

Graf 1 Koncentrácia vitamínu A (mg/l ± SD) v kravskom a kozom mlieku

U mlieka kozieho bola pozorovaná variabilita vitamínu A v priebehu celej laktácie. Na grafe č. 2 je vidno zmeny koncentrácií v jednotlivých mesiacoch. Najvyššia koncentrácia bola zaznamenaná v júni a auguste a následne klesala. Tento jav okrem zmien v kŕmení (pastva vs kŕmenie koncentrované) môže súvisieť i so zasušovaním a prípravou organizmu na ďalšiu graviditu a laktáciu. Štatistickým porovnaním koncentrácie vitamínu A u fariem konvenčných a EKO neboli pozorované žiadne rozdiely.

Záver

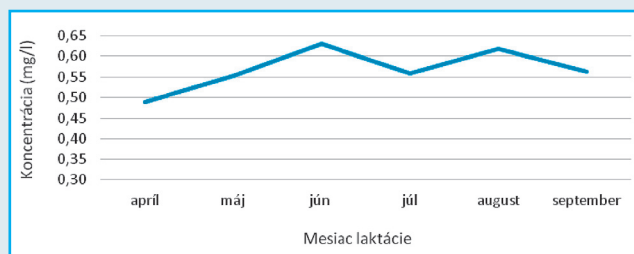
Vitamín A patrí k významným nutričným parametrom mlieka. Z pohľadu potravinových zdrojov tohoto vitamínu, patrí mlieko ako základná potravinová k jeho najvýznamnejším zdrojom. Na základe stanovenia obsahu retinolu v mlieku kravskom a kozom je možno konštatovať, že 1 liter mlieka kravského, nakupovaného mliekárňami, resp. mlieka z priameho predaja obsahuje $0,89 \pm 0,34$ mg/l retinolu (resp. u mlieka kozieho $0,75 \pm 0,34$ mg/l).

Podakovanie

Práca vznikla za finančnej podpory NAZV KUS QJ 1230044.

Použitá literatúra

- EFSA (2013): Vitamin A and normal development and function of the immune system. *EFSA Journal*, 11, s. 1-11.
- HULSHOF, P. J. M., ROEKEL-JANSEN, T., BOVENKAMP, P., WEST, C. E. (2006): Variation in retinol and carotenoid content of milk and milk products in The Netherlands. *J. Food Compos. Anal.*, 19, s. 67-75.
- LIDÉN, M., ERISSON, U. (2006): Understanding retinol metabolism: structure and function of retinol dehydrogenases. *J. Biol. Chem.*, s.13001-13004.
- PARK Y.W. ET AL. (2007): Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rum Res*; 68, s. 88-113.
- PARK Y.W., HAENLEIN H.F.W. (2013): *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production: Production Composition and Health*. West Sussex, Wiley- Blackwell & Sons, 728 s. ISBN: 978-0-470-67418-5
- RAMALHO, H. M. M., SANTOS, J., CASAL S., ALVES, M. R., OLIVEIRA M. B. P. P. (2012): Fat soluble vitamin (A, D, E and β -carotene) contents from a Portuguese autochthonous cow breed-Minhota. *J. of Dairy Sci.*, 95, s. 5476-5484.
- Regulation (EC) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers. OJ L 304/18, 22.11.2011, s. 1-46.
- SAUVANT, P., GROLIER, P., AZAIS-BRAESCO V. (2002): Vitamin A, Nutritional significance. In Roginski, H., Foquay, J., W., Fox, P. F. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2nd ed. London: Academic Press, s. 2657-2664. ISBN: 978-0-12-227235-6.



Graf 2 Variabilita koncentrácie vitamínu A v priebehu celého laktačného obdobia kôz

WEBER, P., BENDICH, A., MACHLIN, L. J. (1997): Vitamin E and human health: Rationale for determining recommended intake levels. *Nutrition*, 13, s. 450-460.

