

# Обнаружение биогенных аминов в пиве и идентификация продуцента

М. Б. МОРКОВНИКОВА, О. Б. ИВАНЧЕНКО

Санкт-Петербургский государственный университет низкотемпературных и пищевых технологий  
191002, Санкт-Петербург, Ломоносова, 9

DONG MINGSHENG

College of Food Science and Technology Nanjing Agricultural University Nanjing  
210095, Jiangsu Province, P. R. China

---

**Beer is known to be a multicomponent drink, its components exerting both positive and detrimental effect on human organism. Reduction of the content of biogenic amines in beer raises its safety. Histamine and other biogenic amines do not originate in beer from malt or barley, but are formed by microbial contaminants. The paper presents the analysis of beer samples, with biogenic amines concentrations being measured and histamine-synthesizing producer *Lactobacillus brevis* being determined. Histamine percentage in beer is a good indicator of hygienic conditions at barley storage and brewing.**

**Key words:** biogenic amines, beer, hygiene, *Lactobacillus brevis*.

**Ключевые слова:** биогенные амины, пиво, гигиена, *Lactobacillus brevis*.

---

## Введение

Биогенные амины — это низкомолекулярные органические соединения, образующиеся в процессе декарбоксилирования (отщепления карбоксильной группы в виде  $\text{CO}_2$ ) аминокислот в живых организмах и обладающие биологической активностью. Низкие концентрации этих соединений играют важную роль в физиологических процессах всех живых организмов. На организм человека действие биогенных аминов различно. *Психотропное действие* связано с влиянием на нервную систему человека, точнее, на нейромедиаторы (нейротрансмиттеры) — биологически активные химические вещества, посредством которых осуществляется передача электрического импульса с нервной клетки через синаптическое пространство. *Вазоактивное действие* характеризуется влиянием на сердечно-сосудистую систему человека. Высокие концентрации биогенных аминов оказывают токсическое и мутагенное действия [1].

Однако органы и ткани, как и целостный организм, располагают специальными механизмами обезвреживания биогенных аминов, которые в общем виде сводятся к окислительному дезаминированию этих аминов под действием фермента моноаминоксидазы (МАО) с образованием альдегидов и аммиака. Этот естественный механизм может быть нарушен, например, приемом веществ (антидепрессантов, спирта и ряда природных веществ), способных ингибировать фермент МАО.

Обычно биогенные амины образуются в результате процессов порчи, связанные с протеолизом и действием ферментов бактериального происхождения — декарбоксилаз, которые присутствуют у сравнительно небольшого числа бактерий. К их числу относятся бактерии родов: *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Photobacterium* и молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Pediococcus* и *Streptococcus*.

Показано, что в относительно больших количествах биогенные амины присутствуют в продуктах брожения (сыры 5–4500 мг/кг, вино 5–130 мг/л, пиво 2,8–13 мг/л, квашеная капуста 110–300 мг/кг) [1, 2].

Определить предельные значения содержания биогенных аминов в пищевых продуктах достаточно трудно. Так как наибольшее количество пищевых отравлений связано именно с гистамином, то и оценку опасных концентраций биогенных аминов ведут именно по его концентрации. Но следует помнить, что гистамин является не единственным опасным биогенным амином, а соединения этой группы могут обладать эффектом синергизма [1]. В целом, критическим уровнем считают 100 мг гистамина/кг в пищевых продуктах, 2 мг гистамина/л в алкогольных напитках.

При производстве пива создаются благоприятные условия для развития посторонней микрофлоры, способной синтезировать биогенные амины. Различные ис-

следования показывают, что в пиве и других продуктах, полученных путем естественного брожения, концентрация биогенных аминов может превышать норму в 2 мг/л, что соответственно отрицательно сказывается на состоянии людей, принимающих антидепрессанты-ингибиторы MAO или имеющих заболевания, снижающие интенсивность процессов детоксикации.

### Материалы и методы исследований

В работе исследовали 10 образцов светлого пива (производство КНР) и образец охмеленного суслу, предоставленного пивоваренным заводом КНР.

Образцы пива имели содержание спирта 3,5–5,5 % об. и начальную плотность 9–12 %. Охмеленное сусло с начальной плотностью 11 % предназначалось для приготовления светлых сортов пива.

