



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MIKROBIOLOGICKÉ ANALYTICKÉ METODY PRO POTŘEBY MLÉKÁRENSKÉHO PRŮMYSLU

MICROBIOLOGICAL ANALYTICAL METHODS SUITABLE FOR DAIRY INDUSTRY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

JAROSLAV VLASÁK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. ŠTĚPÁNKA TRACHTOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0913/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Jaroslav Vlasák	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	

Název bakalářské práce:

Mikrobiologické analytické metody pro potřeby mlékárenského průmyslu

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Jaroslav Vlasák
Student(ka)

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na probiotika v mléčných výrobcích a zejména na molekulárně genetické metody využívané k analýze DNA. Pozornost je věnována především metodám stanovení bakteriálních buněk rodu *Lactobacillus*. Základní technikou je v současné době zejména polymerázová řetězová reakce (PCR), při které dochází k amplifikaci specifických úseků DNA pomocí krátkých oligonukleotidových primerů.

V praktické části práce je izolována celková DNA z čisté bakteriální kultury a probiotického mléčného výrobku metodami fenolové extrakce a magnetické separace za využití magnetických nosičů P(GMA) pokrytých karboxylovými funkčními skupinami. Kvalita izolované DNA byla potvrzena amplifikací v PCR za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria*, *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

ABSTRACT

The theoretical part of the thesis is focused on probiotics in dairy products. Thesis deals with molecular genetic methods, which are used to analyze DNA. Especially are discussed methods used for isolation bacterial cells belonging to genus *Lactobacillus*. The polymerase chain reaction (PCR) is the basic technique at present time. Short chain of oligonucleotide primers are used to amplification specific parts of DNA molecule chain.

The practical part of the thesis is focused on the DNA from pure bacterial culture and probiotic dairy product. DNA was isolated using methods of phenol-chloroform extraction and magnetic separation. For magnetic separation was used magnetic particles covered with carbonyl functional groups. Quality of the DNA was confirmed by PCR amplification. Primers specific for domain *Bacteria* and genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* was used.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polymerázová řetězová reakce (PCR), izolace DNA, mléčné výrobky, probiotika

KEYWORDS

Polymerase chain reaction (PCR), DNA isolation, dairy products, probiotics

VLASÁK, J. *Mikrobiologické analytické metody v mlékárenském průmyslu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 39 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D za odborné vedení, cenné připomínky, trpělivost, pochopení a za čas, který mi věnovala.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	MLÉKÁRENSKÝ PRŮMYSL	8
2.1.1	Legislativní omezení	8
2.1.2	Kultury používané v mlékárenském průmyslu.....	9
2.2	PROBIOTIKA JAKO PŘÍDATNÉ KULTURY DO FERMENTOVANÝCH MLÉČNÝCH VÝROBKŮ ...	9
2.2.1	Definice probiotik a jejich taxonomické zařazení.....	10
2.2.2	Prospěšné účinky probiotik na zdraví hostitele.....	10
2.2.3	Interakce probiotik s matricí fermentovaných mléčných výrobků.....	11
2.3	HISTORIE A SOUČASNOST MIKROBIOLOGICKÝCH ANALYTICKÝCH METOD VYUŽÍVANÝCH V MLÉKÁRENSKÉM PRŮMYSLU (OBEZNĚ):	12
2.4	STRUČNÝ PŘEHLED MIKROBIOLOGICKÝCH ANALYTICKÝCH METOD A MOLEKULÁRNĚ GENETICKÝCH METOD	12
2.4.1	Růst kolonií na živném agaru.....	12
2.4.2	Polymerázová řetězová reakce	13
2.4.3	Fluorescenční in situ hybridizace	13
2.4.4	Omics technologie.....	14
2.5	SOUČASNÉ MIKROBIOLOGICKÉ ANALYTICKÉ METODY POUŽÍVANÉ V MLÉKÁRENSKÉM PRŮMYSLU PRO ROD <i>LACTOBACILLUS</i>	14
2.5.1	Metody fenotypické identifikace.....	14
2.5.2	Metody pomocí fyzikálně – chemické identifikace	14
2.5.3	Metody genotypické identifikace	15
3	CÍL PRÁCE	18
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
4.1	MATERIÁL A METODY	19
4.1.1	Bakteriální kmeny	19
4.1.2	Použitý probiotický potravinový výrobek.....	19
4.1.3	Přístroje a pomůcky.....	19
4.1.4	Chemikálie	20
4.1.5	Roztoky	20
4.1.6	Komponenty pro PCR	21
4.1.7	Magnetické nosiče.....	21
4.1.8	Lyze bakteriálních buněk	21
4.1.9	Fenolová extrakce bakteriální DNA.....	22
4.1.10	Srážení DNA ethanolem.....	22
4.1.11	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z mléčných výrobků pomocí magnetických mikročástic.....	22
4.1.12	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA	23
4.1.13	Gelová elektroforéza bakteriální DNA	24

4.1.14	Příprava směsi pro PCR	24
4.1.15	PCR primery	25
4.1.16	PCR programy	25
4.1.17	Gelová elektroforéza produktu PCR	26
4.2	VÝSLEDKY	27
4.2.1	Izolace bakteriální DNA.....	27
4.2.2	Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA.....	27
4.2.3	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA	28
4.2.4	Důkaz přítomnosti bakteriální DNA pomocí PCR.....	29
4.2.5	Důkaz přítomnosti DNA rodu <i>Lactobacillus</i> pomocí PCR.....	30
4.2.6	Důkaz přítomnosti DNA rodu <i>Bifidobacterium</i> pomocí PCR	31
4.2.7	Shrnutí výsledků.....	32
4.3	DISKUZE.....	33
4.3.1	Izolace DNA z čistých bakteriálních kultur	33
4.3.2	Gelová elektroforéza vzorku bakteriální DNA	33
4.3.3	Polymerázová řetězová reakce	33
4.4	ZÁVĚR.....	35
5	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	36
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	37

1 ÚVOD

Díky změně způsobu života a složení potravy dochází v posledních letech k velkému rozvoji probiotických potravin a jejich rozšíření. Probiotika příznivě ovlivňují zdraví konzumenta a zlepšují rovnováhu jeho střevní mikroflóry. Všeobecně mezi probiotické bakterie patří bakterie mléčného kvašení (BMK). Kvašení mikroorganismů hraje klíčovou roli ve vývoji fyzikálně-chemických a senzorických vlastností potravin. Přispívají také k bezpečnosti výrobků tím, že omezují růst patogenních mikroorganismů a kažení potravin. Vyhodnocení životaschopnosti buněk má velký význam z obecného fermentovaného potravinářského průmyslu a to nejen pro odvětví mléka a mléčných výrobků.

Probiotika jsou v dnešní době užívána zejména jako podpůrný prostředek při různých průjemových onemocněních nebo po ukončení léčby antibiotiky, k obnově střevní mikroflóry. Podílejí se na zachování a rozvoji složení střevní mikroflóry. V nových průzkumech po pravidelném užívání probiotik došlo u všech pacientů ke snížení hladiny zánětlivých látek v krvi. [1] Probiotika tedy budou nejspíše působit na široké spektrum zánětlivých onemocnění. Probiotické kultury jsou často používány jako startovací kultury v mléčných výrobcích, jako jsou sýry nebo jogurty. Jsou součástí i jiných než mléčných výrobků jako je kvašená zelenina.

K identifikaci nejen probiotických organismů v potravinách je využívána celá řada metod. Pro jednoznačné identifikování probiotických bakterií řazených do rodu *Lactobacillus*, lze využít celou řadu fenotypových, fyzikálních a genotypových metod. Tyto metody jsou často dostatečně specifické pro identifikaci probiotických kmenů na úrovni kmen, rod a druh.

Fenotypové metody mohou v některých případech selhat na základě nesprávné identifikace. Tyto základní fenotypové metody zahrnují morfologii, barvení podle Grama a biochemické testy, jako je kvašení sacharidů a růstu při různých teplotách a koncentracích solí.

Nejvíce využívanou molekulárně diagnostickou metodou je metoda polymerázová řetězová reakce (PCR), neboli rychlá a snadná amplifikace úseku DNA založeného na principu replikace nukleových kyselin. [2]

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mlékárenský průmysl

Mlékárenský průmysl je hospodářské odvětví, kde dochází ke zpracování mléka a mléčných výrobků. Mlékárenský průmysl v dnešní době zahrnuje spoustu výrobků mezi, které například patří:

- tekuté mlékárenské výrobky (konzumní mléka, ochucená mléka, smetany atd.),
- kondenzovaná mléka a sušená mléka, včetně kojenecké dětské výživy,
- zakysané mléčné výrobky (jogurty, zakysané tekuté výrobky atd.),
- syrovátka a výroba ze syrovátky
- máslo, máselné pomazánky a kombinované tuky,
- sýry

Z hlediska vývoje mlékárenského průmyslu je nejvýznamnější 19. století, kdy přibýly nové vědecké poznatky v chemii a biologii. Nejdůležitějším objevitelem byl Louis Pasteur, jehož poznatky byly základem pro buněčnou mikrobiologii. Po čase byla výroba mléka tak rozšířená, že začaly vznikat přebytky. V 80. letech 19. století byly zakládány první družstevní mlékárny. Během 1. světové války došlo k velkému úpadku mlékárenského průmyslu. Mnoho mlékáren muselo být i zavřeno. V průběhu druhé světové války opět došlo k zásadní změně, zabráním pohraničí přišel český průmysl o desítky mlékáren. Po válce došlo ke znárodnění mlékáren v Česku a k otevření některých nových podniků v mlékárenském průmyslu. V současné době je v České republice 49 firem zabývajících se mlékárenským průmyslem. [3]

2.1.1 Legislativní omezení

Začátkem roku 1950 vcházely v platnost československé státní normy. Roku 2004 přišla zásadní změna v legislativě mlékárenského průmyslu, jelikož se Česká republika stala členem Evropské unie. Došlo ke zpřísnění hygienických a technických pravidel podle Evropské unie, které platí až dodnes. Legislativa se řídí normou ČSN 570529, která reguluje celkové počty mezofilních organismů, somatických buněk a obsahu inhibičních látek, jejichž obsah je přípustný v mlékárenských výrobcích. Mimo jiné udává také specifické charakteristiky pro složení mléka jako je množství tuku, množství bílkovin, množství tukuprosté sušiny. Norma upravuje také doplňkové znaky jakosti a další mikrobiologická kritéria, mezi něž patří:

- počet psychrotrofních mikroorganismů < 50 000/ml
- počet koliformních bakterií < 2 000/ml
- počet termorezistentních mikroorganismů < 2 000/ml
- počet sporotvorných anaerobních bakterií musí být v 0,1 ml negativní

Dalšími kritérii jsou minimální obsah vápníku, vitamínu A, B a B2. [4]

