

SCREENING OF STARTER AND PROBIOTIC CULTURES INTENDED FOR PROCESSING OF FERMENTED MEAT PRODUCTS FOR THEIR ABILITY TO PRODUCE BIOGENIC AMINES

SKRÍNÍNG STARTOVACÍCH A PROBIOTICKÝCH KULTUR URČENÝCH PRO VÝROBU FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ NA SCHOPNOST TVORBY BIOGENNÍCH AMINŮ

Sládková P., Komprda T., Burdychová R.

Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: sladkopavla@seznam.cz, komprda@mendelu.cz, burdycho@node.mendelu.cz

ABSTRACT

Biogenic amines are toxic low-molecular organic basic compounds formed in food by amino acid decarboxylation induced by microbial enzymes (decarboxylases). Other factors like pH, temperature, oxygen availability and storage life affect the production of biogenic amines, too. Tyramine, histamine, cadaverine and putrescine are considered to be the toxicologically most important biogenic amines, with tyramine and histamine being the most intensively studied. The group of organisms capable of production of biogenic amines includes *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp. and many members of *Enterobacteriaceae* family, as well as *Bacillus macerans* and *Propionibacterium*. Some starter cultures used for fermented food processing can be included, too. 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. 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. The aim of this study was to screening of 73 types of bacterial cultures (SACCO, Italy) as starter or probiotic cultures for their ability to produce biogenic amines. Cultivation in decarboxylating medium, HPLC described by, and PCR detection of genes coding enzymes tyrosine decarboxylase and histidine decarboxylase, participating in formation of biogenic amines, were used as the screening methods. Thirty-nine strains of *Lactobacillus* spp., 15 strains of *Staphylococcus* spp., 15 strains of *Streptococcus* spp., 2 strains of *Pediococcus* spp. and 2 strains of the *Bifidobacterium* spp. were examined by the methods mentioned above. The tyramine production was detected at 13 strains of *Lactobacillus* spp., 14 strains of *Staphylococcus* spp., 3 strains of *Streptococcus* spp. and 2 strains of the *Bifidobacterium* spp., whereas no tested cultures were found to be able to produce histamine. The strains at which production of biogenic amines wasn't detected are

suitable for fermented food processing. When the strains at which production of biogenic amines was demonstrated were used in food processing, a control of concentration of biogenic amines in final product is highly recommended.

Key words: histamine, tyramine, biogenic amines, probiotic cultures

ABSTRAKT

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 prostudovaný je 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 přijaté množství, přítomnosti jiných biogenních aminů a na celkovém fyziologickém stavu jedince (SILLA-SAN-TOS a kol., 1996). Histamin způsobuje rozšíření periferních krevních cév, což vede ke snížení krevního tlaku a bolestem hlavy. Dále histamin indukce kontrakci hladkých svalů vnitřností s následkem břišních křečí, průjmu a zvracení.

Mezi mikroorganismy, které produkují biogenní aminy patří bakterie rodu *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus* a mnoho příslušníků čeledi *Enterobacteriaceae*, *Bacillus macerans* a *Propionibacterium*. Patří sem i zástupci startovacích kultur, používaných při výrobě fermentovaných potravin.

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 73 druhů bakteriálních kultur (SACCO, Itálie) používaných jako startovací či probiotické kultury na schopnost tvořit biogenní aminy. Pro skrínig byla použita metoda kultivace v dekarboxylačním médiu (BOVER-CID, HOLZAPFEL, 1999), HPLC popsaná BURDYCHOVOU A DOHNALEM (2007) a metoda detekce genů kódujících enzymy tyrosindekarboxylázu a histidindekarboxylázu účastnících se tvorby biogenních aminů (BURDYCHOVÁ, 2006). Uvedenými metodami bylo prověřeno 39 kmenů rodu *Lactobacillus*, 15 kmenů rodu *Staphylococcus*, 15 kmenů rodu *Streptococcus*, 2 kmeny rodu *Pediococcus* a 2 kmeny rodu *Bifidobacterium*. U 13 kmenů rodu *Lactobacillus*, 14 kmenů rodu *Staphylococcus*, 3 kmenů rodu *Streptococcus*, a 2 kmenů rodu *Bifidobacterium* byla zjištěna schopnost tvorby tyraminu, 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 biogenních aminů je vhodné při jejich použití důsledně kontrolovat koncentraci biogenních aminů ve finálním výrobku.

