# KOMPARACE RŮZNÝCH METOD DETEKCE DEKARBOXYLÁZOVÉ AKTIVITY U BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ
# COMPARISON OF DIFFERENT METHODS OF DECARBOXYLATION ACTIVITY DETECTION IN LACTIC ACID BACTERIA

*Leona Buňková, František Buňka, Michaela Hlobilová, Vladimír Dráb, Stanislav Kráčmar*

## ABSTRACT
The aim of this paper was to study the production of biogenic amines (histamine, tyramine, putrescine, cadaverine, agmatine, spermine and spermidine) by selected technologically important lactic acid bacteria (strains of genera *Lactococcus* and *Lactobacillus*). Three methods (ion-exchange chromatography, PCR and cultivation method with pH indicator) were used. Within the 27 strains of lactic acid bacteria tested, the production of tyramine (formed by tyrosine decarboxylase) was detected in 7 strains (3 strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 3 strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and 1 strain of *Lactobacillus delbrueckii*). The other biogenic amines were not detected. Cultivation in decarboxylation medium seems to be the least accurate method for the detection of biogenic amines due to enhanced risk of false-positive reactions. Therefore, in order to detect bacteria producing biogenic amines, PCR and chromatographic methods (e.g. ion-exchange chromatography) or their combination can be recommended.
**Key words:** biogenic amines, lactic acid bacteria, tyramine, ion-exchange chromatography, PCR, cultivation method.

## ÚVOD
Biogenní aminy jsou nízkomolekulární bazické sloučeniny, jejichž výskyt je v potravinách závislý zejména na dekarboxylázové aktivitě přítomných mikroorganizmů (**Halász et al., 1994**). Výskyt biogenních aminů lze předpokládat v potravinách obsahujících bílkoviny a nebo volné aminokyseliny, zvláště pokud poskytují vhodné podmínky pro biochemickou aktivitu přítomných mikroorganizmů. Biogenní aminy mohou tedy sloužit jako indikátory procesu fermentace potravin ale také jejich kažení (**Silla Santos, 1996**). Ve fermentovaných potravinách jsou biogenní aminy vytvářeny především dekarboxylací příslušných aminokyselin substrátově specifickými enzymy bakterií mléčného kvašení, které se využívají jako starterové kultury. Mezi faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů u bakterií, patří teplota a pH prostředí, aero-/anaerobióza, dostupnost zdrojů uhlíku (např. glukózy) aj. (**Greif et al., 1997, 1998, 2006; Gardini et al., 2001, 2005; Bover-Cid et al., 2008**).
Bakterie mléčného kvašení jsou častými producenty biogenních aminů. Schopnost dekarboxylace tyrozinu byla pozorována u mnohých zástupců rodů *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*,, *Enterococcus*, *Oenococcus*, dekarboxylace tryptofanu u *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* (**Roig-Sagués et al., 1997; de Llano et al., 1998; Marcobal et al., 2006; Arena et al., 2007; Fernández et al., 2007; Landete et al., 2007; Bover-Cid et al., 2008**). Produkce putrescinu byla zjištěna u rodu *Lactobacillus* (**Arena and Manca de Nadra, 2001; Bover-Cid et al., 2008**) a produkce histaminu u *Lactobacillus*, *Oenococcus* a *Pediococcus* (**Landete et al., 2007, 2008**). Produkce biogenních aminů je vlastnost specifická spíše pro určité kmeny bakterií než vlastnost typická pro daný druh, takže různé kmeny téhož druhu se mohou lišit v produkci biogenních aminů (**Arena and Manca de Nadra, 2001**).
Bezpečnost potravin může být ohrožována mnohými riziky biologického, fyzikálního nebo chemického původu **(Golian et al., 2008; Kačániová et al., 2009)**. Mezi často sledované kontaminanty potravin patří v poslední době i biogenní aminy, které mohou být příčinou alimentárních otrav (**Halász et al., 1994; Silla Santos, 1996**), proto je z důvodu prevence

