

## FACTORS AFFECTED DECARBOXYLATION ACTIVITY OF *ENTEROCOCCUS FAECIUM* ISOLATED FROM RABBIT

Pavel Pleva, Leona Buňková, Andrea Lauková, Eva Lorencová, Vlastimil Kubáň, František Buňka

### ABSTRACT

Biogenic amines (BA) are basic nitrogenous compounds formed mainly by the decarboxylation of amino acids. There are generated in course of microbial, vegetable and animal metabolisms. The aim of the study was to monitor influencing factors of biogenic amine production by *Enterococcus faecium*, which is found in rabbit meat. Biogenic amines were analyzed by the means of UPLC (ultrahigh performance liquid chromatography) equipped with a UV/VIS DAD detector. Decarboxylation activity of *E. faecium* was mainly influenced by the cultivation temperature and by the amount of NaCl in this study. *E. faecium* produced most of the monitored biogenic amines levels: tyramine <2500 mg.l<sup>-1</sup>; putrescine <30 mg.l<sup>-1</sup>; spermidine <10 mg.l<sup>-1</sup> and cadaverine <5 mg.l<sup>-1</sup>.

**Keywords:** biogenic amines, *Enterococcus*, ultrahigh performance liquid chromatography

### ÚVOD

Biogenní aminy (BA) jsou organické dusíkaté sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, které lze podle chemické struktury rozdělit na aromatické (např. tyramin, 2-fenylethylamin), heterocyklické (např. histamin, tryptamin) a alifatické diaminy (např. putrescin, kadaverin) (Smělá et al., 2004). Biogenní aminy se vyskytují v mnohých tkáních a jsou součástí metabolických procesů buněk. Mají funkci prekurzorů syntézy proteinů, nukleových kyselin, hormonů i alkaloidů (Karovičová et al., 2005).

Biogenní aminy se vyskytují téměř v každé potravine, která obsahuje určité množství volných aminokyselin nebo proteinů podléhajících mikrobiální aktivitě. Činností mikrobiálních enzymů dochází k dekarboxylaci volných aminokyselin, čímž vznikají BA a polyaminy (Křížek, 1998). Nízká koncentrace BA může být lidským tělem tolerována, pokud jsou účinné detoxikační mechanismy ve střevním traktu. Na detoxikaci se podílí enzymy monoaminoxidázy a diaminoxidázy. Jestliže však nastane nadměrný příjem některého biogenního aminu, jsou katabolické cesty potlačeny a dochází k fyziologickým poruchám (Shalaby, 1996). Spanier et al. (1991) navrhuji tolerovatelné sumární množství BA (histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu) pro potraviny do 900 mg/kg. S množstvím biogenních aminů souvisí i nařízení ES č. 2073/2005, kde je uváděn limit pro histamin v rybách a výrobcích z ryb do 200 mg.kg<sup>-1</sup>.

U masa a masných výrobků patří mezi významné bakterie produkující BA (zejména histamin, kadaverin a putrescin) rody *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus* a zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*. Zároveň se tyto bakterie mohou lišit v produkci BA i o několik řádů (Shalaby, 1996). Je nemožné najít korelaci mezi obsahem biogenních aminů a počtem buněk (Halász et al. 1994).

Vliv podmínek vnějšího prostředí na tvorbu BA (např. teplota, pH, přístup kyslíku a množství NaCl), se liší i

v rámci kmenů stejného druhu (Křížek et al., 1998). Většina aminů je tepelně stálá, některé dekarboxylázy si však uchovávají aktivitu i po tepelném ošetření (např. pasteraci), takže obsah BA může dále růst i během skladování potraviny (Brink et al., 1990).

