

SKRÍNING PROBIOTICKÝCH KULTUR URČENÝCH PRO VÝROBU FERMENTOVANÝCH POTRAVIN NA SCHOPNOST TVORBY BIOGENNÍCH AMINŮ

R. Burdychová, V. Dohnal

Došlo: 23. listopadu 2007

Abstract

BURDYCHOVÁ, R.: *Screening of probiotic cultures intended for processing of fermented foods for their ability to produce biogenic amines*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2008, LVI, No. 1, pp. 25–30

The contemporary trend is using probiotic cultures in fermented food production. They can be used as starter cultures and for their positive effect on human health. Probiotics are defined as living microorganisms present in food which consumed in adequate amounts affects positively the intestinal microflora's composition and balance and thus human health itself. Cultures of these bacteria have to be of human origin and be able to survive the passage through the gastrointestinal tract. They also have to be able to multiply on the site of action (in intestine) and must not be toxic or pathogenic. Unfortunately, even some probiotic cultures can be counted among potential producers of biogenic amines, so their testing for the presence of biogenic amines is necessary (BURDYCHOVÁ, 2007).

The aim of this study was screening of 26 types of bacterial cultures (SACCO, Italy) as probiotic cultures for their ability to produce biogenic amines tyramine and histamine. Cultivation in decarboxylating medium (BOVER-CID and HOLZAPFEL, 1999), HPLC described by BURDYCHOVÁ and DOHNAL (2007), and PCR detection of genes coding enzymes tyrosine decarboxylase and histidine decarboxylase, participating in formation of biogenic amines (COTON et al., 2004), were used as the screening methods.

19 strains of *Lactobacillus* spp., 3 strains of *Bifidobacterium* spp., 2 strains of *Pediococcus* spp. and 2 strains of *Enterococcus* spp. were examined by the methods mentioned above. The tyramine production was detected at 8 strains of *Lactobacillus* spp., 3 strains of *Bifidobacterium* spp. and 2 strains of *Enterococcus* spp., whereas no tested cultures were found to be able to produce histamine.

The strains at which production of biogenic amines tyramine and histamine wasn't detected are suitable for fermented food processing. When the strains at which production of tyramine was demonstrated were used in food processing, a control of concentration of this biogenic amine in final product is highly recommended.

biogenic amines, HPLC, probiotics, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*

Startovací kultury jsou vybrané a prověřené kmeny mikroorganismů, které jsou ve formě čisté kultury nebo ve směsích s jinými kmeny přidávány do potravin v průběhu výrobního procesu za účelem vyvolání určitých požadovaných změn. Použití startovacích kultur je jedním ze způsobů optimalizace výroby a zaručení kvality výrobků a má vliv hlavně na senzorickou jakost výrobků, zdravotní nezávadnost a na výrobní postup.

V současnosti je trendem používat při výrobě fermentovaných potravin probiotické kultury. Ty mohou mít funkci startovacích kultur nebo jsou při-

dávány pro dosažení pozitivního účinku na lidské zdraví. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy přítomné v potravě, které po požití v určitém množství příznivě ovlivňují složení a rovnováhu střevní mikroflóry, a tak i zdraví člověka. Kultury těchto bakterií musí být humánního původu, musí být schopné přežít průchod trávicím traktem, musí se v místě působení (ve střevě) množit a nesmí být toxické či patogenní (TANNOCK, 2001). Velké množství probiotických kmenů používaných v potravinářském průmyslu zůstává zatím z mnoha důvodů nedostatečně prostudováno. Během fer-

mentace potravin produkují tyto kultury řadu biologicky aktivních látek, které mohou příznivě, ale i negativně ovlivňovat lidské zdraví.

Biogenní aminy jsou toxické nízkomolekulární organické bazické sloučeniny, které v potravinách vznikají dekarboxylací aminokyselin působením mikrobiálních enzymů (dekarboxyláz). Dalšími faktory, které ovlivňují produkci biogenních aminů, jsou pH, teplota, dostupnost kyslíku a doba skladování. K toxikologicky nejvýznamnějším biogenním aminům patří tyramin, histamin, kadaverin a putrescin. Nejvíce prostudovanými jsou tyramin a histamin. Tyramin zvyšuje krevní tlak, způsobuje migrény s bolestí hlavy, může být příčinou krvácení do mozku, resp. selhání srdce. Toxický účinek tyraminu závisí na přijatém množství, přítomnosti jiných biogenních aminů a na celkovém fyziologickém stavu jedince (SILLA-SANTOS et al., 1996). Histamin způsobuje rozšíření periferních krevních cév, což vede ke snížení krevního tlaku a bolestem hlavy. Dále histamin indukuje kontrakci hladkých svalů vnitřností s následkem břišních křečí, průjmů a zvracení. Toxické dávky biogenních aminů je obtížné stanovit. Závisí na individuálních rozdílech mezi lidmi a na přítomnosti různých biogenních aminů v potravě. Pro histamin je toxická dávka asi 70–100 mg/kg potravy, pro tyramin asi 20–80 mg/kg (KOMPRDA, 2005).