v potravinářství nutná včasná detekce bakterií, které je produkují (**Buňková et al., 2009a**). K detekci bakterií s dekarboxylázovou aktivitou se využívají mnohé kvalitativní i kvantitativní metody. Skríningové mikrobiologické metody pro záchyt bakterií produkujících biogenní aminy využívají diferenciační média obsahující příslušnou aminokyselinu a pH indikátor (**Maijala, 1993; Actis et al., 1999; Roig-Sagués, 1997; Bover-Cid and Holzapfel, 1999**). Určitou nevýhodou těchto metod mohou být falešně pozitivní výsledky z důvodu tvorby jiných produktů s alkalickou reakcí než biogenních aminů (**Actis et al., 1999**). Za další možnou nevýhodu těchto metod může být považována neschopnost zachytit malé množství produkovaných biogenních aminů. Kvalitativně i kvantitativně lze přítomnost biogenních aminů v potravinách, ale také v kultivačních médiích, stanovit i tenkovrstvou chromatografií (**Actis et al., 1999; Constantini et al., 2006**) nebo vysoko-účinnou kapalinovou chromatografií (**Bover-Cid and Holzapfel, 1999; Constantini et al., 2006**). V poslední době se pro detekci bakterií produkujících biogenní využívají i metody molekulární biologie, zejména PCR (**Landete et al., 2007**), pomocí které lze s využitím specifických primerů rychle zachytit bakterie nesoucí příslušné geny zodpovědné za produkci dekarboxylačních enzymů
Cílem této studie bylo pomocí tří metod (iontově-výměnné chromatografie, PCR a kultivační metody) prověřit produkci biogenních aminů tyraminu, histaminu, kadaverinu, putrescinu, agmatinu, sperminu a spermidinu u některých kmenů *Lactococcus lactis* a zástupců rodu *Lactabacillus*, které byly poskytnuty Sbírkou kultur mlékařských mikroorganizmů (CCDM). Tyto mikroorganizmy jsou součástí starterových kultur dodávaných do mlékárenského průmyslu v regionu Evropy.

## MATERIÁL A METODIKA

*Kmeny bakterií a podmínky kultivace*

Produkce biogenních aminů byla sledována u následujících kmenů získaných ze Sbírky kultur mlékařských mikroorganizmů Laktoflora® (CCDM): *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 8, CCDM 66, CCDM 67, CCDM 235, CCDM 364, CCDM 664 a CCDM 767, *Lactobacillus helveticus* CCDM 807, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, CCDM 885, CCDM 890, CCDM 946, CCDM 1004 a CCDM 1005, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, CCDM 53, CCDM 141, CCDM 354, CCDM 412, CCDM 414, CCDM 418 a CCDM 421, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 823 a CCDM 1006. Dále byly pro srovnání testovány kmeny z České sbírky mikroorganizmů (CCM): *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 4289, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825, *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833. *Enterococcus faecalis* CCM 2665 byl použit jako pozitivní kontrola pro PCR (producent tyraminu).
Kmeny laktobacilů byly kultivovány v MRS bujónu (Oxoid, Basingstoke, UK) při 37 ± 1 °C po dobu 48 hodin. Laktokoky byly kultivovány v MRS bujónu (Oxoid) obohaceném o 0,5 % (w/v) glukózy (LachNer, Neratovice, Czech Republic) 48 hodin při 30 ± 1 °C. Pro kultivaci *E. faecalis* byl použit Nutrient Broth No. 2 (Oxoid), a to při 30 ± 1 °C po dobu 48 hodin.

*Stanovení dekarboxylázové aktivity bakterií*

V případě zjišťování dekarboxylázové aktivity testovaných kmenů bylo použito dekarboxylační médium připravené dle **Bover-Cid a Holzapfel (1999)**, které obsahovalo příslušnou aminokyselinu (histidin, tyrozin, lyzin, ornitin a arginin) v koncentraci 1,0 % (w/v) a pH indikátor (bromkresol purpur). Laktobacily byly kultivovány při 37 ± 1 °C 48 hodin, laktokoky při 30 ± 1 °C po dobu 48 hodin.
Produkce 7 biogenních aminů (histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, spermin, spermidin a agmatin) v kultivačním médiu byla zjišťována pomocí iontově-výměnné chromatografie (Automatický analyzátor aminokyselin AAA400, Ingos Praha, Česká republika) podle

