

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VYUŽITÍ HPLC KE STANOVENÍ PRODUKTU EXPRESE GENU PRO MIKROBIÁLNÍ TYROSINDEKARBOXYLASU

**RADKA BURDYCHOVÁ a VLASTIMIL
DOHNAL**

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

burdycho@node.mendelu.cz

Došlo 12.1.07, přijato 15.2.07.

Klíčová slova: tyrosindecaboxylasa, biogenní aminy, tyramin, HPLC, PCR

Úvod

Tyrosindecaboxylasa je mikrobiální enzym ze třídy lyas, který katalyzuje přeměnu volné aminokyseliny tyrosinu v potravinovém substrátu na toxický biogenní amin tyramin. Mezi nejdůležitější druhy mikroorganismů s výraznou produkcí tyrosindecaboxylasy patří rody *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* a *Shigella*, ale také mléčné bakterie rodu *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* a mnoho příslušníků čeledi *Enterobacteriaceae*¹.

Enzym tyrosindecaboxylasa je v mikrobiálním genu kódován specifickou DNA sekvencí, genem pro tyrosindecaboxylasu (*tyrDC*). Tato DNA sekvence je součástí genového klastru, který je kromě genu pro tyrosindecaboxylasu složen z genů pro tyrosyl-tRNA syntetasu (*tyrRS*), genu pro tyrosin permeasu (*tyrP*) a genu pro Na⁺/H⁺ antiporter (*nhaC*). Molekulární detekce potenciálních producentů tyrosindecaboxylasy spočívá v identifikaci specifické *tyrDC* sekvence v genomu jednotlivých mikroorganismů.

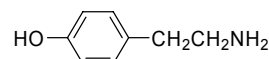
Expresí genu pro *tyrDC* je řízena promotorem, umístěným proti směru jeho transkripce. Produkt exprese, enzym tyrosindecaboxylasa, může být nepřímo detegován stanovením obsahu tyraminu ve vzorku, v němž je přítomen mikroorganismus s decaboxylasovou aktivitou. Pro přesné stanovení je využíváno optimální živné médium pro konkrétní mikroorganismus s tyrosindecaboxylasovou aktivitou s přesně definovaným množstvím tyrosinu, substrátu pro enzymovou katalytickou přeměnu tyrosinu na biogenní amin tyramin. Při stanovení tyraminu je využívá-

na řada separačních analytických metod, nejčastěji vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC), v některých případech je nutné použít micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii. Vzhledem k absenci chromoforu je nutné stanovovat analyt před vlastní detekcí derivatizovat, což je možné uskutečnit buď před nástřikem na kolonu nebo až po jeho výstupu z kolony. Nejčastěji používanými derivatizačními činidly jsou dansylchlorid (5-dimethylaminonafthalen-1-sulfonylchlorid) a *o*-ftaldialdehyd¹.

Tyramin (*p*-hydroxyfenylethylamin) je aromatický biogenní amin (obr. 1), který je ve výživě člověka důležitý jako zdroj dusíku a prekurzor pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a bílkovin².

Ačkoli je tyramin nepostradatelný pro zajištění řady velmi důležitých životních funkcí, může konzumace potravin obsahující vysoké koncentrace této látky vyvolat toxický účinek, nejčastěji vazomotorní, konkrétně vazokonstrikční³. Toxické dávky tyraminu je obtížné stanovit, velmi totiž záleží na individuálních rozdílech mezi lidmi a na přítomnosti různých biogenních aminů v potravine (potenciace). Pro tyramin je toxická dávka asi 20–80 mg kg⁻¹ potravin.

Zatím v žádné zemi neurčuje legislativa výrobce deklarovat obsah tyraminu na obalu. Takovýto údaj by jistě ocenili především jedinci trpící migrénami, dietologové a alergici. Pro výrobce by však tato povinnost byla značně obtížná, což vyplývá z velkého kolísání obsahu tyraminu v rámci určitého druhu potravin. Výzkum proto vyvíjí nejen metody pro stanovení tyraminu v potravinách, ale i jednoduché, rychlé a levné metody pro odhalení příčin jeho produkce.



