

Aplikace molekulárně biologických metod při detekci genů a degradaci vybraných mikrobiálních metabolitů v potravinách

Ing. Hana Pištěková, Ph.D.

Teze disertační práce



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Teze disertační práce

**Aplikace molekulárně biologických metod při
detekci genů a degradaci vybraných
mikrobiálních metabolitů v potravinách**

**Application of molecular biological methods for the detection
of genes and degradation of selected microbial metabolites
in foodstuffs**

Autor: **Ing. Hana Pištěková, Ph.D.**

Studijní program: P2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: 2901V013 Technologie potravin

Školitel: Mgr. Petra Jančová, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Oponenti: prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.

Zlín, září 2020

© Hana Pištěková

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis**.
Publikace byla vydána v roce 2020

Klíčová slova: degradace biogenních aminů, histamin, qPCR, primery, Lactobacillus casei, Bacillus subtilis

Key words: biogenic amines degradation, histamine, qPCR, primers, Lactobacillus casei, Bacillus subtilis

Plná verze disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

ISBN 978-80-7454-946-5

ABSTRAKT

Tato disertační práce je zaměřena na detekci a kvantifikaci bakteriálních genů kódujících enzymy, jež se podílí na degradaci biogenních aminů (BA). Teoretická část předkládané práce pojednává o toxicitě BA, jejich výskytu v potravinách, faktorech, které se podílí na jejich vzniku i možnostech degradace těchto bakteriálních metabolitů. Zvláště se pak zabývá molekulárně biologickými metodami aplikovanými v potravinářství, které jsou efektivně využívány pro kontrolu producentů či degradérů těchto významných nízkomolekulárních dusíkatých látek.

V experimentální části práce byla ověřována schopnost vybraných kmenů degradovat BA a na základě získaných poznatků byly navrženy primery (pro cílové i „housekeepingové“ geny) pro dva bakteriální druhy: *Bacillus subtilis* a *Lactobacillus casei*. V rámci testů byly vybrány vhodné sady primerů (u kterých reakce běžely téměř se 100% efektivitou, netvořily se žádné dimery nebo nespecifické produkty) pro sledování genové exprese cílových genů (*yobN* kódující aminooxidázu u druhů *B. subtilis*; a *MCO* kódující „multi-copper“ oxidázu u druhů *L. casei*), jež kódují enzymy podílející se právě na degradaci BA. K relativní kvantifikaci obou cílových genů (*yobN*, *MCO*) byly využívány optimalizované metodiky kvantitativní real-time PCR s reverzní transkripcí (RT-qPCR).

U kmenů *B. subtilis* byla zaznamenána nejvyšší genová exprese, cílového genu kódujícího aminooxidázu (*yobN*), v exponenciální fázi růstu ($3,03 \pm 0,13$). Tento výsledek byl podpořen sledováním úbytku (degradací) BA v živném médiu MM1, pomocí metody HPLC/UV, kdy bylo zaznamenáno snížení histaminu o 17 % a kadaverinu o 18 % u kmenu CCM 2216 během 48 hodin. Dále byla prokázána 18% degradace tyraminu u kmenu CCM 2267 během 48 hodin v tomtéž médiu. Výsledky dále naznačily, že degradace BA pomocí druhu *B. subtilis* může být ovlivněna tvorbou spór.

I u kmenu *L. casei* CCDM 198 byla sledována genová exprese (relativní kvantifikace) cílového genu *MCO* v čase. Nejvyšší hodnota $5,04 \pm 0,45$ byla rovněž zaznamenána v exponenciální fázi růstu, přičemž úbytek sledovaných BA činil $21,22 \pm 4,17$ %. Později byl testován i vliv redoxních činidel 1% cysteinu (w/v) a 0,1% kyseliny askorbové (w/v) na expresi genu kódujícího „multi-copper“ oxidázu, tedy enzymu podílejícího se na degradaci BA. Z výsledků vyplývá, že 1% cystein (w/v) pozitivně ovlivnil růst bakterií, v důsledku čehož mírně vzrostla degradace BA ($22,64 \pm 3,13$ %). Zatímco po přidavku 0,1% kyseliny askorbové (w/v) následoval pokles množství bakterií, exprese cílového genu i nižší degradace BA ve všech sledovaných časech. V závěru experimentu bylo ověřeno, že kmen CCDM 198 degraduje sledované BA i v reálné potravině – UHT mléce.

ABSTRACT

This dissertation is focused on the detection and quantification of bacterial genes encoding enzymes involved in the degradation of biogenic amines (BA). The theoretical part of the presented work deals with the toxicity of BA, their occurrence in food, the factors that contribute to their formation and the possibility of degradation of these bacterial metabolites. In particular, it deals with molecular biological methods applied in the food industry, which are effectively used for the control of producers or degraders of these important low molecular weight nitrogenous substances.

In the experimental part of the thesis, the ability of selected strains to degrade BA was verified. Based on the acquired knowledge, primers (for target and housekeeping genes) were designed for two bacterial species: *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus casei*. In the tests, suitable primer sets were selected (in which the reactions proceeded with almost 100% efficiency, no dimers or non-specific products formed) for monitoring the relative expression of target genes (*yobN* encoding amine oxidase in *B. subtilis* species; and *MCO* encoding multicopper oxidase in *L. casei* species). These genes encode enzymes involved in BAs degradation. Optimized reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) methodologies were used for relative quantification of both target genes (*yobN*, *MCO*).

The highest relative expression of the gene encoding amine oxidase (*yobN*) in the exponential growth phase (3.03 ± 0.13) was recorded in *B. subtilis* strains. This result was supported by monitoring the reduction (degradation) of BA in the mineral medium by HPLC/UV, which showed a 17% decrease in histamine and 18% cadaverine for strain CCM 2216 over 48 hours. Furthermore, 18% degradation of tyramine was demonstrated by strain CCM 2267 within 48 hours in the same medium. The results further suggested that the degradation of BA by *B. subtilis* may be affected by spore formation.

Even with strain of *L. casei* CCDM 198 was monitored relative expression of the target gene (*MCO*) at time. The highest value of 5.04 ± 0.45 was also recorded in the exponential growth phase, with a decrease in the observed BAs of $21.22 \pm 4.17\%$. Later, the effect of redox reagents 1% cysteine (w/v) and 0.1% ascorbic acid (w/v) on the expression of the gene encoding multicopper oxidase, an enzyme involved in BA degradation, was tested. The results show that 1% cysteine (w/v) had a positive effect on bacterial growth, resulting in a slight increase in BA degradation ($22.64 \pm 3.13\%$). While the addition of 0.1% ascorbic acid (w/v) was followed by a decrease in the amount of bacteria, expression of the target gene and lower degradation of BA at all monitored times. At the end of the experiment, it was verified that the strain CCDM 198 degrades the monitored BA also in real food – UHT milk.

OBSAH

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	6
1.1 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH.....	6
1.2 DEGRADACE BA V POTRAVINÁCH.....	6
1.2.1 Mikrobiální degradace BA.....	6
1.3 MOLEKULÁRNÍ METODY	8
1.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	8
1.3.2 Real-time PCR (qPCR)	8
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	11
3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ	11
3.1 MIKROORGANISMY A KULTIVAČNÍ PODMÍNKY	11
3.2 METODIKA PŘÍPRAVNÉ FÁZE	11
3.2.1 Degradální test vytipovaných bakteriálních kmenů	11
3.2.2 Návrh vhodných sad primerů	12
3.2.3 Izolace nukleových kyselin a reverzní transkripce	12
3.2.4 Testování nových sad primerů pomocí metod PCR.....	13
3.3 METODIKA EXPERIMENTŮ S DEGRADAČNÍMI KMENY	13
3.3.1 Statistické metody	14
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	15
4.1 VÝSLEDKY PŘÍPRAVNÉ FÁZE	15
4.1.1 Prověřování degradační kapacity vybraných kmenů	15
4.1.2 Testování nových sad primerů pro <i>Bacillus subtilis</i>	15
4.1.3 Testování nových sad primerů pro <i>Lactobacillus casei</i>	16
4.2 VÝSLEDKY EXPERIMENTU S KMENEM <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	17
4.2.1 Růst buněk.....	17
4.2.2 Relativní kvantifikace genové exprese (<i>yobN</i> - gen kódující aminoxidázu).....	18
4.2.3 Detekce obsahu biogenních aminů pomocí HPLC/UV	19
4.3 VÝSLEDKY EXPERIMENTU S KMENEM <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	21
4.3.1 Růst buněk.....	21
4.3.2 Relativní kvantifikace genové exprese (<i>MCO</i> – gen kódující enzym „multi-copper“ oxidázu)	24
4.3.3 Detekce obsahu biogenních aminů pomocí HPLC/UV	26
ZÁVĚR.....	29
PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI.....	30
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	31
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	37
SEZNAM OBRÁZKŮ	38
SEZNAM PUBLIKACÍ.....	39

1.SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1.1 Biogenní aminy v potravinách

Biogenní aminy (BA) vznikají převážně dekarboxylací aminokyselin s klíčovou účastí enzymů zvaných **dekarboxylázy**. Tyto enzymy jsou rozšířené v živočiších, rostlinách i mikroorganismech, kde vykazují zvýšenou aktivitu zejména u bakterií (Santos, 1996).

Vyšší obsah BA se vyskytuje v široké škále potravin a nápojů, která zahrnuje rybí, masné a mléčné výrobky, víno, pivo, zeleninu, ovoce a kakao (Santos, 1996). Přičemž toxické dávky aminů je velmi těžké stanovit, neboť celkové množství zkonsumovaných BA většinou pochází z několika druhů potravin a potenciální toxický účinek je dán součtem aminů z různých zdrojů, synergie mezi nimi a dalšími individuálními faktory, jako je detoxikační schopnost jedince, alergie, či příjem léků s inhibitory aminooxidáz (Ruiz-Capillas a Herrero, 2019).

1.2 Degradace BA v potravinách

Jelikož je velmi obtížné odstranit již vzniklé aminy z potravin, protože odolávají vysokým teplotám, a dokonce i autoklávu, jsou hledány nové přístupy, které umožňují redukcí obsahu BA v potravinových maticích tam, kde je obtížné se vyhnout jejich produkci při technologickém postupu dané výroby (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Zaman et al., 2010).

V poslední době se objevily studie popisující degradaci histaminu pomocí **Maillardovy reakce**, což je komplex chemických reakcí mezi karbonylovými skupinami redukujících sacharidů (nebo produkty jejich degradace) a volnými aminoskupinami aminokyselin, peptidů, bílkovin nebo některých jiných dusíkatých sloučenin. V potravinářství se tato reakce vyskytuje během tepelného procesu a má za následek vznik významných sensoricky aktivních sloučenin, jež dodávají hotovým výrobkům specifickou barvu, vůni a chuť (Jiang et al., 2017; Nursten, 2005).

1.2.1 Mikrobiální degradace BA

Mikrobiální degradace biogenních aminů je principiálně založena na schopnosti některých bakterií produkovat deaminační enzymy (aminooxidázy nebo „multi-copper“ oxidázy), které katalyzují rozklad těchto sloučenin, jež jsou následně využity jako zdroj uhlíku a/nebo dusíku (Callejón et al., 2015).

Mikroorganismy schopné degradace BA v potravinách

Významné místo zauímají především LAB (bakterie mléčného kvašení) izolované z potravin, u kterých byla prokázána schopnost degradovat histamin a/nebo tyramin nejen v pufrovacím systému, ale i v sýru, rybích fermentovaných produktech a vínu (Callejón et al., 2014; Dapkevicius et al., 2000; García-Ruiz et al., 2011). Kmeny s degradačními schopnostmi patří k rodům *Brevibacterium*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Micrococcus* (Herrero-Fresno et al., 2012). Nadto LAB produkují během fermentačního procesu sekundární metabolity (např. organické kyseliny, diacetyl, ethanol, peroxid vodíku, reuterin, acetaldehyd, acetoin, oxid uhličitý a bakteriociny), které jim pomáhají v konkurenčním boji s jinými mikroby (Özogul a Hamed, 2017). Významné místo mezi těmito metabolity zauímají antimikrobiální peptidy – bakteriociny, jež přitahují již řadu desetiletí velkou pozornost jako přírodní konzervanty potravin. Mají status GRAS (generally recognized as safe) a používají se k omezení růstu patogenů, např. *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* místo chemických přípravků. Vedle toho LAB prokazují antimikrobní účinek proti bakteriím, jež jsou málo odolné vůči nízkému pH (např. *Escherichia coli*) a také přispívají k rozvoji typických organoleptických vlastností fermentovaných omáček (Castellano et al., 2012).

