

IDENTIFIKACE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ (VÝZNAMNÝCH V MLÉKÁRENSKÉM PRŮMYSLU) POMOCÍ POLYMERASOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE

A. Španová¹, B. Rittich¹, K. Kšicová¹, V. Dráb²

¹ Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Tvrdeho 14, 602 00 Brno

² Výzkumný ústav mlékárenský, Soběslavská 841, 390 02 Tábor

Identification of lactic acid bacteria (important in dairy industry) by polymerase chain reaction

Souhrn

Pozornost byla zaměřena na druhovou identifikaci bakteriálních kmenů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, uložených ve Sbírce mlékárenských mikroorganismů Laktoflora (CCDM, Tábor, ČR). Celkem bylo analyzováno 100 kmenů rodu *Lactobacillus* a 50 kmenů rodu *Bifidobacterium*. Kmeny byly analyzovány rodově a druhově specifickými PCR (7 druhů *Lactobacillus* a 11 druhů *Bifidobacterium*). V práci je uvedeno složení amplifikačních směsí, provedení amplifikací a detekce PCR produktů. Robustnost metod byla ověřena jejich několikaletým používáním při vypracovávání diplomových prací a v řadě publikovaných prací.

Summary

Our interest was focused on species identification of bacterial strains of genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* deposited in Czech Collection of Dairy Microorganisms (CCDM, Tábor, Czech Republic). In total, 100 strains of genus *Lactobacillus* and 50 strains of genus *Bifidobacterium* were analyzed. Strains were analysed using genus and species specific PCRs (7 *Lactobacillus* species and 11 *Bifidobacterium* species). The compositions of PCR mixtures, conditions of amplification and detection of PCR products are given in this paper. The use of working procedures was verified and evaluated during their several years repeated use in diploma thesis and in more published papers.

1. Úvod

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou komerčně využívány v potravinářském průmyslu z důvodu tvorby chuti, vůně a prodloužení trvanlivosti fermentovaných výrobků. Jsou tvořeny fylogeneticky příbuznými rody s několika společnými biochemickými a ekologickými rysy. Z hlediska

využití v potravinářských fermentacích jsou významné především rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* a *Pediococcus*. Rod *Bifidobacterium* je fylogeneticky nepřibuzný s ostatními BMK, ale je často uváděn spolu s BMK pro podobné biochemické a fyziologické vlastnosti (Adams 1999).

Jedním z hlavních cílů potravinářského průmyslu je hledání a výběr nejvhodnějších kmenů pro dosažení trvale vysoké kvality výrobků. Před použitím kmenů v potravinách je nezbytná jejich spolehlivá identifikace a charakterizace. Pro tyto účely je důležité mít k dispozici rychlé a vhodné metody identifikace cílových mikroorganismů v různých typech výrobků. V práci Pérez a spol. (2000) bylo konstatováno, že 23 % izolátů BMK, identifikovaných na základě morfologických charakteristik buněk a profilů fermentace cukrů, bylo zařazeno chybně. Proto se pro identifikaci těchto mikroorganismů v současné době převážně používají molekulárně genetické metody, které jsou založeny na analýze DNA.

Cílem práce bylo využít rodově a druhově specifických polymerasových řetězových reakcí (PCR) pro identifikaci vybraných, průmyslově významných kmenů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

2. Materiál a metody

Použité chemikálie a bakteriální kultury, zařízení, podmínky kultivace buněk a izolace DNA byly podrobně popsány v pracích Dušková a spol. (2008), Rittich a spol. (2008) a Křížová a spol. (2006).