2.1.2 Kultury používané v mlékárenském průmyslu

Laktobacily se vyskytují přirozeně v gastrointestinálním traktu a v pohlavním ústrojí člověka. Bylo popsáno více než 70 druhů laktobacilů. Nejstudovanější z nich je *Lactobacillus acidophilus*. Nejčastěji využívané a studované probiotivcké mikroorganismy jsou uvedeny v tabulce 1. [5]

Tabulka 1 - Nejčastěji využívané mikroorganismy v mlékárenských výrobcích [5]

rod <i>Lactobacillus</i>	rod <i>Bifidobacterium</i>	Další druhy
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. amylovarus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. animalis</i>	
<i>L. helveticus</i>		
<i>L. delbrueckii</i> subs. <i>bulgaricus</i>		
<i>L. salivarius</i> subs. <i>salivarius</i>		
<i>L. casei</i>		
<i>L. paracasei</i> subs. <i>paracasei</i>		
<i>L. paracasei</i> subs. <i>tolerans</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. fermentum</i>		
<i>L. reuteri</i>		

2.2 Probiotika jako přídatné kultury do fermentovaných mléčných výrobků

Nedávné objevy ohledně zdravotních benefitů probiotických bakterií vedly k narůstajícímu komerčnímu využití přísady probiotických bakterií do fermentovaných mléčných produktů. Různé kombinace původních mléčných kultur a probiotických bakterií přináší fermentovaným mléčným výrobkům zlepšené technologické charakteristiky a nutriční a zdravotní benefity. Mléko jako potravinová matrice pro probiotické bakterie vykazuje vlastnosti, které jsou velmi vhodné pro přežití kultur v průběhu skladování konzumace. Byly takto vyvinuty nové technologie přidávání probiotických kultur do fermentovaných mléčných výrobků, které vytvářejí nové chutě, vůně, textury a další atributy mléčných výrobků. [6]

Probiotika jsou hojně používána zejména k přípravě fermentovaných potravin a krmiv vzhledem k předpokládanému příznivému účinku na zdraví hostitele. Například jogurty obsahující dostatečné množství životaschopných probiotických bakterií mají blahodárné účinky na lidské zdraví. [5]

2.2.1 Definice probiotik a jejich taxonomické zařazení

V roce 2010 Světová zdravotnická organizace (WHO) definovala probiotické kmeny jako "živé mikroorganismy, které jsou podávány v přiměřeném množství, přináší zdravotní přínos svému hostiteli".

Většina probiotických organismů používaných v současné době v potravinách patří buď do rodu *Lactobacillus* nebo *Bifidobacterium*. Bifidobakterie jsou grampozitivními, nesporulující, anaerobní a hetero-fermentující bakterie. Zástupci rodu *Lactobacillus* jsou grampozitivní, nesporulující; nicméně, jsou tolerantní ke kyselinám, fakultativně anaerobní, homo- nebo heterofermentativní. [5] Mezi další bakterie používané jako probiotika ve výživě lidí a zvířat patří *Escherichia coli* kmen Nissle 1917, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* a *Enterococcus faecium*. *Bacillus toyonensis* se používá ve výživě zvířat jako probiotikum díky svým sporám, které vydrží tepelné zpracování krmiv. Mezi probiotika jsou řazené také houby, jako jsou kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces boulardii*. [7]

Obecně platí, že bakterie, jsou označované jako „probiotika“ musí být v souladu s následujícími kritérii [8]

- jsou lidského nebo hovězího původu a nepatogenní,
- umožňují integrace vysokého počtu buněk do potravin vysokého počtu buněk
- udržují si svou životaschopnost po celou dobu trvanlivosti výrobku,
- jsou odolné vůči žluči a kyselému prostředí odolávají působení prostředí a průchodu přes gastrointestinální trakt,
- zabraňují adhézi patogenních bakterií ve střevě,
- přináší hostiteli zdravotní výhody.

2.2.2 Prospěšné účinky probiotik na zdraví hostitele

Probiotické bakterie se vyznačují celou řadou blahodárných účinků na zdraví hostitele. Jsou schopny snížit dobu trvání průjmu, snižují alergické syndromy, produkují různé bakteriociny a snižují pH prostředí. Další příznivé účinky kmenů nebo jejich metabolitů jsou zlepšená reakce imunitního systému, zlepšená rovnováha mikroorganismů nacházející se v tlustém střevě, snížení množství enzymů, které přispívají ke vzniku rakoviny, snížení obsahu patogenních bakterií a rotavirů (*Clostridium difficile* a *Helicobacter pylori*) ve střevech, snížení sérového cholesterolu, antimikrobiální působení proti patogenům z potravin a proti organismům způsobující zubní kazy. Antimikrobiální aktivita je způsobena schopností probiotických bakterií vyloučovat a aktivně inhibovat škodlivé nebo patogenní mikroby produkcí organických kyselin (kyselina mléčná a kyselina octová) a dalších baktericidních látek. Zlepšení symptomů intolerance laktozy, antioxidační účinky. [1]

Probiotické bakterie vykazují také antikarcinogenní účinky díky [9] [10]:

- změna metabolických aktivit střevní flóry,
- snížení poškození DNA vazby a snížení potenciálních karcinogenů, jako jsou heterocyklické aromatické aminy,
- výrobě proti rakovinotvorným nebo antimutagenních látek,
- posílení imunitní obrany hostitele,
- zvýšení střevní úrovně spermidinu.

Z hlediska účinku probiotik na zdraví hostitele, je důležitá probiotická adherence na střevní buňky, která ovlivňuje jejich funkčnost a stimuluje enterocyty. Když nedochází k adhezi bakterií na epitelární buňky, probiotika nejsou schopna ovlivnit důležité fyziologické vlastnosti střevní sliznice. K adhézi dochází buď prostřednictvím proteinového mechanismu, nebo mohou být využity sacharidové vazby. Důležité pro zachování funkce probiotických bakterií je jejich přežití gastrointestinálním traktem. Vysoce kyselé prostředí žaludku je nepříznivé pro přežití bakterií stejně jako zásadité prostředí žluči. Proto by tyto kultury měly být konzumovány s potravinovou matricí, která zvýší jejich šance na přežití při průchodu gastrointestinálním traktem (GI).

Probiotika jsou schopny ovlivňovat GI mikroflóru začleněním svých buněk do střevního ekosystému. Bakterie jsou tak schopny modulovat imunitní odpovědi, které pomáhají hostiteli produkovat antipatogení a antikarcinogení látky. Mechanismus účinku probiotik diferenciaciálně utváří expresi cytokinů a kostimulačních molekul. Probiotické bakterie stimulují slizniční i systémové imunitní reakce, které pomáhají v antipatogení a antikarcinogení činnosti hostitele. Několik studií se zabývalo zkoumáním vlivu pravidelného užívání mléčných výrobků na zvýšení počtu bílých krvinek v krevním séru. Bylo pozorováno zvýšení počtu bílých krvinek zejména fagocitních. Bakterie mléčného kvašení jsou schopny redukovat počet patogeních bakterií, které se nacházejí v potravinách a způsobují jejich intoxikaci. Probiotika jsou rozvíjejícím se odvětvím v potravinářských technologiích a zlepšují zdravotní stav spotřebitele. Je však nutný další výzkum zejména v oblasti prevence rakoviny a imunomodulačních vlastností. [11]

2.2.3 Interakce probiotik s matricí fermentovaných mléčných výrobků

Mléko a přírodní sýry jsou vynikajícími médii pro růst a přežití probiotických organismů. Do probiotických sýrů jsou nejčastěji přidávány bakterie rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* a to buď do mléka, anebo až při zpracování syrovátek. Další vhodné potravinové matrice jsou: zmrzlina, mražený jogurt, neb jiné mražené mléčné dezerty, sýr Cheddar, sýr Gouda, tvaroh, kozí sýr, a Crescenza sýr. Nejdůležitějším faktorem probiotické výroby potravin je stabilita výrobku, aby byl obsah životaschopných buněk alespoň 10^7 cfu·ml⁻¹. Při přidávání probiotických kmenů do mléčných výrobků však nastávají problémy. Nežádoucí je zejména negativní efekt na sensorické vlastnosti produktu. Také mikrobiální interakce může způsobit změny ve složení bakteriální flóry během výroby a skladování. Studie ukazuje, že ne všechny kmeny jsou skutečně kompatibilní. Interakce mezi jednotlivými druhy ovlivňují například životaschopnost *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobakterií* v jogurtu. [7]

2.3 Historie a současnost mikrobiologických analytických metod využívaných v mlékárenském průmyslu (obecně):

V dnešní době zahrnuje mlékárenský průmysl nejen výrobu mléka ale i řadu mléčných výrobků, které se vyrábějí pomocí mikroorganismů, dochází zde k prodloužení trvanlivosti fermentovaných výrobků pomocí bakterií mléčného kvašení. Současným trendem je přidávání probiotických bakterií do nových potravinových matic za účelem vytváření nových probiotických výrobků.

V mlékárenském průmyslu je kvalita těchto výrobků kontrolována řadou metod.

2.4 Stručný přehled mikrobiologických analytických metod a molekulárně genetických metod

Mikrobiologické analytické metody jsou využívány k identifikaci mikroorganismů už od 18. století. V současné době však tyto tradiční metody ustupují do pozadí a stále více se rozvíjejí molekulárně genetické metody. K největšímu rozvoji molekulárně genetických metod došlo v 80 – 90. letech 20. století a to zejména vynálezem PCR metody, ale také fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH – Fluorescent *in situ* hybridization) a omics technologií.

2.4.1 Růst kolonií na živném agaru

Mikrobiologické analytické metody jsou důležité zejména proto, že mohou identifikovat probiotické bakterie i bakterie mléčného kvašení, jak v průběhu výroby, tak v hotových výrobcích. Mezi standardní mikrobiologické metody patří: naočkování mikroorganismu na agarové plotny (pevné medium v Petriho misce), n šikmý agar (pevné medium ve zkumavce, která byla ponechána v šikmé poloze tuhnoutí, používá se pro lepší skladování a transport oproti Petriho miskám), na hluboký agar (pevné medium ve zkumavce které tuhne při svislé poloze zkumavky, používá se pro mikroorganismy preferující pro svůj růst méně kyslíku) nebo na živný bujon (tekuté živné prostředí, obvykle ve zkumavce nebo Erlenmeyerově baňce).

Složení živného média je specifické pro každý mikroorganismus v závislosti na jeho požadavcích na zdroj uhlíku (autotrofní – anorganický uhlík, heterotrofní – organický uhlík), kyslík (aeroba, anaeroba, fakultativní anaeroba), vodíku, dusíku, fosforu, síry a minerálních látek. Živná média jsou přirozená, syntetická nebo polysyntetická. Z hlediska růstu MO se dělí na univerzální (vhodné pro všechny MO), selektivní a selektivně diagnostická (růst MO se projeví biochemickou reakcí př. změna zbarvení média). V laboratořích je nejběžněji používaným médiem komerční agar o daném složení.

Běžně se používá ve všech mikrobiologických laboratořích a je to nejjednodušší způsob, jak zjistit a kvantifikovat živé mikroorganismy nejen v potravinách.

