

# IDENTIFIKÁCIA BAKTÉRIÍ V SOL'NÝCH NÁLEVOCH NEZREJÚCICH SYROV POMOCOU DENATURAČNEJ GRADIENTOVEJ GÉLOVEJ ELEKTROFORÉZY

Martina Čakajdová<sup>1</sup>, Štěpánka Trachtová<sup>1</sup>, Tomáš Mohelský<sup>1</sup>,  
Irena Němečková<sup>2</sup>, Alena Španová<sup>1</sup>, Bohuslav Rittich<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav  
chemie potravin a biotechnologií, Purkyňova 464/118,  
612 00, Brno, xccakajdova@fch.vutbr.cz

<sup>2</sup> Výzkumný ústav mlékárenský s. r. o., Ke Dvoru 12a,  
160 00 Praha 6

## Identification of bacteria in pickles of fresh cheeses using denaturated gradient gel electrophoresis

### Súhrn

V práci bola optimalizovaná príprava zmesi pre PCR a amplifikácia bakteriálnej DNA v PCR s primérmí s GC svorkou (F357GC a R518). Získané produkty PCR boli analyzované pomocou DGGE. Amplikóny získané po amplifikácii DNA izolovanej z nálevov sa líšia nielen polohou na géle, ale aj počtom. Väčší počet pásov rôznej intenzity bol detegovaný po amplifikácii DNA z kontaminovaných nálevov (v porovnaní s nekontaminovanými nálevmi).

**Kľúčové slová:** solné nálevy, izolácia DNA, polymerázová reťazová reakcia (PCR), denaturačná gradientová gélová elektroforéza (DGGE)

### Abstract

The preparation of PCR mixtures and bacterial DNA amplification in PCR with primers with clamp (F357-GC and R518) were optimised. PCR products were analysed using DGGE. It was shown that amplicons from pickles differed in positions on the gel and in their numbers. Higher number of the bands of different intensities was detected after amplification of DNA isolated from contaminated pickles (in comparison with noncontaminated pickles).

**Keywords:** pickles, DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

## 1. Úvod

Syry v soľnom náleve z ovčieho, kozieho alebo kravského mlieka, sa vyznačujú vysokým obsahom soli. Soľ v náleve má konzervačné účinky, hlavne proti plesniam (Golner a Valík, 2004). Niekedy však pri nedodržaní technologických postupov môže dochádzať ku kontaminácii

nálevov nežiaducimi mikroorganizmy, ktoré môžu negatívne ovplyvniť kvalitu syrov. K identifikácii a detekcii mikroorganizmov sa ako vhodná ukázala aplikácia molekulárne biologických metód. Pomocou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy (denaturing gradient gel electrophoresis - DGGE) produktov polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) a následného porovnávania amplicónov z oblasti 16S rDNA je možné preukázať prítomnosť rôznych druhov mikroorganizmov, vrátane nekultivovateľných druhov mikroorganizmov (Leite a spol., 2012; Liu a spol., 2012).

Cieľom práce bola identifikácia mikroorganizmov spôsobujúcich kontaminácie v solných nálevoch bielych nezrejúcich syrov.

## 2. Experimentálna časť

### 2.1. Chemikálie a bakteriálne kultúry

Boli použité nasledujúce chemikálie: agaróza pre elektroforézu DNA (Serva, Heidelber, SRN), dodecylsulfát sodný (SDS) (Serva, Heidelber, SRN), etídiumbromid (EtBr) (Sigma, St. Louis, USA), etyléndiamíntetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelber, SRN), MRS (de Man, Rogosa a Sharpe) médium (Oxoid, Veľká Británia), proteínáza K (Sigma, St. Louis, USA). Priméry pre PCR boli syntetizované vo firme Generi-Biotech (Hradec Králové, ČR), TaqI DNA polymeráza bola od firmy Bio-Tech (Praha, ČR), DNA štandard 100 bp rebríček bol od firmy Malamitě (Moravské Prusy, ČR). Magnetické poly(glycidyl metakrylát) P(GMA) mikročastice pokryté karboxylovými skupinami boli získané od D. Horáka (Ústav makromolekulárnej chémie, AV, ČR v.v.i, Praha). Ostatné chemikálie boli čistoty p.a. a pochádzali z bežných komerčných zdrojov. Analyzovanými vzorkami boli solné nálevy bielych nezrejúcich syrov. Ako kontrola boli použité čisté kultúry bakteriálnych druhov (*Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp., *Clostridium tyrobutyricum*, *Klebsiella oxytoca*, *Kocuria varians*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas* sp., *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus warneri*) izolovaných z analyzovaných nálevov kultivačnými postupmi.

