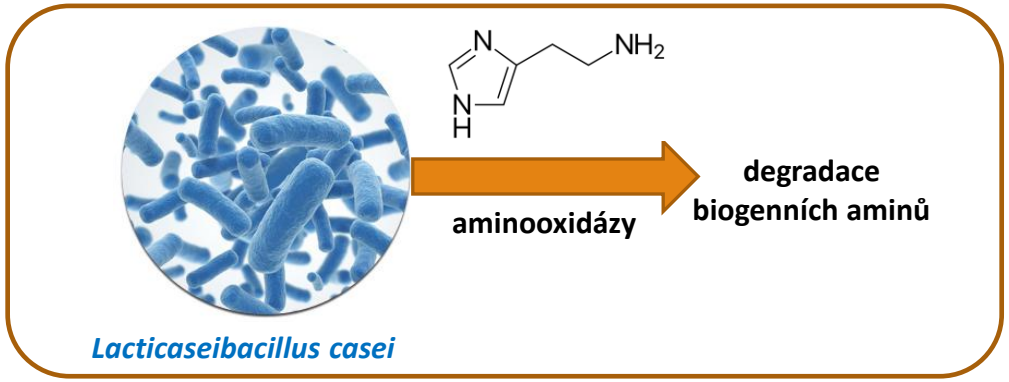
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

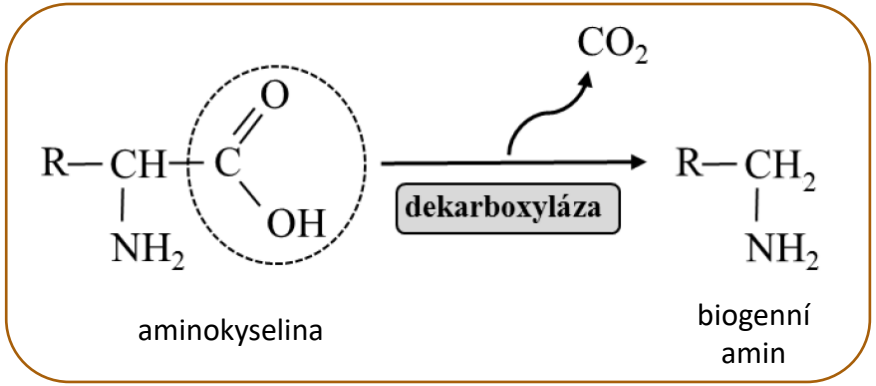
Faktory ovlivňující mikrobiální degradaci biogenních aminů

Mgr. **Petra Jančová**, Ph.D.