WHO, (2009): *Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005 (online)*. Staženo 15.01.2016. Dostupné z: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44110/1/9789241598019_eng.pdf

Přijato do tisku 12. 1. 2016

Lektorováno 5. 2. 2016

STANOVENÍ ŽIVOTASCHOPNÝCH LAKTOBACILŮ S VYUŽITÍM PROPIDIUM MONOAZIDU POMOCÍ QPCR

Andrea Mühlhansová, Šárka Horáčková,

Milada Plocková

Ústav mléka, tuků a kosmetiky,

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Andrea.Muhlhansova@vscht.cz

Determination of viable lactobacilli using propidium monoazide and qPCR

Abstrakt

Byla optimalizována a testována kvantitativní polymerázová řetězová reakce s interkalačními barvivy propidium monoazidem (PMA) a ethidium monoazidem (EMA) pro stanovení pouze životaschopných laktobacilů. Byly hodnoceny podmínky metody jako je výběr barviva, koncentrace barviva, přídavek chlótu sodného a doba fotoindukce. Daná metoda PMA-qPCR byla porovnána s plotnovými metodami a qPCR bez použití propidium monoazidu. Pro *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus acidophilus* byl jako vhodné barvivo vybrán propidium monoazid o konečné koncentraci 50 mmol l^{-1} s přídavkem 0,5 % hm. chlótu sodného a dobou fotoindukce 15 minut pomocí LED lampy. Výsledky získané touto metodou byly ve větší shodě s výsledky z kultivačních metod než samotná qPCR.

KLÍČOVÁ SLOVA: propidium monoazid, qPCR, laktobacily

Abstrakt

The quantitative polymerase chain reaction technique with the use of intercalating dyes (propidium monoazide and ethidium monoazide) was tested for determination of viable lactobacilli. Conditions of the methods such as selecting dyes, dye concentration, the addition of sodium cholate and time of photoinduction were evaluated. The given method PMA-qPCR was compared with plate methods and qPCR methods without the use of propidium monoazide. Propidium monoazide with the final concentration of 50 mmol l⁻¹ with addition of 0,5 % wt. sodium cholate and 15 min of the photoinduction period with LED lamp was the most suitable for the determination of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. Results obtained by this method were more comparable to those obtained by cultivation media than qPCR alone.

Key words: propidium monoazide, qPCR, lactobacilli

Úvod

V dnešní době roste zájem veřejnosti o informace týkající se potravin, ať už jsou to údaje o krajině původu potravin, jejím zpracovateli či vlivu konzumace určitých potravin na lidské zdraví. Zároveň čím dál více spotřebitelů od potravin očekává i její pozitivní vliv na zdraví. Výrobci se snaží na tuto poptávku reagovat a například přidávají do svých potravin probiotika.

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podání v adekvátním množství přináší hostiteli zdravotní výhody (FAO/WHO, 2002). Dle mnohých autorů je třeba, aby výrobek obsahoval alespoň 10⁶ až 10⁹ KJTJ g⁻¹ životaschopných probiotických mikroorganismů (Shah, 2000). Z tohoto důvodu je důležité mít ověřené metody selektivního stanovení probiotických bakterií (Shah, 2000, Lima a kol., 2009). Někteří autoři upozorňují na problém stanovení selektivně probiotických mikroorganismů ve směsi s ostatními bakteriemi mléčného kvašení pomocí plotnových metod a nabízejí jako možné řešení stanovení pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce, které by navíc umožňovalo určit, zda se jedná o deklarovaný kmen (Furet a kol., 2004; Huang, Lee, 2009).