**Buňková et al. (2009b)**. Každý izolát byl analyzován alespoň třikrát. Standardy byly získány ze Sigma-Aldrich.
Pro PCR byla bakteriální DNA izolována fenol-chloroformovou extrakcí z kultur bakterií rostoucích přes noc (**Arena et al., 2002**). Vysušený pelet byl resuspendován v příslušném objemu TE pufru (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA). PCR byla provedena s primery podle **de las Rivas et al. (2006)** pro tyrozindekarboxylázu (TDC-F a TDC-R), histidindekarboxylázu (HIS1-F a HIS1-R) lyzindekarboxylázu (CAD2-F a CAD2-R) a s primery podle **Marcobal et al. (2005)** (primery 3 a 16 pro ornitindekarboxylázu). PCR směs obsahovala 100 ng bakteriální DNA, 200 μM každého dNTP, 1μM každého primeru, 2,5 mM $MgCl_2$, a 1 U Taq DNA polymerázy. Reakce probíhala za následujících podmínek: 95 °C pro aktivaci enzymu po dobu 10 min, následovalo 30 cyklů 45 s při 95 °C, 45 s při 53 °C (v případě primerů 3 a 16 při teplotě 52 °C), 2 min při 72 °C a závěrečný krok 20 min při 72 °C. PCR produkty byly rozděleny pomocí 1% (w/v) agarózového gelu a barveny pomocí etidiumbromidu podle **Sambrook et al. (2001)**.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

V této studii byl proveden skríning bakterií na produkci biogenních aminů histaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, sperminu a spermidinu a to třemi různými metodami, při kterých bylo testováno 27 kmenů bakterií mléčného kvašení (11 kmenů rodu *Lactobacillus* a 16 kmenů *Lactococcus lactis*).
Mikroorganizmy byly nejprve testovány kultivační metodou v dekarboxylačním médiu s prekurzory příslušných biogenních aminů (aminokyselinami histidinem, tyrozinem, argininem, putrescinem a lyzinem) a pH indikátorem po 48hodinové kultivaci. U žádného z testovaných 27 kmenů nebyla kultivační metodou zjištěna barevná změna dekarboxylačního média s histidinem, ornitinem a lyzinem (Tabulka 1).

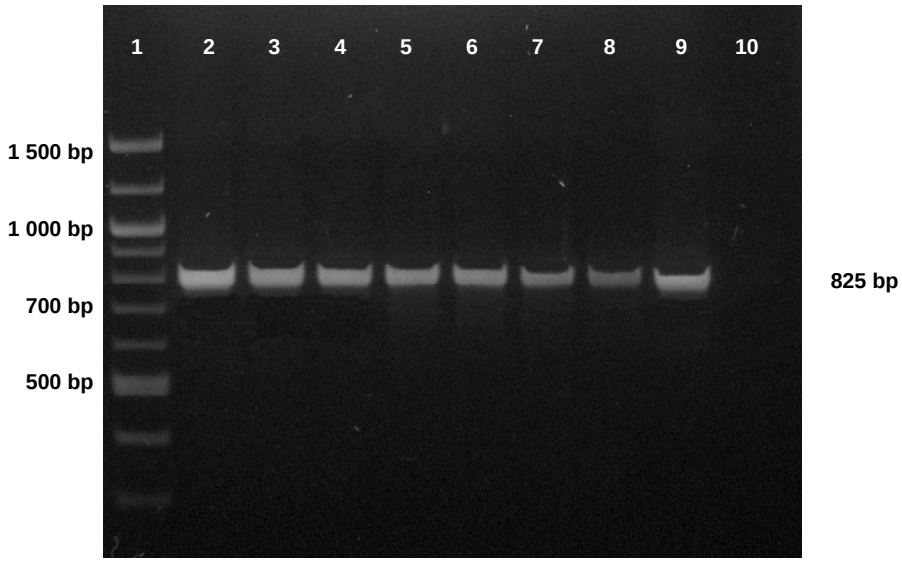
**Tabulka 1** Barevná změna dekarboxylačního média s příslušnou aminokyselinou zjištěná kultivační metodou po 48 hodinách kultivace.

| Druh | Počet testovaných kmenů | Arg[a] | His | Lys | Orn | Tyr |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Lactobacillus*** | | | | | | |
| *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* | 8 | 1[b] | 0 | 0 | 0 | 1 |
| *Lb. helveticus* | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Lb. rhamnosus* | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Lb. acidophilus* | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ***Lactococcus*** | | | | | | |
| *L. lactis* subsp. *cremoris* | 6 | 5 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| *L. lactis* subsp. *lactis* | 8 | 7 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

[a] Aminokyselina přidaná do dekarboxylačního média – arginin (Arg), histidin (His), lyzin (Lys), ornitin (Orn), tyrozin (Tyr).
[b] Celkový počet kmenů s pozitivní reakcí.