Obr. 1. Tyramin (*p*-hydroxyfenylethylamin)

Experimentální část

Bakteriální kmeny

Bakteriální buňky *Enterococcus faecalis* CNRZ 238 (cit.⁴) byly kultivovány na médiu s kanamycinem, eskulínem a azidem sodným (Merck, Německo) při 37 °C. Kultura byla použita jako pozitivní kontrola pro PCR a pro kultivaci v decaboxylačním médiu s tyrosinem i jako pozitivní kontrola pro HPLC analýzu.

Startovací kultury určené pro výrobu fermentovaných tepelně neopracovaných trvanlivých salámů (BioCarna, Německo) byly kultivovány na PCA, MRS a M17 agaru

Tabulka I

Použité startovací kultury pro výrobu fermentovaných tepelně neopracovaných masných výrobků, výrobce BioCarna

Označení startovací kultury výrobcem	Složení startovacích kultur (bakteriální druhy)	Detekce DNA sekvencí pro tyrosindekarboxylasu	HPLC detekce tyraminu [mg l ⁻¹ média]
PPX	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	– ^a –	– ^c –
SG1	<i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Streptomyces griseus</i>	– –	– –
SC1	<i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Lactobacillus curvatus</i>	– + ^b	– 0,45 ± 0,01
PLS	<i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	– – –	– – –
CXK	<i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Lactobacillus sakei</i>	– – +	– – 0,40 ± 0,01
PPLX	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	– – –	– – –
LG1	<i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Streptomyces griseus</i>	– – –	– – –

^a Sekvence nedetegována, ^b sekvence detegována, ^c tyramin nedetegován

(Merck, Německo). Pro rozlišení a identifikaci jednotlivých mikrobiálních druhů byly použity komerční API testy (Biomérieux, Francie), katalasa test a Gramovo barvení. Složení použitých startovacích kultur je uvedeno v tabulce I.

Izolace DNA a PCR screening

Lyze buněk, izolace DNA z bakteriálních kultur, její purifikace a způsob kontroly koncentrace a čistoty byly provedeny dle autorů^{5,6}. Pro amplifikaci specifické DNA sekvence kódující bakteriální tyrosindekarboxylasu byla použita dvojice specifických oligonukleotidových primerů TD2/TD5 (cit.⁷). Gen pro tyrosindekarboxylasu byl amplifikován pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR byla provedena v termocykleru PTC 130 (MJ Research, Waltham, MA, USA) v celkovém objemu 25 µl a obsahovala 10 ng purifikované DNA, 10 pmol každého primeru TD2/TD5, 1 U HotStar Taq DNA polymerasy a příslušné množství optimalizované směsi specifických komponent pro PCR (HotStar Master Mix, Qiagen, Hilden, Německo). Templátové DNA byly nejprve denaturovány inkubací při 95 °C 15 min. DNA byla amplifikována ve 30 cyklech (denaturace při 95 °C 45 s, hybridizace primerů při 52 °C po dobu 45 s a syntéza komplementárního DNA řetězce při 72 °C 75 s). V posledním amplifikačním cyklu byla teplota 72 °C prodloužena na 10 min, a to pro

kompletní syntetizování finálního PCR produktu. PCR produkty byly vizualizovány pomocí agarosové gelové elektroforézy na přístroji Easy, model B1 (Owl Scientific, USA) a vizualizovány na UV transluminátoru (EB-20E Ultralum, USA) po barvení ethidium bromidem (0,5 µg ml⁻¹). Jako pozitivní kontrola PCR byla použita DNA purifikovaná z buněk *Enterococcus faecalis* CNRZ 238, jako negativní kontrola PCR byly použity komponenty PCR bez DNA.