Для определения количества биогенных аминов в пиве и жидкой питательной среде использовался метод ВЭЖХ. Анализ проводили в соответствии с методом, описанным *Lu Yongmei* и *Lu Xin* с использованием системы элюирования, состоящей из ацетонитрила и воды [3].

Выделение чистой культуры бактерий рода *Lactobacillus* проводили методом Коха на селективной питательной среде МРС.

Для идентификации продуцента биогенных аминов культуру бактерий культивировали в жидкой среде МРС при температуре 30 °С. Для экстракции бактериальной ДНК в пробирки отбирали 1 мл среды, содержащей продуцент, и центрифугировали 90 с при 10 000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли шприцем. Косадку, содержащую клетки бактерий, добавляли 200 мкл буфера *GA*, 20 мкл фермента протеиназы *K*, 220 мкл буфера *GB*. Все тщательно перемешивали и инкубировали в водяной бане при температуре 70 °С в течение 10–12 мин. Затем надосадочную жидкость переносили в чистые пробирки с фильтром и добавляли 220 мкл этилового спирта. После центрифугирования (1 мин; 12 000 об/мин) удаляли надосадочную жидкость. После добавления 500 мкл *GD* буфера центрифугировали повторно 1 мин при 12 000 об/мин. Затем удаляли надосадочную жидкость и добавляли 700 мкл *PW* буфера и центрифугировали. Удалив надосадочную жидкость, добавляли 500 мкл *PW* буфера и центрифугировали в тех же условиях. Снова удалили надосадочную жидкость и центрифугировали (2 мин при 12 000 об/мин) для высушивания фильтра. Затем на середину фильтра наносили 100 мкл *TE* буфера, выдерживали в течение 5 мин и затем центрифугировали (2 мин; 12 000 об/мин). В заключение фильтр промывали надосадочной жидкостью и окончательно центрифугировали (2 мин при 12 000 об/мин).

Гены рибосомальной ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на универсальных праймерах 338 *fgc* (5' — *CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG. CCC CCG CCC GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG* — 3') и 518 *r* (5' —

*ATT ACC GCG GCT GCT GG* — 3') по стандартной методике [4]. ПЦР проводили на программируемом амплификаторе.

Очистку амплифицированной бактериальной ДНК осуществляли с помощью электрофореза. Для этого был приготовлен агарозный гель (1 % агара, *TE* буфер и деионизованная вода). В застывшем геле были сделаны отверстия и в них были внесены 5 образцов бактериальной ДНК и один ДНК-маркер для сравнения.

Определение первичной структуры амплифицированных фрагментов ДНК проводилось методом Сенгера с применением ПЦР. Структуры фрагментов были сравнены со структурами 16S рРНК из базы данных *Ribosomal Database Project*.

### Результаты и обсуждения

Первым этапом наших исследований явилось определение уровня биогенных аминов в изучаемых образцах пива. Для этого вначале были получены хроматограммы стандартных концентраций аминов (рис. 1), на основании которых были построены стандартные калибровочные кривые для каждого из изучаемого биогенного амина и составлены уравнения регрессии (табл. 1).

Концентрации обнаруженных биогенных аминов в исследуемых образцах пива рассчитывали по полученным уравнениям. Результаты вычислений содержания биогенных аминов в пиве представлены в табл. 2.

В анализируемых образцах пива общая концентрация биогенных аминов варьировала от 1,67 до 10,42 мг/л, а содержание гистамина составляло 0,26 ÷ 2,02 мг/л. Несмотря на то, что зарегистрированные дозы гистамина не превышают его предельный уровень в алкогольных напитках (2 мг/л), возможно отрицательное влияние их на здоровье человека, так как биогенные амины обладают эффектом синергизма.

В настоящее время исследования по определению биогенных аминов в пиве проводятся как в нашей стране, так и за рубежом. По данным литературы, концентрации биогенных аминов в напитке обнаруживаются от 2 мг/л до нескольких десятков [5, 6].

