

IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE BAKTERIÍ RODU *ENTEROCOCCUS* URČENÝCH PRO VÝROBU FUNKČNÍCH POTRAVIN

R. Burdychová

Došlo: 19. února 2007

Abstract

BURDYCHOVÁ, R.: *Identification and typization of bacteria of the genus Enterococcus supposed to be used for the production of functional foods*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2007, LV, No. 2, pp. 9–14

In this study, the species identification of 12 probiotic strains of the genus *Enterococcus* from Culture Collection of Dairy Microorganisms Lactoflora (CCDM, Milcom, Tábor, Czech Republic) were done using PCR described by DUTKA-MALEN et al. (1995). All strains were classified to be of the genus *Enterococcus* and species *E. faecium*. These strains are supposed to be used as probiotics for the production of functional foods. According to the fact that *E. faecium* was described to have decarboxylase activity responsible for biogenic amine production in fermented products, the presence of genes coding for microbial tyrosine and histidine decarboxylase was screened in all strains using PCR described by COTON et al. (2004). Whereas the presence of DNA sequences for histidine decarboxylase was not detected in any strain, specific DNA sequences coding for tyrosine decarboxylases were detected in all tested strains. When applying as starter probiotic cultures to fermented milk products, the production of biogenic amine tyramine have to be observed during both fermentation and storage.

probiotics, fermented milk products, PCR, *Enterococcus faecium*, biogenic amines, decarboxylase activity

Funkční potraviny jako speciální kategorie potravin nejsou stanoveny legislativně. Obecně se funkční potravina definuje jako jakákoli potravina, která má kromě své nutriční hodnoty kladný vliv na zdraví, fyzickou výkonnost nebo duševní stav konzumenta. Jde tedy o potravinu, která má v porovnání s běžnými potravinami zvýšený fyziologický účinek. Mezi funkční potraviny jsou řazeny i mléčné výrobky s probiotickou kulturou, které si mezi spotřebiteli získávají stále vyšší oblibu.

Všechny popsání bakterie s probiotickým účinkem používané při výrobě mléčných výrobků patří do skupiny bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií, která zahrnuje druhy rodů *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* a *Bifidobacterium*. Jako probiotické byly popsány některé kmeny druhů *Lactobacillus acido-*

philus, *L. bulgaricus*, *L. casei/paracasei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*.

Probiotika nesmí působit toxicky ani patogenně, naopak je žádoucí, aby prokazatelně pozitivně ovlivňovala zdravotní stav hostitele. V tomto směru nastal určitý problém u probiotického mikroorganismu *Enterococcus faecium*. Je to mikroorganismus, jehož původní použití se v případě potravin omezovalo na výrobu kysaného zelí, ale v současnosti se uplatňuje při výrobě kysaných mléčných výrobků. Byly ovšem zjištěny kmeny enterokoků, které prokazatelně neměly probiotické vlastnosti, případně měly schopnost přenášet rezistenci vůči antibiotikům na jiné mikroorganismy.

Cílem této studie byla druhová identifikace sbírkových kmenů rodu *Enterococcus* sbírky Laktoflora (CCDM, Tábor) Výzkumného ústavu mlékárenského, Milcom (Praha) pomocí metod analýzy DNA. Poskytnuté sbírkové kmeny jsou odolné vůči nízkému pH a solím žlučových kyselin a jsou testovány na další probiotické vlastnosti. Dále je u těchto kmenů testována kysací schopnost a senzorická jakost finálních kysaných mléčných výrobků. Vzhledem ke skutečnosti, že byla u mikroorganismů rodu *Enterococcus* popsána negativní vlastnost tvorby biogenních aminů (SHALABY a kol., 1996), v této práci byly analyzované kmeny prověřeny na přítomnost specifických DNA sekvencí kódujících dekarboxylázy (tyrosindekarboxylázu a histidindekarboxylázu) účastníci se tvorby biogenních aminů (tyraminu a histaminu). Schopnost tvořit biogenní aminy je při plánovaném použití kmenů pro výrobu funkčních potravin nežádoucí.