Mezi další významné druhy, jejichž kmeny dokáží snižovat obsah BA v potravinách, patří *Kocuria varians*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus carnosus*. Současně je potřeba zdůraznit, že se výrazně liší deaminační schopnost kmenů jednotlivých bakteriálních druhů (Latorre-Moratalla et al., 2010).

Schopnost snižování obsahu histaminu, tyraminu a putrescinu v komerčních vínech byla prokázána i u enzymového extraktu z vláknitých plísní *Penicillium citrinum* (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014).

Enzymy katalyzující degradaci BA

U mikroorganismů schopných redukce BA se objevují především aminooxidázy nebo „multi-copper“ oxidázy. Dalším enzymem, u něž byla objevena deaminační aktivita je transglutamináza.

a) Aminooxidázy

Mezi aminooxidázy (AO) patří rozsáhlá skupina enzymů, které katalyzují oxidaci biogenních aminů na odpovídající aldehydy. Tato reakce vyžaduje molekulární kyslík a produktem je vedle příslušného aldehydu, také odpovídající stechiometrické množství peroxidu vodíku a amoniaku: $R-CH_2-NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow R-CHO + NH_3 + H_2O_2$ (Leuschner, Heidel a Hammes, 1998; Wang et al., 2013; Yagodina et al., 2002).

b) „Multi-copper“ oxidázy (lakázy)

V poslední době byly izolovány z bakteriálních druhů *Lactobacillus plantarum* a *Pediococcus acidilactici* deaminační enzymy, které se nazývají **lakázy** (benzendiol: kyslík-oxidoreduktázy), (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014). Ty byly zařazeny mezi „**multi-copper“ oxidázy**, jež využívají jako kofaktor měď (resp. Cu^{2+}) a vyskytují se v široké škále organismů včetně bakterií, hub, rostlin, hmyzu a obratlovců (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Su et al., 2013).

c) Transglutamináza

V posledních letech přitahuje pozornost i mikrobiální transglutamináza, kterou produkují některé bakterie během fermentace. Tento enzym modifikuje proteinové molekuly zesíťováním, vazbou nízkomolekulárních sloučenin a deaminačními reakcemi. Tím může potlačovat dekarboxylaci volných aminokyselin a následně i tvorbu BA. Vyskytuje se u sporulujících bakterií (např. *Bacillus subtilis*); (Kieliszek a Misiewicz, 2014; Yerlikaya et al., 2015).

1.3 Molekulární metody

Jejich hlavní přínos spočívá v tom, že biogenní aminy jsou produkovány, ale i degradovány mikroorganismy vybavenými příslušnými enzymy – dekarboxylázami (produkce BA) a aminoroxidázami či lakázami (degradace BA), a je tedy možné detekovat přímo geny kódující tyto klíčové enzymy, čímž lze zabránit akumulaci BA v potravinách ještě před jejich vnikem (Marcobal, de las Rivas a Muñoz, 2006; Landete et al., 2011).

1.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Klasická PCR metoda umožňuje rychlé pomnožení vybrané sekvence DNA, která je ohraničena primery. Samotnou syntézu nového řetězce provádí termostabilní polymeráza. Při reakci se cyklicky opakují teploty, při kterých dochází k denaturaci, nasedání primerů a syntéze nového řetězce, takže dochází k exponenciálnímu nárůstu cílových fragmentů DNA (Mullis et al., 1986).

1.3.2 Real-time PCR (qPCR)

Princip qPCR spočívá v posloupnosti amplifikačních cyklů stejně jako u klasické PCR, avšak součástí termocykléru je fluorescenční detektor, který zaznamenává amplifikované produkty v každém cyklu (Martínez et al., 2011; Postollec et al., 2011).

qPCR se v potravinářství využívá ke studii genů kódujících toxiny, k detekci geneticky modifikovaných organismů, nežádoucích příměsí (např. geny obilovin u bezlepkových potravin) a nepatogenních hnilobných mikroorganismů

(Gachon, Mingam a Charrier, 2004; Martínez et al., 2011). V kombinaci s reverzní transkripcí (RT) lze odhadnout i transkripční množství, tudíž poskytnout data o mikrobiální aktivitě (Postollec et al., 2011).

Pro vizualizaci nukleových kyselin se používají **fluorescenční látky**, které se vážou na DNA buď **(a) nespecificky** – umožňují vizualizaci celé dvoušroubovice DNA vytvořené reakcí, anebo **(b) specificky** – rozlišují amplifikace cílových sekvencí od primerů, dimerů a nespecifických amplifikací (Martínez et al., 2011).

Výsledkem qPCR je amplifikační křivka, kde je nárůst fluorescence vyneseno proti číslu cyklu (Postollec et al., 2011). Průběh qPCR na amplifikační křivce může být rozdělen do čtyř fází (lineární klidová fáze, exponenciální fáze, logaritmičká fáze a fáze plató). Cyklus, ve kterém dojde k dosažení desetinásobku standardní odchylky výchozí hodnoty (baseline), se označuje jako prahový cyklus „threshold cycle“ (Ct). Tato hodnota je přímo úměrná výchozímu počtu kopií původního templátu a používá se k výpočtu experimentálních výsledků (Martínez et al., 2011; Wong a Medrano, 2005).

Analýza křivky tání

Křivka tání se tvoří na konci testu postupným zvyšováním teploty od 50 °C do 90 °C, během kterého se zaznamenává fluorescence. Pomocí záporné derivace křivky tání dostaneme píky s charakteristickou teplotou pro daný PCR produkt. Nespecifické produkty a dimery se zpravidla odlišují nižší teplotou tání (Arya et al., 2014).

Efektivita reakce

Pro výpočet efektivity je nejprve nezbytné zhotovit standardní křivku závislosti prahového cyklu Ct na logaritmu koncentrace DNA. Pomocí hodnoty sklonu křivky je pak vypočítána efektivita (E) samotné amplifikační reakce (Wong a Medrano, 2005). Sklon standardní křivky by se měl pohybovat v rozmezí od -3,58 do -3,10, což odpovídá efektivitě amplifikace 90 - 110 %. Koeficient determinace (r^2) lineární regrese by měl nabývat hodnot $\geq 0,98$ (Broeders et al., 2014).

Kvantifikační metody

Většina mikrobiologických aplikací vyžaduje přesnou kvantifikaci. **Absolutní kvantifikace** je založena na srovnání hodnot prahového cyklu Ct se standardní křivkou, amplifikovanou při známém množství cílového genu. Tato metoda vyžaduje podobnou amplifikační efektivitu pro všechny vzorky a standardy. To znamená pečlivý výběr standardu templátu (Postollec et al., 2011).

Relativní kvantifikace se používá k odhadu změn v expresi genů a je založena na použití externího standardu nebo kontrolního vzorku. Ve studiích genové exprese je relativní kvantifikace často uváděna jako poměr úrovně normalizované exprese experimentálního vzorku ke kontrolnímu vzorku (Postollec et al., 2011). Pro výpočet lze použít Pfafflův model, který kombinuje kvantifikaci a normalizaci genu v jednom výpočtu. Tato metoda zahrnuje stanovení amplifikační efektivity cílových a srovnávacích genů pro korekci rozdílů mezi oběma testy a využívá se v případě, kdy tyto geny nejsou amplifikovány se stejnou efektivitou (Wong a Medrano, 2005). Výpočet genové exprese se pak provádí podle následujícího matematického vztahu:

$$R = \frac{(E_{\text{cílového genu}})^{\Delta Ct_{\text{cílového genu}}(\text{kontrola-vzorek})}}{(E_{\text{srovnávacího genu}})^{\Delta Ct_{\text{srovnávacího genu}}(\text{kontrola-vzorek})}} \quad (\text{Pfaffl, 2001})$$

Zásady pro návrh primerů u metody qPCR

Správně navržené primery jsou zásadní pro určení specifity, citlivosti a robustnosti PCR (Bustin a Huggett, 2017). Nejvyšší pozornost je kladena na optimalizaci teploty ve druhé fázi cyklu, při které nasedá nejvyšší množství primerů na templát. Optimální teplota nasedání primerů se sice odvíjí od teploty tání primerů, kterou lze vypočítat, ale musí být ověřena experimentálně (Bustin a Huggett, 2017). Dalším důležitým parametrem je délka PCR produktu. Délka ampikonů bývá u qPCR nejčastěji v rozmezí 70 - 250 bp, u delších DNA fragmentů obvykle bývá vyšší prahový cyklus (Debode et al., 2017).

Praktické využití technik PCR při kontrole producentů/degradérů BA

Pro detekci genů kódujících dekarboxylázové enzymy byla navržena a testována řada primerů pro detekci histidindekarboxylázy, tyrozindekarboxylázy i ornitindekarboxylázy (Landete et al., 2007).

Dále byly vyvinuty různé metodiky PCR pro detekci LAB produkujících BA v mléčných výrobcích a qPCR pro detekci a kvantifikaci histamin-produkujících, tyramin-produkujících a putrescin-produkujících bakterií. Tyto metody byly úspěšně aplikovány v různých fázích výroby sýru, včetně testů hotových výrobků (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; O'Sullivan et al., 2015).

Jiná situace panuje u bakterií schopných degradace BA, kde se touto problematikou zabývá jen málo odborných článků, a ještě méně popisuje primery vhodné i pro qPCR. Jeden z mála publikovali autoři Eom, Seo a Choi (2015), kde navrhli primery vhodné i pro qPCR na gen kódující aminosidázou *yobN* druhu *Bacillus subtilis*. V další studii zveřejnili Callejón et al. (2014) primery pro lakázový gen *sufI* druhu *Lactobacillus plantarum*. V poslední době byly popsány i primery pro gen kódující „multi-copper“ oxidázu druhu *Lactobacillus paracasei*, které však nejsou určeny pro qPCR (Guarcello et al., 2016).

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo sledování genů, kódujících enzymy, které se podílí na degradaci biogenních aminů u bakterií s potenciální schopností degradovat tyto bakteriální metabolity.

Konkrétní cíle:

- výběr vhodných kmenů se schopnostmi degradovat biogenní aminy;
- typizace bakterií pomocí molekulárně biologických metod;
- výběr vhodných „housekeepingových“ genů;
- návrh vhodných sad primerů pro cílové a srovnávací geny;
- optimalizace izolace bakteriální DNA i RNA ze vzorků;
- optimalizace metody RT-qPCR (kvantitativní real-time PCR s reverzní transkripcí) pro sledování exprese genů kódujících enzymy katalyzující degradaci BA;
- sledování exprese vybraných genů na úrovni syntézy mRNA v průběhu degradace BA a v závislosti na vybraných faktorech (složení kultivačního média, vlivu činidel ovlivňujících redox-potenciál kultivačního média).

3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

3.1 Mikroorganismy a kultivační podmínky

Pro hlavní degradační experimenty byly použity kmeny druhu *Bacillus subtilis* (CCM 2267, CCM 2213, IB 1a), jež byly kultivovány při 30 °C v živném médiu MM1 a masopeptonovém bujónu MPB. Dále kmeny druhu *Lactobacillus casei* (CCDM 198 a CCDM 145), které byly kultivovány v anaerobním prostředí, při 37 °C v MRS a MRS s poloviční navázkou (MRS/2).

3.2 Metodika přípravné fáze

3.2.1 Degradální test vytipovaných bakteriálních kmenů

V první fázi byly vhodné kmeny podrobeny **rychlému degradačnímu testu**, kdy byly bakterie kultivovány v 5 ml média obohaceném o BA a ideálních podmínkách pro daný druh. Od každého kmenu byly zaočkovány 2 zkumavky. Po 48 hodinách byla kultivace ukončena, kultura byla centrifugována 2000 g po dobu 10 minut a ze supernatantu byly následně odebrány 3 vzorky pro stanovení obsahu BA pomocí HPLC/UV dle metodiky (Dadáková, Křížek a Pelikánová, 2009). Výsledná data byla zpracována s využitím softwaru Chromeleon™ 6.8 software (Thermo Fisher Scientific, USA).

Kmeny s nejvyšší degradační schopností byly identifikovány pomocí sekvenace a/nebo MALDI-TOF MS.

3.2.2 Návrh vhodných sad primerů

Pro vybrané bakteriální druhy (*Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae* a *Lactobacillus casei*) byly navrženy primery ze sekvencí příslušných genů s využitím dostupných bakteriálních sekvencí v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information). Sekvence genů byly mezi sebou porovnány pomocí programu Jalview 2.9.0b2 (Waterhouse et al., 2009) a výsledné primery byly vytvořeny pomocí programů Primer Design genefisher2 a NCBI Primer-Blast tool.

