

THE DEVELOPMENT OF SCREENING METHOD FOR MONITORING OF BIOGENIC AMINES IN DECARBOXYLATION MEDIUM

VÝVOJ SCREENINGOVÉ METODY PRO MONITOROVÁNÍ VÝSKYTU BIOGENNÍCH AMINŮ V DEKARBOXYLAČNÍM MÉDIU.

Ježková A., Dohnal V.

Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: ala.jez@seznam.cz, dohnal@mendelu.cz

ABSTRACT

The development and application of new method for monitoring of decarboxylase activity of microorganisms that were isolated from samples of Eidam cheese were our aim. With regard to a high number of required assays and long time of existing method for biogenic amines determination (40 – 45 minutes) a new faster screening method was necessary to developed. This method is based on use of high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. It originated from established method for biogenic amines determination. The analyses are realized on a short chromatography column filled with small particles (1,2 µm) thereby the analyse's time decreased to 4 – 5 minutes (10-times) with approximately similar detection limits. Obtained results were used as verification for PCR method for detection of tyramine producing microorganisms.

Key words: biogenic amines, tyramine, HPLC

ABSTRAKT

V této práci byla vyvinuta a aplikována nová metoda pro rychlý monitoring dekarboxylázové aktivity mikroorganismů izolovaných ze vzorků sýru eidamského typu. Vzhledem k vysokému počtu požadovaných rozborů a časové náročnosti stávající analytické metody (40 – 45 minut), bylo nutné vyvinout novou rychlejší screeningovou metodu. Ta je opět založena na využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s fluorescenční detekcí a vznikla modifikací již zavedené metody stanovení biogenních aminů. Analýza probíhá na krátké chromatografické koloně naplněné malými částicemi (1,2 µm), čímž se doba potřebná k analýze zkrátila na 4 – 5 minut (tedy 10-ti násobně) při zachování přibližně stejného limitu detekce. Získané výsledky byly využity jako verifikace při zavádění PCR metody pro detekci mikroorganismů potenciálně tvořících tyramin.

Klíčová slova: biogenní aminy, tyramin, HPLC

ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické látky pro člověka nepostradatelné. Některé z nich jsou tkáňovými hormony, stavebními látkami pro syntézu dalších hormonů, fytohormonů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů rostlin (CWIKOVÁ O.,2006).

Ve vyšších množstvích se biogenní aminy vyskytují ve fermentovaných potravinách (kysané zelí, zrající uzeniny, sýry, některá červená vína) (www.agronavigator.cz), kde vznikají mikrobiální dekarboxylací aminokyselin a transaminací aldehydů a ketonů (INNOCENTE N.,2006). Běžně neznamenají biogenní aminy pro zdravé osoby žádný problém. Škodlivý vliv se může projevit při příjmu určitých léčiv – psychofarmak a v případě zhoršené funkce jater, kdy je porušen proces štěpení biogenních aminů.

Příliš vysoké hladiny biogenních aminů v potravinách jsou známkou kažení a mohou se vyskytovat především v rybách a v mase během skladování (histamin, kadaverin, putrescin, tyramin), v sýrech a také při nevhodném skladování ovoce, zeleniny a hub (především tyramin) (www.agronavigator.cz). Nejmarkantnější symptomy konzumace vysokých dávek biogenních aminů jsou zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypo- nebo hypertenze (histamin) a migrény (tyramin) (SMĚLÁ D.,2004). Nejčastějšími producenty biogenních aminů jsou mikroorganismy z rodů *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Proeus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* (CWIKOVÁ O.,2006).

MATERIÁL A METODIKA

Během práce byly analyzovány dva sýry eidamského typu od různých producentů (označené R a H) o tučnostech 30 a 45% při požití dvou různých startovacích kultur (Y, L). Odběry pro mikrobiologickou analýzu probíhaly v měsíčních intervalech v období od listopadu 2005 do května 2006 a od každého druhu sýra byl analyzován jeho okraj a střed. Přítomné mikroorganismy byly kultivovány a přeočkovávány dokud nebyly získány čisté kolonie. Na dekarboxylačním mediu s obsahem tyrosinu pak byly mikroorganismy odebrané z těchto kolonií dále kultivovány a testovány na dekarboxylační aktivitu, konkrétně dekarboxylaci tyrosinu za vzniku biogenního aminu tyraminu. Při úpravě vzorku se vycházelo z postupu (BOVER-CID S.,1999), jež zahrnuje centrifugaci dekarboxylačního média (Hettich Universal 32R, Německo) s následným přidáním 0,1 M roztoku kyseliny chlorovodíkové a roztoku vnitřního standardu (1,7-diaminoheptan) Směs byla promíchána na vortexu (MS2 Minishaker, IKA Werke, Německo) a opět centrifugována a zfiltrována přes 0,45 µm nylonový membránový filtr. Připravený vzorek byl uchováván při -20°C až do analýzy. Před samotnou analýzou proběhla derivatizace 0,5 µl vzorku orthoftalaldehydem (OPA, 2,5 µl) v borátovém pufru (pH 9,5) za přítomnosti 2-merkptoethanolu. Po 2 minutách byl derivatizovaný vzorek nadávkován na chromatografickou kolonu. Analýza byla realizovaná na kapalinovém chromatografu HP 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) vybaveném vakuovou odplyňovací jednotkou, kvartérním čerpadlem mobilní fáze, automatickým dávkovačem vzorků a fluorescenčním detektorem. V nově vyvinuté metodě jsme využili tzv. „rapid resolution high throughput“ kolonu (Agilent Eclipse XDB-C18 4,6 x

50 mm) s velmi malou velikostí částic (1,8 μ m) umožňující dosažení vysoké separační účinnosti i při vysokém průtoku mobilní fáze. Během vývoje metody bylo optimalizováno složení mobilní fáze. Nejlepší výsledky byly získány s gradientovou elucí. Parametry elučního programu jsou uvedeny v tabulce 1. Průtok byl oproti původní metodě zvýšen z hodnoty 0,6 ml/min na 1,2 ml/min. Stanovení probíhala při laboratorní teplotě a signál byl snímám fluorescenčním detektorem při λ_{Ex} = 330 nm a λ_{Em} = 440 nm.

