

Stvaranje bioamina u mleku dejstvom *Escherichia coli* (Bioamine Development in Milk Induced by *Escherichia Coli*)

Dr. Ivanka OTENHAJMER, Veterinarski i mlekarski institut, Zavod za mlekarkstvo, Beograd; dr. Zora MIJAČEVIĆ, Veterinarski fakultet, Beograd

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper
Prispjelo: 1. 12. 1988.

UDK: 579.676

Sažetak

Istraživano je stvaranje bioamina u mleku kontaminiranom s *E. coli*. U sirovom mleku merljive količine histamina i tiramina stvorene su pri temperaturi od 21° ili 30 °C za 24 časa. Ukupan broj mikroorganizama dostigne pri tome nivo od 10⁸/ml. U pasterizovanom mleku stvaranje histamina nastaje na nivou 10⁸/ml ćelija *E. coli*. Taj nivo *E. coli* ne postiže se u sirovom mleku ni posle čuvanja mleka pri temperaturama od 7°, 21° ili 30 °C za 48 časova. Bioamini su dokazani metodom tankoslojne hromatografije.

Summary

Bioamine development in milk contaminated with *E. coli* was investigated. Measurable quantities of histamine and thiramine were developed in raw milk after 24 hours at temperatures from 21 °C to 30 °C when total microbial population amounted to 10⁸/ml. Histamine development induced by *E. coli* in pasteurized milk was provoked at 10⁸/ml level. This *E. coli* level was not reached in milk after preservation of milk for 48 hours at temperatures 7°, 21° and 30 °C. Bioamines were established by the thin layer chromatography method.

Uvod

Mikroorganizmi, uobičajena mikroflora sirovog mleka, poseduju fermente koji vrše dekarboksilaciju aminokiselina, i fermente koji oksiduju nastale amine. Pojava amina u namirnicama, prema tome, rezultat je metaboličke aktivnosti nekih mikroorganizama, ali i međusobnog odnosa (sinergizam i antagonizam) pri razmnožavanju. Prema Gale (1940), temperatura i pH sredine presudno utiču na aktivnost tirozin dekarboksilaze, a optimalne vrijednosti su pH 5,0 i temperatura 27—37 °C. Terplan i sar. (1973) nalaze u mešanoj kulturi *Ps.aeruginosa* i *Sc.faecalis* povećano stvaranje bioamina. Autori veruju da na prisustvo bioamina u mleku najviše utiču mikroorganizmi koji su označeni kao kontaminanti. Histamin stvaraju *Streptococcus faecalis*, *Sc.faecium*, *Sc.durans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella dublin*, *Salmonella typhi*, *E.coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* i *B. subtilis*, a tiramin samo *Sc. faecalis* i *B.cereus*.

Pediococcus cerevisiae, prema Lembke (1978), je mikroorganizam koji produkuje velike količine histamina. Prema Mosselu (1968), tipični pred-

stavnici stvaranja histamina su *Betabacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Eenterobacter aerogenes*, *Proteus morgani*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. i *E.coli*, dok *E. coli*, *Cl. sporogenes*, *Proteus mirabilis*, a prema Voigt i sar. (1977) i *Micrococcus luteus*, stvaraju tiramin.

Tirozindekarboksilazu stvaraju još *Sc.lactis* (Köessler i sar. 1928), *Lb. casei* (Lagerborg i sar. 1952), *Lb. bulgaricus* i *Lb.plantarum* (Edwards i sar., 1981), a izučavanja Silvermann i Kosikowski (1956) pokazuju da bioamine stvaraju još enterokoke i sporogene vrste anaerobnih bakterija.

Bioamini se dokazuju na nivou kontaminacije mleka mikroorganizama koji mora biti viši od 10^6 /ml (Mossel, 1970) do 10^8 /ml (Terplan i sar., 1973). Grove i sar. (1975) su u svežem sirovom mleku dokazali 0,2—0,6 μ g/ml histamina i 1,1 μ g/g tiramina, a posle držanja mleka 2 dana na 25 °C, mleko je sadržavalo 2,8 μ g histamina i 94 μ g tiramina/g mleka. Različite vrste mikroorganizama stvaraju različite količine bioamina (Terplan i sar., 1973). Dokazano je da *Sc.faecalis*, *Staph. epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Ps.aeruginosa* i *B.cereus* proizvode histamina 2,3—3,6 μ g/g u mleku. *E.coli* posle 24 časa inkubacije mleka na 30 °C stvara 0,9 μ g/g histamina, a *B.cerus* i *Sc.faecalis* za isti period na temperaturi 21 °C stvara 3,1 i 26,0 μ g/g tiramina. Prema Rice i sar. (1976) finalna koncentracija bioamina u hrani zavisi od sposobnosti sojeva mikroorganizama kao i od dužine inkubacije. Izvor mono i diaminooksidaza bakterijskog porekla su *Sarcina lutea*, *Ps.eruginosa*, *E.coli* (Buffoni, 1966 i Ienistea, 1971).