3.2.3 Izolace nukleových kyselin a reverzní transkripce

Izolace nukleových kyselin z média

DNA byla izolována z narostlé kultury pomocí komerčních kitů High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Švýcarsko), UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio, USA), NucleoSpin Genomic DNA from tissue (Macherey-Nagel, Německo) dle doporučených postupů jednotlivých výrobců (2017; 2016; 2012). Izolace RNA byla provedena pomocí komerčních kitů High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Švýcarsko), PowerMicrobiome RNA Isolation Kit (MoBio, USA) a RNeasy PowerLyzer Tissue Cells Kit (Qiagen, USA), rovněž dle postupů jednotlivých výrobců.

Izolace bakteriální RNA z potravinových matic

Izolace RNA z bakterií kultivovaných v odtučněném UHT mléce byla provedena pomocí kitu RNeasy PowerLyzer Tissue Cells Kit (Qiagen, USA). Kultura (10 ml) byla centrifugována při 2000 g po dobu 10 minut. Ze sedimentu bylo odebráno 50 mg sraženiny, která byla přemístěna do vychlazené zkumavky „Bead Tubes“, poté bylo napipetováno 600 µl TR1/Me a homogenizováno dle přiloženého návodu (2017).

Izolace bakteriální RNA z modelového sýru s nízkodohřívanou sýřeninou byla rovněž provedena pomocí kitu RNeasy PowerLyzer Tissue Cells Kit (Qiagen, USA). Navážka 50 mg sýru byla přemístěna do vychlazené zkumavky „Bead Tubes“, poté bylo napipetováno 600 µl TR1/Me a homogenizováno dle přiloženého návodu kitu RNeasy PowerLyzer Tissue&Cells Kit (Qiagen).

Reverzní transkripce

Pro relativní kvantifikaci genové exprese u metabolicky aktivních bakterií byla jako templát pro qPCR použita mRNA, jež byla převedena do cDNA reverzní transkripcí pomocí komerčního kitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Švýcarsko), dle doporučeného postupu.

3.2.4 Testování nových sad primerů pomocí metod PCR

Primery byly nejprve testovány pomocí „klasické“ PCR. Na základě výsledků byla hledána optimální teplota a vhodné sady primerů pomocí RT-qPCR.

Testování primerů pro cílové a srovnávací geny na PCR

Ověření funkčnosti a nalezení optimální teploty nasedání nových primerů bylo nejprve provedeno pomocí PCR s gradientem teplot nasedání primerů v rozmezí 57 - 63 °C. Výsledné amplicony byly elektroforeticky separovány v 1% (w/v) agarózovém gelu.

Testování primerů pro cílové a srovnávací geny na RT-qPCR

Pomocí připravené ředící řady templátové cDNA v rozmezí 10^0 až 10^{-3} byla stanovena efektivita reakce. Dále byla analyzována záporná derivace křivky tání, která umožňuje odlišit nespecifické produkty a dimery, jež se zpravidla projevují nižší teplotou tání.

3.3 Metodika experimentů s degradačními kmeny

Kultivace buněk a stanovení růstových křivek

Inokulum testovaných kmenů bylo narůstáno podle podmínek uvedených v kapitole 3.1. *Mikroorganismy a kultivační podmínky* po dobu 24 hodin. Poté bylo 200 - 5000 μl zaočkováno 50 ml média v infuzní láhvi tak, aby bylo dosaženo počáteční koncentrace buněk v médiu $7,5 \pm 0,3 \log \text{CFU.ml}^{-1}$ (u kmenů *L. casei* byla počáteční koncentrace buněk v médiu $6,2 \pm 0,3 \log \text{CFU.ml}^{-1}$). *B. subtilis* byl kultivován v MM1 a *L. casei* v MRS/2 a odtučněném UHT mléce. Ihned po zaočkování byly odebrány první vzorky pro stanovení počáteční koncentrace BA, relativní exprese cílových genů a růstovou křivku. Další odběry pro uvedené analýzy byly provedeny po 12, 24 a 48 hodinách. U *L. casei* byl přidán sterilní koncentrát kyseliny askorbové a cysteinu těsně před inokulací tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace 0,1 % (w/v), resp. 1 % (w/v).

U druhu *B. subtilis* a při kultivaci *L. casei* v mléce byly stanoveny celkové počty mikroorganismů (CFU.ml^{-1}) plotnovou metodou. Při kultivaci *L. casei* v MRS/2 byla stanovena optická hustota buněk při vlnové délce 550 nm (OD_{550}) proti médiu bez inokulace v mikrotitračních destičkách pomocí přístroje TECAN Infinite M200 PRO (Tecan, Rakousko).

Relativní kvantifikace genové exprese

Cílové geny (kódující aminooxidázy a „multi-copper“ oxidázy) patří mezi inducibilní, našim cílem tedy bylo sledování exprese těchto genů v čase a pod vlivem faktorů, které ovlivňují redoxní potenciál kultivačního média (přídavek cysteinu a kyseliny askorbové). U vybraných kmenů byly ve zvolených časech 12, 24 a 48 h odebrány vzorky pro sledování exprese cílových genů metodou real-time PCR a stanovení úbytku biogenních aminů v médiu prostřednictvím

HPLC/UV. Po centrifugaci byla ze supernatantu provedena extrakce BA pomocí kyseliny chloristé a dále pak derivatizace vzorku následována analýzou BA na HPLC/UV. Z buněk byla izolována RNA, která byla převedena reverzní transkripcí do cDNA a následně byla sledována genová exprese (relativní kvantifikace) pomocí qPCR (Termocykler DFX 96 Real-Time, Systém BIO RAD). Pro qPCR byla použita reakční směs o celkovém objemu 25 μl , která obsahovala: 12,5 μl Fast Start Universal SYBR Green Master 2X (Roche, Švýcarsko); 9,5 μl H_2O ; každý primer 0,3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; cDNA 2,5 μl . Relativní genová exprese byla vypočítána dle Pfafflova modelu. Jako kontrolní vzorek byl pro stanovení genové exprese u *B. subtilis* vybrán stejný kmen jako experimentální, paralelně kultivovaný v totožných podmínkách i médiu, ale bez přídavku BA. U druhu *L. casei* byl jako kontrolní vzorek použit kmen CCDM 145 kultivovaný paralelně ve stejných podmínkách jako experimentální kmen CCDM 198 (37 °C, anaerobní prostředí) v MRS/2 s přídavkem 0,2 g.l^{-1} testovaných BA (histamin, tyramin, kadaverin a putrescin).

Výskyt dimerů nebo nespecifických produktů byl kontrolován u každého testu pomocí křivky tání, která byla provedena v teplotním rozmezí 50 - 95 °C. Pro další výpočty byla stanovena efektivita reakce E, ze standardní křivky závislosti prahového cyklu Ct na logaritmu koncentrace DNA.

Analýza biogenních aminů pomocí HPLC/UV

Výsledky exprese sledovaných (cílových) genů kódujících aminooxidázy a „multi-copper“ oxidázy byly srovnávány s výsledky získanými metodou HPLC/UV, pomocí které byl pozorován úbytek BA v živném médiu. Příprava vzorků i podmínky samotné metody probíhaly stejným způsobem jako v přípravné fázi.

3.3.1 Statistické metody

Pro odhad závislosti prahového cyklu na koncentraci DNA regresní křivky (lineární metoda nejmenších čtverců) byl použit Unistat® 6.5 (software Unistat, London, UK).

Pro vyhodnocení získaných dat z HPLC byl využit Kruskal-Walisův test ke srovnání středních hodnot více než dvou nezávislých souborů, popř. Wilcoxonův test pro srovnání středních hodnot dvou nezávislých souborů. Data byla vyhodnocována pomocí softwaru Unistat® 6.5 (software Unistat, London, UK) na hladině významnosti 0,05.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Tato část disertační práce je rozdělena na přípravnou fázi a výsledky experimentů s druhy *B. subtilis* a *L. casei*. Přípravná fáze experimentů byla zaměřena na vyhledávání kmenů se schopností degradace biogenních aminů. U vytipovaných bakteriálních druhů byly navrženy primery pro srovnávací i cílové geny a optimalizovány podmínky metod PCR.

S vybranými sadami primerů byla následně kvantifikována relativní genová exprese (na úrovni syntézy mRNA) genů kódujících enzymy, jež katalyzují degradaci biogenních aminů u druhů *B. subtilis* a *L. casei*. Výsledky obou experimentů byly sepsány do dvou samostatných článků.

4.1 Výsledky přípravné fáze

Pro každý vytipovaný bakteriální druh byly navrženy tři sady primerů na geny kódující enzymy podílející se na degradaci BA s ohledem na doporučené podmínky pro metodu RT-qPCR. Stejným způsobem bylo postupováno při tvorbě primerů pro srovnávací geny. Všechny sady primerů byly podrobeny testování metodami PCR. Pozornost byla kladena především na stanovení optimální teploty nasedání primerů a vyloučení tvorby nespecifických produktů PCR.

4.1.1 Prověřování degradační kapacity vybraných kmenů

V první fázi byla testována degradační schopnost 12 kmenů ve zkumavkách: *B. subtilis* (CCM 2216, CCM 2267, CCM 4062 IB1a, IB5a), *B. brevis* IB22, *B. pumilus* IB13, *B. spahericus* IB15, *E. cloacae* (IB16a, IB16b, CCM 1903, CCM 8572). Nejvyšší souhrnný úbytek BA (histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu) po 48 h kultivace (60 ± 4 %) byl zaznamenán u kmenu CCM 2216, druhu *B. subtilis*, proto byl tento druh vybrán pro sledování genové exprese genu *yobN*, kódujícího aminosoxidázy.

Následně byla zaměřena pozornost na druh *L. casei*, jelikož v rámci bakalářské práce (Beneš, 2018) se podařilo snížit koncentraci putrescinu, kadaverinu a histaminu o více než 50 % během 24 hodin pomocí kmenu CCDM 198. Naše předběžné degradační testy ve zkumavkách potvrdily tyto výsledky, kdy byl zaznamenán po 48 hodinách úbytek histaminu 50 ± 4 %, tyraminu 49 ± 1 %, kadaverinu 50 ± 1 % a putrescinu 49 ± 2 %.

4.1.2 Testování nových sad primerů pro *Bacillus subtilis*

V počáteční fázi byly testovány 3 sady nových primerů pro cílový gen *yobN* a srovnávací gen *gyrB*.

Teplota nasedání a specifita primerů - Bacillus subtilis

Na základě testů specifity pomocí PCR, analýzy křivky tání a srovnání Ct hodnot jednotlivých sad primerů, byly vybrány sady *yobN6* (F: 5'- GCTATA CATGGGCCGATGAGG-3'; R: 5'-CCGCAGAATACGGGTACTGG-3'; 162 bp) a *gyrB1* (F: 5'-AGCGGAGATGACGTAAGGGA-3'; R: 5'-TCTTGCTCTTGC CGCCAT TA-3'; 216 bp). Tyto sady netvoří nespecifické produkty při teplotě nasedání primerů 60 °C. Podle záporné derivace křivky tání je teplota tání specifických PCR produktů pro cílový gen s použitím primerů *yobN6*: 76 °C a pro srovnávací gen pomocí *gyrB1*: 78 °C.

Účinnost RT-qPCR se sadami primerů yobN6 a gyrB1

Sady primerů byly vybírány i s ohledem na účinnost reakce. Sklon standardní křivky (závislosti Ct hodnot na vstupní DNA; v reakci použity primery *yobN6*) dosahuje hodnoty -3,2345, což odpovídá 104% efektivitě reakce. V případě testování srovnávacího genu (použity primery *gyrB1*) byl zjištěn sklon křivky - 3,313, což odpovídá 100% efektivitě reakce. U obou sad primerů se tedy efektivita reakce pohybuje v optimálním rozmezí 90 - 110 %. V požadovaných mezích ($\geq 0,98$) se drží i oba koeficienty determinace (Broeders et al., 2014), které vycházejí 0,9989, resp. 0,9998.

4.1.3 Testování nových sad primerů pro *Lactobacillus casei*

Stejně jako u druhu *B. subtilis* byly v počáteční fázi testovány 3 sady nových primerů pro cílový gen kódující multi-copper oxidázu (MCO) a srovnávací gen kódující glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH). Cílem bylo opět vybrat funkční sady primerů a stanovit optimální parametry pro RT-qPCR.