Pojem životaschopnosti mikroorganismů byl dlouho považován za schopnost množit se v optimálním médiu. V 80. letech se následně s použitím dalších metod jako jsou například detekce živých a mrtvých buněk s využitím specifických barviv nebo reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce (RT – PCR) se ukázalo, že existuje více stavů mezi živými

a mrtvými bakteriemi a živé buňky se nemusí množit. Pro odlišení buněk schopných dělení se v současné době doporučuje využívat především molekulární metody. [12]

2.4.2 Polymerázová řetězová reakce

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR – polymerase chain reaction) vznikla v 80. letech a rychle se stala základní metodou nejen pro lékařské a výzkumné biologické laboratoře.

Principem polymerázové řetězové reakce (PCR – polymerase chain reaction) je opakování tří základních kroků (denaturace, hybridizace a soubor komplementárního řetězce DNA) vedoucích k syntéze zvoleného úseku DNA, vymezeného vazbou dvou jednovláknových oligonukleotidů tzv. primerů. Při denuraci dochází vlivem vysoké teploty (90–95°C) k oddělení jednotlivých vláken dvoušroubovice, dále jsou v průběhu hybridizace při teplotě 45–65°C navázány primery, které jsou tvořeny 20–25 nukleotidy. V posledním kroku dochází působením enzymu DNA polymerázy k syntéze nového řetězce DNA.

V současné době je běžně používána nejen v potravinářství, pro detekci patogenních mikrobů a stanovení mikroorganismů znehodnocujících potravinářské produkty. PCR metoda je dle platné (ISO normy 2011b) vhodná také k potvrzení charakteristické kolonie narostlé na agarové plotně, nebo k identifikaci probiotik a mikrobů zapojených do fermentačních procesů. Je využívána v komparativní genomice (porovnávání genomů různých organismů) a v analýze zaměřené na specifickou kvantifikaci mikrobiální populace. Použití reverzně transkripční PCR (RT–PCR), která využívá přepis z RNA do DNA je jedním ze způsobů jak rozlišovat mezi živými a mrtvými bakteriemi. Další přístup je založen na kombinaci použití interakční činidla, jako je například propidium monoazide (PMA) a ethidium monoazide (EMA) a PCR. Tato barviva pronikají pouze do mrtvých buněk s nefunkčními buněčnými membránami a následně brání amplifikaci DNA pomocí PCR.

Její nevýhodou je vysoká citlivost. Právě vysoká citlivost na malé změny v přípravě vzorku, amplifikaci a způsob vyhodnocení dat, jsou nejčastějším důvodem, který může vést nepřesným výsledkům. [13]

2.4.3 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH – Fluorescent *in situ* hybridization) byla populární technikou ve výzkumných laboratořích v 90. letech. Je založena na identifikaci buněk obsahujících specifické sekvence nukleové kyseliny, pomocí oligomerové sondy konjugované s fluorescenčními molekulami sondy hybridizují s cílovou DNA nebo RNA. Fluorescence je detekována pozorováním pod fluorescentním mikroskopem. Nevýhodou metody FISH je její obtížná optimalizace a nízká opakovatelnost. Výhodou metody FISH jsou, že umožňuje rychle zhodnotit velký počet buněk. Využívá se ke zviditelnění sekvencí nukleových kyselin přímo na mikroskopických preparátech obsahujících morfologicky zachovalé chromozomy či buněčná jádra. [14]

2.4.4 Omics technologie

Jedním z cílů technologie omics je identifikovat klíčové biomarkery (charakteristiky, které jsou objektivně měřitelné a uznávané jako indikátory normálních biologických či patologických procesů), které by mohly být využity pro selekci nových probiotických nebo technologicky zajímavých kmenů pro hodnocení jejich fyziologických stavů s cílem zlepšit jejich funkčnost během průmyslových procesů. Využití omics technologií znamená porozumět chování mikrobiálních drah s cílem vylepšit průmyslové procesy.

S její pomocí můžeme charakterizovat genovou expresi a syntézu proteinů během růstu mikroorganismů. [15]

2.5 Současné mikrobiologické analytické metody používané v mlékárenském průmyslu pro rod *Lactobacillus*

K identifikaci mikroorganismů nacházejících se v mlékárenských výrobcích se používá metod fenotypické identifikace, fyzikálně – chemické identifikace a genotypické identifikace (zejména PCR). Poslední zmíněná metoda je nejpřesnější a nevyžaduje doplňující metody.

2.5.1 Metody fenotypické identifikace

Fenotypové metody buď samostatně, nebo v kombinaci s buněčnou morfologií zahrnují testování buněčné pohyblivosti, Gramovo barvení, katalázovu a oxidázovou reakci. [8]

2.5.1.1 Morfologie

Identifikace kmenů nebo druhů rodu *Lactobacillus* na základě morfologických znaků neboli tvaru bakteriálních buněk, velikosti či vzhledu kolonií je nepřesná z důvodu morfologické podobnosti kolonií bakterií stejného rodu. Tyto charakteristiky poskytují pouze prvotní přehled bakterií přítomných v produktu před jejich identifikací pomocí jiných fenotypových metod nebo genotypizací. [8]

2.5.1.2 API 50 CHL systém od BioMérieuxu

Systém API 50 CHL systém od BioMérieuxu využívá široké spektrum fyziologických testů, včetně použití kultivačních substrátů zahrnující sacharidy, heterosidy, polyalkoholy a uronové kyseliny. Tento postup poskytuje vnitřní pohled na asimilační, oxidační a fermentační dráhy, které jsou odvozeny z růstu buněk na různých substrátech a změny barvy způsobené změnami pH v rámci jednoho testu. Vzhledem k vysoké úrovni fenotypové variability mezi laktobacily je tato metoda náročná, protože přítomnost kyslíku nebo odchylka hustoty bakteriální suspenze může ovlivnit výstup hodnot. [16]

2.5.2 Metody pomocí fyzikálně – chemické identifikace

Fyzikálně – chemické metody jsou schopny identifikovat rychle a citlivě s vysokou přesností i blízce příbuzné druhy bakterií.

2.5.2.1 Fourierova transformace infračervené spektroskopie

Metoda používá polychromatické infračervené světlo analyzující složky v bakteriálním vzorku při určité vlnové délce. Technologie Fourierova transformace infračervené spektroskopie (FTIR) umožňuje diferenciaci bakterií studiem jejich buněčných komponentů,

mastných kyselin, membrán, buněčných bílkovin, polysacharidů a nukleových kyselin. V izolátu z různého prostředí, potravin nebo krmiv mohou být identifikovány startovací a ne-startovací kultury, kde lze analyzovat původ ze syru. Metoda je rychlá, levná, citlivá a s vysokou přesností analýzy pro identifikaci bakterií. Umožňuje rozlišení bakterií na rod, druh a kmen. [17]

2.5.2.2 Maticová asistovaná laserová desorpční ionizace

Metoda vychází z toho, že každá molekula buňky má vlastní charakteristickou hmotnost. Tato metoda může být použita pro charakterizaci velkých biomolekul a bakteriálních proteinů s hmotnostním rozsahem 2 kg/mol a 12 kg/mol. Jednotlivé bakteriální kolonie narostlé přes noc lze použít pro chemotaxonomickou klasifikaci využívající maticovou asistovanou laserovou desorpční ionizaci (MALDI). To vedlo k rychlému rozvoji MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie pro charakterizaci nově izolovaných kmenů nebo vybraných neznámých proteinů, bakteriální RNA a DNA na úroveň rodu, druhu, poddruhu a úroveň kmene.

Stále více se tato metoda používá k odlišení blízkce příbuzných druhů v diagnostických laboratořích samostatně nebo v kombinaci s jinými metodami, jako je sekvencování 16S rRNA. [18]

2.5.3 Metody genotypické identifikace

Metody genotypické identifikace jsou vhodné pro specifickou kvantifikaci a identifikaci bakterií z hlediska jejich přesnosti a citlivosti.

2.5.3.1 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Metoda kvantitativní polymerázové reakce (qPCR) umožňuje stanovení množství molekul nukleových kyselin ve vzorku závislosti na detekci fluorescenčního signálu. V současné době se používá varianta PCR umožňující přímou kvantifikaci PCR produktu v průběhu reakce („real-time PCR“).

Kvantifikace množství molekul nukleových kyselin je důležitá při detailním studiu genové exprese nebo diagnostice některých patogenů. Kvantifikace ampliconu při qPCR v reálném čase se provádí prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu v cycleru, který kromě cyklického střídání teplot umožňuje detekci fluorescence a monitorování postupu PCR v reálném čase, bez nutnosti detekovat produkty PCR elektroforeticky.

Ve srovnání s kultivačními metodami, je kvantitativní qPCR rychlejší. Dokonce i jednotlivé bakteriální druhy (startovací kultury zástupců rodu *Lactobacillus* v jogurtu, spolu se *Streptococcus thermophilus*) mohou být detekovány a kvantifikovány pomocí qPCR experimentů. Analýzou křivek tání lze navíc zjistit kmenovou identitu.

QPCR je metoda vhodná pro rutinní analýzu. Ideální způsob pro druhově specifické kvantifikace a identifikace bakterií. [13]

2.5.3.2 Polymerázová řetězová reakce – denaturační gradientová elektroforéza

Kombinace metod polymerázové řetězové reakce a denaturační gradientové elektroforézy (PCR – DGGE) je založená na analýze rozdílných sekvencí v krátkých molekulách DNA. Nevyžaduje předchozí kultivaci buněk nebo předčištění jednotlivých kmenů.

DGGE využívá rozdílné elektroforetické mobility u nedenaturované a částečně denaturované DNA. [19] V důsledku rozdílů v nukleotidovém složení mají různé sekvence DNA jiné teploty tání. Pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy mohou být produkty PCR o stejné délce odděleny na denaturačním gelu s gradientem na základě sekvenčních rozdílů. Proces migrace dvouvláknových DNA gelem se zastaví podle specifické teploty tání (rozdělí se na jednořetězcové DNA). Jednotlivé pásy v gelu mohou, být analyzovány srovnáním s kontrolní DNA, která běží na stejném gelu. Intenzita pásů na DGGE gelu je semikvantitativní, umožňuje tedy vizualizaci a následné vyhodnocení dominance určitých druhů ve vzorku oproti méně dominantním druhům. Proto je pomocí tohoto přístupu omezena kvantifikace.

Mikrobiální komunity používané v probiotických výrobcích mohou být metodou PCR v kombinaci s DDGE snadno vyhodnoceny. Vhodná je například pro identifikace bakteriálních komunit v sýrech. Velké množství primerů je k dispozici k amplifikaci sekvencí bakterií používaných v probiotických výrobcích, umožňujících rozlišování laktobacilů.