### MATERIÁL A METÓDY

#### Mikroorganizmus a kultivační podmínky

*Enterococcus faecium* M2C byl izolován z masa králíka a byl získán z Ústavu fyziologie hospodářských zvířat, Slovenské akademie věd v Košicích. Bakterie byly kultivovány v Brain Heart Infusion Broth (BHI; HiMedia) s aminokyselinami (histidin, ornitin, arginin, lyzin, tyrozin; Sigma-Aldrich) jako prekurzory testovaných biogenních aminů v koncentraci 0,2 % (w/v). Produkce biogenních aminů byla zkoumána v závislosti na teplotě (6±1°C a 30±1°C), dostupnosti kyslíku a koncentraci NaCl (0; 1; 2; 3 a 6 % w/v). Vliv dostupnosti kyslíku na produkci biogenních aminů byl sledován tak, že polovina zkumavek byla kultivována aerobně a druhá anaerobně, anaerobního prostředí bylo dosaženo zakápnutím média sterilním parafinovým olejem (1 ml; Pliva-Lachema). Každý izolát byl kultivován třikrát podle Buňková et al., (2009). Růst *E. faecium* byl sledován pomocí optické denzity ( $\lambda=600$  nm; Fotometr TECAN Sunrise TW/TC).

#### Stanovení biogenních aminů

Produkce 7 biogenních aminů (kadaverinu, CAD; histaminu, HIS; fenylethylaminu, PHE; putrescinu, PUT; tyraminu, TYR; spermidinu, SPD; a sperminu, SPN) byla stanovována pomocí ultra-vysoko účinné kapalinové chromatografie (UPLC) s binární pumpou (autosampler LabAlliance, Statr Colleges; kolona s termostatem; UV/VIS DAD detektor ( $\lambda=254$  nm); a degaser 1260 Infinity, Agilent Technologies).

Bujón po kultivaci testovaných bakterií byl centrifugován (4000 x g; 22±1 °C; 20 minut; EBA 20, Hettich) a získaný supernatant byl zředěn v poměru 1:1 (v/v) kyselinou

chloristou ( $c = 1.2 \text{ mol.l}^{-1}$ ). Směs byla filtrována (porozita filtru  $0.45 \mu\text{m}$ ) a filtrát byl podroben derivatizaci dansylchloridem podle **Dadáková et al., (2009)**. Jako interní standard byl použit 1,7-heptandiamin. Derivatizované vzorky byly po danzylaci opět filtrovány (porozita  $0.22 \mu\text{m}$ ) a nanášeny na kolonu (Cogent HPLC Column HPS C18,  $150 \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ). Podmínky separace sledovaných biogenních aminů jsou popsány v **Smělá et al., (2004)**. Každý ze tří supernatantů (pro jeden testovaný mikroorganismus) byl derivatizován dvakrát a každá derivatizována směs nanášena na kolonu ve dvojnásobném opakování ( $n = 12$ ).