2.1. Rodově a druhově specifická PCR *Lactobacillus*

2.1.1. Rodově specifická PCR

Bakterie rodu *Lactobacillus* byly identifikovány pomocí specifických primerů (Dubernet a spol., 2002):

- LbLMA 1-rev

5' CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC 3'

- R16-1

5' CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA 3'

Při PCR s těmito primery se amplifikuje produkt o velikosti asi 250 párů bazí (bp). Při amplifikaci byla použita směs o následujícím složení: PCR voda 19 µl, 10x reakční pufr kompletní (10x) 2,5 µl; dNTP směs (10 mM) 0,5 µl; primer LbLMA 1-rev (10 pmol/µl) 0,5 µl a primer R16-1 (10 pmol/µl) 0,5 µl; *Taq* DNA polymerasa 1.1 (1 U/µl) 1 µl a DNA matrice (10 ng/µl) 1 µl. Celkový objem PCR směsi byl 25 µl. Všechny složky PCR směsi byly důkladně promíchány, krátce centrifugovány a mikrozkumavky byly umístěny do termocykleru. Podmínky amplifikace byly následující: denaturace DNA 94 °C/60 s, hybridizace primerů 55 °C/60 s a syntéza komplementárního řetězce 72 °C/120 s. Před prvním cyklem byla směs zahřívána při 94 °C/5min; v posledním cyklu byla syntéza řetězce při 72 °C prodloužena na 7 min. Amplifikace proběhla v 30 cyklech. Poté byla reakční směs s PCR produkty analyzována pomocí 1,5 %

Tab. 1 Identifikace některých druhů bakterií rodu *Lactobacillus* pomocí druhově specifické PCR

Druh <i>Lactobacillus</i>	Primery	Sekvence primerů	Literatura	PCR produkt (bp)
<i>zeae</i>	Zeal	5' TGT TTA GTT TTG AGG GGA CG 3'	Walter a spol., 2000	350
	Zeall	5' ATG CGA TGC GAA TTT CTA AAT T 3'		
<i>johnsonii</i>	JohSI	GAG CTT GCC TAG ATG ATT TTA	Ward a spol., 1999	750
	16SII	ACT ACC AGG GTA TCT AAT CC		
<i>paracasei</i>	Y 2	5' CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT 3'	Tilsala-Timisjarvi a spol., 1997	290
	para	5' CAC CGA GAT TCA ACA TGG 3'		
<i>acidophilus</i>	Aci 16SI	5' TCC AAG GAA GCG AAG GAT 3'	Byun a spol., 2004	750
	16SII	5' CTC TTC TCG GTC GCT CTA 3'		
<i>salivarius</i>	LactoR	5' GTC CAT TGT GGA AGA TTC CC 3	Haarmann a Knol, 2006	332
	LsalIF	5' CGA AAC TTT CTT ACA CCG AAT GC3		
<i>casei</i>	FcaseIS	5' CTA TAA GTA AGC TTT GAT CCG GAG ATT T 3'		132
	RcaseIS	5' CTT CCT GCG GGT ÁCT GAG ATG T 3'		

agarosové gelové elektroforézy. Na gel se nanášelo 25 µl PCR produktu a 5 µl nanášecího pufru (připraven smícháním 2,5 g Ficollu, 0,04 g bromfenolové modři, 10 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 a 90 ml destilované vody). Při detekci PCR produktu byl použit velikostní standard DNA (100-1500 bp žebříček) v množství 5 µl. DNA standard sloužil k určení velikosti amplifikovaného PCR produktu.

2.1.2. Druhově specifická PCR

Některé druhy bakterií rodu *Lactobacillus* byly identifikovány pomocí druhově specifické PCR s využitím primerů, které jsou uvedeny v Tabulce 1.

Složení amplifikačních směsí pro PCR s druhově specifickými primery bylo následující:

Komponenta PCR	Druh <i>Lactobacillus</i> (µl)				
	<i>zeae</i>	<i>johnsonii</i>	<i>paracasei</i>	<i>acidophilus</i>	<i>salivarius/casei</i>
PCR voda	15,5	18	14,5	19	18,5
10x reakční pufr kompletní	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
dNTP směs (10 mM)	1	0,5	1	0,5	1
MgCl ₂ (25 mM)	2	1	3	-	-
Primery (10 pmol/µl)	1	0,5	1	0,5	0,5
<i>Taq</i> DNA polymerasa (1 U/µl)	1	1	1	1	1
DNA matrice (10 ng/µl)	1	1	1	1	1
Celkem	25				

Všechny složky PCR směsi byly důkladně promíchány, krátce centrifugovány a umístěny do termocyklu. Podmínky amplifikace pro vybrané druhy rodu *Lactobacillus* jsou popsány v Tabulce 2.