Za tvorbu biogenních aminů jsou zodpovědné enzymy dekarboxylázy, zejména tyrosindekarboxyláza a histidinekarboxyláza (COTON et al., 2004). Schopnost tvořit biogenní aminy je při plánovaném použití probiotických kultur pro výrobu fermentovaných potravin nežádoucí. Metody umožňující detekci mikroorganismů produkujících biogenní

aminy jsou proto důležité z hlediska prevence akumulace biogenních aminů v potravinách a odstranění rizika intoxikace citlivých osob.

Cílem této práce bylo prověřit 26 druhů probiotických kultur na schopnost tvořit biogenní aminy tyramin a histamin. Pro skríníng byla použita metoda kultivace v dekarboxylačním médiu (BOVER-CID a HOLZAPFEL, 1999), HPLC popsaná BURDYCHOVOU a DOHNALEM (2007) a metoda detekce genů kódujících enzymy tyrosindekarboxylázu a histidinekarboxylázu účastnících se tvorby biogenních aminů tyraminu a histaminu (BURDYCHOVÁ, 2006).

MATERIÁL A METODY

Bakteriální kmeny a jejich kultivace

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.

Kultury byly použity jako pozitivní kontroly pro PCR a po kultivaci v dekarboxylačním médiu s tyrosinem a histidinem i jako pozitivní kontrola pro HPLC analýzu.

26 probiotických kultur, které poskytla firma SACCIO (Itálie), bylo kultivováno dle podmínek uvedených v Tab. I. Analyzováno bylo 19 kultur rodu *Lactobacillus*, tři kultury rodu *Bifidobacterium*, dvě kultury rodu *Pediococcus* a dvě kultury rodu *Enterococcus*.

I: Kultivační podmínky bakteriálních kultur

Bakteriální rod	Kultivační médium	Podmínky kultivace
<i>Lactobacillus</i>	MRS, pH = 6,5	anaerobně, 30 °C, 72 h
<i>Pediococcus</i>	MRS, pH = 6,2	aerobně, 37 °C, 48 h
<i>Bifidobacterium</i>	BSM	anaerobně, 45 °C, 72 h
<i>Enterococcus</i>	M17	aerobně, 37 °C, 24 h

Izolace DNA a PCR

Stanovení koncentrace a čistoty DNA byly provedeny podle SAMBROOK et al. (2001). Hrubé lyzáty probiotických kultur byly připraveny suspendováním jedné bakteriální kolonie v 10 µl PCR vody a povařením vzniklé suspenze při 100 °C po dobu 10 min. Po povaření byla suspenze centrifugována a 1 µl hrubého lyzátu buněk obsahující genomovou DNA byl použit pro následnou PCR analýzu.

Multiplex PCR pro detekci genů pro tyrosin a histidin dekarboxylázu byla provedena v konečném objemu 25 µl obsahujícím 10 ng genomové DNA (1 µl hrubého lyzátu buněk), 10 pmol každého primeru TD2/TD5 a HDC3/HDC5, 1 U Taq DNA poly-

merázy a příslušné množství Qiagen HotStar Master Mixu (Qiagen, Hilden, Německo).

Vzorky DNA byly nejprve kompletně denaturovány 15 min. inkubací při 95 °C. DNA byla amplifikována ve 30 cyklech; denaturace při 95 °C po dobu 45 s, připojení primerů při 55 °C po dobu 45 s a elongace při 72 °C po dobu 75 s, s použitím modelu PTC – 150 HB thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA). V posledním amplifikačním cyklu byly vzorky inkubovány 10 min při 72 °C pro kompletní elongaci PCR produktů. PCR produkty byly vizualizovány agarosovou gelovou elektroforézou (1 %, 5 V/cm, 60 min.) a barvením ethidium bromidem (0,5 µl/ml). Jako negativní kontrola PCR byly použity komponenty PCR bez DNA.