### 2.2. Zariadenia

Koncentrácia a čistota izolovanej DNA bola meraná na spektrofotometri NanoPhotometer (Implen, Mníchov, Nemecko). K amplifikácii zmesi pre PCR bol použitý programovateľný cyklátor Termocykler DNA Engine, PeltierThermal Cycler-200 (Bio-Rad, Filadelfia, USA). Produkty PCR s GC svorkou boli použité k DGGE analýze na prístroji INGENYphorU (Goes, Holandsko). K identifikácii produktov PCR bol použitý transiluminátor TVR-312A (Apectroline, Albany, USA)

### 2.3. Metódy

DNA z nálevov a kontrolných kmeňov bola izolovaná pomocou fenolovej extrakcie (Sambrook a Russel, 2001). Koncentrácia a čistota DNA bola stanovená spektrofoto-

**Tab. 1** Popis vzoriek nálevov a koncentrácia DNA

Č.	Vzorka	Koncentrácia DNA (ng/μL)
1	kontrolný nálev 1	74
2	kontrolný nálev 2	107
3	kontrolný nálev 3	84
4	kontaminovaný nálev 1	102
5	kontaminovaný nálev 2	118
6	kontaminovaný nálev 3	116
7	kontaminovaný nálev 4	120
8	kontaminovaný nálev 5	105
9	kontaminovaný nálev 6	100

metricky pri 260 nm (Sinden, 1994). Intaktnosť DNA bola stanovená agarózovou gélovou elektroforézou v 0,8 % géle. Charakteristika DNA a popis vzoriek nálevov je uvedený v Tab. 1.

**Tab. 2** Program amplifikácie

	Krok cyklu	Teplota /čas
1.	denaturácia DNA pred prvým cyklom	95°C/5 min
2.	denaturácia	95°C/60 s
3.	pripojenie primérov	50°C/45 s
4.	syntéza DNA	72°C/60 s
5.	dosyntetizovanie reťazca v poslednom kroku	72°C/10 min
	počet cyklov	30

Amplifikácia DNA prebiehala pomocou PCR s primérmí F357 GC 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGG-CGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3' a R518 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' z V3 regiónu bakteriálnej 16S rDNA (Muyzer a spol., 1993); veľkosť produktu PCR bola 233 (bp). Program amplifikácie je uvedený v Tab. 2. Špecifické produkty boli detegované agarózovou gélovou elektroforézou v 1,8 % géle. Produkty PCR s GC svorkou boli prečistené pomocou magnetických poly(glycidyl metakrylát) P(GMA) mikročastíc podľa postupu publikovaného v práci Rittich a kol. (2009) a analyzované denaturačnou gradientovou gélovou elektroforézou. Na 40-60% gradientový gél bolo nanosených 10 μL produktu PCR. Zaostrovanie prebiehalo 10 minút pri 100 V, samotná analýza pri 60 V po dobu 22 hodín. Získaný gél bol farbený v etídiumbromide (0,5 μg/mL) a vyfotografovaný.

### 3. Výsledky a diskusia

DNA z vzoriek nálevov bola izolovaná v kvalite a množstve vhodnom pre PCR. DNA bola k ďalšej práci riedená na 100 ng/μL. Amplifikácia DNA prebehla pomocou PCR s primérom s GC svorkou. V zmesiach pre PCR bolo testované rôzne množstvo Mg<sup>2+</sup> iónov, množstvo dNTP, primérov a DNA polymerázy. Ako optimálne bolo zvolené zloženie zmesi pre PCR uvedené v Tab. 3. Táto zmes bola použitá pri amplifikácii všetkých DNA izolovaných z nálevov a kontrolných kmeňov. Amplifikované boli špecifické produkty PCR v intenzite dostatočnej pre ďalšiu analýzu. Produkty PCR s GC svorkou boli ďalej ana-

