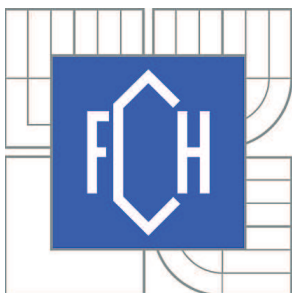


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PROBIOTIKA A JEJICH VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ

PROBIOTICS AND THEIR USE IN FOOD INDUSTRY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

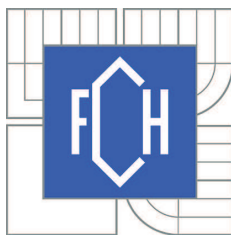
ALEKSANDRA DIADO

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2014



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0846/2013** Akademický rok: **2013/2014**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Aleksandra Diado**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)
Vedoucí práce **doc. RNDr. Alena Španová, CSc.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Probiotika a jejich využití v potravinářství

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Vyhodnoťte získané výsledky

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

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.

Aleksandra Diado
Student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Probiotické bakterie jsou definovány jako živé mikroorganismy, které, pokud jsou konzumované ve stanoveném množství, mají zdraví prospěšné účinky. Většina probiotik patří k bakteriím rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacteria*. Tyto a řada jiných mikroorganismů se v současnosti úspěšně využívají v průmyslu, včetně potravinářského. V potravinářství se probiotika využívají v první řadě v mléčných výrobcích a doplňcích stravy.

Probiotické bakterie, lze stejně jako ostatní mikroorganismy, identifikovat metodou PCR, která umožňuje amplifikovat specifické úseky DNA. Polymerázová řetězová reakce byla provedena po izolaci DNA z bakteriálních kulturních kmenů metodou fenolové extrakce. PCR pro doménu *Bacteria* byla použita pro ověření amplifikovatelnosti DNA a rodově specifická PCR pro důkaz přítomnosti bakterií rodu *Lactobacillus*.

ABSTRACT

Probiotic bacteria are defined as live microorganisms, which when consumed in the determining quantities, have healthy and beneficial effects. Most of probiotics belongs to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. These and other genera of microorganisms are successfully used in industry, including food industry at present. Probiotics are used primarily in dairy products and food additives in food industry.

Probiotic bacteria, like other organisms, can be identified by PCR method that allows amplifying specific regions of DNA. Polymerase chain reaction was performed after DNA isolation from bacterial cultures of three strains using phenol extraction method. PCR specific for the domain *Bacteria* and genus-specific PCR were used for the confirmation of the presence of bacteria of the genus *Lactobacillus*

KLÍČOVÁ SLOVA

Probiotik, izolace DNA, polymerázová řetězová reakce, identifikace, doména *Bacteria*, rod *Lactobacillus*

KEYWORDS

Probiotic, DNA isolation, Polymerase Chain Reaction, identification, domain *Bacteria*, genus *Lactobacillus*

Diado, A. *Probiotika a jejich využití v potravinářství*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 44 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc

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

Chtěla bych upřímně poděkovat doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. Za její čas, trpělivost a cenné rady, které jsem se snažila zohlednit v práci.

OBSAH

ÚVOD.....	8
1 PROBIOTIKA	9
1.1 Historie a definice.....	9
1.2 Mikroorganizmy - probiotika	9
1.2.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	10
1.2.2 Rod <i>Bifidobacterium</i>	11
1.3 Obecná kritéria probiotik.....	11
1.3.1 Bezpečnostní aspekty	11
1.3.2 Funkční aspekty.....	11
1.3.3 Technologické vlastnosti.....	12
1.4 Klinické studie	13
1.5 Prebiotika.....	13
1.6 Symbiotika.....	13
1.7 Probiotické výrobky	14
1.7.1 Potravinářské výrobky.....	14
1.7.2 Léky.....	15
1.7.3 Stanovené normy.....	16
2 METODY IDENTIFIKACE PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ.....	17
2.1 Identifikace probiotických bakterií.....	17
2.2 Polymerázová řetězová reakce	17
2.3 Termocykler	18
2.4 Průběh PCR.....	18