Před prvním cyklem byla směs zahřívána při 94 °C/5 min; v posledním cyklu byla syntéza řetězce při 72 °C prodloužena na 7 min. Amplifikace proběhla v 30 cyklech. Poté byla reakční směs analyzována pomocí 1,5 % agarosové gelové elektroforézy. Při detekci PCR produktu byl použit velikostní standard DNA (100-1500 bp žebříček).

2.2. Rodově a druhově specifická PCR *Bifidobacterium*

2.2.1. Rodově specifická PCR

Bakterie rodu *Bifidobacterium* byly identifikovány pomocí PCR s využitím sady rodově specifických primerů (Roy a Sirois, 2000):

Tab. 2 Podmínky amplifikace pro druhy rodu *Lactobacillus*

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)
<i>L. zeae, L. paracasei</i>		
denaturace DNA	94	30
hybridizace primerů	58	30
syntéza řetězce DNA	72	60
<i>L. acidophilus</i>		
denaturace DNA	95	30
hybridizace primerů	62	30
syntéza řetězce DNA	72	60
<i>L. salivarius, L. johnsonii</i>		
denaturace DNA	94	30
hybridizace primerů	57	30
syntéza řetězce DNA	72	60
<i>L. casei</i>		
denaturace DNA	95	30
hybridizace primerů	54	30
syntéza řetězce DNA	72	60

- Pbi F1 5' CCGGAATAGCTCC 3'
- Pbi R2 5' GACCATGCACCACCTGTGAA 3'

V PCR s těmito primery se amplifikuje PCR produkt o velikosti 914 párů bazí (bp). Při amplifikaci byla použita směs o následujícím složení: 10 x reakční pufr kompletní (10 x) 2,5 µl; dNTP směs (10 mM) 0,5 µl; 0,5 µl jednotlivých primerů (10 pmol/µl); *Taq* DNA polymerasa 1.1 (1 U/µl) 0,5 µl; DNA matrice (10 ng/µl) 1-2 µl. PCR voda byla doplněna na celkový objem PCR směsi 25 µl. Všechny složky PCR směsi byly důkladně promíchány, krátce centrifugovány a mikrozkumavky byly umístěny do termocyklu. Podmínky amplifikace byly následující: denaturace DNA 94 °C/60 s, hybridizace primerů 55 °C/60 s a syntéza komplementárního řetězce 72 °C/120 s. Před prvním cyklem byla směs zahřívána při 94 °C/5 min; v posledním cyklu byla syntéza řetězce při 72 °C prodloužena na 7 min. Poté byla reakční směs analyzována pomocí 1,5 % agarosové gelové elektroforézy. Při detekci PCR produktu byl použit velikostní standard DNA (100-1500 bp žebříček).

2.2.2. Druhově specifická PCR

Druhy bakterií rodu *Bifidobacterium* byly identifikovány pomocí druhově specifických primerů, které jsou uvedeny v Tabulce 3:

Tab. 3 Identifikace některých druhů bakterií rodu *Bifidobacteria* pomocí druhově specifické PCR