U vybraných primerů *MCO4* (F: 5'- GCGTGGTGACATCAAAATAGGG -3'; R: 5'- TGGGACTACCGGGCTGATTA -3'; 94 bp) a *GAPD4 MCO4* (F: 5'- GCACAGCGTGTCTGTTGT -3'; R: 5'- TCGTTCCAGCCAAAGCTAGG-3'; 137 bp) bylo ověřováno i nasedání na jiné druhy rodu *Lactobacillus*, přičemž bylo zjištěno, že primery pro srovnávací gen nasedají i na *Lactobacillus rhamnosus* a detekují tedy celou skupinu *Lactobacillus*, která zahrnuje druhy *L. casei*, *L. paracasei* a *L. rhamnosus*. PCR produkt o správné délce se u primerů pro cílový gen *MCO* objevil jen u jednoho kmenu *L. rhamnosus*, což může být způsobeno nepřítomností tohoto cílového genu u zbylých testovaných kmenů.

Při optimalizaci podmínek u metody qPCR byla snížena koncentrace primerů na 250 nmol.l⁻¹, aby nedocházelo k tvorbě nespecifických produktů u kontrolního vzorku při teplotě nasedání primerů 60 °C.

Účinnost RT-qPCR se sadami primerů MCO4 a GAPD4

Sklon standardní křivky (závislosti Ct hodnot na vstupní DNA; v reakci použity primery MCO4) dosahuje hodnoty -3,344, což odpovídá 99% efektivitě reakce. V případě testování primerů pro srovnávací gen (použity primery GAPD4) byl zjištěn sklon křivky -3,314, jež odpovídá 100% efektivitě reakce. U obou sad primerů se efektivita pohybuje v optimálním rozmezí 90 - 110 %, reakce tedy probíhá s dostatečnou účinností. V požadovaných mezích ($\geq 0,98$) se drží i oba koeficienty determinace (0,999, resp. 1).

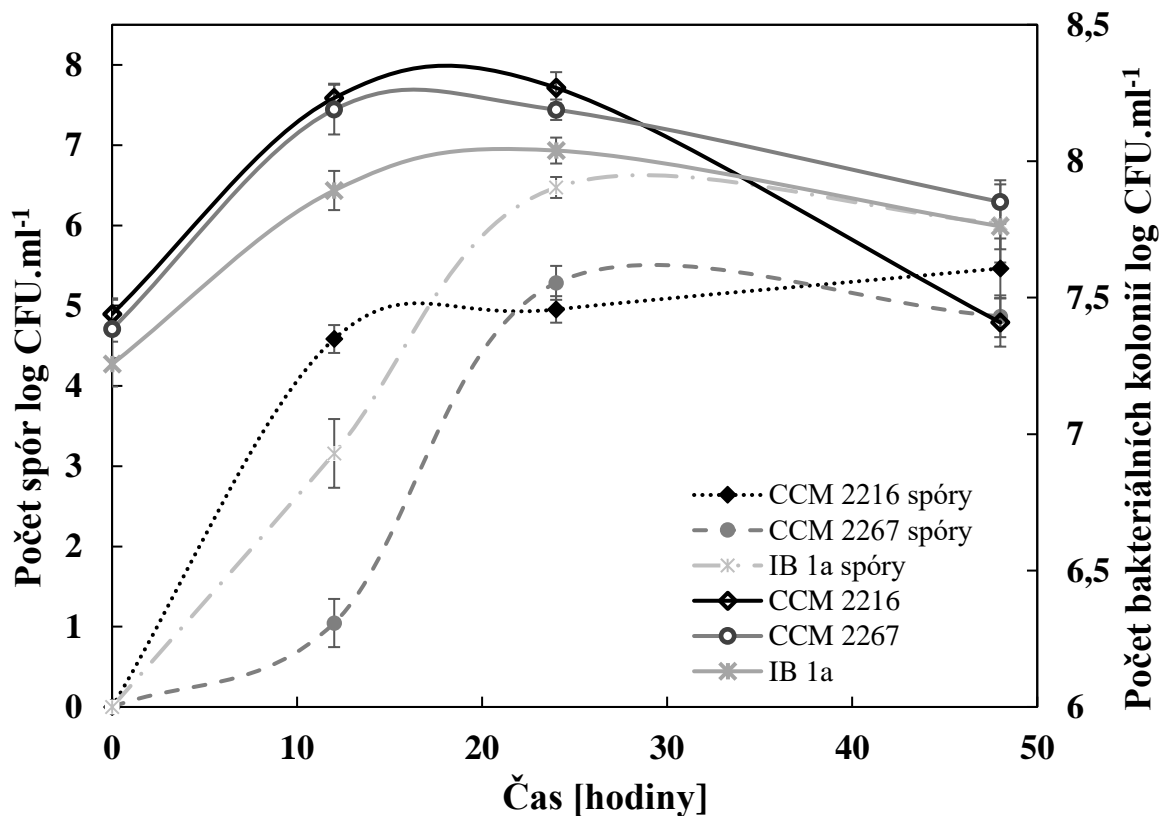
4.2 Výsledky experimentu s kmenem *Bacillus subtilis*

Bakteriální druh *Bacillus subtilis* byl mimo jiné zvolen pro výrazné degradační schopnosti kmenu IB1a, který redukoval obsah histaminu o 97 % (Butor et al., 2017). Dále byly testovány kmeny CCM 2216 a CCM 2267. Přičemž kmen CCM 2216 dosáhl v přípravných degradačních testech v 5 ml ochuzeného masopeptonového bujónu MPB/2 s přidávkem BA ($0,2 \text{ g.l}^{-1}$) nejvyššího souhrnného úbytku histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu po 48 h kultivace ($60 \pm 4 \%$). Během samotného experimentu, který byl prováděn v infuzních láhvích s 50 ml MM1, byly ve stanovených časech 0, 12, 24 a 48 hodin odebrány vzorky pro stanovení růstových křivek, relativní kvantifikaci genové exprese genu *yobN* a množství BA v supernatantu. Po prvních testech se ukázalo, že sledované kmeny *B. subtilis* nerostou v minerálním médiu s BA jako jediným zdrojem uhlíku a dusíku vůbec, nebo jen velmi omezeně. Pro povzbuzení růstu byla tedy u všech testů do média MM1 přidávána glukóza v množství $0,5 \text{ g.l}^{-1}$.

4.2.1 Růst buněk

Bacillus subtilis patří mezi druhy, které při nedostatku výživových látek tvoří spóry, proto byla během degradačních testů sledována vedle růstových křivek i sporulace testovaných kmenů (Obr. 4.1). Odběr vzorků probíhal ve stejných časech jako pro metody RT-qPCR a HPLC/UV. Nejvyšší množství buněk bylo zaznamenáno u kmenu CCM 2216 v médiu MM1 po 24 hodinách kultivace ($1,9 \cdot 10^8 \text{ CFU.mL}^{-1}$). Nejvyšší množství spór ($2,97 \cdot 10^6 \text{ CFU.ml}^{-1}$) se objevilo po 24 hodinách kultivace u kmenu IB1a.

Žádné rozdíly v počtech buněk nebyly pozorovány v MM1 s/bez BA, což by mohlo znamenat, že zvolená koncentrace BA ($0,2 \text{ g.l}^{-1}$) neovlivňuje růst buněk.

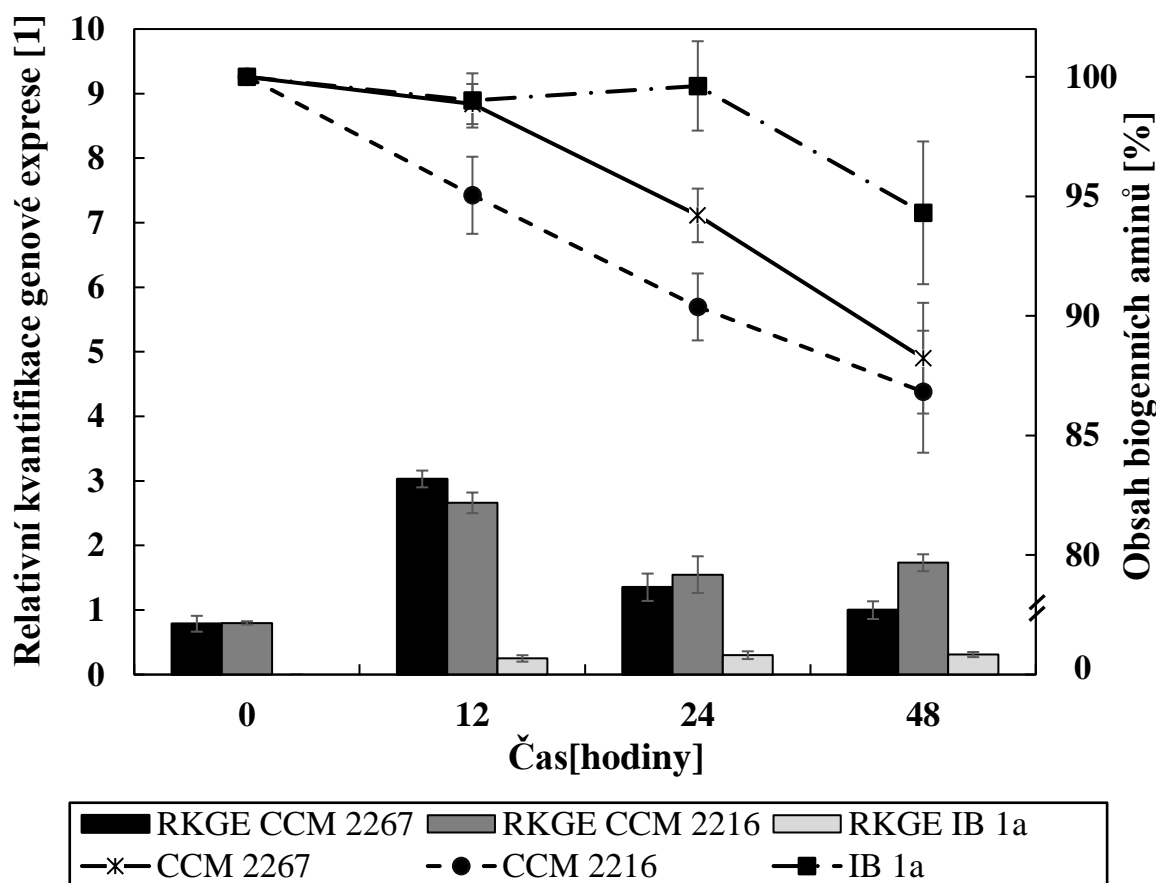


Obr. 4.1: Růst kmenů *B. subtilis* během degradace BA v médiu MM1 po dobu 48 h v porovnání s nárůstem spór během kultivace.

4.2.2 Relativní kvantifikace genové exprese (*yobN* - gen kódující aminooxidázu)

Pomocí transkripční analýzy, byla kvantifikována relativní genová exprese cílového genu *yobN* dle Pfafflova modelu. Jako srovnávací byl použit gen *gyrB* a výsledné hodnoty prahového cyklu experimentálního vzorku byly porovnávány s kontrolními výsledky získanými souběžnou kultivací kmenů za stejných podmínek v totožném médiu MM1 bez přítomnosti BA.

Pro relativní kvantifikaci genové exprese byly vybrány 3 kmeny CCM 2267, CCM 2216 a IB1a. Na Obr. 4.2 je patrné, že exprese cílového genu *yobN* probíhala pouze u kmenů CCM 2267 a CCM 2216, přičemž její nejvyšší hodnota byla zaznamenána u obou kmenů po 12 hodinách kultivace. Absolutně nejvyšší hodnota genové exprese byla zaznamenána u kmenu CCM 2267 ($3,07 \pm 0,13$), u kmenu CCM 2216 dosáhla nejvyšší hodnota $2,66 \pm 0,16$. Relativní expresi genu *yobN* stanovovali ve svém článku také Eom, Seo a Choi, (2015), kteří dosáhli vyšších hodnot u testovaných kmenů (3-3,8), přestože odebírali vzorky jen po 24 hodinové kultivaci.