3	CÍL PRÁCE	20
4	EXPERIMENTALNÍ ČÁST	21
4.1	Bakteriální kultury	21
4.2	Přístroje a pomůcky	21
4.3	Chemikálie.....	22
4.3.1	Kultivační media	22
4.3.2	Lyze bakteriálních buněk	22
4.3.3	Fenolová extrakce DNA a sražení DNA ethanolem	22
4.3.4	Komponenty pro agarozovou gelovou elektroforézu.....	22
4.4	Roztoky.....	23
4.4.1	Kultivace mikroorganismů.....	23
4.4.2	Lyze bakteriálních buněk	23
4.4.3	Extrakce DNA	24
4.4.4	Srážení DNA ethanolem.....	24
4.5	Poplymerázová řetězová reakce	24
4.5.1	Komponenty pro PCR	24
4.6	Agarozová gelová elektroforéza	25
4.7	Metody.....	26
4.7.1	Kultivace bakteriálních buněk.....	26
4.7.2	Lyze bakteriálních buněk	26
4.7.3	Fenolová extrakce DNA	27
4.7.4	Srážení DNA ethanolem.....	27
4.7.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	28
4.7.6	PCR pro domenu <i>Bacteria</i> a pro rod <i>Lactobacillus</i>	28
4.7.7	Průběh amplifikace.....	30

4.7.8	Detekce produktů PCR pomocí agarosové gelové elektroforézy.....	30
5	VÝSLEDKY	32
5.1	Kultivace bakterií	32
5.1.1	Růst bakteriálních buněk na pevném mediu	32
5.1.2	Kultivace v tekutém mediu	33
5.2	Izolace DNA fenolovou extrakce	33
5.2	Příprava DNA pro PCR	34
5.3	PCR specifická pro doménu <i>Bacteria</i>	34
5.4	PCR specifická pro rod <i>Lactobacillus</i>	36
6	DISKUZE	38
6.1	Kultivace bakterií	38
6.2	Izolace DNA fenolovou extrakce	38
6.3	PCR specifická pro doménu <i>Bacteria</i>	38
6.4	Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu <i>Lactobacillus</i>	38
7	ZÁVĚR.....	40
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	44

ÚVOD

Zhoršování zdravotního stavu populace nutí lékaře věnovat tomuto problému více pozornosti. I přes rychlý rozvoj farmaceutického průmyslu, který produkuje obrovské množství léčiv, není tendence k narůstajícímu výskytu onemocnění snížena. To je jeden z důvodů zvýšeného zájmu vědců o studium mikroorganismů, žijících v lidském těle, které se podílejí na udržení normálních metabolických procesů člověka.

Úspěchy mikrobiálních výzkumů na přelomu XX - XXI století a vznik nové lékařské vědy - mikrobiální ekologie člověka - přispěla ke vzniku v podstatě nových profylaktických i terapeutických léků - mikroorganismů, známých jako probiotika.

V současné době jsou probiotika používána velmi často. Přijímány mohou být se stravou v nejrůznějších formách. Především jsou součástí řady výrobků a potravin rostlinného původu, které jsou vyrobené biotechnologickým způsobem za použití různých mikroorganismů, včetně tzv. probiotických. Zejména se to týká mléčných výrobků. Dále se jedná o léčivé formy a biologicky aktivní přísady v potravinách.

1 PROBIOTIKA

1.1 Historie a definice

V roce 1908 Ilya Mechnikov, ruský vědec a nositel Nobelovy ceny, předložil teorii, že bakterie mléčného kvašení (BMK) podporují dlouhověkost a vedou ke zlepšení zdraví.

Předpokládal, že v důsledku "střevní auto - intoxikace" vzniklé látky mohou být potlačeny pomocí modifikace střevních bakterií. Navrhl výměnu proteolytických mikrobů (např. *Clostridium*), produkujících toxické látky (včetně fenolu, indolu a amoniaku po trávení proteinů) za jiné mikroorganismy. Mechnikov vyvinul dietu za použití mléka fermentovaného bakteriemi, které pojmenoval "*Bulgarian bacillus*".

Termín "probiotika" byl poprvé zaveden v roce 1965 Lilly a Stillwellem. Slovo pochází z řeckých slov *pro*, což znamená "podpora" a *biotic*, neboli "život." Na rozdíl od antibiotik, probiotika byla definována jako mikrobiální faktory, které stimulují růst jiných mikroorganismů [1].

Podle definice Roye Fullera (1989) jsou probiotika jsou živé mikrobiální doplňky stravy, které prospívají zdraví spotřebitelů tím, že udržují nebo zlepšují jejich střevní mikrobiální rovnováhu [2].

