

Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů u bakterií rodu *Bifidobacterium*

Bc. Zuzana Svobodová

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zuzana Svobodová**
Osobní číslo: **T11135**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů u bakterií rodu Bifidobacterium**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika bakterií rodu Bifidobacterium.
2. Produkce biogenních aminů bakteriemi rodu Bifidobacterium.
3. Detekce genů pro produkci biogenních aminů.

II. Praktická část

1. Stanovení přítomnosti genů pro produkci biogenních aminů metodou PCR.
2. Chromatografické stanovení biogenních aminů.
3. Vyhodnocení výsledků PCR a chromatografického stanovení biogenních aminů.
4. Diskuse získaných výsledků a formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] ŠMARDA, J. a kol. **Metody molekulární biologie**. 1. vydání. Masarykova univerzita, 2008. ISBN 978-80-210-3841-7.

[2] SILLA SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 213-231. 1996.

[3] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L. and HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Technol.* 5: 42-49. 1994.

[4] LANDETE, J. M., RIVAS, B., MARCOBAL, A. PCR methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on wine. *Ann Microbiol.* 61: 159-166. 2011.

[5] COSTANTINI, A., DORIA, F., VAUDANO, E., GARCIA-MORUNO, E. Chemical and molecular methods for the control of biogenic amine production by microorganisms. *Ann Microbiol.* 61: 173-178. 2011.

[6] COTON, M., ROMANO, A., SPANO, G. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology.* 27: 1078-1085. 2010.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

16. ledna 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2013

Ve Zlíně dne 4. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ŠVOBODOVÁ ZUZANA

Obor: THEVP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 2.5.2013

Švobodová Zuzana

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato práce byla zaměřena na prozkoumání dekarboxylasové aktivity probiotických bakterií. Dekarboxylasová aktivita kmenů rodu *Bifidobacterium* byla sledována za působení různých faktorů vnějšího prostředí (pH, NaCl a laktosa). Produkce biogenních aminů z aminokyselin (tyrosinu, ornitinu, argininu, lysinu) byla analyzována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Kmen *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 produkoval pouze tyramin a spermin. Kmen *B. animalis* subsp. *lactis* B25 produkoval tyramin, putrescin, kadaverin, spermin a spermidin. Produkce biogenních aminů byla specifická pro jednotlivé kmeny. Část práce byla věnována detekci genu pro produkci putrescinu u osmi kmenů rodu *Lactobacillus* pomocí metody PCR. U tří kmenů laktobacilů (*Lbc. curvatus* subsp. *curvatus* AI-2, *Lbc. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3, *Lbc. brevis* DEPE 24) byl detekován při použití primerů AgD1/AgD2 gen *aguA* kódující agmatin-deiminasu.

Klíčová slova: biogenní aminy, rod *Bifidobacterium*, faktory ovlivňující produkci biogenních aminů, HPLC, PCR, gen *aguA*

ABSTRACT

This work was focused on the exploration decarboxylase activity of probiotic bacteria. Decarboxylase activity of *Bifidobacterium* strains was tested. The effect of selected environmental factors (pH, NaCl and lactose) on the decarboxylase activity of bifidobacteria was monitored too. The production of biogenic amines from amino acids (tyrosine, ornithine, arginine, lysine) was analysed by high performance liquid chromatography. *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 produced only tyramine and spermine. *B. animalis* subsp. *lactis* B25 produced tyramine, putrescine, cadaverine, spermine and spermidine. Production of biogenic amines was specific to the individual strains. Some work has been focused on the detection of the gene for putrescine production in eight strains of the genus *Lactobacillus* using PCR. The *aguA* gene encoding agmatine deiminase was detected in three strains of lactobacilli (*Lbc. curvatus* subsp. *curvatus* AI-2, *Lbc. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3, *Lbc. brevis* DEPE 24).

Keywords: biogenic amines, *Bifidobacterium*, factors affecting the production of biogenic amines, HPLC, PCR, gen *aguA*

Touto formou bych chtěla poděkovat paní doc. RNDr. Leoně Buňkové PhD. a Mgr. Leoně Wunderlichové za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady, trpělivost a optimismus při řešení problémů souvisejících s touto prací. Ráda bych poděkovala také laborantkám paní Lence Machákové, paní Bc. Veronice Kučabové a paní Ing. Ludmile Zálešákové za jejich přívětivost, čas a ochotu.

Dále bych chtěla velmi poděkovat svým rodičům za jejich podporu a za to, že mi umožnili dostudovat.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ	13
1.1 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ.....	14
1.2 FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM	15
1.3 TOXICKÉ ÚČINKY.....	16
1.4 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH	17
1.5 VYUŽITÍ CHROMATOGRÁFICKÝCH METOD PRO STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	18
1.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	18
2 FAKTORY PŮSOBÍCÍ NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ	21
2.1 STARTOVACÍ KULTURY	21
2.2 VLIV PH	22
2.3 PŘÍTOMNOST ZKVASITELNÝCH SACHARIDŮ	22
2.4 VLIV TEPLoty	23
2.5 PŮSOBENÍ KONZERVAČNÍCH A PŘÍDATNÝCH LÁTEK.....	23
2.6 DALŠÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ HLADINU BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH.....	24
3 PROBIOTICKÉ BAKTERIE RODU BIFIDOBACTERIUM	25
3.1 OBECNÝ POPIS PROBIOTIK	25
3.1.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	26
3.2 CHARAKTERISTIKA RODU <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	26
3.2.1 Morfologie a cytologie	27
3.2.2 Fyziologické vlastnosti.....	28
3.2.3 Biochemické vlastnosti	28
3.2.4 Taxonomické zařazení	29
3.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST BIFIDOBAKTERIÍ JAKO PROBIOTIK	30
4 DETEKCE GENŮ PRO PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ	32
4.1 METODA PCR	32
4.1.1 Faktory ovlivňující průběh PCR	34
4.2 DETEKCE VÝSLEDKU PCR POMOCÍ ELEKTROFORÉZY.....	35
4.3 SEKVENCOVÁNÍ AMPLIFIKOVANÝCH FRAGMENTŮ DNA.....	36
II PRAKTICKÁ ČÁST	37
5 CÍL PRÁCE	38
6 MATERIÁL A METODIKA	39

6.1	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	39
6.1.1	Materiál použitý pro chromatografické stanovení.....	39
6.1.1.1	Bakteriální kultura	39
6.1.1.2	Kultivační média.....	39
6.1.1.3	Činidla využívaná při derivatizaci	40
6.1.2	Systém HPLC	41
6.1.3	Pracovní postup chromatografického stanovení.....	42
6.1.3.1	Stanovení produkce biogenních aminů kmenem <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM239 při rozdílném složení kultivačního média	42
6.1.3.2	Stanovení produkce biogenních aminů kmenem <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> B25 při rozdílném složení kultivačního média a odlišném pH	42
6.1.3.3	Derivatizace a analýza vzorků pomocí kapalinové chromatografie	43
6.2	STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI GENŮ PRO PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ METODOU PCR.....	44
6.2.1	Materiál použitý pro PCR a následnou detekci pomocí elektroforézy.....	44
6.2.1.1	Bakteriální kultury	44
6.2.1.2	Kultivační média.....	44
6.2.1.3	Chemikálie pro izolaci DNA	44
6.2.1.4	Chemikálie pro PCR	45
6.2.1.5	Chemikálie pro elektroforézu	46
6.2.2	Izolace DNA.....	47
6.2.2.1	Izolace DNA z bakterií pomocí izolačních kitů.....	47
6.2.2.2	Příprava hrubého lyzátu bakteriální kultury.....	50
6.2.3	Vlastní provedení PCR.....	52
6.2.3.1	Základní rozpis směsi pro PCR (master mix).....	52
6.2.3.2	Program pro PCR.....	52
6.2.4	Elektroforéza a detekce DNA.....	53
6.2.4.1	Elektroforéza izolované DNA.....	53
6.2.4.2	Elektroforéza produktů PCR.....	53
6.3	PURIFIKACE DNA NA SEKVENACI.....	53
7	VÝSLEDKY	55
7.1	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ V ZÁVISLOSTI NA VNĚJŠÍCH PODMÍNKÁCH.....	55
7.2	MOŽNOSTI DETEKCE GENU ZODPOVĚDNÉHO ZA SCHOPNOST TVORBY PUTRESCINU U LAKTOBACILŮ	63
8	DISKUSE ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ	69
8.1	DISKUSE VÝSLEDKŮ CHROMATOGRAFICKÉHO STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	69
8.2	DISKUSE VÝSLEDKŮ DETEKCE GENU PRO PRODUKCI PUTRESCINU METODOU PCR	72
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	85
	SEZNAM OBRÁZKŮ	87
	SEZNAM TABULEK.....	89

SEZNAM PŘÍLOH.....	90
---------------------------	-----------

ÚVOD

Dekarboxylasová aktivita bakterií vyskytujících se ve fermentovaných potravinách je aktuálním a často diskutovaným tématem. Problematikou produkce biogenních aminů startérovými kulturami a izolací bakterií s dekarboxylasovou aktivitou z fermentovaných výrobků se zabývá již mnoho studií. Řada z nich je zaměřena na optimalizaci a vývoj metod pro detekci biogenních aminů. Důvodem je negativní vliv vyšších koncentrací biogenních aminů na lidský organismus. Dekarboxylasová aktivita bakterií je ovšem kmenově specifická a navíc je do jisté míry ovlivněna působením vnějších faktorů. Tato diplomová práce je zaměřena na problematiku produkce biogenních aminů probiotickými bakteriemi, neboť této oblasti nebyla doposud věnována odpovídající pozornost.

Teoretická část zahrnuje charakteristiku biogenních aminů a popis vnějších faktorů (pH, teplota, přítomnost sacharidů, působení konzervačních a přídatných látek atd.) působících na jejich produkci. Zabývá se popisem probiotických bakterií, především bakterií rodu *Bifidobacterium* a pojednává o využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie k detekci biogenních aminů. Dále je v teoretické části popsán princip metody PCR a možnost využití této metody pro stanovení potenciálu bakterií pro tvorbu biogenních aminů.

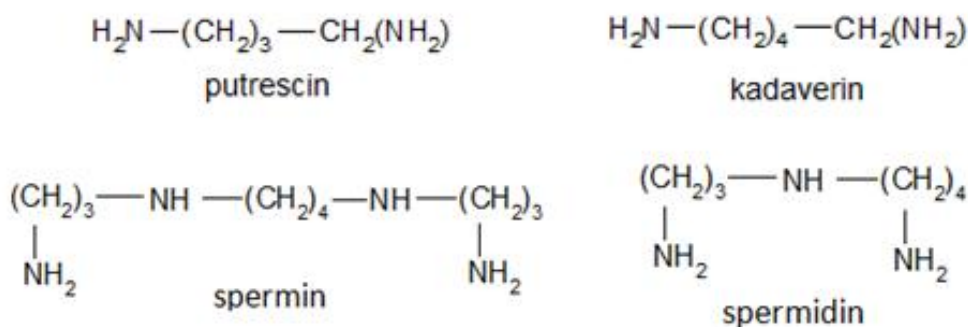
Praktická část diplomové práce je rozdělena do dvou částí. První část je zaměřena na stanovení závislosti produkce biogenních aminů bifidobakteriemi na působení vnějších faktorů (pH, koncentrace soli a laktosy). U bakterií rodu *Bifidobacterium* byla zkoumána jejich schopnost dekarboxylace aminokyselin lysinu, ornitinu, argininu a tyrosinu. Druhá část je věnována detekci genu zodpovědného za schopnost tvorby putrescinu bakteriemi rodu *Lactobacillus* pomocí metody PCR.

I. TEORETICKÁ ČÁST

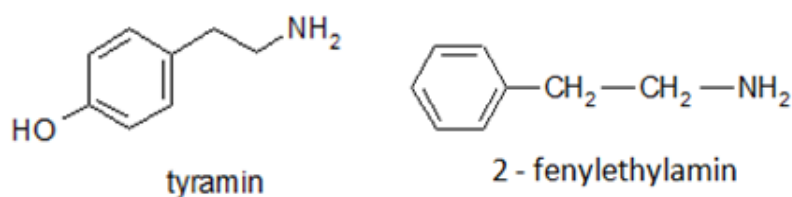
1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ

Biogenní aminy (BA) jsou organické dusíkaté sloučeniny s nízkou molekulární hmotností. Tyto bazické sloučeniny vznikají převážně dekarboxylací aminokyselin, případně také aminací a transaminací aldehydů a ketonů. BA jsou syntetizovány v mikrobiálním, rostlinném i živočišném metabolismu. V potravinách jsou vytvářeny pomocí enzymů s původem v surovině nebo mikroorganismy s dekarboxylasovou aktivitou. Dle chemické struktury lze BA rozdělit do skupin [1]:

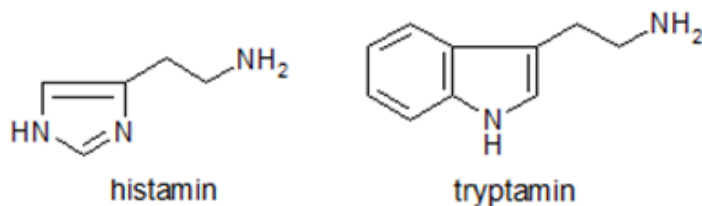
- alifatické (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin) (Obr. 1),
- aromatické (tyramin, fenylethylamin) (Obr. 2),
- heterocyklické (histamin, tryptamin) (Obr. 3) [1].



Obr. 1: Alifatické biogenní aminy [2]



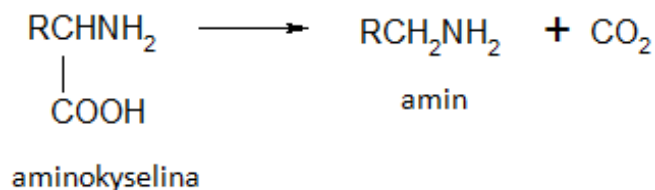
Obr. 2: Aromatické biogenní aminy [2]



Obr. 3: Heterocyklické biogenní aminy [2]

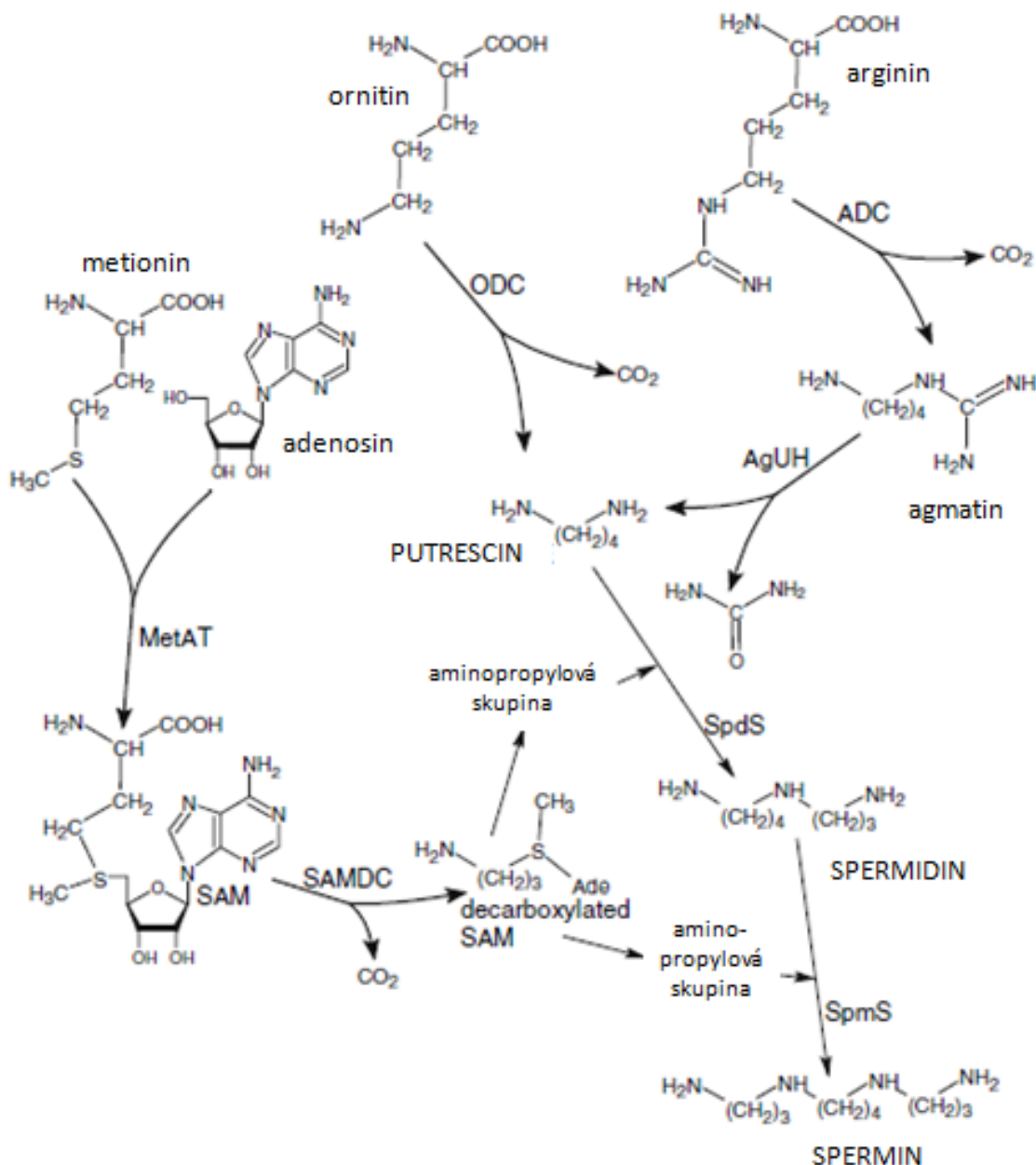
1.1 Vznik biogenních aminů

Z aminokyselin (AMK) vznikají BA působením dekarboxylas obsahujících pyridoxalfosfát jako kofaktor (Obr. 4) nebo z AMK a karbonylových sloučenin působením enzymů transaminas. V průběhu transformace na další biologicky aktivní produkty se pak uplatňují některé oxygenasy a metyltransferasy [2].



Obr. 4: Obecné schéma vzniku aminů [3]

Dekarboxylasy mají různou substrátovou specifíčnost. Produkty dekarboxylace jsou převážně fyziologicky velmi účinné látky [4]. Produktem dekarboxylace histidinu pomocí histidindekarboxylasy je histamin. Z aminokyseliny lysinu vzniká působením lysindekarboxylasy kadaverin (1,5-diaminopentan). Agmatin je produktem dekarboxylace argininu (arginindekarboxylasou) a následně může být přetvářen na putrescin (1,4-diaminobutan), který je zároveň přímým produktem dekarboxylace ornitinu (ornitindekarboxylasou). Ornitin vzniká z argininu působením arginasy. Metylací putrescinu S-adenosylmetioninem vzniká spermidin a dále spermin [2]. Putrescin, spermidin, a spermin jsou v současné době zařazeny do skupiny polyaminů, protože obsahují dvě a více aminoskupin a mohou být tvořeny i alternativními metabolickými cestami (Obr. 5) [5]. Fenylyalanin je činností fenylyalanindekarboxylasy přetvářen na 2-fenyletylamin. Z tyrosinu působením tyrosindekarboxylasy vzniká tyramin a jeho následnou oxidací oktopamin. Produktem dekarboxylace tryptofanu (tryptofandekarboxylasou) je tryptamin, z něhož je vytvářen hormon serotonin a dále pak hormon melatonin [2].



Obr. 5: Vznik polyaminů biosyntetickými drahami bakterií [5]

Pozn.: SAM S-adenosylmetionin, ODC ornitin-dekarboxylasa, ADC arginin-dekarboxylasa, AgUH agmatin-ureohydrolasa (agmatinasa), SPDS spermidin-syntasa, SPMS spermin-syntasa, MetAT metionin-adenosyltransferasa, SAMDC S-adenosylmetionin-dekarboxylasa [5].

1.2 Fyziologický význam

Produkty dekarboxylace aminokyselin patří k přirozeným antinutričním faktorům, hygienicky významným ve výživě. V malých množstvích jsou však v organismu potřebné

pro řadu funkcí [6]. Kromě biologického využití biogenních aminů jako zdrojů dusíku se podílejí na řadě jiných významných funkcí, jako je např. regulace nukleových kyselin, syntéza bílkovin, stabilizace membrán, využití k výstavbě koenzymů, vitaminů atd. [2, 7]. Některé biogenní aminy fungují také jako tkáňové hormony (histamin) nebo jsou stavebními látkami podílejícími se na syntéze dalších hormonů živočichů (fenyletylamin), či fytohormonů rostlin. Určité třídy aminů (katecholaminy, indolaminy a histamin) plní v lidském organismu důležité metabolické funkce v nervovém systému a při regulaci krevního tlaku. Fenyletylamin spolu s tyraminem způsobuje zvýšení krevního tlaku a histamin pak krevní tlak snižuje. Histamin slouží také jako mediátor spouštějící příznaky alergické reakce a podílí se na sekreci kyseliny chlorovodíkové v žaludku. Tyramin má pak vliv na kontrakce hladkého svalstva a je prekurzorem dopaminu, který je významným neurotransmiterem, jehož nedostatek v mozku může vyvolávat Parkinsonovu chorobu. Kadaverin spolu s putrescinem a agmatinem stabilizuje nukleové kyseliny a subcelulární struktury (ribosomy) [2, 8]. Polyaminy (putrescin, spermin a spermidin) jsou nezbytné pro udržení normálně fungující metabolické aktivity a imunitní systém střev [1]. Vzhledem k intenzivním účinkům biogenních aminů musí být jejich hladina citlivě regulována [8].

1.3 Toxické účinky

Biogenní aminy se jako běžné produkty metabolismu vyskytují téměř ve všech potravinách obsahujících bílkoviny nebo volné AMK, pokud tyto potraviny vytvářejí prostředí pro mikrobiální nebo biochemickou aktivitu [1, 2]. Vysoké koncentrace BA ovšem mohou působit na organismus toxicky [9]. Při působení vysokých koncentrací na organismus se BA projevují jako látky vasoaktivní (přímo nebo nepřímo působí na vaskulární systém) a psychoaktivní. Příznaky působení vysokých dávek biogenních aminů jsou například zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypertense nebo hypotense a migrény [2]. Toxikologicky nejvýznamnějšími BA jsou tyramin a histamin. Tyramin je silně vasoaktivní látka, jeho vyšší hladina v organismu může vést k hypertensi, migrénám a případně i vyvolat krvácení do mozku a srdečního selhání. Histamin, který je také vasoaktivní, může způsobit kopřivku, hypotensi, bolest hlavy, návaly a křeče v břiše [5]. Putrescin a kadaverin jsou méně účinné než histamin a tyramin. Významnou otázkou je však působení putrescinu a kadaverinu v souvislosti se zvýšením toxicity ostatních aminů, zejména histaminu [10]. Toxicita polyaminů pak spočívá v jejich schopnosti tvořit stabilní karcinogenní N-nitrososloučeniny

a zvyšovat tak nárůst nádorových buněk ve střevě. Z tohoto důvodu je nanejvýš důležitá kontrola obsahu polyaminů ve stravě přijímané pacienty s onkologickým nálezem [5].

Je velmi obtížné stanovit toxickou dávku biogenních aminů, protože závisí na individuální charakteristice a přítomnosti jiných aminů. Pro histamin byl navržen horní limit 100 mg/kg potravin a 2 mg/l alkoholu [5]. Intoxikace histaminem se projevuje v inkubační době v rozmezí od několika minut až po několik hodin a příznaky jsou obvykle patrné po dobu několika hodin. U zdravých jedinců nebyly pozorovány zdravotní komplikace při podání množství histaminu 25 až 50 mg [10]. Pro tyramin byly jako toxické dávky určeny hodnoty v rozmezí 100 až 800 mg / kg potravin a pro fenyletylamin pak 30 mg / kg potravin [11]. Žádné nežádoucí účinky na zdraví nebyly pozorovány u zdravých jedinců ještě při dávce tyraminu 600 mg [10]. Klinické příznaky intoxikace tyraminem, tryptaminem a fenyletylaminem se objevují zhruba po 30 minutách nebo po několika hodinách a obvykle vymizí během několika hodin. Toxický účinek biogenních aminů je silně ovlivněn aktivitou enzymů monoaminoxidasy a diaminoxidasy, které je v organismu odbourávají [2]. Tyto enzymy oxidující BA se nacházejí ve střevech, játrech, ledvinách, plicích a dalších orgánech [12]. Jejich aktivita je různá u jednotlivců a závisí na řadě faktorů (např. přítomnost inhibitorů nebo potenciátorů). V případě vysokých koncentrací BA však tento enzymový systém selhává a není již schopen působení biogenních aminů eliminovat [2]. Detoxikační mechanismy jsou nedostačující také v případě citlivých jedinců se sklony k alergiím nebo při současné konzumaci alkoholu. Jako inhibitory aminooxidas působí některé léky, jako jsou antibiotika, antidepresiva, tuberkulostatika a léky proti Parkinsonově chorobě. Tyto látky brzdí detoxikační proces ve střevech a způsobují zvýšení resorpce biogenních aminů i při příjmu malých dávek aminů v potravině [5, 12].

1.4 Výskyt biogenních aminů v potravinách

Vyšší množství biogenních aminů se vyskytují především ve fermentovaných potravinách, jako jsou mléčné výrobky, fermentované salámy, pivo, víno či kysané zelí, kde vznikají činností mikroorganismů. Vysoký výskyt BA je samozřejmě u potravin v pokročilém stadiu kažení [2]. Obecně se nejčastěji ze všech BA vyskytuje ve fermentovaných výrobcích putrescin [10].

V rybách, mase, masných výrobcích a sýrech je přítomen převážně histamin, kadaverin, putrescin a tyramin. U ryb vznikají biogenní aminy během skladování působením kontami-

nující mikroflóry. V čerstvém rybím mase je obsah biogenních aminů nízký. Při nevhodném skladování za vyšších teplot se však například koncentrace histaminu může zvýšit až na hodnoty 8000 mg/kg suroviny. Současně vznikají v relativně vysokém množství i ostatní biogenní aminy [2]. Ryby (tuňák a makrela) se řadí mezi potraviny, které jsou nejčastěji spojovány s otravami histaminem. Dále jsou za původce intoxikace histaminem považovány sýry, a to sýry vyrobené z pasterovaného i nepasterovaného mléka. Vyšší koncentrace histaminu byly zaznamenány také v kuřecím mase a kysaném zelí [10].

U fermentovaných výrobků je největší nárůst obsahu BA patrný v počátečních fázích výroby a závisí na typu přítomné mikroflóry. Na vzniku BA se mohou podílet jak startovací kultury, tak i mikroorganismy pocházející ze zpracovávané suroviny [2]. S otravami histaminem jsou nejčastěji spojovány sýry: Gouda, sýry švýcarského typu, Čedar, Gruyère a Cheshire [10]. Vyšší obsah BA byl stanoven například i u tvarůžků, brynzy a některých dalších měkkých zrajících sýrů [13]. Množství biogenních aminů je značně různorodé nejen mezi odlišnými druhy sýrů, ale i v rámci jednoho druhu. Koncentrace BA se dokonce liší i v různých vrstvách sýru. Vyšší obsah biogenních aminů bývá zpravidla detekován u sýrů vyrobených z nepasterovaného mléka [14].

V ovoci, zelenině a houbách jsou biogenní aminy produkovány při nevhodném skladování z větší části endogenními dekarboxylasami. Zde se jako hlavní biogenní amin vyskytuje tyramin [2].

1.5 Využití chromatografických metod pro stanovení biogenních aminů

Pro stanovení BA lze využít některé ze separačních technik, jako je tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie (GC) nebo kapilární elektroforéza. Nejčastěji využívanou metodou je vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC). Biogenní aminy lze stanovit také iontově výměnné chromatografie. Z důvodu citlivého stanovení fluorimetrickou detekcí je třeba aminy nejprve derivatizovat. V případě iontově výměnné chromatografie se uplatňuje derivatizace s OPA (o-ftaldialdehydem). Stále častěji je také využíváno spojení HPLC nebo GC s hmotnostní spektrometrií [9].