**Tab. 3** Zloženie optimalizovanej zmesi pre PCR-DGGE

Č.	Komponenta	Objem (μL)
1.	voda pre PCR	24,6
2.	LA pufor kompletný	5,0
3.	zmes dNTP (10 mM)	4,0
4.	primér F357 GC (10 pmol/μL)	2,0
5.	primér R518 (10 pmol/μL)	2,0
6.	DMSO enhancer	2,0
7.	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	8,0
8.	LA polymeráza Top Bio (5U/μL)	0,4
9.	DNA matrica (asi 100 ng/μL)	2,0

lyzované pomocou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy. Produkty PCR amplifikované z DNA z kontrolných nálevov obsahovali menej fragmentov než v kontaminovaných nálevoch. V kontrolných nálevoch boli viditeľné fragmenty o nižšej intenzite. To vypovedá o kontaminácii nálevov mikroorganizmami, ktoré sa v pôvodných nepokazených nálevoch nevyskytovali. Výsledky DGGE sú uvedené na Obr. 1.

Poloha amplikónov po amplifikácii DNA izolovaných z nálevov bola porovnaná s aplikónmi získanými po amplifikácii DNA izolovanými z kontrolných kmeňov.

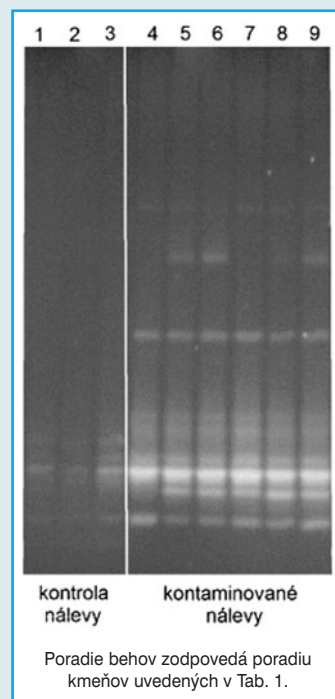
Podľa polohy pásov pravdepodobnými kontaminantami mohli byť mikroorganizmy druhu *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* a *Staphylococcus warneri*. Pretože uvedená identifikácia mikroorganizmov je nedostačujúca a iba orientačná, získané pruhy boli vyrezané z gélu a v ďalšej práci budú podrobené sekvenácii.

### 4. Záver

V práci bolo zistené, že je možné použiť metódu PCR-DGGE k analýze mikroflóry v soľných nálevoch nezrejúcich syrov.

### Podakovanie

Táto práca bola podporená interným grantom FCH-S-14-2325 a grantom NAZV QJ1210300 Národnej agentúry pre poľnohospodársky výskum České republiky v rámci programu Komplexní udržitelné systémy KUS.

**Obr. 1** DGGE produktov PCR pri použití priméru s GC svorkou

## Literatúra

- GOLNER F. VALÍK L. (2004): Aplikovaná mikrobiologie požívání. Bratislava, Malé centrum, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- LEITE A.M.O., MAYO B., RACHID C.T.C.C., PEIXOTO R.S., SILVA J.T., PASCHOALIN V.M.F., DELGADO S. (2012): Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefirgrains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiol.* 31, s. 215-221.
- LIU W., BAO Q., JIRIMUTU Q. M., SIRIGULENG C. X., SUN T., LI M., ZHANG J, YU J., BILIGE M., SUN T., ZHANG H. (2012): Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbiol. Res.* 167, s. 110-115.
- MUYZER G., De WAAL E.C., UITERLINDEN A.G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, s. 695-700.
- SAMBROOK J., RUSSEL D.W. (2001): Molecularcloning: A laboratory manual (II), 3rded. New York, Cold Spring Laboratory Harbor Press, 2100 s. ISBN-13: 978-0879695774.
- SINDEN R. R. (1994): DNA Structure and Function, San Diego, Academic Press, s. 34. ISBN-10: 0-12-645750-6.
- RITTICH B., ŠPANOVÁ A., ŠÁLEK P., NĚMCOVÁ P., TRACHTOVÁ Š., HORÁK D (2009): Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethyleneglykol)-NaCl water solutions. *J. Magn. Magn. Mater.* 321, s. 1667-1670.