1.2 Mikroorganizmy - probiotika

Probiotika mohou být různé mikroorganismy: bakterie, plísně a kvasinky. Většina je však řazena mezi bakterie.

Bakterie jsou přirození a dominantní obyvatelé (99 %) v trávicím traktu organismu, z čehož vyplývá, že většina v současnosti používaných probiotik patří k prokaryotům. Nejčastěji se jako probiotika využívají bakterie rodu *Bifidobacterium* a bakterie mléčného kvašení (BMK). BMK jsou heterogenní skupinou Gram - pozitivních bakterií, které fermentací produkují kyselinu mléčnou. Zahrnují rody *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* a *Weissella*.

I když výzkum probiotik se zaměřuje zejména na probiotika prokaryotická, vědecký a komerční zájem o eukaryotická probiotika se v posledních letech významně zvýšil a jejich účinnost byla potvrzena v klinických studiích. Z eukaryotických probiotik je pozoruhodný zejména druh *Saccharomyces cerevesiae*, který patří do rodu *Saccharomyces*, a je nejčastěji používaným probiotikem [3]. Srovnání prokaryotických a eukaryotických probiotik je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1. Porovnání charakteristik eukaryotických a prokaryotických probiotik [3]

Vlastnost	Prokaryota (bakteria)	Eukaryota (plíseň)
Velikost	0,5 – 5 μm	10 x 5 μm
Složení buněčné steny	Peptidoglykan, lipotejchoová kyselina, lipopolysacharidy	Chitin, glukán, manosa, fosfolipomanan
Optimální podmínky růstu:		
pH	6,5 - 7,5	4,5 - 6,5
Teplota	10 - 80 °C	20 - 30 °C
Tolerance k žaludečné šťávě	Ano	Ano
Tolerance k solím žlučových kyselin	Ano	Ano
Rezistence vůči antibiotikům	Ne	Ano
Schopnost přenosu genetického materiálu	Ano	Ne
Přítomnost v střevní mikrobiote	99 %	1 %
Schopnost kolonizovat střevo	Vysoká	Nízká-Střední

1.2.1 Rod *Lactobacillus*

S více než 100 druhy a poddruhy, rod *Lactobacillus* představuje největší skupinu v čeledi *Lactobacillaceae*. Řada kmenů rodu *Lactobacillus* se využívá jako probiotika: *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. bulgaricum*.

Členové rodu jsou tyčinkovité bakterie často spojené do řetězců. Jsou aerobní, ale dobře rostou i za anaerobních podmínek [3].

V buněčné stěně laktobacilů nachází se peptidoglykanu a teichoová kyselina, ovlivňující imunitní systém prostřednictvím stimulace migrace monocytů a aktivace fagocytární aktivity (citace). Existují dvě skupiny druhů v závislosti na jejich schopnosti zkvašovat cukry: homofermentativní druhy, převádí cukry většinou na kyselinu mléčnou a heterofermentativní druhy, které převádí cukry na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou, etanol a oxid uhličitý. Výsledkem je, že

Lactobacillus inhibují růst a násobení mikroorganismu pocházející z vnějšího prostředí blokováním buněčných receptorů sliznice vůči adhezím patogenních bakterií.

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou přirození obyvatelé střevního traktu lidí a jiných živočichů a hlavními zástupci mikroflóry porodních cest [4].

1.2.2 Rod *Bifidobacterium*

Zástupce rodu *Bifidobacterium* jsou Gram - pozitivní bakterie s vysokým zastoupením G + C v DNA, které patří do aktinobakterií. Jejich buňky jsou tyčinkovité a jsou často uspořádané do větviček se vlákny [3]. Mají bohatý metabolismus: produkují extracelulární enzymy, rozkládají mnohé polymery. Jsou obvykle anaerobní a heterotrofní. *Bifidobakterie* jsou dominantní obyvatelé trávicího traktu savců, ptáků a některých studenokrevných zvířat. *Bifidobakterie* jsou často používány jako probiotické složky v řadě funkčních potravin. Mezi nimi jsou kmeny: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. adolescentis*. Účinek bifido-obsahujících přípravků se vysvětluje produkcí různých látek (kyselina octová, kyselina mléčná) v procesu metabolismu zástupců rodu *Bifidobacterie*, a také schopnost mikroorganismů modulovat různé části imunitního systému: zvýšení produkce g-interferonu, syntéza imunoglobulinů apod. [4].