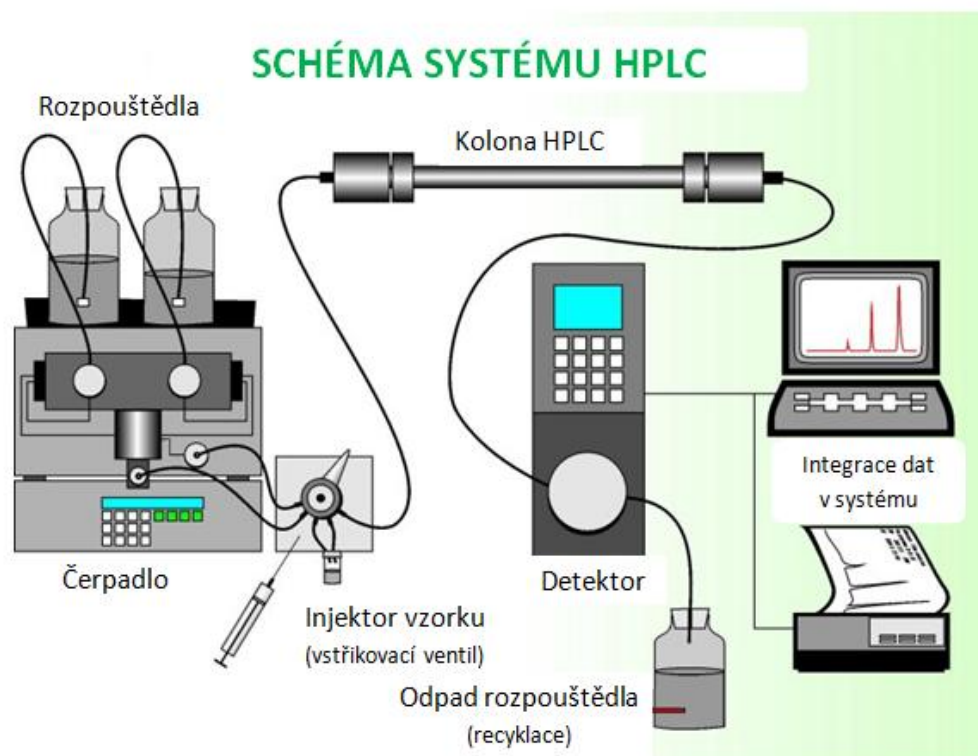
1.5.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační metoda založená na průchodu mobilní fáze obsahující směs složek skrz stacionární fázi, která se skládá z kolony naplněné pevnými částicemi.

ce. Mezi rozpuštěnými látkami a těmito dvěma fázemi dochází k působení fyzikálních a chemických sil, které jsou odpovědné za zachování rozpuštěných látek na chromatografické koloně [15]. Podle mechanismu interakce oddělované látky s pevným sorbentem je metoda HPLC rozdělována do čtyř aplikačních skupin, a to adsorpční chromatografie (LSC), iontově výměnná chromatografie (IEC) založená na disociaci slabých či silných elektrolytů, rozdělovací chromatografie (LLC) a gelová chromatografie (GPC) [16].

U vysokoúčinné kapalinové chromatografie je eluční činidlo (mobilní fáze) filtrováno a čerpáno z nádrže pod tlakem do chromatografické kolony. Směs rozpuštěných látek vstříkovaných v horní části sloupce je pak rozdělena při prostupu sloupcem na jednotlivé složky a ty jsou sledovány detektorem. Jejich výskyt a množství se zaznamenává zapisovačem. Hlavními součástmi vysoce účinného kapalinového chromatogramu jsou vysokotlaké čerpadlo, sloupec, systém vstřikovače a detektor (Obr. 7). U plynové chromatografie je dosaženo selektivity využitím řad sloupců s různými stacionárními fázemi. U HPLC je však počet sloupců omezen a selektivity je dosaženo různými variantami teplot kolony nebo složením mobilní fáze (např. přidáním organických rozpouštědel, jako je metanol nebo acetonitril) [17].

Pro stanovení biogenních aminů pomocí HPLC se používají různá derivatizační činidla (dansyl-chlorid, benzoyl-chlorid, o-ftalaldehyd (OPA), naftalen-2,3-dikarboxaldehyd, N-acetylcytein, 2-merkptoetanol). Pravděpodobně nejpoužívanější činidlem je dansylchlorid [10]. Při předkolonové derivatizaci dochází ke vzniku dansylderivátů biogenních aminů a ty jsou pak separovány v chromatografickém systému [18]. Pro detekci se nejčastěji využívá fluorescence, UV a elektrochemická detekce [10].



Obr. 6: Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie [19]

Metody založené na vysoce účinné kapalinové chromatografii (HPLC) jsou nyní jediné dostatečně spolehlivé a citlivé, schopné současné kvantifikace koncentrace všech BA ve fermentovaných potravinách. Tyto metody jsou pro analýzu fermentovaných potravin nejvhodnější. Bohužel ještě nebyly vyvinuty podrobné monitorovací systémy a metody vhodné ke sledování koncentrací BA ve fermentovaných potravinách během výrobního procesu, což by mohlo být použito, jako jeden z parametrů pro posouzení hygieny výrobního procesu. Testy na bázi HPLC mají detekční limit kolem 0,1 mg/kg. HPLC je uváděna jako referenční metoda pro histamin v nařízení (ES) č. 2073/2005 (mikrobiologická kritéria pro potraviny) a jelikož je vhodná pro kvantifikaci všech biogenních aminů, mohla by být časem zvolena hlavní analytickou metodou pro oficiální kontrolu BA [10, 20].

2 FAKTORY PŮSOBÍCÍ NA PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ

Vzhledem k tomu, že aminy jsou tvořeny aktivními enzymy v potravinách nebo dekarboxylasovou aktivitou bakterií, inhibicí takové činnosti a prevencí růstu bakterií by bylo možné regulovat obsah biogenních aminů v potravinách [1]. Proto byly zkoumány určité faktory, které působí na dekarboxylasovou aktivitu mikroorganismů a také na hromadění biogenních aminů v potravinách [21]. Množství a typ biogenních aminů vytvořený v potravině je silně ovlivněn vnitřními vlastnostmi potraviny, jako je pH, vodní aktivita, složení, mikroflóra a vnějšími parametry (doba a teplota), které umožňují růst bakterií při zpracování a skladování potraviny [10]. Nově vznikající metody se pak zaměřují na balení v ochranné atmosféře, ozařování, působení vysokého hydrostatického tlaku, mikrobiální modelování a přidávání konzervačních látek [22]. Pokud jsou biogenní aminy již přítomny v potravině, je jejich následné odstranění velmi obtížné. Teoreticky lze jejich koncentraci částečně snížit použitím diaminooxidas, ale v praxi se tato dekontaminace nevyužívá [2].

2.1 Startovací kultury

Startovací kultury mohou ovlivnit hladinu biogenních aminů v potravině dvěma způsoby. Prvním z nich je zvyšování množství volných aminokyselin jejich proteolytickou činností, což usnadňuje jejich dostupnost pro kontaminující bakterie s dekarboxylasovou aktivitou [23]. Minimalizací výskytu mikroorganismů schopných produkce BA může být dosaženo zajištěním dobrého hygienického stavu surovin a následnými dalšími mikrobiálními kontrolami [10]. Druhým způsobem je vlastní dekarboxylasová činnost startovacích kultur. Dekarboxylasová aktivita byla prokázána např. u některých kmenů *Lactobacillus helveticus* nebo *Lactococcus lactis* využívaných jako startovací kultury pro mléčné výrobky [23].

Bylo zjištěno, že některé bakterie (např. *E. coli*) se brání proti oxidačnímu stresu zvyšováním produkce putrescinu. Tento biogenní amin působí také jako ochranný faktor na DNA poškozenou reaktivními kyslíkovými radikály. Dále se předpokládá, že putrescin hraje roli při toleranci *E. coli* k osmotickému stresu. Z tohoto důvodu je možné, že i jiné bakterie vykazující dekarboxylasovou aktivitu by mohly využívat produkci putrescinu pro překonání nebo snížení účinků stresových faktorů (např. kyslíku a NaCl). U mikroorganismů používaných jako startovací kultury v jakékoli fermentované potravině, by proto mělo být prokázáno, že nedokážou produkovat BA a jsou schopny potlačit svým růstem nežádoucí mik-

roflóru v podmínkách výroby a skladování. Používání vhodných startovacích kultur je nejspolehlivější možností kontroly fermentačního procesu využitelné jak ve velkém měřítku, tak v malých výrobcích. Mikroorganismus však musí být vybrán zvlášť pro každý typ výrobku [10]. Jako příklad lze uvést vliv začlenění bifidobakterií do smíšených startovacích kultur (*Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium lactis* a *Bifidobacterium bifidum*) na akumulaci biogenních aminů během fermentace a skladování fermentovaných klobás, kdy zahrnutí *B. lactis* a *B. bifidum* do startovacích kultur vedlo k výraznému snížení produkce BA [24]. Oproti tomu v jiné studii byla u některých kmenů bifidobakterií izolovaných z mléčných výrobků zjištěna produkce malého množství kadaverinu a tyraminu [25].

Vzhledem k tomu, že schopnost produkce dekarboxylas je nehomogenně rozložena mezi kmeny daného druhu, je nutné provádět zkoušky na potenciální dekarboxylázovou činnost u každého kmene, který má být použit jako startovací kultura. Mimo to by měla být dekarboxylasová aktivita zvoleného kmene posouzena i za konkrétních podmínek reálného zpracování ve výrobě [10].

2.2 Vliv pH

pH působí na produkci BA dvěma mechanismy, a to ovlivněním aktivity enzymu nebo inhibicí růstu mikroorganismů [10]. Z toho vyplývá, že pH hraje důležitou roli při tvorbě BA. Aktivita dekarboxylas je vyšší v kyselém prostředí, a to s optimem při pH v rozmezí 4 až 5,5 [26]. V kyselém prostředí jsou bakterie navíc motivovány k produkci dekarboxylas, jako součástí svých obranných mechanismů proti kyselému intracelulárnímu pH [1]. Při neutrálním a alkalickém pH jsou tyto enzymy neaktivní [21].

2.3 Přítomnost zkvasitelných sacharidů

Přítomnost zkvasitelných sacharidů, jako je např. glukosa, zvyšuje růst a dekarboxylační činnost bakterií. Optimální koncentrace glukosy pro tvorbu BA byly zjištěny v rozmezí 0,5-2,0 %, zatímco koncentrace glukosy přesahující 3 % inhibovala aktivitu dekarboxylačních enzymů [1]. Vhodným opatřením, které by částečně zabránilo hromadění BA při výrobě a skladování fermentovaných výrobků je změna druhu nebo koncentrace zkvasitelného sacharidu v kombinaci s přidávkou antimikrobiálního činidla, či nízkými teplotami. Snížení tvorby histaminu a putrescinu v masných výrobcích bylo pozorováno také po přidávku 1 % glukono- δ -laktonu díky poklesu pH [10].

2.4 Vliv teploty

Nejvýznamnějším způsobem prevence proti tvorbě biogenních aminů je dodržování správné skladovací teploty [1]. Obecně platí, že rychlost tvorby aminů se zvyšuje s teplotou [10]. Při nízkých teplotách se produkce snižuje prostřednictvím inhibice mikrobiálního růstu a snížení aktivity enzymů. Hladina BA tedy může být řízena striktním dodržováním chladicího řetězce. Přesto může u potravin obsahujících vysoké koncentrace docházet k mírnému zvýšení v průběhu doby skladování [22]. Nárůst koncentrace BA i v řádně chlazené potravine způsobuje aktivita přítomných psychrotrofních mikroorganismů. Optimální teplota pro tvorbu BA mezofilními bakteriemi se pohybuje mezi 20 až 37 °C, zatímco při teplotách pod 5 °C nebo nad 40 °C produkce BA klesá [10]. Většina aminů je při tepelném ošetření stálá, ovšem aktivita některých dekarboxylas zůstává i po tepelném ošetření (např. pastera-ci). Proto může obsah BA dále narůstat během skladování potraviny [27]. Tepelným zá-krokem přesto dochází k částečnému snížení koncentrace BA díky jejich reakci s redukujícími sacharidy (Maillardova reakce) [2].

2.5 Působení konzervačních a přídatných látek

Konzervační a přídatné látky mohou působit na snížení tvorby BA. Omezení vzniku BA bylo způsobeno přidavkem sorbanu sodného nebo hexametrafosfátu sodného, kdy 2 % pří-davek způsobil zpomalení tvorby histaminu. K částečné inhibici dekarboxylasové aktivity vede i přídavek kyseliny citronové, jantarové, jablečné a D-sorbitolu. Například použití 1 % přídavku kyseliny citronové v průběhu výroby kysaného zelí mělo za důsledek mírný pokles hladiny biogenních aminů při kombinaci s obsahem 6 % soli. Významného snížení obsahu BA bylo dosaženo také u klobás použitím sorbanu draselného a kyseliny askorbové. Schopnost inhibovat produkci biogenních aminů byla prokázána rovněž u dusitanu a du-sičnanu sodného [22]. Také chlorid sodný působí na dekarboxylaci aminokyselin. Vysokými koncentracemi soli byla zpomalena produkce histaminu například u bakterií *Staphylococcus capitis*, *Enterobacter cloacae* a *Pantoea agglomerans*. Naopak u halotolerantní bakterie *Staphylococcus* sp. izolované ze solených ančoviček došlo v důsledku přídavku soli ke zvýšení produkce histaminu. Proto se předpokládá, že účinek chloridu sodného na tvorbu BA je buď inhibující, nebo stimulující specificky pro jednotlivé bakteriální kme-ny [10].

Inhibice tvorby biogenních aminů byla prokázána rovněž u některých přirozeně se vyskytujících látek koření (např. kurkumin, kapsaicin, piperin). Zpomalení tvorby BA bylo prokázáno i u zázvoru, česneku, zelené cibulky, papriky, hřebíčku a skořice [22].

2.6 Další faktory ovlivňující hladinu biogenních aminů v potravinách

Významný vliv na biosyntézu BA má zřejmě dostupnost kyslíku. Za anaerobních podmínek se například snížila produkce putrescinu bakterií *Enterobacter cloacae* až o polovinu ve srovnání s aerobními podmínkami. Naopak u bakterie *Klebsiella pneumoniae* došlo za anaerobních podmínek ke snížení tvorby kadaverinu, ale zároveň se zvýšila produkce putrescinu [10]. Pro prodloužení trvanlivosti potravin se často používá vakuové balení nebo balení do ochranné atmosféry. Tím může být dosaženo zpomalení produkce biogenních aminů inhibicí mikroorganismů nebo enzymů zodpovědných za tvorbu BA. Například enzymatická činnost histidin-dekarboxylasy je vyšší za nepřítomnosti kyslíku, kdežto histaminasy oxidující histamin jsou účinné pouze v přítomnosti kyslíku [22]. Tvorbu BA ovlivňuje také redoxní potenciál média. Podmínky vedoucí ke snížení redoxního potenciálu stimuluje produkci histaminu [10].

V potravinách může být hladina aminů ovlivněna i ozařováním pomocí radiolýzy BA a snížení počtu bakterií odpovědných za jejich tvorbu. Radiolytická degradace BA byla prozatím prokázána pouze v modelovém systému. Radiolytické produkty biogenních aminů vznikající v potravinách po ozáření a jejich biologický účinek není dostatečně znám. Metoda snižování obsahu BA ozařováním má tedy jistý potenciál, ale vyžaduje další studie [22].

3 PROBIOTICKÉ BAKTERIE RODU BIFIDOBACTERIUM

3.1 Obecný popis probiotik

Probiotika jsou podle FAO/WHO (Organizace pro výživu a zemědělství / Světová zdravotnická organizace) definovány jako živé mikroorganismy, které při podání v optimálním množství jsou přínosem pro zdraví hostitele [28, 29, 30]. Mikroorganismy označované za probiotika lze rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří bakterie mléčného kvašení. Tato heterogenní skupina Gram-pozitivních bakterií je tvořena třemi rody (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Lactococcus*), které jsou obecně považovány za bezpečné. Do druhé skupiny se pak řadí některé probiotické nepatogenní izoláty rodů, které obsahují zároveň i potenciálně patogenní kmeny (*Escherichia coli*, *Clostridium butyricum*) [31]. Jako probiotika lze použít i některé kmeny bakterie rodu *Bacillus* nebo *Streptococcus thermophilus*. Využit je možné rovněž nepatogenní kvasinky např. *Saccharomyces cerevisiae* subtyp *bou-lardii* [28, 29, 30, 32].

Nejdříve byl pozitivní efekt na organismus probiotikům připisován pouze díky úpravě mikrobiální rovnováhy zažívacího traktu. Probiotika vytvářejí organické kyseliny, jejichž působením dochází k poklesu pH, které omezuje růst patogenních MO. Patogenní mikroorganismy jsou probiotiky vytěšňovány a snižuje se možnost jejich adheze ke sliznici střeva. Některé probiotické bakterie mohou navíc produkovat antibakteriální látky (např. peroxid vodíku, kyselinu mléčnou nebo bakteriocin). V současnosti jsou zaznamenány i jiné specifické pozitivní účinky probiotik na organismus člověka, např. zmírňování chronických intestinálních zánětů, prevence a léčba průjmů způsobených patogenní mikroflórou nebo léčba urogenitálních infekcí. Řada studií prokázala i preventivní vliv probiotik na vznik karcinomu střev. Potlačením růstu hnilobných bakterií vlivem nízkého pH se snižuje tvorba rakovinotvorných látek. Mimo to dokáží některé probiotické bakterie případné rakovinotvorné látky rozložit a tím zabránit jejich destruktivní činnosti. Probiotika snižují také aktivitu prokarcinogenních enzymů, jako jsou nitroreduktasy, azoreduktasy a beta-glukuronidasy [4, 28, 29, 30, 32].

V potravinářství se probiotika používají jako funkční přísada. Zvyšují tedy výživovou hodnotu daného výrobku a mění jej na tzv. funkční potravinu. V dnešní době je na trhu celá řada probiotických produktů, avšak největší význam pro transport probiotických bakterií

do zažívacího traktu člověka stále mají především fermentovaná mléka. Pro výrobu fermentovaných mlék byla prozkoumána řada bakterií z pohledu jejich stability ve výrobku a prokazatelných pozitivních účinků na organismus. K nejčastěji používaným probiotickým bakteriím se řadí laktobacily (*Lactobacillus acidophilus* LA5, *L. acidophilus* NCFM, *L. johnsonii* LA1, *L. casei* Shirota, *L. casei* DN114-001, *L. paracasei* St11, *L. rhamnosus* ATCC 53013, *L. reuteri* ATCC 55730, *L. plantarum* 299V, kmeny *L. gasseri* a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) a bifidobakterie (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *B. longum* BB 536, *B. breve* Yakult, *B. bifidum*, *B. infantis*) [29, 30].

3.1.1 Rod *Lactobacillus*

Laktobacily tvoří největší skupinu mezi bakteriemi mléčného kvašení. V současné době zahrnují více než 120 druhů a 20 poddruhů. Tato široká skupina laktobacilů je definována jako Gram-pozitivní, nesporulující, pravidelné tyčinky. Občas se vyskytují i ve tvaru kokovitých tyčinek. Vesměs jsou tyto bakterie nepohyblivé, pouze zřídka mají peritrichální bičíky. Ve vztahu ke kyslíku jsou to fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní bakterie. Růst laktobacilů podporuje přítomnost 5 % CO₂. Ve vztahu k teplotám kultivace se řadí do skupiny mezofilních a mírně termofilních bakterií, optimální růstová teplota je 30 až 40 °C. Laktobacily jsou acidotolerantní až acidofilní, optimum pH pro jejich růst je v rozmezí 5,5 – 6,2. Hlavním produktem při fermentaci sacharidů je kyselina mléčná, v menší míře pak kyselina octová, etanol a CO₂. Laktobacily se podílí také na dekarboxylaci některých aminokyselin, jako je kyselina glutamová a tyrosin, za vzniku biogenních aminů, které jimi nejsou dále metabolizovány. Rod *Lactobacillus* je taxonomicky zařazen do oddělení *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae* [12, 33, 34].

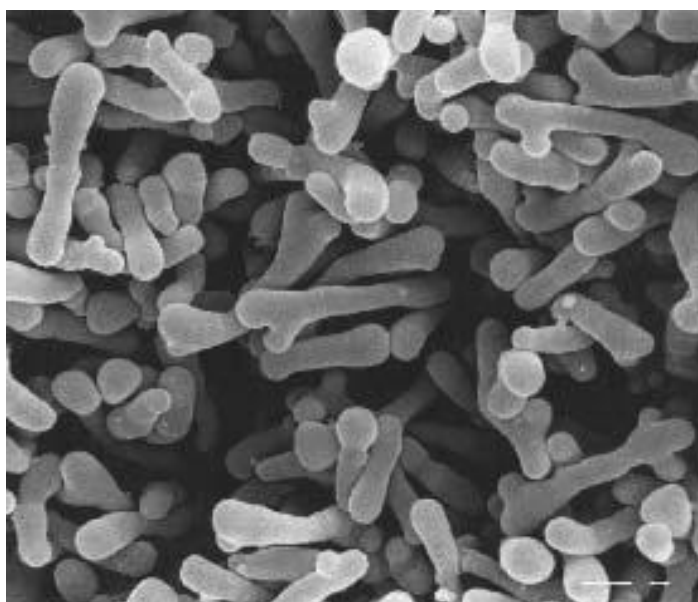
3.2 Charakteristika rodu *Bifidobacterium*

Tento rod patří k běžné mikroflóře dutiny ústní a zažívacího traktu. Dříve byly bifidobakterie řazeny do rodu *Lactobacillus*, v roce 1957 byl však vytvořen nový rod *Bifidobacterium*. K tomuto kroku vedly rozdílné morfologické, fyziologické a biochemické vlastnosti [12, 35].

3.2.1 Morfologie a cytologie

Kolonie bifidobakterií jsou na agarových půdách hladké, vypouklé s hladkými okraji, smetanově bílé, lesklé, měkké konzistence. Na agarových plotnách se kolonie bifidobakterií růstem velmi podobají bakteriím mléčného kvašení (zejména laktobacilům) [12, 36]. Růst bifidobakterií je podporován tzv. bifidogenními faktory, jako je např. laktulosa (β -galaktosidofruktosa), sacharidy obsahující N-acetyl-D-glukosamin, transgalaktosylované oligosacharidy atd. Do skupiny bifidogenních faktorů se nově řadí i fruktooligosacharidy (deriváty inulinu) rostlinného původu a také algináty. Tyto látky slouží jako selektivní živiny pro bifidobakterie a pravděpodobně i pro ostatní bakterie mléčného kvašení [12].

Bifidobakterie jsou nepohyblivé tyčinky, rostoucí jednotlivě, v řetězcích, ve hvězdicovitém nebo palisádovém uspořádání. Tyčinky mohou zobrazovat různé tvary s drobnými ohyby nebo širokou paletou větvení převážně na jednom z konců (Obr. 7). K rozštěpení dochází zejména, pokud mají tyto bakterie nedostatek živin [12, 33, 36].



Obr. 7: *Bifidobacterium* sp. pozorované elektronovým mikroskopem [37]

Složení buněčné stěny bifidobakterií je typické pro grampozitivní bakterie. Skládá se z husté peptidoglykanové vrstvy, polysacharidů, proteinů a kyseliny teichové. Aminokyselinnové složení základních tetrapeptidů mureinu se může odlišovat u jednotlivých druhů nebo i kmenů stejného druhu. Tento fakt je proto využíván k jejich rozdělení. Další odliš-

ností mezi jednotlivými druhy rodu *Bifidobacterium* je zastoupení glukosy, galaktosy a ramnosy v polysacharidech buněčné stěny. Spojení kyseliny lipoteichové s polysacharidovými řetězci je pak považováno za významné pro adhezi buněk na stěnu střeva [37, 38].

3.2.2 Fyziologické vlastnosti

Bifidobakterie jsou Gram-pozitivní, nesporulující, zpravidla striktně anaerobní tyčinky. Některé druhy tolerují mírnou přítomnost kyslíku v prostředí. Míra tolerance ke kyslíku závisí na složení kultivačního média (obsah bifidogenních faktorů) a přítomnosti CO₂. Za aerobních podmínek na Petriho miskách bifidobakterie nerostou, výjimkou je kmen *B. psychraerophilum*, který byl izolován z vepřového slepého střeva a u nějž byla prokázána vysoká tolerance ke kyslíku a dokonce růst na agaru za aerobních podmínek [12, 36, 38].

Optimální teploty pro růst bifidobakterií se obecně pohybují v rozmezí 37 – 41 °C. Optimum je však různé ve vztahu k původu kmenu. Bylo zjištěno, že teplotní optimum lidských kmenů bifidobakterií je nižší (36 – 38 °C) než u kmenů izolovaných z jiných živočichů (41 – 43 °C). Růst těchto bakterií se zastavuje při teplotách pod 25 – 28 °C a nad 43 – 45 °C. Výjimkou je *Bifidobacterium thermacidophilum* schopný růst i při teplotě 49,5 °C a kmen *B. psychraerophilum*, u kterého byl prokázán růst při teplotách až do 4°C [36, 37, 38].

Bifidobakterie jsou mírně acidotolerantní mikroorganismy. Optimální pH pro růst se pohybuje v rozmezí 6,5 – 7,0. Růst se zastavuje při pH 4,5 – 5,0 a 8,0 – 8,5. Výjimku tvoří opět *Bifidobacterium thermacidophilum*, který vykazuje mírný růst ještě při pH 4. Kmeny *B. lactis* a *B. animalis* pak dokážou přežít vystavení pH 3,5 [12, 36, 37, 38].

3.2.3 Biochemické vlastnosti

Bifidobakterie jsou kataláza-negativní sacharolytické organismy. Všechny charakteristické kmeny bifidobakterií mají schopnost fermentovat glukosu, galaktosu a fruktosu. Mezi jednotlivými druhy se ale vyskytují rozdíly ve schopnosti metabolizovat některé další sacharidy a alkoholy [12, 37, 38]. Metabolismus glukosy probíhá přes fruktosa-6-fosfátový zkrat a ze dvou molů hexosy jsou pak vytvořeny tři moly kyseliny octové a dva moly L(+)-kyseliny mléčné. Kyselina octová, která je bifidobakteriemi produkována ve vyšší

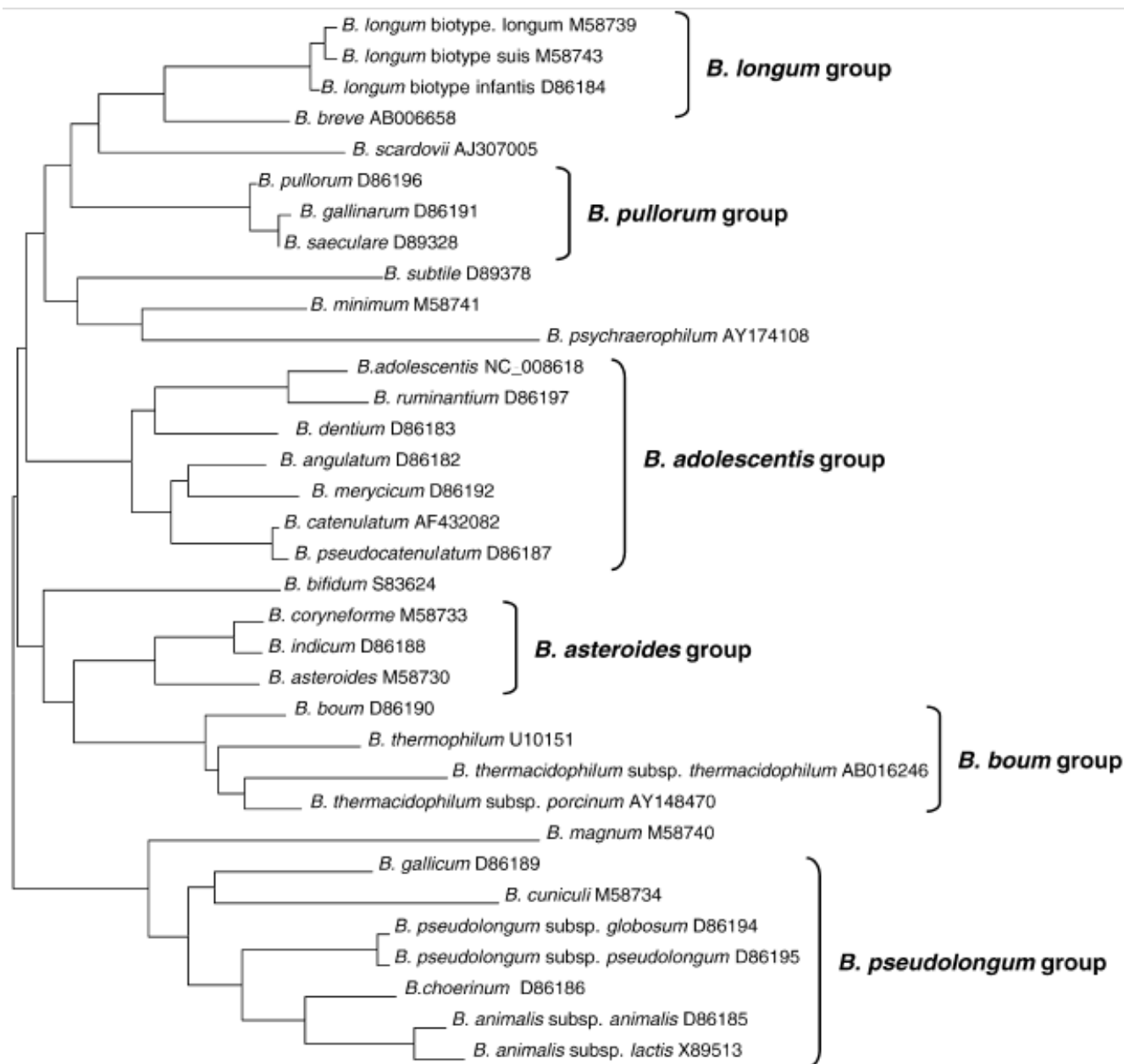
míře, má silnější antagonistický účinek na nežádoucí Gram-negativní bakterie než kyselina mléčná. Oxid uhličitý bifidobakterie při metabolismu netvoří. Vedlejším metabolitem fermentace sacharidů je malé množství kyseliny mravenčí, etanolu a kyseliny jantarové. Tvorba kyseliny mravenčí a etanolu může ovlivnit bilanci produktů fermentace. Různé druhy bifidobakterií produkují různé množství kyseliny octové, kyseliny mléčné, etanolu a kyseliny mravenčí za jinak stejných podmínek kultivace. Některé kmeny rodu *Bifidobacterium* vykazují v mléku také mírnou proteolytickou aktivitu [12, 37].