Klíčová slova: biogenní aminy, histamin, tyramin, HPLC, PCR, probiotika

ÚVOD

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární bazické dusíkaté látky vznikající v potravinách a potravinových surovinách nejčastěji dekarboxylací aminokyselin působením bakteriálních dekarboxylačních enzymů. Základními podmínkami vzniku biogenních aminů v potravinách jsou přítomnost aminokyselin v substrátu (potravině), přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a nastolení vhodných podmínek pro růst a množení mikroorganismů. Ve fermentovaných masných výrobcích se nejčastěji na produkci biogenních aminů podílejí bakterie rodu *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus* a mnoho příslušníků čeledi *Enterobacteriaceae*. Patří sem i zástupci startovacích kultur, používaných při výrobě fermentovaných potravin. Jedním z důležitých faktorů, které ovlivňují aktivitu mikrobiálních dekarboxylačních enzymů, je dostupnost substrátu. Význam má nejen přítomnost volných aminokyselin, ale také přítomnost využitelných sacharidů. Dalšími významnými faktory, které ovlivňují produkci biogenních aminů jsou teplota, pH, přítomnost soli, přístupnost kyslíku, doba zrání, skladování a hygienické podmínky výroby. K toxikologicky nejvýznamnějším biogenním aminům patří tyramin, histamin, kadaverin a putrescin. Významným vazoaktivním biogenním aminem je tyramin, který zvyšuje krevní tlak s možným důsledkem hypertenzní krize, migrenózních bolestech hlavy, v krajních případech až krvácení do mozku, resp. selhání srdce. Negativní účinky histaminu na organismus člověka jsou poměrně různorodé. Vazba histaminu na příslušné receptory cévní stěny vyvolává dilataci hladké svaloviny periferních krevních cév s důsledkem poklesu tlaku, což může mít za následek silné bolesti hlavy. Naopak interakce histaminu s receptory střevní stěny vyvolá kontrakce hladké svaloviny střeva s klinickými projevy 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 potraviny, pro tyramin asi 20 - 80 mg/ kg (KOMPRDA, 2005).

V současnosti je trendem používat při výrobě fermentovaných potravin probiotické kultury. Ty mohou mít funkci startovacích kultur nebo 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 (BURDYCHOVÁ, 2007). Bohužel i zástupci probiotických kultur patří mezi potencionální producenty biogenních aminů a je proto nutné je prověřovat na schopnost tvorby biogenních aminů.

MATERIÁL A METODY

Bakteriální kmeny a jejich kultivace

73 startovacích a probiotických kultur, které poskytla firma (SACCO, Itálie) (Tab I.) byly kultivovány aerobně i anaerobně dle typu kultury na MRS, M17 agaru (Merck, Německo) a PCA agaru (NOACK, Francie)

Tab. I. Podmínky kultivace jednotlivých bakteriálních kultur

Název kmenů	Počet	Doba kultivace	Teplota	aerobně/anaerobně
<i>Lactobacillus</i>	39	5 dní	30 °C	Ana
<i>Staphylococcus</i>	15	48 hodin	37 °C	A
<i>Streptococcus</i>	15	48 hodin	37 °C	A
<i>Pediococcus</i>	2	3 dny	37 °C	A
<i>Bifidobacterium</i>	2	3 dny	45 °C	Ana

A - aerobně

Ana - anaerobně

Izolace DNA a PCR

Stanovení koncentrace a čistoty DNA byly provedeny podle SAMBROOK et al. (2001). Multiplex PCR pro detekci genů pro tyrosin a histidin dekarboxylázu byla provedena v konečném objemu 25 μ l obsahujícím 10 ng genomové DNA, 10 pmol každého primeru TD2/TD5 a HDC3/HDC5, 1 U Taq DNA polymerázy 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 μ l/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 (BOVERCID, HOLZAPFEL, 1999) s přidavkem aminokyselin tyrosinu a histidinu, 10 mg/l. Vzorek byl centrifugován (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 μ m nylonový membránový filtr. Před HPLC analýzou proběhla derivatizace 0,5 μ l vzorku orthoftalaldehydem (OPA, 2,5 μ l) 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 BURDYCHOVOU a DOHNALEM (2007).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Produkce biogenních aminů tyraminu a histaminu byla popsána u řady mikroorganismů používaných jako startovací kultury při výrobě fermentovaných potravin (KOMPRDA a kol., 2004). Tato vlastnost byla popsána dokonce i u řady probiotických mikroorganismů, které jsou v současnosti hojně přidávány do fermentovaných potravin. V mlékárenském průmyslu má použití probiotik dlouhou tradici a do různých typů mléčných výrobků je přidávána řada komerčních probiotických kultur řady zahraničních výrobců. Všechny tyto probiotické kultury, podobně jako startovací mikroorganismy, by měly být prověřovány na schopnost tvořit biogenní aminy, jejichž tvorba je při výrobě fermentovaných potravin nežádoucí. Vzhledem ke skutečnosti, že je v současnosti trendem přidávat probiotické kultury i do fermentovaných masných výrobků, je nutné všechny startovací i probiotické kultury na schopnost tvorby biogenních aminů testovat, případně prověřovat obsah biogenních aminů přímo ve finálních výrobcích.