Přijato do tisku: 4. 11. 2014

Lektorováno: 29. 11. 2014

## ANTILISTERIÁLNÍ ÚČINKY Kyseliny fenylmléčné A JEJÍ PRODUKCE KMENEM *LACTOBACILLUS PLANTARUM* LPAL FERMENTACÍ SYROVÁTKY

Šárka Havlíková, Ladislav Bár, Eva Kvasničková

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Antilisterial activity of phenyllactic acid and their production by *Lactobacillus plantarum* LPAL during the fermentation of whey

### Abstrakt

Cílem této práce bylo ověřit antilisteriální aktivitu kyseliny fenylmléčné (PLA) vůči dvěma kmenům listerií v závislosti na koncentraci PLA, teplotě a pH. S klesající hodnotou pH a stoupající koncentrací a při teplotě 37 °C rostla i inhibiční aktivita.

Dále byly prováděny pokusné fermentace zahuštěné syrovátky s cílem vyprodukovat co nejvyšší množství PLA s využitím izolátu *Lactobacillus plantarum* LPAL. Nejvyšší dosažená koncentrace PLA byla 1,12 mg/ml při fermentaci o pH 4,4 a zaočkováním syrovátky kmenem *Lactobacillus plantarum* LPAL a *Geotrichum candidum* CCDM 870.

**Klíčová slova:** kyselina fenylmléčná, syrovátka, antilisteriální aktivita, laktobacily

### Abstract

The aim of this work was to verify the activity of phenyllactic acid (PLA) against two strains of *Listeria*, depending on the concentration of PLA, temperature and pH. Inhibitory activity grew at 37 °C with decreasing pH and increasing concentration.

Further experiments used concentrated whey fermentation to produce the highest amount of PLA used an isolate of *Lactobacillus plantarum* LPAL. Highest concentration of PLA achieved was 1,12 mg/ml during the fermentation at pH 4,4 and whey inoculation with strains *Lactobacillus plantarum* LPAL and *Geotrichum candidum* CCDM 870.

**Key words:** phenyllactic acid, whey, antilisterial activity, lactobacilli

### Úvod

Stále větší odpor k využívání čistě chemické konzervace potravin k prodloužení jejich trvanlivosti vede ke zkoumání látek, které jsou produkovány mikroorganismy používanými buď přímo v technologickém postupu výroby potravin, nebo mohou být přidávány jako produkt zpracování jiné potravin nebo odpadní suroviny při výrobě potravin bez spotřebitelem rozeznatelné změny typických vlastností dané potravin. Pro tento postup se vžilo označení biokonzervace, protože tyto látky nejsou produkty chemické syntézy, ale k jejich tvorbě dochází během biochemického procesu.

Jednou z těchto látek, jejichž vliv je zkoumán různými autory, je kyselina fenylmléčná (PLA). Produkce této organické kyseliny byla zjištěna u některých bakterií rodu *Lactobacillus* (Lavermicocca et al. 2003, Valerio et al. 2004), u některých bakterií rodu *Pediococcus* a *Geotrichum* (Ström et al. 2002, Dieuleveux et al. 1998a) a dalších. Prozkoumány byly její antifungální vlastnosti (Greifová et al. 2014). Je uváděna i její antilisteriální aktivita při koncentraci 13 mg/ml proti *Listeria monocytogenes* (Dieuleveux et al. 1998a). PLA způsobuje změny v chování listerií a jejich struktuře. Bakterie se shlukují, produkují polysacharidy a jejich buněčná stěna ztrácí pevnost. Nakonec dochází ke zvětšování buněk až k jejich úplné desintegraci (Dieuleveux et al. 1998a).

Naše práce byla zaměřena na testování jejího vlivu na růst listerií v závislosti na teplotě a pH potravin a na možnost produkce kyseliny fenylmléčné při fermentaci zahuštěné syrovátky kmeny, u nichž byla zjištěna nějaká antilisteriální aktivita. Vybrali jsme izolát s výraznou antilisteriální aktivitou, identifikovaný jako *Lactobacillus plantarum* s označením LPAL a kmen *Geotrichum candidum* CCDM 870 s předpokládanou produkcí PLA (Dieuleveux et al. 1998b), a použili jsme je při fermentaci zahuštěné syrovátky, jejímž využitím se dlouhodobě zabýváme.

### Materiál a metodika

- BHI bujón (OXOID CM0225, UK)
- GKCH agar (MILCOM a.s., CZ)