MATERIÁL A METODY

Bakteriální kmeny a jejich růstové podmínky

Bakteriální buňky *E. faecium* CCM 7250 (Česká sbírka mikroorganismů, Brno) byly kultivovány na Slanetz-Bartley médiu (Noack, Francie) při 37 °C. Bakteriální kmen *E. faecalis* CNRZ 238 (popsaný COTONEM a kol., 2004 jako producent tyraminu) byl kultivován v médiu s kanamycinem, eskulinem a azidem sodným (KEAA, Merck, Německo) při 37 °C. Bakteriální kmen *Lactobacillus* 30a ATCC 33222 (popsaný COTONEM a kol., 2004 jako producent histaminu) byl kultivován v MRS médiu (Noack, Francie) při 30 °C. Kmeny byly použity jako pozitivní kontrola pro PCR, pro rodovou a druhovou identifikaci a jako producenti tyraminu a histaminu.

V práci byly analyzovány následující kmeny, získané ze sbírky Laktoflora: CCDM 964/04, CCDM 965/05, CCDM 923/05, CCDM 924/05, CCDM 766/05, CCDM 816/04, CCDM 170/05, CCDM 644/02, CCDM 106/05, CCDM 917/04, CCDM 120/05, CCDM 817/04. Mikroorganismy byly kultivovány na M17 (Merck, Německo) médiu s 1 % glukózou při 37 °C po dobu 72 h.

Izolace DNA a rodová a druhová identifikace bakterií pomocí PCR

Izolace DNA z bakteriálních buněk, její purifikace a způsob stanovení koncentrace a čistoty byly provedeny dle SAMBROOKA a kol. (2001) a AUSUBELA a kol. (1994). Pro identifikaci rodu *Enterococcus* byla použita PCR popsaná DEASYM a kol., 2000. Pro amplifikaci rodově specifické DNA sekvence (733 bp) byla použita dvojice specifických oligonuk-

leotidových primerů E1/E2. PCR byla provedena v celkovém objemu 25 µl a obsahovala 10 ng purifikované DNA, 10 pmol primeru E1 a E2, 1 U HotStar *Taq* DNA polymerázy a příslušné množství HotStar Master Mixu (Qiagen, Hilden, Německo). Templátové DNA byly nejprve denaturovány inkubací při 95 °C 15 min. DNA byla amplifikována ve 25 cyklech (denaturace při 95 °C/45 s, hybridizace primerů při 60 °C/45 s a syntéza komplementárního DNA řetězce při 72 °C/1 min). V posledním amplifikačním cyklu byla teplota 72 °C prodloužena na 10 min, a to pro kompletní dosyntetizování finálního PCR produktu.

Pro druhovou identifikaci byly použity PCR metody popsané autory DUTKA-MALEN a kol. (1995). Druhově specifické primery detekují gen *ddl_{E.faecium}*, amplifikovaný PCR produkt má velikost 550 bp, který je specifický pro *E. faecium*. PCR byla provedena v celkovém objemu 25 µl a obsahovala 10 ng purifikované DNA, 10 pmol každého druhově specifického primeru, 2 U HotStar *Taq* DNA polymerázy a příslušné množství HotStar 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/1 min, hybridizace primerů při 54 °C/1 min a syntéza komplementárního DNA řetězce při 72 °C/1 min). V posledním amplifikačním cyklu byla teplota 72 °C prodloužena na 10 min. Jako pozitivní kontrola PCR byla použita purifikovaná DNA izolovaná z buněk sbírkového kmene *E. faecium* CCM 7250. Jako negativní kontrola PCR byly použity komponenty PCR bez DNA.

Všechny PCR reakce byly provedeny v termocyklátoru PTC 130 (MJ Research, Waltham, MA, USA). 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 µg/ml). Dokumentace byla provedena pomocí fotodokumentačního systému Gel imager^(TM) Ultra-Lum, Inc., USA.

Skríníng kmenů na přítomnost DNA sekvencí kódujících bakteriální tyrosindekarboxylázu a histidindekarboxylázu

Pro amplifikaci specifické DNA sekvence kódující bakteriální tyrosindekarboxylázu a histidindekarboxylázu byly použity dvojice specifických oligonukleotidových primerů TD2/TD5 a HDC3/HDC4 (COTON a kol., 2004) a postup popsáný BURDYCHOVOU (2006). Jako pozitivní kontrola PCR pro detekci tyrosindekarboxylázy byla použita purifikovaná DNA izolovaná z buněk *E. faecalis* CNRZ 238, jako pozitivní kontrola PCR pro detekci histidindekarboxylázy sloužila purifikovaná DNA izolovaná z buněk *Lacto-*