Nevýhodou PCR – DGGE je, že druhy nemusí být detekovatelné, jsou-li přítomny v celkové bakteriální populaci v menším množství než 1% z celkové populace. Další nevýhodou je, že blízké příbuzné kmeny, můžou mít za následek tvorbu stejně velkých skupin v DGGE gelu, což má za následek chybnou identifikaci. [20]

2.5.3.3 Náhodná amplifikace polymorfní DNA

Náhodná PCR (AP – PCR) neboli náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD) je rychlá a jednoduchá technika pro fingerprintink DNA. Je vhodná pro rychlou srovnávací typizaci genomových DNA mikroorganismů a některých rostlin. [19] Metoda využívá krátké nespecifické primery, které nasedají na více náhodných cílových sekvencí a vedou ke vzniku většího počtu amplikonů tzv. "fingerprint". Tyto amplikony umožňují rozlišení různých druhů bakterií.

Výhodou této metody je, že může být během krátké doby analyzován vysoký počet vzorků. V praxi umožňuje například sledování vývoje startovacích kultur v rostlinném fermentačním procesu (výroba kysaného zelí).

Naopak problematické může být u RAPD opakovatelnost výsledků. Metoda je citlivá na změny v přípravě vzorků DNA, následkem toho jsou proměnlivé výsledky mezi vzorky DNA stejného druhu nebo kmene. Proto by tento postup neměl být používán samostatně, ale vždy v kombinaci s jinou metodou. [21] Využití qPCR je shledáno vhodným k využití ve výrobním procesu fermentovaných mléčných výrobků. Byl zkoumán množství kolonií rodu *Lactobacillus* a *Streptococcus* na počátku fermentace a v jejím průběhu metodou qPCR za účelem optimalizace fermentačního procesu. V závislosti na převládajícím bakteriálním rodu se měnily organoleptické vlastnosti výsledného produktu. Metoda qPCR je tudíž vhodná pro optimalizaci průběhu fermentace a pro získání produktu s požadovanými vlastnostmi. [22]

2.5.3.4 Sekvencování 16S/23S – rRNA 5S

16S rRNA představuje nejčastější cílovou oblast pro fylogenetické analýzy, protože sekvenční data této oblasti mohou být použity pro taxonomickou klasifikaci. PCR produkty jsou snadno amplifikovány pomocí druhově specifických primerů pro 16S/23S – rRNA a gelové elektroforézy.

Metoda umožňuje rychlou identifikaci laktobacilů již do tří hodin po izolaci. Přesné přiřazení laktobacilů na úrovni rodu nebo druhu, je možné s použitím sekvence 16S/23S – rRNA 5S oblasti. Nicméně zatímco sekvencování 16S/23S – rRNA 5S je užitečné pro identifikaci druhů rodu *Lactobacillus*, v každodenní diagnostice je tato metoda příliš časově náročná. I proto je velmi těžké získat spolehlivé výsledky. [14]

2.5.3.5 Polymorfismus konformace jednořetězců

Diagnostická metoda analýzy konformačního polymorfizmu jednořetězců využívá tvorby rozdílné sekvenčně specifické intramolekulární struktury ssDNA nebo ssRNA ovlivňující mobilitu jednořetězců při nedenurovaných elektroforetických podmínkách. [19]

Jednotlivé DNA nebo RNA vlákna mají vysokou afinitu pro vytvoření párů bází. Nicméně pokud DNA nebo RNA řetězec není komplementární, je k dispozici RNA nebo se mohou tvořit vlákna DNA skládaných konformací. To je závislé na kritériích, jako jsou vlastnosti sekvence a teplotní podmínky, umožňující tvorbu různých konformací. Jediná mutace v DNA nebo RNA řetězci způsobuje (ovlivnění pohyblivosti řetězce v gelu). Pokud jsou známy základní kritéria, je jednoduché odlišit fragmenty DNA v teplotě gradientové gelové elektroforézy a identifikovat různé bakteriální komunity.

Metoda se využívá pro potraviny, jako je syrové mléko, tradiční sýry a fermentované výrobky z ryb. Analýza SSCP je vhodná pro sledování změn v krátkých úsecích DNA libovolného původu o velikosti 150 až 400 bp, připravených polymerázovou řetězovou reakcí (PCR – SSCP) Zástupci rodu *Lactobacillus* mohou být identifikovány kombinací sekvenční a SSCP analýzy. [23]

2.5.3.6 Polymorfismus délky jednoduchých repetitivních sekvencí

Jednoduché repetitivní sekvence (SSR) jsou tandemové repetece o délce 2–10 bp přítomné v eukaryotických genomech s četností až 80 kopií. SSR jsou součástí eukaryotních genomů bakteriálních druhů, jsou umístěny jak v kódujících, tak v nekódujících oblastech a poskytují největší počet opakování pro genetickou charakterizaci. Například, plochy velmi bohaté na SSR jsou zastoupené v genomu *L. johnsonii* NCC533. SSR regiony bakterií poskytují vysokou rozlišující sílu pro fylogenetické analýzy. V kombinaci se sekvenční typizací multilokusů (MLST) je SSR technika efektivní, má vysokou sílu rozlišení odlišnou v mezi bakteriálními živočišnými druhy rozdílného původu, úrovně a poddruhu. [24]

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat přehled mikrobiologických analytických metod v mlékárenském průmyslu, které byly využívány v minulosti a které jsou upřednostňovány v současné době. Metody se používají často v kombinaci, díky tomu lze dosáhnout komplexnějších a kvalitnějších výsledků.

Hlavním cílem experimentální části byla izolace bakteriální DNA z mléčného výrobku keřírové mléko – višňové. Takto izolovaná bakteriální DNA byla dále zpracována metodou PCR. Byla prokázána přítomnost bakteriální DNA specifické pro rod *Lactobacillus* a rod *Bifidobacterium*, Výsledky byly porovnány s údaji uvedenými na obale a deklarované výrobcem.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁL A METODY

Pokud není uvedeno jinak, byly níže uvedené postupy a metody převzaty ze skript Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie autorů Špánové a Ritticha. [25]

4.1.1 Bakteriální kmeny

Bakteriální DNA byla poskytnuta vedoucí práce Ing. Štěpánkou Trachtovou, Ph.D. Tato DNA byla izolována ze sbírkových kmenů získaných ze Sbírký mlékařských mikroorganismů v Táboře (Culture Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora (CCDM)) a Kolekce průmyslových organismů v Polsku (Centre of Industrial Microorganisms Collection (LOCK)). DNA byla izolována metodou fenolové extrakce a vyředěna na koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

- *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935
- *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919
- *Bifidobacterium brevis*

4.1.2 Použitý probiotický potravinový výrobek

Kefírové mléko višňové nízkotučné

Výrobce: Mlékárna Valašské Meziříčí, spol. s.r.o

Zámecká 2/57, 757 01 Valašské Meziříčí, ČR

www.mlekarna-valmez.cz

Složení (jedno balení): mléko, ovocná složka 12 % (glukózo-fruktózový sirup, cukr, višňová dřev a višňový koncentrát 25 %, zahušťovadla: modif. kukuřičný škrob, guma tara; barviva: koncentráty červené řepy, ibišku, černé mrkve; aroma, regulátory kyselosti: citrát sodný, kyselina citrónová), mléčné kultury, probiotická kultura ABT (*Lactobacillus acidophilus* $10^6/\text{g}$, *Bifidobacteria* $10^6/\text{g}$, *Streptococcus thermophilus* $10^6/\text{g}$). Obsah tuku: min. 0,8 %.

4.1.3 Přístroje a pomůcky

- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifuga miniSpin plus 14 500 ot·min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Minicentrifuga SPECTRAFUGE MINI
- NanoPhotometer (Implen, München, Německo)
- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, New Jersey, USA)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- MiniInkubator Labnet (Labnet international, Inc., New Jersey, USA)
- Zařízení pro elektroforézu OWL Buffer Puffer™

- Zdroj elektrické napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Transiluminátor TVR – 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermocycler Minicycler™ (BIO-RAD Lab., USA)
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)
- Laboratorní sklo
- Špičky z umělé hmoty
- Další laboratorní pomůcky (lžička, buničina, špachtle...)

4.1.4 Chemikálie

- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno ČR)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Agarosa pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Ethidium bromid (5mg/ml) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- Tris-báze (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Polyethylen glykol (PEG 6000) (FLUKA BioChemika, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Nanášecí pufr Yeallow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)

4.1.5 Roztoky

- Lyzační pufr (10 mM Tris–HCl o pH 7,8; 5 mM EDTA o pH 8,0 a 3 mg/ml lysozymu)
- DNA standard (obsahuje fragmenty DNA o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200 a 1500 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- TE pufr (1 M Tris–HCl; pH 7,8; 0,5 M EDTA; pH 8,0 a destilovaná voda)
- CIZ (směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1)
- 0,5 × TBE pufr (Tris-base, kyselina boritá, destilovaná voda a EDTA)
- Tris-HCl (Tris-báze, destilovaná voda, koncentrovaná HCl, pro úpravu pH)
- Fluorescenční barvivo GoldView (Ecoli, Bratislava, SR)

4.1.6 Komponenty pro PCR

- PPP Master mix (směs DNA-polymerasy, směs dNTP, PCR pufr s Mg^{+} ionty) (Top-Bio, Praha, ČR)
- dNTP (3'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery specifické pro rod *Bifidobacteria* (Pbi F1, Pbi R2)) [26]
- Primery specifické pro rod *Lactobacillus* (R_allact, F_allact) [27]
- Primery specifické pro rod *Bacteria* (F_eub, R_eub) [27]

4.1.7 Magnetické nosiče

Pro izolaci DNA byly použity magnetické nosiče F-kol B 100 ox ($2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) připraveny Ing. Danielem Horákem CSc. na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze. Vlastnosti těchto částic jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Vlastnosti magnetických polymerních nosičů

polymer*	Fe [%hm]	průměr nosiče [μm]	PDI*	Dn*	Dw*	-COOH [$\text{mM}\cdot\text{g}^{-1}$]
PGMA	5,36	0,70	1,16	0,70	0,81	0,67

*PGMA – polyglycidyl methakrylát, PDI – index polydisperzity (poměr hmotnosti a počtu nosičů o průměrné velikosti), Dn – počet částic průměrné velikosti, Dw – hmotnost částic průměrné velikosti

4.1.8 Lyze bakteriálních buněk

Lyzované buňky bakteriální kultury jsou označovány jako hrubý lyzát bakteriálních buněk a jsou použity pro izolaci bakteriální DNA dalšími postupy. Z vybraného mléčného výrobku byl připraven hrubý lyzát, z něhož byla izolována DNA. Postup přípravy hrubého lyzátu buněk je shodný pro bakteriální kultury v tekutém živném médiu i vybraný mléčný výrobek.

- Z tekutého mléčného výrobku bylo odebráno po 1 ml vzorku do dvou 1,5ml Eppendorfových zkumavek a obsah byl důkladně resuspendován ve 2 ml lyzačního pufru s lysozymem.
- 1 ml buněčné kultury byl centrifugován při $10\,000 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 3 minut v 1,5 ml Eppendorfových zkumavkách.
- Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě, občas byly promíchány.
- K suspenzi bylo přidáno 100 μl 10% SDS a 50 μl proteinasy K ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a byla promíchána.
- Vzorky byly inkubovány 1 hodinu v inkubátoru při teplotě $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Vzorky byly uchovány v mrazáku $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, aby nedošlo k degradaci DNA.