Stanovení tvorby biogenních aminů pomocí HPLC

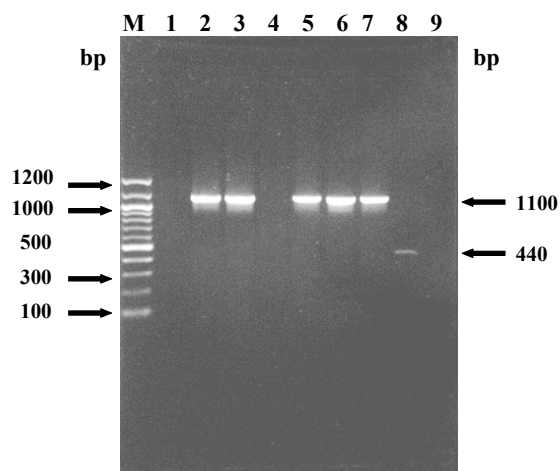
Kolonie bakteriálních kmenů byly kultivovány v dekarboxylačním médiu (BOVER-CID a HOLZAPFEL, 1999) s přidávkou aminokyselin tyrosinu a histidinu (10 mg/l). Při úpravě vzorku, jež zahrnoval centrifugaci dekarboxylačního média (Hettich Universal 32R, Německo) s následným přidáním 0,1 M roztoku kyseliny chlorovodíkové a roztoku vnitřního standardu (1,7-diaminoheptan). Směs byla promíchána na vortexu (MS2 Minishaker, IKA Werke, Německo) a centrifugována a zfiltrována přes 0,45 µm nylonový membránový filtr. Před HPLC analýzou proběhla derivatizace 0,5 µl vzorku ortho-ftalaldehydem (OPA, 2,5 µl) v borátovém pufru (pH 9,5) za přítomnosti 2-merkptoethanolu. Po 2 minutách byl vzorek dávkován na chromatografickou kolonu. Analýza byla realizována na kapalinovém chromatografu HP 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Obsah biogenních aminů byl v médiu stanoven dle postupu popsáném BURDÝCHOVOU a DOHNALEM (2007).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Velké množství probiotických kmenů, používaných v potravinářském průmyslu, zůstává zatím z mnoha důvodů nedostatečně prostudováno. Během fermentace potravin mohou tyto kultury produkovat řadu biologicky aktivních látek, které mohou příznivě, ale i negativně ovlivňovat lidské zdraví. Schopnost tvořit biogenní aminy tyramin a histamin byla popsána u řady startovacích kultur, ale i u některých zástupců probiotických mikroorganismů (BERNARDEAU, 2007). Probiotické kultury, podobně jako startovací mikroorganismy, by měly být vzhledem k ochraně spotřebitele prověřovány na schopnost tvořit biogenní aminy, případně by měl být kontrolován obsah biogenních aminů přímo ve finálních výrobcích.

V této práci bylo na schopnost tvorby biogenních aminů prověřeno celkem 26 probiotických kmenů dodaných firmou SACCO (Itálie), používaných při výrobě fermentovaných výrobků živočišného původu (19 kultur rodu *Lactobacillus*, tři kultury rodu *Bifidobacterium*, dvě kultury rodu *Pediococcus* a dvě kultury rodu *Enterococcus*). Specifické DNA sekvence pro enzym tyrosindekarboxylázu byly detekovány u osmi kmenů rodu *Lactobacillus*, tří kmenů rodu *Bifidobacterium* a dvou kmenů rodu *Enterococcus* a tyto bakterie byly označeny za potenciální původce tvorby tyraminu. Přítomnost genu pro histidine-

karboxylázu nebyla detekována u žádného z prověřovaných kmenů. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 1.