Změna zbarvení dekarboxylačního kultivačního média obsahujícího arginin byla pozorována u 7 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 53, CCDM 141, CCDM 354, CCDM 412, CCDM 414 a CCDM 418), 5 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 824, CCDM 885, CCDM 890, CCDM 946 a CCDM 1004), 1 kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (CCDM 1006), 1 kmene *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CCDM 364). Alkalizace dekarboxylačního média s tyrozinem byla detekována po

kultivaci 3 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 53, CCDM 141), 3 kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 824, CCDM 946 a CCDM 1004), 1 kmene *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CCDM 364).
Další metodou, kterou lze rychle provést skríning bakterií na produkci biogenních aminů, je PCR. U všech testovaných kmenů BMK byla provedena PCR s primery 3 a 16 (pro ornitindekarboxylázu), TDC-F a TDC-R (pro tyrozindekarboxylázu), HIS1-F a HIS1-R (pro histidindekarboxylázu) a s primery CAD2-F a CAD2-R (pro lyzindekarboxylázu). S použitím uvedených primerů nebyla u žádného z testovaného kmene zjištěna přítomnost genu pro enzymy dekarboxylující histidin, lyzin ani ornitin. U 6 kmenů *L. lactis* (CCDM 48, CCDM 53, CCDM141, CCDM 824, CCDM 946 a CCDM 1004), 1 kmene *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CCDM 364) a rovněž u kontrolního kmene *Enterococcus faecalis* CCM 2665 byla zjištěna přítomnost genu pro tyrozindekarboxylázu (Obrázek 1).




**Obrázek 1** PCR produkty získané s primery TDC-F/TDC-R u testovaných kmenů bakterií mléčného kvašení.*

* Běh 1 – 100 bp marker; 2 – *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 364; 3 – *Lactococcus lactis* CCDM 48; 4 – *L. lactis* CCDM 53; 5 – *L. lactis* CCDM 141; 6 – *L. lactis* CCDM 824; 7 – *L. lactis* CCDM 946; 8 – *L. lactis* CCDM 1004; 9 – *Enterococcus faecalis* CCM 2665; 10 – negativní kontrola bez DNA.

Pomocí iontově-výměnné chromatografie (IEC) byla po kultivaci bakterií zjišťována přítomnost biogenních aminů v dekarboxylačním médiu s aminokyselinami histidinem, tyrozinem, lyzinem, ornitinem a argininem. U žádné z testovaných bakterií nebyla metodou IEC zjištěna produkce putrescinu, agmatinu, spermidinu, sperminu, kadaverinu ani histaminu. V dekarboxylačním médiu obsahujícím tyrozin byla zjištěna produkce tyraminu u 3 kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 53 a CCDM 141), 3 kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 824, CCDM 946 a CCDM 1004) a 1 kmene *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CCDM 364). Detekovaná množství tyraminu se pohybovala v rozmezí 1,3 – 5,5 g/l kultivačního média (Tabulka 2). U kontrolního kmene *Enterococcus faecalis* CCM 2665 byla zjištěna koncentrace tyraminu 0,6 ± 0,1 g/l kultivačního média. U výše zmíněných kmenů byla přítomnost tyraminu zjištěna i v dekarboxylačních médiích obsahujících ostatní testované aminokyseliny (jednotlivě histidin, lyzin, ornitin a arginin). V těchto případech však

bylo detekované množství více jak desetinásobně nižší ve srovnání s koncentrací tyraminu v dekarboxylačním médiu s tyrozinem.
V dekarboxylačním médiu s tyrozinem bylo po kultivaci pomocí IEC zjišťováno množství volného tyrozinu. U kmenů, které podle IEC neprodukovaly tyramin, nedošlo v kultivačním médiu k signifikantním změnám ($P \geq 0,05$) v obsahu tyrozinu oproti médiu bez mikroorganizmů. U mikroorganizmů, které podle IEC produkovaly tyramin, došlo po 48 hodinové kultivaci k signifikatními poklesu obsahu tyrozinu ($P < 0,001$) ve srovnání s kontrolním bujónem prostém inokulace (výsledky jsou uvedeny v Tabulce 2).