4.1.9 Fenolová extrakce bakteriální DNA

- K 500 μl lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu (předestilovaného, pH bylo upraveno na hodnotu 7,8). Směs byla kývavým pohybem opatrně promíchávána 4 minuty.
- Směs byla centrifugována při 14 500 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 5 minut.
- Byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky (nesměla být odebrána proteinová vrstva)
- Vodní fáze s DNA byla doplněna TE pufrem (1 M Tris-HCl; 0,5 M EDTA; pH 8,0) na objem 500 μl a poté bylo přidáno 700 μl směsi chloroform – isoamylalkohol (24:1). Směs byla opatrně kývavým pohybem promíchávána 4 minuty.
- Směs byla centrifugována při 14 500 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 5 minut.
- Horní vodní fáze DNA byla odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky.
- DNA bylo přečištěno srážením ethanolem.

4.1.10 Srážení DNA ethanolem

- Pomocí automatické pipety byl změřen objem vzorku DNA ve zkumavce a celkový objem byl upraven TE pufrem (1 M Tris-HCl; 0,5 M EDTA; pH 8,0) na 400 μl (pokud objem vzorku DNA neměl 400 μl).
- Ke vzorku DNA byla přidána 1/20 objemu 3 M octanu sodného (20 μl). Byl promíchán.
- Byl přidán 1 ml (2,5 násobek objemu) ethanolu (96%) vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Směs byla promíchána.
- DNA byla srážena při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut.
- Směs byla centrifugována při 14 500 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 15 minut (při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Opatrně byl odlit supernatant. Dále bylo pracováno se sedimentem.
- Sediment DNA byl vysušen v exikátoru (asi 15 min).
- DNA bylo rozpuštěno v 200 μl TE pufru a bylo uchováno při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Takto připravená DNA byla použita pro agarózovou gelovou elektroforézu a pro spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.

4.1.11 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z mléčných výrobků pomocí magnetických mikročástic

K izolaci bakteriálních DNA z hrubého lyzátu buněk mléčného výrobku byly použity polyglycidyl methakrylátové magnetické mikročástice P(GMA) s navázanými karboxylovými funkčními skupinami na jejich povrchu (kapitola 4.1.7) . Hrubý lyzát buněk z mléčného výrobku Kefírové mléko - višňové byl připraven dle postupu uvedeného v kapitole 4.1.8. Lyze bakteriálních buněk.

Složení separační směsi a pořadí přidávaných složek pro izolaci DNA magnetickými nosiči je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3: Složení separační směsi:

Krok	Složka	Podíl (μl)
1	NaCl (5 M)	400
2	DNA	100
3	polyethylen glykol 6000 (PEG 6000) (40%)	400
4	Magnetický nosič (2 mg·ml ⁻¹)	100
Celkový objem separační směsi		1 000

- Po smíchání komponent byla směs inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Směs byla na chvíli stočena na minicentrifuze.
- Směs byla umístěna do magnetického separátoru (se zasunutým magnetickým pásem) a magnetické částice byly separovány 5 min při laboratorní teplotě.
- Po uplynutí uvedené doby byl opatrně odebrán supernatant.
- Z magnetického separátoru byl vyjmut magnetický pás, do mikrozkušavek s částicemi bylo přidáno 1 000 μl 70% ethanolu.
- Vzorek byl promíchán, do separátoru byl zasunut magnetický pás a po 2 minutách se ethanol opatrně odebral. Tato operace byla provedena 5-krát.
- DNA adsorbovaná na magnetických částicích byla eluována při laboratorní teplotě do 50 μl TE pufru.
- Druhý den byly magnetické částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát obsahující DNA byl odebrán do čistých Eppendorfových zkumavek.

4.1.12 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA

- Koncentrace a čistota izolované DNA byla měřena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoPhotometer.
- Jako referenční vzorek byl použit TE pufr (1 M Tris-HCl; 0,5 M EDTA; pH 8,0), ve kterém byla eluována izolovaná DNA.
- Byl použit lid 10 (víčko 10), které je optimální pro koncentraci DNA ve vzorku 14-700 ng·μl⁻¹. Bylo naneseno množství 3 μl vzorku, optická dráha byla 1 nm.
- Byla měřena absorbance v rozmezí vlnových délek 220-320 nm proti TE pufru. Byly odečteny hodnoty absorbancí při vlnových délkách 230 nm (minimum absorbance pro DNA), 260 nm (maximum absorbance pro DNA), 280 nm (maximum absorbance pro proteiny a 320 nm).
- Z hodnoty absorbance $A_{260\text{ nm}}$ byla vypočtena koncentrace DNA ve vzorku.
- Z hodnoty $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ byla určena čistota vzorku DNA. Ideální hodnoty by měla být v rozmezí 1,8-2,0

4.1.13 Gelová elektroforéza bakteriální DNA

- Byl připraven 0,8% agarosový gel (0,4 g agarosy na 50 ml 0,5krát koncentrovaný TBE pufr); suspenze byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě, byla ponechána k vychlazení na teplotu asi 60 °C, suspenze byla nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem a byla ponechána půl hodiny tuhnout. Před nanášením vzorků na gel byl hřebínek opatrně vyjmut.
- Na parafilmu bylo smícháno 15 μ l DNA a 3 μ l nanášecího pufru (6- krát koncentrovaný).
- Byly naneseny dva vzorky DNA získané pomocí magnetických nosičů a získané pomocí fenolové extrakce. Dále byla nanesena DNA kmene *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935 připravená jako kontrolní DNA.
- Gel byl vložen do elektroforetické vaničky v takové orientaci, aby záporně nabitá DNA migrovala k anodě. Vanička s gelem byla opatrně převrstvena 0,5 \times TBE pufrum do výšky 5 mm nad gel a byl zapnut zdroj gelové elektroforézy (80 V 1,5 hod).
- Separace byla ukončena v okamžiku, kdy bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufru doputovala do 2/3 délky agarosového gelu.
- Po skončení elektroforézy byl gel obarven ethidium bromidem (0,5 μ g·ml⁻¹) po dobu 20 minut.
- Gel byl opláchnut v destilované vodě a byl umístěn na transluminátor, kde byl vyhodnocen v UV světle při vlnové délce $\lambda = 305$ nm.
- Byla provedena fotografická dokumentace.

4.1.14 Příprava směsi pro PCR

- Všechny komponenty PCR byly před použitím rozmrazeny promíchány a krátce zcentrifugovány.
- Byla připravena směs pro PCR o celkovém objemu 25 μ l
- Pořadí a objemy komponent pro PCR jsou uvedeny v tabulce 4

Tabulka 4: Složení směsi pro PCR

Komponenta	Objem (μ l)
Voda pro PCR	9,5
PPP master mix	12,5
Primer (10 pmol· μ l ⁻¹)	1,0
Primer (10 pmol· μ l ⁻¹)	1,0
DNA matrice	1,0

- Jako DNA matrice byla použita purifikovaná DNA jednotlivých vzorků, zředěná na koncentraci 10 ng· μ l⁻¹. Do reakční směsi byla přidávána jako poslední.
- Negativní kontrola (kontrola kontaminace reakčních komponent) byla připravena smícháním směsi pro PCR a 1 μ l vody pro PCR, která nahradila DNA matrici.

- Jako pozitivní kontrola byla v případě PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* [27] použita DNA izolovaná z typového kmene *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935, v PCR specifické pro rod *Lactobacillus* o kulturu *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919 a pro PCR specifickou pro rod *Bifidobacterium* [26] o kulturu *Bifidobacterium brevis*. Koncentrace DNA byla vždy 10 ng·μl⁻¹.

4.1.15 PCR primery

- Pro přípravu PCR směsi byly použity primery specifické pro doménu *Bacteria* (F_eub, R_eub)[27], pro rod *Lactobacillus* (F_all lact, R_all lact) [27] a pro rod *Bifidobacterium* (Pbi F1, Pbi R2). [26]
- Sekvence primerů specifických pro doménu *Bacteria* jsou uvedeny v Tabulka 55, pro rod *Lactobacillus* v tabulce 6 a pro rod *Bifidobacterium* v tabulce 7.

Tabulka 5: Specifické primery pro doménu *Bacteria* [27]

Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR
F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp
R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	

Tabulka 6: Specifické primery pro rod *Lactobacillus* [27]

Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR
F_alllact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92 bp
R_alllact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT	

Tabulka 7: Specifické primery pro rod *Bifidobacterium* [26]

Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR
Pbi F1	CCG GAA TAG CTC C	914 bp
Pbi R2	GAC CAT GCA CCA CCT GTG AA	

4.1.16 PCR programy

- Byla provedena amplifikace izolované DNA při různých teplotních programech v závislosti na použitých primerech
- Teplotní program pro doménu *Bacteria* je uveden v tabulce 8, pro rod *Lactobacillus* v tabulce 9 a pro rod *Bifidobacteria* v tabulce 10.

Tabulka 8: Teplotní program pro doménu *Bacteria* [27]

1.cyklus (prodloužená denaturace DNA)	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Poslední cyklus (dosyntetizování DNA)
95 °C/5 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
30 cyklů				

Tabulka 9: Teplotní program pro rod *Lactobacillus* [27]

1.cykus (prodloužená denaturace DNA)	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Poslední cyklus (dosyntetizování DNA)
95 °C/5 min	94 °C/30 s	58 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
30 cyklů				

Tabulka 10: Teplotní program pro rod *Bifidobacterium* [26]

1.cykus (prodloužená denaturace DNA)	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Poslední cyklus (dosyntetizování DNA)
94 °C/5 min	94 °C/1 min	50 °C/1 min	72 °C/2 min	72 °C/5 min
30 cyklů				

4.1.17 Gelová elektroforéza produktu PCR

- Byly připraveny gely o různém procentu agarosy dle délky naamplifikované DNA, suspenze byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě, byla ponechána k vychlazení na teplotu asi 60 °C, suspenze byla nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem a byla ponechána půl hodiny tuhnout. Před nanášením vzorků na gel byl hřebínek opatrně vyjmut.
- Byly naneseny dva vzorky DNA získané pomocí magnetických nosičů a dva získané pomocí fenolové extrakce.
- Do jedné z komůrek byl nanesen DNA standard 100 – 1500 bp.
- Gel byl vložen do elektroforetické vaničky v takové orientaci, aby záporně nabitá DNA migrovala k anodě. Vanička s gelem byla opatrně převrstvena TBE pufrem do výšky 5 mm nad gel a byl zapnut zdroj gelové elektroforézy (80 V 1,5 hod).
- Separace byla ukončena v okamžiku, kdy bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufru doputovala do 2/3 délky agarosového gelu.
- Po skončení elektroforézy byl gel obarven ethidium bromidem ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) po dobu 20 minut.
- Gel byl opláchnut v destilované vodě a byl umístěn na transluminátor, kde byl vyhodnocen v UV světle při vlnové délce $\lambda = 305 \text{ nm}$.
- Byla provedena fotografická dokumentace.