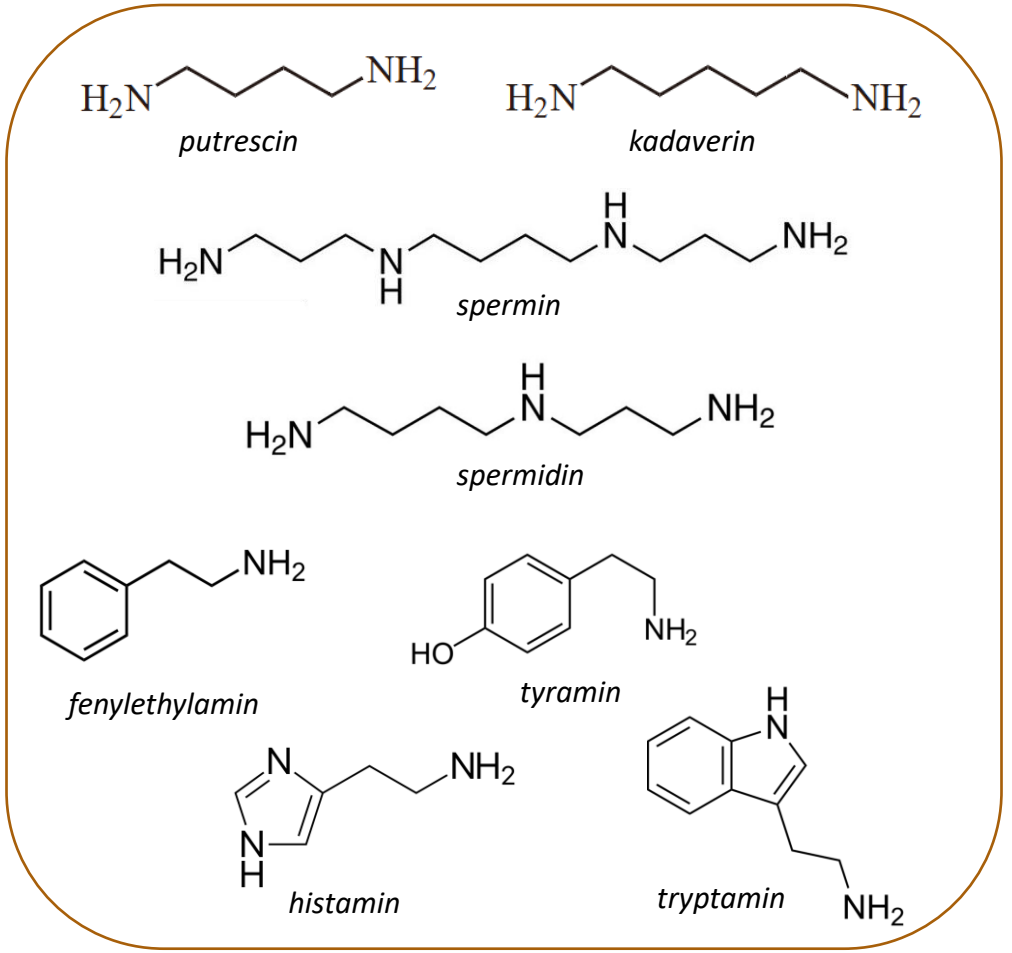


Biogenní aminy

- **nízkomolekulární organické dusíkaté látky**
- **vznik:**



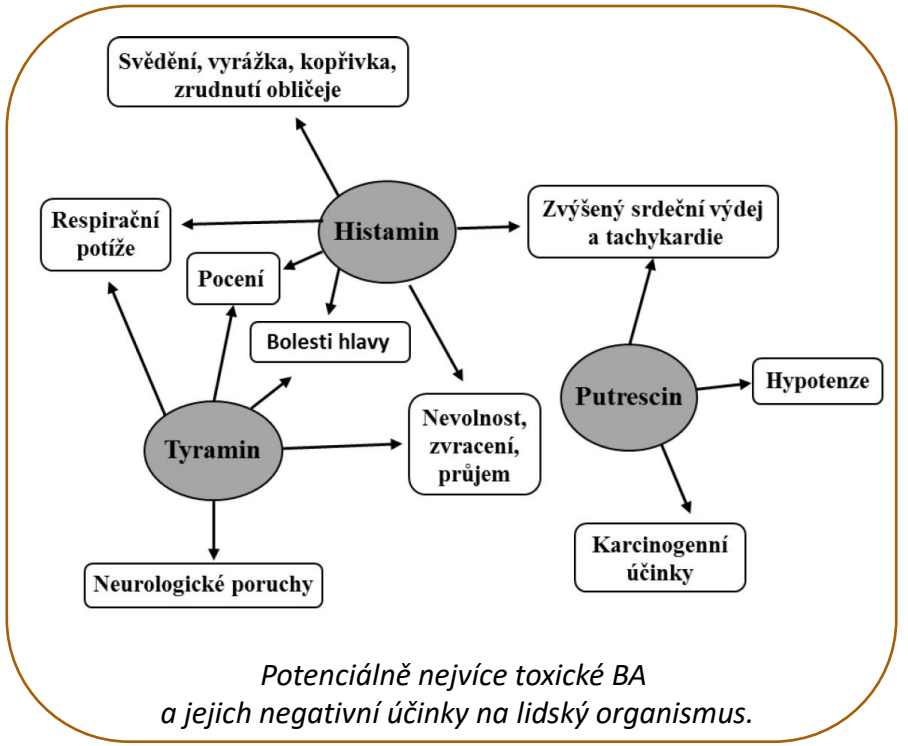
- **dělení:**
  - chemická struktura (alifatické; aromatické; heterocyklické)
  - počet aminoskupin (monoaminy; polyaminy)
- **produkovány rostlinami, živočichy, mikroorganismy => součást jejich metabolických fyziologických procesů**



Biogenní aminy (BA)



- **výskyt: potraviny a nápoje**
  (ryby a mořské plody, mléčné produkty, masné výrobky, alkoholické nápoje)
  - nefermentované potraviny => nežádoucí mikrobiální aktivita
  - fermentované potraviny => startérové a doplňkové kultury
- **důležité z hygienického a toxikologického hlediska**
  - člověk => detoxikační systém (aminooxidázy)
  - identifikovány jako původci otrav



Potenciálně nejvíce toxické BA a jejich negativní účinky na lidský organismus.

EC č. 2073/2005; Nařízení Komise, 2005;
Limit histaminu u ryb:
100 mg·kg-1 (čerstvé ryby); 200 mg·kg-1 (fermentované rybí produkty)

Možnosti snížení BA v potravinách

- **změna pH**
  - ovlivnění aktivity bakteriálních dekarboxyláz
- **změna koncentrace NaCl**
  - potlačení růstu patogenů v průběhu fermentace a kysání mléčných výrobků
- **změna teploty**
  - v průběhu zpracování a uchovávání
- **změna tlaku**
  - poškození buněčné membrány mikroorganismů (inaktivace, subletální účinky)
- **aplikace potravinářských přídatných látek**
  - antimikrobní účinky
- **vliv ionizujícího záření**
  - redukce počtu bakterií produkujících BA; přímá radiolýza BA v potravinách
- **adsorpce**
  - imobilizace BA na povrchu sorbentu
- **použití startérových kultur**
  - dekarboxyláza negativní kultury
  - mikroorganismy schopné redukce BA

nejnovější a nejefektivnější přístup

Mikrobiální degradace BA

- **princip: schopnost některých bakterií produkovat deaminační enzymy**
  - aminooxidázy; lakázy (multicopperoxidázy); transglutaminázy