bacillus 30a ATCC 33222. Jako negativní kontroly PCR byly použity komponenty PCR bez DNA.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Při testování metody PCR pro identifikaci bakteriálního rodu *Enterococcus* bylo nejprve nutné ověřit specifitu PCR. Do PCR reakce byla jako DNA templát použita purifikovaná DNA izolovaná z bakteriálního kmene *Enterococcus faecium* CCM 7250. U analyzovaných bakteriálních kmenů (Tab. I) byl amplifikován specifický PCR produkt předpokládané velikosti (733 bp), což svědčí o jejich příslušnosti k bakteriálnímu rodu *Enterococcus*. Provedením rodově specifické PCR byla zároveň ověřena amplifikovatelnost DNA všech bakteriálních kmenů. DNA tedy byla izolována a purifikována v dostatečné čistotě pro použití v PCR a je možné ji použít pro druhově specifickou PCR.

Analyzované bakteriální kmeny pocházející ze sbírky Laktoflora (CCDM, Tábor) byly nejprve testovány na příslušnost k bakteriálnímu rodu *Enterococcus*. Výsledky jsou uvedeny v Tab. I. Pro identifikaci byla použita PCR, při níž je u bakterií patřících k rodu *Enterococcus* amplifikována specifická sekvence genu kódujícího 16S rRNA o velikosti 733 bp. Metody analýzy bakteriálních 16S a 23S rDNA sekvencí se velmi často používají při klasifikaci bakterií (LANE a kol., 1989; BOTTGER, 1989; SALAMA a kol., 1991). Geny pro 16S a 23S rRNA obsahují univerzální konzervativní sekvence, ale i regiony unikátní pro určitý bakteriální rod nebo druh, takže mohou být použity pro rodově nebo druhově specifickou PCR. Geny kódující ribosomální RNA byly již úspěšně použity při klasifikaci mnoha bakteriálních izolátů rodů *Enterococcus* (BETZL a kol., 1990), *Lactobacillus* (DUBERNET a kol., 2002), *Lactococcus* (KLIJN a kol., 1991) a mnoha dalších.

Druhově specifická PCR využívá specifické primery amplifikující gen pro D-alanin:D-alanin ligázu (*ddl*) druhu *E. faecium*. PCR produkty amplifikované z DNA matric všech charakterizovaných bakteriálních kmenů měly velikost 550 bp, tedy velikost odpovídající amplikonu pozitivní kontroly PCR, DNA sbírkového kmene *E. faecium* CCM 7250 (Obr. 1, Tab. I).

Využití druhově specifické PCR při analýze bakterií rodu *Enterococcus* významně usnadňuje jejich správnou identifikaci. Použití biochemických testů, které

vychází z fenotypových vlastností bakterií, je často nejednoznačné a vede k mylným interpretacím, protože se vlastnosti terénních kmenů mohou značně lišit od vlastností kmenů sbírkových, pomocí nichž jsou biochemické testy definovány (FACKLAM a COLLINS, 1989; VINCENT a kol., 1991).

Z literatury je známo (SHALABY, 1996), že je většina zástupců rodu *Enterococcus* schopná tvořit toxické biogenní aminy. Ty vznikají činností bakteriálních enzymů dekarboxyláz. Vzhledem k tomu, že se práce zabývá výběrem vhodných kmenů bakterií vhodných pro funkční potraviny, byla u testovaných kmenů prověřena přítomnost genů kódujících dekarboxylázy.