1.3 Obecná kritéria probiotik

Aby organismus mohl být uznán, jako probiotikum musí splňovat několik kritérií:

1. Bezpečnost
2. Funkční vlastnosti
3. Technologické vlastnosti

1.3.1 Bezpečnostní aspekty

Bezpečnostní aspekty zahrnují jejich původ: gastrointestinální trakt (GI- trakt) zdravého člověka, nepatogenitu a nesmí být rezistentní k antibiotikům [2].

1.3.2 Funkční aspekty

Funkční aspekty zahrnují například: životaschopnost v GI-traktu, imunomodulace, antagonistické a antimutagení vlastnosti. Funkční požadavky probiotik bývají stanovené s použitím metod *in vitro*.

Při výběru vhodného probiotika je třeba zvážit několik funkčních aspektů např.:

1. Tolerance k nízkému pH tj. tolerance k prostředí lidského žaludku (žaludeční šťávy)
2. Tolerance k prostředí žluči (důležitá vlastnost pro přežití v tenkém střevě)
3. Adsorpce buněk na epiteliálním povrchu a přežívání v lidském GI - traktu
4. Imunostimulace, ale ne protizánětlivé účinky
5. Antagonistický účinek proti patogenům včetně patogenů potravinářského řetězce (jako je *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* a *Clostridium difficile*) [2].

Probiotické bakterie vyvíjejí svou činnost na třech úrovních. Na první úrovni (interakce mikrob - mikrob) probiotické bakterie inhibují životaschopnost patogenních a potenciálně patogenních kmenů v důsledku konkurence o živiny a také díky schopnosti produkovat "bakteriociny" a další substráty (cytokiny, mléčná kyselina, máselná kyselina) s antimikrobiální aktivitou. Na druhé úrovni (interakce mikrob - epitel trávicího traktu), kdy probiotické bakterie zabraňují adhezi nebo vytlačují z adhezních receptorů patogenní a potenciálně patogenní mikroflóru. To brání translokaci střevních bakterií do vnitřního prostředí hostitele, čímž se zlepšuje bariérová funkce střevního epitelu. Velmi důležitý mechanismus účinku probiotik (třetí úroveň mikrobiální interakce mikrob - imunitní systém) se podílí na aktivaci lokálních a systémových ochranných imunitních reakcí, jakož i na vytvoření imunologické tolerance mikroorganismu [5].

Pokusy s různými probiotickými kmeny ukázaly, že probiotické kmeny obvykle zmizí z gastrointestinálního traktu během několika týdnů po požití a lze předpokládat, že jejich pozitivní účinek je přerušen. Nicméně, pravidelné používání může zvýšit šance probiotika na prospěšný účinek v GI - traktu [4].

1.3.3 Technologické vlastnosti

Pečlivé vyšetření probiotických kmenů na jejich technologické vhodnosti může také umožnit výběr kmenů s nejlepšími výrobními a technologickými vlastnostmi. Nicméně, bakterie s výjimečnými, funkčními a zdraví prospěšnými vlastnostmi, musí být často vyloučeny kvůli technologickým omezením. Nové technologie však postupně umožňují i rozšíření sortimentu výrobků, do kterých probiotika lze aplikovat a v nichž lze umožnit využití nových účinných kmenů [4].

Životaschopnost probiotik byl marketingovým a technologickým problémem pro mnoho průmyslových výrobců. Probiotické potraviny by měly obsahovat specifické probiotické kmeny s vhodnými funkčními vlastnostmi v průběhu celé doby jejich trvanlivosti. Řadu technologických aspektů je třeba vzít v úvahu při výběru probiotik např.:

1. Zachování dobrých sensorických vlastností výrobku
2. Rezistence k bakteriofágům
3. Životaschopnost v průběhu zpracování
4. Stabilita během výroby a skladování

1.4 Klinické studie

Jak už bylo uvedeno, stanovení funkčních vlastností probiotik se provádí za použití metody *in vitro* a výsledky těchto studií by se měly odrazit v kontrolovaných studiích provedených u člověka. V různých klinických studiích byly zjištěny blahodárné účinky probiotik, např.:

1. Modulace střevní mikroflóry
2. Modulace imunitní odpovědi
3. Snížení fekální enzymové aktivity
4. Zvýšení fekálního obsahu mastných kyselin
5. Zmírnění symptomů atopické dermatitidy u dětí
6. Prevenci nebo léčba různých průjmových onemocnění

Je známo, že nejsilnější důkaz efektivity probiotik souvisí s jejich použitím pro zlepšení funkčnosti střev a také pro stimulaci imunitního systému [2].