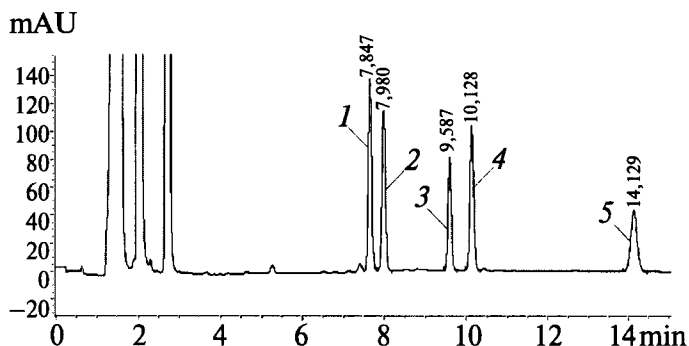


Рис. 1. Хроматограмма стандартных растворов биогенных аминов:  
1 — кадаверин; 2 — гистамин; 3 — тирамин;  
4 — спермин; 5 — спермидин

Биогенные амины	Уравнение регрессии	$R^2$
Кадаверин	$y = 184,66x$	0,9807
Гистамин	$y = 133,02x$	0,9929
Тирамин	$y = 138,92x$	0,9995
Спермидин	$y = 111,47x$	0,9989
Спермин	$y = 88,695x$	0,9973

$R^2$  — величина достоверности аппроксимации;  $y$  — площадь пика;  $x$  — концентрация амина.

Таблица 2

№ образца	Концентрация биогенных аминов в пиве, мг/л					
	Кадаверин	Гистамин	Тирамин	Спермидин	Спермин	Общее содержание
1	0,22	0,57	0,64	0,24	—	1,67
2	0,32	1,28	0,58	0,32	—	2,5
3	—	0,93	0,48	9,01	—	10,42
4	0,54	0,4	0,45	—	—	1,39
5	—	2,02	—	0,57	—	2,59
6	—	1,21	0,46	—	—	1,67
7	—	0,33	—	1,89	—	2,22
8	0,51	0,31	—	0,15	1,08	2,05
9	0,49	0,26	0,21	0,29	1,05	2,3
10	0,92	1,85	0,7	1,4	0,98	5,85

Испанскими исследователями проанализировано 195 образцов европейского пива. В некоторых обнаружены агматин в концентрации  $10,5 \pm 5,8$  мг/л и путресцин в концентрации  $4,8 \pm 2,3$  мг/л. Спермин, спермидин, триптамин присутствовали не всегда, и их уровень был меньше 2 мг/л. Гистамин в основном был в интервале  $0,5 \div 1,1$  мг/л, хотя в некоторых образцах было обнаружено большее его количество. Тирамин присутствовал в каждом пиве, и количество его, как и кадаверина, было высоким. Путресцин и полиамины являются естественными компонентами пива, в то время как гистамин, тирамин и кадаверин могут выступать в роли индикаторов микробной контаминации в пивоварении. «Спонтанно ферментированное» пиво показало более высокие уровни тирамина и гистамина (см. [5]).

Черутти с соавторами проанализировали 40 образцов пива и 2 образца хмелевого экстракта на присутствие биогенных аминов. Гистамин не был обнаружен, кадаверин и фенилэтиламин обнаруживались не всегда, и их уровень не превышал 0,5 и 0,7 мг/л, соответственно, а тирамин (7,5 мг/л) и путресцин (5 мг/л) были всегда.

Исследования, проведенные другими учеными, показали, что в ряде случаев концентрация гистамина в образцах пива превышала 2 мг/л и составляла  $3 \div 26$  мг/л. Боль-

шие различия были обнаружены даже среди образцов одного производителя, что может свидетельствовать о влиянии технологии или сырья на его концентрацию [7]. Исследования немецких и венгерских коллег показали, что наличие гистамина в солоде обусловлено микробной контаминацией зерна. Кроме этого исследователями показана корреляция между концентрацией гистамина в напитке и обнаружением на производстве микробных загрязнителей — представителей рода *Pediacoccus* и рода *Lactobacillus*, хотя гистаминсинтезирующая способность штаммов лактобактерий различалась. Таким образом, основываясь на утверждении, что источником гистамина в пиве являются не ячмень и солод, а микробные загрязнители производства, обнаружение гистамина является хорошим индикатором санитарного состояния хранения ячменя, солодоращения и производства пива [7].

Учитывая происхождение биогенных аминов, нами были изучены образцы суслу одного из пивоваренных заводов, в образцах пива которого обнаружилось максимальное количество гистамина. Сусло было микроскопировано (рис. 2), и для получения чистой культуры бактерий пробы высевали на твердую питательную среду МРС.