1: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů po amplifikaci specifických sekvencí pro tyrosindekarboxylázu (1100 bp) a histidinekarboxylázu (440 bp)

M: 100 bp ladder (New England Biolabs), běh. č. 1: *L. casei* 01, běh. č. 2: *Lactobacillus plantarum* 10, běh. č. 3: *Lactobacillus rhamnosus* 02, běh. č. 4: *Pediococcus pentosaceus* 02, běh. č. 5: *Bifidobacterium lactis* 01, běh. č. 6: *Enterococcus faecium* 02, běh. č. 7: pozitivní kontrola – *E. faecalis* CNRZ 238, běh. č. 8: pozitivní kontrola *Lactobacillus lactis* 30a, běh. č. 9: negativní kontrola PCR

Produkce tyraminu a histaminu byla u všech 26 prověřovaných kmenů testována v dekarboxylačním médiu s prekurzory tyraminu a histaminu (tyrosinem a histidinem) a pomocí HPLC. Pro skríníng produkce biogenních aminů není vhodné použít jen dekarboxylační médium. Detekce biogenních aminů s použitím tohoto skríníngového média poskytuje řadu falešně pozitivních výsledků (BOVER-CID a HOLZAPFEL, 1999) a je proto nutné výsledky ověřit pomocí analytické koncovky (HPLC). Tvorba tyraminu byla prokázána u všech kultur, u kterých byl detekován gen pro tyrosindekarboxylázu (19 zástupců rodu *Lactobacillus*, tři zástupci rodu *Bifidobacterium*, dva zástupci rodu *Enterococcus*), a to v různých koncentracích. Tvorba histaminu nebyla zjištěna u žádné z prověřovaných kultur. Výsledky byly statisticky zpracovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a jsou uvedeny v Tab. II. Obr. 2 dokumentuje chromatogramy standardu a pozitivních kontrol produkce tyraminu a histaminu při HPLC analýze.

II: Testované probiotické kultury určené pro výrobu fermentovaných potravin (Sacco, Itálie)

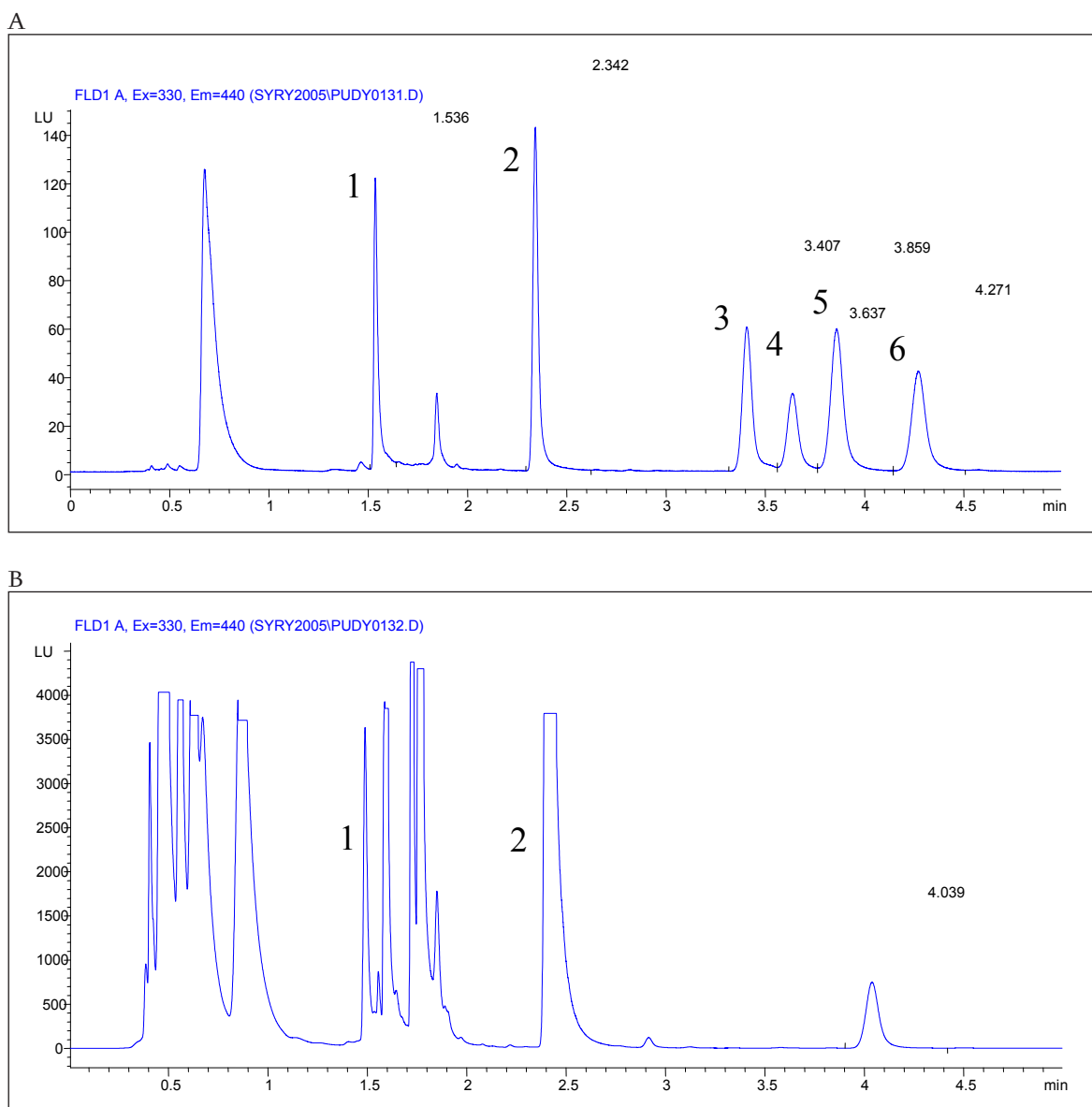
Označení testovaného kmene	Detekce DNA sekvencí pro tyrosin-dekarboxylázu	HPLC detekce tyraminu (mg/l média)	Detekce DNA sekvencí pro histidin-dekarboxylázu	HPLC detekce histaminu (mg/l média)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 03	- ^a	- ^c	-	- ^d
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 04	-	-	-	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 08	-	-	-	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 147	-	-	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i> 02	-	-	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i> 13	-	-	-	-
<i>Lactobacillus lactis</i> 01	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> 01	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> 02	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> 16	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> 09	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> 10	+ ^b	0,50 ± 0,01	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> 01	+	0,55 ± 0,01	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 02	+	1,55 ± 0,01	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 04	+	0,40 ± 0,01	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 05	+	0,45 ± 0,01	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 08	+	0,40 ± 0,01	-	-
<i>Lactobacillus sakei</i> 01	+	0,40 ± 0,01	-	-
<i>Lactobacillus sakei</i> 02	+	0,50 ± 0,01	-	-
<i>Bifidobacterium lactis</i> 01	+	0,50 ± 0,01	-	-
<i>Bifidobacterium lactis</i> 04	+	0,40 ± 0,01	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i> 03	+	0,40 ± 0,01	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 02	-	-	-	-
<i>Pediococcus acidilactici</i> 09	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> 02	+	6,50 ± 0,01	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> 04	+	7,45 ± 0,01	-	-