Druh	Primery	Sekvence primerů	Program	PCR produkt (bp)
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	BiLON-1	5' TTCCAGTTGATCGCATGGTC 3'	I	831
	BiLON-2	5' GGGAAAGCCGTATCTCTACGA 3'		
<i>B. adolescentis</i>	BiADO-1	5' CTCCAGTTGGATGCATGTC 3'	I	279
	BiADO-2	5' CGAAGGCTTGCTCCAGT 3'		
<i>B. angulatum</i>	BiANG-1	5' CAGTCCATCGCATGGTGGT 3'	I	275
	BiANG-2	5' GAAGGCTTGCTCCCAAC 3'		
<i>B. bifidum</i>	BiBIF-1	5' CCACATGATCGCATGTGATTG 3'	I	278
	BiBIF-2	5' CCGAAGGCTTGCTCCAAA 3'		
<i>B. breve</i>	BiBRE-1	5' CCGGATGCTCCATCACAC 3'	I	288
	BiBRE-2	5' ACAAGTGCCTTGCTCCCT 3'		
Skupina <i>B. catenulatum</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i>	BiCATg-1	5' CGGATGCTCCGACTCCT 3'	I	285
	BiCATg-2	5' CGAAGGCTTGCTCCGAT 3'		
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i>	BiINF-1	5' TTCCAGTTGATCGCATGGTC 3'	I	828
	BiINF-2	5' GGAACCCCATCTCTGGGAT 3'		
<i>B. dentium</i>	BiDEN-1	5' ATCCCGGGGTTTCGCCCT 3'	I	387
	BiDEN-2	5' GAAGGCTTGCTCCCGA 3'		
<i>B. gallicum</i>	BiGAL-1	5' TAATACCGGATGTTCCGTC 3'	I	303
	BiGAL-2	5' ACATCCCGAAAGGACGC 3'		
<i>B. animalis</i> *	Ban F2	5' AACCTGCCCTGTG 3'	II	925
	Pbi R1	5' GCACCACCTGTGAACCG 3'		
<i>B. longum</i> *	Pbi F1	5' CCGGAATAGCTCC 3'	III	875
	Lon R4	5' CGTATCTACGACC 3'		

*Roy a Sirois (2000), ostatní Matsuki a spol. (1999)

Při amplifikaci byla použita směs o následujícím složení: 10x reakční pufr kompletní (10x) 2,5 µl; dNTP směs (10 mM) 0,5 µl; 0,5 µl jednotlivých primerů (10 pmol/µl); *Taq* DNA polymerasa 1.1 (1 U/µl) 1,0 µl; DNA matrice (10 ng/µl) 1 µl. PCR voda byla doplněna na celkový objem PCR směsi 25 µl. Reakce probíhala za níže uvedených podmínek:

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)
Druhy <i>Bifidobacterium</i> * (Program I)		
denaturace DNA	94	20
hybridizace primerů	55	20
syntéza řetězce DNA	72	30
<i>B. animalis</i> ** (Program II)		
denaturace DNA	92	30
hybridizace primerů	58	30
syntéza řetězce DNA	72	60
<i>B. longum</i> ** (Program III)		
denaturace DNA	92	30
hybridizace primerů	56	30
syntéza řetězce DNA	72	60

* Matsuki a spol. (1999) - 35 cyklů, ** Roy a Sirois (2000) - 30 cyklů;

Směs byla před prvním cyklem zahřívána při výše uvedené teplotě denaturace po dobu 5 minut. V posledním cyklu reakce byla doba syntézy řetězce DNA prodloužena

na 10 minut. Po ukončení PCR byly PCR produkty analyzovány pomocí elektroforézy na 1,5 % agarosovém gelu. Při detekci PCR produktu byl použit velikostní standard (100-1500 bp žebříček) k určení velikosti amplikonu.

3. Výsledky a diskuse

Specificita rodově a druhově specifických polymerasových řetězových reakcí byla ověřena s použitím typových a sbírkových kmenů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Takto ověřené primery byly použity při rodově a druhově identifikaci kmenů uložených ve Sbírce mlékárenských mikroorganismů Laktoflora (CCDM, Tábor, ČR). Výsledky identifikace 150 kmenů sbírky Laktoflora jsou uvedeny v Tabulce 4. Z výsledků uvedených v tabulce vyplývá, že 8 % (8) kmenů *Bifidobacterium* a 18 % (9) kmenů *Lactobacillus* nebylo identifikováno do druhu. Dva kmeny byly zařazeny do patogenního druhu *Bifidobacterium dentium*. Ve výše uvedených PCR reakcích byla použita purifikovaná DNA izolovaná z čistých bakteriálních kultur.