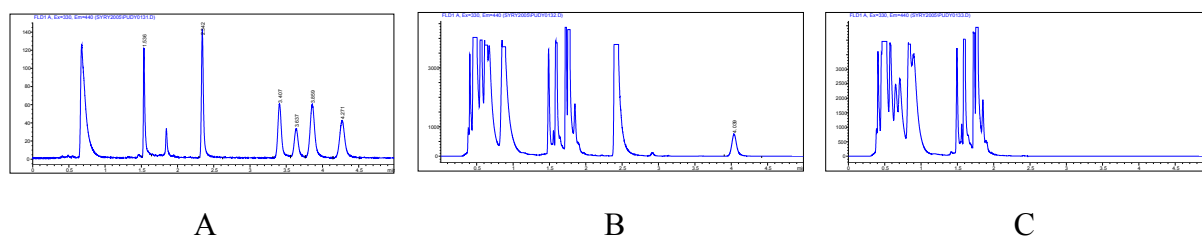
Tab. 1 Parametry lineárního gradientového elučního programu

Čas [minuty]	% acetátového pufru	% acetonitrilu
0,5	52	48
4,5	52	48
6	70	30
6,1	25	75

VÝSLEDKY A DISKUZE

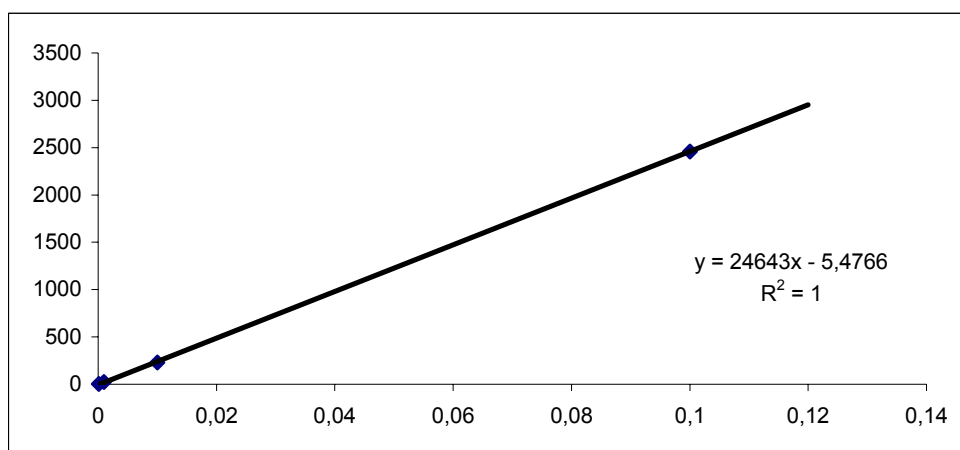
S použitím vyvinuté metody bylo možné provést stanovení biogenních aminů v době kratší než 5 minut, v případě nutnosti kvantifikace pak analýza trvala 6 minut. Ukázky chromatogramů jsou na obrázku 1.

Obr. 1 Ukázka chromatogramů standardu biogenních aminů (A), negativního vzorku půdy (B) a pozitivního vzorku půdy (C), získaných vyvinutou metodou.



Lineární odezva fluorescenčního detektoru byla u stanovení tyraminu ve vzorcích standardu pozorována v rozsahu koncentrací od 10 ng/ml do 0,1 mg/ml. Limit detekce 3 ng/ml je srovnatelný s původní metodou (0,74 ng/ml). Kalibrační funkcí byla lineární rovnice s regresním koeficientem vždy vyšším než 0,999, obrázek 2.

Obr. 2 Kalibrační křivka stanovení tyraminu



Vyvinutou metodou byly analyzovány vzorky dekarboxylačních médií, které vykazovaly pozitivní výsledek (změna pH) po kultivaci mikroorganismů. Získané výsledky rovněž potvrdily, že změnu pH média nelze považovat za dostatečný důkaz dekarboxylázové aktivity.

ZÁVĚR

V této práci byla vyvinuta nová rychlá chromatografická metoda pro sledování obsahu biogenních aminů ve vzorcích média po kultivaci mikroorganismů izolovaných ze sýrů eidamského typu. Analytické parametry metody jsou srovnatelné s klasickými HPLC metodami. Naměřené výsledky sloužily jako kontrola při vývoji a zavádění PCR metody pro detekci genu tyrosindekarboxylázy.

LITERATURA

Bover-Cid S. et al (1999): Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic bacteria. *Int. J. Food Micr.* 53, 33-41.

Cwиковá O. et al (2006): Mikrobiologické aspekty tvorba biogenních aminů ve zrající sýrech, XXXVI. Lenfeldovy a Höklovy dny, Konference o hygieně a technologii potravin, sborník, 44-47

Innocente N. et al (2006): Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food chemistry*, 110(3):1285-1289

Smělá D. et al (2004): Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování, *Chemické listy* 98, 432-437.

www.agronavigator.cz/az/vis.