**Tabulka 2** Detekce produkce tyraminu u testovaných kmenů bakterií mléčného kvašení metodou IEC a úbytek aminokyseliny tyrozinu.

| **Kmen** | **Množství tyraminu (g/l)[a]** | **Množství tyrozinu (g/l)[a]** |
|---|---|---|
| **Kontrola (bez mikroorganizmů)** | ND [b] | 10,2 ± 0,1 |
| **Pozitivní kontrola** | | |
| *Enterococcus faecalis* CCM 2665 | 0,6 ± 0,1 | 9,3 ± 0,3 |
| ***Lactobacillus*** | | |
| *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 364 | 1,3 ± 0,1 | 8,6 ± 0,2 |
| ***Lactococcus*** | | |
| *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 | 2,3 ± 0,3 | 7,5 ± 0,2 |
| *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 | 2,8 ± 0,2 | 7,2 ± 0,5 |
| *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 | 2,6 ± 0,2 | 7,3 ± 0,7 |
| *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 | 2,9 ± 0,3 | 7,0 ± 0,6 |
| *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 | 2,1 ± 0,1 | 7,9 ± 0,4 |
| *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004 | 2,7 ± 0,3 | 7,2 ± 0,4 |

[a] průměr ± směrodatná odchylka (S.D.; n = 10)
[b] ND – produkce nebyla detekována

Z Tabulky 2 rovněž vyplynulo, že s rostoucí koncentrací tyraminu v médiu klesalo detekovaném množství tyraminu (korelační koeficient –0,9962; $P < 0,001$).
V dekarboxylačním médiu obsahujícím arginin bylo po kultivaci pomocí IEC zjišťováno rovněž množství volného argininu, ornitinu a citrulinu, a to z důvodu vysvětlení falešně pozitivních výsledků kultivační metody. Kontrolní bujón s přidaným argininem (bez mikroorganizmů) obsahoval 10,1 ± 0,1 g/l argininu, naopak ornitin a citrulin zde detekován nebyl. U 14 kmenů, u kterých byla v tomto bujónu zjištěna barevná změna, byl po inkubaci zjištěn signifikantní úbytek argininu a současně nárůst obsahu ornitinu a citrulinu ($P < 0,001$) ve srovnání s kontrolním médiem. Korelace mezi obsahem argininu a koncentracemi ornitinu a citrulinu v bujónu po inkubaci byly rovněž signifikantní: –0,915, respektive –0,908 ($P < 0,01$). U ostatních testovaných kmenů byl zaznamenán pouze nepatrný pokles obsahu argininu ve srovnání s kontrolním bujónem; ornitin a citrulin zde detekován nebyl.
Ze skupiny laktokoků byla schopnost tvořit tyramin detekována u 3 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a 3 kmenů *Lactotoccus lactis* subsp. *cremoris*. Produkci tyraminu, i když v nižších koncentracích, zaznamenali u komerční starterové kultury složené z *L. lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *cremoris také* **Santos et al. (2003)**. Naproti tomu **Delgado et al. (2002)** nezjistili produkci tyraminu ani jiného biogenního aminu u 29 kmenů laktokoků izolovaných ze sýrů. Tvorbu tyraminu detekovali také **de Llano et al. (1998)**, a to u kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. V naší studii však ani u jednoho z testovaných kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* produkce tyraminu zjištěna nebyla.