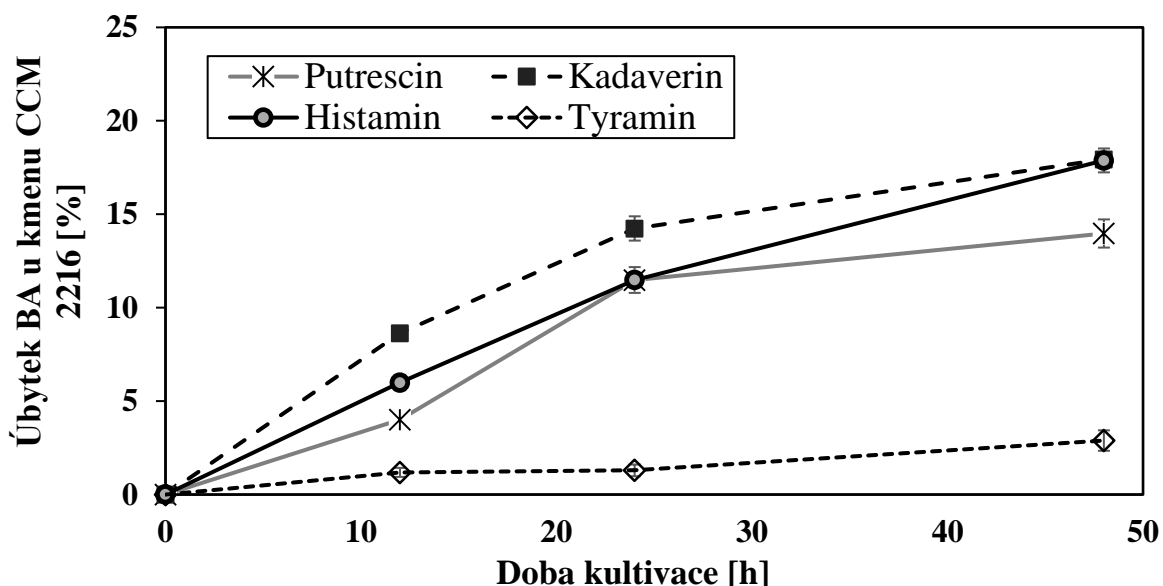
Obr. 4.2: Srovnání relativní kvantifikace genové exprese cílového genu *yobN* u testovaných kmenů *B. subtilis* s úbytkem biogenních aminů v médiu MM1 během 48hodinové kultivace.

4.2.3 Detekce obsahu biogenních aminů pomocí HPLC/UV

Z grafu (Obr. 4.2), který porovnává relativní expresi genu, kódujícího aminooxidázu s úbytkem obsahu BA v průběhu 48 hodinové kultivace vyplývá, že kmeny CCM 2267 a CCM 2216 významně ($p < 0,05$) redukují BA, ale celkový úbytek histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu po 48 hodinách kultivace činí pouze $11,75 \pm 2,55$ %, resp. $13,25 \pm 2,32$ %.

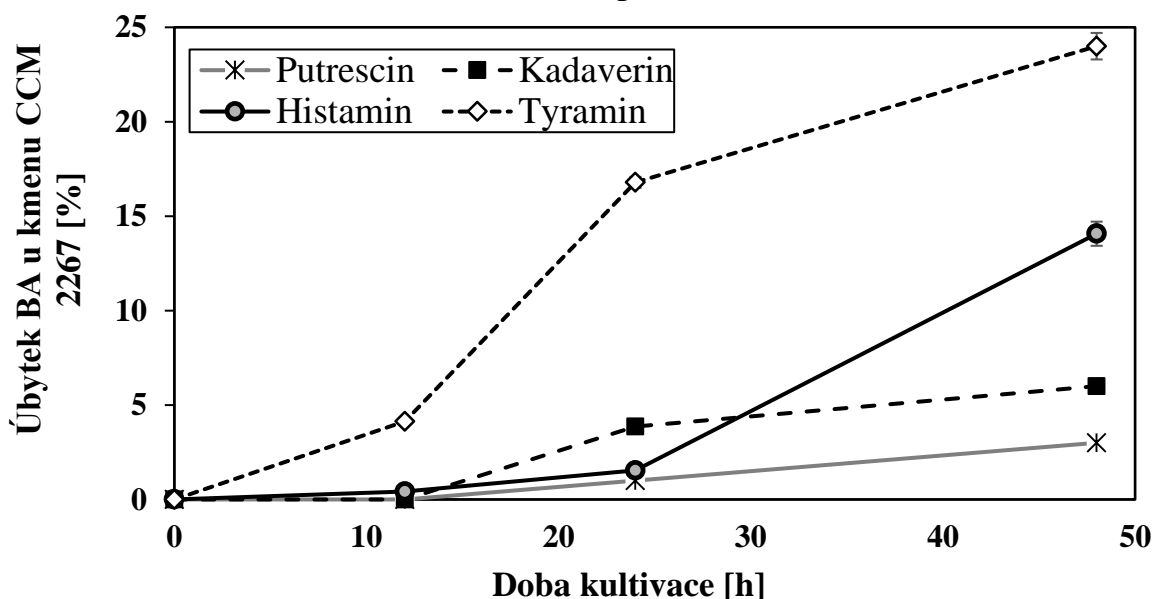
U kmenu IB1a i přes velmi nízkou relativní expresi (0,3) došlo po 48 hodinách k úbytku $5,69 \pm 2,99$ %. Což je pravděpodobně způsobeno synergickým působením deaminačního enzymu transglutaminázy, jelikož se tento enzym nachází ve spórách druhu *B. subtilis* (Kieliszek a Misiewicz, 2014) a u dotyčného kmenu byla zaznamenána nejvyšší sporulace (Obr. 4.1).

Srovnání úbytku jednotlivých BA pomocí kmenu CCM 2216 je znázorněno na Obr. 4.3. U kmenu CCM 2216 byl po 48 hodinové kultivaci zaznamenán úbytek histaminu $17,88 \pm 3,20$ %, kadaverinu $17,94 \pm 0,50$ % a putrescinu $13,97 \pm 3,77$ %.



Obr. 4.3: Úbytek histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu během 48 hodinové kultivace kmenů *B. subtilis* CCM 2216 v médiu MM1.

Kmen CCM 2267 v porovnání s CCM 2216 lépe redukoval pouze obsah tyraminu (úbytek o $24,00 \pm 3,51$ % po 48 hodinách kultivace, viz Obr. 4.4). U ostatních sledovaných BA dosáhl horších výsledků (úbytek histaminu $14,07 \pm 3,25$ %, kadaverinu $6,02 \pm 1,01$ % a putrescinu $2,97 \pm 0,49$ %).



Obr. 4.4: Úbytek histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu během 48 hodinové kultivace kmenů *B. subtilis* CCM 2267 v médiu MM1.

Jak již bylo uvedeno, degradací BA pomocí druhu *B. subtilis* se zabývali Eom, Seo a Choi (2015). Ve své studii dosáhli s kmenem HJ0-6 izolovaným z pohanky 48% redukce histaminu i vyšší hodnotu relativní genové exprese u tohoto kmenu (3,8) po 24 hodinách kultivace. Přestože námi použitý kmen

CCM 2267 je nejbližší referenční genom kmenu HJ0-6 (NCBI; National Center for Biotechnology Information), jsou jeho degradační schopnosti BA podstatně nižší.

4.3 Výsledky experimentu s kmenem *Lactobacillus casei*

Bakteriální druh *L. casei* byl pro experiment zvolen z důvodu výrazného degradačního potenciálu u kmenu CCDM 198, který byl objeven v rámci bakalářské práce (Beneš, 2018). Což bylo následně potvrzeno při předběžných testech, kdy se úbytek všech sledovaných BA pohyboval kolem 50 %.

V médiu MRS/2 bylo zaznamenáno pomocí HPLC/UV malé množství histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu (v rozmezí 10 - 20 mg.l⁻¹) aniž by tam byly dotyčné sloučeniny přidány. I toto množství stačilo kmenu CCDM 198 k navození zvýšené transkripce cílového genu *MCO*, které zkreslovalo následné výpočty při relativní kvantifikaci genové exprese. Jelikož *L. casei* neroste v médiu MM1, kde by byl tento problém potlačen, byl využit kmen CCDM 145 s výrazně slabšími degradačními schopnostmi ($6 \pm 0,5$ %), jež sloužil jako pozitivní kontrola při kvantifikaci relativní genové exprese.

Dále byly v přípravné fázi vybrány sady primerů *MCO4* a *GAPD4* pro další experimenty, tedy sledování transkripce cílového genu *MCO* během 48 hodinové degradace BA v 50 ml ochuzeného MRS/2 média. Během kultivace byly v časech 12, 24 a 48 hodin odebírány vzorky pro sledování růstových křivek bakterií, relativní kvantifikaci genové exprese genu a monitorování úbytku BA v médiu. V další fázi experimentu byla snaha podpořit růst buněk i degradaci BA pomocí redoxních činidel; cysteinu a kyseliny askorbové. Na závěr byla monitorována degradace BA v reálné potravíně - UHT mléce.

4.3.1 Růst buněk

Během degradačních testů kmenů *L. casei* byl zaznamenáván růst buněk pro ověření vlivu cysteinu a askorbové kyseliny. Aby bylo možné lépe zachytit jednotlivé fáze růstu, byl nárůst počtu buněk v ochuzeném médiu MRS/2 sledován spektrofotometrickou metodou. Při kultivaci v mléku nebylo možno tuto metodu použít, proto byl počet kolonií zaznamenán odečtem z agarových misek v čase odběru vzorků pro RT-qPCR a HPLC/UV (Obr. 4.5). U kmenu CCDM 145 byl testován růst pouze v MRS/2 s přídatkem BA, protože při těchto podmínkách kultivace byly získané hodnoty Ct použity pro výpočet relativní genové exprese.

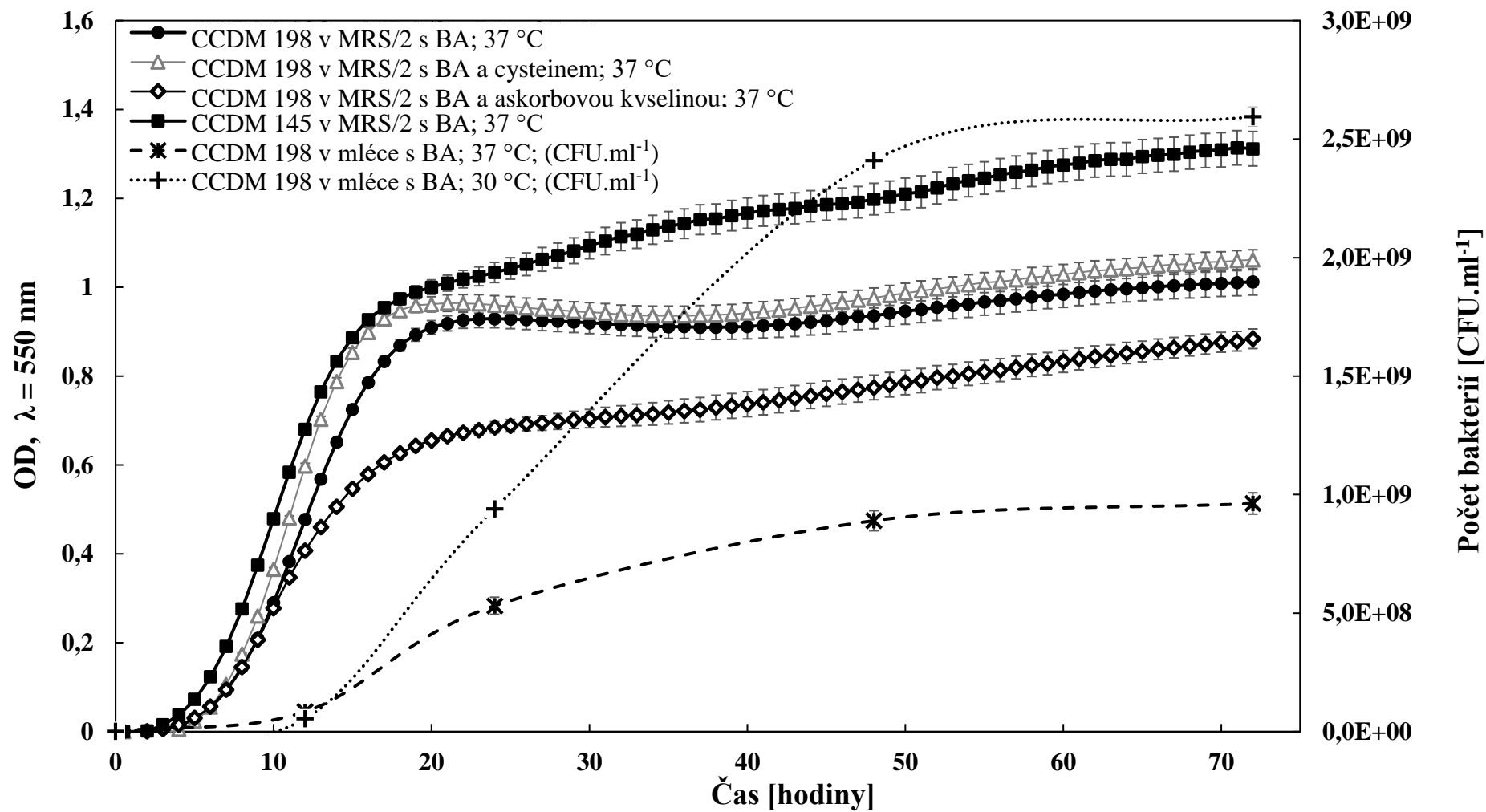
Růst *L. casei* CCDM 198 a CCDM 145 v ochuzeném médiu MRS/2 a mléce

Na růstové křivce trvala lagová fáze v MRS/2 přibližně 2 hodiny u obou kmenů, po tuto dobu zůstala optická hustota OD₅₅₀ prakticky nezměněna (Obr. 4.5). Následná exponenciální fáze probíhala mezi 4 - 17 hodinou kultivace, po 22 h se růstové křivky obou kmenů dostaly do stacionární fáze. Zatímco OD₅₅₀ kmenu CCDM 198 na počátku stacionární fáze mírně klesá, OD₅₅₀ kmenu CCDM 145 pozvolna roste až do konce kultivace.