1.5 Prebiotika

Prebiotika byly poprvé definovány jako nestravitelné složky potravy, které příznivě ovlivňují stav hostitele selektivní stimulací růstu a aktivity omezeného počtu bakterií v tlustém střevě. Podle výzkumů prebiotika zvyšují počet užitečných anaerobní bakterií (např. *Bifidobakterií*) a snižují populaci potenciálně patogenních mikroorganismů [6].

Běžně známá prebiotika: oligofruktóza, inulin, galaktooligosacharidy, laktulosa. Prebiotika jsou ve významném množství obsažena v takových potravinách rostlinného původu, jako jsou cibule, pórek, česnek, zrnka ječmene a pšenice, banány [1].

1.6 Symbiotika

Symbiotika jsou složky, které obsahují jak probiotika, tak prebiotika. Termín symbiotika je vyhrazen pro produkty, u nichž prebiotická složka selektivně zvýhodňuje aktivitu probiotik [7].

1.7 Probiotické výrobky

V dnešní době užívání probiotik jako doplňků stravy, představuje jen malou část jejich celkové spotřeby, zatímco většina probiotických výrobků se nakupuje v běžných obchodech s potravinami. Je zřejmé, že rozsah použití probiotik je velmi široký. Využití probiotik dále našlo uplatnění v kosmetologii, farmaceutickém průmyslu, spotřební chemii, farmářství [8]. Příklady využití probiotik v průmyslu jsou uvedené v Tabulce 2.

Tabulka 2. Využití probiotik v různých oblastech průmyslu [8]

Oblast využití	Výrobky
Potravinářství	Přirozeně fermentované výrobky, sýr, fermentované mléko, jogurt, máslo, kumys, kefir, chleb, sušenky, káva, čokoláda, med, zmrzlina, džus, muffiny, sójové mléko, doplňky stravy
Farmaceutický průmysl	Registrované farmaceutické výrobky, tabletky, prášky, kapsuly, vaginální čípky
Kosmetologie a hygiena	Anti-age sérum, pleťová voda na obličej a tělo, hydratační krém, zubní pasta, tampony, šampon, sprchový gel
Spotřební chemie	Čistící prostředky na podlahu, průmyslové čištění odpadních vod
Zemědělství	Výrobky určené pro péči o ryby, doplňky krmiv hospodářských zvířat

1.7.1 Potravinářské výrobky

První návrh využívání probiotik v potravinách předložil W.Henneberg. Henneberg použil střevní bakterie *Lactobacillus acidophilus* na výrobu jogurtu, kterému říkal Acidophilus-Milch na začátku roku 1980. Když tento typ produktu kvašení nakonec získal úspěch v Německu a v některých dalších západoevropských zemích, jeho zdravotní aspekty se staly daleko méně důležité, než možnost produkovat nové, mírně kyselé, fermentované výrobky [9]. Dnes je spotřeba potravin a doplňků, obsahujících probiotika, především řízena "měkkými", zdraví prospěšnými účinky a podporou imunity, než léčbou příznaků onemocnění [8].

Kmeny rodu *Lactobacillus* jsou obvykle používány do fermentovaných mlék, sýrů, zmrzliny, potravinových doplňků a másla [10]. Jsou tedy obecně považovány za bezpečné (generally regarded as safe - GRAS) v souladu s Americkým federálním Úřadem pro kontrolu léků a potravin (Food and Drug Administration) a splňují kritéria kvalifikované presumpce bezpečnosti (Qualified Presumption of Safety), v souladu s Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority). Kmeny *Lactobacillus* jsou uváděny na trh jako podporující zdraví spotřebitele. Jejich bezpečnostní status, enzymatická aktivita a schopnost přežít průchod trávicím traktem (GIT) jsou podmínkami k zařazení mezi probiotika [2].

V potravinářských výrobcích probiotického typu jsou používány zejména mikroorganismy rodu *Lactobacillus*, rodu *Bifidobacterium* a kmenu *Streptococcus thermophilus*, a v poslední době také *Bacillus*.

Jogurt je prioritním probiotickým produktem. Vyrábí se fermentací mléka dvou startovacích kultur *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. Obohatit ho lze o bakterie rodu *Bifidobacterium* [11].