^a sekvence nedetekována, ^b sekvence detekována, ^c tyramin nedetekován, ^d histamin nedetekován

Metody umožňující detekci probiotických mikroorganismů produkujících biogenní aminy jsou důležité z hlediska prevence akumulace biogenních aminů v potravinách a odstranění rizika intoxikace citlivých osob. Přítomnost specifických DNA sekvencí enzymů účastnících se tvorby biogenních aminů ve startovacích či probiotických mikroorganismech a dokonce ani produkce biogenních aminů v substrátu s volnými aminokyselinami neznamená, že budou příslušné bakteriální kmeny ve fermentovaných potravinách tvořit biogenní aminy v toxikologicky významném množství (100 mg/100 g potraviny, u dětí 50 mg/100 g potraviny). Startovací a probiotické mikroorganismy se mohou vzájemně ovlivňovat a dokonce jsou známy případy, kdy určitý bakteriální druh degradoval biogenní aminy

produkované jinými mikroorganismy (např. *Lactobacillus rhamnosus*). Proto je nutné konkrétní mikroorganismy nejprve testovat při výrobě reálných produktů a při jejich uchovávání a stanovením biogenních aminů ověřit, zda jsou tyto produkovány v toxikologicky závažných koncentracích. Je totiž známo, že biogenní aminy mohou pozitivně ovlivnit senzorickou jakost fermentovaných potravin (KOMPRDA a kol., 2007).

Kmeny, u kterých nebyla prokázána tvorba biogenních aminů tyraminu a histaminu, jsou vhodné pro výrobu fermentovaných potravin. U kmenů s prokázanou produkcí tyraminu je vhodné při jejich použití důsledně kontrolovat koncentraci tohoto biogenního aminu ve finálním výrobku.



2: Stanovení tyraminu a histaminu pomocí HPLC; A: standard (1 = histamin, 2 = tyramin, 3 = tryptamin, 4 = putrescin, 5 = 2-phenylethylamin, 6 = cadaverin), B: pozitivní kontrola na přítomnost tyraminu a histaminu.