Klasické stanovení počtu kolonií pomocí ploten se selektivní půdou je metodou, kterou se zachycují pouze živé buňky, což je její velkou výhodou, na druhou stranu jedná se o časově náročnou metodu, která může vykazovat odchylku až 30 % (García-Cayuella a kol., 2009). Z tohoto důvodu by bylo vhodné použití qPCR, která je rychlejší a přesnější (Furet a kol., 2004; García-Cayuella a kol., 2009). Výhodou qPCR je její vysoká citlivost, přesnost, dobrá opakovatelnost, minimální riziko kontaminace a nejsou třeba další kroky (po qPCR). Mezi její nevýhody patří, že data získaná pomocí qPCR značně závisí na přesnosti odběru a přípravě vzorku, kvalitě standardu a správném výběru primerů. Další její nevýhodou je, že se stanovují nejen živé buňky, ale též mrtvé (García-Cayuella a kol., 2009). V současnosti jsou již vyvinuty techniky pro

stanovení pouze živých buněk pomocí propidium monoazidu (García-Cayuella a kol., 2009; Nocker a kol., 2006) či ethidium monoazidu (Nocker a kol., 2006).

Tato práce se zabývala kvantitativním stanovením *Lactobacillus casei* (*L. casei*) a *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) a optimalizací metody s využitím propidium monoazidu pro stanovení pouze živých buněk *L. casei* a *L. acidophilus* ve srovnání s plotnovými metodami a s výsledky získanými pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR).

Materiál a metody

Použité kmeny

Byly použity kmeny: *Lactobacillus acidophilus* LA 5[®] - Christian Hansen (Dánsko) a CCDM 151 - Laktoflora[®] Milcom (ČR) dále *Lactobacillus casei* Lafti[®] L26 - DSM (Nizozemsko) a CCDM 198 - Laktoflora[®] Milcom (ČR).

Kultivace kmenů rodu *Lactobacillus*

Zkoumané kmeny rodu *Lactobacillus* byly kultivovány v bujónu MRS, pH 5,6 (po sterilaci), bylo zaočkováno 1 obj. % inokula. Laktobacily byly kultivovány v upravené atmosféře s obsahem 5 obj. % CO₂ při 37 °C.

Plotnové metody

V práci byly vyzkoušeny a porovnávány plotnové metody pro *L. casei* MRS agar s vankomycinem (MRS-V) při podmínkách anaerobní inkubace za teploty 37 °C po dobu 72 hodin. pH bylo upraveno na hodnotu 5,2-4,6 a přidán vankomycin; výsledná koncentrace 1 mg l⁻¹. A LC agar, jehož složení je následující: na jeden litr 10 g bakteriologického peptonu, 1 g kvasničného extraktu, 4 g Lab Lemco, 2 g KH₂PO₄, 3 g trihydrátu acetátu sodného, 1 g citrátu triamonného, 0,2 g heptahydrátu síranu hořečnatého, 0,05 g tetrahydrátu síranu hořečnatého, 1 g hydrolyzátu kyselého kaseinu, 1 g tweenu 80. pH bylo upraveno na 5,1 ± 0,1, bylo přidáno 6 ml bromkresolové zeleně a 12 g bakteriologického agaru. Těsně před očkovaním byla k médiu přidána D-ribosa; konečná koncentrace 1 hm. %. Misky byly inkubovány anaerobně při 27 °C po dobu 72 až 96 hodin (Shah, 2000). Pro stanovení presumptivního počtu *L. acidophilus* na selektivní živné půdě byl použit postup dle ČSN ISO 20 128. Dle této normy byla připravena MRS půda s clindamycinem hydrochloridem a ciprofloxacinem hydrochloridem (MRS/CL/CP); pH 6,2 ± 0,2. Výsledná koncentrace clindamycinu hydrochloridu byla 0,1 mg l⁻¹, ciprofloxacinu hydrochloridu 10 mg l⁻¹. Misky byly inkubovány anaerobně při 37 °C po dobu 72 ± 3 hodiny (ČSN ISO 20128). Dále byl použit agar MRS pH 5,6 používaný obecně pro stanovení laktobacilů.

