokazatelnou produkcí biogenních aminů, na produkci biogenních aminů v majonéze, sledovém a tuňákovém salátě. Komerčně vyrobená majonéza byla kontaminována laktobacily v množství 10^7 KTJ g^{-1} s prokazatelnou produkcí biogenních aminů a to kadaverinu, putrescinu, tyraminu, fenylethylaminu a histaminu. Obsah všech aminů byl zjišťován po 24, 48, 72 a 96 hodinách inkubace při 30 °C. Po 24 hodinách inkubace nebyly sledované aminy detegovány s výjimkou nízké koncentrace tyraminu ($4,5$ mg kg^{-1}). Přídavek prekurzorů aminokyselin do zaočkováných majonéz zvýšil koncentraci putrescinu na 40 mg kg^{-1} , tyraminu na $16,5$ mg kg^{-1} a kadaverinu na $5,5$ mg kg^{-1} . Komerčně vyrobená majonéza, použitá jako kontrola bez zaočko-

Tabulka I

Výpočet Comité des Industries des Mayonnaises et Sauces Condimentaires de la Communauté Économique Européenne rovnice pro majonézu a tatarskou omáčku výroby č. 1 a 2

Výroba/typ výrobku	Σs	
Výroba 1	majonéza	17
	tatarská omáčka	9
Výroba 2	majonéza	23
	tatarská omáčka	26

Tabulka II

Obsah histaminu a tyraminu v majonéze a tatarské omáčce výroby č. 1 a č. 2 (mg kg^{-1})

	Omáčky výroby č. 1		Omáčky výroby č. 2	
	majonéza	tatarská omáčka	majonéza	tatarská omáčka
Histamin	ND ^a	$0,40 \pm 0,02$	ND ^a	$0,38 \pm 0,01$
Tyramin	ND ^a	ND ^a	$2,26 \pm 0,03$	$1,22 \pm 0,02$

^a ND – nedetegovatelné množství

vaných laktobacilů, neobsahovala po čtyřech dnech inkubace sledované biogenní aminy.

Závěr

V této práci byla potvrzena schopnost bakterií rodu *Lactobacillus* růst a přežívat v laboratorně vyrobené majonéze a tatarské omáčce. V závislosti na složení výrobků dochází k jejich pomnožení a svým rozvojem přispívají k nežádoucím změnám v sensorických vlastnostech výrobků.

Stanovením histaminu a tyraminu bylo zjištěno, že majonéza a tatarská omáčka nepředstavuje riziko pro konzumenty, obsah histaminu a tyraminu ve sledovaných omáčkách byl nízký.

Tato práce byla podpořena grantem MŠMT ČR, projekt CEZ: MSM 6046137303.

LITERATURA

- Depree J. A., Sabage G. P.: Trends Food Sci. Technol. 12, 157 (2001).
- Karas R., Skvarča M., Žlender B.: Food Technol. Biotechnol. 40, 119 (2002).
- Míková K.: Maso (příloha Lahůdka) 1, 5 (2002).
- Kurtzman C. P., Rogers R., Hesseltine C. W.: Appl. Microbiol. 21, 870 (1971).
- Erickson J. P., Bloom J. S., Mc Kenna D. N., Woodruff M. A.: J. Food Prot. 56, 1015 (1993).
- Bover-Cid S., Holzapfel W. H.: Int. J. Food Microbiol. 53, 33 (1999).
- Eerola S., Hinkkanen R., Lindorfs E., Hurvi T.: J. AOAC Int. 76, 575 (1993).
- Halász A., Barath A., Simon-Sarkadi L., Holzapfel W.: Trends Food Sci. Technol. 51, 42 (1994).
- Santos S. M. H.: Int. J. Food Microbiol. 29, 213 (1996).
- Vyhláška č.305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách, částka100, str. 6406.
- Finoli C., Vecchio A., Galli A.: Ind. Aliment. 2001, 15.
- Vyhláška 264/2003 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), g), h), i) a j) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich, str.10.
- ČSN EN ISO 6887-1: Mikrobiologie potravin a krmiv – Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobného ředění – Část 1: Všeobecné podmínky pro přípravu výchozí suspenze a desetinasobných ředění (září 1999).
- ČSN ISO 7218: Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné pokyny pro mikrobiologické zkoušení (březen 2008).
- Chapman B., Jensen N., Ross T., Cole M.: Appl. Environ. Microbiol. 72, 5165 (2006).
- Eckschlager K., Horsák I., Kodejš Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod, str. 32. SNTL, Praha 1980.
- Bonestroo M. H., Kusters B. J. M., de Wit J. C., Rombouts F. M.: Food Microbiol. 10, 110 (1993).
- Brocklehurst T. F., Lund B. M.: Food Microbiol. 1, 5 (1984).
- Greif G., Greifová M., Karovičová J.: J. Food Nutr. Res. 45, 21 (2006).
- Leuschner R. G., Hammes W. P.: Int. J. Food Sci. Nutr. 50, 159 (1999).

J. Fialová^a, J. Chumchalová^b, K. Míková^c, M. Greifová^d, and G. Greif^d (^a Department of Dairy and Fat Technology; ^b Department of Environmental Chemistry; ^c Department of Chemistry and Analysis of Food, Institute of Chemical Technology, Prague; ^d Department of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Technology, Bratislava): **The occurrence of the *Lactobacillus* Genus and Biogenic Amines in Mayonnaise and Tartar Sauce Prepared in Laboratory**

The occurrence of *Lactobacillus* genus was confirmed in the title products prepared in laboratory and stored at 15 °C. *Lactobacilli* were able to grow and survive in the tested products contributing to their spoilage. The maximum acceptable concentration of *lactobacilli* was exceeded in all the tested sauces. Lower amounts of *lactobacilli* were observed in mayonnaise. The contents of histamine and tyramine in the products were very low and not hazardous.