

VLIV AEROBNÍHO/ANAEROBNÍHO PROSTŘEDÍ NA DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITU VYBRANÝCH BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

EFFECT OF AERO-/ANAEROBIOSIS ON DEKARBOXYLASE ACTIVITY OF SELECTED LACTIC ACID BACTERIA

Leona Buňková, František Buňka, Eva Pollaková, Tereza Podešvová, Vladimír Dráb, Stanislav Kráčmar

ABSTRACT

Biogenic amines are undesirable compounds produced in foods mainly through bacterial decarboxylase activity. The aim of this study was to investigate some environmental conditions (particularly aero/anaerobiosis, sodium chloride concentration (0–2% w/w), and amount of lactose (0–1% w/w)) on the activity of tyrosine decarboxylase enzymes of selected six technological important *Lactococcus lactis* strains. The levels of parameters tested were chosen according to real situation in fermented dairy products technology (especially cheese-making). Tyramine was determined by the ion-exchange chromatography with post-column ninhydrine derivatization and spectrophotometric detection. Tyrosine decarboxylation occurred during the active growth phase. Under the model conditions used, oxygen availability had influence on tyramine production, anaerobiosis seemed to favour the enzyme activity because all *L. lactis* strains produced higher tyramine amount.

Keywords: *Lactococcus*, tyramine, ion-exchange chromatography, aero/anaerobiosis.

ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární alifatické, aromatické nebo heterocyklické bazické sloučeniny odvozené od aminokyselin. Jsou významnými sloučeninami, které se vyskytují v živých organizmech jako metabolické meziproducty a producty, které vykazují biologickou aktivitu. Základní podmínkou vzniku biogenních aminů je přítomnost aminokyselin v daném substrátu, přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů. (Fernández et al., 2007; Landete et al., 2007; Bover-Cid et al., 2008).

Tvorba biogenních aminů bakteriemi může být ovlivněna mnohými vnějšími faktory, které mohou ovlivňovat zejména kinetiku dekarboxylázových reakcí. Mezi vnější faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů u bakterií, patří teplota a pH prostředí, aero-/anaerobióza, dostupnost zdrojů uhlíku (např. glukózy), přítomnost růstových faktorů, růstová fáze buněk, koncentrace NaCl (vodní aktivita) aj. (Greif et al., 1997, 1998, 2006; Gardini et al., 2001, 2005; Santos et al., 2003; Fernández et al., 2007; Bover-Cid et al., 2008; Emborg and Dalgaard, 2008a, b). Kromě výše zmíněných faktorů mohou produkci biogenních aminů ovlivňovat další chemické látky, např. etanol, některé sacharidy, fenolické sloučeniny nebo oxid siřičitý (Gardini et al., 2005; Alberto et al., 2007; Mazzoli et al., 2009).

Biogenní aminy mohou být produkovány i kmeny BMK, které se běžně využívají pro technologické účely jako starterové kultury (Buňková et al., 2009), a proto je vhodné tyto kmeny před použitím v mlékárenství otestovat na dekarboxylázovou aktivitu. Stejně tak by pro technologické účely bylo vhodné znát kinetiku tvorby biogenních aminů za podobných podmínek prostředí, které mohou nastat během technologického procesu výroby fermentovaných mléčných výrobků. Tyto informace se však v soudobé odborné literatuře vyskytují jen zřídka.

Cílem této studie tedy bylo sledovat vliv aerobního a anaerobního prostředí na produkci tyraminu u 6 kmenů bakterií rodu *Lactococcus* (Buňková et al., 2009). Tyto bakterie se v průběhu biotechnologického procesu výroby mléčných výrobků využívají jako starterové kultury.

MATERIÁL A METODIKA

Vliv aerobního a anaerobního prostředí na produkci tyraminu byl testován u 3 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 53 a CCDM 141) a 3 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 824, CCDM 946 a CCDM 1004). Všechny kmeny byly získány ze Sbírký kultur mlékářských mikroorganismů Laktoflora® (CCDM).