Stanovení tyraminu

Bakteriální kmeny byly kultivovány v dekarboxylačním médiu⁸ s tyrosinem (10 g l⁻¹ média) při 37 °C 48 h. Mikrobiální produkce tyraminu byla potvrzena analýzou HPLC a vzorky byly připraveny modifikovanou metodou⁹. Kultivační média byla po kultivaci centrifugována při 3000 otáčkách/min po dobu 10 min a při teplotě 4 °C na centrifuze Hettich Universal 32R, Německo. Supernatant (1 ml) byl smíchán s 1 ml 0,1 M kyseliny chlorovodíkové a 20 µl interního standardu 1,7-diaminoheptanu (Sigma-Aldrich, Německo). Směs byla promíchána (MS2 Minishaker, IKA Werke, Germany) a znovu centrifugována. Supernatant byl filtrován přes 0,45 µm nylonovou membránu. Filtrát byl derivatizován *o*-ftalaldehydem v borátovém pufru (pH 9,5) (Sigma-Aldrich, Německo) za přítomnosti 2-sulfonylethan-1-olu (Merck, Německo). Stej-

ným způsobem byl zpracován i standard tyraminu (Sigma-Aldrich, Německo).

Vzorky byly podrobeny chromatografické analýze použitím Agilent HP 1100 systému (Agilent, Německo), který byl složen z vakuové odplynovací jednotky (G1322A), kvartérní pumpy (G1311A), automatického dávkovače (G1313A) a fluorescenčního detektoru (G1321A). Pro analýzu byla dále použita Zorbax XDB C8 kolona (4,6 × 150 mm, velikost částic 5 μm) s předkolonou Meta Guard Inertsil C18 (4,6 × 30 μm, velikost částic 5 μm) a metoda vyvinutá v naší laboratoři⁹. Ke gradientové eluci tyraminu byla použita mobilní fáze složená z 0,1 M acetátového pufru, A (pH 5,8) a acetonitrilu, ACN (Merck, Německo) (čas 0–27 min: A 60–23 %, ACN 40–77 %) při průtokové rychlosti 0,6 ml min⁻¹.

Kvalitativně byl tyramin ve vzorcích stanoven porovnáním retenčních časů jednotlivých vzorků a retenčního času standardu. Kvantitativní zastoupení tyraminu bylo vypočteno z plochy specifického píku a využitím kalibrační křivky.

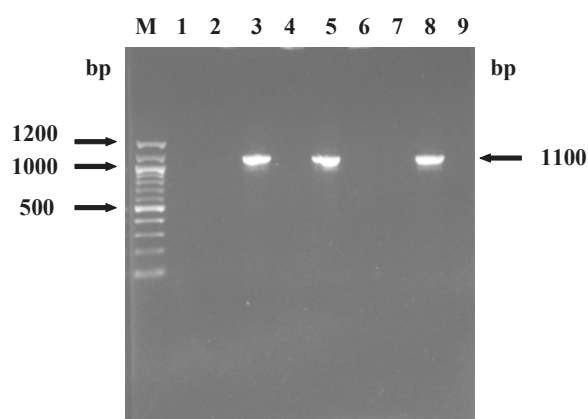
Výsledky a diskuse

Většina odborníků se domnívá, že startovací kultury mohou zvýšit obsah biogenních aminů ve finálním výrobku. Z hlediska prevence vzniku biogenních aminů v potravinách je tedy nutné volit takové mikroorganismy, které netvoří biogenní aminy. Zároveň by startovací kultura měla být schopná potlačit konkurenční mikroflóru tvořící biogenní aminy^{10,11}. Pro odhalení potenciálních producentů biogenních aminů musí být definovány vhodné skriningové metody. V této práci byla optimalizována metoda pro typizaci mikroorganismů produkujících tyramin. Tato metoda může být použita nejen pro skrining startovacích kultur používaných pro výrobu fermentovaných potravin, ale i pro odhalení jakýchkoli jiných mikroorganismů tvořících tyramin, např. z řad kontaminujících a doprovodných mikroflóry.