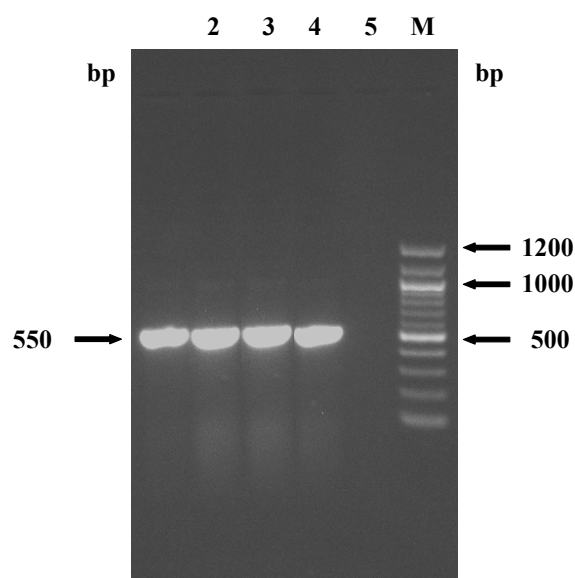
Do PCR reakce byla jako pozitivní kontrola použita purifikovaná DNA izolovaná z bakteriálního kmene *Enterococcus faecalis* CNRZ 238 popsaná COTONEM a kol. (2004) jako producent tyrosindekarboxylázy a purifikovaná DNA kmene *Lactobacillus* 30a, který byl tímtož autorem označen jako producent histidindekarboxylázy. V PCR reakci byly amplifikovány PCR produkty předpokládané velikosti (1100 bp a 440 bp). Po ověření specifity a funkčnosti PCR byla tato metoda použita pro ověření přítomnosti či nepřítomnosti genů pro tyrosindekarboxylázu (*tyrDC*) a histidindekarboxylázu (*hDC*) u charakterizovaných kmenů *E. faecium* CCDM uvedených v Tab. I. U všech analyzovaných kmenů byla zjištěna přítomnost specifické *tyrDC* DNA sekvence, *hDC* gen nebyl detekován u žádného ověřovaného bakteriálního kmene. Výsledky detekce specifických dekarboxylázových sekvencí u dvou kmenů sbírky Laktoflora a u kontrolních kmenů jsou uvedeny na Obr. 2 a v Tab. I.

Detekce přítomnosti specifické *tyrDC* DNA sekvence neznamená, že bude příslušný mikroorganismus ve fermentovaném výrobku produkovat biogenní amin tyramin v množství, které bude pro spotřebitele toxikologicky závažné. Množství tvořeného tyraminu závisí nejen na síle exprese specifické *tyrDC* DNA sekvence, tedy na množství vytvářeného enzymu tyrosindekarboxylázy, ale i na koncentraci volné aminokyseliny tyrosinu v substrátu. Dekarboxylázová aktivita mezi kmeny určitého druhu se může lišit (KOMPRDA a kol., 2004). Proto bude naším dalším cílem testovat vždy konkrétní bakteriální kmeny, a to v podmínkách předpokládané výroby fermentovaných mléčných výrobků a při jejich uchovávání.

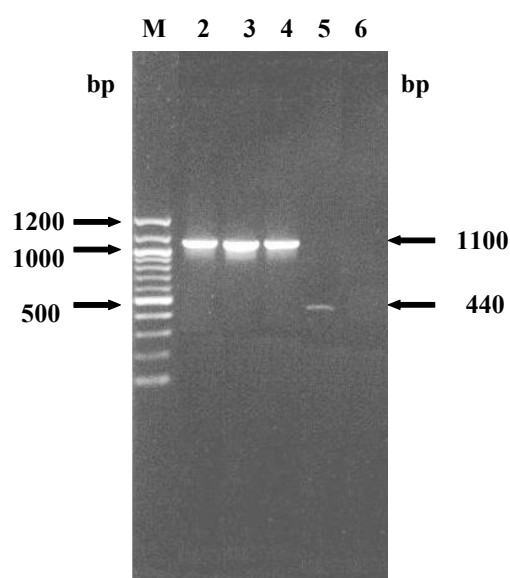
I: Identifikace a charakterizace sbírkových kmenů *Laktoflora* (CCDM) a jejich analýza na přítomnost genů pro dekarboxylázu tyrosinu a histidinu

Označení sbírkových kmenů	Bakteriální druh	PCR produkt specifický pro rod <i>Enterococcus</i> (733 bp)	PCR produkt specifický pro druh <i>E. faecium</i> (550 bp)	Detekce DNA sekvencí <i>tyrDC</i> (1100 bp)	Detekce DNA sekvencí pro <i>hDC</i> (440 bp)
CCDM 964/04	<i>E. faecium</i>	+	+	+	–
CCDM 965/05	<i>E. faecium</i>	+	+	+	–
CCDM 923/05	<i>E. faecium</i>	+	+	+	–
CCDM 924/05	<i>E. faecium</i>	+	+	+	–
CCDM 766/05	<i>E. faecium</i>	+	+	+	–
CCDM 816/04	<i>E. faecium</i>	+	+	+	–
CCDM 170/05	<i>E. faecium</i>	+	+	+	–
CCDM 644/02	<i>E. faecium</i>	+	+	+	–
CCDM 106/05	<i>E. faecium</i>	+	+	+	–
CCDM 917/04	<i>E. faecium</i>	+	+	+	–
CCDM 120/05	<i>E. faecium</i>	+	+	+	–
CCDM 817/04	<i>E. faecium</i>	+	+	+	–