Kultivace výše zmíněných kmenů, pozitivních na produkci tyraminu, probíhala v bujónu M17 s přidavkem 0,2 % (w/v) tyrozinu při 10 ± 1 °C v rozmezí 1 až 15 dnů. Příslušné kultivační médium o objemu 5 ml bylo zaočkováno vždy 25 µl suspenze bakterií narostených přes noc v M17 bujónu s přidavkem 0,2 % tyrozinu. Kultivační médium bylo obohaceno o laktózu v koncentraci 0,5 % (w/v) a NaCl (0; 1 a 2 % w/v).

Vliv aerobního/anaerobního prostředí na produkci biogenních aminů byl sledován tak, že polovina zkumavek byla kultivována aerobně a druhá anaerobně. Anaerobního prostředí bylo dosaženo zakápnutím kultivačního média sterilním parafinovým olejem (1 ml). Odběr vzorků pro analýzy probíhal 0., 1., 5., 10. a 15. den kultivace a to tak, že vždy byly náhodně odebrány od každého kmene a každé úrovně faktoru 2 zkumavky. Celý experiment byl opakován třikrát.

Po inkubaci bakterií byly buňky odstraněny centrifugací ($10000 \times g$, 5 min) a supernatant byl filtrován přes 0,45 µm filtr. Produkce tyraminu byla zjišťována pomocí iontově-výměnné chromatografie (IEC; Automatický analyzátor aminokyselin AAA400, Ingos Praha, ČR) v médiu po odstranění buněk a po filtraci podle Buňková et al. (2009). Každý izolát byl analyzován alespoň třikrát. Standard tyraminu byl získán ze Sigma-Aldrich. Výsledky IEC byly statisticky vyhodnoceny pomocí Kruskal-Wallisova testu a Wilcoxonova testu.

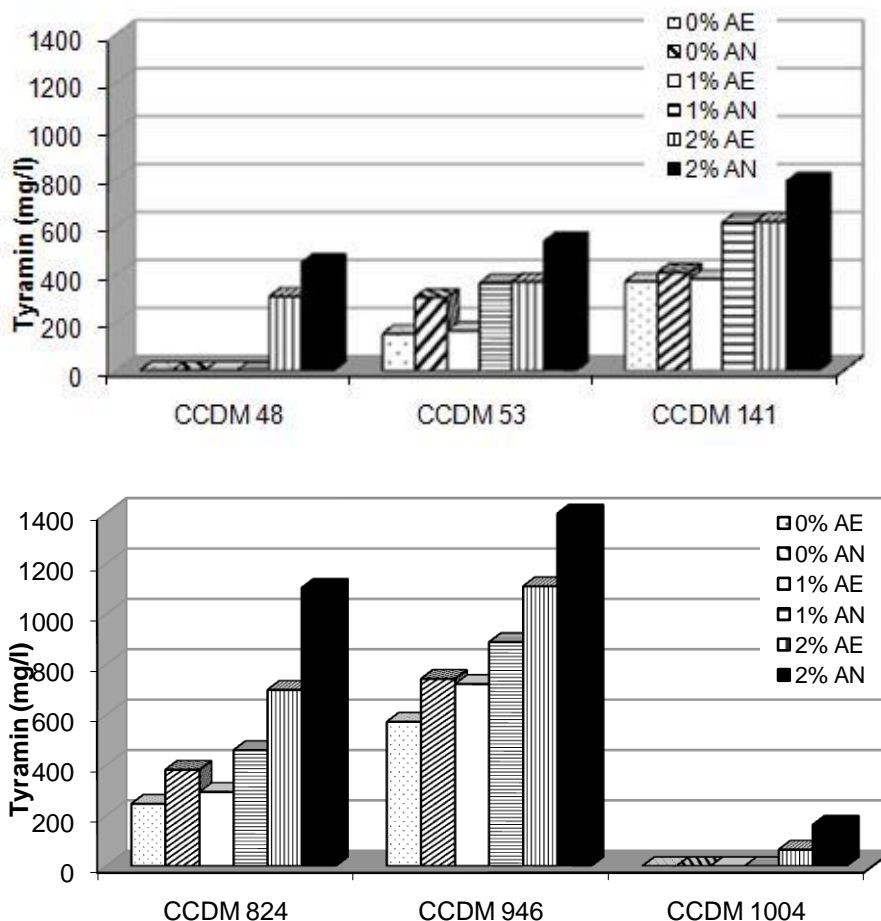
VÝSLEDKY A DISKUZE

V předcházející studii (Buňková et al., 2009) byla u 6 kmenů *L. lactis* zjištěna produkce biogenního aminu tyraminu. Tyto kmeny byly nyní využity pro testování vlivu aerobního a anaerobního prostředí na produkci

