

SKRÍNING VYBRANÝCH STARTOVACÍCH BAKTERIÁLNÍCH KULTUR NA PŘÍTOMNOST DNA SEKVENCÍ KÓDUJÍCÍCH DEKARBOXYLÁZU TYROSINU

R. Burdychová

Došlo: 30. května 2006

Abstract

BURDYCHOVÁ, R.: *Screening of selected starter cultures for the presence of DNA sequences coding for tyrosine decarboxylase*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2006, LIV, No. 5, pp. 7–12

Here, seven different starter cultures used in the production of fermented sausages were screened for the presence or absence of specific DNA sequences coding for tyrosine decarboxylase. PCR with the a set of specific primers TDC2/TDC5 (COTON et al., 2004) was used. The PCR analysis of DNA from two starter cultures confirmed the presence of DNA sequences for tyrosine decarboxylase. A detailed analysis of the starter cultures showed that DNA sequences for tyrosine decarboxylase are contained in genomic DNA of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*.

These results show suitability of the described PCR method for the screening of starter cultures for the presence of the gene for tyrosine decarboxylase that is responsible for the production of the biogenic amine tyramine.

biogenic amines, tyramine, decarboxylase activity, PCR, starter cultures, fermented foods

Biogenní aminy jsou organické bazické sloučeniny, k jejichž produkci dochází v různých typech potravin jako jsou sýry, víno, pivo, trvanlivé salámy nebo rybí produkty (BRINK a kol., 1990). K toxikologicky nejvýznamnějším biogenním aminům patří histamin, tyramin, putrescin a kadaverin. Nejvíce prostudovaným je tyramin, a to díky jeho fyziologickým účinkům. Tyramin zvyšuje krevní tlak, způsobuje migrény s bolestí hlavy, v krajních případech může být i příčinou krvácení do mozku, resp. selhání srdce. Toxický účinek tyraminu závisí na přijatém množství, přítomnosti jiných biogenních aminů (násobení účinků) a na celkovém fyziologickém stavu jedince (SILLA-SANTOS a kol., 1996).

Základními podmínkami pro vznik tyraminu jsou přítomnost volné aminokyseliny tyrosinu v substrátu (potravině), přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů. Některé mikroorganismy kódují tyrosindekarboxylázu, enzym účastní-

cí se tvorby tyraminu z volného tyrosinu. Přítomnost této specifické DNA sekvence byla popsána u bakterií náležejících do rodů *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* a u mnoha zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* (SHALABY, 1996). Zástupci uvedených rodů mikroorganismů se používají jako startovací kultury při výrobě fermentovaných potravin živočišného původu.

Startovací kultury jsou vybrané a prověřené bakteriální kmeny nebo směsi kmenů, které v čisté kultuře po aplikaci do suroviny vytvářejí v průběhu výrobního procesu potraviny určité žádoucí změny. Použití startovacích kultur je jedním ze způsobů optimalizace výroby a kvality výrobků a má vliv hlavně na senzorickou jakost výrobků, zdravotní nezávadnost výrobků (antagonistické působení na patogenní a hnilobnou mikroflóru) a na výrobní postup (zkrácení doby zrání, standardizace doby zrání). Komerční preparáty startovacích kultur jsou ve světě používány více než 30 let. Některé kmeny bakterií používané do startova-

cích kultur produkují výše popsany enzym, účastníci se tvorby nežádoucího toxického biogenního aminu tyraminu z volného tyrosinu přítomného v potravině (KOMPRDA a kol., 2004). Dekarboxylázová aktivita mezi kmeny určitého druhu se může lišit dokonce až o tři řády, existují i kmeny bez dekarboxylázové aktivity (KOMPRDA a kol., 2004). Proto je v praxi nutné testovat vždy konkrétní použité bakteriální kmeny.

Včasná detekce enzymu tyrosindekarboxylázy, respektive specifické DNA sekvence, která ho kóduje, je pro potravinářský průmysl vzhledem k ochraňování spotřebitele velmi důležitá. Pro rychlou detekci příslušné specifické DNA sekvence ve startovacích kulturách jsou vhodné metody molekulární biologie. Pro skrínění startovacích kultur byla použita nedávno publikovaná metoda polymerázové řetězové reakce (PCR), která umožňuje rychlou, velmi citlivou a specifickou detekci cílového genu. Tato PCR byla popsána COTONEM a kol. v roce 2004. Modifikovaná varianta publikované PCR metody je v této práci použita pro ověření sedmi startovacích mikrobiálních

kultur, určených pro výrobu fermentovaných trvanlivých salámů, na přítomnost genu kódujícího enzym tyrosindekarboxylázu.