3.2.4 Taxonomické zařazení

Rod *Bifidobacterium* je zařazen do třídy *Actinobacteria*, podtřídy *Actinobacteridae*, řádu *Bifidobacteriales*, a čeledi *Bifidobacteriaceae* [33].

Podle databáze bakteriální nomenklatury (DSMZ – Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen, Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur) je do rodu *Bifidobacterium* zařazeno 29 druhů: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. longum*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. psychraeophilum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. scardovii*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum* a *B. thermophilum*. Dva poddruhy pak tvoří druhy *B. animalis* (subsp. *animalis* a *lactis*), *B. pseudolongum* (subsp. *globosum* a *pseudolongum*) a *B. thermacidophilum* (subsp. *thermoacidophilum* a *porcinum*). Druh *B. longum* je rozdělen do tří různých biotypů (*longum*, *infantis* a *suis*) [33].

Nejčastěji se vyskytující kmeny bifidobakterií v lidském intestinálním traktu patří k druhu *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. angulatum*, *B. bifidum* a *B. dentium* [33]. Izolace bifidobakterií ze vzorku se provádí na speciálním médiu za anaerobních podmínek. Typické médium obsahuje tryptikasu, fyton, glukosu, kvasničný autolyzát a soli manganu, železa, zinku a vápníku, Tween 80, cystein hydrochlorid a agar; pH půdy se volí 6,5. Identifikace rodu se poté uskutečňuje na základě mikroskopického obrazu izolovaných buněk, tvaru kolonií a růstu na specifických médiích. Identifikace jednotlivých druhů bifidobakterií vyžaduje plynovou chromatografii, identifikaci fermentačních produktů glukosy a další testy [12].



Obr. 8: Evoluční vztahy kmenů bifidobakterií získané pomocí 16S rDNA sekvenace [33]

3.3 Faktory ovlivňující růst bifidobakterií jako probiotik

Pro použití při výrobě probiotických výrobků jsou probiotické mikroorganismy selektovány na základě prokázaných a potenciálních pozitivních efektů na organismus člověka, nicméně nesmí tyto mikroorganismy negativně ovlivňovat vlastnosti finálního produktu. Probiotické kmeny jsou často izolovány z lidského intestinálního traktu. Přednostně jsou využívány kmeny se schopností růstu v mléce, kmeny produkující vitamin K nebo vitaminy skupiny B a takové kmeny, které vykazují maximální životaschopnost po celou dobu trvan-

livosti výrobku. U probiotických výrobků je převážně vyžadován počet živých MO alespoň $10^6 - 10^8$ KTJ/ml, které jsou schopny přežít působení kyselých žaludečních šťáv a žluči [28, 29].

Množství probiotických bakterií ve výrobku ovlivňuje zejména:

- Kombinace probiotických kmenů s kulturou zákysu. Rod *Lactobacillus* je více tolerantní ke kyslíku a nízkému pH než bifidobakterie. Některé bifidobakterie produkují více než 0,4 g/l kyseliny octové a tím nepříznivě ovlivňují chuť a vůni výrobku a stimulují růst *Lactobacillus acidophilus*. Bylo ovšem zjištěno, že *Lactobacillus acidophilus* pak zpětně podporuje růst bifidobakterií. Růst *Bifidobacterium* sp. je podporován a zároveň inhibován metabolickou činností *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Stimulace je způsobena jeho produkcí volných aminokyselin (valinu, glycinu a histidinu) při proteolýze mléčného kaseinu. Inhibice je pak způsobena silnou produkcí kyseliny mléčné a peroxidu vodíku. Růst striktně anaerobních bifidobakterií je podporován také bakteriemi *Streptococcus thermophilus* díky jejich intenzivnímu využívání přítomného kyslíku [29].
- Složení fermentačního média a výše tepelného záhřevu mléka před fermentací. Schopnost přežívání probiotických kultur a stimulaci jejich růstu může příznivě ovlivnit přidavek kaseinu, hydrolyzátu sérových bílkovin, kvasničného extraktu, glukosy, vitaminů a minerálních látek. Při silném záhřevu mléka pak vzniká z laktosy prebiotikum laktulosa. Nebo mohou být do mléka přidávány poly- a oligosacharidy [29].
- Množství rozpuštěného kyslíku. Nízký obsah kyslíku dosažený deaerací mléka a dále pak použitím nepropustných obalů stimuluje růst a přežívání bifidobakterií i *Lactobacillus acidophilus*. Ochranou před negativními vnitřními i vnějšími faktory prostředí poskytuje probiotickým kulturám mikroenkapsulace [29].
- Velikost inokula je dalším důležitým faktorem. Z důvodu špatného růstu probiotických bakterií v mléce se používá vyšší inokulační dávka tvořící 5-10 % výsledného objemu [29].
- Vysoká kyselost výrazně snižuje životaschopnost přítomných laktobacilů i bifidobakterií [29].

4 DETEKCE GENŮ PRO PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ

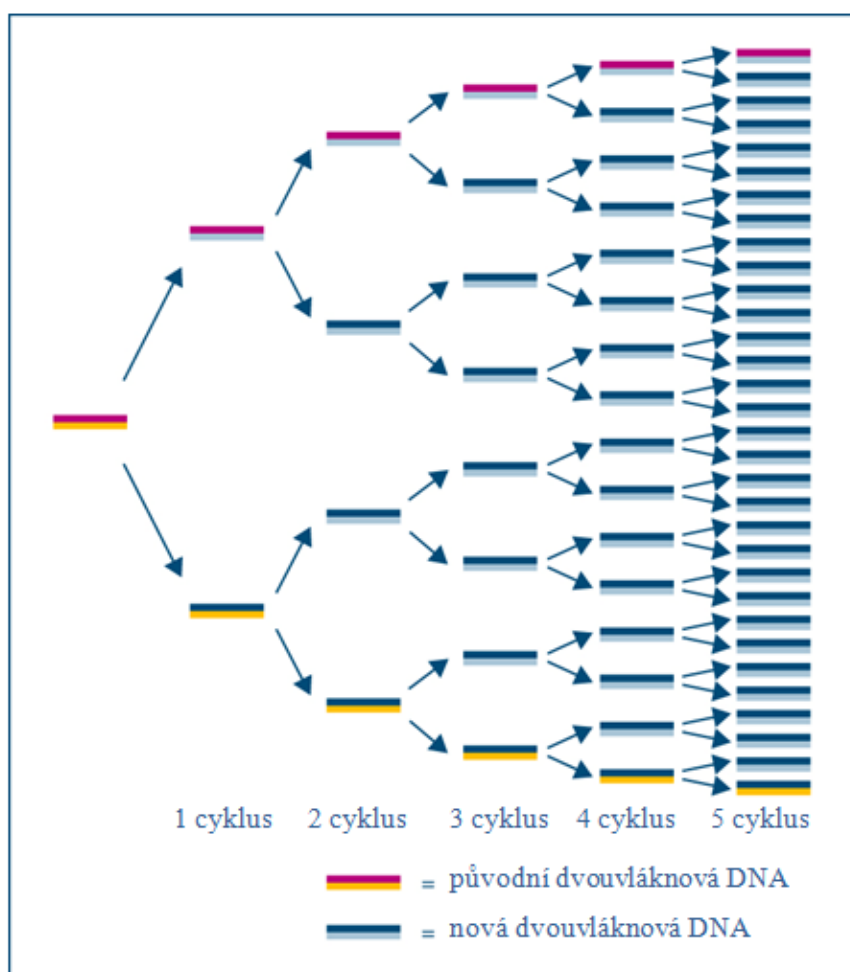
Vztah mezi přítomností genu kódujícího dekarboxylasu a schopností produkce biogenních aminů byl prokázán již několika autory. Tvorba biogenních aminů je spojována s některými skupinami mikroorganismů. Například schopnost produkce putrescinu a kadaverinu byla zaznamenána u většiny enterobakterií a produkce tyraminu pak převážně u většiny enterokoků. V rámci mikrobiální skupiny je nicméně schopnost tvorby biogenních aminů kmenově specifická a tato vlastnost je různě distribuována mezi některými rody nebo druhy. Tato skutečnost naznačuje, že za šíření této schopnosti mezi kmeny může být zodpovědný horizontální přenos genů. Některé kmeny jsou navíc schopny produkovat současně více než jeden biogenní amin, a to buď v důsledku tvorby různých dekarboxylas nebo tvorbou jednoho enzymu schopného dekarboxylace různých aminokyselin [10].

Nutnost charakterizovat geny kódující dekarboxylační enzymy vedla k vývoji specifických a citlivých metod založených na PCR. Tyto metody umožňují detekovat schopnost produkce BA u jednotlivých mikroorganismů rychleji než ostatní kultivační metody [10]. Molekulární metody detekce a identifikace bakterií vyskytujících se v potravinách jsou tedy alternativou k tradičním kultivačním metodám. Výhodami metody PCR a DNA hybridizace je rychlost, citlivost, jednoduchost a specifická detekce cílových genů. Navíc jsou molekulární metody vhodné pro detekci potenciálního rizika vzniku BA v potravinách dříve, než jsou biogenní aminy vyprodukovány. Nevýhodou využití metody PCR však je, že není známo, zda templátová DNA pocházela z životaschopných buněk. Schopnost rozlišovat mezi životaschopnými a mrtvými mikroorganismy je rozhodující v případě, že by metoda PCR byla použita k posouzení rizika akumulace BA přímo v potravinářském zpracovatelském závodě [39]. Další nevýhodou je, že testy založené na PCR stanovují pouze potenciál pro tvorbu BA, nikoliv skutečnou produkci biologicky aktivního enzymu [10].

4.1 Metoda PCR

Polymerasová řetězová reakce umožňuje získat požadovanou specifickou sekvenci genomové DNA. Princip je založen na replikaci nukleových kyselin. Podstata spočívá v cyklicky se opakující enzymové syntéze nových řetězců vybraného úseku DNA. Syntéza probíhá ve směru 5'→3' prostřednictvím enzymu DNA-polymerasy. Amplifikovaný úsek DNA (amplikon) je vymezen navázáním dvou oligonukleotidů (tzv. primerů), které se připojí

na protilehlé řetězce molekuly DNA tak, že jejich 3'- konce směřují proti sobě. Na obou řetězcích pak po přidavku nukleotidů a DNA-polymerasy probíhá protisměrná syntéza nových vláken DNA. Amplifikací jedné molekuly DNA vznikají vždy dvě další, počet molekul tedy s každým cyklem narůstá exponenciálně (Obr. 9). K syntéze DNA se nejčastěji používá *Taq* DNA-polymerasa izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Tento termostabilní enzym odolává teplotám, při nichž dochází k denaturaci DNA, což umožňuje opakovanou syntézu DNA probíhající ve formě cyklů. Amplifikaci DNA umožňuje pravidelné a regulované střídání teplot. Tyto regulované změny teplot zajišťuje přístroj nazývaný termocykler [40, 41].



Obr. 9: Exponenciální nárůst amplifikovaných molekul DNA [42]

Obecně je celý proces tvořen třemi kroky, při nichž v závislosti na změně teploty reakční směsi probíhají tři odlišné děje [40, 41]:

- Denaturace dvouřetězcové molekuly DNA. Denaturace zpravidla probíhá při teplotě 94 – 98 °C po dobu 1 – 10 minut. V tomto kroku dochází k rozdělení dvouřetězco-

vé DNA, která poté slouží jako templát pro nově vznikající komplementární úsek DNA [40, 41].

- Připojení primerů k jednotlivým řetězcům templátové DNA. Primery jsou převážně tvořeny 18 – 28 syntetickými olinukleotidy a každý z dvojice primerů je komplementární ke koncové sekvenci amplikonu na protilehlých řetězcích templátové DNA. Při vhodné teplotě (tzv. annealingová teplota) nasedají primery na příslušnou komplementární sekvenci templátové DNA. Teplota annealingu se pohybuje v rozmezí 30 – 65 °C [40, 41, 43].
- Syntéza nových řetězců DNA (elongace). Začíná po navázání primerů za přítomnosti enzymu DNA-polymerasy a dalších nezbytných složek reakční směsi (volné nukleotidy dNTP, dvojmocné ionty atd.). Teplota v tomto kroku je závislá na použité DNA-polymerase a pohybuje se v rozmezí teplot 65 – 75 °C [40, 41].

Vzniklé jednořetězcové molekuly DNA se párují na principu komplementarity a vznikají opět dvouřetězcové molekuly. Ty následně mohou vstupovat jako templát do dalšího cyklu [40, 41].

Přesnost a úspěšnost PCR je závislá na vhodném návržení obou primerů. Dostatečné množství produktu je obvykle vytvořeno po 30 – 35 cyklech. Příliš vysoký počet cyklů významně zvyšuje možnost vzniku nespecifických produktů PCR. Rovněž je nutné optimalizovat přesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých kroků. Pro získání požadovaného produktu v dostatečném množství je důležitá koncentrace jednotlivých složek reakční směsi. Reakční směs mimo jiné obsahuje hořečnaté ionty Mg^{2+} , které slouží jako kofaktor a tvoří rozpustný komplex s jednotlivými dNTP, ale také s primery, templátovou DNA a s přítomnými chelatačními činidly. Ve většině případů je třeba stanovit pro každou aplikaci optimální koncentraci těchto iontů. Příliš vysoká koncentrace některé ze složek reakční směsi může vést k chybám a vzniku nežádoucích nespecifických produktů. Výsledek PCR lze detekovat pomocí elektroforézy v agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu [40, 41].

4.1.1 Faktory ovlivňující průběh PCR

Termostabilní DNA-polymerasa katalyzuje prodlužování primerů již při laboratorní teplotě, což může vést k chybám a vzniku nespecifických produktů, a to především pokud je templátová DNA dostupná pouze v nízkých koncentracích. Výtěžek a specifičnost reakce

výrazně ovlivňuje také tzv. hot-start PCR. Při tomto kroku jsou některé složky reakční směsi odděleny do doby, než teplota překročí optimální teplotu pro připojení primerů (cca 55 – 65 °C). DNA-polymerasa není v této nekompletní směsi aktivní, a proto nedochází k prodlužování nespecificky navázaných primerů [40]. Účinnost DNA-polymerasy se snižuje při použití příliš vysokého počtu cyklů PCR [43].

Z důvodu vysoké citlivosti a specifity polymerázové řetězové reakce může výsledek ovlivnit kontaminace i jednou molekulou neznámé DNA [40]. Kontaminace se pak může projevit v podobě amplifikovaného fragmentu DNA v negativní kontrole. V takovém případě je nutné považovat pozitivní výsledky PCR za podezřelé. Pro minimalizaci falešných pozitivních výsledků vhodné jednotlivé fáze PCR (příprava vzorků templátové DNA, příprava PCR reakčních směsí, analýza amplifikovaných vzorků) provádět v oddělených místnostech nebo alespoň na určených pracovištích [44]. Navíc je nutné dodržovat doporučené standardní postupy (fyzikální separace používaných reakčních roztoků pro PCR od templátové DNA a produktů PCR, příprava reakčních složek i vzorků do alikvotních částí, používání UV záření pro odstranění exogenních NK z pracovní plochy, používání jednorázových rukavic, přidávání templátové DNA jako poslední reakční složky, vhodná volba pozitivních, negativních a vnitřních kontrol). Vyloučení kontaminace je nutné zejména u degradovaných vzorků DNA, kde je zapotřebí použít vysoký počet amplifikačních cyklů, aby bylo dosaženo potřebného množství produktu PCR. V takovém případě může zbytkové množství exogenní DNA vytvářet konkurenci templátové DNA a tím potlačit amplifikační proces za vzniku falešných výsledků [40].

4.2 Detekce výsledku PCR pomocí elektroforézy

Elektroforéza je jednou z nejpoužívanějších separačních metod molekulární biologie. Využívá se pro izolaci a analýzu nukleových kyselin a bílkovin. Principem separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Negativně nabitě fosfátové skupiny nukleových kyselin způsobují, že NK ve stejnosměrném elektrickém poli putují k opačně nabitě anodě. Dělení může probíhat buď volně v roztoku (pufru) nebo se provádí ve vhodném nosiči (gelu) [40, 43]. Pro separaci NK se používají nejčastěji agarosové nebo polyakrylamidové gely, které vytvářejí síťovou strukturu polymerních částic s póry. Velikost pórů lze ovlivnit koncentrací polymeru a složením roztoku. Pro separaci molekul o velikosti 100 bp až 50 kbp jsou vhodné gely agarosové. Polyakrylamidové gely se využívají pro separaci

menších molekul NK o velikosti 10 až 1000 bp. Velikost molekuly DNA nebo jejího fragmentu lze stanovit srovnáním jejich elektroforetické pohyblivosti s pohyblivostí molekul či fragmentů DNA o známé velikosti. Tyto molekuly a fragmenty molekul DNA jsou označovány jako standardy velikosti nebo standardy hmotnostní. Podle polohy umístění gelu v elektroforetické aparatuře lze rozlišit vertikální a horizontální gelovou elektroforézu. Dále existuje ještě tzv. kapilární elektroforéza, v jejímž případě je gel umístěn uvnitř kapiláry. Pro identifikaci polohy separovaných molekul je nutné molekuly DNA obarvit vhodným barvivem. Běžně se používá barvivo etidiumbromid, které se vmezeřuje mezi sousedící páry bází v molekule DNA a vytváří s ní tak komplex. Tento komplex pak červeně fluoreskuje po ozáření ultrafialovým světlem. Molekuly o stejné velikosti vytvářejí po proběhnutí elektroforézy na gelu proužky a intenzita jejich fluorescence je úměrná koncentraci molekul DNA [40].

4.3 Sekvencování amplifikovaných fragmentů DNA

Cílem sekvencování DNA je stanovení pořadí nukleotidů v molekulách DNA [40]. Metoda sekvencování je založena na replikaci DNA, která je následně přerušena zařazením chemicky upraveného nukleotidu (dideoxyribonukleotidu). Tato metoda je v podstatě modifikací PCR. Rozdílem je, že k analýze je využíván pouze jeden primer komplementární k oblasti, kde sekvencovaný úsek DNA začíná. Reakční směs pro sekvenaci navíc obsahuje kromě běžných složek (DNA-polymerasa, dNTP) dideoxynukleotidtrifosfáty (ddNTP), které mají na 3'uhlovodíkovém atomu deoxyribosy navázán pouze vodík místo OH-skupiny. Tyto ddNTP jsou označeny fluorescenčním barvivem. V průběhu PCR se pak vytvoří jednořetězcové fragmenty DNA různé velikosti, neboť po navázání ddNTP již nelze připojit další nukleotid. Po provedení elektroforézy je směs rozdělena podle velikosti fragmentů a díky označení konců fragmentů specifickým fluorescenčním barvivem lze stanovit, kterým ddNTP byla syntéza ukončena. Na tomto principu byly založeny moderní přístroje využívající kapilární elektroforézu pro přesné seřazení fragmentů DNA podle velikosti. Tyto tzv. sekvenátory obsahují detektor odlišující jednotlivá fluorescenční barviva na koncových ddNTP a umožňují automatické stanovení zkoumané sekvence DNA. Výsledkem analýzy je graf, skládající se z jednotlivých vrcholů ukazujících na přítomnost příslušných nukleotidů [45].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat dekarboxylasovou aktivitu u probiotických bakterií. Hlavním cílem bylo vyhodnotit produkci biogenních aminů bakteriemi rodu *Bifidobacterium* za působení různých faktorů. Dekarboxylasová aktivita dvou zkoumaných kmenů *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM239 a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B25 byla vyhodnocována při působení různých koncentrací NaCl, laktosy, odlišném pH a při současném působení těchto faktorů. Těmito faktory byly simulovány různé podmínky vyskytující se v potravinách, které by mohly evokovat tvorbu BA bifidobakteriemi používanými jako startérové kultury. Dekarboxylasová aktivita bifidobakterií byla následně detekována a kvantifikována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Dílčím cílem diplomové práce bylo stanovení přítomnosti genů pro produkci biogenních aminů pomocí metody PCR. Detekce byla provedena u osmi kmenů rodu *Lactobacillus*, u nichž byla produkce BA prokázána již dříve s využitím jiných metod stanovení. Metoda PCR byla zaměřena především na detekci genu zodpovědného za následnou tvorbu putrescinu. Pro stanovení bylo nutné izolovat DNA jednotlivých kmenů laktobacilů a provést optimalizaci metody. K detekci genu pro produkci putrescinu bylo použito několik primerů a nejlepší výsledky následně byly odeslány na sekvenaci.

Na základě poznatků z teoretické části a výsledků praktické části bylo cílem vyvodit závěry o dekarboxylasové aktivitě bifidobakterií za různých podmínek složení kultivačního média a potenciálu laktobacilů jako probiotik pro tvorbu putrescinu.

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Chromatografické stanovení biogenních aminů

6.1.1 Materiál použitý pro chromatografické stanovení

6.1.1.1 Bakteriální kultura

Pro tuto experimentální část byly vybrány dva kmeny rodu *Bifidobacterium*, a to *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B25.

6.1.1.2 Kultivační média

Bujón MRS

MRS (HiMedia)	55,15 g
Destilovaná H ₂ O	1000 ml

Připravený bujón byl rozlit do zkumavek po 8 ml a po uzavření byly zkumavky sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Modifikovaný bujón MRS

Proteoso-Pepton (HiMedia)	10,000 g
Beef extrakt (HiMedia)	10,000 g
Yeast extrakt (HiMedia).....	5,000 g
Glukosa (Lach:Ner).....	20,000 g
Tween 80 (Lach:Ner)	1,000 g
Citran amonný (Ing. P. Lukeš)	2,000 g
Octan sodný (Ing. P. Lukeš).....	5,000g
Síran hořečnatý (Ing. P. Lukeš).....	0,100 g
Síran manganatý (Lach:Ner)	0,005 g
Hydrogenfosforečnan didraselný (PENTA)	2,000 g
Arginin (Sigma-Aldrich).....	0,300 g

Ornitin (Sigma-Aldrich).....	0,300 g
Tyrosin (Sigma-Aldrich).....	0,300 g
Lysin (Sigma-Aldrich)	0,300 g
Destilovaná H ₂ O	1000 ml

Připravený modifikovaný bujón MRS byl dále upraven.

Úpravy pro kultivaci kmenu *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM 239

Výsledné pH modifikovaného bujónu MRS bylo upraveno na hodnotu 4,5. Toto médium bylo následně rozděleno na dvanáct stejných podílů, k nimž byly přidány navážky laktosy (Lach:Ner) tak, aby bylo dosaženo koncentrace 0,00; 0,25; 0,50; 1,00 % (w/v). Obdobně bylo postupováno v případě chloridu sodného (PENTA), kdy byly přidávány navážky tak, aby bylo dosaženo koncentrace 0,0; 1,0; 2,0 % (w/v). Takto bylo dosaženo dvanácti různých variant kultivačního média. Každá varianta byla rozpipetována po 7 ml do zkumavky. Zkumavky byly po uzavření sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Úpravy pro kultivaci kmenu *B. animalis* subsp. *lactis* B25 za působení rozdílného pH

Modifikovaný bujón MRS připravený podle základního rozpisu byl rozdělen do dvou stejných částí, jejichž pH bylo poté upraveno na hodnoty 4,5 a 5,0. Obě části bujónu s odlišným pH byly rozděleny, každá na dvanáct stejných podílů. K těmto podílům byla přidána laktosa, tak aby výsledné koncentrace dosahovaly hodnot 0,00; 0,25; 0,50; 1,00 % (w/v). Poté byl přidán chlorid sodný, tak aby výsledné koncentrace dosahovaly hodnot 0,0; 1,0; 2,0 % (w/v). Takto bylo dosaženo 24 variant kultivačního média. Každá varianta připraveného média byla rozpipetována po 8 ml do tří zkumavek. Zkumavky byly po uzavření sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

6.1.1.3 Činidla využívaná při derivatizaci

Vnitřní standard

1,7-heptadiamin ($c = 500 \text{ mg.l}^{-1}$) (Sigma-Aldrich) v kyselině chloristé ($c = 0,6 \text{ mol.l}^{-1}$) (Merck)

Karbonátový pufr

Množství pufru bylo připravováno vzhledem k počtu vzorků k derivatizaci. Nejprve byl připraven roztok hydrogenuhličitanu sodného ($c = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$).

NaHCO₃ (Merck) 21,000 g

Destilovaná H₂O 500 ml

Dále byl připraven roztok uhličitanu sodného ($c = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$), který byl použit pro úpravu pH roztoku hydrogenuhličitanu sodného na hodnotu 9,2.

Na₂CO₃ (Merck)..... 13,250 g

Destilovaná H₂O 250 ml

Po úpravě pH byla k potřebnému objemu pufru přidána příslušná navážka uhličitanu draselného.

K₂CO₃ (Merck) 0,333 g

Pufr (o pH 9,2) 1 ml

Tímto postupem bylo dosaženo výsledného pH karbonátového pufru v rozmezí hodnot 11,0 – 11,1.

Derivatizační činidlo

Jako derivatizační činidlo byl použit roztok dansylchloridu (Sigma-Aldrich) v acetonu ($c = 5 \text{ g.l}^{-1}$), který byl připraven vždy čerstvý těsně před derivatizací v potřebném množství dle počtu vzorků.

Další chemikálie používané při derivatizaci:

Roztok prolinu ($c = 0,1 \text{ g.l}^{-1}$) (Merck)

Heptan pro HPLC (Sigma-Aldrich)

Acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich)

6.1.2 Systém HPLC

Binární pumpa LabAlliance (USA)

Autosampler LabAlliance (USA)

Kolona Agilent Eclipse Plus C18 RRHD s rozměry 3,0 x 50 mm

UV/VIS DAD detektor ($\lambda = 254$ nm) Agilent Technologies (USA)

Termostat kolon degaser 1260 Infinity Agilent Technologies (USA)

6.1.3 Pracovní postup chromatografického stanovení

Pro stanovení produkce BA za působení různých koncentrací chloridu sodného a laktosy při pH 4,5 byl použit bakteriální kmen *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM239. Pro stanovení produkce BA za odlišného pH a současného působení různých koncentrací laktosy a chloridu sodného byl vybrán kmen *B. animalis* subsp. *lactis* B25. Bakteriální kultury byly zaočkovány do dvou zkumavek s bujónem MRS a kultivovány při 37 °C tři dny. Po kultivaci byly kultury přeočkovány do dalších dvou zkumavek s bujónem MRS a opět kultivovány při 37 °C tři dny. Tento postup byl opakován ještě jednou.