Izolace DNA s obarvením propidium monoazidem nebo ethidium monoazidem

Byl odstředěn 1 ml čerstvě narostlé kultury (10 000 g, 10 min, 4 °C) a odsán supernatant. Buňky byly promyty

v 1 ml 1,5 % (hm.) roztoku NaCl a odstředěny 10 000 g, 10 min, 4 °C). Po odsátí supernatantu bylo přidáno 500 µl sterilní vody. K suspenzi bylo přidáno 1,25 µl roztoku PMA (roztok 20 % obj.) sterilního dimethylsulfoxidu s PMA; finální koncentrace 50 mmol l⁻¹ PMA) a proběhla inkubace 5 minut ve tmě. Následovala fotoindukce azidové skupiny použitím LED lampy (Phastblue, GenIUL, Španělsko) (15 minut). Suspenze byla odstředěna (10 000 g, 10 min, 4 °C), supernatant byl odsán, buňky byly promyty nejprve v 1 ml 1,5 % (hm.) roztoku NaCl, odstředěny (10 000 g, 10 min, 4 °C), a poté v 1 ml sterilní vody a opět odstředěny (10 000 g, 10 minut, 4 °C). Dále bylo přidáno 400 µl lytického pufru a proběhla inkubace 1 hodinu při 37 °C. Poté bylo přidáno 25 µl proteinasy K (20 mg ml⁻¹) a 200 µl pufru AL a následovala inkubace 30 min při 70 °C. Suspenze byla převedena do 2 ml mikrozkumavek s 0,3 g zirkoniových kuliček (diameter 0,5 mm). Mikrozkumavky byly protřepány 3krát po dobu 30 s. Suspenze byla převedena zpět do Eppendorfových zkumavek a odstředěna (10 000 g, 10 min, 25 °C). Po převedení do kolonky (DNeasy Mini spin z kitu DNeasy Blood and Tissue kit, Qiagen, Německo) bylo přidáno 200 µl ethanolu (98 %, -20 °C) a inkubováno 5 minut při 25 °C. Poté byl vzorek odstředěn (5 750 g, 2 min, 4 °C). Po odstředění byl vylit obsah sběrné zkumavky, přidáno 500 µl pufru AW1 a následovalo odstředění (6 750 g, 2 min, 4 °C). Opět byl vylit obsah sběrné zkumavky, bylo přidáno 500 µl pufru AW2 a odstředěno (13 900 g, 3 min, 4 °C). Nakonec byl ještě jednou vylit obsah sběrné zkumavky a následovalo další odstředění (13 900 g, 3 min, 4 °C). Před elucí DNA byla vyměněna sběrná zkumavka. Na střed membrány v kolonce bylo napipetováno 50 µl elučního pufru AE, proběhla inkubace 2 minuty při 25 °C a poslední odstředění (5 750 g, 1 min, 4 °C). V případě obarvení ethidium monoazidem byl PMA pouze nahrazen EMA.

Izolace DNA s použitím cholátu sodného před obarvením PMA a EMA upravenou metodou dle Yanga a kol. (2011)

Byl odstředěn 1 ml čerstvě narostlé kultury (10 000 g, 10 min, 4 °C) a odsán supernatant. K peletě byl přidán cholát sodný (konečná koncentrace 0,5 hm. %) a poté proběhla inkubace 30 minut při 37 °C. Dále se v práci pokračovalo dle předchozího odstavce.

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Nejprve byl připraven mix dle tabulky I. Následně bylo do každé jamky napipetováno 9 µl mixu. A poté byl do každé jamky napipetován 1 µl stanovované DNA (duplikát-

Tab. I PCR mix

PCR mix	výrobce	objem (µl)
iQ SYBR Green Supermix	Biorad	5
Primer Fwd (10 mol l ⁻¹)	GeneriBiotech	0,5
Primer Re (10 mol l ⁻¹)	GeneriBiotech	0,5
Demineralizovaná sterilní voda	-	3
Celkový objem		9

Tab. II Průběh qPCR reakce

Počet cyklů	Teplota (°C)	čas (s)
1	95	180
39	95	30
	65/62	30
	72	30
Křivka tání	55-95	0,05 s / 0,5 °C

ně byla napipetována kalibrační řada i neznámé vzorky). Vlastní reakce probíhala dle tabulky II.