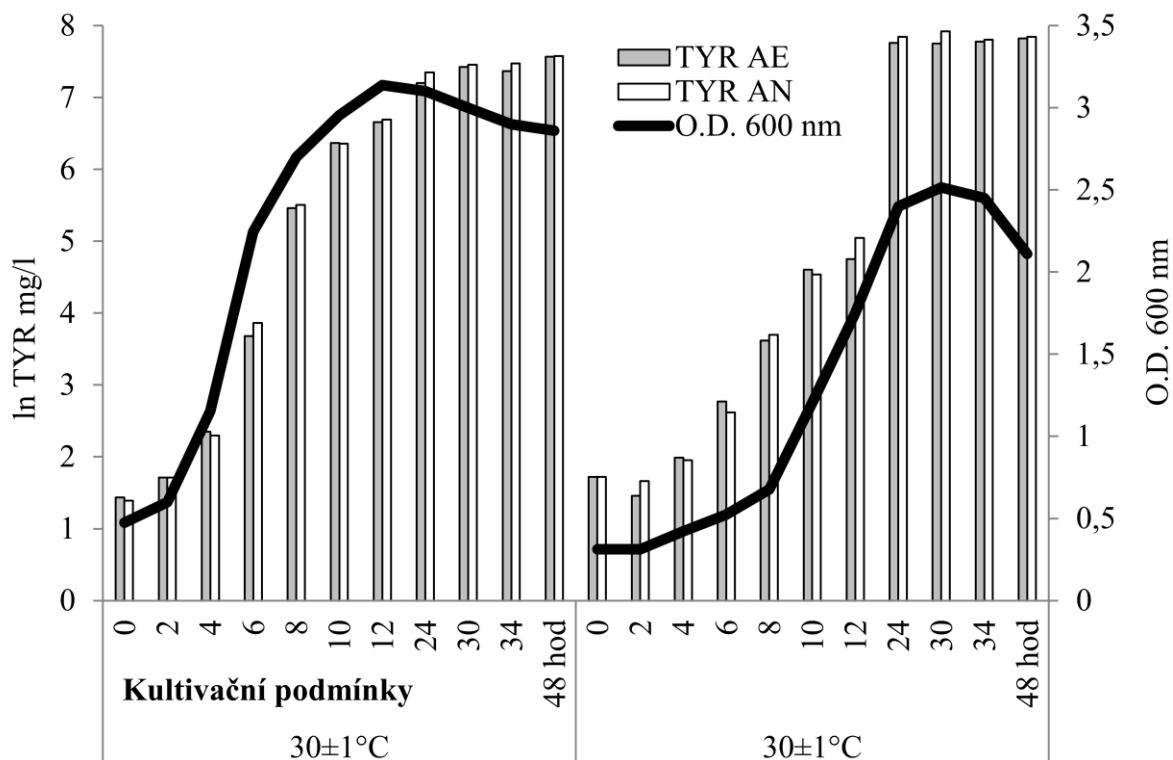
### VÝSLEDKY A DISKUZE

Schopnost tvorby biogenních aminů rodem *Enterococcus* potvrdil předcházející skrínig (**Pleva et al., 2011**). Na základě těchto výsledků byl pro další studii vybrán kmen *E. faecium* M2C schopný produkce tyraminu, putrescinu, kadaverinu, fenylethylaminu a spermidinu. U tohoto kmene byly v modelových podmínkách sledovány vybrané faktory, u kterých existuje předpoklad, že jsou schopny ovlivňovat produkci BA ( $\text{NaCl } 0 - 6\%$  (w/v); aerobní/ anaerobní prostředí, kultivační teplota  $6 \pm 1^\circ\text{C}$  a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Tyto faktory byly voleny tak, aby se přiblížily podmínkám zpracování a skladování masa a masných výrobků.

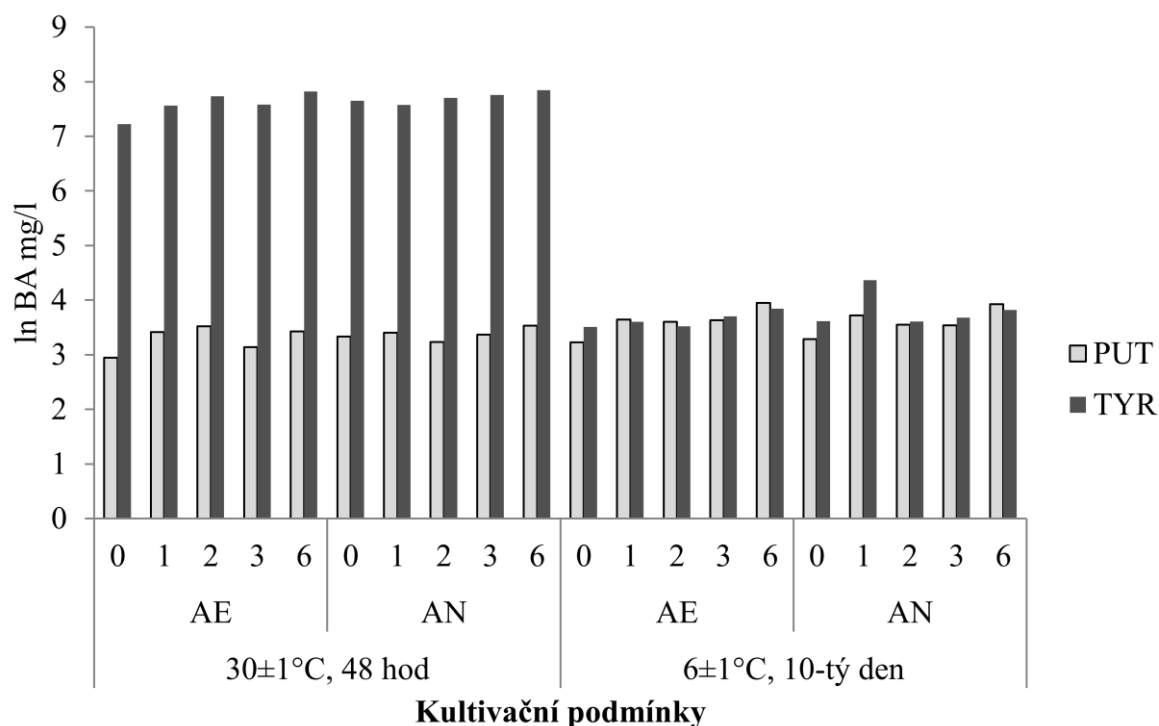
Tvorba biogenních aminů za aerobních i anaerobních podmínek se v čase zvyšovala. Biogenní aminy po 16 dnech kultivace při  $6 \pm 1^\circ\text{C}$  za aerobních podmínek