6.1.3.1 Stanovení produkce biogenních aminů kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM239 při rozdílném složení kultivačního média

Z bakteriální suspenze kmenu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 bylo po kultivaci odebráno vždy 100 μ l k inokulaci připraveného modifikovaného bujónu MRS pro toto stanovení. Postupně bylo bakteriální suspenzí zaočkováno všech 12 variant kultivačního média. Po zaočkování byly zkumavky (včetně kontrolních) kultivovány při 37 °C 48 hodin. Vzorky byly po kultivaci centrifugovány 10 minut při 4 600 otáčkách za minutu. Ze získaného supernatantu bylo odebráno vždy po 750 μ l do tří 2 ml mikrozkušavek a zředěno kyselinou chloristou ($c = 1,2 \text{ mol.l}^{-1}$) v poměru 1 : 1.

6.1.3.2 Stanovení produkce biogenních aminů kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při rozdílném složení kultivačního média a odlišném pH

Pro inokulaci modifikovaného bujónu MRS bylo v případě tohoto experimentu použito vždy 25 μ l bakteriální suspenze kmenu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B25 (po kultivaci třikrát tři dny při 37 °C). Postupně byly touto bakteriální suspenzí inokulovány všechny zkumavky 24 variant kultivačního média. Poté byly zkumavky kultivovány při 37 °C 48 hodin. Po ukončení kultivace byl obsah zkumavek centrifugován 10 minut při 4600 otáčkách za minutu. Z každé zkumavky bylo odebráno třikrát 700 μ l supernatantu

do tří přichystaných 2 ml mikrozkušavek. K odebranému supernatantu v mikrozkušavkách bylo přidáno vždy 700 μl kyseliny chloristé ($c = 1,2 \text{ mol.l}^{-1}$).

6.1.3.3 Derivatizace a analýza vzorků pomocí kapalinové chromatografie

Do přichystaných derivatizačních zkumavek bylo odpipetováno 100 μl vnitřního standardu (1,7- heptandiaminu v kyselině chloristé) a 1 ml vzorku přichystaného k derivatizaci. Následně byl přidán 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,0 – 11,1 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu. Derivatizační zkumavky se vzorky byly uzavřeny a třepány po dobu 20 hodin v temnu. Po uplynutí 20 hodin bylo třepání přerušeno a po přidavku 200 μl roztoku prolinu se v třepání pokračovalo ještě 1 hodinu. Dále byly do derivatizačních zkumavek odpipetovány 3 ml heptanu a po uzavření byly vzorky třepány ještě 3 minuty.

Po ukončení třepání byl z derivatizačních zkumavek odpipetován vždy 1 ml heptanové vrstvy do vialek a pod dusíkem byl při teplotě 60 °C odpařen do sucha. Suchý odparek byl poté zředěn 1,5 ml acetonitrilu a uchován v uzavřených vialkách při teplotě -18 °C do doby analýzy. Bezprostředně před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μm a dávkovány do chromatografického systému. Derivatizace byla provedena podle postupu uvedeného ve studii Dadáková a kol. [46].

Chromatografické stanovení BA bylo provedeno pomocí modifikace studie Smělá a kol. [47]. Separace BA probíhala při teplotě 30 °C a průtoku 0,45 ml za minutu pomocí gradientové eluce. Pro eluční program byla zvolena mobilní fáze 10 % acetonitril / 100 % acetonitril (Tab. 1).

Tab. 1: Eluční program HPLC

Čas [min]	10 % acetonitril [%]	100 % acetonitril [%]
0,0	39	61
0,1	39	61
1,4	30	70
3,5	17	83
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	39	61
15,5	39	61

6.2 Stanovení přítomnosti genů pro produkci biogenních aminů metodou PCR

6.2.1 Materiál použitý pro PCR a následnou detekci pomocí elektroforézy

6.2.1.1 Bakteriální kultury

Pro detekci genu zodpovědného za produkci putrescinu bylo vybráno 8 kmenů laktobacilů ze sbírky Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, u nichž již byla produkce putrescinu prokázána s využitím jiných metod:

Lactobacillus curvatus subsp. *curvatus* AI-2

Lactobacillus curvatus subsp. *curvatus* AI-3

Lactobacillus curvatus DEPE 15

Lactobacillus curvatus DEPE 41

Lactobacillus curvatus subsp. *curvatus* DEPE 39

Lactobacillus curvatus subsp. *curvatus* DEPE 8

Lactobacillus brevis DEPE 24

Lactobacillus curvatus DEPE 42

6.2.1.2 Kultivační média

Čisté bakteriální kultury byly pro izolaci templátové DNA kultivovány v bujónu MRS nebo na agarových plotnách MRS.

Agar MRS

MRS agar (Bio-Rad) 68 g

H₂O..... 1000 ml

Připravená půda byla sterilována při 121 °C po dobu 15 minut v autoklávu a poté rozlévána na Petriho misky.

6.2.1.3 Chemikálie pro izolaci DNA

Izolační kit Ultra Clean Microbial DNA (ElisabethPharmacon)

HighPCR Template Preparation Kit (Roche)

Sterilní fyziologický roztok (0,9 % roztok NaCl), (PENTA)

Sterilní destilovaná H₂O

Proteinasa K (c = 10 mg.ml⁻¹), (Rosche)

Roztok lysozymu (Serva), (c = 0,1 mg.ml⁻¹)

Isopropanol 80 % (Lachema)

Lyzační roztok s NAOH a SDS

NaOH (c = 0,05 mol.l⁻¹), (Ing. P. Lukeš)99 ml

SDS 20 % (Serva) 1 ml

6.2.1.4 Chemikálie pro PCR

Sady primerů použitých pro detekci genu zodpovědného za schopnost produkce putrescínu

Tab. 2: Charakteristika použitých primerů

Primer	5'→3' sekvence	Cílový gen	Zdroj
AgD1	CAYGTNGAYGGHSAAGG		Coton a kol. [48]
AgD2	TGTTGNGTRATRCAGTGAAT		
aguA-F1	GACTGGACDTTYAAGGGCTGG	<i>aguA</i>	Landete a kol. [49]
aguA-F2	GACTGGACDTTYAAGGCTTGG		
aguA-R	TGYTGRGTRATRCARTGR		
Agdif	TGCCCCGGTGAATTTGAA		Nanneli a kol. [50]
Agdir	TTGCGCGGTTTAGCACC		
3'	GTNTTYAAYGCNGAYAARACNTAYTTYGT	<i>odc</i>	Marcobal a kol. [51]
16'	TACRCARAATACTCCNGGNGGRTANG		
PUT1-F	TWYMAYGCNGAYAARACNTAYYYTGT		
PUT1-R	ACRCANAGNACNCCNGGRTANGG		

Chemikálie pro PCR

PCR reakční pufr + Mg; 10 x koncentrovany (Roche)

dNTP Mix; 12,5 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (JENA Bioscience)

Taq DNA Polymerasa; 5U. μl^{-1} (Roche)

H₂O pro PCR (TopBio)

MgCl₂ - roztok Mg²⁺ (TopBio)

Purifikační kit

Pro purifikaci DNA zasílané na sekvenaci byl použit QIA PCR Purification kit (QIAGEN).

6.2.1.5 Chemikálie pro elektroforézu

LE Agarosa (Lonza)

Etidiumbromid (10 mg.ml⁻¹), (TopBio)

1 x TBE pufr

Pro elektroforézu a přípravu gelu byl používán Accu GENE 10 x TBE pufr (0,89 M Tris-borát, 0,02 M EDTA, pH 8,3) ředěný podle rozpisu:

10 x TBE pufr (Lonza)	100 ml
Redestilovaná H ₂ O	900 ml

Nanášecí pufr

Pro elektroforézu byl používán Gel Loading Dye Blue (6 x), (New England BioLabs) ředěný v poměru 1:1 s vodou pro PCR.

Marker

Při stanovení velikosti amplifikovaných produktů byl využíván 100 bp DNA Ladder (c = 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) ředěný podle rozpisu:

DNA Ladder (New England BioLabs).....	20 μl
Nanášecí pufr	50 μl
H ₂ O pro PCR	180 μl

Příprava agarosového gelu

Pro přípravu agarosového gelu bylo naváženo potřebné množství agarosy a přilito 100 ml 1 x TBE pufru. Připravená směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě za občasného promí-

chání do doby varu. Po ochlazení gelu na cca 50 °C bylo přidáno 5 µl etidiumbromidu a důkladně promícháno. Agarosový gel byl nalit do elektroforetické formičky s připraveným hřebenem. Po ztuhnutí gelu byl vyjmut hřebínek a gel byl připraven k použití.

6.2.2 Izolace DNA

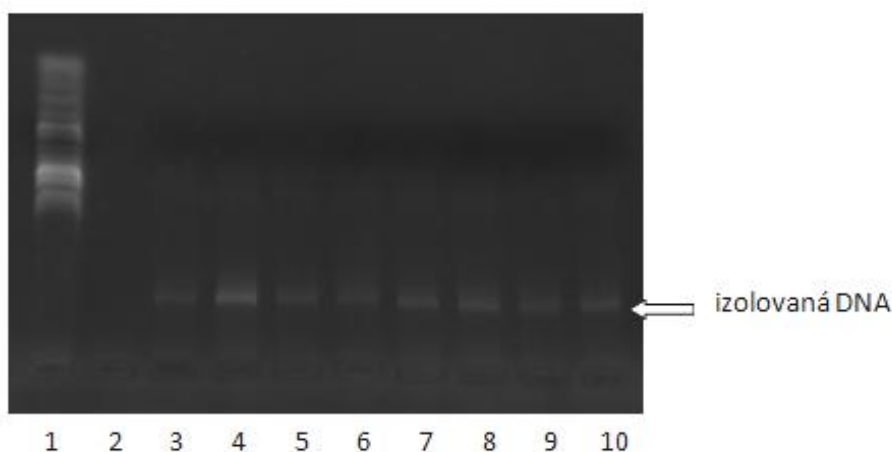
6.2.2.1 Izolace DNA z bakterií pomocí izolačních kitů

DNA byla nejprve izolována ze dvou kmenů laktobacilů (*Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* AI-2 a *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* AI-3) pomocí izolačního kitu Ultra Clean Microbial DNA.

1. Bakteriální kultury byly nejprve kultivovány každá ve dvou zkumavkách s bujónem MRS při 37 °C po dobu 24 h. Poté byly kultury promíchány a z každé zkumavky bylo odebráno čtyřikrát 1000 µl do čtyř 2 ml mikrozkuvek.
2. Následovala centrifugace po dobu 5 minut při 10 000 otáčkách za minutu.
3. Supernatant byl slit a k peletě bylo přidáno 500 µl sterilního fyziologického roztoku. Po promíchání byly slity vždy dvě stejné bakteriální suspenze do jedné mikrozkuvky a opět byla provedena centrifugace za stejných podmínek.
4. Vzniklý supernatant byl slit a dále bylo postupováno dle návodu izolačního kitu.
5. Buněčná peleta byla resuspendována ve 300 µl rozbíjecího pufru a vzniklá suspenze byla přenesena do rozbíjecí mikrozkuvky. Do rozbíjecí mikrozkuvky bylo přidáno 50 µl roztoku MD1 (obsahujícího SDS a činidla pro rozrušení buněk) a po uzavření byly mikrozkuvky vortexovány v horizontální poloze 10 minut.
6. Následně byly mikrozkuvky centrifugovány po dobu 30 sekund při 10 000 otáčkách za minutu.
7. Získaný supernatant byl přenesen do přiložených 2 ml mikrozkuvek. K supernatantu bylo přidáno 100 µl roztoku MD2 (obsahujícího reagent pro odstranění organických a anorganických sloučenin mimo DNA) a suspenze byla vortexována po dobu 5 sekund.
8. Mikrozkuvky byly inkubovány při 4 °C po dobu 5 minut a centrifugovány při pokojové teplotě 1 minutu při 10 000 otáčkách za minutu.

9. Veškerý supernatant kromě pelety byl přenesen do čisté mikroskopické mikrozkušavky a k supernatantu bylo přidáno 900 μ l roztoku MD3 (koncentrovaný solný roztok).
10. Mikroskopické mikrozkušavky byly vortexovány po dobu 5 sekund a poté byla suspenze přenesena do kolonky a centrifugována po dobu 30 sekund při 10 000 otáčkách za minutu. Tímto krokem došlo k navázání DNA na křemičitou membránu kolonky, takže přefiltrovaný roztok byl odstraněn.
11. Do kolonky bylo přidáno 300 μ l roztoku MD4 (promývací roztok na bázi etanolu) a kolonky byly centrifugovány po dobu 30 sekund při 10 000 otáčkách za minutu. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a centrifugace byla opakována.
12. Kolonka byla přenesena do čisté mikroskopické mikrozkušavky a do středu membrány kolonky bylo přidáno 50 μ l roztoku MD5 (eluční pufr). Po centrifugaci po dobu 30 sekund při 10 000 otáčkách za minutu byla kolonka odstraněna a supernatant v mikroskopické mikrozkušavce byl uchován.

Ve výsledku byly získány čtyři mikroskopické mikrozkušavky izolované DNA z *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-2 a čtyři mikroskopické mikrozkušavky s DNA izolovanou z *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3. Čistota této izolované DNA byla stanovena pomocí elektroforézy (Obr. 10).



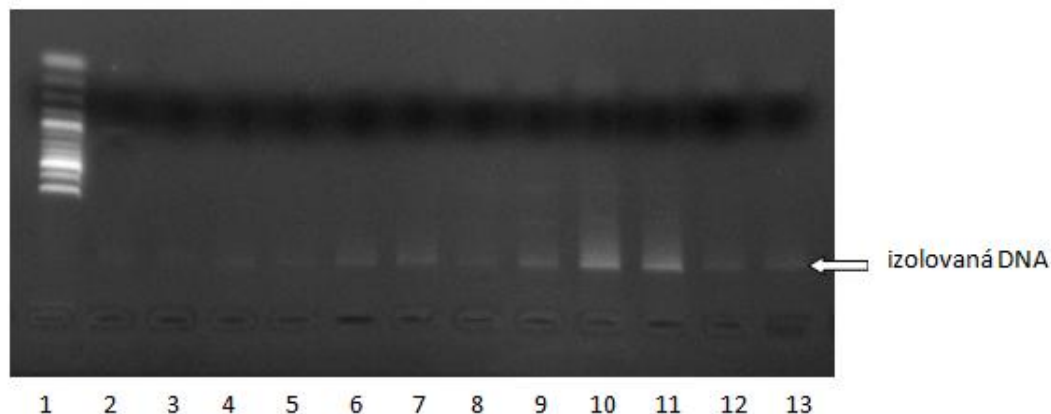
Obr. 10: Čistota izolované DNA – 1. marker 100 bp; 2. vynechána; 3. – 6. *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-2; 7. - 10. *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3

Jako druhý byl k izolaci DNA použit HighPCR Template Preparation Kit, pomocí něhož byla izolována DNA z kmenů *Lactobacillus curvatus* DEPE 15, *Lactobacillus curvatus*

DEPE 41, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 39, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 8, *Lactobacillus brevis* DEPE 24, *Lactobacillus curvatus* DEPE 42.

1. Kultury byly kultivovány v bujónu MRS při 37 °C po dobu 24 h. Po kultivaci byly zkumavky promíchány a z každé bylo odebráno po 1 ml do dvou 2 ml mikrozku-mavek. Ty byly následně centrifugovány po dobu 5 minut při 3000 otáčkách za mi-nutu.
2. Supernatant byl odstraněn a k peletě bylo přidáno 200 µl fyziologického roztoku a 5 µl roztoku lysozymu. Tato směs byla inkubována 10 minut při 37 °C (později modifikováno na 20 h při 37 °C).
3. Po inkubaci bylo přidáno 200 µl vazebného pufru (Binding buffer) a 40 µl proteina-sy K. Po promíchání byla směs inkubována 10 minut při 70 °C.
4. K směsi bylo přidáno 100 µl isopropanolu a po promíchání byla směs nepipetována do kolonky. Následně byla směs centrifugována 1 minutu při 8000 otáčkách za mi-nutu.
5. Supernatant byl odstraněn a do kolonky bylo přidáno 500 µl inhibičního pufru (Inhibitor Removal buffer). Směs byla centrifugována opět 1 minutu při 8000 otáč-kách za minutu. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn.
6. Do kolonky bylo přidáno 500 µl promývacího pufru (Wash buffer) a směs byla cen-trifugována za stejných podmínek. Supernatant, jenž prošel filtrem, byl opět odstra-něn a kolonka byla centrifugována ještě jednou 10 sekund při maximálních otáč-kách.
7. Kolonka byla přemístěna do čisté 2 ml mikrozku-mavky a bylo přidáno 200 µl eluč-ního pufru (Elution buffer) předehřátého na 70 °C. Směs byla poté centrifugována po dobu 1 minuty při 8000 otáčkách za minutu. Kolonky byly odstraněny a superna-tant byl uchován.

Takto byly získány vždy dva vzorky izolované DNA od každé z použitých bakteriálních kultur. V bodě 2 bylo nutné provést modifikaci, neboť inkubace směsi s lysozymem po dobu 10 minut byla nedostačující. DNA se podařilo izolovat až po prodloužení doby inkubace s lysozymem na 20 hodin při 37 °C. Čistota takto izolované DNA byla stanovena pomocí elektroforézy (Obr. 11).



Obr. 11: Čistota izolované DNA – 1. marker 100 bp; 2. – 3. *L. curvatus* DEPE 15; 4. – 5. *L. curvatus* DEPE 41; 6. – 7. *L. curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 39; 8. – 9. *L. curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 8; 10. – 11. *L. brevis* DEPE 24; 12. – 13. *L. curvatus* DEPE 42

6.2.2.2 Příprava hrubého lyzátu bakteriální kultury

K získání bakteriální DNA byly u některých kmenů (*Lactobacillus curvatus* DEPE 15, *Lactobacillus curvatus* DEPE 41, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 39, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 8, *Lactobacillus brevis* DEPE 24, *Lactobacillus curvatus* DEPE 42) použity také postupy vycházející z metod popsanych v disertační práci Prodělalová (2004) [44].

Příprava hrubého lyzátu pomocí povaření a přídavku proteinasy K

Do 2 ml mikrokumavky byl přenesen 1 ml bakteriální kultury a suspenze byla centrifugována při teplotě 4 °C po dobu 5 minut při 14 000 otáčkách za minutu.

Získaná peleta byla promývána 500 µl sterilní destilované vody a směs byla znovu centrifugována. K promyté peletě bylo přidáno 400 µl sterilní destilované vody a suspenze byla inkubována 5 minut při 100 °C.

Po inkubaci bylo přidáno 0,6 µl proteinasy K a směs byla inkubována 10 minut při 55 °C. Poté byla směs inkubována ještě po dobu 5 minut při 100 °C.

Příprava hrubého lyzátu povařením bakteriální suspenze

1 ml bakteriální kultury byl centrifugován ve 2 ml mikrozkuhavce po dobu 5 minut při 14 000 otáčkách za minutu. Poté byl dvakrát promyt 500 μ l fyziologického roztoku a po každé centrifugován za stejných podmínek.

Po promytí bylo k peletě přidáno 600 μ l sterilní destilované vody a směs byla inkubována 15 minut při 100 °C.

Příprava hrubého lyzátu bakteriálních kultur alkalickou lyzí

Nejprve byl centrifugován 1 ml bakteriální kultury po dobu 5 minut při teplotě 4 °C a 14 000 otáčkách za minutu. Sediment byl dvakrát promyt fyziologickým roztokem a centrifugován opět za stejných podmínek.

K sedimentu bylo přidáno 60 μ l lyzačního roztoku s NaOH a SDS a směs byla inkubována 15 minut při 100 °C. Po inkubaci bylo přidáno 540 μ l sterilní destilované vody.

Použití kolonií bakteriální kultury na plotnách přímo pro PCR

Pro získání templátové DNA byly u některých kmenů (*Lactobacillus curvatus* DEPE 15, *Lactobacillus curvatus* DEPE 41, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 39, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 8, *Lactobacillus brevis* DEPE 24, *Lactobacillus curvatus* DEPE 42) použit také postup, kdy při přípravě mastermixu byla použita přímo bakteriální kultura.

Do 2 ml mikrozkuhavky bylo nepipetováno 90 μ l sterilní vody pro PCR a 10 μ l PCR reakčního pufru. To tohoto roztoku byla resuspendována bakteriální kolonie.

Po promíchání byla suspenze inkubována 20 minut při 95 °C a následně centrifugována 60 s při 14 500 otáčkách za minutu. Supernatant byl odpipetován do čisté mikrozkuhavky a uchován pro PCR.

Všechny vzorky DNA získané pomocí těchto čtyř postupů byly před použitím pro PCR naředěny dle uvedeného rozpisu:

Hrubý lyzát	10 μ l
H ₂ O pro PCR.....	90 μ l

Po provedení PCR byly výsledky těchto postupů získání DNA podrobeny elektroforéze.

6.2.3 Vlastní provedení PCR

6.2.3.1 Základní rozpis směsi pro PCR (master mix)

V průběhu experimentu bylo použito různé složení amplifikační směsi z důvodu optimalizace metody. Složení vždy vycházelo z komponent uvedených v základním rozpisu mastermixu pro PCR:

H ₂ O pro PCR	11,20 µl
PCR reakční pufr	1,50 µl
dNTP mix.....	0,60 µl
primery	2 x 0,30 µl
<i>Taq</i> polymerasa.....	0,15 µl
Templátová DNA.....	1,00 µl

6.2.3.2 Program pro PCR

Veškeré amplifikace PCR probíhaly v objemu 15,05 µl. Syntéza DNA fragmentů byla prováděna na termocykleru PTC-100 MJ Research. IMC. (USA) s vyhříváním víkem. V termocykleru byl nastaven následující program:

Denaturace 94 °C 10 minut

17 cyklů:

94 °C 30 sekund		opakováno 2x
62 °C 60 sekund		
72 °C 60 sekund		

94 °C 30 sekund		(při každém cyklu vždy sníženo o 1 °C)
61 – 47 °C 60 sekund		
72 °C 60 sekund		

Závěrečná extenze 72 °C 5 minut

6.2.4 Elektroforéza a detekce DNA

K ověření kvality izolované DNA a detekci PCR produktů byla použita elektroforéza Scie-Plas (Velká Británie) na agarosovém gelu. Jako standard pro určení velikosti amplifikovaných fragmentů byl vždy do první jamky gelu nanesen 100 bp DNA marker v množství 12 μ l. Po ukončení elektroforézy byly výsledky detekovány na UV transluminátoru SYNGENE (Velká Británie).

6.2.4.1 Elektroforéza izolované DNA

DNA izolovaná pomocí izolačních kitů byla podrobena elektroforéze pro stanovení čistoty (Obr. 10 a 11). Pro tato stanovení byl připraven 0,8 % agarosový gel a vzorky DNA byly naředěny dle rozpisu:

DNA	5 μ l
H ₂ O pro PCR.....	5 μ l
Nanášecí pufr	3 μ l

Připravené vzorky byly nanесeny na gel v elektroforetické vaničce v množství 12 μ l. Gel byl zalit 1 x TBE puřrem po rysku a byla provedena elektroforéza po dobu 30 minut při 90 V.

6.2.4.2 Elektroforéza produktů PCR

Pro detekci amplifikovaných fragmentů DNA byl připravován 1,5 % agarosový gel. K produktům PCR byly před elektroforézou přidány 3 μ l nanášecího puřru. Po promíchání a centrifugaci po dobu 30 sekund při 10 000 otáčkách za minutu, byly vzorky nanесeny na gel v množství 12 μ l. Gel byl zalit 1 x TBE puřrem a poté byla spuřtěna elektroforéza po dobu 60 minut při 90 V. U produktů amplifikovaných pomocí primerů agdir/agdif byla elektroforéza prováděna pouze po dobu 30 minut. Důvodem byla menší velikost amplifikovaných fragmentů (přibližně 90 bp) v porovnání s amplikony produkovanými ostatními použitými primery (přibližně 600 bp).

6.3 Purifikace DNA na sekvenaci

Purifikace byla provedena dle návodu purifikačního kitu QIA PCR Purification (Roche):

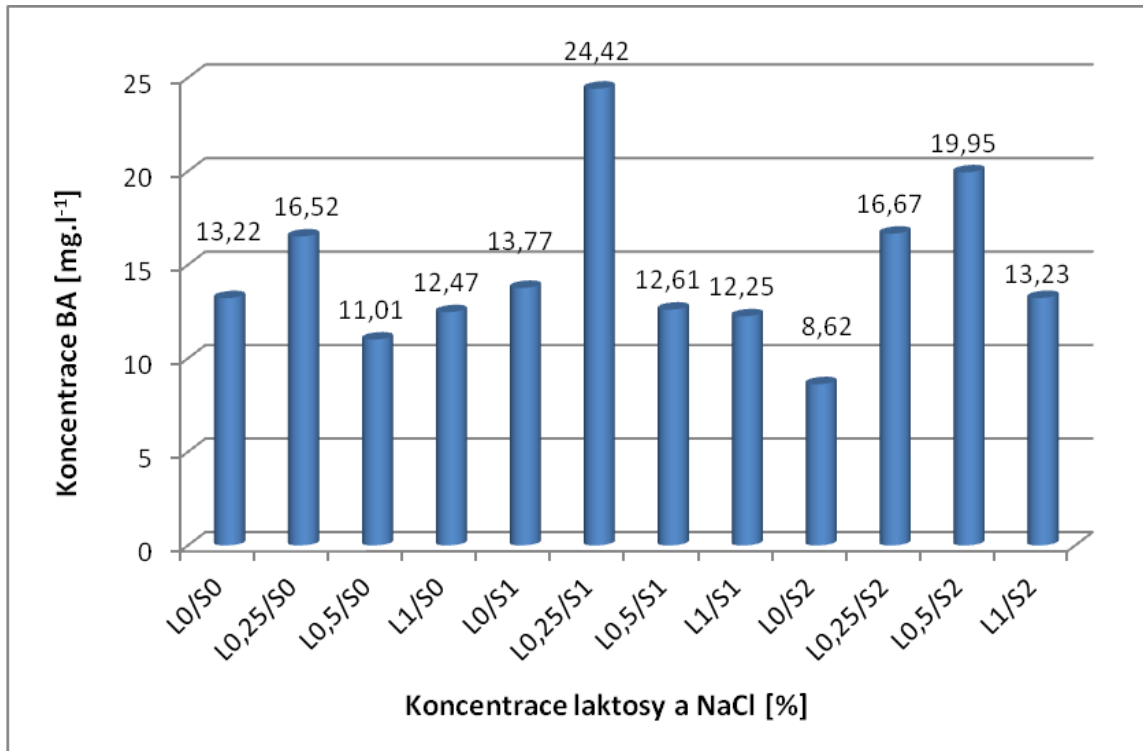
1. Do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky bylo přeneseno 15 μ l reakčního produktu (produktu PCR) a bylo přidáno 75 μ l DF pufru.
2. Směs byla přenesena na kolonku umístěnou ve sběrné mikrozkuhavce a centrifugována 1 minutu při 10 000 otáčkách za minutu.
3. Supernatant byl odstraněn a do kolonky bylo přidáno 600 μ l promývacího pufru. Kolonka byla ponechána v klidu po dobu 1 minuty a poté byla centrifugována 1 minutu při 10 000 otáčkách za minutu. Po odstranění supernatantu byla kolonka centrifugována znovu po dobu 3 minuty.
4. Po přenesení kolonky do 1,5 ml mikrozkuhavky bylo do kolonky nanášeno 30 μ l elučního pufru. Kolonka s elučním pufrém byla ponechána v klidu 2 minuty a poté centrifugována po dobu 2 minut při 10 000 otáčkách za minutu.