Identitu testovaného kmene je vhodné ověřit pomocí dalších metod. K ověření druhové identifikace *Bifidobacterium* lze použít např. metodu ARDRA -

INFORMACE

EVROPSKÝ BOOM "BIO-MLÉKA" POKRAČUJE

Údaje růstu obrátu byla po léta pevným rysem produkce organického mléčného sektoru v Německu a Rakousku. Navzdory globální ekonomické krizi rok 2008 nebyl rozdílný podle předběžného zjištění agentury pro trh a ceny ZMP. Předpokladem je růst nejméně 10 % podle přehledu Federálního sektoru organických potravin BÖLW.

Dairy Ind. Intern. 74, 2009, č.3 /ben/

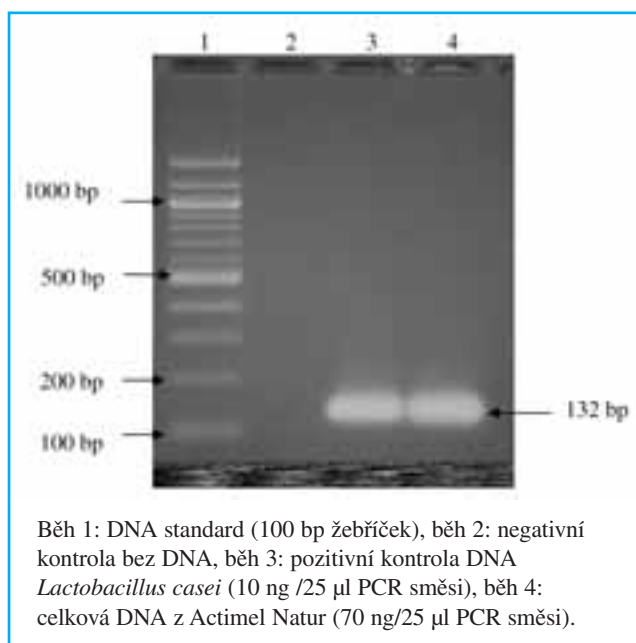
restrikční analýza rodově specifického amplikonu pomocí vhodné endonukleasy (Křížová a spol., 2006, Moreira a spol., 2005), metodu RAPD nebo rep-PCR (Křížová a spol., 2008). Využití většího počtu metod je v souladu s tzv. polyfázním přístupem, který využívá moderní taxonomie.

Předpokladem úspěšné analýzy bakterií přímo v mléčných výrobcích (bez kultivace) je izolace DNA v potřebné kvalitě a dostatečném množství. Postup izolace DNA z čisté bakteriální kultury i z výrobků zahrnuje následující kroky: lyze buněk, extrakce DNA, odstranění proteinů a RNA, srážení DNA ethanolem, převedení DNA do vhodného pufru (Sambrook a Russell, 2001). Uvedený postup je však pracný a při práci se používají toxické chemikálie (fenol, chloroform). DNA izolovaná z komplexní matrice (potravinový výrobek) často obsahuje doprovodné látky, které mohou působit jako inhibitory PCR (Wilson, 1997).

Při izolaci DNA z reálných vzorků se osvědčil jiný postup a to postup založený na neselektivní adsorpci DNA na magnetické částice (bez fenolové extrakce) v prostředí vysoké koncentrace polyethylenglykolu (PEG 6000) a chloridu sodného (Rittich a spol., 2006). Bylo ukázáno, že uvedený postup lze s výhodou použít k izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR z reálných vzorků mléčných výrobků (Rittich a spol., 2006). DNA izolovanou fenolovou extrakcí z čistých kultur lze potom použít jako pozitivní kontrolu při vývoji či validaci nových metod. Příklad využití PCR při identifikaci bakterií druhu *Lactobacillus casei* ve výrobku Actimel Natur je uveden na Obr.1.