dosahovaly následujících hodnot: TYR  $<50 \text{ mg/l}$ ; PUT  $<40 \text{ mg.l}^{-1}$ ; SPD  $<25 \text{ mg.l}^{-1}$  a za anaerobních podmínek TYR  $<80 \text{ mg.l}^{-1}$ ; PUT  $<50 \text{ mg.l}^{-1}$ ; SPD  $<20 \text{ mg.l}^{-1}$ . Při  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  byla po 48 hodinách kultivace (obr. 1) zjištěna vyšší produkce BA: aerobně TYR  $<2500 \text{ mg.l}^{-1}$ ; PUT  $<30 \text{ mg.l}^{-1}$ ; SPD  $<10 \text{ mg.l}^{-1}$  a CAD  $<5 \text{ mg.l}^{-1}$ ; anaerobně TYR  $<2250 \text{ mg.l}^{-1}$ ; PUT  $<30 \text{ mg.l}^{-1}$ ; SPD  $<7 \text{ mg.l}^{-1}$ ; CAD  $<5 \text{ mg.l}^{-1}$ . Rozdíl v množství vytvořených BA je dán především vlivem anaerobního prostředí, které může růst *E. faecium* zpomalovat.

Tvorba biogenních aminů je ovlivněna především růstovou fází buněk, tedy množstvím a aktivitou bakterií *E. faecium* v médiu. Při  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  byla zřetelná významná produkce BA již po hodině kultivace (TYR  $5,91 \pm 0,13 \text{ mg.l}^{-1}$ ; PUT  $41,93 \pm 6,53 \text{ mg.l}^{-1}$ ; CAD  $4,16 \pm 0,59 \text{ mg.l}^{-1}$ ; SPD  $5,32 \pm 0,12 \text{ mg.l}^{-1}$ ; PHE  $2,99 \pm 0,03 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Po 48 hodinové kultivaci bylo množství BA následující: TYR  $1650 \pm 118 \text{ mg.l}^{-1}$ ; PHE  $7,60 \pm 0,20 \text{ mg.l}^{-1}$ ; PUT  $35,30 \pm 1,05 \text{ mg.l}^{-1}$ ; CAD  $5,00 \pm 0,12 \text{ mg.l}^{-1}$ ; SPD  $5,00 \pm 0,10 \text{ mg.l}^{-1}$ . Ze studovaných faktorů měla na růst a dekarboxylázovou aktivitu vliv především teplota (obr. 2), která je schopna zpomalit buněčný růst, prodloužit generační dobu a úměrně tomu i tvorbu BA. Dekarboxylázová aktivita *E. faecium* při teplotě  $6 \pm 1^\circ\text{C}$  v prvním až 16 dnů byla řádově obdobná. Nejvyšší zaznamenaný nárůst produkce tyraminu byl čtvrtý den (TYR  $83,22 \pm 11,93 \text{ mg.l}^{-1}$ ) od tohoto dne se produkce zpomalovala. Množství tvořeného spermidinu (SPD  $<25 \text{ mg/l}$ ) kontinuálně rostlo s dobou kultivace.



**Obr. 1** Produkce tyraminu u *E. faecium* M2C; při  $\text{pH}=7$ . Kultivační teplota  $30^\circ\text{C}$ , 1 % a 6 % NaCl. TYR AE – produkce v aerobním prostředí; TYR AN – produkce v anaerobním prostředí; O. D. (optická densita) měřena při 600 nm za aerobních podmínek.