7 VÝSLEDKY

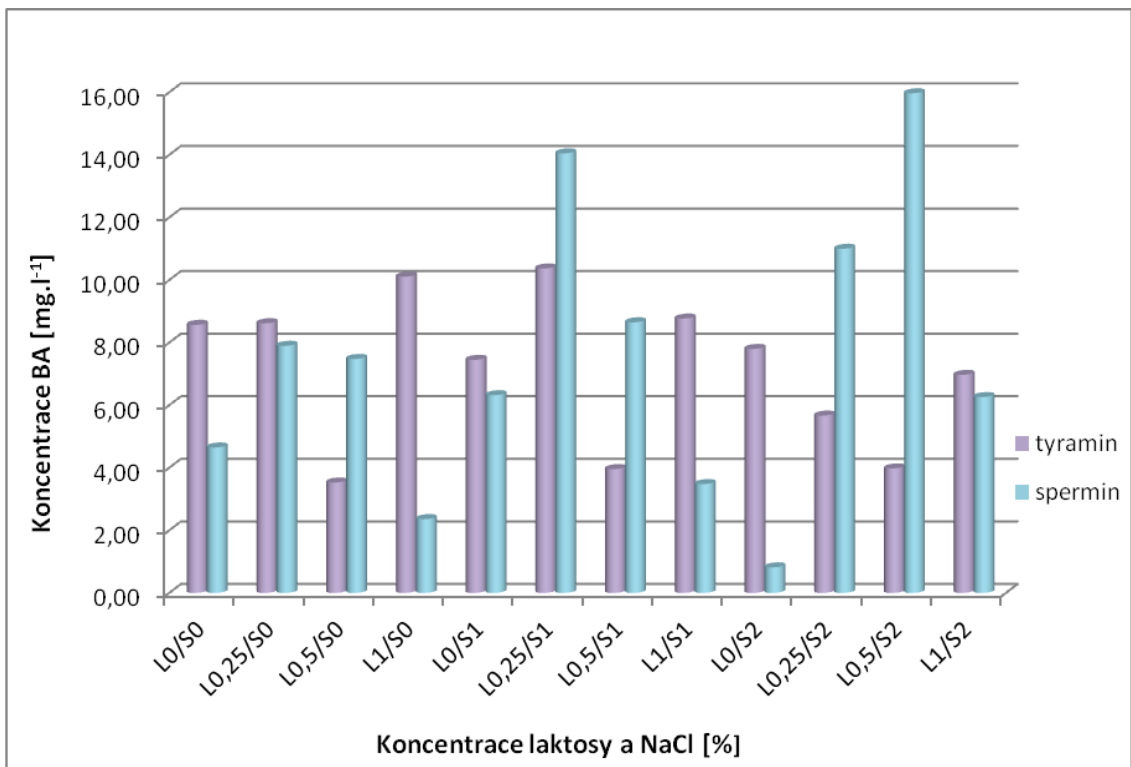
7.1 Chromatografické stanovení produkce biogenních aminů v závislosti na vnějších podmínkách

Pomocí vysokoúčinné chromatografie byla stanovena produkce biogenních aminů (putrescinu, kadaverinu, tyraminu, spermidinu a sperminu) bakteriemi *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 a *B. animalis* subsp. *lactis* B25. Tvorba BA byla sledována při různém složení dekarboxylačního média obsahujícího jako prekurzory pro tvorbu BA aminokyseliny ornitin, arginin tyrosin a lysin. Produkce BA byla sledována za působení těchto vnějších faktorů: pH 4,5 a 5,0, koncentrace NaCl 0,00; 1,00; 2,00 % (w/v), koncentrace laktosy 0,00; 0,25; 0,50; 1,00 % (w/v). Testovány byly všechny možné kombinace uvedených faktorů. Získané hodnoty produkce biogenních aminů byly zprůměrovány (Příloha PI) a vyhodnoceny ve formě grafů.

Kmen *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM239 byl kultivován pouze za podmínek působení pH 4,5. Ve všech vzorcích byly při chromatografickém stanovení detekovány pouze dva biogenní aminy (tyramin a spermin). Tento kmen produkoval nejvíce BA v kultivačním mediu obsahujícím 0,25 % (w/v) laktosy v kombinaci s 1,00 % (w/v) soli. Nejméně biogenních aminů produkoval při použití 2,00 % (w/v) přídavku soli. Celková produkce BA tímto kmenem se pohybovala v rozmezí 8,62 – 24,42 mg.l⁻¹ (Obr. 12). Spermin byl produkován v rozmezí hodnot 0,82 – 15,97 mg.l⁻¹ (Obr. 13), kdy nejnižší produkce byla zaznamenána při přídavku 2,00 % (w/v) soli a nejvyšší při kombinaci 2,00 % (w/v) soli s 0,50 % (w/v) laktosy. Produkce tyraminu se pohybovala v rozmezí hodnot 3,53 – 10,37 mg.l⁻¹ (Obr. 13). Vliv vnějších faktorů na produkci tohoto biogenního aminu nebyl tedy tak patrný, jako u produkce sperminu. Nejvyšší hodnoty byly stanoveny při kombinaci 1,00 % (w/v) přídavku soli a 0,25 % (w/v) laktosy. Nejnižší produkce pak byla při 0,50 % (w/v) laktosy v kultivačním mediu.



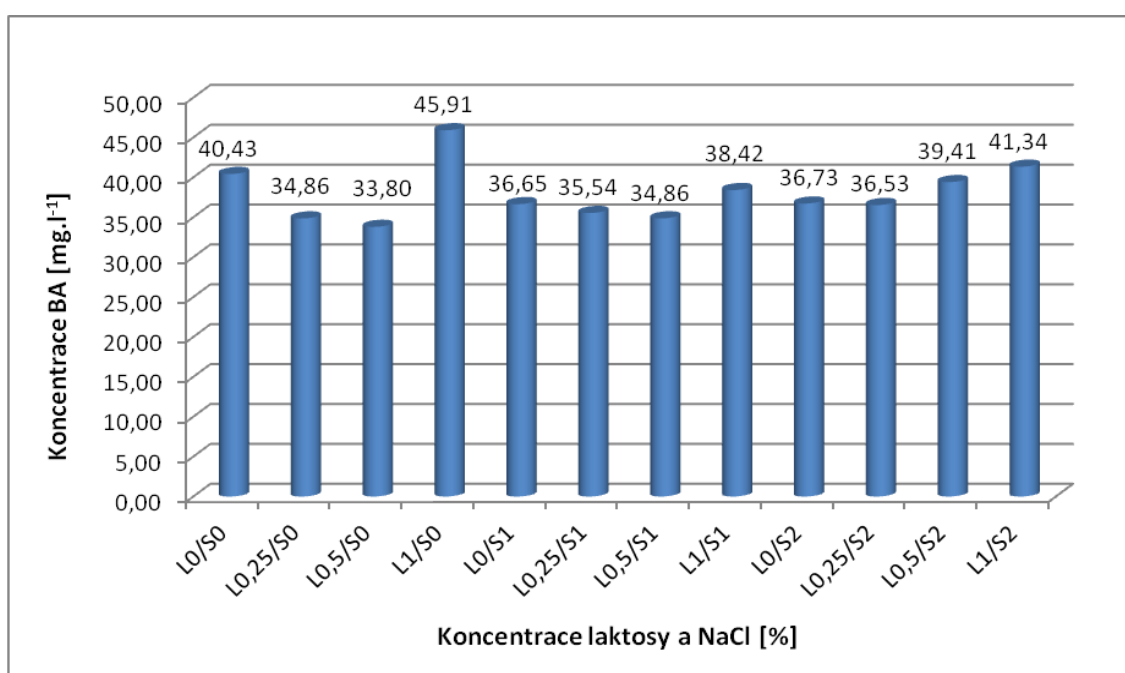
Obr. 12: Celková produkce BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM239 při pH 4,5 s přidavkem různých koncentrací laktosy a NaCl.



Obr. 13: Produkce jednotlivých BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM239 při pH 4,5 s přidavkem různých koncentrací laktosy a NaCl.

V případě bakteriálního kmeny *B. animalis* subsp. *lactis* B25 byla kultivace prováděna při pH 4,5 a 5,0. V obou případech byla zaznamenána produkce putrescinu, kadaverinu, tyraminu, spermidinu a sperminu. Hodnoty celkové produkce biogenních aminů tímto kmenem při pH 4,5 jsou uvedeny na Obrázku 14, z něhož vyplývá, že tvorba BA se v závislosti na vnějších vlivech příliš neměnila. Nejvyšší produkce biogenních aminů ($45,91 \text{ mg.l}^{-1}$) při pH 4,5 byla detekována u 1,00 % (w/v) přídavku laktosy.

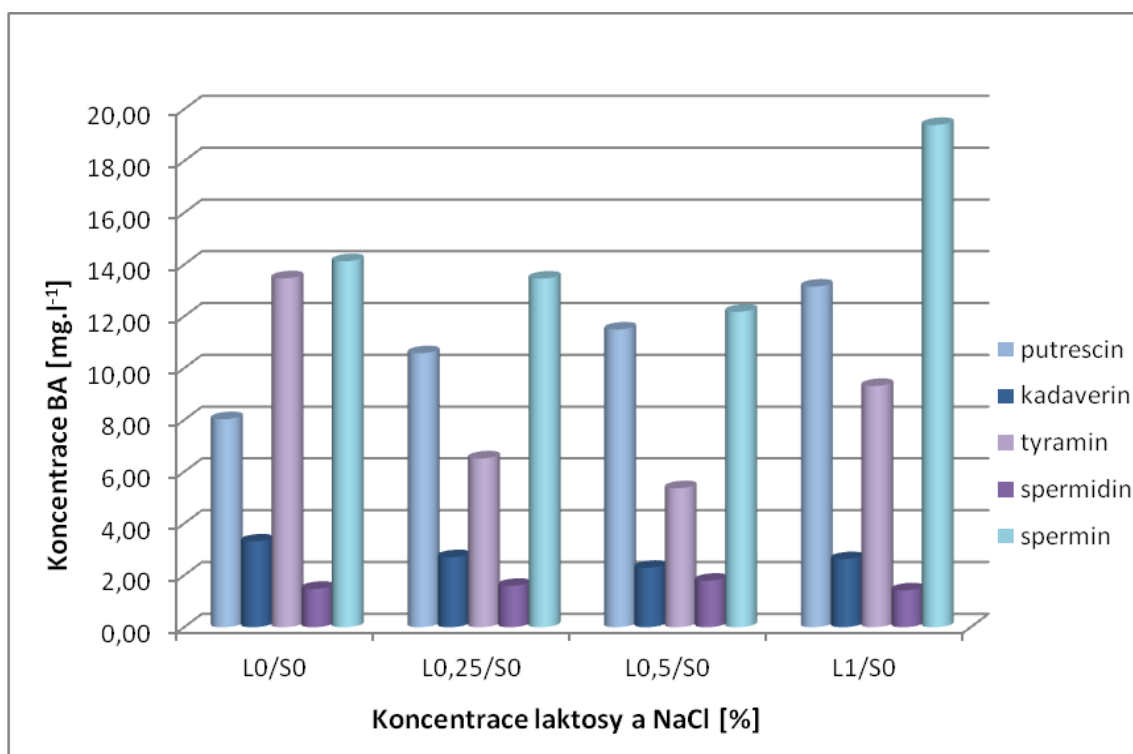
Celková produkce biogenních aminů při pH 4,5 byla u kmeny *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B25 přibližně dvakrát vyšší než u *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM239.



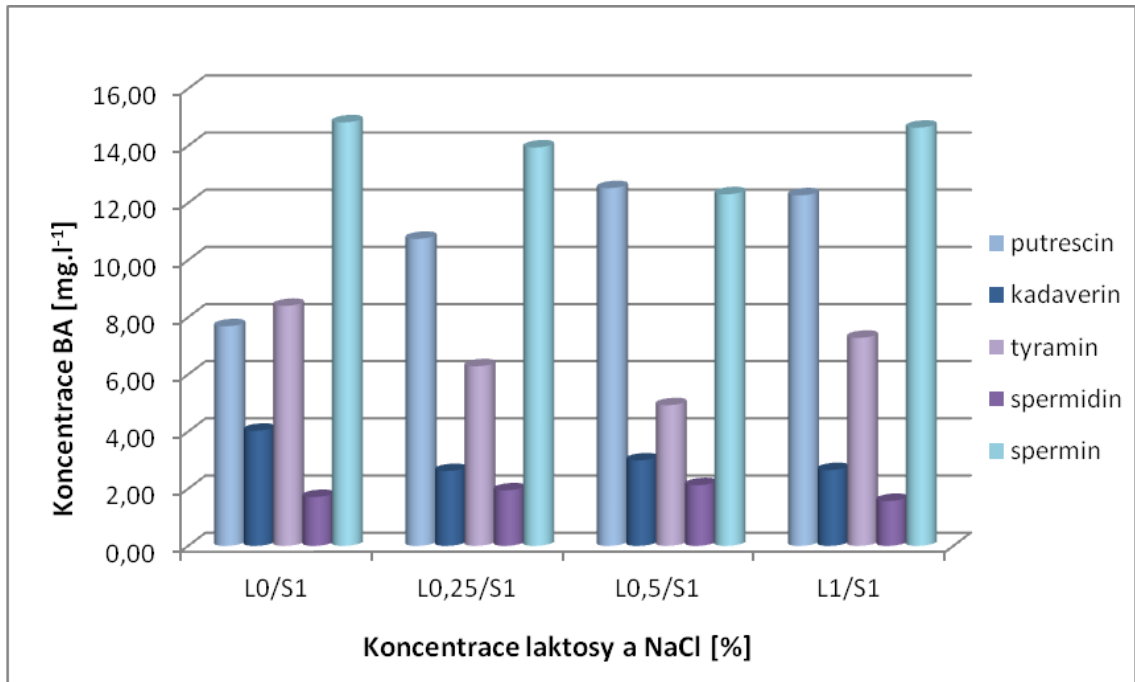
Obr. 14: Celková produkce BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH 4,5 s přídavkem různých koncentrací laktosy a NaCl.

Pro přehlednost byla tvorba jednotlivých BA při pH 4,5 rozdělena do tří grafů podle rozdílné koncentrace soli v kultivačním mediu (Obr. 15 – 17). Z detekovaných BA byl v největší míře produkován spermin ($12,18 - 19,39 \text{ mg.l}^{-1}$), nejméně pak spermidin ($1,42 - 2,20 \text{ mg.l}^{-1}$) a kadaverin ($2,29 - 4,03 \text{ mg.l}^{-1}$). Spermin byl nejvíce produkován při 1,00 % (w/v) přídavku laktosy a nejméně při 0,50 % (w/v) přídavku laktosy. Tvorba spermidinu a kadaverinu nebyla působením vnějších faktorů ovlivněna. Při nulovém a 1,00 % (w/v) přídavku soli byl pozorován mírný nárůst tvorby putrescinu při zvyšující se koncentraci laktosy (Obr. 15 a 16). V případě 2,00 % (w/v) přídavku soli nebyla tvorba

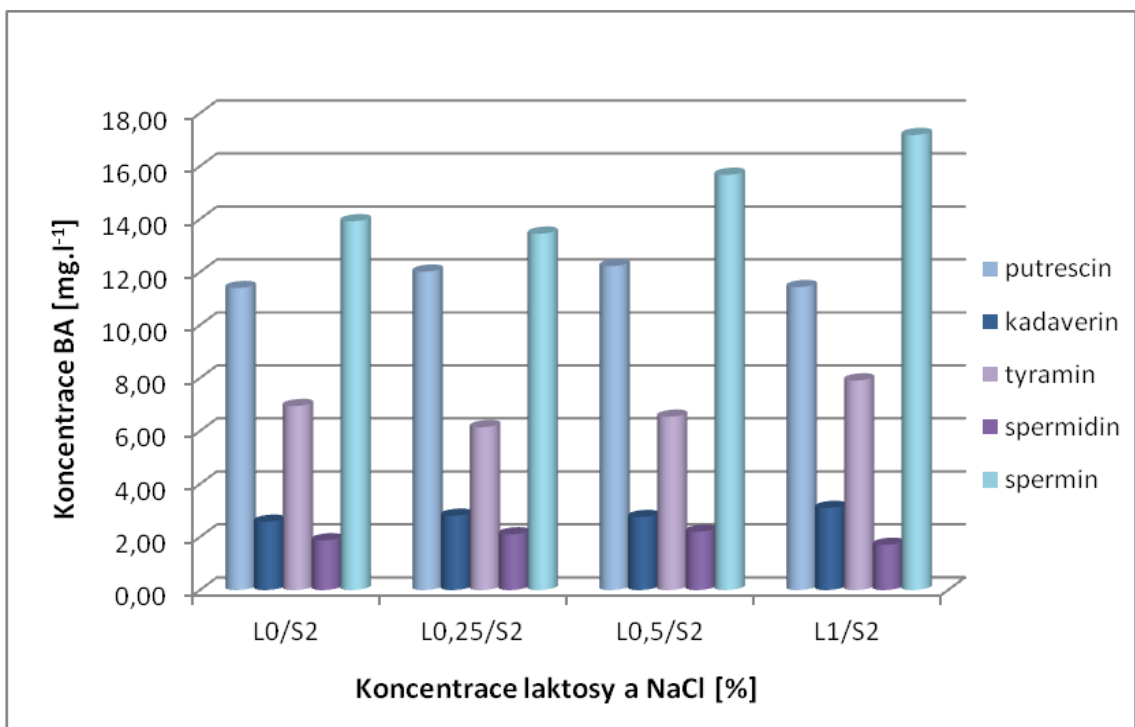
putrescinu koncentrací laktosy ovlivněna (Obr. 17). Nejvyšší hodnoty putrescinu ($13,15 \text{ mg.l}^{-1}$) byly zaznamenány při přidavku 1,00 % (w/v) laktosy. Nejmenší produkce putrescinu byla stanovena v původním dekarboxylačním médiu (tzn. bez přidavku soli a laktosy). Obdobně tomu bylo také u tyraminu, kdy nejvyšší hodnoty ($13,47 \text{ mg.l}^{-1}$) bylo dosaženo v nezměněném dekarboxylačním médiu. Nejméně byl tyramin produkován v mediu obsahujícím 1,00 % (w/v) soli a 0,50 % (w/v) laktosy.



Obr. 15: Produkce jednotlivých BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH 4,5 v závislosti na rostoucí koncentraci laktosy.

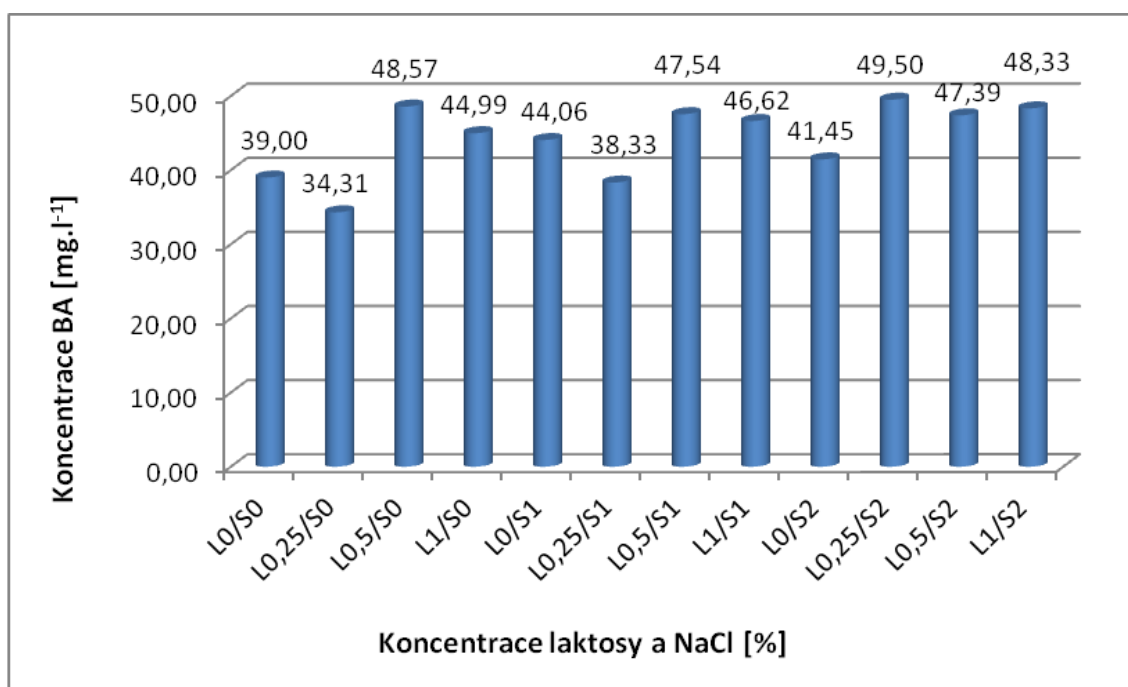


Obr. 16: Produkce jednotlivých BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH 4,5, 1,00 % (w/v) koncentraci NaCl v závislosti na rostoucí koncentraci laktosy.



Obr. 17: Produkce jednotlivých BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH 4,5, 2,00 % (w/v) koncentraci NaCl v závislosti na rostoucí koncentraci laktosy.

Hodnoty celkové produkce biogenních aminů kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH 5,0 se pohybovaly v rozmezí 34,31 – 49,50 mg.l⁻¹ (Obr. 18). Zvýšení pH mělo za následek mírný nárůst produkce BA ve srovnání s kultivací tohoto kmene při pH 4,5. Vyjímkou byla produkce biogenních aminů v nezměněném dekarboxylačním mediu a mediu obsahujícím 0,25 % (w/v) laktosu, kde byly rozdíly v produkci téměř zanedbatelné.

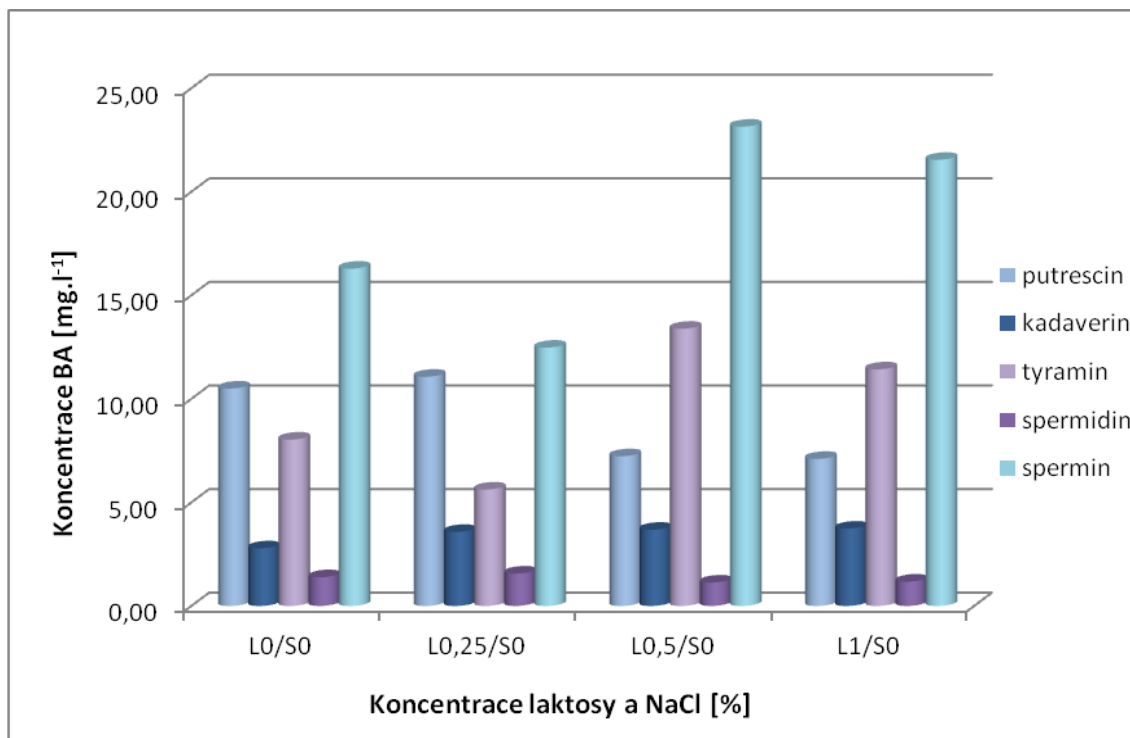


Obr. 18: Celková produkce BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH 5,0 s přidávkou různých koncentrací laktosu a NaCl

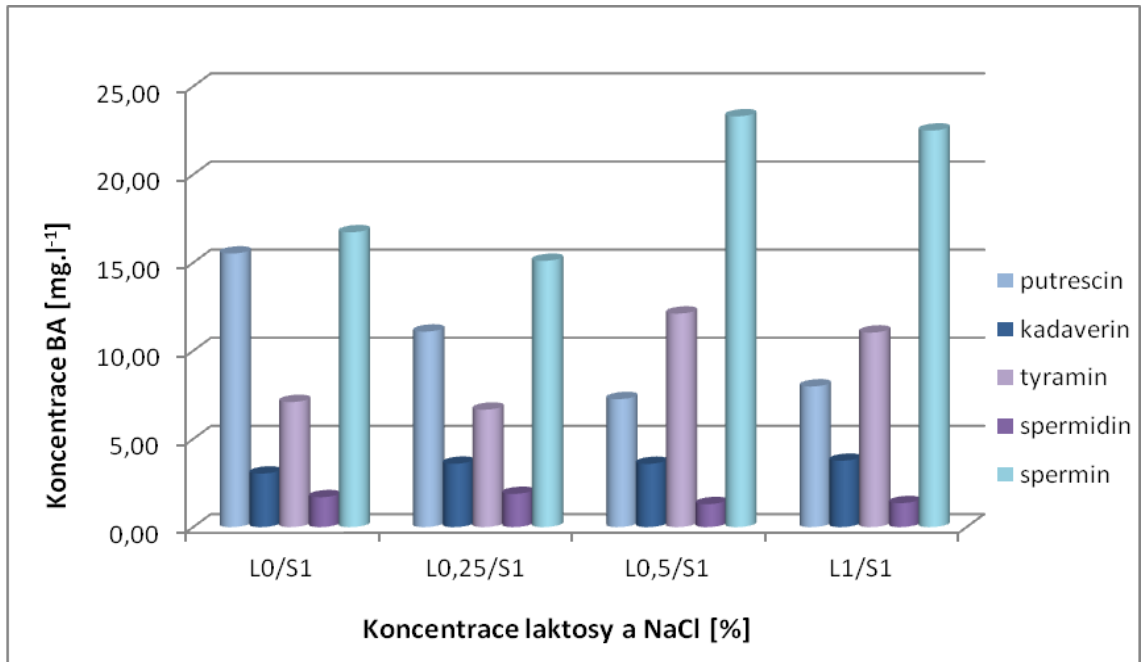
Pro přehlednost byla tvorba jednotlivých BA při pH 5,0 opět rozdělena do tří grafů podle rozdílné koncentrace soli v kultivačním mediu (Obr. 19 až 21). V největší míře byl produkován spermin (12,47 – 32,36 mg.l⁻¹). Nejvyšší tvorba byla zaznamenána při kombinaci 2,00 % (w/v) přidavku soli s 1,00 % (w/v) laktosu. Hodnoty sperminu v množství vyšším než 20,00 mg.l⁻¹ byly detekovány u všech vzorků obsahujících 0,50 a 1,00 % (w/v) laktosu a také v případě kombinace 0,25 % (w/v) laktosu s 2,00 % (w/v) soli. Putrescin byl při pH 5,0 nejvíce produkován v dekarboxylačním mediu bez obsahu laktosu anebo při koncentraci laktosu 0,25 % (w/v). Produkce putrescinu se pohybovala v rozmezí 7,10 – 15,52 mg.l⁻¹. Tvorba tyraminu byla zaznamenána v rozmezí 5,62 – 13,39 mg.l⁻¹. Nejvyšší hodnota byla stanovena při 0,50 % (w/v) přidavku laktosu a nejnižší hodnota při 0,25 % (w/v) přidavku laktosu. Nejméně byly produkovány biogenní aminy spermidin (1,18 – 1,93, mg.l⁻¹) a ka-

daverin (2,78 – 3,78 mg.l⁻¹). Tvorba spermidinu a kadaverinu nebyla působením vnějších faktorů ovlivněna ani při pH 5,0.