Výsledky a diskuse

Porovnání kvantitativního stanovení počtu buněk *L. acidophilus* a *L. casei* pomocí propidium monoazidu a ethidium monoazidu

Bylo provedeno porovnání stanovení počtu kolonií tvořících jednotek dvou kmenů *L. casei* a dvou kmenů *L. acidophilus*, jak je uvedeno v tabulkách III-VI, pomocí kultivačních metod, qPCR, PMA-qPCR a pomocí qPCR s obarvením EMA (EMA-qPCR). Počet buněk stanovený pomocí qPCR byl o 1,0-1,3 řádu vyšší než plotnovými metodami. Lepší korelace s kultivačními metodami byla dosažena u qPCR s interkalačními barvivou.

Tab. III. Porovnání stanovení počtu buněk čisté kultury *L. casei* Lafti L26 pomocí plotnových metod, qPCR a qPCR s obarvením PMA a EMA (log KTJ ml⁻¹)

MRS 5,6	MRS-V	LC	qPCR	PMA-qPCR	EMA-qPCR
8,49	8,45	8,46	9,78	9,77	9,62

Tab. IV. Porovnání stanovení počtu buněk čisté kultury *L. casei* CCDM 198 pomocí plotnových metod, qPCR a qPCR s obarvením PMA a EMA (log KTJ ml⁻¹)

MRS 5,6	MRS-V	LC	qPCR	PMA-qPCR	EMA-qPCR
8,75	8,74	8,74	9,73	9,70	9,49

Tab. V. Porovnání stanovení počtu buněk čisté kultury *L. acidophilus* LA 5 pomocí plotnových metod, qPCR a qPCR s obarvením PMA a EMA (log KTJ ml⁻¹)

MRS 5,6	MRS/CL/CP	qPCR	PMA-qPCR	EMA-qPCR
8,00	8,11	11,46	10,21	9,33

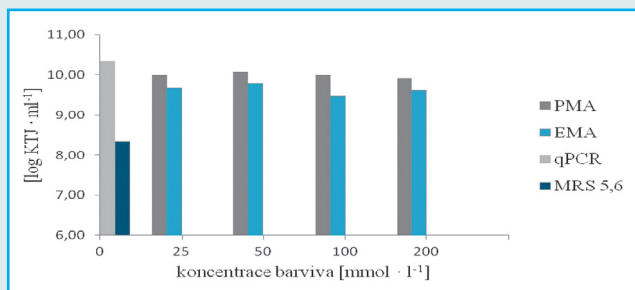
Tab. VI. Porovnání stanovení počtu buněk čisté kultury *L. acidophilus* CCDM 151 pomocí plotnových metod, qPCR a qPCR s obarvením PMA a EMA (log KTJ ml⁻¹)

MRS 5,6	MRS/CL/CP	qPCR	PMA-qPCR	EMA-qPCR
8,08	8,04	8,31	7,91	5,02

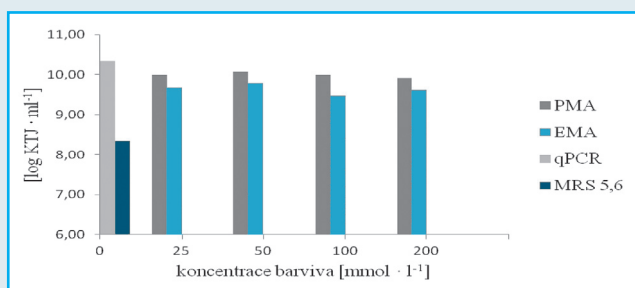
Nocker a kol. uvádí, že v jejich práci došlo k poklesu počtu buněk stanovených pomocí EMA-qPCR o 1-2 řádu oproti stanovení PMA-qPCR. Tento jev je dán tím, že EMA může proniknout také buněčnou stěnou živých buněk a zkruslovat tak výsledky, zatímco PMA buněčnou stěnou živých buněk neproniká (Nocker a kol., 2006; Yáñez a kol., 2011). Množství živých buněk, do kterých EMA pronikne