4.2 VÝSLEDKY

4.2.1 Izolace bakteriální DNA

4.2.1.1 Pomocí fenolové extrakce z hrubých lyzátů z mléčného výrobku keřirové mléko – višňové

Hrubý lyzát byl připraven z mléčného nápoje Keřirové mléko s příchutí višeň dle postupu uvedeného v kapitole 4.1.8.

Byla provedena izolace DNA z hrubých lyzátů výrobku keřirové mléko – višňové metodou fenolové extrakce podle postupu uvedeného v kapitole 4.1.9.

Přítomnost a relativní intaktnost izolované bakteriální DNA byla ověřena pomocí agarózové gelové elektroforézy DNA a spektrofotometrickým stanovením. Izolovaná DNA byla použita jako DNA matrice do PCR za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a rod *Bifidobacterium*.

4.2.1.2 Pomocí magnetických nosičů z hrubých lyzátů buněk z mléčného výrobku keřirové mléko – višňové

Hrubý lyzát buněk byl připraven z mléčného nápoje Keřirové mléko s příchutí višeň od výrobce Mlékárna Valašské Meziříčí dle postupu uvedeného v kapitole 4.1.8. Bakteriální DNA byla izolována metodou magnetické separace pomocí magnetických mikročástic podle postupu uvedeného v kapitole 4.1.11.

Přítomnost a relativní intaktnost izolované bakteriální DNA byla ověřena pomocí agarózové gelové elektroforézy DNA a spektrofotometrickým stanovením. Izolovaná DNA byla použita jako DNA matrice do PCR za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a rod *Bifidobacterium*. [27]

4.2.2 Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA

Přítomnost bakteriální DNA byla dokázána agarosovou gelovou elektroforézou. Gel lze vidět na obrázku 1. Pro identifikaci UV zářením byl přidán ethidium bromid. DNA izolovaná z kultury *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935 byla nanášena jako pozitivní kontrola do běhu 2. Postup práce je uveden v kapitole 4.1.13.

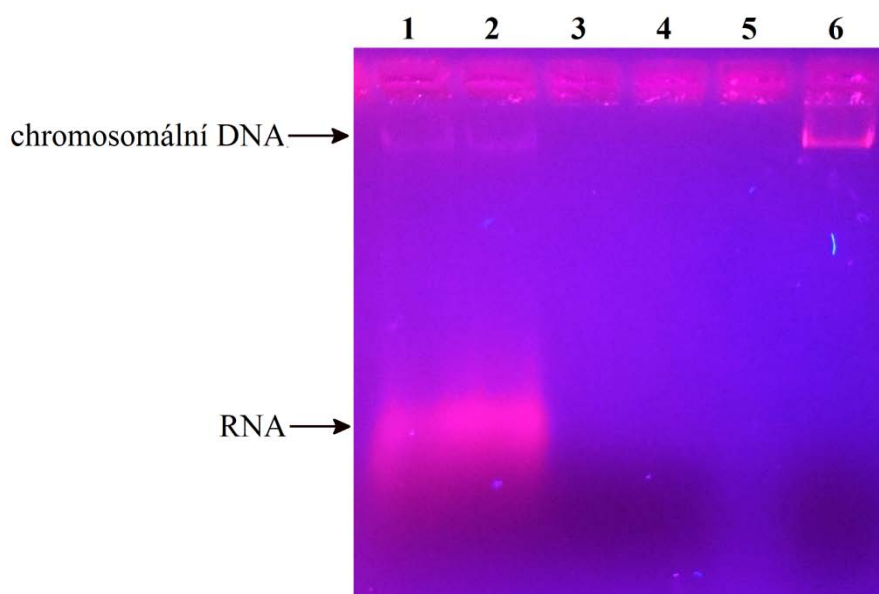


Schéma nanesení: běh č. 1 – DNA izolovaná z výrobku pomocí fenolové extrakce vzorek č. 1, běh č. 2 – DNA izolovaná z výrobku pomocí fenolové extrakce vzorek č. 2, běh č. 3 – DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů vzorek č. 1, běh č. 4 – DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů vzorek č. 2, běh č. 5 – DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů vzorek č. 2, běh č. 6 *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935

Obrázek 1: Agarózová gelová elektroforéza DNA

Z keřirového mléka s příchutí višňová byla uvedenými postupy izolována chromosomální DNA. Ve vzorku DNA byla přítomna RNA.

4.2.3 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

Koncentrace a čistota izolované DNA byla změřena spektrofotometricky. Byla změřena absorbance u vzorku Keřírové mléko – višňové v rozmezí vlnových délek 220–320 nm a stanovena koncentrace a čistota DNA dle postupu uvedeného v kapitole 4.1.11. Výsledky spektrofotometrického stanovení jsou uvedeny v tabulce 11 a v tabulce 12.

Tabulka 11: Spektrofotometrické stanovení bakteriální DNA izolované metodou fenolové extrakce

	$A_{230\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}}$	$A_{280\text{ nm}}$	$A_{320\text{ nm}}$	$A_{260/280\text{ nm}}$	$A_{260/230\text{ nm}}$	Koncentrace [ng·μl ⁻¹]
Vzorek 1	0,433	0,154	0,120	0,013	1,318	0,336	70,5
Vzorek 2	0,331	0,107	0,087	0,010	1,260	0,302	48,5

Tabulka 12: Spektrofotometrické stanovení DNA izolované metodou magnetických nosičů

	A _{230 nm}	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{320 nm}	A _{260/280 nm}	A _{260/230 nm}	Koncentrace [ng·μl ⁻¹]
Vzorek 1	0,057	0,028	0,031	0,008	0,870	0,408	10,0
Vzorek 2	0,212	0,096	0,095	0,037	1,017	0,337	29,5

Podle výsledků v tabulce 11 a tabulce 12 spektrometrického stanovení koncentrace a čistoty lze vidět, že ve vzorcích stanovených pomocí metody fenolové extrakce i magnetických nosičů je velké znečištění bílkovinami podle hodnot A_{260/280 nm}, které by neměly být nižší jak 1,8.

4.2.4 Důkaz přítomnosti bakteriální DNA pomocí PCR

Důkaz přítomnosti bakteriální DNA byl proveden metodou PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* [27]. Postup práce je uveden v kapitole 4.1.15.

Byl amplifikován specifický úsek o délce asi 466 bp (base pair). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA bakteriálního kmene *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935, (10 ng·μl⁻¹). Výsledky PCR jsou uvedeny na obrázku 2.

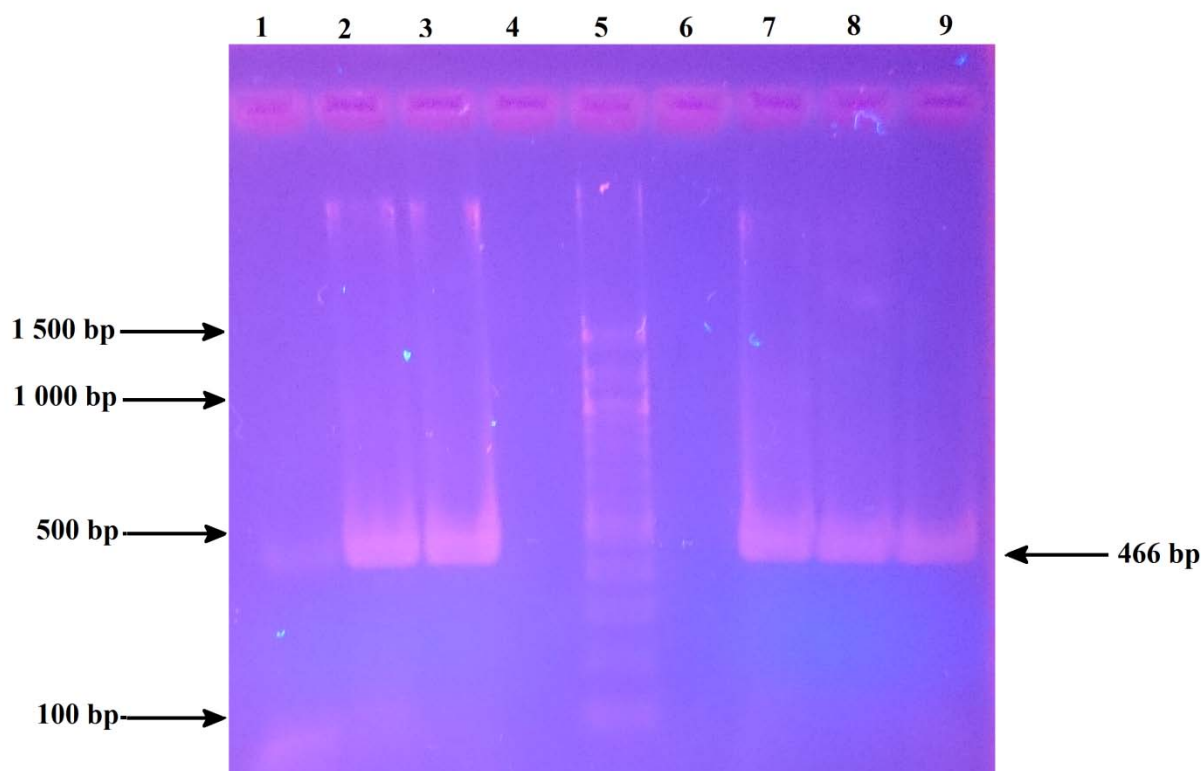


Schéma nanesení: běh č. 1 – negativní kontrola, běh č. 2 – DNA izolovaná z výrobku pomocí fenolové extrakce vzorek č. 1, 3 – DNA izolovaná z výrobku pomocí fenolové extrakce vzorek č. 2, běh č. 5 – DNA standard 100bp – 1500 bp, běh č. 7 – DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů vzorek č. 1, běh č. 8 – DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů vzorek č. 2, běh č. 9 – pozitivní kontrola (*Lactobacillus johnsonii* CCM 2935, 10 ng·μl⁻¹)

Obrázek 2 - Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro doménu Bacteria [27]

4.2.5 Důkaz přítomnosti DNA rodu *Lactobacillus* pomocí PCR

Důkaz přítomnosti bakteriální DNA rodu *Lactobacillus* byl proveden metodou PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* [27]. Postup práce je uveden v kapitole 4.1.16.