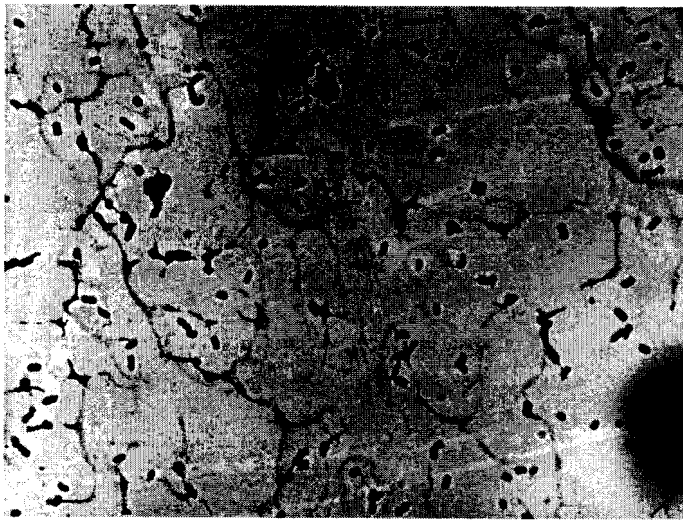


Рис. 2. Микроскопия охмеленного сула

Клетки чистых культур бактерий культивировали в жидкой питательной среде и в инкубационной смеси определяли уровень биогенных аминов. Продукт из пробы, содержащей максимальное количество биогенных аминов, был очищен методом ДНК-электрофореза, и впоследствии методом ПЦР была установлена его точная нуклеотидная последовательность. Структуры фрагментов были сравнены со структурами 16S рРНК из базы данных *Ribosomal Database Project*. Полученные результаты сравнения представлены в табл. 3.

Проведенные эксперименты и полученные результаты позволяют нам заключить, что продуцентом биогенных аминов являются представители рода *Lactobacillus*

(*Lactobacillus brevis*). Данные микроорганизмы достаточно хорошо приспособлены к условиям пивоварения вследствие устойчивости к антисептическому действию хмеля, низким значениям кислотности среды, высокому содержанию спирта, низким температурам и развиваются на всех стадиях пивоваренного производства — от сула до пива в бутылках.

Таким образом, наши исследования подтверждают возможность бактерии рода *Lactobacillus* продуцировать биогенные амины и то, что биогенные амины могут быть использованы для оценки санитарного состояния производства.

Если учитывать, что фактором, определяющим концентрацию биогенных аминов в продукте, является уровень санитарии на производстве, то высокие концентрации определенных аминов, присутствующие в готовом продукте, могут являться следствием использования некачественного сырья, заражения или несоблюдения условий производства и хранения [2]. Чаще всего в продукции контролируются следующие биогенные амины: гистамин, тирамин, путресцин, кадаверин, триптамин, фенилэтиламин, спермидин и спермин, но определение только одного гистамина может быть достаточным для оценки санитарного состояния производства. Так как концентрация гистамина может меняться и в основном она зависит от микробной контаминации продукта, то можно говорить о том, что определение гистамина в процессе производства и в готовом продукте дает информацию не только о безопасности продукта, но и о качественных характеристиках технологического процесса в целом.

Таблица 3

Таксономическая принадлежность штаммов продуцента *Lactobacillus brevis*

№ образца	1	2	3	4	5
№ в каталоге	S000927942	S000927943	S000941656	S000927944	S001044486
Вероятность	0,990	0,983	0,979	0,985	1,000

### Список литературы

1. Shalaby A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health // Food Res. Int. 1996. V. 29. № 7.
2. Karovičová J., Kohajdová Z. Biogenic amines in food // Chem. Pap. 2003. Vol. 59 (1).
3. Yongmei L., Xin L., Xiaohong C., Mei J., Chao L., Mingsheng D. A survey of biogenic amines in Chinese rice wines // Food Chem. 2007. Vol. 100.
4. Muyzer G., Waal E. C. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis

of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA // Appl. Environ. Microbiol. 1993. № 59 (3).

5. Izquierdo-Pulido M., Hernandez-Jover T., Marine-Font A., Vidal-Carou C. Biogenic amines in European beers // J. Agric. Food Chem. 1996. № 44 (10).

6. Kalac P., Hlavatá V., Krizeck M. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation // Food Chem. 1997. № 58.

7. Halasz A., Barath A., Holzappel W. H. The biogenic amine content of beer: the effect of barley, malting and brewing on amine concentration // Z. Lebensm. unters Forsch. 1999. № 208.