4. Závěr

V práci je uveden přehled amplifikačních metod, vhodných pro identifikaci vybraných druhů laktobacilů a bifi-



Obr. 1 Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus casei* (132 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná pomocí magnetického nosiče z mléčného výrobku Actimel Natur.

Tab. 4 Druhová identifikace bakteriálních kmenů rodu *Bifidobacterium* a rodu *Lactobacillus* ve sbírce Laktoflora s využitím metod PCR

Rod	Druh	Počet kmenů	Zařazené kmene (%)
<i>Bifidobacterium</i>	Celkem	100	100
	<i>B. bifidum</i>	3	3
	<i>B. breve</i>	6	6
	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	40	40
	<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i>	2	2
	<i>B. adolescentis</i>	3	3
	Skupina <i>B. catenulatum</i> / <i>B. pseudocatenulatum</i>	15	15
	<i>B. angulatum</i>	0	0
	<i>B. gallicum</i>	0	0
	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	8	8
	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	6	6
<i>B. dentium</i>	2	2	
nezařazeno	8	8	
<i>Lactobacillus</i>	celkem	50	100
	<i>L. rhamnosus</i>	14	28
	<i>L. johnsonii</i>	7	14
	<i>L. casei/paracasei</i>	9	18
	<i>L. fermentum</i>	8	16
	<i>L. salivarium</i>	2	4
	<i>L. gasseri</i>	1	2
	nezařazeno	9	18

dobakterií. Robustnost metod byla ověřena jejich několikaletým používáním v praktických cvičeních, při vypracovávání diplomových prací a v řadě publikovaných prací.

Tato práce byla podporována grantem IG460045 Národní agentury pro zemědělský výzkum a grantem 2B06053 Ministerstva školství, tělovýchovy a mládeže ČR.

Literatura

- Adams M.R.: Safety of industrial lactic acid bacteria. J. Biotechnol. 68 (1999) 171-178.
- Byun R., Nadkarni M. A., Chhour Martin F. E., Jacques N. A., Hunter N.: Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. J. Clin. Microbiol. 42 (2004) 3128-3136.
- Dubernet S., Desmares N., Guéguen M.: A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. FEMS Microbiol. Lett. 214 (2002) 271-275.
- Dušková M., Španová A., Dráb V., Rittich B.: Molekulární typizace vybraných kmenů bakterií rodu *Lactobacillus* ze sbírky Laktoflora. Mlékařské listy - Zpravodaj 110 (2008) 12-16.
- Haarman M., Knol J.: Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. Appl. Environ. Microbiol. 72 (2006) 2359-2365.
- Křížová J., Španová A., Rittich B.: Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of *Bifidobacterium* species. Syst. Appl. Microbiol. 29 (2006) 36-44.
- Křížová J., Španová A., Rittich B.: RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of *Bifidobacterium* species. Folia Microbiol. 53 (2008) 99-104.
- Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H.: Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999) 4506-4512.
- Moreira J. L. S., Mota R. M., Horta M. F., Teixeira S. M. R., Neumann E., Nicolli J. R., Nunes A. C.: Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. BMC Microbiology. 5 (2005) 15.

10. Pérez, G., Cardell, E., Zárate, V.: Protein fingerprinting as a complementary analysis to classical phenotyping for the identification of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *Lait* 80 (2000) 589-600.
11. Rittich B., Španová A., Horák D., Beneš M. J., Klesnilová L., Petrová K., Rybníkář A.: Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloid.Surf. B.- Interfaces*. 52 (2006) 143-148.
12. Rittich B., Španová A., Dráb V., Havlíková Š.: Korelace mezi fenotypovými a molekulárně genetickými metodami identifikace bakterií mléčného kvašení. *Mlékařské listy -Zpravodaj* 111 (2008) 34-37.
13. Roy D., Sirois S.: Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 191 (2000) 17-24.
14. Sambrook J., Russell D.W.: *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
15. Tilsala-Timisjarvi A., Alatossava T.: Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 35 (1997) 49-56.
16. Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatossava T.: Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 297-303.
17. Ward L.J.H., Timmins M.J.: Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 29 (1999) 90-92.
18. Wilson I.G.: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 3741-3751.