SOUHRN

V současnosti je trendem používat při výrobě fermentovaných potravin probiotické kultury. Ty mohou mít funkci startovacích kultur a do výrobků jsou přidávány pro dosažení pozitivního účinku na lidské zdraví. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy přítomné v potravě, které po požití v určitém množství příznivě ovlivňují složení a rovnováhu střevní mikroflóry, a tak i zdraví člověka. Kultury těchto bakterií musí být humánního původu, musí být schopné přežít průchod trávicím traktem, musí se v místě působení (ve střevě) množit a nesmí být toxické či patogenní. Bohužel i zástupci probiotických kultur patří mezi potenciální producenty biogenních aminů a je proto nutné je prověřovat na schopnost tvorby biogenních aminů (BURDYCHOVÁ, 2007).

Cílem této práce bylo prověřit 26 druhů bakteriálních probiotických kultur poskytnutých firmou Sacco (Itálie) na schopnost tvořit biogenní aminy. Pro skríníng byla použita metoda kultivace v dekarboxylačním médiu (BOVER-CID a HOLZAPFEL, 1999), HPLC popsaná BURDYCHOVOU a DOHNALEM (2007) a metoda detekce genů kódujících enzymy tyrosindekarboxylázu a histidindekarboxylázu účastnících se tvorby biogenních aminů (COTON a kol., 2004).

Uvedenými metodami bylo prověřeno 19 kmenů rodu *Lactobacillus*, tři kmeny rodu *Bifidobacterium*, dva kmeny rodu *Pediococcus* a dva kmeny rodu *Enterococcus*. Schopnost tvorby tyraminu byla zjištěna u osmi kmenů rodu *Lactobacillus*, tří kmenů rodu *Bifidobacterium* a dvou kmenů rodu *Enterococcus*, schopnost tvořit histamin nebyla zjištěna u žádné z prověřovaných kultur.

Kmeny, u kterých nebyla prokázána tvorba biogenních aminů tyraminu a histaminu, jsou vhodné pro výrobu fermentovaných potravin. U kmenů s prokázanou produkcí tyraminu je vhodné při jejich použití důsledně kontrolovat koncentraci tohoto biogenního aminu ve finálním výrobku.

biogenní aminy, HPLC, probiotika, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*

LITERATURA

- BERNARDEAU, M., VERNOUX, J. P., HENRI-DUBERNET, S., GUÉGUEN, M., 2007: The *Lactobacillus* genus. *Int J Food Microbiol.* In print.
- BOVER-CID, S., HOLZAPFEL, W. H., 1999: Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.*, 53: 33–41.
- BURDYCHOVÁ, R., DOHNAL, V., 2007: Využití HPLC ke stanovení produktu exprese genu pro mikrobiální tyrosindekarboxylasu. *Chemické listy*, 101, 11: 907–910. ISSN 0009-2770.
- BURDYCHOVÁ, R., 2007: Mikrobiologická detekce probiotických mikroorganismů ve fermentovaných mléčných výrobcích. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, LV, 2: 15–20. ISSN 1211-8516.
- BURDYCHOVÁ, R., 2006: Skrining vybraných startovacích bakteriálních kultur na přítomnost sekvencí kodujících dekarboxylázu tyrosinu. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, LIV, 5: 7–11. ISSN 1211-8516.
- COTON, M., COTON, E., LUCAS, P., LONVAUD, A., 2004: 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.*, 21: 125–130.
- KOMPRDA, T., SMĚLA, D., PECHOVÁ, P., KALHOTKA, L., ŠTENCL, J., KLEJDUS, B., 2004: Effect of starter culture, spice mix and storage time temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Sci.*, 67: 607–616.
- KOMPRDA, T., 2005: Biogenní aminy a polyaminy ve fermentovaných potravinách živočišného původu. *Veterinářství*, 10: 646–650.
- SAMBROOK, J., MACCALLUM, E. F., RUSSEL, D., 2001: Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press., 2344 pp. ISBN 0-87969-577-3.
- SILLA-SANTOS, M. H., 1996: Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol.*, 29: 213–231.
- TANNOCK, G. W., 2002: Probiotics and Prebiotics. Where are we going? Caister Academic press, England. ISBN: 0-9542464-1-1.

Adresa

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