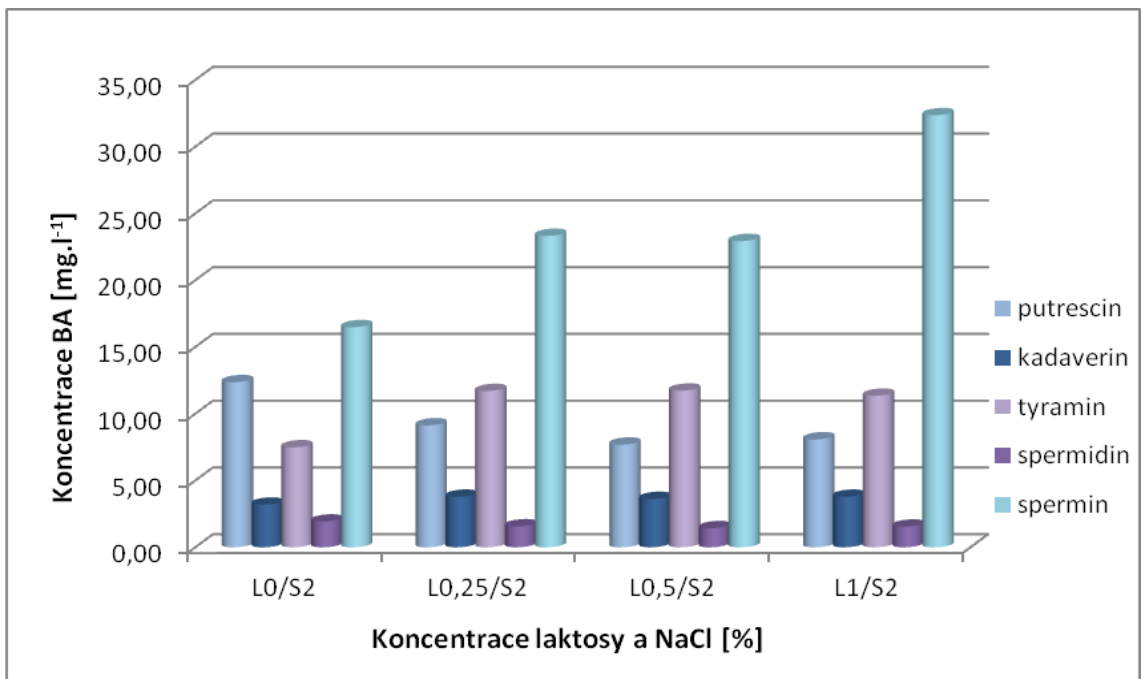
Při porovnání všech vzorků bylo zjištěno, že nejvíce biogenních aminů produkoval kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B25, a to při pH 5,0 za přídavku laktosy 0,25 % (w/v) a soli 2,00 % (w/v). Z detekovaných biogenních aminů byl nejvíce produkován spermin a nejméně spermidin.



Obr. 19: Produkce jednotlivých BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH 5,0 v závislosti na rostoucí koncentraci laktosy.



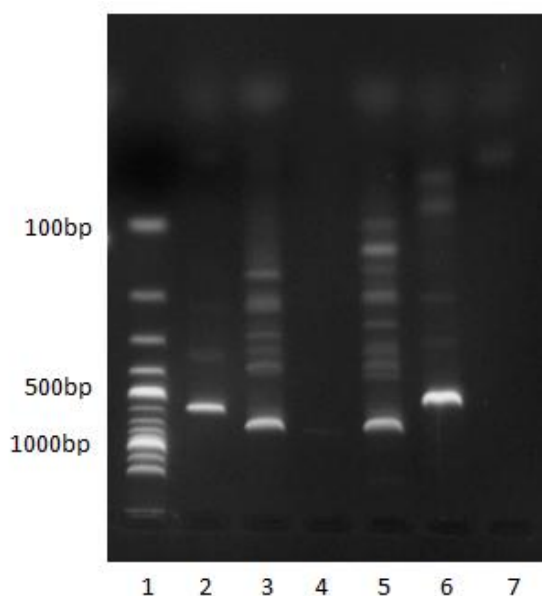
Obr. 20: Produkce jednotlivých BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH 5,0, 1,00 % (w/v) koncentraci NaCl v závislosti na rostoucí koncentraci laktosy.



Obr. 21: Produkce jednotlivých BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH 5,0, 2,00 % (w/v) koncentraci NaCl v závislosti na rostoucí koncentraci laktosy.

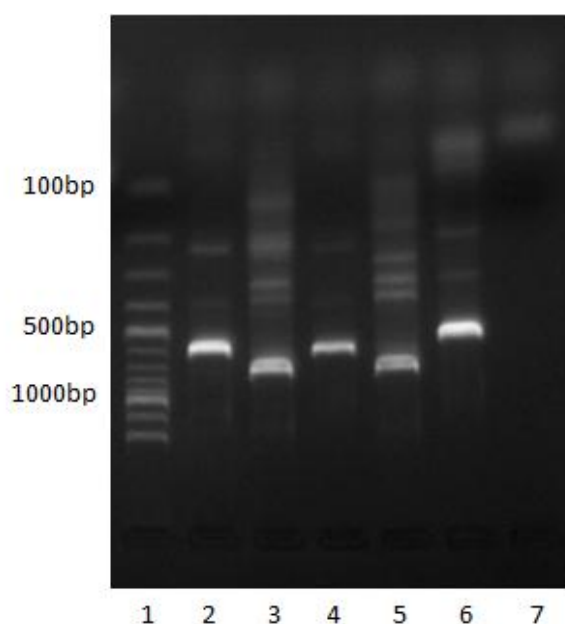
7.2 Možnosti detekce genu zodpovědného za schopnost tvorby putrescinu u laktobacilů

U kmenů *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* AI-2 a *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3 byl vždy používán základní rozpis master mixu. Na těchto kmenech byly testovány primery určené k detekci genu pro tvorbu enzymu agmatin-deiminasy (AgD1, AgD2; aguA-R, aguA-F1, aguA-F2; agdir, agdif) a primery pro detekci genu zodpovědného za produkci ornitindekarboxylasy (3',16'; PUT1-R, PUT1-F) (Příloha P II). Amplifikované produkty PCR byly zaznamenány u obou kmenů pouze v případě použití primerů AgD1 a AgD2, aguA-R a aguA-F1. Při použití kombinace primerů aguA-R a aguA-F2 bylo vytvářeno více nespecifických produktů, proto tato kombinace nebyla již v dalších stanoveních používána. Amplifikovaný produkt byl zaznamenán také v případě primerů agdir a agdif, avšak pouze u kmenu *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-2. Jako nejlepší se tedy jevily produkty získané pomocí primerů AgD1, AgD2 a aguA-R, aguA-F1. S těmito primery byly připraveny vzorky o dvojnásobném množství, pro zaslání na sekvenaci. Po detekci amplifikovaných fragmentů s primery aguA-F1/aguA-R (Obr. 22), byl zjištěn výskyt nespecifických produktů. Mastermix pro sekvenaci byl tedy připraven znovu.



Obr. 22: Detekce amplifikovaných fragmentů: 1. – 100 bp marker; 2. – *L. curvatus* AI-2 s primery AgD1/AgD2; 3. – *L. curvatus* AI-2 s primery aguA-F1/aguA-R; 5. – *L. curvatus* AI-3 s primery aguA-F1/aguA-R; 6. - pozitivní kontrola; 7. – negativní kontrola

Po detekci produktů PCR (Obr. 23) byly vybrány pro sekvenaci pouze amplikony získané amplifikací DNA kmenů *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* AI-2 a *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3 s primery AgD1/AgD2. Produkty získané při použití primerů aguA-F1/aguA-R byly znečištěny vysokým výskytem nespecifických fragmentů a z toho důvodu nemohly být zaslány na sekvenaci.



Obr. 23: Detekce amplifikovaných fragmentů pro sekvenaci: 1. – 100 bp marker; 2. – *L. curvatus* AI-2 s primery AgD1/AgD2; 3. – *L. curvatus* AI-2 s primery aguA-F1/aguA-R; 4. – *L. curvatus* AI-3 s primery AgD1/AgD2; 5. – *L. curvatus* AI-3 s primery aguA-F1/aguA-R; 6. - pozitivní kontrola; 7. – negativní kontrola

Vybrané produkty byly následně purifikovány pomocí kitu QIA PCR Purification. Po provedení purifikace byly produkty zaslány na sekvenaci do Ústavu molekulární biologie rostlin, Akademie věd České republiky v Českých Budějovicích. Získané sekvence byly vizualizovány (v programu SEQUENCE SCANNER SOFTWARE v 1. 0.) (Obr. 24 a 25) a srovnány pomocí nástroje Blast (National Centre for Biotechnology Information - NCBI) s veřejně dostupnými databázemi. Čistá sekvence získaného produktu byla ve vizualizaci znázorněna modrou barvou (Obr. 24 a 25).

1	CCGMWTWAAK	RUGGCTTTTA	TCTGAGGACG	CRATCCTCAC	ATGAGCWWAG	AGGACATTGA	AAATAAACTT	AAAGAACATT	TGAATGCTGA	AAAAATTCTT	TGGCTTGGGG	ATGGAATTGA	120
121	CCCA S AAGAA	ACAAACGGTC	ATGTGGATGA	TGTTGCTTGC	TTCGTAGCAC	CAGGGGAAGT	TGCMTGCATT	TATACTGARG	ATGAGAAGTC	ACCTTTTTAT	GAAGCAGCAC	AAGATGCCTA	240
241	TAAACGCTTG	AGCCAAATGA	CAGATGCTAA	AGGACGTCAA	CTCAAAGTTC	ATAAATTGAC	TTGTCCAGCT	AAAAATGTAA	CGATTA AAAAA	ACAATTTAGA	ATTGATACAG	TTGAAGGAAC	360
361	AATGCCACGT	GAAGACGGAG	ATATTTGTAT	TGCTTCATAT	ATGAATTTCT	TGATTACAAA	CAAAGGAGTT	ATCGTACCAC	AATACGGTGA	TGAAAAWGAR	GCTCTARCAT	TWAAAAAARK	480
481	TCYARAAAAF	KTTTCRAAC	CSSRAAAAAK	TTGGS S GTGAA	CACTGTTKWA	AAKWKKT TTT	TGGGGGGGGG	AAAAATTTCW	TGGWYCC CCC	CMCAAAA			577

Obr. 24: Sekvence genu *aguA* detekovaná u kmenu *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-2

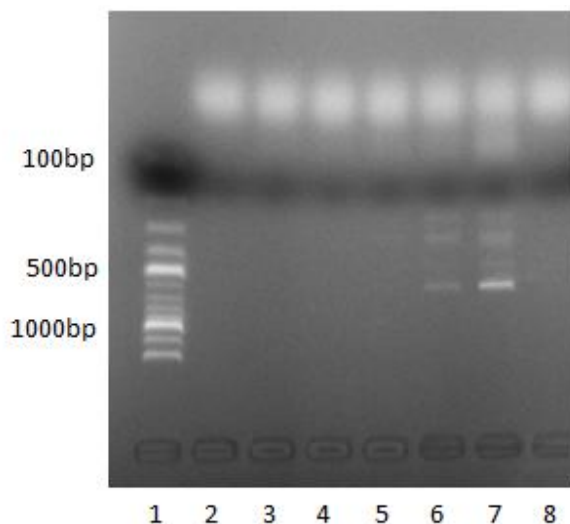
1	CCGMWTWAAK	RUGGCTTTTA	TCTGAGGACG	CRATCCTCAC	ATGAGCWWAG	AGGACATTGA	AAATAAACTT	AAAGAACATT	TGAATGCTGA	AAAAATTCTT	TGGCTTGGGG	ATGGAATTGA	120
121	CCCA S AAGAA	ACAAACGGTC	ATGTGGATGA	TGTTGCTTGC	TTCGTAGCAC	CAGGGGAAGT	TGCMTGCATT	TATACTGARG	ATGAGAAGTC	ACCTTTTTAT	GAAGCAGCAC	AAGATGCCTA	240
241	TAAACGCTTG	AGCCAAATGA	CAGATGCTAA	AGGACGTCAA	CTCAAAGTTC	ATAAATTGAC	TTGTCCAGCT	AAAAATGTAA	CGATTA AAAAA	ACAATTTAGA	ATTGATACAG	TTGAAGGAAC	360
361	AATGCCACGT	GAAGACGGAG	ATATTTGTAT	TGCTTCATAT	ATGAATTTCT	TGATTACAAA	CAAAGGAGTT	ATCGTACCAC	AATACGGTGA	TGAAAAWGAR	GCTCTARCAT	TWAAAAAARK	480
481	TCYARAAAAF	KTTTCRAAC	CSSRAAAAAK	TTGGS S GTGAA	CACTGTTKWA	AAKWKKT TTT	TGGGGGGGGG	AAAAATTTCW	TGGWYCC CCC	CMCAAAA			577

Obr. 25: Sekvence genu *aguA* detekovaná u kmenu *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3

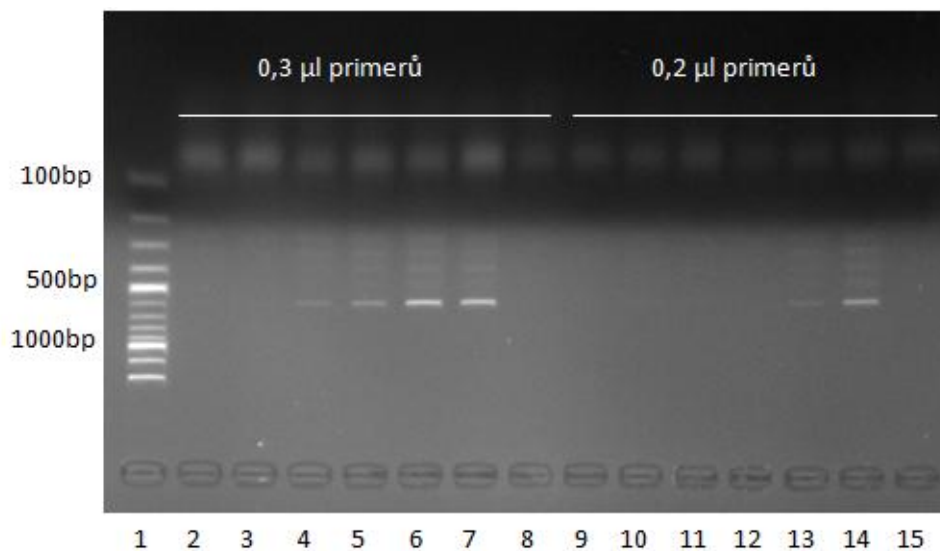
Pomocí nástroje Blast byla u ampliconů získaných z kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* AI-2 nalezena 98 % shoda s genem *aguA* u bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147 (Příloha P III). Shoda genu *aguA* byla z 97 % nalezena také u bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56 a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I11403 (Příloha P III).

Pomocí nástroje Blast byla u amplifikovaných fragmentů DNA kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* AI-3 zjištěna 97 % shoda s genem *aguA* u bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147 a 96 % shoda s tímto genem u bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56 (Příloha P IV).

Při dalších stanoveních již byly využívány pouze primery AgD1 a AgD2. S využitím těchto primerů pro detekci genu *aguA* u dalších kmenů laktobacilů (*Lactobacillus curvatus* DEPE 15, *Lactobacillus curvatus* DEPE 41, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 39, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 8, *Lactobacillus brevis* DEPE 24, *Lactobacillus curvatus* DEPE 42) bylo dosaženo pozitivního výsledku pouze u kmenu *L. brevis* DEPE 24 (Příloha P II). DNA ostatních kmenů zřejmě nebyla izolována v dostačující kvalitě nebo se v ní vyskytovalo vyšší množství inhibitorů PCR reakce. Proto byla PCR provedena ještě jednou za použití 10 x ředěné DNA (pro naředění inhibitorů) a podpoření reakce přídatkem $MgCl_2$ v množství 0,2 a 0,5 μl . Amplifikované fragmenty byly opět detekovány pouze u DNA izolované z *Lactobacillus brevis* DEPE 24 (Příloha P II). Z tohoto důvodu byla provedena nová izolace DNA pomocí čtyř různých postupů uvedených v kapitole 7.2.2. Ani těmito postupy se však nepodařilo izolovat DNA v požadované kvalitě. Metoda tedy byla optimalizována alespoň pro kmen *Lactobacillus brevis* DEPE 24. Pro optimalizaci byla použita řada vzorků s rostoucí koncentrací Mg^{2+} iontů, snížení množství primerů na 0,2 μl a opětovné naředění DNA (100 x ředěná DNA). Pro tento kmen se jako optimální jevil přídatek $MgCl_2$ 0,5 a 0,7 μl (Obr. 26) a použití 100 x naředěné DNA (Obr. 27). Snížením množství primerů byla reakce ovlivněna negativně.



Obr. 26: Produkty PCR *L. brevis* DEPE 24 s primery AgD1/AgD2 při rostoucí koncentraci MgCl_2 : 1. – 100 bp marker; 2. – 0,1 μl MgCl_2 ; 3. – 0,2 μl MgCl_2 ; 4. – 0,3 μl MgCl_2 ; 5. – 0,4 μl MgCl_2 ; 6. – 0,5 μl MgCl_2 ; 7. – 0,7 μl MgCl_2 ; 8. – negativní kontrola bez DNA



Obr. 27: Produkty PCR 100 x ředěné DNA *L. brevis* DEPE 24 s rozdílným množstvím primerů AgD1/AgD2 při rostoucí koncentraci MgCl_2 : 1. – 100 bp marker; 2. – 0,1 μl MgCl_2 ; 3. – 0,2 μl MgCl_2 ; 4. – 0,3 μl MgCl_2 ; 5. – 0,4 μl MgCl_2 ; 6. – 0,5 μl MgCl_2 ; 7. – 0,7 μl MgCl_2 ; 8. – negativní kontrola bez DNA; 9. – 0,1 μl MgCl_2 ; 10. – 0,2 μl MgCl_2 ; 11. – 0,3 μl MgCl_2 ; 12. – 0,4 μl MgCl_2 ; 13. – 0,5 μl MgCl_2 ; 14. – 0,7 μl MgCl_2 ; 15. – negativní kontrola bez DNA

Za těchto podmínek bylo dosaženo snížení tvorby nesespecifických produktů a zvýšilo se množství amplifikovaných fragmentů požadované velikosti. I přes optimalizaci podmínek PCR reakce však nebylo dosaženo dostatečné čistoty výsledného produktu. Z důvodu tvorby nesespecifických fragmentů nebylo možné odeslat tento vzorek na sekvenaci.

8 DISKUSE ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ

Problematika výskytu biogenních aminů je sledována již v mnoha studiích, souhrnem dosavadních poznatků je Vědecké stanovisko k riziku řízení a vzniku biogenních aminů ve fermentovaných potravinách vydané Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) v roce 2011 [10]. V této diplomové práci byla pozornost věnována tvorbě biogenních aminů probiotickými kulturami.

8.1 Diskuse výsledků chromatografického stanovení biogenních aminů

Dekarboxylasová aktivita byla sledována u bakterií rodu *Bifidobacterium* v závislosti na působení faktorů vnějšího prostředí. Důvodem byla skutečnost, že u probiotických bakterií doposud byl zkoumán především jejich pozitivní vliv na lidský organismus, nikoli možnost negativního působení formou produkce BA. Dalším podnětem pro tuto práci byla studie Lorencové a kol. [25], kde byla tvorba biogenních aminů stanovována u kmenů bifidobakterií a laktobacilů izolovaných z mléčných výrobků, z nichž u mnohých byly detekovány pozitivní dieteticko-léčebné účinky. Bylo zjištěno, že testované kmeny bifidobakterií produkovaly malé množství kadaverinu v rozmezí 5,0 – 14,0 mg.l⁻¹. U dvou kmenů bifidobakterií byla detekována také produkce tyraminu v množství 5,4 a 66,6 mg.l⁻¹[25].

V této diplomové práci byla dekarboxylasová aktivita kmenů *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM239 a *B. animalis* subsp. *lactis* B25 vyhodnocována v dekarboxylačním médiu obsahujícím AMK ornitin, arginin, lysin a tyrosin za působení vnějších faktorů. Obdobně jako ve studii Buňkové a kol. [54] byly jako vnější faktory zvoleny koncentrace NaCl v rozmezí 0,00 – 2,00 % (w/v), koncentrace laktosy 0,00 – 1,00 % (w/v) a působení pH 4,5 a 5,0. Produkce BA byla vyhodnocována také za současného působení těchto faktorů. Kultivační teplota byla u obou kmenů zvolena 37 °C, jakožto teplota optimální pro probiotika působící ve střevním traktu.

U kmenu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 byla kultivace provedena pouze při pH 4,5. Pomocí HPLC byla detekována tvorba tyraminu a sperminu. Ostatní biogenní aminy (kadaverin, putrescin a spermidin) nebyly tímto kmenem produkovány. Nejvyšší produkce BA (24,42 mg.l⁻¹) tímto kmenem bylo dosaženo při 0,25 % (w/v) přídavku laktosy v kombinaci s 1,00 % (w/v) soli. Tyto podmínky se jevily jako vhodné pro tvorbu obou detekovaných biogenních aminů. Spermin byl nejvíce produkován při kombinaci

0,50 % (w/v) laktosy a 2,00 % (w/v) soli. Produkce tyraminu byla méně závislá na vnějších faktorech. Nejméně BA bylo tímto kmenem vytvářeno při 2,00 % (w/v) přídavku soli, kdy došlo především k poklesu množství sperminu. Hladina tyraminu za těchto podmínek zůstala beze změny. Nejméně tyraminu bylo produkováno při 0,50 % přídavku laktosy. Ve srovnání s kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B25 produkoval kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 za stejných podmínek přibližně o polovinu méně biogenních aminů.

V případě bakteriálního kmenu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B25 byly pro kultivaci zvoleny hodnoty pH 4,5 a 5,0. Jako vhodnější pro produkci biogenních aminů se jevila hodnota pH 5,0, kdy bylo dosaženo mírného zvýšení množství biogenních aminů ve srovnání s pH 4,5. Výjimkou byly vzorky obsahující výchozí dekarboxylační médium (bez přídavku laktosy a soli) a vzorky obsahující 0,25 % přídavek laktosy, kde bylo stanovené množství BA v obou případech pH srovnatelné. Nejvyšší produkce ($49,50 \text{ mg.l}^{-1}$) biogenních aminů kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 bylo dosaženo při pH 5,0, 0,25 % (w/v) laktosy a 2,00 % (w/v) soli. Nejméně BA ($33,80 \text{ mg.l}^{-1}$) bylo vyprodukováno při pH 4,5 a koncentraci laktosy 0,50 % (w/v). V obou případech pH byly detekovány biogenní aminy putrescin, kadaverin, tyramin, spermidin a spermin. Spermidin a kadaverin byly produkovány v zanedbatelném množství. V největší míře ($32,36 \text{ mg.l}^{-1}$) byl produkován spermin, a to především v podmínkách pH 5,0, 1,00 % (w/v) laktosy a 2,00 % (w/v) soli. Putrescin byl nejvíce produkován ($15,52 \text{ mg.l}^{-1}$) v podmínkách pH 5,0 v kombinaci s 1,00 % soli. V případě putrescinu byl zpozorován mírný nárůst jeho produkce v závislosti na stoupající koncentraci laktosy v podmínkách pH 4,5 při nulovém nebo 1,00 % přídavku soli. Nejvyšší množství tyraminu ($13,47 \text{ mg.l}^{-1}$) bylo detekováno ve výchozím dekarboxylačním médiu bez přídavku soli a laktosy za pH 4,5.

Ze získaných výsledků nebylo možné vyvodit jednoznačné závěry ve vztahu působení vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u bifidobakterií. Obecně by se dalo shrnout, že vnější podmínky jako jsou koncentrace laktosy a soli nemají na celkovou produkci BA významný vliv. Při různých variantách kultivačního média bylo dosaženo maximálního rozdílu v produkci BA $15,80 \text{ mg.l}^{-1}$ v případě kmene *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 při pH 4,5 a $15,19 \text{ mg.l}^{-1}$ BA v případě kmene *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH 5,0. Rozdílné počáteční pH mělo mírný vliv na produkci BA pouze v kombinaci s dalšími faktory. V případě kmene *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 produkce biogenních aminů

dosahovala hodnot nižších než $25,00 \text{ mg.l}^{-1}$, což nelze považovat za hodnoty nebezpečné pro lidské zdraví. V případě kmene *B. animalis* subsp. *lactis* B25 bylo dosaženo produkce BA nižší než $50,00 \text{ mg.l}^{-1}$. Tyto hodnoty také nejsou považovány za nebezpečné pro lidské zdraví, avšak bifidobakterie se převážně používají ve směsných kulturách, nebo jsou přidávány do výrobku již obsahujícího jiné startérové kultury. Z tohoto důvodu by se mohla produkce BA bifidobakteriemi podílet na zvyšování celkové hladiny biogenních aminů ve výsledném produktu.

Vlivem vnějších faktorů na růst a dekarboxylasovou aktivitu se ve své studii zabývali Gardini a kol. [11], kteří zkoumali podobně jako v této diplomové práci vliv pH, soli a teploty na tvorbu biogenních aminů bakterií *Enterococcus faecalis*. Zde bylo zjištěno, že produkce biogenních aminů je nejvíce ovlivněna rozsahem růstu daného mikroorganismu. Produkci biogenních aminů kmenem *Enterococcus durans* za různých podmínek se zabývali také Fernández a kol. [26]. V jejich studii byl zkoumán vliv zdroje uhlíku, koncentrace tyrosinu a tyraminu a vliv pH na tvorbu tyraminu. Bylo zjištěno, že zdroj uhlíku neovlivňuje produkci tyraminu. Tvorba tyraminu však byla značně ovlivněna hodnotou pH, kdy nejvyšší produkce tyraminu bylo dosaženo při pH 5,0, přestože současně byl omezen růst bakterií. Tyto výsledky poukazují na odlišné působení pH na různé druhy bakterií, neboť samotný vliv pH na testované kmeny bifidobakterií nebyl příliš významný. Produkce tyraminu se ve studii Fernández a kol. snižovala úměrně s rostoucí koncentrací tyraminu v kultivačním médiu [26]. Komprda a kol. [53] se zabývali vlivem působení vnějších faktorů (tepelná úprava, teplota a doba skladování) na obsah biogenních aminů v tavených sýrech. Zde bylo zjištěno, že teplota ani doba skladování neovlivnila významně obsah aminů v tavených sýrech. Kvantitativně nejvýznamnějším biogenním aminem byl v této studii tyramin [53]. Tyramin byl hlavním produktem dekarboxylasové aktivity také ve studii Buňkové a kol. [54], kde byla sledována dekarboxylasová aktivita bakterií rodu *Lactococcus* (kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) v závislosti na faktorech vnějšího prostředí (aerobní a anaerobní podmínky kultivace, koncentrace NaCl 0 – 2 % (w/v) a laktosy 0 – 1 % (w/v)). Bylo zjištěno, že tyramin byl ve větší míře produkován za anaerobních podmínek a nejvyšších hodnot tyraminu bylo dosaženo při 2,00 % (w/v) přídavku soli. V případě této diplomové práce byl hlavním produktem dekarboxylasové aktivity obou kmenů bifidobakterií spermin. Pokud by byla porovnávána produkce tyraminu, pak byl tento biogenní amin produkován nejvíce kmenem *Bifidobacterium animalis*

subsp. *lactis* B25 při pH 4,5 v kultivačním médiu bez přídavku soli a laktosy ($13,47 \text{ mg.l}^{-1}$). Vliv koncentrace soli v kultivačním médiu na bifidobakterie je tedy odlišný než u laktokoků. Koncentrace laktosy měla dle studie Buňkové a kol. [54] na produkci tyraminu menší vliv než přítomnost soli. Nejvyšší produkce tyraminu byla zaznamenána při 0,50 % přídavku laktosy [54]. Také v této diplomové práci byla při pH 5,0 a 0,50 % (w/v) přídavku laktosy stanovena u kmenu *B. animalis* subsp. *lactis* B25 jedna z nejvyšších hodnot tyraminu ($13,39 \text{ mg.l}^{-1}$). Ve studii La Gioia a kol. [55] byla zvýšená produkce tyraminu bakteriálním kmenem *Streptococcus thermophilus* v přítomnosti NaCl zdůvodněna jako regulace osmotického šoku. Dekarboxylace tyrosinu je zřejmě nepřímo využívána k získání energie potřebné pro osmoregulaci. Obdobné výsledky byly získány také při nízkých koncentracích laktosy (0,1 %, w/v) [55]. V diplomové práci Žouželkové [56] byl popsán vliv vnějších faktorů (teploty a pH) na dekarboxylasovou aktivitu bakteriálního kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289. U tohoto kmene byla prokázána produkce putrescinu a tyraminu. Jako nejvhodnější pro produkci putrescinu se jeví podmínky kultivační teploty $37 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 6,0 a 1,0 % (w/v) přídavek glycerolu při 48 hodinách kultivace. Hodnota počátečního pH podobně jako v této diplomové práci nikterak významně neovlivnila produkci BA. Na produkci tyraminu testovaným kmenem *L. rhamnosus* CCDM 289 měla značný vliv vyšší koncentrace glycerolu (zdroj uhlíku) při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Nižší koncentrace glycerolu do 1,0 % (w/v) naopak ovlivnila produkci putrescinu [56]. Z těchto poznatků vyplývá, že působení vnějších faktorů na produkci BA je velmi různorodé u jednotlivých kmenů bakterií.