- **mikroorganismy schopné degradace BA v potravinách**
  - zástupci rodů *Brevibacterium, Bacillus, Micrococcus, Staphylococcus*
  - bakterie mléčného kvašení (LAB)
    - *Lacticaseibacillus, Lactiplantibacillus, Latilactobacillus, Pediococcus*
  - schopnost mikroorganismů degradovat BA je kmenově specifická

Cíl práce

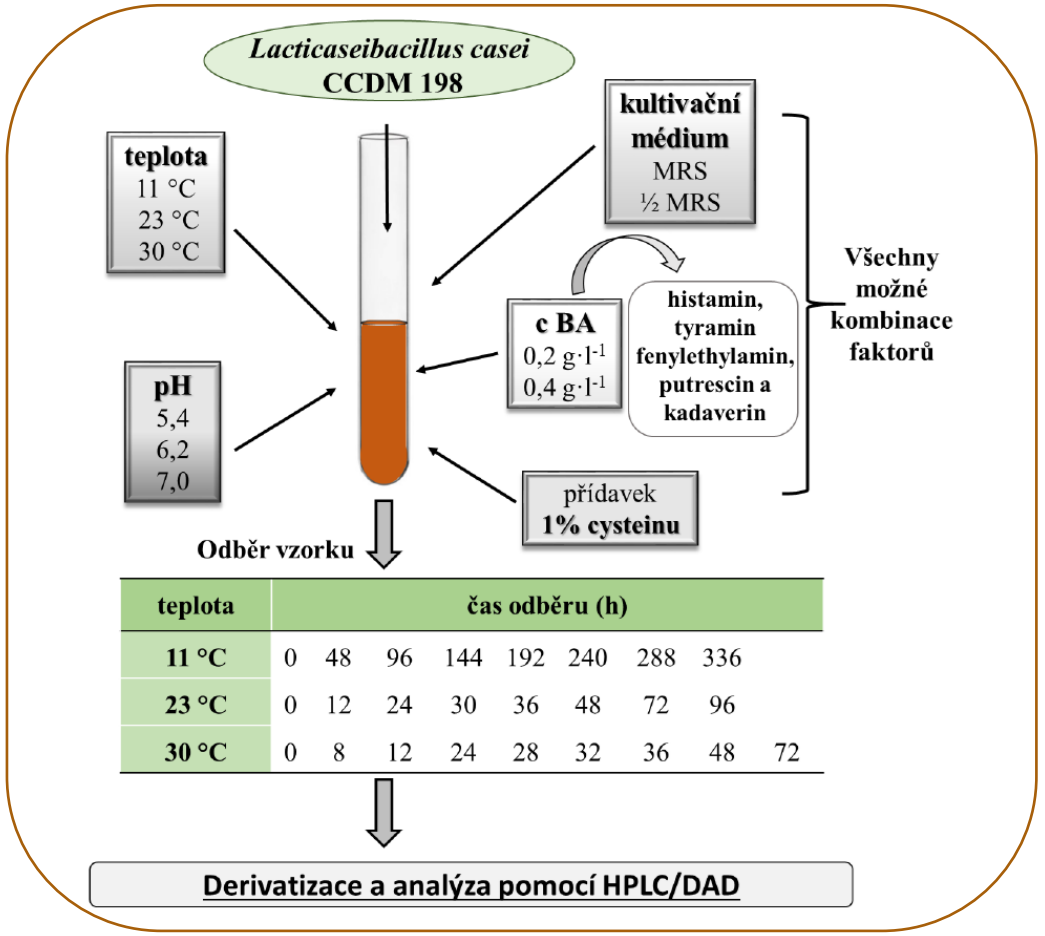
- ***Lacticaseibacillus casei* CCDM 198**
  (sbírka mlékárenských mikroorganismů Laktoflora)

  1) **sledování vlivu vybraných faktorů na schopnost bakterie redukovat obsah BA**
     - ***in vitro***
     - **v reálné potravině**
  2) **detekce enzymu lakázy** (MCO, multicopperoxidázy)
  3) **detekce genu *MCO***
  4) **sledování exprese genu *MCO* v průběhu degradace BA a v závislosti na vybraných faktorech**

METODIKA

1A) Vliv vybraných faktorů na redukční schopnost *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 – *in vitro*