tyraminu. Teplota kultivace byla volena tak, aby se přiblížila podmínkám technologického procesu výroby přírodních sýrů a aby tato studie napomohla předvídat průběh tvorby biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích (zejména přírodních sýrech), které prochází zrácím procesem. Testované kmeny laktokoků byly proto kultivovány při teplotě 10 ± 1 °C, která se využívá během technologického procesu zrání přírodních sýrů. U všech testovaných kmenů se maximální produkce tyraminu po 10. dnu kultivace již neměnila.

Z testovaných kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 53 a CCDM 141) byl jako nejproduktivnější označen kmen *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, u něhož byla zjištěna maximální produkce tyraminu až 790 mg/l kultivačního média. U testovaných kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* byla pozorována nejvyšší produkce tyraminu v médiu obohaceném o 2 % NaCl po kultivaci v anaerobním prostředí (Obrázek 1A). K nejvyšší produkci tyraminu došlo při kultivaci bez přítomnosti kyslíku. K produkci tyraminu u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 došlo pouze tehdy, pokud byly tyto bakterie kultivovány v přítomnosti nejvyšší aplikované koncentrace soli (2 % NaCl). V ostatních případech (bez NaCl a 1 % NaCl)

tyraminu byla pozorována při kultivaci v prostředí se 2 % NaCl bez přístupu kyslíku. Tato zjištěná produkce tyraminu se statisticky významně odlišovala ($P < 0,05$) od produkce zjištěné při kultivaci za ostatních testovaných podmínek (Obrázek 1B). Testovaný kmen *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004 se do jisté míry choval podobně jako kmen *L. lactis* CCDM 48. Dekarboxylázová aktivita byla u kmene CCDM 1004 poměrně slabá a tyramin byl detekován pouze během kultivace v prostředí se 2 % NaCl. Mnoho studií se věnuje vlivu nejrůznějších faktorů vnějšího prostředí (např. teploty, pH, přítomnosti sacharidů, NaCl a jiných chemických látek) na produkci biogenních aminů u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (Greif et al., 1997, 1998, 2006; Emborg and Dalgaard, 2008a, b) nebo u mléčných bakterií rodu *Lactobacillus* (Alberto et al., 2007; Arena et al., 2008; Bover-Cid et al., 2008; Mazzoli et al., 2009), *Enterococcus* (Gardini et al., 2001; Fernández et al., 2007) a *Oenococcus* (Gardini et al., 2005). Avšak studií, věnujících se faktorům, které ovlivňují produkci biogenních aminů u bakterií rodu *Lactococcus*, není příliš mnoho. Z důvodu absence studií vlivu podmínek prostředí na produkci biogenních aminů u laktokoků a také proto, že se jedná o technologicky



Obrázek 1: Produkce tyraminu po 15 dnech kultivace při 10 ± 1 °C u testovaných kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* (A) a *L. lactis* subsp. *cremoris* (B) v M17 bujónu s 0,5 % laktózy a 0, 1 nebo 2 % NaCl v aerobním (AE) a anaerobním (AN) prostředí.

nebyla u tohoto kmene přítomnost tyraminu detekována. U testovaných bakterií *L. lactis* subsp. *cremoris* byla zaznamenána největší produkce tyraminu u kmene CCDM 946 (až 1400 mg.l^{-1} kultivačního média), nejnižší pak u CCDM 1004. U všech testovaných kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* lze pozorovat trend, že maximální produkce

významné bakterie hojně využívané v mlékárenství, jsme sledovali vliv aerobního a anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu tyramin pozitivních bakterií rodu *Lactococcus*.