Z 9 testovaných kmenů *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* byla produkce tyraminu detekována pouze v jednom případě. V dostupné literatuře nebyla u kmenů těchto mikroorganizmů tvorba tyraminu doposud publikována. Tato studie testovala rovněž po jednom kmenu *Lb. rhamnosus* a *Lb. acidophilus*, kde rovněž přítomnost tyraminu nebyla zaznamenána. Na druhou stranu řada jiných laktobacilů biogenní aminy včetně tyraminu produkuje, například některé kmeny *Lb. brevis* nebo *Lb. paracasei* (**Arena and Manca de Nadra, 2001; Arena et al., 2007; Landete et al., 2007**).

Výše popisované a diskutované výsledky jsou tak v souladu s tvrzením, že produkce biogenních aminů u bakterií je spíše vlastností jednotlivých kmenů než druhů nebo dokonce rodů bakterií. Z výsledků tohoto experimentu rovněž vyplynulo, že se zvyšujícím se množstvím prekurzoru (tyrozinu) se zvyšuje produkce příslušného biogenního aminu (v tomto případě tyraminu), což potvrzují i další studie (**Fernández et al., 2007**). Z tohoto důvodu je vhodné při výrobě fermentovaných potravin prověřovat nejen kmeny mikroorganizmů (s cílem detekovat potenciální producenty biogenních aminů), ale sledovat také koncentraci prekurzorů pro dekarboxylázovou reakci.

Ze srovnání jednotlivých metod, kterými byla produkce biogenních aminů u zvolených bakterií mléčného kvašení testována, vyplynulo, že jednoduchá skríningová metoda s použitím dekarboxylačního média s příslušnou aminokyselinou a pH indikátorem se jeví jako nejméně vhodná. Tato metoda je sice technicky a materiálně ze tří testovaných nejméně náročná, avšak v případě tyramin produkujících bakterií nebyly zachyceny některé kmeny, u kterých byla později dalšími technikami (IEC a PCR) produkce biogenních aminů prokázána (kontrolní kmen *Enterococcus faecalis* CCM 2665 a 1 kmen *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Na druhou stranu v případě dekarboxylační půdy s argininem byla pozorována u poloviny testovaných kmenů falešně pozitivní reakce (IEC produkci putrescinu, agmatinu, spermidinu ani sperminu neprokázala). U falešně pozitivních kmenů byl zaznamenán úbytek argininu a naopak zvýšení množství ornitinu a citrulinu v médiu po kultivaci. Při přeměně argininu na ornitin, citrulin popř. další metabolity může dojít ke vzniku sloučenin s alkalickou reakcí, např. amoniaku nebo močoviny (**Griswold et al., 2004; Spano et al., 2007**). Vznik látek s alkalickou reakcí pak pravděpodobně způsobil změnu barvy pH indikátoru v dekarboxylačním médiu a tím falešně pozitivní výsledek dekarboxylaci argininu.

V případě PCR, kterou lze rovněž považovat za skríningovou metodu, k falešně pozitivním reakcím nedocházelo. U všech testovaných kmenů, u kterých byl detekován charakteristický PCR produkt pro tyrozindekarboxylázu, byla následně pomocí IEC prokázána produkce tyraminu. PCR metoda je prakticky stejně materiálně náročná jako IEC, avšak výhodnější v tom, že v kratším časovém úseku lze analyzovat více kmenů. Z tohoto důvodu jsou v poslední době vyvíjeny protokoly pro PCR, tak aby mohla být metoda využita k rychlé detekci bakterií produkujících biogenní aminy (**de las Rivas et al., 2005; Torriani et al., 2008**). PCR je specifická metoda, která poukáže na existenci genu pro příslušný enzym, tedy vypovídá o potenciálu kmene produkovat příslušný biogenní amin. Nezodpoví však otázku, zda je biogenní amin za daných podmínek skutečně produkován a v jakém množství. Chromatografické metody naopak dokáží srovnat množství produkovaného biogenního aminu za různých podmínek fermentace. Nevýhodou však je skutečnost, že v případě nevhodných podmínek pro expresi genu, resp. aktivitu enzymu, nezjistíme těmito metodami, zda daný kmen má schopnost produkovat biogenní amin. Je tedy výhodné v praxi kombinovat obě specifické metody – PCR i IEC.

