

Stanovení dekarboxylázové aktivity bakterií pomocí kultivační metody

Biogenní aminy (BA) představují skupinu nízkomolekulárních dusíkatých sloučenin, které mají významné fyziologické a toxické účinky. Tyto látky se tvoří a zase rozkládají během obvyklých metabolických procesů v živých buňkách. Mohou také vznikat z aminokyselin působením bakteriálních dekarboxyláz, takže mohou být obsaženy ve všech produktech, připravovaných fermentačními postupy nebo vystavených během výroby nebo skladování mikrobiální kontaminaci. Proto relativně vysoké hodnoty obsahu některých biogenních aminů mohou sloužit i jako indikátor zhoršení výrobního nebo skladovacího procesu či nedodržení předepsaného technologického postupu výroby. Nejběžnější BA vyskytující se v potravinách jsou histamin, tyramin, kadaverin, spermin, spermidin, putrescin, 2-fenyletylamin a tryptamin. Histamin vzniká dekarboxylací histidinu, kadaverin z lyzinu, 2-fenyletylamin z fenylalaninu, tyramin z tyrozinu a tryptamin z tryptofanu. Dekarboxylací argininu vzniká agmatin a ornitin a dekarboxylací ornitinu vzniká putrescin. Z putrescinu vzniká metylací S-adenosylmetioninem spermidin a dále spermin.

Řada bakteriálních druhů včetně bakterií mléčného kvašení jsou schopny dekarboxylace jedné či více aminokyselin. Jedná se zejména o rody *Bacillus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* a *Photobacterium*. Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou častými producenty BA zejména ve fermentovaných potravinách, kde jsou BMK přidávány obvykle ve formě startérových kultur. Dekarboxylázová aktivita byla prokázána především u rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* a *Bifidobacterium*.

Kultivační metody poskytují prvotní skrining. Výhodami těchto metod je nenáročnost a rychlost provedení. Nevýhodou pak falešně pozitivní výsledky. Screeningové metody využívají specifického média, které obsahuje pH indikátor, jako je např. bromkresolová violet. Mezi základní složky média patří: pepton, sůl nebo glukóza, kvasničný nebo hovězí extrakt. Do média jsou také přidávány prekurzory aminokyselin. Pozitivní výsledek je indikován změnou barvy média na fialovou. Naopak při negativní reakci se barva média nemění.

Úkol 1 – Stanovení dekarboxylázové aktivity bakterií kultivační metodou

Testované mikroorganismy: *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus epidermis*.

Postup:

- Do každé jamky mikrotitrační destičky napipetujte 150 µl dekarboxylačního média obohaceného o příslušnou aminokyselinu a 5 µl 24 hodinové suspenze daného mikroorganismu (viz Tab. 1).
- Poté všechny jamky zakápněte parafinovým olejem pro vytvoření anaerobního prostředí (štěpení aminokyselin je anaerobní proces).
- Destičky vložte do sáčku a nechte kultivovat při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin.

Tab. 1 – Schéma rozmístění jednotlivých komponent v mikrotitrační destičce

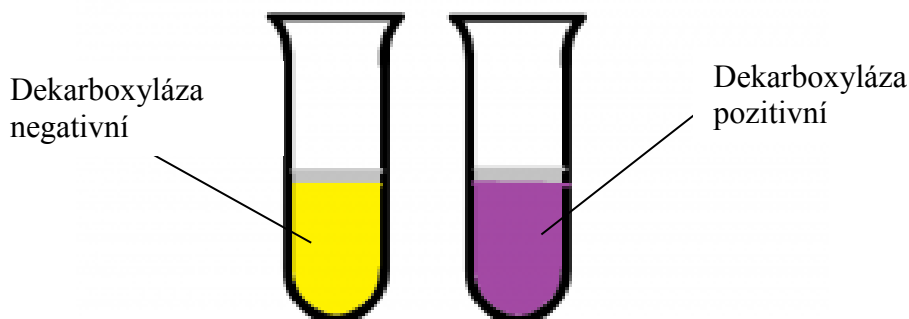
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	HISTIDIN		LYZIN		FENYLALANIN		ORNITIN		TYROZIN		TRYPTOFAN	
A	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
D	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
E	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
F	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
H	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

Legenda: NK – Negativní kontrola (čistě dekarboxylační médium),

- 1 – *Enterococcus faecium*,
- 2 – *Leuconostoc mesenteroides*,
- 3 – *Streptococcus thermophilus*,
- 4 – *Lactobacillus curvatus*,
- 5 – *Lactobacillus plantarum*,
- 6 – *Lactococcus lactis*,
- 7 – *Staphylococcus epidermis*.

Hodnocení:

Dekarboxylací AMK dochází k alkalizaci média a změně barvy média ze žluté na fialovou (Obr. 1).



Obr. 1 - Dekarboxylace aminokyselin

•).