Výsledky naší studie ukazují, že 4 z 6 testovaných kmenů laktokoků (*L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53, CCDM 141 a

L. lactis subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946) produkovaly tyramin za každých podmínek, které byly testovány. Zbývající 2 kmeny (*L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004) vykazovaly produkci tyraminu pouze za určitých podmínek (kultivace v prostředí se 2 % NaCl). Tyto výsledky prokazují, že schopnost produkce biogenních aminů bakteriemi závisí na kultivačních podmínkách a zároveň, že tato vlastnost je charakteristikou daného kmene (Arena and Manca de Nadra, 2001; Bover-Cid et al., 2001) Jestliže srovnáme růst testovaných laktokoků a křivku produkce biogenních aminů, zjistíme, že produkce biogenních aminů započala během logaritmické fáze jejich růstu. Podobný trend zaznamenali u *Lb. curvatus* také Bover-Cid et al. (2008).

U všech testovaných technologicky významných kmenů *L. lactis* byla za daných podmínek zjištěna vyšší produkce tyraminu za anaerobních podmínek. Bover-Cid et al. (2008) nezjistili výraznější vliv v dostupnosti kyslíku na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus curvatus*, a zároveň však poukazují na to, že anaerobní prostředí pravděpodobně napomáhá dekarboxylázové aktivitě enzymů.

ZÁVĚR

U všech testovaných kmenů *L. lactis*, pozitivních na produkci tyraminu, byla zjištěna vyšší produkce tohoto biogenního aminu po kultivaci bez přístupu kyslíku. Zároveň bylo detekováno nejvyšší množství tyraminu v kultivačním médiu s přidávkou 2 % NaCl.

LITERATURA

ALBERTO, M. R., ARENA, M. E., MANCA DE NADRA, M. C., 2007. Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: Effect of phenolic compounds. In *Food Control*, roč. 18, 2007, s. 898-903.

ARENA, M. E., LANDETE, J. M., MANCA DE NADRA, M. C., PARDO, I., FERRER, S., 2008. Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* X₁B isolated from wine. In *Journal of Applied Microbiology*, roč. 105, 2008, s. 158-165.

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.

BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M. C., 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 66, 2001, s. 185-189.

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

EMBORG, J., DALGAARD, P., 2008a. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation on *Morganella psychrotolerans*. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 128, 2008, s. 226-233.

EMBORG, J., DALGAARD, P., 2008b. Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella*

psychrotolerans and *Morganella morganii* – development and evaluation of predictive models. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 128, 2008, s. 234-243.

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.

Štúdium rastu a produkcie biogénnych aminov nektorými mikroorganizmami za modelových podmienok. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 17, 1998, s. 15-21.

GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J., 1997. Tvorb kadaverínu a amoniaku činnosťou niektorých 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.

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.

MAZZOLI, R., LAMBERTI, C., COISSON, J. D., PURROTTI, M., ARLORIO, M., GIUFFRIDA, M. G., GIUNTA, C., PESSIONE, E., 2009. Influence of ethanol, malate and arginine on histamine production of *Lactobacillus hilgardii* isolated from Italian red wine. In *Amino Acids*, roč. 36, 2009, s. 81-89.

SANTOS, W. C., SOUZA, M. R., CERQUEIRA, M. M. O. P., GLÓRIA, M. B. A., 2003. Bioactive amine 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.

Poděkování

Práce vznikla za podpory projektu MŠMT: MSM 7088352101.

Kontaktní adresa:

RNDr. Leona Buňková, Ph.D. Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky.
Tel: 00420 576 031 154, email: bunkova@ft.utb.cz,
doc. Ing. František Buňka, Ph.D., Bc. Eva Pollaková, Bc. Tereza Podešvová, Ústav technologie a mikrobiologie potravin,
prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc., Ústav biochemie a analýzy potravin,
Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Česká republika.
Vladimír Dráb, Sběrka kultur mlékařských mikroorganismů Laktoflora, MILCOM, Soběslavská 841, 390 02 Tábor, Česká republika