## ZÁVĚR

U technologicky významných kmenů bakterií mléčného kvašení (starterových kultur) byla zjištěna významná schopnost dekarboxylovat aminokyselinu tyrozin za vzniku biogenního aminu tyraminu. Z celkem 27 testovaných kmenů bakterií mléčného kvašení byla produkce

tyraminu zjištěna u 6 kmenů *Lactococcus lactis* a u 1 kmene *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Z důvodu vyššího množství falešně pozitivních výsledků je pro zjišťování dekarboxylázové aktivity mikroorganizmů méně vhodná kultivace v médiu s prekurzory biogenních aminů a pH indikátorem. Pro detekci bakterií produkujících biogenní aminy lze doporučit metodu PCR a separační techniky (např. kapalinovou chromatografii), popř. jejich kombinaci.

## LITERATURA

ACTIS, L. A., SMOOT, J. C., BARANCIN, C. E., FINDLAY, R. H., 1999. Comparison of differential plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria. In *Journal of Microbiological Methods*, roč. 39, 1999, s. 79-90.

ARENA, M. E., MANCA DE NADRA, M. C., 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. In *Journal of Applied Microbiology*, roč. 90, 2001, s, 158-162.

ARENA, M. E., FIOCCO, D., MANCA DE NADRA, M. C., PARDO, I., SPANO, G., 2007. Characterization of a *Lactobacillus plantarum* strain able to produce tyramine and partial cloning of a putative tyrosine decarboxylase gene. In *Current Microbiology*, roč. 55, 2007, s. 205-210.

ARENA, M. E., MANCA DE NADRA, M. C., MUÑOZ R., 2002. The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B: structural and functional study of the *arc*ABC gene. In *Gene*, roč. 301, 2002, s 61-66.

BOVER-CID, S., HOLZAPFEL, W. H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 53, 1999, s. 33-41.

BOVER-CID, S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M. J., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. H., VIDAL-CAROU, M. C., 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. In *Food Microbiology*, roč. 25, 2008, s. 269-277.

BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., LUKEŠOVÁ, P., MRKVIČKA, V., DOLEŽALOVÁ, M., KRÁČMAR, S., 2009a. Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z povrchu drůbeže. In *Potravinárstvo*, roč. 3(2), 2009, s. 7-11.

BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V., 2009b. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus, Lactococcus* and *Streptococcus.* In *European Food Research and Technology*, roč. 229, 2009, s. 533-538.

CONSTANTINI, A., CERSOSIMO, M., DEL PRETE, V., GARCIA-MORUNO, E., 2006. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: Screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. In *Journal of Food Protection*, roč. 69, 2006, s. 391-396.

DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, Á., CARRASCOSA, A. V., MUÑOZ, R., 2006. PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine and cadaverine. In *Journal of Food Protection*, roč. 69, 2006, s. 2509-2514.

DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R., 2005. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amine. In *FEMS Microbiology Letters*, roč. 244, 2005, s. 367-372.

DE LLANO, G. D., CUESTA, P., RODRÍGUEZ, A., 1998. Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. In *Letters in Applied Microbiology*, roč. 26, 1998, s. 270-274.

DELGADO, S., DELGADO, T., MAYO, B., 2002. Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. In *Journal of Food Protection*, roč. 65, 2002, s. 1590-1596.