Růstové křivky kmenu CCDM 198 v mléce se lehce liší (Obr. 4.5). Oproti kultivaci v MRS/2 je patrné prodloužení lagové fáze přibližně o 2 hodiny. To může být způsobeno přípravou inokula v MRS/2, která si vyžádala delší adaptaci buněk na nové prostředí. Přestože optimální teplota kultivace pro kmen CCDM 198 je 37 °C, nejvyšší počet buněk byl dosažen při 30 °C ($2,6 \cdot 10^9$ CFU.ml⁻¹).

Vliv cysteinu a kyseliny askorbové na růst *L. casei* CCDM 198

Jednou z možností zvýšení degradace BA je podpora růstu buněk exprimujících geny, které kódují „multi-copper“ oxidázové enzymy. U fakultativně anaerobního druhu *L. casei* mohou k tomuto účelu sloužit redukující činidla. U laktobacilů se v potravinářství používá cystein a kyselina askorbová, přičemž jejich vliv při různých koncentracích je popsán v několika studiích (Demain et al., 1961; Rickes, Koch a Wood, 1949; Guowei et al., 2013). Dodavatel Laktoflora doporučuje pro podporu růstu u kmenu CCDM 198 přídavek 1% (w/v) cysteinu. V případě kyseliny askorbové, byla 0,1% (w/v) koncentrace zvolena dle studie (Demain et al., 1961). Vliv 1% (w/v) cysteinu se projevil mírný nárůstem OD₅₅₀ po celou dobu kultivace ve srovnání s růstem v samotném MRS/2, zatímco přídavek 0,1% (w/v) kyseliny askorbové výrazně snížil OD₅₅₀ v průběhu celé růstové křivky.



Obr. 4.5: Růst kmenů *L. casei* během degradace BA v MRS/2 při 37 °C po dobu 72 h (spektrofotometrické měření) v porovnání s růstem kmenu CCDM 198 během degradace BA v mléce při 30 °C a 37 °C.

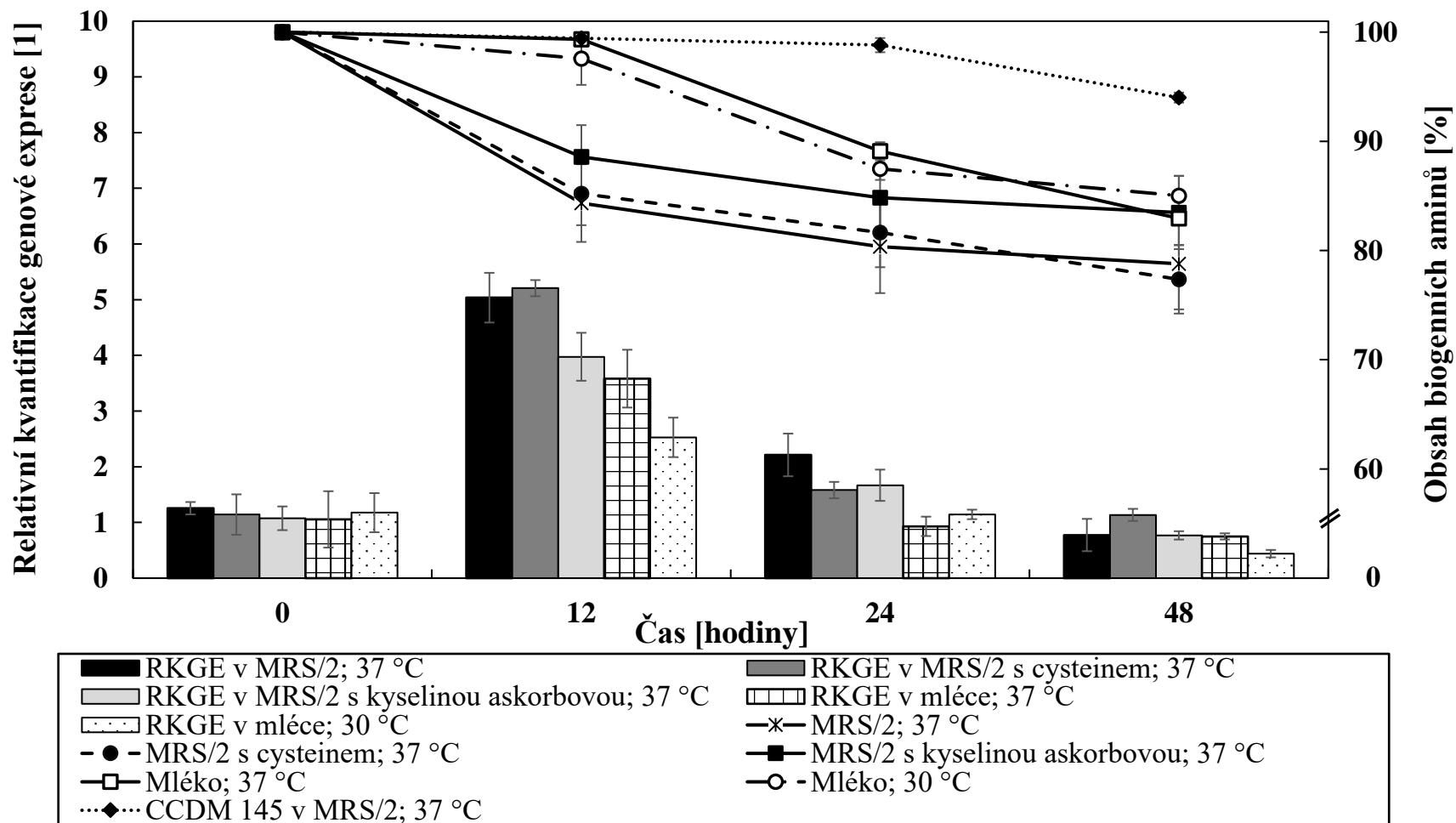
4.3.2 Relativní kvantifikace genové exprese (*MCO* – gen kódující enzym „multi-copper“ oxidázu)

Nejvyšší hodnota relativní genové exprese, cílového genu *MCO* u kmenu CCDM 198, byla u všech vzorků naměřena po 12 hodinách kultivace, přičemž ve všech odběrových časech byla exprese vyšší v ochuzeném MRS/2 médiu než v mléce (Obr. 4.6). Absolutně nejvyšší hodnoty byly pozorovány v MRS/2 s/bez cysteinu ($5,21 \pm 0,14$), resp. ($5,04 \pm 0,45$), zatímco v mléce byla relativní genová exprese ve stejném čase $3,58 \pm 0,52$ při 37 °C a $2,53 \pm 0,35$ při 30 °C. Což znamená, že nejvyšší exprese cílového genu probíhala v exponenciální fázi růstové křivky buněk.

Po 24 hodinách kultivace, relativní genová exprese výrazně poklesla u všech testovaných vzorků, přičemž nevyšší hodnota byla zaznamenána v MRS/2 ($2,21 \pm 0,38$). I přes delší lagovou fázi byl pokles exprese genu po 24 hodinách kultivace pozorován i u vzorků s mlékem. Další pokles následoval při měření po 48 hodinách kultivace, kdy s výjimkou vzorku v MRS/2 s cysteinem ($1,14 \pm 0,12$) jsou hodnoty relativní genové exprese nižší než 1, tudíž transkripce cílového genu *MCO* u testovaného kmenu CCDM 198 byla na konci experimentu nižší než u kontrolního kmenu CCDM 145.

Bylo publikováno jen málo studií popisující primery, pomocí kterých lze sledovat transkripci genů kódujících deaminační enzymy (Eom et al., 2015; Herrero-Fresno et al., 2012). Přičemž jen studie Herrero-Fresno et al. (2012) se zabývá degradací BA pomocí *L. casei*. Autoři však využili metodu qPCR pouze pro monitorování růstu buněk s degradačními schopnostmi. Tudíž jediný nám známý článek s publikovanými výsledky relativní kvantifikace genové exprese genů kódujících deaminační enzymy je od Eom et al., (2015), který byl již zmíněn v diskusi vztahující se k experimentu s *B. subtilis*. Za zmínku stojí, že tito autoři při stanovení relativní genové exprese také využili jako kontrolu kmen se slabšími degradačními vlastnostmi. A i v porovnání s našim druhým experimentem, zaznamenali vyšší relativní expresi (3,8) po 24 hodinách kultivace oproti CCDM 198 (2,21), což je v souladu i s degradačními schopnostmi obou kmenů.

Hodnoty získané při relativní kvantifikaci genové exprese byly srovnány s výsledky experimentů sledujících úbytek BA (tedy degradační schopnost bakterií) pomocí HPLC/UV, viz následující kapitola.



Obr. 4.6: Srovnání relativní kvantifikace genové exprese cílového genu MCO u kmenu *L. casei* CCDM 198 s úbytkem biogenních aminů v různých kultivačních médiích obohacených o BA během 48hodinové kultivace.

4.3.3 Detekce obsahu biogenních aminů pomocí HPLC/UV

Výsledky souhrnného úbytku biogenních aminů (histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu) pomocí HPLC/UV ve srovnání s relativní expresí cílového genu jsou zaznamenány na *Obr. 4.6*. Z tohoto grafu vyplývá, že pokles obsahu BA koresponduje s hodnotami relativní genové exprese. Ve vzorcích kultivovaných v ochuzeném médiu MRS/2 byl nejvyšší pokles zaznamenán v čase odběru 12 h u vzorků s/bez cysteinu, kde byla také naměřena nejvyšší hladina relativní genové exprese cílového genu. Přestože nejvyšší hodnota relativní genové exprese byla zaznamenána po 12 hodinách kultivace i v mléce, pokles množství BA je nepatrný, což může být způsobeno nízkým počtem buněk, jelikož v čase odběru je růstová křivka bakterií teprve na počátku exponenciální fáze. Nejvyšší úbytek BA po 48 hodinách byl zaznamenán v MRS/2 s 1 % cysteinem ($23,64 \pm 3,13$ %), přičemž nepatrně nižší hodnoty byly naměřeny v samotném MRS/2 ($21,22 \pm 4,17$ %). Přestože významně vyšší počet buněk byl zaznamenán v mléce při teplotě 30 °C, relativní genová exprese cílového genu *MCO* byla při těchto podmínkách nízká, což se projevilo nejnižším úbytkem BA na konci kultivace ($14,98 \pm 1,83$ %).

Vliv cysteinu a askorbové kyseliny na úbytek histaminu tyraminu, kadaverinu a putrescinu

Na *Obr. 4.7* je zachyceno množství histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu během 48 hodinové kultivace v různých médiích. Z grafů je patrné, že *L. casei* CCDM 198 nejlépe degraduje putrescin v MRS/2, kde byl dosažen nejvyšší úbytek tohoto biogenního aminu po 48 hodinách kultivace ($24,81 \pm 2,63$ %). Na druhou stranu, nejnižší degradace v MRS/2 byla zaznamenána u tyraminu, kde výsledné redukce tohoto aminu nepřesáhla 20 %. Kmen CCDM 198 také výrazně redukuje nejnebezpečnější biogenní amin - histamin v MRS/2 ($23,14 \pm 2,81$ %) a v MRS/2 s cysteinem ($23,65 \pm 1,91$ %).

Z výsledků je patrné, že přítomnost 0,1% kyseliny askorbové nepodporuje degradaci BA, protože obsah všech sledovaných BA byl na konci kultivace vyšší než v samotném MRS/2, což odpovídá jak nižší hodnotě relativní genové exprese, tak OD_{550} u růstové křivky.