Tab. VII. Porovnání stanovení počtu buněk pomocí qPCR, qPCR-PMA, qPCR-PMA-CHS, qPCR-EMA, qPCR-EMA-CHS a plotnovými metodami *L. casei* Lafti L26 (log KTJ ml⁻¹)

MRS 5,6	qPCR	PMA-qPCR	PMA-qPCR s CHS	EMA-qPCR	EMA-qPCR s CH
9,00	11,55	9,74	8,94	9,31	9,10



Obr. 1 Stanovení počtu buněk *L. casei* Lafti L26 při různé koncentraci interkalačních barviv



Obr. 2 Stanovení počtu buněk *L. acidophilus* CCDM 151 při různé koncentraci interkalačních barviv

je dáno druhem buněk (Nocker a kol., 2006), použitou koncentrací barviva (Kobayashi a kol., 2009; Wang a kol., 2009) či hustotou bakteriální suspenze (Flekna a kol., 2007; Kobayashi a kol., 2009). Existují názory, že EMA není vhodný k odlišení živých a mrtvých buněk (Flekna a kol., 2007; Kobayashi a kol., 2009; Nam a kol., 2011). PMA byl navržen jako vhodná alternativa EMA, neboť je specifitější. Důvodem by mohlo být to, že PMA má vyšší náboj molekuly (PMA²⁺, EMA¹⁺) (Nocker a kol., 2006). Nevýhodou PMA je generace falešně pozitivních výsledků z důvodu potlačení neúplného signálu. Na druhou stranu, EMA-qPCR způsobuje vyšší snížení CT hodnoty než PMA-qPCR při srovnání s qPCR (Fittipaldi a kol., 2012). Ke stejnému výsledku se došlo i v této práci u *L. casei* Lafti L26, *L. casei* CCDM 198, *L. acidophilus* LA 5 a *L. acidophilus* CCDM 151.

Vliv změny podmínek na kvantitativní stanovení počtu živých buněk *L. acidophilus* a *L. casei* pomocí PMA-qPCR a EMA-qPCR

Byla popsána nutnost stanovení efektivní koncentrace barviva a doby ozáření pro stanovovaný mikroorganismus (Yáñez a kol., 2011). Byla provedena stanovení pro optimalizaci metody pro použití PMA-qPCR (EMA-qPCR) pro *L. casei* a *L. acidophilus* se zaměřením na koncentraci použitého barviva a dobu fotoindukce barviva. Čisté kmeny *L. casei* Lafti L26 a *L. acidophilus* CCDM 151 byly kultivovány v bujónu a dále byla provedena izolace DNA se

změnou koncentrace barviva (konečná koncentrace barviva 25 mmol l⁻¹, 50 mmol l⁻¹, 100 mmol l⁻¹ a 200 mmol l⁻¹) v prvním případě (obr. 1 a 2), ve druhém případě (obr. 3 a 4 byla použita koncentrace barviva 50 mmol l⁻¹, ale byla pozměněna doba fotoindukce (7,5 min, 15 min a 30 min).