Při nepřímé detekci biogenního aminu tyraminu byly využity metody molekulární biologie v kombinaci s analytickými metodami. Specifita polymerázové řetězové reakce (PCR) pro detekci specifické sekvence genu pro tyrosindecaboxylasu byla ověřena použitím purifikované DNA buněk *Enterococcus faecalis* CNRZ 238, u nichž byla prokázána⁷ produkce tyrosindecaboxylasy. V reakci byl amplifikován PCR produkt o předpokládané velikosti (1100 bp).

Po ověření specifity a funkčnosti byla PCR použita pro skrining startovacích kultur používaných pro výrobu fermentovaných tepelně neopracovaných trvanlivých salámů. Přehled analyzovaných startovacích kultur uvádí tabulka I.

Z čistých kultur jednotlivých bakteriálních druhů byla izolována a purifikována DNA, která byla použita jako DNA matrice (10 ng) pro PCR na detekci genu pro tyrosindecaboxylasu. Postup detekce genu pro tyrosindecar-



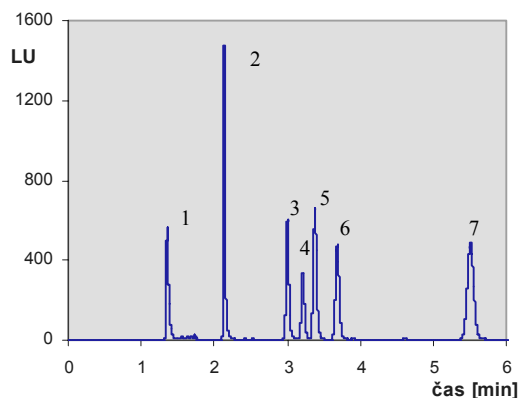
Obr. 2. PCR detekce *tyrDC* pozitivních startovacích kultur; M: 100 bp ladder (New England Biolabs), běh č. 1–7: startovací kultury (sestupné pořadí tab. I), běh č. 8: pozitivní kontrola – *E. faecalis* CNRZ 238, běh č. 9: negativní kontrola (komponenty PCR bez DNA)

boxylasu byl stejný jako u kontrolního kmene. Specifické PCR produkty byly amplifikovány s použitím DNA bakterií druhu *Lactobacillus sake* a *Lactobacillus curvatus*. Přítomnost specifických PCR produktů v těchto kulturách je uvedena na obr. 2.

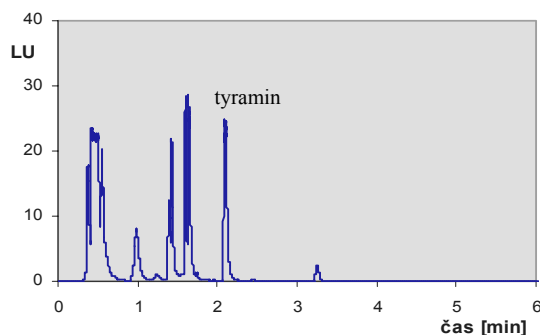
Expresí specifické sekvence DNA byla ověřena analytickým stanovením produktu exprese této sekvence – tyraminu, a to v médiu s přesně definovaným množstvím aminokyseliny tyrosinu (10 g l⁻¹ média). Kvalitativně a kvantitativně byl tyramin stanoven metodou vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC).