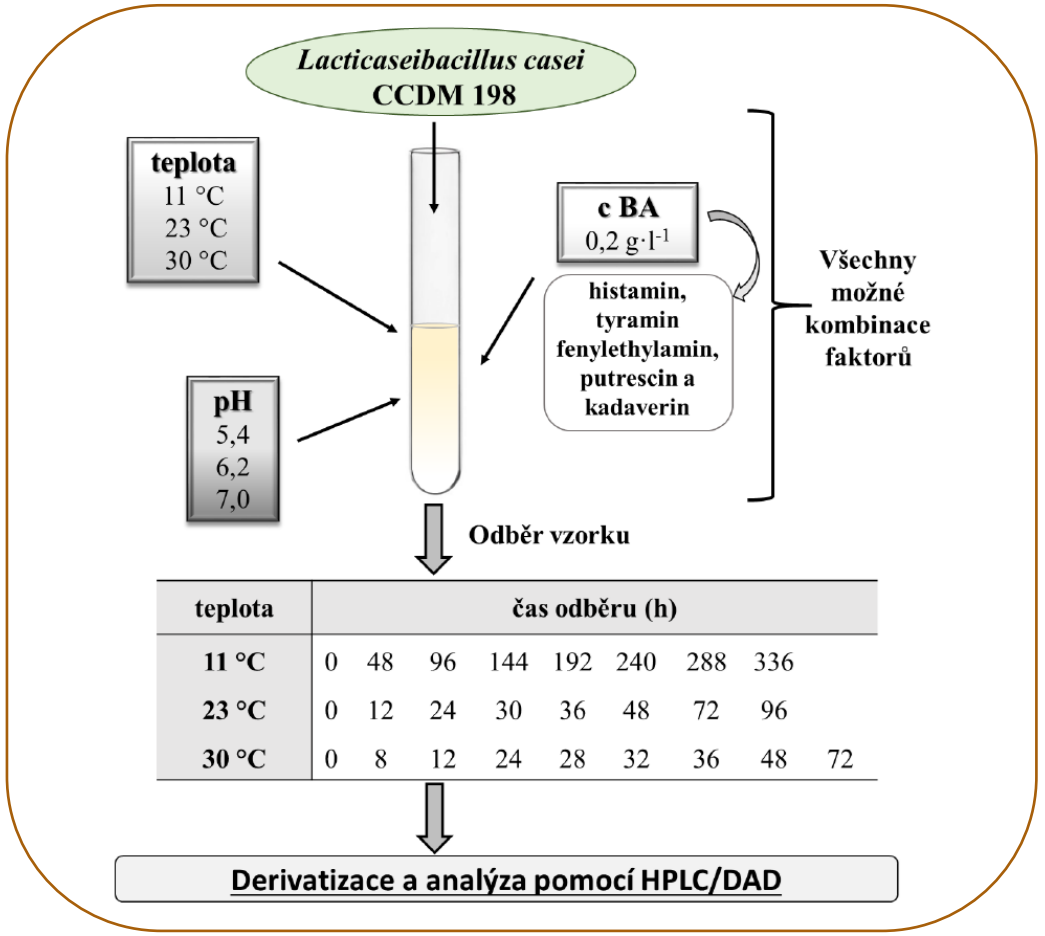
- **sledované faktory:**
  - pH
  - teplota
  - koncentrace BA
  - dostupnost živin v kultivačním médiu
  - přídavek cysteinu



teplota	čas odběru (h)								
11 °C	0	48	96	144	192	240	288	336	
23 °C	0	12	24	30	36	48	72	96	
30 °C	0	8	12	24	28	32	36	48	72

1B) Vliv vybraných faktorů na redukční schopnost *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 – v reálné potravině

- **sledované faktory:**
  - pH
  - teplota
  - koncentrace BA



teplota	čas odběru (h)								
11 °C	0	48	96	144	192	240	288	336	
23 °C	0	12	24	30	36	48	72	96	
30 °C	0	8	12	24	28	32	36	48	72

Derivatizace a analýza pomocí HPLC/DAD

2) Detekce enzymu lakázy (MCO, multicopperoxidázy) u *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198

- kultivace *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v MRS médiu (0, 24, 48 a 72 h; 30 °C) → centrifugace → promytí → lýze buněk → centrifugace → supernatanty
  - **detekce přítomnosti enzymu**
    - **nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu** (PAGE) (oxidace substrátu DMP /2,6-dimethoxyfenol/ v přítomnosti Cu^{2+} => barevný produkt)
  - **stanovení aktivity enzymu**
    - **spektrofotometrie** (oxidace substrátu ABTS /2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina/ => barevný produkt; $A_{\lambda=420\ nm}$)

3) Detekce *MCO* genu kódujícího enzym lakázu (MCO) u *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198

- **návrh vhodných sad primerů** (databáze, programy)
  - primery pro cílové a „housekeepingové“ geny
- **izolace nukleových kyselin z média nebo potravinových matric** (izolační kity)
- **stanovení koncentrace a čistoty nukleových kyselin** (spektrofotometricky)
- **reverzní transkripce** (přepis mRNA → cDNA)
- **testování primerů** (PCR, elektroforéza; qPCR)