E.coli je u našim uslovima proizvodnje mleka često označen kao mikroorganizam koji se nalazi u sirovom mleku, pa je cilj ovog rada bio da utvrdi uslove stvaranja bioamina u sirovom mleku dejstvom *E.coli*.

Materijal i metode rada

Sposobnost stvaranja histamina i tiramina istražena je na 26 sojeva *E.coli* izolovanih iz mleka i sireva. Za stvaranje bioamina eksperimentalno je inokulisano sirovo mleko s *E.coli* i inkubisano pri temperaturama $7 \pm 0,5$; $21 \pm 0,05$ °C i $30 \pm 0,5$ °C u trajanju od 24 i 48 časova. Da bismo utvrdili nivo *E.coli* neophodan za detekciju bioamina u sirovom ili pasterizovanom mleku, izvodili smo oglede s histamin pozitivnim (53, 55, 111) i histamin negativnim (43, 19) sojevima *E.coli*. Prisustvo amina određivali smo posle inkubacije pri temperaturama od 30 °C za 24 časa.

Bioamini su dokazivani tankoslojnom hromatografijom metodom po Langner i Kellinghusenu (1979), koja je modifikovana za mleko. Kao standardi su korišćeni histamin dihidrohlorid i tiramin HCl (Sigma, USA).

Rezultati i diskusija

Sposobnost stvaranja histamina i tiramina razmnožavanjem različitih sojeva *E.coli* u pasterizovanom mleku određivano je posle 24 časa inkubisanja pri 30 °C. Dobijeni rezultati prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Rezultati stvaranja histamina ili tiramina od različitih sojeva *E. coli*
Table 1. Ability of Histamine and Thyramine Development of Escherichia Coli Strains

Amini	Broj istraženih sojeva <i>E. coli</i>	Sposobnost stvaranja amina broj	%
Amines	Tested <i>E. Coli</i> Strain Count	Ability Amine Development No.	%
Histamin	26	20	76,92
Tiramin	26	—	—

Istraživani sojevi *E.coli* stvarali su samo histamin i to u 76,92% slučajeva, a nijedan soj nije stvarao tiramin.

Uticaj nivoa kontaminacije i temperature na brzinu razmnožavanja *E.coli* u sirovom mleku tokom inkubisanja prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Rezultati umnožavanja *E. coli* u sirovom mleku tokom 48^h pri različitim temperaturama

Table 2. Conditions for Multiplication of *E. Coli* in Raw Milk

Nivo kontaminacija sa <i>E. coli</i>	Uslovi čuvanja	Promene nivoa <i>E. coli</i> tokom čuvanja mleka 48 ^h			
		0	6	24	48 ^h
<i>E. Coli</i> Contamination Level	Storage Conditions	E. Coli Contamination Variations During Milk Storage — Hours			
		0	6	24	48 ^h
10 ⁵	7 — 10 °C	3,1 × 10 ⁵	4,2 × 10 ⁵	3,4 × 10 ⁵	9,8 × 10 ⁵
	18 — 20 °C	2,3 × 10 ⁵	2,1 × 10 ⁵	3,5 × 10 ⁵	1,0 × 10 ⁵
10 ⁴	7 — 10 °C	1,9 × 10 ⁴	7,4 × 10 ⁴	6,7 × 10 ⁴	2,5 × 10 ⁴
	18 — 20 °C	1,9 × 10 ⁴	3,5 × 10 ⁴	5,2 × 10 ⁴	3,1 × 10 ⁴
10 ¹	7 — 10 °C	1,0 × 10 ¹	—	—	—
	18 — 20 °C	1,0 × 10 ¹	1,3 × 10 ²	3,9 × 10 ²	1,6 × 10 ³