Kumys je produktem mléčného kvašení cukru pomocí bakterií druhu *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, a etanolového kvašení pomocí kvasinek druhu *Candida utilis* [12].

Příklady některých kmenů probiotických bakterií využívaných v potravinářském průmyslu jsou uvedeny v Tabulce 3 [1].

Tabulka 3. Bakteriální kmeny používané jako probiotika pro lidskou výživu, názvy výrobků a výrobce [1]

Kmen	Výrobek	Výrobce
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Activia (jogurt)	Danone
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru™ Bifido (řada potravinových doplňků)	Danisco
<i>Enterococcus</i> LAB SF 68	Bioflorin (kapsle)	Cerbios-Pharma
<i>L. acidophilus</i> La-1 <i>L. johnsonii</i> Lj-1	LC1 (řada mléčných výrobků)	Nestlé

1.7.2 Léky

Různé druhy a kmeny rodu *Lactobacillus* jsou široce používány v léčivech, včetně léčiv pro léčbu dysbakterioz zapříčiněných různou etiologií, jako jsou ústní onemocnění, urogenitální, gastrointestinální poruchy. Velkou výhodou léčby pomocí probiotik je fakt, že probiotika nemají žádné významné vedlejší účinky [5]. Níže, v Tabulce 4 jsou uvedeny příklady léků a potravinových doplňků, které obsahují různé probiotické kmeny rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

Tabulka 4. Vybrané výrobky (léky a doplňky stravy) obsahující probiotické kmeny rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, včetně jejich použití

Název kměňů	Výrobek (lék)	Účinky výrobků (léků)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , kměny NK1, NK2, NK5 a NK12	Acipol	Pro prevence a léčbu disbacteriozy gastrointestinálního traktu [13]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 12	Biobakton	Léčba disbakteriozy a chronických onemocnění trávicího traktu [14]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	Biform Complex (biologicky aktivný doplněk)	Normalizace rovnovahy střevní mikroflóry odstraňení projevů gastrointestinálních poruch [15]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i>	Linex	Léčba a prevence dysbacteriozy [14]
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Bifiliz suchý	Léčba střevních infekcí [14]

1.7.3 Stanovené normy

Dalším důležitým faktorem, vedle koncentrace probiotik v potravě, je jejich denní spotřeba. Prokazaná norma pro terapeutický efekt je $\geq 10^6$ KTJ/ml. Norma se může lišit v závislosti na použitých kmenech [16]. Stanovené normy jsou uvedeny v Tabulce 5 [1].

Tabulka 5. Normy koncentrace různých kmenů probiotických bakterií [1]

Biologicky aktivní složky potravy	Doporučovaná úroveň spotřeby KTJ/g	Maximálně doporučovaná úroveň spotřeby KTJ/g
Bakterie rodu <i>Bifidobacterium</i> , včetně <i>B. infantis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. adolescentis</i>	10^8	10^{10}
Bakterie rodu <i>Lactobacillus</i> , včetně <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermenti</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG	10^{10}	10^{11}
Bakterie rodu <i>Enterococcus faecium</i>	10^8	2×10^{10}

2 METODY IDENTIFIKACE PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ

2.1 Identifikace probiotických bakterií

Účinný probiotický výrobek vyžaduje řádnou identifikaci. Vedle kultivačních postupů průkazu (identifikace) probiotických bakterií lze použít i postupy založené na analýze DNA. Existuje více metod pro detekci DNA požadovaného organismu, ale nejvíce využití našla metoda polymerázové řetězové reakce (PCR).

2.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda „*in vitro*“, používaná pro amplifikaci určitého úseku DNA. Od zavedení v roce 1983 americkým biochemikem Kary B. Mullisem (obdržel Nobelovou cenu za chemii v roce 1993), se metoda stala významným nástrojem pro detekci sekvence nukleových kyselin. PCR je nezbytná pro celou řadu analýz, provedených v základním anebo aplikovaném výzkumu a v praxi. Příkladem využití PCR je monitorování terapie rakoviny při detekci genetických změn v rakovinných buňkách v průběhu léčení. PCR se také používá na typizaci nádorů a identifikaci onkogenu v onkologii, detekci bakteriálních a virových infekcí, v prenatální diagnostice (stanovení pohlaví u prenatálních buněk), archeologii a kriminalistice [17]. Lze ji účinně použít i při detekci probiotických bakterií.