MATERIÁL A METODY

Bakteriální kmeny a jejich růstové podmínky

Startovací kultury určené pro výrobu fermentovaných tepelně neopracovaných trvanlivých salámů (BioCarna, Německo) byly kultivovány na PCA, MRS a M17 agaru (Merck, Německo). Pro rozlišení a identifikaci jednotlivých mikrobiálních druhů byly použity komerční API testy (Biomerieux, Francie), kataláza test a Gramovo barvení. Složení použitých startovacích kultur je uvedeno v Tab. I.

Bakteriální buňky *Enterococcus faecalis* CNRZ 238 (popsaná COTONEM a kol., 2004) byly kultivovány v médiu s kanamycinem, eskulinem a azidem sodným (KEAA, Merck, Německo) při 37 °C. Kultura byla použita jako pozitivní kontrola pro PCR.

I: Použité startovací kultury pro výrobu fermentovaných tepelně neopracovaných masných výrobků, výrobce BioCarna

Číslo startovací kultury	Označení startovací kultury výrobcem	Složení startovacích kultur (bakteriální druhy)	Detekce DNA sekvencí pro tyrosindekarboxylázu	
			celková DNA	DNA z čisté kultury
1	PPX	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	-	-
2	SG1	<i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Streptomyces griseus</i>	-	-
3	SC1	<i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Lactobacillus curvatus</i>	+	+
4	PLS	<i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	-	- - -
5	CXK	<i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Lactobacillus sakei</i>	+	- - +
6	PPLX	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	-	- - -
7	SLG1	<i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Streptomyces griseus</i>	-	- - -

+ sekvence detekována, - sekvence nedetekována

Izolace DNA a PCR

Lyze buněk startovacích kultur, izolace DNA z bakteriálních kultur, její purifikace a způsob kontro-

ly koncentrace a čistoty byly provedeny dle SAMBROOKA a kol. (2001) a AUSUBELA a kol. (1994). Pro amplifikaci specifické DNA sekvence kódující

bakteriální tyrosindekarboxylázu byla použita dvojice specifických oligonukleotidových primerů TD2/TD5 (COTON a kol., 2004). PCR reakce byla provedena v termocyklátoru PTC 130 (MJ Research, Waltham, MA, USA). PCR byla provedena v celkovém objemu 25 μ l a obsahovala 10 ng purifikované DNA, 10 pmol každého primeru TD2/TD5, 1U Hot-Star *Taq* DNA polymerázy a příslušné množství Hot-Star Master Mixu (Qiagen, Hilden, Německo). Templátové DNA byly nejprve denaturovány inkubací při 95 °C 15 min. DNA byla amplifikována ve 30 cyklech (denaturace při 95 °C 45 s, hybridizace primerů při 52 °C po dobu 45 s a syntéza komplementárního DNA řetězce při 72 °C 75 s). V posledním amplifikačním cyklu byla teplota 72 °C prodloužena na 10 min, a to pro kompletní dosyntetizování finálního PCR produktu. PCR produkty byly detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy na přístroji Easy, model B1 (Owl Scientific, USA) a vizualizovány na UV transluminátoru (EB-20E Ultralum, USA) po nabarvení ethidium bromidem (0,5 μ g/ml). Jako pozitivní kontrola PCR byla použita DNA purifikovaná z buněk *Enterococcus faecalis* CNRZ 238, jako negativní kontrola PCR byly použity komponenty PCR bez DNA.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Produkce biogenního aminu tyraminu byla již dříve popsána u řady mikroorganismů používaných jako startovací kultury při výrobě fermentovaných výrobků živočišného původu (KOMPRDA a kol., 2004). Vzhledem k tomu, že je třeba pro prevenci rizika, které pro spotřebitele plyne z přítomnosti biogenních aminů ve fermentovaných potravinách produkci biogenních aminů snížit nebo zcela eliminovat, vyvstává nutnost startovací kultury pečlivě vybírat a testovat.