Iz rezultata prikazanih u tablici zapažamo da je razvijanje populacije *E.coli* u mleku zavisno o temperaturi i nivou inicijalne kontaminacije. Kod visokih nivoa kontaminacije (10⁵, 10⁴) uticaj različitih temperatura ispoljava se tako što niže temperature neznatno inhibiraju porast, a na višim temperaturama populacija *E.coli* se poveća za 0—2 potencije. Razvijanje populacije niže početne kontaminacije mleka s *E.coli* u direktnoj je zavisnosti o temperaturi čuvanja. Na temperaturi od 7—10 °C nivo *E.coli* je manji od 10¹ posle 6 časova, a na temperaturi od 18—20 °C u istom periodu populacija se dvostruko uvećava i dostiže maksimalan porast tokom 24 časa.

Da bismo utvrdili da li u sirovom mleku ima uslova za nastajanje bioamina, mleku smo dodavali soj *E.coli* kojem je u prethodnom postupku utvrđena sposobnost stvaranja histamina. Mleko je čuvano 48 časova na temperaturi od 7, 21, 30 ± 0,5 °C. Dobijeni rezultati prikazani su u tablici 3.

Iz iznetih rezultata zapažamo da *E.coli* koja je naknadno dodata u mleko, u toku 48 časova ne dostiže veći nivo od 10³/ml mleka. Porast ukupne kontaminacije je izrazito visok tokom prvih 24 časa i u tom periodu nalazimo i

histamin na svim temperaturama čuvanja, a tiramin na temperaturama 21 i 30 °C. Produženim čuvanjem mleka na odabranim temperaturama nalaz bioamina je nepromenjen kao i posle 24 časa.

Tablica 3. Uticaj uslova čuvanja sirovog mleka kontaminiranog sa *E. coli* na nastajanje bioamina

Table 3. Effect of Storage Conditions of Milk Contaminated With *E. Coli* on Bioamine Development

A					
Vreme čuvanja mleka	Temperature °C	E. coli	Parametri		
			UBB	Amini Histamin Tiramin	
Period of	Temperatura °C	E. Coli	Parameters		
			Total Bacterial Count	Amines Histamine Thyramine	
0	7 ± 0,5	7,0 × 10 ¹	1,2 × 10 ⁶	—	—
	21 ± 0,5	7,0 × 10 ¹	1,2 × 10 ⁶	—	—
	30 ± 0,5	7,0 × 10 ¹	1,2 × 10 ⁶	—	—
24	7 ± 0,5	7,0 × 10 ¹	1,4 × 10 ⁹	+	—
	21 ± 0,5	2,3 × 10 ³	1,5 × 10 ⁹	+	+
	30 ± 0,5	2,4 × 10 ³	1,6 × 10 ⁹	+	+
48	7 ± 0,5	3,7 × 10 ²	6,1 × 10 ⁹	+	—
	21 ± 0,5	3,0 × 10 ³	9,2 × 10 ⁸	++	+
	30 ± 0,5	1,0 × 10 ²	1,2 × 10 ⁸	++	+

Nivo *E.coli* u sirovom mleku ostao je na 10³/ml pa je naš sledeći zadatak bio da utvrdimo na kojem nivou *E.coli* u mleku nastaje merljiva količina histamina. Da bi se ovo utvrdilo zasejali smo pet sojeva *E.coli* u pasterizovano mleko i pratili pojavu histamina. Dobijeni rezultati prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Uslovi za nastajanje histamina u pasterizovanom mleku tokom čuvanja 24^h na temperaturi 30 °C

Table 4. Conditions for Histamine Development on Pasteurized Milk During 24 Hours at 30 °C

Vreme čuvanja mleka	Sposobnost sojeva <i>E. Coli</i> za stvaranje histamina	Prosečan broj <i>E. Coli</i>	Pozitivan nalaz histamina
Milk Storage Period	Properties of <i>E. Coli</i> Strains	Average <i>E. Coli</i> Count	Histamine Finding
0	histamin (+)	2,9 × 10 ² (1)	—
	histamin (—)	4,0 × 10 ² (2)	—
24	histamin (+)	3,25 × 10 ⁶	—
	histamin (—)	6,50 × 10 ⁶	—
48	histamin (+)	9,63 × 10 ⁸	+
	histamin (—)	1,1 × 10 ⁹	—

(1) — tri soja, (2) — dva soja

Legend: 1. 53,55,111 Strains

2. 43,19 Strains

Od sojeva označenih kao histamin pozitivni, stvaranje bioamina zapaženo je pri nivou 10^8 *E.coli*/ml mleka. Histamin nije dokazan ni kod nivoa 10^9 /ml mleka kod sojeva koji su ranije označeni kao histamin negativni.