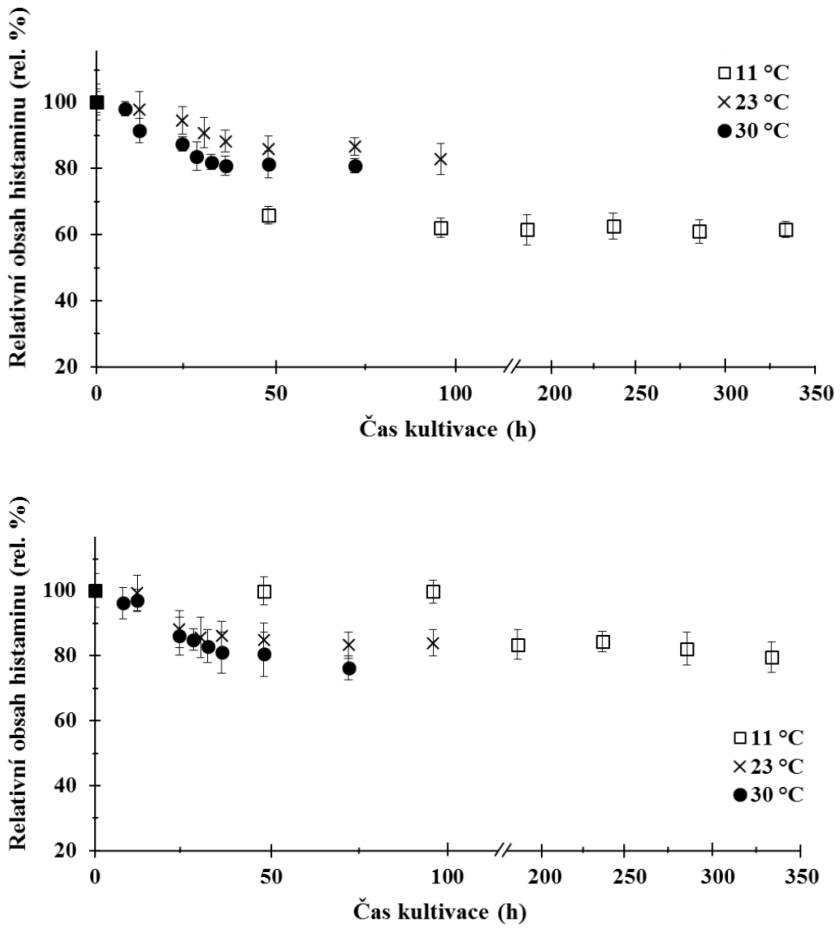
4) Sledování exprese genu *MCO* v průběhu degradace BA v závislosti na vybraných faktorech u *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198

- **sledované faktory:**
  - složení kultivačního média
  - vliv činidel ovlivňujících redox-potenciál kultivačního média (kyselina askorbová, cystein)

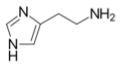
- **RT-qPCR**
  - relativní kvantifikace

VÝSLEDKY

1) Vliv vybraných faktorů na redukční schopnost *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 – *in vitro* a v reálné potravině



Vývoj relativního obsahu **HISTAMINU** (rel. %) při degradaci bakterií L. casei CCDM 198 v úplném **MRS bujónu** (horní graf) a v mléce (spodní graf) s počáteční **koncentrací BA 0,2 g·l^{-1}** v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační **T = 11 °C, 23 °C a 30 °C; pH = 7,0.**
Počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %.

Testovaný biogenní amin (BA)	*Dostupnost živin/ médium*	*Teplota kultivace (°C)*	*pH*	*doba inkubace (hodiny)*	*Degradace BA (úbytek BA v % na konci inkubace)*	
					Počáteční koncentrace testovaného BA (g.l^{-1})	
					0,2	0,4
HISTAMIN 	MRS	11	5,4	336	19	**43**
			6,2		21	25
			7,0		**39**	31
		23	5,4	96	23	12
			6,2		11	3
			7,0		18	16
		30	5,4	72	20	28
			6,2		**39**	**40**
			7,0		20	30
	MRS ½	11	5,4	336	**36**	9
			6,2		**32**	21
			7,0		**30**	6
		23	5,4	96	8	15
			6,2		**32**	20
			7,0		**27**	10
		30	5,4	72	31	24
			6,2		**51**	4
			7,0		30	12
	mléko	11	5,4	336	**39**	
			6,2		18	
			7,0		20	
		23	5,4	96	**35**	
			6,2		**39**	
			7,0		16	
		30	5,4	72	16	
			6,2		19	
			7,0		22	

1) Vliv vybraných faktorů na redukční schopnost *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 – *in vitro* a v reálné potravině

- **SHRNUTÍ ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ EXPERIMENTŮ – „nejvýznamnější redukce“** (úbytek BA v %)**:**