8.2 Diskuse výsledků detekce genu pro produkci putrescinu metodou PCR

Druhá část diplomové práce byla zaměřena na detekci genu pro tvorbu putrescinu u laktobacilů pomocí metody PCR. Na přítomnost genu pro tvorbu putrescinu bylo testováno osm kmenů laktobacilů (*Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* AI-2, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* AI-3, *Lactobacillus curvatus* DEPE 15, *Lactobacillus curvatus* DEPE 41, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 39, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE 8, *Lactobacillus brevis* DEPE 24, *Lactobacillus curvatus* DEPE 42). U testovaných kmenů byla produkce putrescinu již dříve prokázána s využitím jiných metod stanovení. Literatura uvádí, že putrescin může být syntetizován nepřímo z argininu dvěma cestami.

Arginin může být přeměněn na ornitin pomocí arginin-deaminasy a ornitin je pak dekarboxylován na putrescin. Druhou možností je přeměna argininu pomocí arginin-dekarboxylasy na agmatin, který je následně převeden na putrescin pomocí agmatin-deiminasy [49, 61]. Vzhledem k tomuto faktu, byly pro experiment použity primery pro detekci genu *aguA* kódujícího agmatin-deiminasu a genu *odc* kódujícího ornitin-dekarboxylasu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo využitím primerů AgD1/AgD2 sloužících k detekci genu *aguA*. Tento gen byl detekován u tří testovaných kmenů (*Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* AI-2, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* AI-3, *Lactobacillus brevis* DEPE 24). U zbylých pěti kmenů se nepodařilo izolovat DNA v dostatečné kvalitě pro metodu PCR a nelze tedy posoudit, zda tyto kmeny obsahují gen *aguA* či nikoli. Amplifikované produkty detekovaného genu *aguA* u kmenů *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* AI-2 a *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3 byly zaslány na sekvenaci. Srovnáním získaných sekvencí s dostupnými databázemi bylo potvrzeno, že se v obou případech jedná o gen *aguA*. Pomocí analýzy BLAST byla nalezena shoda získané sekvence kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* AI-2 s genem *aguA* u bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147 (98 %), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56 (97 %) a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I11403 (97 %). V případě kmene *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3 byla nalezena shoda amplifikovaných fragmentů s genem *aguA* u bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147 (97 %) a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56 (96 %). Amplikony získané v případě kmene *Lactobacillus brevis* DEPE 24 nebylo možné zaslat na sekvenaci, neboť obsahovaly značné množství nespecifických produktů. Mírného snížení tvorby nespecifických produktů bylo v tomto případě dosaženo optimalizací metody (přidávkem 0,5 – 0,7 μ l $MgCl_2$ a použitím 100 x ředěné templátové DNA).

Gen *aguA* byl detekován také ve studii Landete a kol. [49] u kmenů bakterií *Lactobacillus hilgardii* X1B, *Lactobacillus sakei* 23K, *Enterococcus faecalis* ATCC 11700, *Bacillus cereus* ATCC 14579 a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. V této studii byl gen pro agmatin-deiminasu detekován pomocí primerů *aguA-F/aguA-R* [49]. U kmenů *Lactobacillus plantarum* izolovaných z vína byla ve studii Spano a kol. [60] zjištěna schopnost degradovat arginin díky přítomnosti genů kódujících arginin-deiminasu. Tento gen byl postupně detekován i u dalších bakteriálních kmenů např. *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus sakei* a *Lactobacillus hilgardii*. Stanovením genů odpovědných za produkci biogenních aminů se zabývalo již více autorů, z nichž značná část věnovala pozornost genu kódujícímu enzym tyro-

sin-dekarboxylasu. Přítomnost genu pro tyrosin-dekarboxylasu u technologicky významných kmenů *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Streptococcus* byla zkoumána ve studii Buňkové a kol. [57], kde byla produkce tyraminu a přítomnost genu pro tyrosin dekarboxylasu detekována u osmi z 36 testovaných kmenů. Gen pro tyrosin-dekarboxylasu byl detekován u tří kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, tři kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, jednoho kmene *Streptococcus thermophilus* a jednoho kmene *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [57]. Přítomnost genu pro tyrosin-dekarboxylasu byla prokázána také u šesti kmenů *Lactococcus lactis* (CCDM 48, CCDM 53, CCDM141, CCDM 824, CCDM 946 a CCDM 1004). U těchto kmenů nebyl zaznamenán výskyt genů kódujících enzymy pro dekarboxylaci histidinu, lysinu a ornitinu [58]. Detekcí genu pro tyrosin dekarboxylasu u startérových kultur určených pro výrobu fermentovaných salámů se zabývali autoři Burdychová a Dohnal [59]. Gen pro tyrosin-dekarboxylasu byl detekován u startovacích kultur *Lactobacillus sakei* a *Lactobacillus curvatus*. Produkce tyraminu byla u těchto kmenů potvrzena současně pomocí metody HPLC [59]. Produkce histaminu nebo výskyt genu *hdc* kódujícího tvorbu histidin-dekarboxylasy byl popsán u některých specifických druhů např. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus sakei*. U těchto druhů byl stanoven nízký podíl kmenů pozitivních na dekarboxylasu a jejich potenciál pro tvorbu histaminu byl slabý, nebo nebyl v potravinách vůbec prokázán [10].

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium produkce biogenních aminů probiotickými bakteriemi. Převážná část byla věnována faktorům ovlivňujícím tvorbu BA bakteriálními kmeny *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 a *B. animalis* subsp. *lactis* B25. Bakterie byly kultivovány v dekarboxylačním médiu obohaceném o aminokyseliny (arginin, lysin, ornitin, tyramin) při 37 °C. Dekarboxylasová aktivita byla sledována při pH 4,5 a 5,0, koncentraci soli 0-2 % (w/v) a koncentraci laktosy 0-1 % (w/v). Dílčí část byla zaměřena na stanovení potenciálu pro produkci putrescinu (metodou PCR) u osmi kmenů probiotických bakterií rodu *Lactobacillus*. Na základě získaných výsledků lze konstatovat:

- produkce biogenních aminů je především kmenově specifická, neboť kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 produkoval za jinak stejných podmínek přibližně o polovinu BA méně než kmen *B. animalis* subsp. *lactis* B25,
- kmen *B. animalis* subsp. *lactis* CCDM 239 byl kultivován při pH 4,5 a produkoval pouze tyramin a spermin. Nejvyšší produkce biogenních aminů (24,42 mg.l⁻¹) bylo dosaženo při pH 4,5 v kombinaci s 0,25 % (w/v) laktosy a 1,00 % (w/v) soli.
- kmen *B. animalis* subsp. *lactis* B25 produkoval putrescin, kadaverin, tyramin, spermidin a spermin ve všech variantách kultivačního média. Nejvíce BA (49,50 mg.l⁻¹) bylo produkováno v médiu obsahujícím 0,25 % (w/v) laktosy a 2,00 % (w/v) soli při pH 5,0.
- v největší míře byl kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 produkován spermin,
- změna pH neměla u kmene *B. animalis* subsp. *lactis* B25 významný vliv na celkovou produkci BA,
- tímto experimentem bylo prokázáno, že dekarboxylasovou aktivitu bifidobakterií lze do jisté míry ovlivnit změnou složení kultivačního media. Ze získaných výsledků však nebyla zpozorována jednoznačná závislost produkce BA na koncentraci soli nebo laktosy.
- metodou PCR byl u tří kmenů laktobacilů (*Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* AI-2, *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3, *L. brevis* DEPE 24) detekován gen *aguA* kódující agmatin deiminasu při použití primerů AgD1/AgD2,

- produkty PCR s DNA kmenů *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-2, *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3 byly zaslány na sekvenaci, kterou bylo potvrzeno, že byl v obou případech detekován gen *aguA*.

Na základě získaných výsledků byl prokázán částečný vliv faktorů vnějšího prostředí na produkci BA testovanými kmeny bifidobakterií a také potenciál některých kmenů laktobacilů k produkci putrescinu pomocí enzymu agmatin-deiminasy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. [online] 1996, č. 29, s. 213-231. [cit. 2013-03-15]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160595000321>
- [2] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozšířené a přepracované 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [3] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. české vyd. Praha: Galén, c2005, xv, 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [4] HOLEČEK, Milan. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 286 s. ISBN 80-247-1562-7.
- [5] KOMPRDA, Tomas, Radka BURDYCHOVÁ, Vlastimil DOHNAL, Olga CWIKOVÁ a Pavla SLÁDKOVÁ. Some factors influencing biogenic amines and polyamines content in Dutch-type semi-hard cheese. *European Food Research and Technology* [online]. 2007. 227(1) [cit. 2013-03-15]. ISSN 1438-2385. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00217-007-0688-7>
- [6] SHALABY, Ali R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. [online] 1996, č. 29, s. 675-690. [cit. 2013-03-15]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399699600066X>
- [7] VODRÁŽKA, Zdeněk, Blanka KRÁLOVÁ a Vladislav ŠÍCHO. *Potravinářská biochemie*. 2., dopl a přeprac. vyd. Praha: SNTL, 1981, 360 s.
- [8] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-246-1414-4.
- [9] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 202 s. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [10] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods.

- EFSA Journal* [online] 2011, 9(10):2393. [93 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2393.
Dostupné z: www.efsa.europa.eu/efsajournal
- [11] GARDINI, Fausto, Maria MARTUSCELLI, Marisa CARUSO, Fernanda GALGANO, Maria CRUDELE, Fabio FAVATI, Maria GUERZONI a Giovanna SUZZI. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2001. 64(1) [cit. 2013-03-11]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160500004451>
- [12] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 8096706497.
- [13] STANDAROVÁ, E., I. BORKOVCOVÁ a L. VORLOVÁ. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. In: *Vetweb* [online]. 2008. [cit. 2013-03-22]. Dostupné z: http://www.vetweb.cz/Obsah-biogennich-aminu-v-syrech-z-ceske-obchodni-site__s1496x53853.html
- [14] BUŇKOVÁ, Leona, Kateřina HUDCOVÁ, Pavel BUDINSKÝ, Eva LORENCOVÁ, Helena VELICHOVÁ a František BUŇKA. Sledování kvality farmářských sýrů. *Mlékařské listy - Zpravodaj*. Praha: Výzkumný ústav mlékárenský. 2012. č. 113, ISSN 1212-950x.
- [15] FALLON, A., R. F. G. BOOTH a L. D. BELL. *Applications of HPLC in Biochemistry: laboratory techniques in biochemistry and molecular viology*. Amsterdam: Elsevier, 1987, 338 s. ISBN 0-444-80863-9.
- [16] MIKEŠ, Otakar. *Laboratorní chromatografické metody*. 1. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1980, 673 s.
- [17] PRYDE, A. a Mary T. GILBERT. *Applications of high performance liquid chromatography*. London: Chapman and Hall, 1979, xii, 255 s. ISBN 0-412-14220-1.
- [18] ROMERO, R., M. SÁNCHEZ-VIÑAS, D. GÁZQUEZ, M. BAGUR a L. CUADROS-RODRÍGUEZ. Robustness study for the determination of biogenic amines by HPLC. *Chromatographia* [online]. 2001. 53(9), s. 481-484 [cit. 2013-

- 04-02]. ISSN 1612-1112. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02491607>
- [19] UNIVERSITÄT BREMEN. Liquid Chromatography. *Chem.uft.uni-bremen.de* [online]. 2003. [cit. 2013-04-2]. Dostupné z: <http://chem.uft.uni-bremen.de/Chromatography/chrom065.htm>
- [20] EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení (ES) 2073/2005 ze dne 15. Listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. In: *Úřední věstník L 338*. 2005, s. 1-26 [cit. 2013-04-02]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:CS:PDF>
- [21] ÖZOGUL, Fatih a Yesim ÖZOGUL. The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology* [online]. Heidelberg: Springer Verlag, 2007. 225(3) [cit. 2013-03-11]. ISSN 1438-2385. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00217-006-0429-3>
- [22] NAILA, Aishath, Steve FLINT, Graham FLETCHER, Phil BREMER a Gerrit MEERDINK. Control of Biogenic Amines in Food – Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science* [online]. 2010. 75(7) [cit. 2013-03-11]. ISSN 1750-3841. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x/full>
- [23] RAI, Mahendra a Michael CHIKINDAS. *Natural antimicrobials in food safety and quality*. Wallingford: CABI, 2011, xiii, 368 s. ISBN 978-1-84593-769-0.
- [24] MOKHTAR Sayed, Gamal MOSTAFA, Refat TAHA a Gehad ELDEEP. Effect of different starter cultures on the biogenic amines production as a critical control point in fresh fermented sausages. *European Food Research and Technology* [online]. 2012. 235(3), s. 527-535 [cit. 2013-04-02]. ISSN 1438-2385. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00217-012-1777-9>
- [25] LORENCOVÁ, Eva, Leona BUŇKOVÁ, Dagmar MATOULKOVÁ, Vladimír DRÁB, Pavel PLEVA, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2012. 47(10), s. 2086-2091 [cit. 2013-03-19]. ISSN 1365-2621. Dostupné z:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>

- [26] FERNÁNDEZ, María, Daniel LINARES, Ana RODRÍGUEZ a Miguel ALVAREZ. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2007. 73(6) [cit. 2013-03-15]. ISSN 1432-0614. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-006-0596-y>
- [27] PLEVA, Pavel, Leona BUŇKOVÁ, Andrea LAUKOVÁ, Eva LORENCOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. Factors affected decarboxylation activity of *Enterococcus faecium* isolated from rabbit. *Potravinářstvo* [online]. 2012. 6(2), s. 46-49 [cit. 2013-03-22]. ISSN 1337-0960. Dostupné z: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/182/171>
- [28] KUNOVÁ, Václava. *Zdravá výživa*. Vyd. 2. Praha: Grada Publishing a.s., 2011, 140 s. ISBN 978-80-247-3433-0.
- [29] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2010, 536 s. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [30] GROFOVÁ, Zuzana. *Nutriční podpora: praktický rádce pro sestry*. Vyd. 1. Praha: Grada Publishing a.s., 2007, 237 s. ISBN 80-471-868-5.
- [31] KREJSEK, Jan. Prebiotika, probiotika a imunitní systém. *Potravinářská Revue*. Praha: AGRAL s.r.o., 2012, 8(2), s. 18-21. ISSN 1801-9102
- [32] JOSEF, Marek a kol. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4., přeprac a dopl. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2010, 808 s. ISBN 978-80-247-2639-7.
- [33] LEE, Yuan a Seppo SALMINEN. *Handbook of probiotics and prebiotics*. 2nd ed. Hoboken: Wiley, c2009, xix, 596 s. ISBN 978-0-470-13544-0.
- [34] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 978-80-210-4207-0.
- [35] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

- [36] BATT, Carl. *Encyclopedia of food microbiology*. San Diego: Academic Press, 2000, 2405 s. ISBN 978-0-12-227070-3.
- [37] BIAVATI, B., M. VESCOVO, S. TORRIANI a V. BOTTAZZI. Bifidobacteria: history, ecology, fysiology and applications. *Annals of Microbiology*. [online] 2000. 50(2), s. 117-131. [cit. 2013-03-06]. ISSN 1590-4261. Dostupné z: <http://www.univr.it/main?ent=catalogoal&id=235686&page=dettaglioPubblicazione>
- [38] LEAHY, S., D. HIGGINS, G. FITZGERALD a D. van SINDEREN. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2005. 98(6), s. 1303-1315 [cit. 2013-03-19]. ISSN 1365-2672. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2005.02600.x/full>
- [39] LANDETE, José, Blanca de las RIVAS, Angela MARCOBAL a Rosario MUÑOZ. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International journals of Food Microbiology* [online]. 2007. 117(3), s. 258-269 [cit. 2013-03-13]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507002644>
- [40] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [41] PENKA, Miroslav a Eva TESAROVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství I: hematologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2011, 421 s. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [42] NATUUR LEVEN TECHNOLOGIE. Genetisch onderzoek m.b.v. bioinformatica. *Nlt.bioinformatica.nl* [online]. 2007. [cit. 2013-03-28]. Dstupné z: <http://nlt.bioinformatica.nl/index.php?mode=hfdst&hfdstid=874&pgid=2463>
- [43] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. 2010 ISBN 978-80-214-4004-3.
- [44] PRODĚLALOVÁ, Jana. *Molekulární diagnostika potravinářsky významných mikroorganismů*. Brno, 2004. Dizertační práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra mikrobiologie.

- [45] KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007, 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
- [46] DADÁKOVÁ, Eva, Martin KŘÍŽEK a Tamara PELIKÁNOVÁ. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. [online]. 2009. 116(1), s. 365-370 [cit. 2013-04-12]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609002040>.
- [47] SMĚLÁ, Dana, Pavla PECHOVÁ, Tomáš KOMPRDA, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. [online]. 2004. 98, s. 432-437 [cit. 2013-04-14]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_07_07.pdf.
- [48] COTON, M., A. ROMANO, G. SPANO, K. ZIEGLER, C. VETRANA, C. DESMARAIS, A. LONVAUD-FENEL, P. LUCAS a E. COTON. Occurrence of biogenic amine-forming acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology* [online]. 2010. 27, s. 1078-1085 [cit. 2013-04-14]. ISSN 0740-0020. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002010001875>
- [49] LANDETE, José, Mario ARENA, Isabel PARDO, María MANCA DE NADRA a Sergi FERRER. The role of two families of bacterial enzymes in putrescine synthesis from agmatine via agmatine deiminase. *International Microbiology* [online]. 2010. 13, s. 169-177 [cit. 2013-04-14]. ISSN 1139-6709. Dostupné z: <http://130.206.88.107/index.php/IM/article/view/53871>
- [50] NANNELLI, F., O. CLAISSE, E. GINDREAU, G. DE REVEL, A. LONVAUD-FUNEL a P. LUCAS. Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2008. 47, s. 594-599 [cit. 2013-04-02]. ISSN 0266-8254. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2008.02472.x/full>
- [51] MARCOBAL, Angela, Blanca de las RIVAS, Victoria MORENO-ARRIBAS a Rosario MUÑOZ. Multiplex PCR Method for the Simultaneous Detection of His-

- tamine-, Tyramine-, and Putrescine-Producing Lactic Acid Bacteria in Foods. *Journal of Food Protection*. 2005. 68(4), s. 874-878. ISSN 0362-028X.
- [52] LANDETE, José, Blanca de las RIVAS, Angela MARCOBAL a Rosario MUÑOZ. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *Food Microbiology* [online]. 2007. 117, s. 258-269 [cit. 2013-04-02]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507002644>
- [53] KOMPRDA, Tomáš, Kateřina NOVICKÁ, Libor KALHOTKA a Dana SMĚLÁ. Biogenic amine content in sterilised and pasteurised long-term stored processed cheese. *Czech Journal of Food Science* [online]. 2005. 23(5), s. 209-216 [cit. 2013-04-16]. ISSN 1212-1800 Dostupné z: <http://agriculturejournals.cz/publicFiles/50569.pdf>
- [54] BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Eva POLLAKOVÁ, Tereza PODEŠVOVÁ a Vladimír DRÁB. The effect of lactose, NaCl and an aerobic/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2011. 147(2), s. 112-119 [cit. 2013-04-18]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511001838>
- [55] La GIOIA, Federica, Lucia RIZZOTTI, Franca ROSSI, Fausto GARDINI, Giulia TABANELLI a Sandra TORRIANI. Identification of a Tyrosine Decarboxylase Gene (*tdcA*) in *Streptococcus thermophilus* 1TT45 and Analysis of Its Expression and Tyramine Production in Milk. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011. 77(3), s. 1140-1144 [cit. 2013-04-18]. ISSN 1098-5336. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/77/3/1140.short>
- [56] ŽOUŽELKOVÁ, N. *Vliv teploty a pH na produkci biogenních aminů u vybraných probiotických bakterií*. Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [57] BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Michaela HLOBILOVÁ, Zuzana VAŇÁTKOVÁ, Dana NOVÁKOVÁ a Vladimír DRÁB. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*.

- European Food Research and Technology* [online]. 2009. 229(3), s. 533-538 [cit. 2013-04-16]. ISSN 1438-2385. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00217-009-1075-3>
- [58] BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Michaela HLOBILOVÁ, Vladimír DRÁB a Stanislav KRÁČMAR. Komparace různých metod detekce dekarboxylázové aktivity u bakterií mléčného kvašení. *Potravinářstvo* [online]. 2010. 4, s. 372-380 [cit. 2013-04-15]. ISSN 1337-0960. Dostupné z: http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/mc_februar_2010/pdf/4/Bunkova.pdf
- [59] BURDYCHOVÁ, Radka a Vlastimil DOHNAL. Využití HPLC ke stanovení produktu exprese genu pro mikrobiální tyrosindekarboxylasu. *Chemické listy* [online]. 2007. 101, s. 907-910 [cit. 2013-04-16]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_11_907-910.pdf
- [60] SPANO, G., L. BENEDUCE, L. de PALMA, M. QUINTO, A. VERNILE a S. MASSA. Characterization of wine *Lactobacillus plantarum* by PCR-DGGE and RAPD-PCR analysis and identification of *Lactobacillus plantarum* strains able to degrade arginine. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* [online]. 2006. 22(8), s. 769-773 [cit. 2013-04-15]. ISSN 1573-0972. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11274-005-9007-2>
- [61] LANDETE, José, Blanca de las RIVAS, Angela MARCOBAL a Rosario MUÑOZ. PCR methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on wine. *Annals of Microbiology* [online]. 2011. 61(1), s. 159-166 [cit. 2013-04-17]. ISSN 1869-2044. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s13213-010-0068-6>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADC	Arginin-dekarboxylasa
AgUH	Agmatin-ureohydrolasa
AMK	Aminokyseliny
BA	Biogenní aminy
ddNTP	Dideoxynukleotidtrifosfáty
DEPE	Department of production engineering - UIOZP
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxynukleotidtrifosfány
DSMZ	Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur
FAO	Světová zdravotnická organizace
GC	Plynová chromatografie
GPC	Gelová chromatografie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IEC	Iontově výměnná chromatografie
KTJ	Kolonii tvořící jednotka
LLC	Rozdělovací chromatografie
LSC	Adsorpční chromatografie
MetAT	Metionin-adenosyltransferasa
MO	Mikroorganismy
NK	Nukleové kyseliny
ODC	Ornitin-dekarboxylasa
OPA	o-ftaldialdehyd
PCR	Polymerasová řetězová reakce
SAM	S-adenosylmetionin

SAMDC	S-adenosylmetionin-dekarboxylasa
SPDS	Spermidin-syntasa
SPMS	Spermin-syntasa
UV	Ultrafialové záření
WHO	Organizace pro výživu a zemědělství

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Alifatické biogenní aminy [2].....	13
Obr. 2: Aromatické biogenní aminy [2].....	13
Obr. 3: Heterocyklické biogenní aminy [2]	13
Obr. 4: Obecné schéma vzniku aminů [3]	14
Obr. 5: Vznik polyaminů biosyntetickými drahami bakterií [5].....	15
Obr. 6: Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie [19].....	20
Obr. 7: <i>Bifidobacterium</i> sp. pozorované elektronovým mikroskopem [37].....	27
Obr. 8: Evoluční vztahy kmenů bifidobakterií získané pomocí 16S rDNA sekvenace [33]	30
Obr. 9: Exponenciální nárůst amplifikovaných molekul DNA [42].....	33
Obr. 10: Čistota izolované DNA – 1. marker 100 bp; 2. vynechána; 3. – 6. <i>L.</i> <i>curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> AI-2; 7. – 10. <i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> AI-3	48
Obr. 11: Čistota izolované DNA – 1. marker 100 bp; 2. – 3. <i>L. curvatus</i> DEPE 15; 4. – 5. <i>L. curvatus</i> DEPE 41; 6. – 7. <i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE 39; 8. – 9. <i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE 8; 10. – 11. <i>L. brevis</i> DEPE 24; 12. – 13. <i>L.</i> <i>curvatus</i> DEPE 42	50
Obr. 12: Celková produkce BA kmenem <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM239 při pH 4,5 s přidavkem různých koncentrací laktosy a NaCl.	56
Obr. 13: Produkce jednotlivých BA kmenem <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM239 při pH 4,5 s přidavkem různých koncentrací laktosy a NaCl.	56
Obr. 14: Celková produkce BA kmenem <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> B25 při pH 4,5 s přidavkem různých koncentrací laktosy a NaCl.	57
Obr. 15: Produkce jednotlivých BA kmenem <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> B25 při pH 4,5 v závislosti na rostoucí koncentraci laktosy.	58
Obr. 16: Produkce jednotlivých BA kmenem <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> B25 při pH 4,5, 1,00 % (w/v) koncentraci NaCl v závislosti na rostoucí koncentraci laktosy.....	59
Obr. 17: Produkce jednotlivých BA kmenem <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> B25 při pH 4,5, 2,00 % (w/v) koncentraci NaCl v závislosti na rostoucí koncentraci laktosy.....	59

- Obr. 18: Celková produkce BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH 5,0 s
přídavkem různých koncentrací laktosy a NaCl..... 60
- Obr. 19: Produkce jednotlivých BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH 5,0
v závislosti na rostoucí koncentraci laktosy. 61
- Obr. 20: Produkce jednotlivých BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH
5,0, 1,00 % (w/v) koncentraci NaCl v závislosti na rostoucí koncentraci
laktosy..... 62
- Obr. 21: Produkce jednotlivých BA kmenem *B. animalis* subsp. *lactis* B25 při pH
5,0, 2,00 % (w/v) koncentraci NaCl v závislosti na rostoucí koncentraci
laktosy..... 62
- Obr. 22: Detekce amplifikovaných fragmentů: 1. – 100 bp marker; 2. – *L. curvatus*
AI-2 s primery AgD1/AgD2; 3. – *L. curvatus* AI-2 s primery aguA-F1/aguA-R;
5. – *L. curvatus* AI-3 s primery aguA-F1/aguA-R; 6. - pozitivní kontrola; 7. –
negativní kontrola..... 63
- Obr. 23: Detekce amplifikovaných fragmentů pro sekvenaci: 1. – 100 bp marker; 2. –
L. curvatus AI-2 s primery AgD1/AgD2; 3. – *L. curvatus* AI-2 s primery aguA-
F1/aguA-R; 4. – *L. curvatus* AI-3 s primery AgD1/AgD2; 5. – *L. curvatus* AI-3
s primery aguA-F1/aguA-R; 6. - pozitivní kontrola; 7. – negativní kontrola..... 64
- Obr. 24: Sekvence genu *aguA* detekovaná u kmenu *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-2 65
- Obr. 25: Sekvence genu *aguA* detekovaná u kmenu *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3 65
- Obr. 26: Produkty PCR *L. brevis* DEPE 24 s primery AgD1/AgD2 při rostoucí
koncentraci MgCl₂: 1. – 100 bp marker; 2. – 0,1 µl MgCl₂; 3. – 0,2 µl MgCl₂;
4. – 0,3 µl MgCl₂; 5. – 0,4 µl MgCl₂; 6. – 0,5 µl MgCl₂; 7. – 0,7 µl MgCl₂; 8. –
negativní kontrola bez DNA..... 67
- Obr. 27: Produkty PCR 100 x ředěné DNA *L. brevis* DEPE 24 s rozdílným
množstvím primerů AgD1/AgD2 při rostoucí koncentraci MgCl₂: 1. – 100 bp
marker; 2. – 0,1 µl MgCl₂; 3. – 0,2 µl MgCl₂; 4. – 0,3 µl MgCl₂; 5. – 0,4 µl
MgCl₂; 6. – 0,5 µl MgCl₂; 7. – 0,7 µl MgCl₂; 8. – negativní kontrola bez
DNA; 9. – 0,1 µl MgCl₂; 10. – 0,2 µl MgCl₂; 11. – 0,3 µl MgCl₂; 12. – 0,4 µl
MgCl₂; 13. – 0,5 µl MgCl₂; 14. – 0,7 µl MgCl₂; 15. – negativní kontrola bez
DNA 67

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Eluční program HPLC	43
Tab. 2: Charakteristika použitých prumerů	45

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: Výsledky chromatografického stanovení produkce biogenních aminů

PŘÍLOHA P II: Optimalizace metody PCR pro detekci produkce putrescinu u laktobacilů

PŘÍLOHA P III: Výsledky srovnání sekvencovaných fragmentů DNA kmenu *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-2 s dostupnými databázemi pomocí nástroje Blast

PŘÍLOHA P IV: Výsledky srovnání sekvencovaných fragmentů DNA kmenu *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3 s dostupnými databázemi pomocí nástroje Blast