Byl amplifikován specifický úsek o délce asi 92 bp (base pair). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA bakteriálního kmene *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919, 10 ng·μl⁻¹. Výsledky PCR jsou uvedeny na obrázku 3

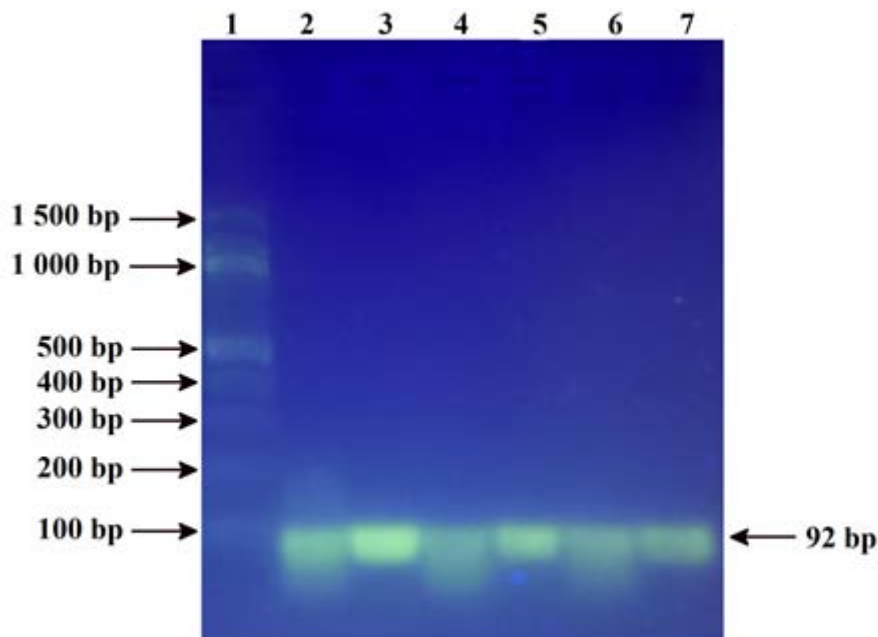


Schéma nanesení: běh č. 1 – DNA standard 100bp – 1500, běh č. 2 – negativní kontrola, běh č.3 – *Lactobacillus paracasei*, LOCK 0919, (10ng·μl⁻¹) běh č. 4 – DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů vzorek č. 1, běh č. 5 – DNA izolovaná z výrobku pomocí fenolové extrakce vzorek č. 1, běh č. 6 – DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů vzorek č. 2, běh č.7 – DNA izolovaná z výrobku pomocí fenolové extrakce vzorek č. 2

Obrázek 3: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus* [27]

Z výsledků na Obrázek 3 lze vidět, že ve všech vzorcích byla prokázána DNA rodu *Lactobacillus*. Běh č. 2 by měl vyjít bez prokázání DNA, jelikož se jedná o negativní kontrolu. Pravděpodobně došlo k znečištění během přípravy PCR směsi.

4.2.6 Důkaz přítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium* pomocí PCR

Důkaz přítomnosti bakteriální DNA rodu *Bifidobacterium* byl proveden metodou PCR s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium*. [26] Postup práce je uveden v kapitole 4.1.17.

Byl amplifikován specifický úsek o délce asi 914 bp (base pair). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA bakteriálního kmene *Bifidobacterium brevis*, (10 ng·μl⁻¹). Výsledky PCR jsou uvedeny na obrázku 4.

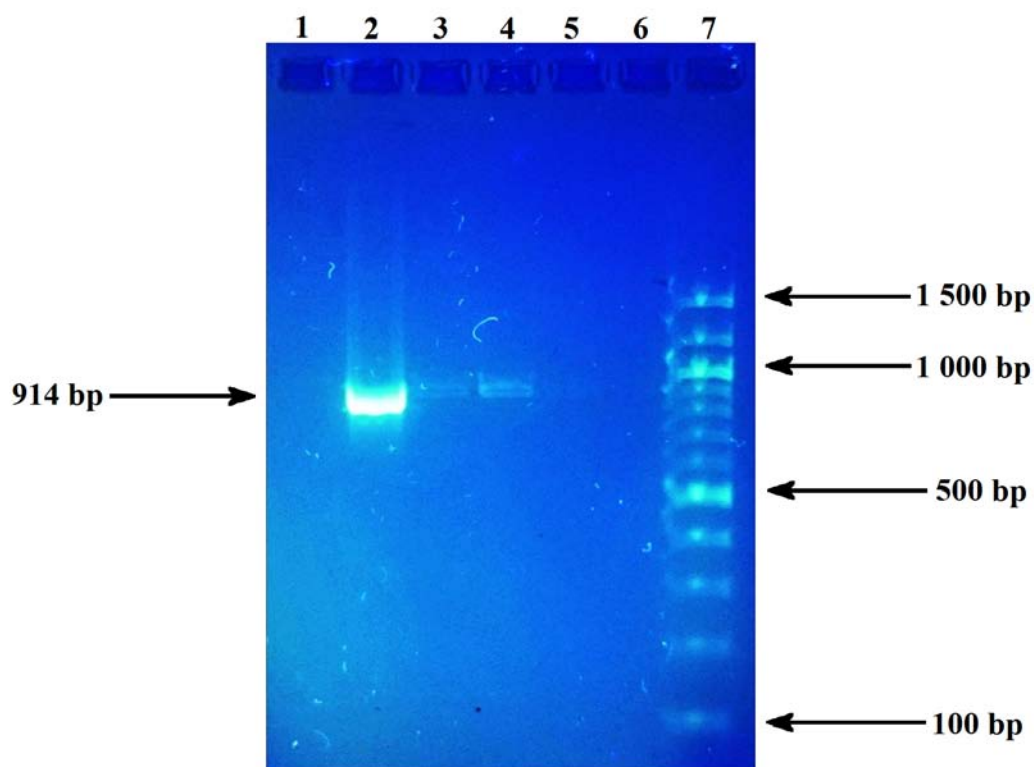


Schéma nanesení: běh č. 1 – negativní kontrola, běh č. 2 – *Bifidobacterium brevis*, ($10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$), běh č. 3 – DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů vzorek č. 2 běh č. 4 – DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů vzorek č. 1, běh č. 5 – DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů vzorek č. 2, běh č. 6 – DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů vzorek č. 1, běh č. 7 – DNA standard 100bp – 1500

Obrázek 4: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro rod *Bifidobacterium* [26]

4.2.7 Shrnutí výsledků

Metodou magnetické separace a fenolové extrakce byla izolována DNA z mléčného produktu keřírové mléko – višňové od výrobce Mlékárna Valašské Meziříčí. Agarózovou gelovou elektroforézou DNA byla potvrzena přítomnost DNA izolované z výrobku keřírové mléko – višně. Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace a ověřena čistota izolované DNA. Koncentrace izolované DNA byla pomocí metody fenolové extrakce přibližně dvojnásobná, než pomocí magnetických nosičů, což mohlo být způsobeno při přečištění ethanolem separační směsí uvedené v Tabulka 3 a následně neopatrným odebráním DNA uchycené na magnetických nosičích. Spektrofotometrické stanovení čistoty DNA po obou metodách (fenolová extrakce, separace magnetickými nosiči) bylo vyhodnoceno jako silné znečištění DNA bílkovinami.

Byla získána DNA v kvalitě a koncentraci vhodné pro provedení PCR. Pomocí PCR za využití primerů specifických pro doménu *Bacteria* [27], rod *Lactobacillus* [27] a rod *Bifidobacterium* [26] byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA ve vybraném vzorku reprezentovaném výrobkem keřírové mléko – višňové.

4.3 DISKUZE

4.3.1 Izolace DNA z čistých bakteriálních kultur

Pro zjištění koncentrace a čistoty bakteriální DNA byla změřena absorbance na NanoPhotometru v rozmezí vlnových délek 230–320 nm. Čistota DNA z fenolové extrakce a z magnetický nosičů byla stanovena z poměru absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$. Tento poměr DNA pro fenolovou extrakci je průměrná hodnota ze dvou vzorků rovna 1,29 a pro magnetické nosiče je průměrná hodnota tohoto poměru DNA rovna 0,94. Hodnota $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,8$ značí silné znečištění DNA bílkovinami. Znečištění mohlo být způsobeno kontaminací přidanými látkami, které jsou přirozeně obsaženy ve výrobku kefírové mléko – višňové nebo byly vzorky špatně přečištěné ethanolem.

4.3.2 Gelová elektroforéza vzorku bakteriální DNA

Intaktnost DNA získané fenolovou extrakcí a následným srážením ethanolem z mléčného výrobku kefírové mléko – višňové byla ověřena gelovou elektroforézou. Vzorek izolované DNA byl nanesen na agarozový gel, na gelu je viditelná chromozomální DNA a RNA. Na gelu není vidět viditelná DNA, která byla izolovaná pomocí magnetických nosičů, zřejmě z důvodu nízké koncentrace. Přítomnost RNA je očekávatelná, protože nebyla v průběhu přípravy hrubých lyzátů buněk či následné extrakce nukleových kyselin nijak odstraňována. Na základě výsledku gelové elektroforézy DNA lze říci, že izolovaná DNA není degradovaná.

4.3.3 Polymerázová řetězová reakce

4.3.3.1 Důkaz přítomnosti bakteriální DNA pro doménu *Bacteria*

DNA z probiotického mléčného výrobku (kefírové mléko – višňové) byla izolována v kvalitě vhodné pro PCR metodou magnetické separace a fenolové extrakce. To bylo ověřeno jejím použitím v PCR jako matrice. Přítomnost bakteriální DNA byla prokázána ve všech vzorcích potravinového výrobku pomocí PCR pro doménu *Bacteria* se specifickými primery PCR (F_eub a R_eub). [27] Po amplifikaci byly agarózovou gelovou elektroforézou na agarózovém gelu detekovány specifické produkty PCR o velikosti 466 bp.

Z výsledků agarózové gelové elektroforézy produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria* bylo zjištěno, že negativní kontrola byla mírně znečištěna, což mohlo nastat během přípravy vzorku. Vzorek izolované DNA má jasně viditelný pás v oblasti pro 466 bp stejně jako pozitivní kontrola DNA kultury *Lactobacillus johnsonii* CCM 2935. To je důkaz že oba vzorky obsahují bakteriální DNA náležící do domény *Bacteria*. Stejnou metodou byla prokázána přítomnost DNA této domény ve vzorku i jinými autory. [27]

4.3.3.2 Důkaz přítomnosti bakteriální DNA rodu *Lactobacillus*

DNA z probiotického mléčného výrobku (kefírové mléko – višňové) byla izolována v kvalitě vhodné pro PCR metodou magnetické separace a fenolové extrakce. To bylo ověřeno jejím použitím v PCR jako matrice. Přítomnost bakteriální DNA byla prokázána ve všech vzorcích potravinového výrobku pomocí PCR pro rod *Lactobacillus* se specifickými primery (F_all lact a R_all lact). [27] Po amplifikaci byly agarózovou gelovou elektroforézou na agarózovém gelu detekovány specifické produkty PCR o velikosti 92 bp.