**Obr. 2** Produkce tyraminu a putrescinu u *E. faecium* M2C při pH7. AE – aerobní prostředí; AN – anaerobní prostředí; 30 ± 1 °C po 48 hodinách a 6 ± 1 °C po 10-ti dnech kultivace; 0-6 – % koncentrace přidaného NaCl.

Množství NaCl ovlivňuje tvorbu BA významněji pouze u tyraminu, kdy byl znatelný rozdíl v produkci tyraminu při koncentracích do 3 % (TYR 1958 ± 201 mg.l<sup>-1</sup>) a nad 3% (w/v) koncentrací soli (TYR 2500 ± 67,8 mg.l<sup>-1</sup>) při 30 ± 1 °C. Koncentrace 6 % (w/v) NaCl výrazně inhibovala produkci tyraminu, a po 12 hodinách kultivace bylo množství vyprodukovaného tyraminu menší (TYR <110 mg.l<sup>-1</sup>), než u 3 % (w/v) NaCl, (TYR <1500 mg.l<sup>-1</sup>). Dá se tedy říci, že NaCl má do koncentrací 3 % (w/v) efekt akcelérátoru, zatímco přidavek 6 % (w/v) NaCl tvorbu BA zpomaluje. Putrescin byl tvořen *in vitro* za aerobních i anaerobních podmínek až od 4. dne kultivace u koncentrace NaCl <1 % (w/v) při 6 ± 1 °C, dále se produkce postupně zvyšovala za aerobních i anaerobních podmínek (41,51 ± 1,47 mg.l<sup>-1</sup>).

Obsah tyraminu, kadaverinu a fenylethylaminu se v bujónu po kultivaci *E. faecium* v čase zvyšoval. Množství vytvořeného spermidinu (max. SPD 23,48 ± 0,45 mg.l<sup>-1</sup>) a putrescinu (max. PUT 52,03 ± 2,48 mg.l<sup>-1</sup>) se po 16-ti dnech kultivace při 6 °C výrazně nenavýšovalo. **Burdychová et al. (2007)** uvádí, že řada kmenů rodu *Enterococcus* tvoří takové koncentrace tyraminu, které již překračují hladinu toxicity (100 mg.l<sup>-1</sup>), což se slučuje i s našimi výsledky. **Bover-Cid et al. (2001)** zjistili produkci tyraminu v rozmezí 500-4300 mg.l<sup>-1</sup> a fenylethylaminu 40-432 mg.l<sup>-1</sup> u všech jimi testovaných kmenů *E. faecium* (5 testovaných kmenů). Naopak u těchto izolátů nedetekovali produkci putrescinu a kadaverinu. Stejní autoři rovněž označují studované enterokoky za časté producenty tyraminu a fenylethylaminu, což opět koresponduje s našimi výsledky. Častou produkcí tyraminu u kmenů *E. faecium* popisují také **Roig-Sagués et al. (2002)**, **Cosentino et al. (2004)** a **Komprda et al.**

**(2008)**. **Latorre-Moratalla et al. (2010)** detekovali u kmenů *E. faecium* kromě již zmíněného tyraminu i produkci fenylethylaminu a tryptaminu. **Podle Marcobal et al. (2006)** je produkce BA ovlivněna mimo jiné i množstvím prekurzorů (zejména volných aminokyselin) a úpravou fyzikálně chemických podmínek prostředí. Dále je nutné konstatovat, že produkce BA je rovněž vlastnost silně kmenově závislá (**Pischer et al., 2007; Buňková et al., 2009**).

## ZÁVĚR

V práci byla studována *in vitro* produkce biogenních aminů u izolátu *Enterococcus faecium*. Bylo zjištěno, že maso králíka může být kontaminováno mikroflórou bohatou na produkci BA, což může podstatně ohrozit bezpečnost a zdravotní nezávadnost této suroviny. Nejčastěji byla detekována produkce tyraminu, putrescinu, fenylethylaminu a spermidinu. Vzhledem k možnému ohrožení zdraví konzumentů, by bylo vhodné dále prozkoumat další faktory ovlivňující intenzitu dekarboxylační aktivity dekarboxyláza-pozitivních kmenů rodu *Enterococcus*.