PŘÍLOHA P I: VÝSLEDKY CHROMATOGRAFICKÉHO STANOVENÍ PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ

Hodnoty biogenních aminů produkovaných kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp.
lactis B25 při pH 4,5 a různé koncentraci laktosy a soli v kultivačním mediu

Faktory [%] pH 4,5	č. vzorku	Detekované množství BA [mg.l ⁻¹]					
		putrescin	kadaverin	tyramin	spermidin	spermin	celkem
L 0 / S 0	1	7,45 ± 0,64	2,87 ± 0,24	7,17 ± 0,12	1,50 ± 0,08	13,45 ± 1,10	32,44
	2	9,93 ± 0,44	4,52 ± 0,08	23,32 ± 1,21	1,43 ± 0,09	14,21 ± 0,75	53,41
	3	6,72 ± 0,33	2,54 ± 0,25	9,93 ± 1,07	1,51 ± 0,07	14,74 ± 1,37	35,43
L 0 / S 1	4	7,41 ± 0,37	2,50 ± 0,18	8,66 ± 0,65	1,70 ± 0,05	15,47 ± 0,67	35,74
	5	7,98 ± 0,73	2,42 ± 0,06	7,62 ± 0,06	1,76 ± 0,16	14,52 ± 0,50	34,30
	6	7,67 ± 0,25	7,17 ± 0,27	8,92 ± 0,59	1,67 ± 0,07	14,48 ± 0,80	39,91
L 0 / S 2	7	12,22 ± 0,85	2,66 ± 0,16	6,85 ± 0,53	1,84 ± 0,09	14,02 ± 0,58	37,59
	8	11,81 ± 1,03	2,64 ± 0,23	7,42 ± 0,46	1,93 ± 0,12	13,87 ± 0,96	37,67
	9	10,18 ± 0,74	2,43 ± 0,16	6,57 ± 0,56	1,86 ± 0,10	13,88 ± 0,60	34,92
L 0,25 / S 0	10	11,15 ± 0,78	2,84 ± 0,14	6,58 ± 0,16	1,62 ± 0,11	13,52 ± 0,78	35,70
	11	10,63 ± 0,73	2,65 ± 0,20	6,37 ± 0,42	1,58 ± 0,11	12,75 ± 1,24	33,98
	12	9,96 ± 0,44	2,62 ± 0,21	6,60 ± 0,47	1,59 ± 0,11	14,12 ± 0,76	34,89
L 0,25 / S 1	13	11,00 ± 0,61	2,82 ± 0,24	6,44 ± 0,50	1,94 ± 0,17	14,81 ± 0,94	37,01
	14	10,47 ± 0,35	2,29 ± 0,17	6,62 ± 0,45	1,95 ± 0,13	13,53 ± 0,64	34,86
	15	10,77 ± 0,96	2,75 ± 0,07	5,80 ± 0,51	1,94 ± 0,18	13,49 ± 0,87	34,74
L 0,25 / S 2	16	10,83 ± 0,65	2,72 ± 0,22	6,64 ± 0,59	2,10 ± 0,12	14,04 ± 0,57	36,35
	17	12,02 ± 0,77	2,82 ± 0,18	5,96 ± 0,37	2,11 ± 0,08	13,43 ± 0,43	36,33
	18	13,21 ± 0,74	2,88 ± 0,15	5,85 ± 0,30	2,10 ± 0,09	12,89 ± 0,94	36,92
L 0,5 / S 0	19	10,98 ± 0,71	0,95 ± 0,18	5,09 ± 0,33	1,76 ± 0,11	11,46 ± 0,86	32,24
	20	11,34 ± 1,09	2,95 ± 0,10	5,27 ± 0,38	1,74 ± 0,15	11,51 ± 0,49	32,80
	21	12,17 ± 0,52	2,98 ± 0,21	5,74 ± 0,28	1,88 ± 0,12	13,58 ± 0,56	36,36
L 0,5 / S 1	22	12,50 ± 0,78	3,05 ± 0,30	5,20 ± 0,48	2,10 ± 0,13	13,09 ± 1,19	35,95
	23	11,85 ± 1,01	2,87 ± 0,16	4,91 ± 0,11	2,06 ± 0,09	12,25 ± 0,85	33,93
	24	13,21 ± 1,04	3,05 ± 0,15	4,66 ± 0,35	2,21 ± 0,16	11,58 ± 0,47	34,71
L 0,5 / S 2	25	12,68 ± 1,10	2,84 ± 0,23	5,07 ± 0,08	2,39 ± 0,17	12,39 ± 0,87	35,38
	26	12,51 ± 0,32	2,97 ± 0,26	4,68 ± 0,43	2,40 ± 0,09	13,25 ± 0,69	35,80
	27	11,49 ± 1,14	2,46 ± 0,14	9,88 ± 0,48	1,82 ± 0,14	21,39 ± 1,66	47,05
L 1 / S 0	28	12,18 ± 0,58	2,57 ± 0,20	9,66 ± 0,56	1,46 ± 0,08	20,06 ± 1,81	45,92
	29	12,36 ± 0,21	2,51 ± 0,18	9,39 ± 0,64	1,42 ± 0,03	19,64 ± 1,64	45,31
	30	14,92 ± 1,41	2,80 ± 0,14	8,90 ± 0,40	1,39 ± 0,10	18,48 ± 1,58	46,50
L 1 / S 1	31	12,22 ± 0,53	2,87 ± 0,21	8,51 ± 0,52	1,53 ± 0,06	16,20 ± 0,88	41,33
	32	12,85 ± 1,09	2,75 ± 0,10	5,75 ± 0,14	1,60 ± 0,10	12,51 ± 1,00	35,46
	33	11,74 ± 0,88	2,34 ± 0,10	7,59 ± 0,70	1,59 ± 0,10	15,20 ± 0,79	38,46
L 1 / S 2	34	11,19 ± 0,89	3,02 ± 0,26	8,38 ± 0,20	1,68 ± 0,13	17,90 ± 1,21	42,18
	35	11,46 ± 0,68	3,29 ± 0,20	7,99 ± 0,21	1,71 ± 0,12	17,45 ± 1,11	41,90
	36	11,68 ± 0,39	2,99 ± 0,22	7,37 ± 0,33	1,73 ± 0,13	16,19 ± 1,73	39,95

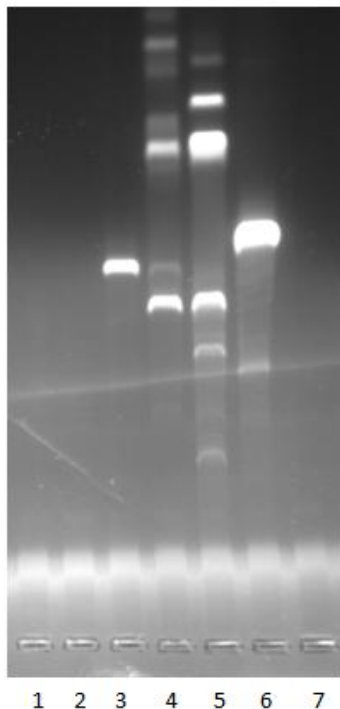
Hodnoty biogenních aminů produkovaných kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B25 při pH 5,0 a různé koncentraci laktosy a soli v kultivačním mediu

Faktory [%] pH 5,0	Č. vzorku	Detekované množství BA [mg.l ⁻¹]					
		putrescin	kadaverin	tyramin	spermidin	spermin	celkem
L0/S0	37	10,66 ± 0,66	2,89 ± 0,16	8,37 ± 0,29	1,36 ± 0,10	15,79 ± 1,26	39,09
	38	10,42 ± 0,67	2,78 ± 0,14	7,99 ± 0,73	1,40 ± 0,08	17,17 ± 0,68	39,77
	39	10,42 ± 0,84	2,68 ± 0,17	7,74 ± 0,66	1,41 ± 0,07	15,90 ± 0,70	38,15
L0/S1	40	9,50 ± 0,49	3,18 ± 0,10	7,21 ± 0,52	1,66 ± 0,10	16,56 ± 0,41	38,11
	41	25,58 ± 1,55	2,92 ± 0,07	6,89 ± 0,60	1,74 ± 0,11	16,96 ± 0,87	54,09
	42	11,47 ± 0,67	3,00 ± 0,13	7,18 ± 0,39	1,68 ± 0,09	16,65 ± 1,29	39,98
L0/S2	43	12,87 ± 0,78	3,39 ± 0,25	8,17 ± 0,22	2,06 ± 0,06	17,30 ± 0,76	43,79
	44	11,57 ± 0,98	2,96 ± 0,15	7,58 ± 0,32	1,83 ± 0,11	16,69 ± 1,09	40,64
	45	12,65 ± 0,74	3,22 ± 0,18	6,71 ± 0,51	1,89 ± 0,06	15,45 ± 0,78	39,91
L0,25/S0	46	10,97 ± 0,84	3,27 ± 0,18	4,97 ± 0,22	1,56 ± 0,10	11,49 ± 0,40	32,26
	47	10,96 ± 0,35	3,24 ± 0,17	6,41 ± 0,29	1,59 ± 0,11	12,94 ± 0,72	35,13
	48	11,28 ± 0,88	4,22 ± 0,15	5,49 ± 0,30	1,55 ± 0,09	12,99 ± 1,04	35,53
L0,25/S1	49	10,67 ± 0,48	3,84 ± 0,21	7,52 ± 0,19	1,86 ± 0,16	15,77 ± 1,55	39,67
	50	12,42 ± 1,06	3,70 ± 0,30	6,08 ± 0,27	1,88 ± 0,10	14,99 ± 1,30	39,08
	51	10,17 ± 0,81	3,23 ± 0,25	6,38 ± 0,30	1,90 ± 0,12	14,55 ± 0,56	36,23
L0,25/S2	52	11,94 ± 1,02	3,88 ± 0,29	6,75 ± 0,26	1,98 ± 0,17	17,77 ± 0,91	42,33
	53	7,66 ± 0,40	3,73 ± 0,27	15,41 ± 0,39	1,39 ± 0,08	27,56 ± 2,15	55,75
	54	7,78 ± 0,48	3,74 ± 0,18	12,95 ± 0,77	1,32 ± 0,12	24,62 ± 2,08	50,41
L0,5/S0	55	7,24 ± 0,60	3,50 ± 0,28	13,24 ± 0,59	1,13 ± 0,05	23,63 ± 0,87	48,74
	56	7,28 ± 0,37	3,85 ± 0,13	13,54 ± 0,68	1,14 ± 0,06	23,47 ± 1,86	49,28
	57	7,17 ± 0,52	3,69 ± 0,24	13,38 ± 0,91	1,13 ± 0,06	22,33 ± 1,71	47,69
L0,5/S1	58	6,48 ± 0,40	3,11 ± 0,25	12,48 ± 0,76	1,27 ± 0,07	21,91 ± 1,54	45,24
	59	7,56 ± 0,60	3,75 ± 0,29	11,65 ± 0,69	1,31 ± 0,08	23,93 ± 2,17	48,20
	60	7,73 ± 0,51	3,89 ± 0,24	12,20 ± 0,26	1,32 ± 0,06	24,06 ± 0,65	49,19
L0,5/S2	61	7,72 ± 0,56	3,57 ± 0,27	11,73 ± 0,69	1,47 ± 0,08	23,26 ± 1,09	47,74
	62	7,57 ± 0,72	3,72 ± 0,13	11,20 ± 0,78	1,37 ± 0,05	21,66 ± 2,04	45,51
	63	7,77 ± 0,22	3,56 ± 0,12	12,26 ± 0,56	1,44 ± 0,08	23,88 ± 1,94	48,91
L1/S0	64	7,34 ± 0,59	3,79 ± 0,18	11,74 ± 0,48	1,14 ± 0,09	22,43 ± 2,00	46,45
	65	6,74 ± 0,29	3,88 ± 0,26	12,10 ± 0,44	1,14 ± 0,07	22,33 ± 1,68	46,19
	66	7,23 ± 0,36	3,54 ± 0,22	10,44 ± 0,43	1,25 ± 0,06	19,87 ± 1,96	42,32
L1/S1	67	8,05 ± 0,21	3,75 ± 0,25	11,86 ± 0,81	1,37 ± 0,10	23,47 ± 1,01	48,50
	68	8,27 ± 0,47	3,57 ± 0,25	9,96 ± 0,96	1,33 ± 0,06	20,88 ± 1,41	44,02
	69	7,61 ± 0,37	3,96 ± 0,21	11,28 ± 0,65	1,37 ± 0,13	23,13 ± 1,18	47,34
L1/S2	70	7,85 ± 0,34	3,72 ± 0,18	11,56 ± 0,39	1,48 ± 0,09	23,28 ± 1,91	47,89
	71	8,44 ± 0,83	3,91 ± 0,05	10,78 ± 0,49	1,62 ± 0,09	21,78 ± 1,88	47,21
	72	7,96 ± 0,67	3,71 ± 0,18	11,70 ± 0,71	1,52 ± 0,07	52,01 ± 2,05	49,90

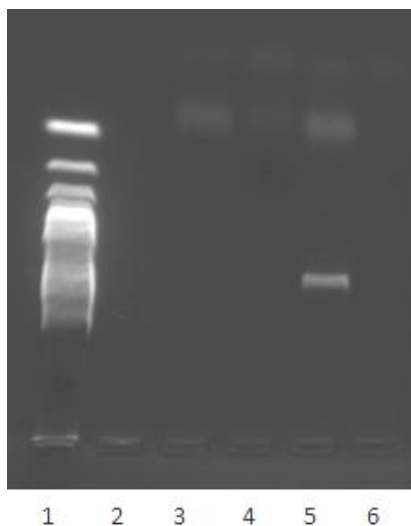
Hodnoty biogenních aminů produkovaných kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCDM239 při pH 4,5 a různé koncentraci laktosy a soli v kultivačním mediu

Faktory [%] pH 4,5	č. vzorku	Detekované množství BA [mg.l ⁻¹]		
		tyramin	spermin	celkem
L0/S0	1	8,57	4,65	13,22
L0/S1	2	7,45	6,32	13,77
L0/S2	3	7,80	0,82	8,62
L0,25/S0	4	8,62	7,90	16,52
L0,25/S1	5	10,37	14,05	24,42
L0,25/S2	6	5,67	11,00	16,67
L0,5/S0	7	3,53	7,48	11,01
L0,5/S1	8	3,96	8,65	12,61
L0,5/S2	9	3,98	15,97	19,95
L1/S0	10	10,11	2,36	12,47
L1/S1	11	8,77	3,48	12,25
L1/S2	12	6,97	6,26	13,23

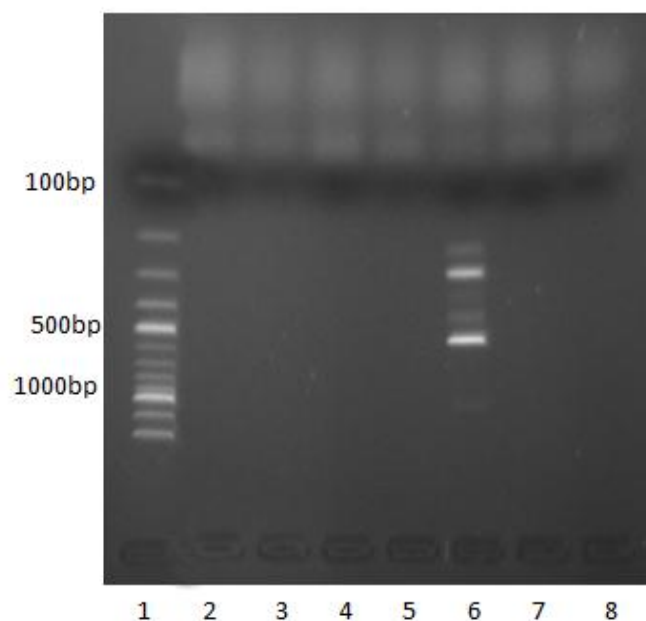
PŘÍLOHA P II: OPTIMALIZACE METODY PCR PRO DETEKCI PRODUKCE PUTRESCINU U LAKTOBACILŮ



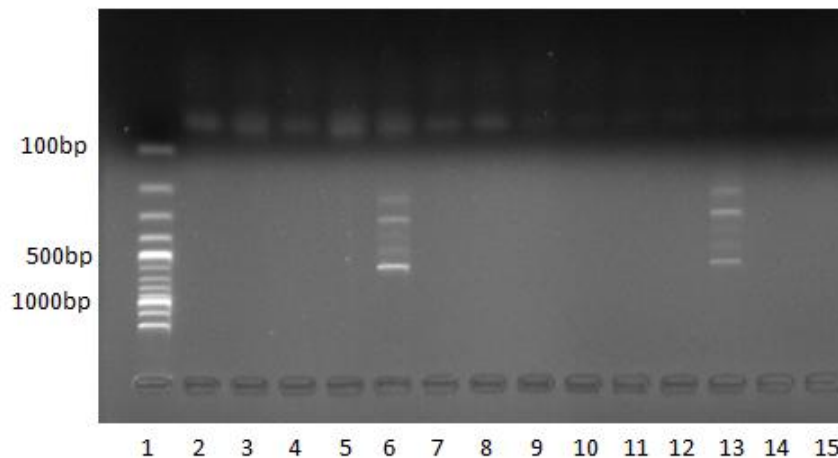
Optimalizace PCR s různými primery u kmene *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-2: 1. – 3′/16′; 2. – PUT1-R/PUT1-F; 3. – AgD1/AgD2; 4. – aguA-F1/aguA-R; 5. – aguA-F1/aguA-R; 6. – pozitivní kontrola; 7. – slepý pokus.



Výsledky elektroforézy produktů získaných s primery agdif/agdir: 1. – 100 bp marker; 2. – vynecháno; 3. – *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-2; 4. – *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3; 5. – *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-2; 6. – *L. curvatus* subsp. *curvatus* AI-3



Použití primerů AgD1/AgD2 pro detekci genu *aguA* u dalších kmenů laktobacilů: 1. – 100 bp marker; 2. – *L. curvatus* č. 15; 3. – *L. curvatus* č. 41; 4. – *L. curvatus* subsp. *curvatus* č. 39; 5. – *L. curvatus* subsp. *curvatus* č. 8; 6. – *L. brevis* č. 24; 7. – *L. curvatus* č. 42



Podpoření PCR reakce s primery AgD1/AgD2 použitím 10 x ředěné DNA a přidavkem $MgCl_2$: 1. – 100 bp marker; 2. – *L. curvatus* č. 15 s 0,2 μl $MgCl_2$; 3. – *L. curvatus* č. 41 s 0,2 μl $MgCl_2$; 4. – *L. curvatus* subsp. *curvatus* č. 39 s 0,2 μl $MgCl_2$; 5. – *L. curvatus* subsp. *curvatus* č. 8 s 0,2 μl $MgCl_2$; 6. – *L. brevis* č. 24 s 0,2 μl $MgCl_2$; 7. – *L. curvatus* č. 42 s 0,2 μl $MgCl_2$; 8. – negativní kontrola bez DNA; 9. – *L. curvatus* č. 15 s 0,5 μl $MgCl_2$; 10. – *L. curvatus* č. 41 s 0,5 μl $MgCl_2$; 11. – *L. curvatus* subsp. *curvatus* č. 39 s 0,5 μl $MgCl_2$; 12. – *L. curvatus* subsp. *curvatus* č. 8 s 0,5 μl $MgCl_2$; 13. – *L. brevis* č. 24 s 0,5 μl $MgCl_2$; 14. – *L. curvatus* č. 42 s 0,5 μl $MgCl_2$; 15. – negativní kontrola bez DNA

**PŘÍLOHA P III: VÝSLEDKY SROVNÁNÍ SEKVENCOVANÝCH
FRAGMENTŮ DNA KMENU *L. CURVATUS* SUBSP. *CURVATUS* AI-2 S
DOSTUPNÝMI DATABÁZEMI POMOCÍ NÁSTROJE BLAST**

Lactococcus lactis subsp. lactis KF147

Range 1: 1925306 to 1925705 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
708 bits(383)	0.0	393/400(98%)	0/400(0%)	Plus/Minus

Features:

agmatine deiminase

Query 1

TTGAAAATAAACTTAAAGAACATTTGAATGCTGAAAAATTCTTTGGCTTGSGGATGGAA 60
 |||
 |||

Sbjct 1925705

TTGAAAATAAACTTAAAGAACATTTGAGTGCTGAAAAATTCTTTGGCTTGGGGATGGAA 1925646

Query 61

TTGACCCASAAGAAACAAACGGTCATGTGGATGATGTTGCTTGCTTCGTAGCACCAGGGG 120
 |||

Sbjct 1925645

TTGACCCAGAAGAAACAAACGGTCACGTGGATGATGTTGCTTGCTTCGTAGCACCAGGGG 1925586

Query 121

AAGTTGCMTGCATTTATACTGARGATGAGAAGTCACCTTTTTATGAAGCAGCACAAAGATG 180
 |||

Sbjct 1925585

AAGTTGCATGCATTTATACTGAGGATGAGAAGTCACCTTTTTATGAAGCAGCACAAAGATG 1925526

Query 181

CCTATAAACGCTTGAGCCAAATGACAGATGCTAAAGGACGTCAACTCAAAGTTCATAAAT 240
 |||

Sbjct 1925525

CCTATAAACGCTTGAGCCAAATGACAGATGCTAAAGGACGTCAACTCAAAGTTCATAAAT 1925466

Query 241

TGACTTGTCAGCTAAAAATGTAACGATTAATAAACAATTTAGAATTGATACAGTTGAAG 300
 |||

Sbjct 1925465

TGACTTGTCAGCTAAAAATGTAACGATTAATAAACAATTTAGAATTGATACAGTTGAAG 1925406

Query 301

GAACAATGCCACGTGAAGACGGAGATATTTGTATTGCTTCATATATGAATTTCTTGATTA 360
 |||

Sbjct 1925405

GAACAATGCCACGTGAAGATGGAGATATTTGTATTGCTTCATATATGAATTTCTTGATTA 1925346

Query 361

CAAACAAAGGAGTTATCGTACCACAATACGGTGATGAAAA 400

Sbjct 1925345

CAAACAAAGGAGTTATCGTACCACAATACGGTGATGAAAA 1925306

**PŘÍLOHA P IV: VÝSLEDKY SROVNÁNÍ SEKVENCOVANÝCH
FRAGMENTŮ DNA KMENU *L. CURVATUS* SUBSP. *CURVATUS* AI-3
DOSTUPNÝMI DATABÁZEMI POMOCÍ NÁSTROJE BLAST**

Lactococcus lactis subsp. lactis KF147 chromosome, complete genome
Sequence ID: [ref|NC_013656.1|](#) Length: 2598144 Number of Matches: 1
Related Information

Range 1: 1925191 to 1925675 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
833 bits(451)	0.0	472/485(97%)	0/485(0%)	Plus/Minus

Features:

agmatine deiminase

Query 1

CTGAAAAAATTCTTTGGCTTGGGGATGGAATTGACCCASAAGAAACAAACGGTCATGTGG 60
|||||

|||||

Sbjct 1925675

CTGAAAAAATTCTTTGGCTTGGGGATGGAATTGACCCAGAAGAAACAAACGGTCACGTGG 1925616

Query 61

ATGATGTTGCTTGCTTCGTAGCACCAGGGGAAGTTGCMTGCATTTATACTGARGATGAGA 120
|||||

|||||

Sbjct 1925615

ATGATGTTGCTTGCTTCGTAGCACCAGGGGAAGTTGCATGCATTTATACTGAGGATGAGA 1925556

Query 121

AGTCACCTTTTTATGAAGCAGCACAAGATGCCTATAAACGCTTGAGCCAAATGACAGATG 180
|||||

|||||

Sbjct 1925555

AGTCACCTTTTTATGAAGCAGCACAAGATGCCTATAAACGCTTGAGCCAAATGACAGATG 1925496

Query 181

CTAAAGGACGTCAACTCAAAGTTCATAAATTGACTTGTCCAGCTAAAAATGTAACGATTA 240
|||||

|||||

Sbjct 1925495

CTAAAGGACGTCAACTCAAAGTTCATAAATTGACTTGTCCAGCTAAAAATGTAACGATTA 1925436

Query 241

AAAAACAATTTAGAAATYATACARTTGAAGGAACAATGCCACGTGAAGACGGAGATATTT 300
|||||

|||||

Sbjct 1925435

AAAAACAATTTAGAAATTGATACAGTTGAAGGAACAATGCCACGTGAAGATGGAGATATTT 1925376

Query 301

GTATTGCTTCATATATGAATTTCTTGATTACAAACAAAGGARTTATCGTACCACAATACG 360
|||||

|||||

Sbjct 1925375

GTATTGCTTCATATATGAATTTCTTGATTACAAACAAAGGAGTTATCGTACCACAATACG 1925316

Query 361

GTGATGAAAATGATGCTCTAGCATTAAACAAGTTCAAGAGATGTTTCCAGACCGCGAAA 420

```

|||||
Sbjct 1925315
GTGATGAAAATGATGCTCTAGCATTAAAACAAGTTCAAGAGATGTTTCCAGACCGCGAAA 1925256

Query 421
TAGTTGGCGTGAACACTGTTGAAGTAGTTTATGGTGGAGGAAATATTCAGTGCATCACCC 480
          |||
|||
Sbjct 1925255
TAGTTGGCGTGAACACTGTTGAAGTAGTTTATGGTGGAGGAAATATCCATTGTATTACTC 1925196

Query 481      AACAA 485
          ||||
Sbjct 1925195 AACAA 1925191

```

[Download](#) [GenBankGraphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Lactococcus lactis subsp. lactis CV56 chromosome, complete genome
Sequence ID: [ref|NC_017486.1|](#) Length: 2399458 Number of Matches: 1

[Related Information](#)

Range 1: 1680045 to 1680529 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
800 bits(433)	0.0	466/485(96%)	0/485(0%)	Plus/Minus

Features:

agmatine deiminase

```

Query 1
CTGAAAAAATTCCTTTGGCTTGGGGATGGAATTGACCCASAAGAAACAAACGGTCATGTGG 60
          |||
||||
Sbjct 1680529
CTGAAAAAATTCCTTTGGCTTGGGGATGGAATTGACCCAGAAGAAACAAACGGTCACGTGG 1680470

Query 61
ATGATGTTGCTTGCTTCGTAGCACCAGGGGAAGTTGCMTGCATTTATACTGARGATGAGA 120
          |||
|||||
Sbjct 1680469
ATGATGTTGCTTGCTTCGTAGCGCCAGGGGAAGTTGCATGCATTTATACTGAGGATGAGA 1680410

Query 121
AGTCACCTTTTTATGAAGCAGCACAAGATGCCTATAAACGCTTGAGCCAAATGACAGATG 180
          |||
|||||
Sbjct 1680409
AGTCACCTTTTTATGAAGCAGCACAAGATGCTTATAAACGCTTGAACCAAATGACAGATG 1680350

Query 181
CTAAAGGACGTCAACTCAAAGTTCATAAATTGACTTGTCCAGCTAAAAATGTAACGATTA 240
          |||
|||||
Sbjct 1680349
CTAAAGGACGTCAACTCAAGTTCATAAATTGACTTGTCCAGCTAAAAATGTAACGATTA 1680290

Query 241
AAAAACAATTTAGAATTYATACARTTGAAGGAACAATGCCACGTGAAGACGGAGATATTT 300
          |||
|||||

```

Sbjct 1680289
AAAAACAATTTAGAATTGATACAGTTGAAGGAACAATGCCACGTGAAGATGGAGATATTT 1680230

Query 301
GTATTGCTTCATATATGAATTTCTTGATTACAAACAAAGGARTTATCGTACCACAATACG 360

|||||
|||||

Sbjct 1680229
GTATTGCTTCATATATGAATTTTTTGGATTACAAACAAAGGAGTTATCGTACCACAATACG 1680170

Query 361
GTGATGAAAATGATGCTCTAGCATTAAAACAAGTTCAAGAGATGTTTCCAGACCGCGAAA 420

|||||
|||||

Sbjct 1680169
GTGATGAAAATGATGCTCTAGCACTAAAACAAGTTCAAGAGATGTTTCCAGACCGCGAAA 1680110

Query 421
TAGTTGGCGTGAACACTGTTGAAGTAGTTTATGGTGGAGGAAATATTCCTGCATCACCC 480

|||||
|| |

Sbjct 1680109
TAGTTGGCGTGAACACTGTTGAAGTAGTTTATGGTGGAGGAAATATCCATTGTATTACTC 1680050

Query 481 AACAA 485
 |||||

Sbjct 1680049 AACAA 1680045