Nastanak bioamina u sirovom mleku posle inkubacije od 24 časa verovatno je rezultat metaboličke aktivnosti drugih mikroorganizama koji su deo ukupne populacije u mleku. Nastanak tiramina može se objasniti samo aktivnošću nekih mikroorganizama iz ukupne populacije, jer su dodati sojevi *E.coli* pokazivali samo histidin dekarboksilaznu aktivnost.

Zaključci

1. Stvaranje histamina u pasterizovanom mleku nastaje na nivou 10^8 *E.coli*/ml mleka posle 24 časa inkubiranog na 30°C . Za isti vremenski period i u istim uslovima čuvanja *E.coli* u sirovom mleku dostiže nivo od 10^8 ml.

2. Histamin i tiramin u sirovom mleku rezultat su aktivnosti ukupne mikroflore.

3. Amine su dokazani u sirovom mleku posle 24 časa. Prisustvo histamina moglo se utvrditi u mleku čuvanom na sve tri odabrane temperature (7 , 21 ili 30°C), a prisustvo tiramina na 2 odabrane temperature (21 i 30°C).

Literatura

- BUFFONI, F. (1966): Histaminase and related amine oxidase, **Pharmacol. Rev.** **18**, 1163—1199.
- EDWARDS, S. T., SANDINE, W. E. (1981): Symposium: Microbial metabolites of importance in dairy products. Public Health Significance of Amines in Cheese, **Journal of Dairy Science**, **64**, 12, 2341—2438, 1981.
- GALE, E. P. (1940): The production of amines by bacteria 2. The production of tyramine by *Streptococcus faecalis*, **Biochem. J.** **34**, 846—852,1
- GROVE, H. H., TERPLAN, G.: Erhebungen über Histamine und Tyramine Gehalt in Trockenmilchprodukten. **Archiv für Lebensmittelhygiene** **26**, 147—152, 1975.
- IENISTEA, C. (1971): Bacterial production and destruction of histamine in foods and food poisoning caused by histamine, **Die Nahrung**, **15**, 109—113.
- KOESSLER, K. K., M. T. HANKES, M. S., SHEPPARD (1928): Production of histamine, tyramine, bronchospastic and arterioispastic substances in blood broth by pure cultures of microorganisms. **J. Infect. Dis.** **43**, 363—377.
- LEMBKE, A. (1978): Histamin, eine wenig beachtete Noxe in Nahrungs und Genussmitteln, **Milchwissenschaft**, **33**, (10), 614—616.
- LAGEBORG, V. A., W. E. CLAPPER (1952): Amino acid decarboxylases of lactic acid bacteria. **J. Bacteriology** **63**, 393—397..
- MOSSEL, D. A. A.: Bacterial toxins of uncertain oral pathogenicity. In H. A. Greham (ed) The safety of foods Aci Publishing Co. Inv. Westport Conn p. 173, 1968.
- MOSSEL, D. A. A.: Mikrobiologische Qualitätsbeherrschung in der Lebensmittelindustrie. Alimenta, Sonderausgabe 47-74, 1970.
- RICE, S. L., KOEHLER, P. E. (1976): Tyrosine and Histidine Decarboxylase Activities of *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus* Species and the Production of Tyramine in fermented Sausages. **J. Milk and Food Technol.** **39**, 3, 166—169.
- SILVERMANN, G. J., KOSIKOWSKI, F. V. (1956): Amines in cheddar cheese. **J. Dairy Sci.** **39**, 1134—1141.
- TERPLAN, G., WENZEL, S., GROVE, H. H.: Zur Histamin — und Tyraminbildung durch Mikroorganismen in Milch und Milchprodukten. Wien. **Tierärztl. Nachr.** **60** Jahrgang, Heft 2/3, 46—50, 1973.
- VOIGHT, M. N., EITENMILLER, R. R. (1977): Production of Tyrosine and Histidine Decarboxylase by Dairy Related Bacteria. **J. of Food Protection**, **40** (4) 241—245.