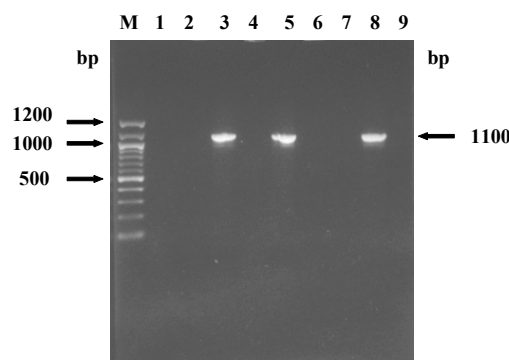
Při testování metody PCR pro skríníng studovaných startovacích kultur (viz Tab. I) na přítomnost či nepřítomnost genu pro tyrosindekarboxylázu bylo nejprve nutné ověřit specifitu PCR. Do PCR reakce byla jako DNA templát použita purifikovaná DNA izolovaná z bakteriálního kmene *Enterococcus faecalis* CNRZ 238, který byl popsán COTONEM a kol. (2004) jako producent tyrosindekarboxylázy. V reakci byl amplifikován PCR produkt předpokládané velikosti (1100 bp). Pro PCR byla v této práci na rozdíl od COTONA a kol. (2004) použita HotStar *Taq* DNA směs (Qiagen), která obsahuje HotStar *Taq* DNA polymerázu spolu s příslušnými komponentami PCR. Tato polymeráza je modifikovanou formou *Taq* DNA polymerázy. V PCR směsi je v inaktivovaném stavu, takže nemá žádnou polymerázovou aktivitu. Absence polymerázové aktivity brání extenzi nespecificky hybridizovaných primerů a vzniku primerových dimerů, které se mohou tvořit při nízkých teplotách na počátku PCR a během prvního PCR cyklu. HotStar

Taq DNA polymeráza je aktivována desetiminutovou až patnáctiminutovou inkubací při 95 °C (DRÁBER a kol., 1993). Koncentrace polymerázy je vzhledem k ostatním komponentám směsi již optimalizována, což minimalizuje tvorbu nespecifických PCR produktů a zaručuje dobrou amplifikační účinnost enzymu. PCR pufr obsahuje vyváženou kombinaci KCl a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, které jsou důležité pro specifickou hybridizaci primerů s DNA matricí. Optimalizovaná koncentrace hořčnatých iontů zaručuje dobrou účinnost reakce a reakční specifitu. Pro optimalizaci PCR je nutné pouze ověření vhodného množství DNA a počtu PCR cyklů, obojí bylo v této práci testováno. Optimální bylo použití 10 ng DNA do PCR směsi a 30 cyklů polymerázové řetězové reakce.

Po ověření specifity a funkčnosti byla PCR použita pro skríníng startovacích kultur používaných pro výrobu fermentovaných tepelně neopracovaných trvanlivých salámů (Tab. I). Po izolaci a purifikaci celkové DNA z jednotlivých směsných startovacích kultur byla tato DNA použita jako matrice pro PCR. Specifické PCR produkty očekávané velikosti (1100 bp) byly detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy ve směsné kultuře SC1 (č. 3, obsahující mikroorganismy *Staphylococcus carnosus* a *Lactobacillus curvatus*) a CXK (č. 5, obsahující mikroorganismy *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* a *Lactobacillus sakei*) (číslování kultur viz Tab. I). Detekce specifických PCR produktů v těchto směsných kulturách je uvedena na Obr. 1.

Po detekci přítomnosti genu pro tyrosindekarboxylázu ve směsných startovacích kulturách byly tyto směsné kultury kultivovány a purifikovány s použitím specifických kultivačních půd. Přítomnost jednotlivých bakteriálních druhů v čistých kulturách byla ověřena provedením základních biochemických reakcí. Z čistých kultur jednotlivých bakteriálních druhů byla dále izolována a purifikována DNA, která byla použita jako DNA matrice (10 ng) pro PCR. Postup detekce genu pro tyrosindekarboxylázu byl stejný jako u kontrolního kmene. Specifické PCR produkty se amplifikovaly s použitím DNA bakterií druhu *Lactobacillus sakei* a *Lactobacillus curvatus* (Tab I). Uvedené nespecifikované kmeny těchto dvou bakteriálních druhů byly identifikovány jako potenciální producenti tyrosindekarboxylázy a mohou se tedy ve fermentovaných trvanlivých salámech účastnit tvorby biogenního aminu tyraminu.

Vzhledem k ochraně konzumenta před nežádoucími vlastnostmi tyraminu, který mohou za vhodných podmínek (KOMPRDA, 2004) startovací kultury č. 3 a č. 5 (Tab I) obsahující druhy *Lactobacillus sakei* a *Lactobacillus curvatus* tvořit, se výrobcí analyzovaných startovacích kultur nedoporučuje tyto mikroorganismy používat a distribuovat.