Z výsledků 2 % agarózové gelové elektroforézy produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* bylo zjištěno, že negativní kontrola byla mírně znečištěna, což mohlo nastat během přípravy vzorku. Vzorek izolované DNA má jasně viditelný pás v oblasti pro 92 bp stejně jako pozitivní kontrola DNA kultury *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919. To je důkaz, že vzorky obsahují bakteriální DNA a náležící do rodu *Lactobacillus*. Podobnou metodou byla prokázána přítomnost DNA rodu *Lactobacillus* ve vzorku i jinými autory. [27]

4.3.3.3 Důkaz přítomnosti bakteriální DNA pro rod *Bifidobacterium*

DNA z probiotického mléčného výrobku (kefírové mléko – višňové) byla izolována v kvalitě vhodné pro PCR metodou magnetické separace a fenolové extrakce. To bylo ověřeno jejím použitím v PCR jako matrice. Přítomnost bakteriální DNA byla prokázána ve vzorcích fenolové extrakce potravinového výrobku pomocí PCR pro rod *Bifidobacterium* se specifickými primery (Pbi_F1 a Pbi_R2), [26] metodou magnetických nosičů se DNA nepodařilo prokázat pravděpodobně kvůli nedokonalému promíchání roztoku vzorku. Po amplifikaci byly agarózovou gelovou elektroforézou na agarózovém gelu detekovány specifické produkty PCR o velikosti 914 bp.

Z výsledků 1,5 % agarózové gelové elektroforézy produktů PCR specifických pro rod *Bifidobacterium* bylo jisté, že negativní kontrola nebyla znečištěna. Vzorky izolované DNA mají jasně viditelné pásy u metody fenolové extrakce v oblasti pro 914 bp stejně jako pozitivní kontrola DNA kultury *Bifidobacterium brevis*. To je důkaz, že vzorky mají bakteriální DNA a náleží pod rod *Bifidobacterium*. Podobnou metodou byla prokázána přítomnost DNA rodu *Bifidobacterium* ve vzorku i jinými autory. [26]

4.4 ZÁVĚR

Teoretická část bakalářské práce se zabývá probiotickými bakteriemi, molekulárním genetickými metodami a jejich využití k identifikaci probiotických bakterií. Z celkového přehledu metod použitých pro analýzu probiotických bakterií v potravinách je zřejmé, že je kladen důraz hlavně na to, aby byly rychlé, levné a měli velmi vysokou citlivost pro rozlišení druhů, kmenů a rodů. V některých případech tyto molekulární genetické metody musí být společně kombinovány, aby se dosáhlo přesných výsledků.

V experimentální části bakalářské práce byla odlišnými metodami izolována DNA z probiotického mléčného výrobku kefirové mléko – višňové. Jednalo se o metodu separace magnetickými nosiči a fenolovou extrakcí. Kvalita a čistota izolované DNA byla prokázána metodami agarósové gelové elektroforézy DNA a spektrofotometricky. Izolovaná DNA byla následně použita jako DNA matrice pro metodu PCR. Analýzou PCR produktů byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA v testovaném výrobku. Oběma uvedenými metodami byla získána DNA v kvalitě i množství vhodném pro PCR. V mléčném výrobku byly prokázány bakteriální kmeny rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, což se shoduje s údaji uvedenými výrobcem.

5 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

MO – mikroorganismy

WHO – Světová zdravotnická organizace

PCR – polymerázová řetězová reakce

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

PEG – polyethylen glykol

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

bp – pár bází (base pair)

RT – PCR – reverzně transkripční PCR

PMA – propidium monoazide

EMA – ethidium monoazide

SSR – jednoduché repetitivní sekvence

RAPD – náhodná amplifikace polymorfní DNA

FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace

MALDI TOF MS – maticová asistovaná laserová desorpční ionizace s detektorem hmotnostní spektrometrie

FTIR – fourierova transformace infračervené spektroskopie

DGGE – denaturační gradientová elektroforéza

SSCP – polymorfismus konformace jednořetězců

SSR – jednoduché repetitivní sekvence

qPCR – kvantitativní polymerázové reakce

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] CHANDAN, R.C. Enhancing market value of milk by adding cultures. *Journal of Dairy Science* [online]. 1999, **82**(10): 2245-2256 [cit. 2015-05-06]. ISSN 00220302. Dostupné také z: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(99\)75472-X/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(99)75472-X/pdf)
- [2] PRASAD, J., GILL, H, SMART, J. a GOPAL, P.K. Selection and Characterisation of Lactobacillus and Bifidobacterium Strains for Use as Probiotics. *International Dairy Journal*. 1998, **8**(12): 993-1002. DOI: 10.1016/S0958-6946(99)00024-2. ISSN 09586946. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694699000242>
- [3] BRONCOVÁ, D. *Historie mlékárenství v Čechách a na Moravě*. Praha: Milpo, 1998, 279 p. ISBN 80-860-9807-9.
- [4] FORMAN, L. a ČURDA, L. *Agris: Význam základních a doplňkových znaků kvality mléka pro jakost mlékárenských výrobků a pro ekonomiku mlékaření* [online]. 2001 [cit. 2015-05-10]. Dostupné také z: <http://www.agris.cz/clanek/108668>
- [5] LIONG, M.T. *Probiotics: biology, genetics, and health aspects*. New York: Springer, c2011, x, 327 p. ISBN 36-422-0838-X.
- [6] SANDERS, M. E. a VELD, J.H.I. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: Microbiological, product, regulatory and labeling issues. In: *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* [online]. 1999, s. 293-315 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1023/A:1002029204834. ISSN 00036072. Dostupné také z: <http://link.springer.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1023/A%3A1002029204834>
- [7] GARDINER, G., STANTON, C., LYNCH, P.B., ROSS, J.K., COLLINS, G., FITZGERALD, R.P, GARDINER, R.P., STANTON, R.P. ROSS, R.P. Evaluation of Cheddar Cheese as a Food Carrier for Delivery of a Probiotic Strain to the Gastrointestinal Tract. *Journal of Dairy Science* [online]. 1999, **82**(7): 1379-1387 [cit. 2015-05-06]. ISSN 00220302. Dostupné také z: <http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302%2899%2975363-4/pdf>
- [8] BELKUM, A.V., WELKER, M., ERHARD, M. a CHATELLIER, S. Biomedical Mass Spectrometry in Today's and Tomorrow's Clinical Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012, **50**(5): 1513-1517. DOI: 10.1128/JCM.00420-12. ISSN 0095-1137. Dostupné také z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00420-12>
- [9] ZABALA, H.A.A a MORALES, P. Protective effect and cytokine production of a Lactobacillus plantarum strain isolated from ewes' milk cheese. *International Dairy Journal* [online]. ELSEVIER SCI LTD, 2004, **14**(1): 29-38 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00146-8. ISSN 09586946. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0958694603001468>

- [10] HIRAYAMA, K. a RAFTER, J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection* [online]. 2000, **2**(6): 681-686 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)00357-9. ISSN 12864579. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S1286457900003579>
- [11] SHAHNAWAZ, K.U. Probiotics in dairy foods: a review. *Nutrition & Food Science* [online]. Emerald Group Publishing Limited, 2014, **44**: 71-88 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1605/01.301-0025655478.2014. Dostupné také z: <http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/1493114748?accountid=17115>
- [12] BOYER, M. a COMBRISSE, J. Analytical opportunities of quantitative polymerase chain reaction in dairy microbiology. *International Dairy Journal*. 2013, **30**(1): 45-52. DOI: 10.1385/1-59259-384-4-3. ISSN 09586946. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694612002622>
- [13] POSTOLLEC, F., FALENTIN H., PAVAN, S., COMBRISSE, J. a SOHIER, D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*. 2011, **28**(5): 848-861. DOI: 10.1016/j.fm.2011.02.008. ISSN 07400020. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002011000505>
- [14] BABOT, J. D., HIDALGO, M., MARTÍNEZ, E.A., APELLA, M.C. a CHAIA, A.P. Fluorescence in situ hybridization for detection of classical propionibacteria with specific 16S rRNA-targeted probes and its application to enumeration in Gruyère cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, **145**(1): 221-228. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.024. ISSN 01681605. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510007142>
- [15] BY MOUSUMI DEBNATH, G. B. *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*. Online-Ausg. Dordrecht: Springer Science Business Media B.V, 2010. ISBN 978-904-8132-614.
- [16] BROLAZO, E. M., LEITE, D.S., TIBA, M.R., VILLARROEL, M., MARCONI, C. a SIMOES, J.A. Correlation between API 50 CH and multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011, **42**(1): 225-232. DOI: 10.1590/S1517-83822011000100028. ISSN 1517-8382. Dostupné také z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext
- [17] DZIUBA, B., BABUCHOWSKI, A., NAŁĘCZ, D. a NIKLEWICZ, M. Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. *International Dairy Journal*. 2007, **17**(3): 183-189. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.02.013. ISSN 09586946. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694606000550>
- [18] DUŠKOVÁ, M., ŠEDO, O., KŠICOVÁ, K., ZDRÁHAL, Z. a KARPÍŠKOVÁ, R. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, **159**(2): 107-114. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029. ISSN 01681605. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160512004254>

- [19] ŠMARDA, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd., 2. dotisk. Brno: Masarykova univerzita, 2010, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [20] RENOUF, V., CLAISSE, O., SERTIER, C.M., a FUNEL, A.L. Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology* [online]. 2006, **23**(2): 136-145 [cit. 2015-01-07]. DOI: 10.1016/j.fm.2005.01.019. ISSN 07400020. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002005000298>
- [21] COCCONCELLI, P.S., PARISI, M.G., SENINI, L. a BOTTAZZI, V. Use of RAPD and 16S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 1997, **25**(1): 8-12 [cit. 2015-01-07]. DOI: 10.1046/j.1472-765X.1997.00061.x. ISSN 0266-8254. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765X.1997.00061.x>
- [22] MILLER, D.M., DUDLEY, E.G. a ROBERTS, R.F. Technical note: Development of a quantitative PCR method for monitoring strain dynamics during yogurt manufacture. *Journal of Dairy Science* [online]. 2012, **95**(9): 4868-4872 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.3168/jds.2012-5445. ISSN 00220302. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030212005012>
- [23] SMALLA, K., SICHLER, M.O., MILLING, A., HEUER, H., BAUMGARTE, S., BECKER, R., NEUBER, G., KROPF, S., ULRICH, A. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results?. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2007, **69**(3): 470-479 [cit. 2015-01-07]. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.02.014. ISSN 01677012. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701207000681>
- [24] ST-PIERRE, B. a WRIGHT, A.D.G. Molecular analysis of methanogenic archaea in the forestomach of the alpaca (*Vicugna pacos*). *BMC Microbiology*. 2012, **12**(1): 1-. DOI: 10.1186/1471-2180-12-1. ISSN 1471-2180. Dostupné také z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/1>
- [25] ŠPANOVÁ, A. a RITTICH, B. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [26] ROY, D. a SIROIS, S. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2000, **191**(1): 17-24 [cit. 2015-04-10]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09313.x. Dostupné také z: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/191/1/17>
- [27] HAARMAN, M. a KNOL, J. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal *Lactobacillus* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, **72**(4): 2359-2365 [cit. 2015-01-07]. DOI: 10.1128/aem.72.4.2359-2365.2006.