Vliv mléka na úbytek histaminu tyraminu, kadaverinu a putrescinu

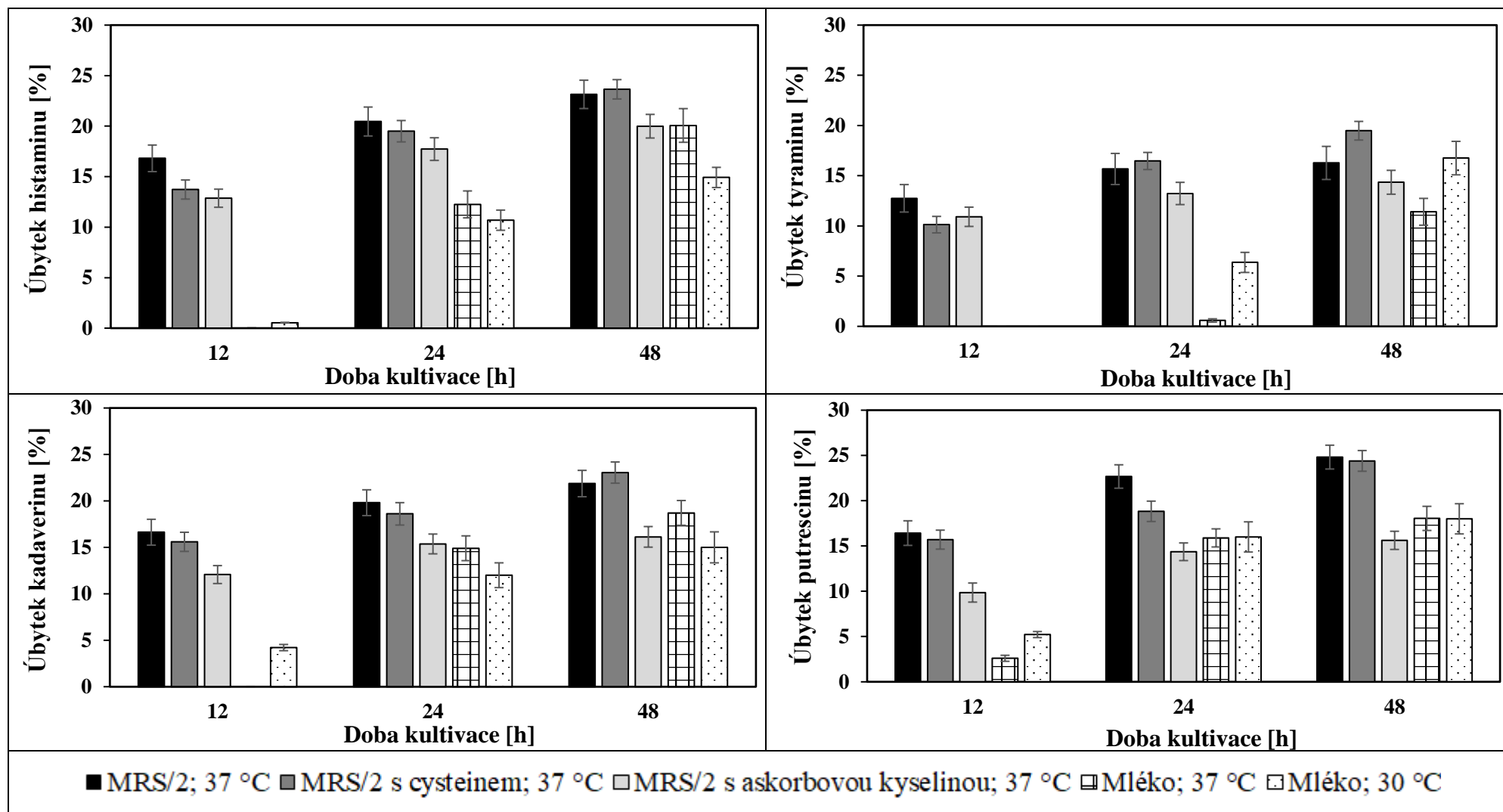
Po 48 hodinách kultivace byl obsah histaminu, kadaverinu a putrescinu nižší v MRS/2 než v mléce u obou teplot. Nejvyšší degradace v mléce byla naměřena u putrescinu a dosáhla hodnot 18 %. Vyšší úbytek BA v mléce při 30 °C než v MRS/2 byl zaznamenán pouze u tyraminu, avšak pokles činil jen $17 \pm 4,21$ %. Z grafů na *Obr. 4.7* vyplývá, že teplota kultivace 37 °C je výhodnější pro degradaci histaminu a kadaverinu v mléce, kde rozdíl činil 5 %, resp. 4 %. Pro degradaci tyraminu je výhodnější 30 °C s rozdílem 6 %. U putrescinu byl finální obsah shodný.

Ačkoliv kmen CCDM 198 byl izolován ze sýru, tudíž je velmi dobře přizpůsoben na toto prostředí a schopen v mléce rychlého růstu ve vysokém počtu buněk, byla v mléce pozorována nižší transkripce *MCO* genu, ve srovnání s kultivací v MRS/2 médiu. Přesto bylo prokázáno, že tento kmen významně ($p < 0,05$) redukuje histamin, tyramin, kadaverin a putrescin i v této matrici po 48 hodinové kultivaci.

Na závěr tohoto experimentu byly primery testovány i na bakteriální RNA (následně přepsané do cDNA) izolované z modelového sýru s nízkodohřívanou sýřeninou. Vzhledem k tomu, že je sýr poměrně složitou matricí a diverzita mikroorganismů je v sýrech velká (Coeuret et al., 2003), nepodařilo se pomocí testovaných sad námi navržených primerů zachytit kmen CCDM198, přestože byl sýr tímto kmenem zaočkován. Z časových důvodů nebylo možné již tento experiment zopakovat, případně pozměnit, či optimalizovat testovací podmínky pro tuto potravinovou matrici.

Shrnutí experimentu s druhem *L. casei*

Dosažené výsledky experimentu s kmenem CCDM 198, během kterých došlo ke snížení celkového obsahu BA pouze o $21,32 \pm 4,17$ % v MRS/2, zůstaly za očekávání i ve srovnání s jinými studii. Autorům (García-Ruiz et al., 2011) se podařilo v MRS/2 s kmenem *L. casei* IFI-CA 52 dosáhnout degradace 54 % u histaminu, 55 % u tyraminu a 65 % u putrescinu. V další studii autorů (Herrero-Fresno et al., 2012) došlo ke snížení histaminu a/nebo tyraminu až o 40 % v modelovém vzorku sýru. Schopnost významné degradace tyraminu (93 - 98 %) u dvou kmenů *L. casei* izolovaných z masných výrobků popsali i autoři (Fadda, Vignolo a Oliver, 2001).



Obr. 4.7: Úbytek histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu během 48 hodinové kultivace s *L.casei* CCDM 198 v různých médiích.

ZÁVĚR

Disertační práce byla zaměřena na hledání metody pro rychlou detekci kmenů schopných vysoké exprese genů kódujících enzymy degradující BA, sledování přítomnosti cílových genů a jejich transkripci během degradace těchto metabolitů pomocí molekulárně biologických metod. Průběh degradace BA byl současně monitorován pomocí HPLC/UV.

Mezi první skupinu vybraných bakteriálních druhů patřily kmeny bakteriálního druhu *B. subtilis*. Na cílový gen kódující aminooxidázu - *yobN* a srovnávací gen *gyrB* byly navrženy nové sady primerů, jejichž specifita byla testována nejprve pomocí „klasické“ PCR a následně i RT-qPCR. Celý experiment byl však nepříznivě ovlivněn horšími degradačními schopnostmi testovaných kmenů, kdy nejvyšší monitorovaný úbytek BA nedosáhl ani 15 %. Průběh degradace pravděpodobně výrazně ovlivnila sporulace všech testovaných kmenů, kdy významný nárůst spór byl pozorován již po 12 hodinách kultivace. I přes nízké hodnoty úbytku BA u testovaných kmenů, lze konstatovat, že byly nalezeny sady primerů pro rychlou detekci a kvantifikaci genu *yobN* kódujícího aminooxidázu u druhu *B. subtilis*.

Vzhledem k nízkým hodnotám degradace BA u sledovaných kmenů *B. subtilis* byla pozornost přeměřována na druh *L. casei*, poněvadž při předchozím testování kmenu CCDM 198 byl zaznamenán výrazný úbytek BA. V průběhu přípravných testů nových sad primerů vyplynulo, že detekují cílový gen *MCO* (kódující „multi-copper“ oxidázu) a srovnávací gen *GAPDH* u celé skupiny *L. casei*, jež zahrnuje druhy *L. casei*, *L. paracasei* a *L. rhamnosus*.

V průběhu hlavní fáze experimentu byla sledována transkripce cílového genu *MCO* metodou RT-qPCR u kmenu *L. casei* CCDM 198, který během našich testů prokázal schopnost snížení histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu o více než 20 %, přičemž naměřené hodnoty relativní genové exprese cílového genu *MCO* v čase korelují s úbytkem BA zaznamenaným pomocí HPLC/UV. V pozdějších fázích experimentu byla snaha podpořit růst buněk pomocí redoxních činidel - cysteinu a kyseliny askorbové. Což se podařilo při kultivaci s přidáním cysteinu, kdy mírně vzrostl počet buněk v celé fázi růstu a byla zde získána nejvyšší hodnota relativní genové exprese i nejvyšší úbytek sledovaných BA ze všech testů.

Na závěr experimentu byla ověřována degradace histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu v mléce pomocí kmenu CCDM 198. I v této potravinové matici došlo k významné degradaci ($p < 0,05$) testovaných BA, i když byl úbytek nižší než v MRS/2, čemuž také odpovídaly nižší hodnoty relativní genové exprese. Vzhledem k tomu, že se tento kmen využívá v potravinářství, může významně přispět k degradaci biogenních aminů u mléčných výrobců.

PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI

Disertační práce byla věnována hledání primerů pro detekci a kvantifikaci genů kódujících enzymy, které degradují biogenní aminy. Pozornost byla věnována i optimalizaci metody RT-qPCR, jež se v potravinářství stále více uplatňuje pro sledování producentů/degradérů toxických metabolitů (např. biogenních aminů) a lze ji využít i pro rychlou detekci vhodných kmenů s degradačními schopnostmi. Ve spojení s reverzní transkripcí lze i odhadnout množství transkribovaného genu a jednodušeji vytipovat vhodné degradéry. V neposlední řadě byly během experimentů prověřovány kmeny s cílem sledovat relativní expresi cílových genů u bakteriálních kmenů s vysokou degradační schopností.

Přínos pro vědu a praxi je shrnut v následujících bodech:

1. Byly představeny nově navržené sady primerů pro RT-qPCR, pro detekci a kvantifikaci:
 - genu *yobN* (kóduje aminooxidázu) u *B. subtilis*;
 - genu *MCO* (kóduje „multi-copper“ oxidázu) u skupiny *L. casei*.
2. Byl modifikován postup pro izolaci bakteriální RNA, v dostatečné čistotě a množství, z reálných vzorků potravin (sýru a UHT mléka).
3. Byly optimalizovány metodiky RT-qPCR, které je možno využít k rychlé detekci a relativní kvantifikaci genů kódujících enzymy, jež se podílejí na degradaci biogenních aminů u *B. subtilis* a skupiny *L. casei*.
4. Výsledky práce ukázaly, že *L. casei* CCDM 198 je významným degradérem BA - histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu a je možné tento kmen, pro tyto účely, využívat v potravinářství.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ALVAREZ, Miguel a Ma MORENO-ARRIBAS, 2014. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **39**(2), 146-155 [cit. 2016-04-01]. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224414001599>
- ARYA, Manit et al., 2014. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* [online]. **5**(2), 209-219 [cit. 2019-10-18]. DOI: 10.1586/14737159.5.2.209. ISSN 1473-7159. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737159.5.2.209>
- BENEŠ, Štěpán, 2018. *Skríning vybraných bakterií využívaných v mlékárenství na schopnost degradace biogenních aminů*. Fakulta technologická, Vavrečkova 275, 760 01 Zlín, Česká Republika.. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- BROEDERS, S. et al., 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **37**(2), 115-126 [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.03.008. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224414000661>
- BUSTIN, Stephen a Jim HUGGETT, 2017. QPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification* [online]. **14**, 19-28 [cit. 2019-10-22]. DOI: 10.1016/j.bdq.2017.11.001. ISSN 22147535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221475351730181X>
- BUTOR, Irena et al., 2017. Biogenic amines degradation by microorganisms isolated from cheese. *Potravinárstvo* [online]. **11**(1), 302-308 [cit. 2018-11-28]. DOI: 10.5219/736. ISSN 1337-0960. Dostupné z: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/736>
- CALLEJÓN, S. et al., 2014. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **98**(1), 185-198 [cit. 2016-04-01]. DOI: 10.1007/s00253-013-4829-6. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-4829-6>

CALLEJÓN, Sara et al., 2015. Ability of *Kocuria varians* LTH 1540 To Degrade Putrescine: Identification and Characterization of a Novel Amine Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **63**(16), 4170-4178 [cit. 2016-04-01]. DOI: 10.1021/jf5026967. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf5026967>