1: PCR detekce sekvencí kódujících tyrosindekarboxylázu v celkové DNA izolované ze startovacích kultur. M: 100 bp ladder (Malamité, ČR), běh č. 1–7: startovací kultury č. 1–7 (Tab.1), běh č. 8: pozitivní kontrola – *E. faecalis* CNRZ 238 (COTON a kol., 2004), běh č. 9: negativní kontrola (komponenty PCR bez DNA)

SOUHRN

Biogenní aminy jsou toxické nízkomolekulární organické bazické sloučeniny, které v potravinách nejčastěji vznikají dekarboxylací aminokyselin působením mikrobiálních enzymů. Tvorba biogenních aminů v potravinách závisí na přítomnosti volných aminokyselin a mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou. Takovými mikroorganismy mohou být i zástupci startovacích kultur, používaných při výrobě fermentovaných potravin živočišného původu. Moderní metody molekulární biologie umožňují včasné odhalení potenciálních producentů biogenních aminů detekcí specifické DNA sekvence kódující příslušný mikrobiální enzym účastnící se jejich tvorby.

Pro analýzu bylo vybráno sedm v praxi hojně používaných směsných startovacích kultur. Z kultur byla izolována celková DNA, která byla podrobena analýze na přítomnost specifických DNA sekvencí kódujících tyrosindekarboxylázu. Pro skríníng startovacích kultur byla použita metoda polymerázové řetězové reakce (PCR), která umožňuje rychlou, velmi citlivou a specifickou detekci cílových genů s použitím dvojice specifických oligonukleotidových primerů (COTON a kol., 2004).

Specifické DNA sekvence pro enzym tyrosindekarboxylázu byly detekovány u dvou směsných startovacích kultur (kultura obsahující *Staphylococcus carnosus* a *Lactobacillus curvatus* a kultura obsahující *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosum* a *Lactobacillus sakei*). Použitím mikrobiálních kultivačních technik a biochemické analýzy byli izolováni jednotliví zástupci směsných startovacích kultur. Analýzou jejich celkové DNA pomocí PCR bylo zjištěno, že specifické DNA sekvence kódující enzym tyrosindekarboxylázu jsou přítomny u DNA druhů *Lactobacillus sakei* a *Lactobacillus curvatus*. Tyto bakterie proto byly označeny za potenciální původce tvorby biogenního aminu tyraminu. Výrobci startovacích kultur obsahujících výše uvedené bakteriální druhy bylo doporučeno tyto druhy testovat na přítomnost specifické DNA sekvence pro enzym tyrosindekarboxylázu.

biogenní aminy, tyramin, dekarboxylázová aktivita, PCR, startovací kultury, fermentované potraviny

LITERATURA

- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K.: Current protocols in molecular biology. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. 1994, 350 p. ISBN 0-47150-338-X
- BRINK, B. T., DAMINK, C., JOOSTEN, H. J., HUIS IN 'T VELD, J.: Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 1990, 11, 73–84.
- COTON M., COTON E., LUCAS, P. and LONVAUD, A.: Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiol.* 2004, 21, 125–130.
- DRÁBER, P., PETŘÍČEK, M., BOUBELÍK, M., BRDIČKA, R., ZADINA, J.: Pokroky v PCR tech-

- nologii a jejím využití. Pracovní materiály semináře. 1. vyd. Praha: Ústav molekulární genetiky AVČR. 1993, 550 s.
- KOMPRDA, T., SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KALHOTKA, L., ŠTENCL, J., KLEJDUS, B.: Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Sci.* 2004, 67, 4: 607–616.
- LE JEUNE, C., LONVAUD-FUNEL, A., TENBRINK, B., HOLSTRA, H. and VAN DER BOSS, J. M. B. M.: Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. *J. Appl. Bacteriol.* 1995, 78, 316–326.
- SAMBROOK, J. MACCALLUM, P., RUSSELL, D.: Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001, 2344 pp. ISBN 0-87969-577-3.
- SHALABY, A. R.: Significance of biogenic amines in food safety and human health. *Food Res. Int.* 1996, 29, 675–690.
- SILLA-SANTOS M. H.: Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol.* 1996, 29: 213–231.

Adresa

Ing. Radka Burdychová, Ph.D., Ústav technologie potravin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