## LITERATURA

- BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M. C. 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 66, 2001, 185-189.
- BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V. 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 229, 2009, 533-538.

- BURDYCHOVA, R., KOMPRDA, T. 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. In *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 276, 2007, 149-155.
- BRINK, B., DAMINK, C., JOOSTEN, H. M., HUIS IN 'T VELD J. H. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. In *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 11 1990, no.1, p. 73-84.
- COSENTINO, S., PISANO, M. B., CORDA, A., FADDA, M. E., PIRAS, C. 2004. Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. In *J. Dairy Res.*, vol. 71, 2004, p. 444-450.
- HALÁSZ, A. BARÁTH, SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. In *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 5, 1994, p. 42-49.
- KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. 2005. Biogenic amines in food. In *Chemical Papers*, vol. 59, 2005, no. 1, p. 70-79.
- KOMPRDA, T., BURDYCHOVÁ, R., DOHNAL, V., CWIKOVÁ, O., SLÁDKOVÁ, P., DVOŘÁČKOVÁ, H. 2008. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. In *Food Microbiol.*, vol. 25, 2008, p. 219-227.
- KŘÍŽEK, M., KALÁČ, P. 1998. Biogenic amines in foods and their roles in human nutrition. In *Czech. J. Food Sci.*, vol. 16, 1998, p. 151-159.
- LATORRE-MORATELLA, L., BOVER-CID, S., TALON, R., AYMERICH, T., GARRIGA, M., ZANARDI, E., IANIERI, A., FRAQUENZA, M. J., ELIAS, M., DROSINOS, E. H., LAUKOVA, A., VIDAL-CAROU, M. C., 2010. Distribution of Aminogenic Activity among Potential Autochthonous Starter Cultures for Dry Fermented Sausages. In *J. Food Prot.*, vol. 73, 2010, no. 3, p. 524-528.
- MARCOBAL, Á., ÁLVAREZ P. J. M., MORENO-ARRIBAS M. V., MUÑOZ, R., 2006. A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. In *Res. Microbiol.*, vol. 157, 2006, p. 417-424.
- PIRCHER, A., BAUER, F., PAULSEN, P. 2007. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. In *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 226, 2007, p. 225-231.
- PLEVA, P., BUŇKOVÁ, L., LORENCOVÁ, E., LAUKOVÁ, A., BUŇKA, F. 2011. Produkce biogenních aminů u enterokoků izolovaných z masa králíků a stafylokoků získaných z vnitřního obsahu střev pstruhů. In *Proteiny 2011 : sborník z vědecké konference*. 1. vyd. - Zlín : Univerzita Tomáše Bati, 2011, ISBN 978-80-7454-022-6.
- ROIG-SAGUÉ, A. X., MOLINA, A. P., HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M. 2002. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. In *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 215, 2002, p. 96-100.
- SANTOS, M. H. S. 1996. Biogenic amines: Their importance in foods. In *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 29, 1996, p. 213-231.
- SHALABY, A., R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. In *Food Res. Int.*, vol. 29, 1996, no. 7, p. 675-690.
- SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V., 2004. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. In *Chemické listy*, vol. 98, 2004, p. 432-437.
- SPANIER, M. C., BRUIN, T. J. F., VAN ROODE, B. A. S. W. 1991. HPLC determination of biogenic amines and evaluation of results. In *Food Policy Trends in Europe*, vol. 6, 1991, p. 213.

### Acknowledgments:

This work was supported by grant UTB Zlín no. IGAFT/2012/027 and GAČR 503/11/1417.

### Contact address:

Pavel Pleva, Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: ppleva@ft.utb.cz

Leona Buňková, Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: bunkova@ft.utb.cz

Andrea Lauková, Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Soltesovej 4-6, 040 01 Košice, Slovakia, E-mail: laukova@saske.sk

Eva Lorencová, Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: lorencova@ft.utb.cz

Vlastimil Kubáň, Department of Food Technology and Microbiology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic E-mail: kuban@ft.utb.cz

František Buňka, Department of Food Technology and Microbiology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: bunka@ft.utb.cz