FERNÁNDEZ, M., LINARES, D. M., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M. A., 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, roč. 73, 2007, s. 1400-1406.
GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M. C., GALGANO, F., CRUDELE, M. A., FAVATI, F., GUERZONI, M. E., SUZZI, G., 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis.* In *International Journal of Food Microbiology,* roč. 64, 2001, s. 105-117.
GARDINI, F., ZACCARELLI, A., BELLETI, N., FAUSTINI, F., CAVAZZA, A., MARTUSCELLI, M., MASTROCOLA, D., SUZZI, G., 2005. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. In *Food Control*, roč. 16, 2005, s. 609-616.
GOLIAN, J., ŠIŠKA, B., TOMAN, R., HLUCHÝ, S., 2008. Content of cadmium and lead in selected food of animal origin. In *Toxicology Letters*, roč. 180, 2008, s. S235-S235.
GREIF, G., GREIFOVÁ, M., DVORAN, J., KAROVIČOVÁ, J., BUCHTOVÁ, V., 1998. Štúdium rastu a produkcie biogénnych amínov neiktorými mikroorganizmami za modelových podmienok. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 17, 1998, s. 15-21.
GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J., 1997. Tvorba kadaverínu a amoniaku činnosťou niektových baktérií za modelových podmienok. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 16, 1997, s. 53-56.
GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J., 2006. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. In *Journal of Food and Nutrition Research*, roč. 45, 2006, s. 21-29.
GRISWOLD, A. R., CHEN, Y. Y. M., BURNE, R. A., 2004. Analysis of an agmatine deiminase gene cluster in *Streptococcus mutans* UA159. In *Journal of Bacteriology,* roč. 186, 2004, s. 1902-1904.
HALÁSZ, A., BARÁTH, Á, SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. In *Trends in Food Science and Technology*, roč. 5, 1994, s. 42-49.
KAČÁNIOVÁ, M., KŇAZOVICKÁ, V., MELICH, M., FIKSELOVÁ, M., MASSÁNYI, P., STAWARZ, R., HAŠČÍK, P., PECHOČIAK, T., KUCZKOWSKA, A., PUTALA, A., 2009. Environmental concentration of selected elements and relation to physicochemical parameters in honey. In *Journal of Environmental Science Health Part A – Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, roč. 44, 2009, s. 414-422.
LANDETE, J. M., DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R., 2007. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. In *International Journal of Food Microbiology,* roč.117, 2007, s. 258-269.
LANDETE, J. M., DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R., 2008. Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, roč. 48, 2008, s. 697-714.
LANDETE, J. M., FERRER, S., PARDO, I., 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. In *Food Control*, roč. 18, 2007, s. 1569-1574.
MAIJALA, R. L., 1993. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. In *Letters in Applied Microbiology,* roč. 17, 1993, s. 40-43.
MARCOBAL, A., DE LAS RIVAS, B., MUÑOZ, R., 2006. First genetic characterization of a bacterial β-phenylethylamine biosynthetic enzyme in *Enterococcus faecium* RM58. In *FEMS Microbiology Letters*, roč. 258, 2006, s. 144-149.

MARCOBAL, Á., DE LAS RIVAS, B., MORENO-ARRIBAS, V., MUÑOZ, R., 2005. Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine-producing lactic acid bacteria in foods. In *Journal of Food Protection,* roč. 68, 2005, s. 874-878.
ROIG-SAGUÉS, A. X., HERNÀNDEZ-HERRERO, M. M., LÓPEZ-SABATER, E. I., RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J., MORA-VENTURA, M. T., 1997. Evaluation of three decarboxylating agar media to detect histamine and tyramine-producing bacteria in ripened sausages. In *Letters in Applied Microbiology,* roč. 25, 1997, s. 309-312.
SAMBROOK, J., MACCALLUM, E. F., RUSSEL, D., 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001, 2344 s.
SANTOS, W. C., SOUZA, M. R., CERQUEIRA, M. M. O. P., GLÓRIA, M. B. A., 2003. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. In *Food Chemistry,* roč. 81, 2003, s. 595-606.
SILLA SANTOS, M. H., 1996. Biogenic amines: their importance in foods. In *International Journal of Food Microbiology,* roč. 29, 1996, s. 213-231.
SPANO, G., MASSA, S., ARENA, M. E., MANCA DE NADRA, M. C., 2007. Arginine metabolism in wine *Lactobacillus plantarum: in vitro* activities of the enzymes arginine deiminase (ADI) and ornithine transcarbamilase (OTCase). In *Annals of Microbiology,* roč. 57, 2007, s. 67-70.
TORRIANI, S., GATTO, V., SEMBENI, S., TOFALO, R., SUZZI, G., BELLETTI, N., GARDINI, F., BOVER-CID, S., 2008. Rapid detection and quantification of tyrosine decarboxylase gene (*tdc*) and its expression in Gram-positive bacteria associated with fermented foods using PCR-based methods. In *Journal of Food Protection,* roč. 71, 2008, s. 93-101.

**Poděkování**
Práce vznikla za podpory projektu MŠMT: MSM 7088352101.

**Kontaktní adresa:**
RNDr. Leona Buňková, Ph.D. Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín. Tel: 00420 576 031 154, email: bunkova@ft.utb.cz