+ sekvence detekována, – sekvence nedetekována



1: PCR detekce DNA sekvencí *ddl_{E. faecium}* v celkové DNA sbírkových kmenů. Běh č. 1: CCDM 964/04, běh č. 2: CCDM 766/05, běh č. 3: CCDM 170/05, běh č. 4: pozitivní kontrola PCR *E. faecium* CCM 7250, běh č. 5: negativní kontrola PCR, M: 100 bp ladder (New England Biolabs, Anglie)



2: PCR detekce DNA sekvencí kódujících tyrosindekarboxylázu a histidindekarboxylázu v celkové DNA izolované z kmenů CCDM. M: 100 bp ladder (New England Biolabs, Anglie), běh č. 2: *E. faecium* CCDM 964/04, běh č. 3: *E. faecium* CCDM 766/05, běh č. 4: *E. faecalis* CNRZ 238, běh č. 5: *Lactococcus lactis* 30a ATCC 33222, běh č. 6: negativní kontrola PCR

SOUHRN

Cílem této práce byla rodová a druhová identifikace dvanácti probiotických kmenů rodu *Enterococcus* ze Sbírký čistých mlékařských kultur Laktoflora (CCDM, Milcom Praha, Česká republika). K identifikaci byla použita polymerázová řetězová reakce (DUTKA-MALEN a kol, 1995). Všechny analyzované kmeny byly zařazeny do rodu *Enterococcus* a druhu *E. faecium*. U všech kmenů byly prokázány některé probiotické vlastnosti a mohly by být použity pro výrobu funkčních potravin. Vzhledem ke skutečnosti, že byly některé kmeny *E. faecium* ve fermentovaných potravinách popsány jako producenti biogenních aminů, byly kmeny analyzované v této práci prověřeny na přítomnost či nepřítomnost genů pro tyrosindekarboxylázu a histidindekarboxylázu. Pro skríníng byla použita PCR popsaná COTONEM a kol., 2004. Přítomnost genu pro histidindekarboxylázu nebyla potvrzena v žádném z analyzovaných kmenů *E. faecium*, přítomnost genu pro tyrosindekarboxylázu byla potvrzena u všech kmenů podrobených skríníngu. Při aplikaci testovaných kmenů *E. faecium* jako startovacích kultur pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků musí být ve finálních výrobcích a po dobu jejich uchovávání testována produkce biogenního aminu tyraminu.

probiotika, fermentované mléčné výrobky, PCR, *Enterococcus faecium*, biogenní aminy, dekarboxylázová aktivita

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
- BETZL, D., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. H.: Identification of lactococci and enterococci by colony hybridization with 23S rDNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, 56, 2927–2929.
- BOTTGER, E. C.: Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 1989, 65, 171–176.
- BURDYCHOVÁ, R.: Skríníng vybraných startovacích bakteriálních kultur na přítomnost DNA sekvencí kódujících dekarboxylázu tyrosinu. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2006, 5, 7–11.
- COTON, M., COTON, E., LUCAS, P., 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.
- DEASY, B. M., REA, M. C., FITZGERALD, G. F., COGAN, T. M., BERESFORD, T. P.: A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *System. Appl. Microbiol.* 2000, 23, 510–522.
- DUBERNET, S., DESMASURES, N., GUEGUEN, M.: A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002, 10, 271–275.
- DUTKA-MALEN, S., AVERS, S., COURVALIN, P.: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33: 24–27.
- FACKLAM, R. R., COLLINS, M. D.: Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27: 3340–3343.
- KLIJN, N., WEERKAMP, A. H., DE VOS, W. M.: Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 788–792.
- 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.
- LANE, D. J., PACE, B., OLSEN, G. J., STAHL, D. A., SOGIN, M. L., PACE, N. R.: Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989, 82, 6955–6956.
- SALAMA, M., SANDINE, W., GIOVANNONI, S.: Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* supsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991, 57, 1313–1318.
- 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.

VINCENT, S. R., KNIGHT, R. G., GREEN, M.,

SAHM, D. F., SHLAES, D. M.: Vancomycin susceptibility and identification of motile enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29: 2335–2337.

Adresa

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