V obou vzorcích médií po kultivaci prověřovaných bakteriálních kultur byla potvrzena přítomnost tyraminu. Vzhledem ke skutečnosti, že detekční limit tyraminu je 2,90 ± 0,01 ng ml⁻¹, lze s jistotou prohlásit, že u sledovaných kultur došlo při kultivaci v médiu s tyrosinem k expresi sledovaného genu, tedy k produkci bakteriální tyrosindecaboxylasy. Stanovená množství tyraminu se vzájemně podstatně nelišila (0,40 ± 0,01 mg l⁻¹ média pro *Lactobacillus sake* a 0,45 ± 0,01 mg l⁻¹ média pro *Lactobacillus curvatus*). To však může být ovlivněno standardním složením kultivačního média, konkrétně uniformní dostupností substrátu. Je známo, že se decarboxylasová aktivita mikroorganismů může značně lišit. V rámci určitého mikrobiálního druhu dokonce existují kmeny, které se mohou touto aktivitou lišit až o tři řády¹². V této práci uvedená hypotéza potvrzena nebyla.

Startovací kultury obsahující blíže nespecifikované kmeny dvou bakteriálních druhů *Lactobacillus sake* a *Lactobacillus curvatus* byly identifikovány jako potenciální producenti tyrosindecaboxylasy a mohou se ve fermentovaných trvanlivých salámech účastnit tvorby biogenního aminu tyraminu.



Obr. 3. Chromatogram standardu biogenních aminů ($c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$); 1: histamin, 2: tyramin, 3: tryptamin, 4: putrescin, 5: 2-fenylethylamin, 6: kadaverin, 7: 1,7-diaminoheptan; LU – luminiscence



Obr. 4. Chromatogram vzorku živné půdy s pozitivním nálezem tyraminu; LU – luminiscence

Vzhledem k ochraně konzumenta před nežádoucími vlastnostmi tyraminu, který mohou za vhodných podmínek startovací kultury SC1 a CXK (tabulka I) obsahující druhy *Lactobacillus sake* a *Lactobacillus curvatus* tvořit, je třeba použití těchto startovacích bakteriálních kultur pro výrobu potravin důkladně zvážit.

LITERATURA

1. Komprda T.: Veterinářství 10, 646 (2005).
2. Davídek J.: *Natural Toxic Compounds of Foods*. CRC Press, Boca Raton 1995.

3. Velíšek J.: *Chemie potravin 1*. OSSIS, Tábor 1999.
4. Coton E., Coton M.: J. Microbiol. Methods. 63, 296 (2005).
5. Sambrook J., MacCallum P., Russell D.: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York 2001.
6. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K.: *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates a Wiley-Interscience, New York 1994.
7. Coton M., Coton E., Lucas P., Lonvaud A.: Food Microbiol. 21, 125 (2004).
8. Bover-Cid S., Holzapfel W. H.: Int. J. Food Microbiol. 53, 33 (1999).
9. Komprda T., Smělá D., Pechová P., Kalhotka L., Štencl J., Klejdus B.: Meat Science 67, 607 (2004).
10. Hammes W. P., Hertel C.: Lait 76, 159 (1996).
11. Rice S. L., Koehler P. E.: J. Milk Food Technol. 38, 256 (1976).
12. Kalač P., Křížek M., Pelikánová T., Langová M., Veškrna O.: Food Chemistry 90, 561 (2005).

R. Burdychová and V. Dohnal (Department of Food Technology, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, Czech Republic): The Use of HPLC for Determination of Expression Product of Microbial Tyrosine Decarboxylase

The aim of this study was verification of the presence or absence of specific DNA sequences coding for tyrosine decarboxylase in the starter cultures used in the fermented sausages production and confirmation of the tyrosine decarboxylase gene expression by rapid HPLC analysis affording the expression product – tyramine.

Genomic DNA from microorganisms used as starter cultures for production of fermented sausages was extracted with phenol. The DNA was used as a template for PCR identification in which a set of oligonucleotide primers based on tyrosine decarboxylase gene sequence was used. Two strains with high tyrosine decarboxylase activity were detected (*Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake*). The tyrosine decarboxylase gene expression of these two strains was analyzed by an optimized rapid HPLC method, which confirmed the presence of high concentrations of tyramine. The results show suitability of the described PCR and HPLC methods of screening starter cultures for the presence and expression of the above gene.