V této práci bylo na schopnost tvorby biogenních aminů prověřeno celkem 73 bakteriálních kmenů dodaných firmou SACCO (Itálie), používaných coby startovací či probiotické kultury při výrobě fermentovaných výrobků živočišného původu (39 kmenů rodu *Lactobacillus*, 15 kmenů rodu *Staphylococcus*, 15 kmenů rodu *Streptococcus*, 2 kmeny rodu *Pediococcus*, 2 kmeny rodu *Bifidobacterium*). Specifické DNA sekvence pro enzym tyrosindekarboxylázu byly detekovány u 13 kmenů rodu *Lactobacillus* (33%), 14 kmenů rodu *Staphylococcus* (93%), 3 kmenů rodu *Streptococcus* (20%), a 2 kmenů rodu *Bifidobacterium* (100%) a tyto bakterie byly označeny za potenciální původce tvorby biogenních aminů. Schopnost tvořit histamin nebyla zjištěna u žádné z prověřovaných kultur.

Vzhledem k nepřítomnosti genu pro histidindekarboxylázu nebyla produkce histaminu testována. Schopnost tvorby biogenního aminu tyraminu byla u všech 73 prověřovaných kmenů testována v dekarboxylačním médiu s prekurzorem tyraminu (tyrosinem). Tvorba tyraminu byla prokázána u všech kultur u kterých byl detekován gen pro tyrosindekarboxylázu (13 kmenů rodu *Lactobacillus*, 14 kmenů rodu *Staphylococcus*, 3 kmenů rodu *Streptococcus* a 2 kmenů rodu *Bifidobacterium*, a to v různých koncentracích (10 ng/ml - 1 mg/ml).

ZÁVĚR

Vzhledem k tomu, že je třeba pro prevenci rizika, které pro spotřebitele plyne z přítomnosti biogenních aminů ve fermentovaných potravinách produkci biogenních aminů snížit nebo zcela eliminovat, vyvstává nutnost startovací i probiotické kultury pečlivě vybírat a testovat (BURDYCHOVÁ, 2006). Kmeny, u kterých nebyla prokázána tvorba biogenních aminů tyraminu a histaminu jsou vhodné pro výrobu fermentovaných potravin. U kmenů s prokázanou produkcí biogenních aminů je vhodné při jejich použití důsledně kontrolovat koncentraci biogenních aminů ve finálním výrobku.

LITERATURA

Bover-Cid S. et al (1999): Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic bacteria. *Int. J. Food Micro.* 53, 33-41

Burdychová R. (2006): Skríninf vybraných startovacích bakteriálních kultur na přítomnost DNA sekvencí kódujících dekarboxylázu tyrosinu. *Acta univ. Agric. Et silvic. Mendel. Brun.*, LIV, No. 5, 7-12

Burdychová R. (2007): Mikrobiologická detekce probiotických mikroorganismů ve fermentovaných mléčných výrobcích. *Acta Universitatis, Acta univ. Agric. Et silvic. Mendel. Brun.*, LIV, No. 2, 15-17

Burdychová R., Dohnal V. (2007): Využití HPLC ke stanovení produktu exprese genu pro mikrobiální tyrosindekarboxylázu. *Food Chemistry*, Accepted

Komprda T. (2005): Biogenní aminy a polyaminy ve fermentovaných potravinách živočišného původu. *Veterinářství*, 10, 646-650

Komprda T. et al (2004): Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Sci.* 67, 4: 607-616

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (2001): *Molecular cloning*, 3rd. Ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press.

Silla-Santos M. (1996): Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol.* 29: 213-231