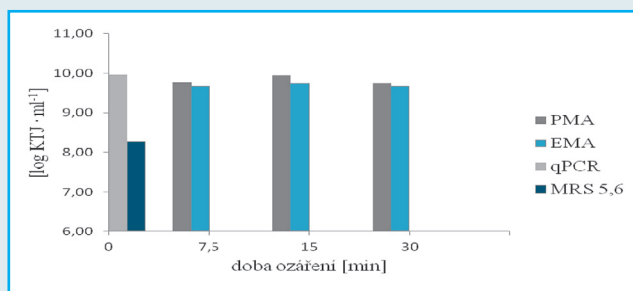
Počet buněk stanovený plotnovou metodou byl u *L. casei* Lafti L 26 i *L. acidophilus* CCDM 151 o 2 řády nižší než qPCR, oproti PMA-qPCR o cca 1,5 řádu. V případě EMA-qPCR se od sebe *L. casei* a *L. acidophilus* lišili více. U *L. casei* došlo k poklesu od PMA-qPCR o 0,3 řádu. U stanovení počtu buněk *L. acidophilus* s rostoucí koncentrací EMA klesal stanovený počet buněk. EMA se nejspíše navázala na DNA i ze živých buněk *L. acidophilus*.

Z obrázků 3 a 4 je patrné, že doba fotoindukce neměla v těchto případech příliš velký vliv na stanovení počtu buněk *L. casei* a *L. acidophilus* (pouze v případě doby fotoindukce 7,5 minuty u EMA-qPCR byl zaznamenán pokles počtu stanovených buněk o 2,5 řádu).

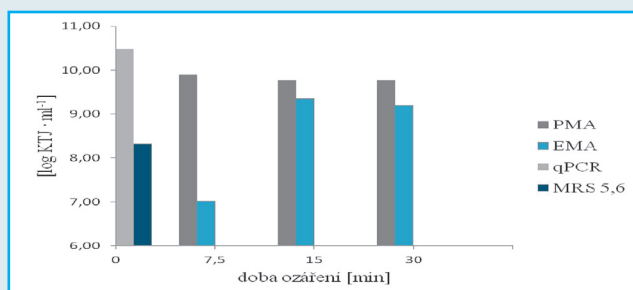
Fotoindukci po dobu 15 minut pro obarvení PMA používají ve své práci například Guarcía-Caguella a kol. (2009).

Použití cholátu sodného před obarvením buněk PMA a EMA u qPCR upravenou metodou dle Yanga a kol. (2011)

Dle Yanga a kol. (2011) je vhodné před obarvením buněk PMA použít deoxycholát sodný. Účinek cholátu sodného byl testován v této práci u *L. casei* Lafti L26, který byl kultivován v bujónu. Byla vyizolována DNA s cholátem sodným (CHS). Bylo také provedeno stanovení počtu buněk plotnovou metodou na MRS agaru pH 5,6; Porovnání výsledků je patrné v tabulce VII.



Obr. 3 Stanovení počtu buněk *L. casei* Lafti L26 při různé době fotoindukce interkalačních barviv



Obr. 4 Stanovení počtu buněk u *L. acidophilus* CCDM 151 při různé době fotoindukce Interkalačních barviv

Počet buněk obarvených PMA (EMA) bez cholátu sodného byl vyšší než počet buněk obarvených PMA (EMA) s cholátem sodným. Počtu buněk stanovených plotnovými metodami bylo nejbližší stanovení PMA-qPCR s cholátem sodným. Ke stejnému zjištění došli Yang a kol. (2011) v práci zaměřené na kvantitativní stanovení *E. coli*. V naší práci pro *L. casei* Lafti L26 jsou výsledky získané EMA-qPCR s použitím cholátu sodného bližší plotnové metodě nežli pouze EMA-qPCR.

Závěr

Byla provedena optimalizace qPCR s použitím PMA a EMA. Pro stanovení počtu buněk *L. casei* a *L. acidophilus* byla vybrána PMA-qPCR s konečnou koncentrací PMA 50 mmol l⁻¹ a optimální doba fotoindukce byla stanovena na 15 minut při použití LED lampy Phastblue, GenIUL (Španělsko). Při použití ošetření buněk cholátem sodným (konečná koncentrace 0,5 hm. %) před samotnou reakcí PMA-qPCR bylo dosaženo nejvyšší shody s hodnotami počtu buněk stanovenými kultivačními metodami. Pomocí této metody by mělo být možné stanovit kmeny *L. casei* a *L. acidophilus* selektivně ve směsi s ostatními probiotickými bakteriemi či zákysovémi kulturami.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokolekolský výzkum (MŠMT č. 20/2015).