CASTELLANO, P. et al., 2012. *Lactobacillus sakei* CRL1862 improves safety and protein hydrolysis in meat systems. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **113**(6), 1407-1416 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1111/jam.12005. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12005>

COEURET, Valérie et al., 2003. Article. *Le Lait* [online]. **83**(4), 269-306 [cit. 2019-10-11]. DOI: 10.1051/lait:2003019. ISSN 0023-7302. Dostupné z: <http://www.edpsciences.org/10.1051/lait:2003019>

DADÁKOVÁ, Eva, Martin KŘÍŽEK a Tamara PELIKÁNOVÁ, 2009. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry* [online]. **116**(1), 365-370 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.018. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609002040>

DAPKEVICIUS, Maria et al., 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **57**(1-2), 107-114 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00238-5. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500002385>

DEBODE, Frédéric et al., 2017. The influence of amplicon length on real-time PCR results. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* [online]. **27**(1), 1-9 [cit. 2019-10-22]. DOI: 10.25518/1780-4507.13461. ISSN 1370-6233. Dostupné z: <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=13461>

DEMAIN, A. et al., 1961. Nutritional studies on *Lactobacillus heterohiochi*. *Journal of Bacteriology* [online]. **81**(1), 147-153 [cit. 2019-08-08]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC278967/>

FADDA, S., G. VIGNOLO a G. OLIVER, 2001. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnology Letters* [online]. **23**(24), 2015-2019 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1023/A:1013783030276. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1013783030276>

- GACHON, C., A. MINGAM a B. CHARRIER, 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. *Journal of Experimental Botany* [online]. **55**(402), 1445-1454 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1093/jxb/erh181. ISSN 0022-0957. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erh181>
- GARCÍA-RUIZ, Almudena et al., 2011. Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **148**(2), 115-120 [cit. 2016-04-01]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.009. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160511002893>
- GUARCELLO, Rosa et al., 2016. Selection of Amine-Oxidizing Dairy Lactic Acid Bacteria and Identification of the Enzyme and Gene Involved in the Decrease of Biogenic Amines. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **82**(23), 6870-6880 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1128/AEM.01051-16. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.01051-16>
- GUOWEI, Shu et al., 2013. *Effect of Ascorbic Acid and Cysteine Hydrochloride on Growth of Bifidobacterium Bifidum* [online]. [cit. 2020-07-09]. ISBN 978-0-7695-4649-0. ISSN 978-0-7695-4649-0.
- HERRERO-FRESNO, Ana et al., 2012. Lactobacillus casei strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **157**(2), 297-304 [cit. 2016-04-01]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816051200284X>
- JIANG, Wei et al., 2017. Histamine reduction by Maillard reaction with glucose. *Food Control* [online]. **82**, 136-144 [cit. 2018-12-10]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.06.035. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713517303353>
- KIELISZEK, Marek a Anna MISIEWICZ, 2014. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica* [online]. **59**(3), 241-250 [cit. 2018-12-20]. DOI: 10.1007/s12223-013-0287-x. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12223-013-0287-x>
- LANDETE, José et al., 2011. PCR methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on wine. *Annals of Microbiology* [online]. **61**(1), 159-166 [cit. 2016-04-28]. DOI:

10.1007/s13213-010-0068-6. ISSN 15904261. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1007/s13213-010-0068-6>

LANDETE, José et al., 2007. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **117**(3), 258-269 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.001. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507002644>

LATORRE-MORATALLA, M.L. et al., 2010. Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. *LWT - Food Science and Technology* [online]. **43**(1), 20-25 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1016/j.lwt.2009.06.018. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364380900190X>

2017. In: *Macherey-Nagel GmbH & Co.* [online]. 52355 Düren , Německo [cit. 2018-01-03].

MARCOBAL, A., B. DE LAS RIVAS a R. MUÑOZ, 2006. Methods for the Detection of Bacteria Producing Biogenic Amines on Foods: A Survey. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* [online]. **1**(3), 187-196 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1007/s00003-006-0035-0. ISSN 16615751. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00003-006-0035-0>

MARTÍNEZ, Noelia et al., 2011. QPCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: Significance for food quality. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **22**(7), 367-376 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/j.tifs.2011.04.004. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224411000720>

2016. In: *MO BIO Laboratories, Inc.* [online]. 2746 Loker Ave West, Carlsbad, CA 92010 [cit. 2017-03-27].

MULLIS, K. et al., 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* [online]. **51**(0), 263-273 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1101/SQB.1986.051.01.032. ISSN 0091-7451. Dostupné z: <http://symposium.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/SQB.1986.051.01.032>

NURSTEN, H., 2005. *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications.* Cambridge: Royal Society of Chemistry. ISBN 0-85404-964-9.

O'SULLIVAN, Daniel et al., 2015. High-throughput DNA sequencing to survey bacterial histidine and tyrosine decarboxylases in raw milk cheeses. *BMC Microbiology* [online].

15(1), - [cit. 2016-05-12]. DOI: 10.1186/s12866-015-0596-0. ISSN 14712180. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/266>

ÖZOGUL, Fatih a Imen HAMED, 2017. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **58**(10), 1660-1670 [cit. 2019-02-21]. DOI: 10.1080/10408398.2016.1277972. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2016.1277972>

PFAFFL, M., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* [online]. **29**(9), 45-45 [cit. 2019-08-06]. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45. ISSN 13624962. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/29.9.e45>

POSTOLLEC, Florence et al., 2011. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology* [online]. **28**(5), 848-861 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/j.fm.2011.02.008. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002011000505>

2017. In: *QIAGEN* [online]. Loker Avenue West, Carlsbad, CA 92010 [cit. 2019-12-16].

RICKES, Edward, Paul KOCH a Thomas WOOD, 1949. Additional observations on the rate of growth of *Lactobacillus casei*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **178**(1), 103-111 [cit. 2019-08-08]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/f8cf/f905487840d51be35181ab4e9da9196a38eb.pdf>

2012. In: . Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Německo [cit. 2016-07-12].

RUIZ-CAPILLAS, Claudia a Ana HERRERO, 2019. Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. *Foods* [online]. **8**(2) [cit. 2019-02-25]. DOI: 10.3390/foods8020062. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2304-8158/8/2/62>

SANTOS, M.H.Silla, 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **29**(2-3), 213-231 [cit. 2016-03-30]. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160595000321>

SU, Jianmei et al., 2013. CotA, a Multicopper Oxidase from *Bacillus pumilus* WH4, Exhibits Manganese-Oxidase Activity. *PLoS ONE* [online]. **8**(4), 60573- [cit. 2016-05-10]. DOI:

10.1371/journal.pone.0060573. ISSN 19326203. Dostupné z:
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0060573>

WONG, Marisa a Juan MEDRANO, 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* [online]. **39**, 75-85 [cit. 2016-04-28]. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16060372>

YERLIKAYA, Pinar et al., 2015. Suppression of the formation of biogenic amines in mackerel mince by microbial transglutaminase. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. **95**(11), 2215-2221 [cit. 2018-11-28]. DOI: 10.1002/jsfa.6937. ISSN 00225142. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6937>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AO	Aminooxidázy
BA	Biogenní aminy
EC	Evropská komise
GRAS	Generally recognized as safe
HO	Histaminoxidáza
HPLC/UV	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí
LAB	Bakterie mléčného kvašení
MCO	„Multi-copper“ oxidázy
MRS	De Man, Rogosa a Sharpe agar/médium
MRS/2	Modifikované De Man, Rogosa a Sharpe agar/médium
PCR	Polymerázová řetězová reakce
qPCR	Real-time PCR
RKGE	Relativní kvantifikace genové exprese
RT-qPCR	Kvantitativní real-time PCR s reverzní transkripcí
S	Substrát

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 4.1: Růst kmenů B. subtilis během degradace BA v médiu MM1 po dobu 48 h v porovnání s nárůstem spór během kultivace.</i>	18
<i>Obr. 4.2: Srovnání relativní kvantifikace genové exprese cílového genu yobN u testovaných kmenů B. subtilis s úbytkem biogenních aminů v médiu MM1 během 48hodinové kultivace.</i>	19
<i>Obr. 4.3: Úbytek histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu během 48 hodinové kultivace kmenů B. subtilis CCM 2216 v médiu MM1.</i>	20
<i>Obr. 4.4: Úbytek histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu během 48 hodinové kultivace kmenů B. subtilis CCM 2267 v médiu MM1.</i>	20
<i>Obr. 4.5: Růst kmenů L. casei během degradace BA v MRS/2 při 37 °C po dobu 72 h (spektrofotometrické měření) v porovnání s růstem kmenu CCDM 198 během degradace BA v mléce při 30 °C a 37 °C.</i>	23
<i>Obr. 4.6: Srovnání relativní kvantifikace genové exprese cílového genu MCO u kmenu L. casei CCDM 198 s úbytkem biogenních aminů v různých kultivačních médiích obohacených o BA během 48hodinové kultivace.</i>	25
<i>Obr. 4.7: Úbytek histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu během 48 hodinové kultivace s L.casei CCDM 198 v různých médiích.</i>	28

SEZNAM PUBLIKACÍ

PIŠTĚKOVÁ, H., JANČOVÁ, P., BERČÍKOVÁ, L., BUŇKA, F., SOKOLOVÁ, I., ŠOPÍK, T., MARŠÁLKOVÁ, K., AMARAL, O., BUŇKOVÁ, L. Application of qPCR for multicopper oxidase gene (*MCO*) in biogenic amines degradation by *Lactobacillus casei*. *Food Microbiology*. 91. DOI: 10.1016/j.fm.2020.103550. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002020301398>

PIŠTĚKOVÁ, H., JANČOVÁ, P., BUŇKOVÁ, L., BERČÍKOVÁ, L., ŠOPÍK, T., MARŠÁLKOVÁ, K., BUŇKA, F. Detection and relative quantification of amine oxidase gene (*yobN*) in *Bacillus subtilis*: application of real-time quantitative PCR. 2020, odesláno k recenznímu řízení.

JANČOVÁ, P., PACHLOVÁ, V., ČECHOVÁ, E., CEDIDLOVÁ, K., **PIŠTĚKOVÁ, H.**, BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L. Occurrence of biogenic amine producers in the wastewater of the dairy industry. 2020, odesláno k recenznímu řízení.

BUTOR, I., **PIŠTĚKOVÁ, H.**, PUREVDORJ, K., JANČOVÁ, P., BUŇKA, F., a BUŇKOVÁ L. Biogenic amines degradation by microorganisms isolated from cheese. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food science*. 2017, 11(1), 302-308. DOI: 10.5219/736. ISSN 1337-0960. Dostupné z: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/736>

MARŠÁLKOVÁ, K., PUREVDORJ, K., JANČOVÁ P., **PIŠTĚKOVÁ H.** a BUŇKOVÁ L. Quantitative Real-time PCR detection of putrescine-producing Gram-negative bacteria. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food science*. 2017, 11(1), 355-362. DOI: 10.5219/739. ISSN 1337-0960. Dostupné z: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/739>

KONFERENČNÍ PŘÍSPĚVKY

JANČOVÁ, P., MARŠÁLKOVÁ, K., ŠERÁ, J., **PIŠTĚKOVÁ, H.**: Environmentální aplikace molekulární biologie. Týden výzkumu a inovací pro praxi a životní prostředí. Přednáška; 21. - 23. 3. 2017, Hustopeče u Brna. ISBN: 978-80-85990-30-0. RIV/70883521:28110/17:63517480 (Článek ve sborníku)

PUREVDORJ, K., BUŇKOVÁ, L., **PIŠTĚKOVÁ, H.**, ČECHOVÁ, E., BLÁHOVÁ J., BUŇKA, F., GONCALVES DOS SANTOS, M. T. P.: Decarboxylase Activity of microorganisms isolated from Kefir. 28. kongres Československej spoločnosti mikrobiologickej, 18. – 21.9. 2019, Tatranské Matliare, Slovensko. ID 43880383 RIV-ID 63523381 (Poster)

ZAHRANIČNÍ POBYT

2017 Instituto Politécnico2 de Beja; Pracovní stáž, 2 měsíce

Téma: Characterization of lactic acid bacteria and yeasts of traditional Portuguese bread sourdough

Ing. Hana Pištěková, Ph.D.

**Aplikace molekulárně biologických metod při detekci genů
a studiu degradace vybraných mikrobiálních metabolitů
v potravinách**

Application of molecular biological methods for the detection of genes
and degradation of selected microbial metabolites in foodstuffs

Teze disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: autor

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2020

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7454-946-5