  - **TYRAMINU**
    - ***MRS bujon***
      - T= 23 a 30 °C; pH 6,2; c_{BA}= 0,2 g·l^{-1}; MRS½ => **25 %**
    - ***v mléce***
      - T= 30 °C; pH 7; c_{BA}= 0,2 g·l^{-1} => **19 %**

  - **PURESCINU**
    - ***MRS bujon***
      - T= 30 °C; pH 6,2; c_{BA}= 0,2 g·l^{-1}; MRS½ => **60 %**
    - ***v mléce***
      - T= 23 °C; pH 5,4; c_{BA}= 0,2 g·l^{-1} => **49 %**
      - T= 23 °C; pH 6,2; c_{BA}= 0,2 g·l^{-1} => **42 %**

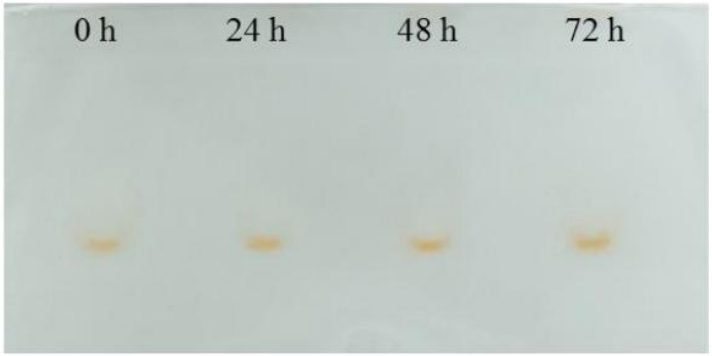
  - **KADAVERIN**
    - ***MRS bujon***
      - T= 30 °C; pH 6,2; c_{BA}= 0,2 g·l^{-1}; MRS½ => **58 %**
    - ***v mléce***
      - T= 23 °C; pH 5,4; c_{BA}= 0,2 g·l^{-1} => **40 %**
      - T= 30 °C; pH 7; c_{BA}= 0,2 g·l^{-1} => **40 %**

  - **FENYLETHYLAMIN**
    - ***MRS bujon***
      - T= 23 °C; pH 6,2; c_{BA}= 0,4 g·l^{-1}; MRS => **38 %**
    - ***v mléce***
      - T= 23 a 30 °C; pH 7; c_{BA}= 0,2 g·l^{-1} => **32 %**

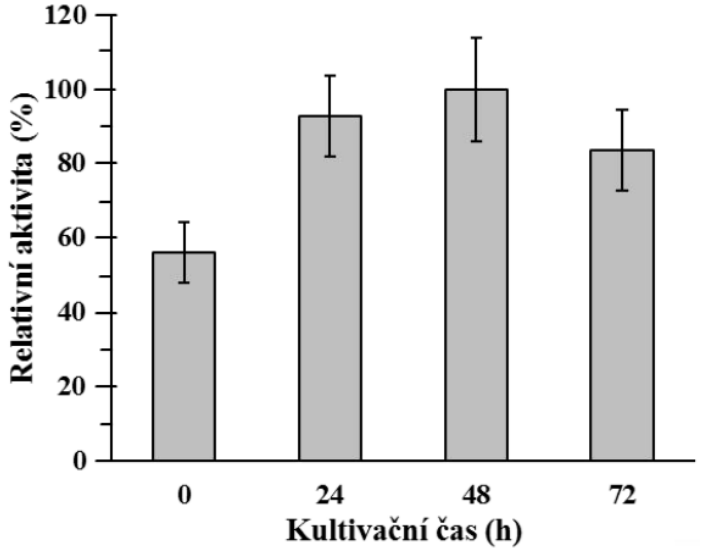
Přídavek cysteinu signifikantně ($P < 0,05$) **podporoval redukci BA** bakterií *L. casei* CCDM 198, **avšak interakce jednotlivých faktorů a přítomnost cysteinu významně redukci všech aminů neovlivňovala** ($P < 0,05$).

2) Detekce enzymu lakázy (MCO, multicopperoxidázy) u *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198

Detekce přítomnosti enzymu MCO u bakteriálního kmene *L. casei* CCDM 198 v čase kultivace 0, 24, 48 a 72 hodin.
PAGE za nativních podmínek; substrát 2,6-dimethoxyfenol (DMP).



Aktivita enzymu MCO u bakteriálního kmene *L. casei* CCDM 198 v čase kultivace 0, 24, 48 a 72 hodin.
Spektrofotometrická detekce změny % relativní aktivity enzymu MCO v čase při oxidaci substrátu ABTS ($A_{\lambda=420\ nm}$).
Výsledky jsou vyjádřeny pomocí průměrů a standardních odchylek.