Přijato do tisku 31. 7. 2009

Lektorováno 13. 8. 2009

VÝSKYT MIKROORGANISMŮ S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU V SÝRECH

V. Černý¹, E. Kvasničková¹, Š. Havlíková², L. Kalhotka³

¹ MILCOM a.s., Výzkumný ústav mlékárenský, Soběslavská 841, 390 02 Tábor

² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Soběslavská 841, 390 02 Tábor

³ Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Agronomická fakulta, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Occurrence of microorganisms with decarboxylase activity in cheeses

Souhrn

Zdravotní nezávadnost a jakost potravin může být ovlivněna i biogenními aminy, produkty některých mikroorganismů přítomných v sýrech. Tato práce byla zaměřena na vytvoření souboru izolátů mikroorganismů ze sýrů schopných tvořit biogenní aminy. Na izolaci byla použita řada vzorků různých druhů sýrů domácí i zahraniční výroby. Pro orientační stanovení dekarboxylázové aktivity u jednotlivě získaných izolátů byla použita plotnová a zkumavková kulturační metoda za použití MDA bujónu a MDA agaru.

U obou uvedených živných medií se dekarboxylázová aktivita projevuje barevnou reakcí provázející změnu pH. Celkem bylo získáno více jak 70 izolátů s pozitivní reakcí. Soubor izolátů byl dále zúžen na 48 izolátů, u kterých budou provedena další stanovení a případně použita pro další práce.

Summary

Health safety and food quality can be affected by biogenic amines, the products of some microorganisms in cheeses. This work was oriented on creating of isolates collection of microorganisms from cheeses able to produce biogenic amines. The range of various kinds cheeses samples of national or foreign production were used for isolation. Determination of decarboxylase activity by separated isolates plated method and tube cultivated method using MDA bujon and MDA agar were used for orientation. Decarboxylated activity of both mentioned cultivated media demonstrates in color reaction accompanying pH changes. More than 70 isolates with positive reaction were obtained in total. The collection of isolates was further reduced on 48 isolates, for next determinations and study.

Klíčová slova: biogenní aminy, dekarboxylace, sýry, dekarboxylázopozitivní mikroorganismy, kulturační metody

Úvod

Záměrem naší práce bylo prozkoumat výskyt bakteriálních kontaminantů sýrů různých typů ohledně tvorby biogenních aminů, původu těchto kontaminantů a jejich schopnosti přežít výrobní proces a ohrožovat kvalitu zralých sýrů. V minulém roce jsme se zaměřili na to, abychom mikrobiologickými rozbory mlékárenských výrobků, především sýrů, získali soubor izolátů mikroorganismů schopných tvořit biogenní aminy, které bude možno následně využít při řešení dalších plánovaných dílčích cílů tohoto projektu.

Biogenní aminy představují skupinu aminů, které mají významné fyziologické a farmakologické účinky. Vznikají v buňkách enzymovou dekarboxylací aminokyselin (řada enzymů ze skupiny EC 4.1.1.). Tyto enzymy jsou rozdílné pro různé druhy mikroorganismů. Mezi mléčné bakterie, které mohou produkovat dekarboxylázy a podílet se tak na jejich vzniku, patří v mléce např. druhy rodu *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* a některé bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* nebo i probiotické a startovací kultury (SLÁDKOVÁ a kol., 2007). Biogenní aminy, z nich nejznámější histamin, tyramin, putrescin a kadaverin, byly studovány zejména pro svou toxicitu. V současné době se však biogenní aminy dostávají do popředí zájmu i co se týče hygieny potravin, jelikož relativně vysoké hodnoty obsahu některých biogenních aminů mohou sloužit i jako