Literatura

- FITTIPALDI M., NOCKER A., CODONY F. (2012): Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 91, s. 276-289.
- FLEKNA G., ŠTEFANIČ P., WAGNER M., SMULDERS F. J. M., MOŽINA S. S., HEIN I. (2007): Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Research in Microbiology*, 158, s. 405-412.
- FURET J.P., QUÉNÉE P., TAILLIEZ P. (2004): Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 97, s. 197-207.
- GARCÍA-CAYUELA T., TABASCO R., PELÁEZ C., REQUENA T. (2009): Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. *International Dairy Journal*, 19, s. 405-409.
- HUANG CH. H., LEE F. L. (2009): Development of novel species-specific primers for species identification of the *Lactobacillus casei* group based on RAPD fingerprints. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 89, s. 1831-1837.
- KLEIN D. (2002): Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8, s. 257-260.
- KOBAYASHI H., OETHINGER M., TUOHY M. J., HALL G. S., BAUER T. W. (2009): Unsuitable distinction between viable and dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by ethidium bromide monoazide. *Letters in Applied Microbiology*, 48, s. 633-638.
- LIMA K. G. DE C., KRUGER M. F., BEHRENS J., DESTRO M. T., LANDGRAF M., MELO FRANCO B. G. (2009): Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Food and Technology*, 42, s. 491-495.

- NAM S., KWON S., KIM M.-J., CHAE J.-CH., MAENG P. J., PARK J.-G., LEE G.-CH. (2011): Selective detection of viable *Helicobacter pylori* using ethidium monoazide or propidium monoazide in combination with real-time polymerase chain reaction. *Microbiology and Immunology*, 55, s. 841-846.
- NOCKER A., CHEUNG CH.-Y., CAMPER A. K. (2006): Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67, s. 310 - 320.
- YÁÑEZ M. A., NOCKER A., SORIA-SORIA E., MÚRTULA R., MARTÍNEZ L., CATALÁN V. (2011): Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide. *Journal of Microbiological Methods*, 85, s. 124-130.
- SHAH N. P. (2000): Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, 83, s. 894-907.
- TALWALKAR A., KAILASAPATHY K. (2004): Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium ssp.* and *Lactobacillus casei* complex from commercial yogurts. *International dairy journal*, 14, s. 143-149.
- YANG X., BADONI M., GILL C. O. (2011): Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable *Escherichia coli* from *E. coli* killed by mild or pasteurizing heat treatments. *Food Microbiology*, 28, s. 1478-1482.

Přijato do tisku: 12. 1. 2016

Lektorováno: 8. 2. 2016

VLIV ZVÝŠENÉHO POČTU SOMATICKÝCH BUNĚK NA KVALITU MLÉKA

Květoslava Šustová¹, Jan Kuchtík², Libor Kalhotka³

Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav technologie potravin

¹ Mendelova univerzita v Brně, Ústav technologie potravin

² Mendel. univerzita v Brně, Ústav chovu a šlechtění zvířat

³ Mendelova univerzita v Brně, Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin

The influence of somatic cells count on milk quality

Souhrn

Práce rozebírá příčiny vzniku mastitidy a vliv zvýšeného počtu somatických buněk na technologické zpracování mléka. Pojednává o změnách ve složení a kvalitě mléka v důsledku mastitidy, rizicích zvýšeného počtu somatických buněk v mléce pro spotřebitele i zpracovatele mléka. Popisuje diagnostiku mastitidy pomocí sledování počtu somatických buněk a enzymatické aktivity v mléce.

Klíčová slova: složení mléka, obsah laktózy, somatické buňky, inhibiční látky, enzymy

Summary

This work analyzes the possible causes of mastitis and the impact of increased somatic cell count on the techno-