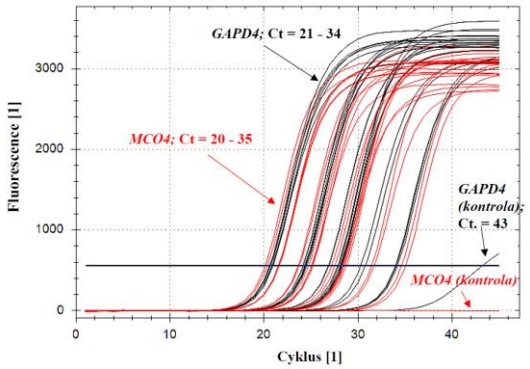
3) Detekce *MCO* genu kódujícího enzym lakázu (multicopperoxidázy) u *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198

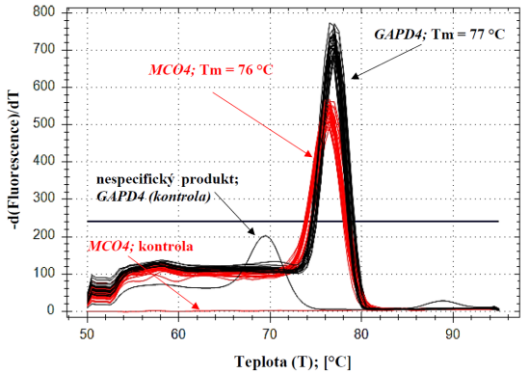
Testování nových sad primerů pro RT-qPCR (pro cílový (*MCO*) a srovnávací (*GAPDH*) gen).

Typ primerů	Název	Sekvence 5´-3´	Délka produktu (bp)
Cílový gen	*MCO4*-L	GCGTGGTGACATCAAAATAGGG	94
	MCO4-R	TGGGACTACCGGGCTGATTA	
Srovnávací gen	*GAPD4*-L	GCACAGCGTGTTTCTGTTGT	137
	GAPD4-R	TCGTTCCAGCCAAAGCTAGG	

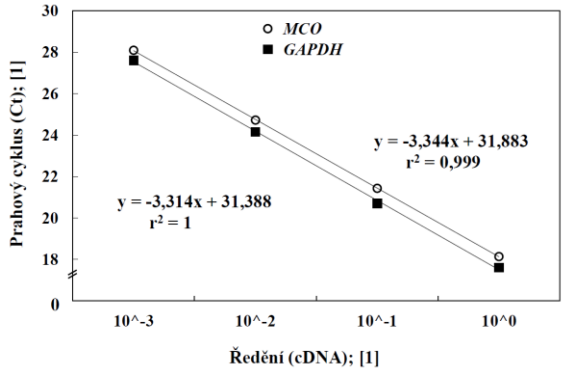


Testování podmínek RT-qPCR a analýza křivky tání.



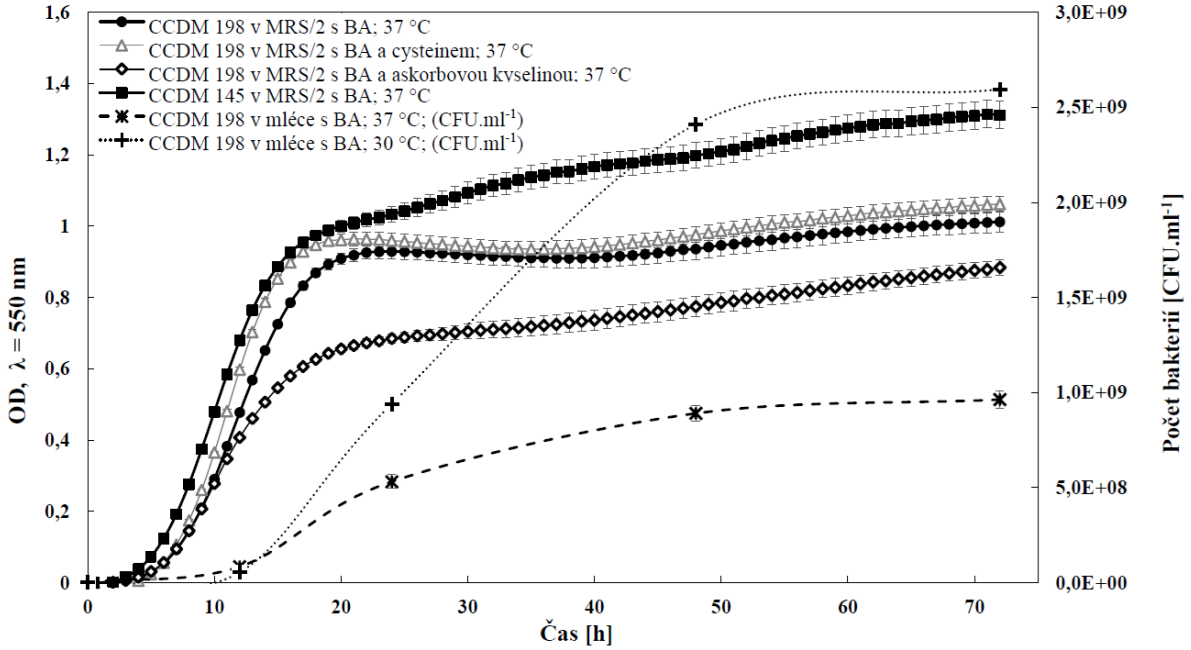


Účinnost RT-qPCR pro vybrané sady primerů.

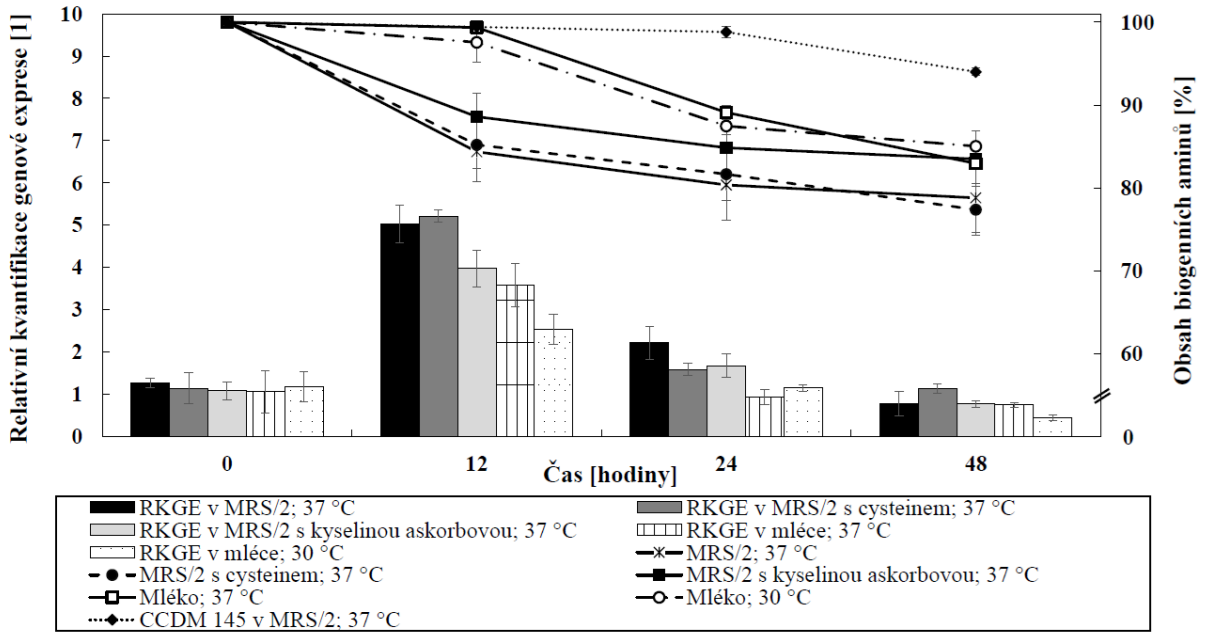


4) Sledování exprese genu *MCO* v průběhu degradace BA v závislosti na vybraných faktorech u *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198

Přídavek redukujících činidel (cysteinu a kys. askorbové) **z důvodu podpory růstu buněk exprimující geny kódující MCO.**



Srovnání relativní kvantifikace genové exprese cílového genu MCO u kmenu *L. casei* CCDM 198 s úbytkem BA aminů v různých kultivačních médiích obohacených o BA během 48h kultivace.



ZÁVĚR

- **byla zmapována a popsána degradační aktivita *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 vůči obsahu BA za *in vitro* podmínek a v reálné potravině** (mléce)
- **bylo prokázáno, že degradace všech jednotlivých BA závisí na technologických faktorech**
  - zjištěna rozdílná schopnost *L. casei* CCDM 198 degradovat jednotlivé aminy při stejných technologických podmínkách jak *in vitro*, tak i v reálné potravině
  - nevhodně zvolená kombinace faktorů nepodporuje degradační schopnost testovaného kmene
- **výsledky studií ukázaly, že studovaný kmen je významným degradérem BA** (histaminu, tyraminu, kadaverinu, putrescinu)
  - kmen má statut GRAS a byl Evropským úřadem EFSA umístěn na seznam QPS (qualified presumption of safety)
  - prokázáno, že není producentem BA

=> **možné využití *L. casei* CCDM 198 v potravinářství**
(součást startovací kultury u fermentovaných mléčných potravin)

PODĚKOVÁNÍ

- **ÚIOŽP, Fakulta Technologická, UTB ve Zlíně**

- **prof. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
- **prof. Ing. František Buňka, Ph.D.**
- **Mgr. Lucie Klementová, Ph.D.**
- **Ing. Hana Pištěková, Ph.D.**
- **Mgr. Irena Butor, Ph.D.**

DĚKUJI VÁM ZA POZORNOST