Složky směsi

Reakční směs (obvykle v rozmezí 25-30 μ l) se skládá z následujících komponent [18]:

PCR reakční pufr zajišťuje prostředí s vhodným pH a iontovou silou pro optimální DNA polymerázovou aktivitu. Vzhledem k požadavkům různých DNA polymeráz jsou reakční pufrы obvykle dodávány s DNA polymerázou. Mnohé reakční pufrы, které jsou dodávány spolu s DNA polymerázou obsahující chlorid hořečnatý ($MgCl_2$). Takový reakční pufr se nazývá kompletní [19].

Ionty Mg^{2+} jsou nezbytné jako kofaktor pro termostabilitu DNA polymerázy. Za nepřítomnosti dostatečného množství volného hořčíku bude DNA polymerázy neaktivní. Naopak, v případě příliš velké koncentrace hořčíku se přesnost DNA polymerázy sníží a může dojít k nespecifické amplifikaci [19]. Obvykle se používá koncentrace Mg^{2+} 1,5 mM. Koncentrace Mg^{2+} musí být optimalizovaná pro každou kombinaci primeru a DNA-templátu [18].

Voda pro doplnění směsi PCR do požadovaného objemu musí být bez specifických iontů, organických látek a bakterií. Pro PCR musí být použita vysoce kvalitní laboratorní čištěná voda (destilovaná) [19].

2'-deoxynukleosid -5'-trifosfaty (dNTP) - (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) - stavební jednotky pro syntézu nové DNA. Optimální koncentrace je 200 μ M. Vysoké koncentrace dNTP (od 4 mM a výše) působí inhibičně, protože vyvazují hořečnaté ionty.

DNA - polymeráza musí být termostabilní, aby zůstala funkční za vysokých teplot. To je základem pro přesnou specifčnost výsledných produktů. Nejčastěji se používá *Taq* DNA

polymeráza (katalytická aktivita 75 °C – 80 °C), vysoce termostabilní DNA polymeráza z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* [18].

Primery jsou syntetické oligonukleotidy a pro standardní PCR musí splňovat následující požadavky:

- Délka 18-25 nukleotidů
- Obsah G+C 40 - 60%
- Rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry
- Teplota tání primerů aspoň 50 °C, podobná u obou primerů
- Specifičnost primerů – na matricové DNA nesmí být nesespecifická vazebná místa
- Absence komplementárních sekvencí v primerech
- Absence vnitřních sekundárních struktur (vlásenek)
- Zařazení 1. a 2. zbytku G nebo C v sekvenci na 3'- koncích primeru pro zajištění přesné vazby na matrice [17]

DNA templát (matrice) je makromolekula, podle které se komplementárně syntetizují nové řetězce DNA. Jako zdroj lze použít purifikovanou DNA nebo je často používána DNA obsažená v různých biologických materiálech jako jsou např. hrubé lyzáty extraktů z krve, tělní tekutiny, buňky tkáňových kultur a kultury mikroorganismů [17].

2.3 Termocykler

PCR probíhá v přístroji označovaném jako termocykler. Termocykler je naprogramován tak, aby v jednotlivých teplotních krocích byly automaticky dodržovány tepelné podmínky pro a) denuraci DNA, b) připojení primeru, c) tvorbu komplementárních vláken DNA [17].

2.4 Průběh PCR

Každý cyklus PCR se skládá ze tří kroků. Třístupňový proces zahrnuje:

- Denuraci dvouřetězové molekuly DNA matrice (94 °C)
- Připojení primerů k odděleným řetězcům DNA- hybridizace (50 - 65 °C)
- Syntéza nových řetězců DNA katalyzovaná DNA – polymerázou (67-75 °C)

Postupným opakováním těchto tří kroků (cyklu) se exponenciálně syntetizuje až 10^9 kopií úseku DNA ohraničeného primery. Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci DNA matrice a obvykle se pohybuje v rozmezí od 25 - 35 cyklů [18].

Denurace dvojvláknové chromozomální DNA probíhá při optimální teplotě 94 °C.

Hybridizace (annealing) probíhá za teploty 67 - 75 °C. Požadovaný úsek, který je třeba amplifikovat, se identifikuje pomocí primerů. Primery svojí polohou vymezují amplifikovaný úsek na molekule DNA, přičemž první (+ orientace) se váže na jedno vlákno DNA, druhý (-

orientace) se váže na vlákno komplementárně v denaturované DNA.

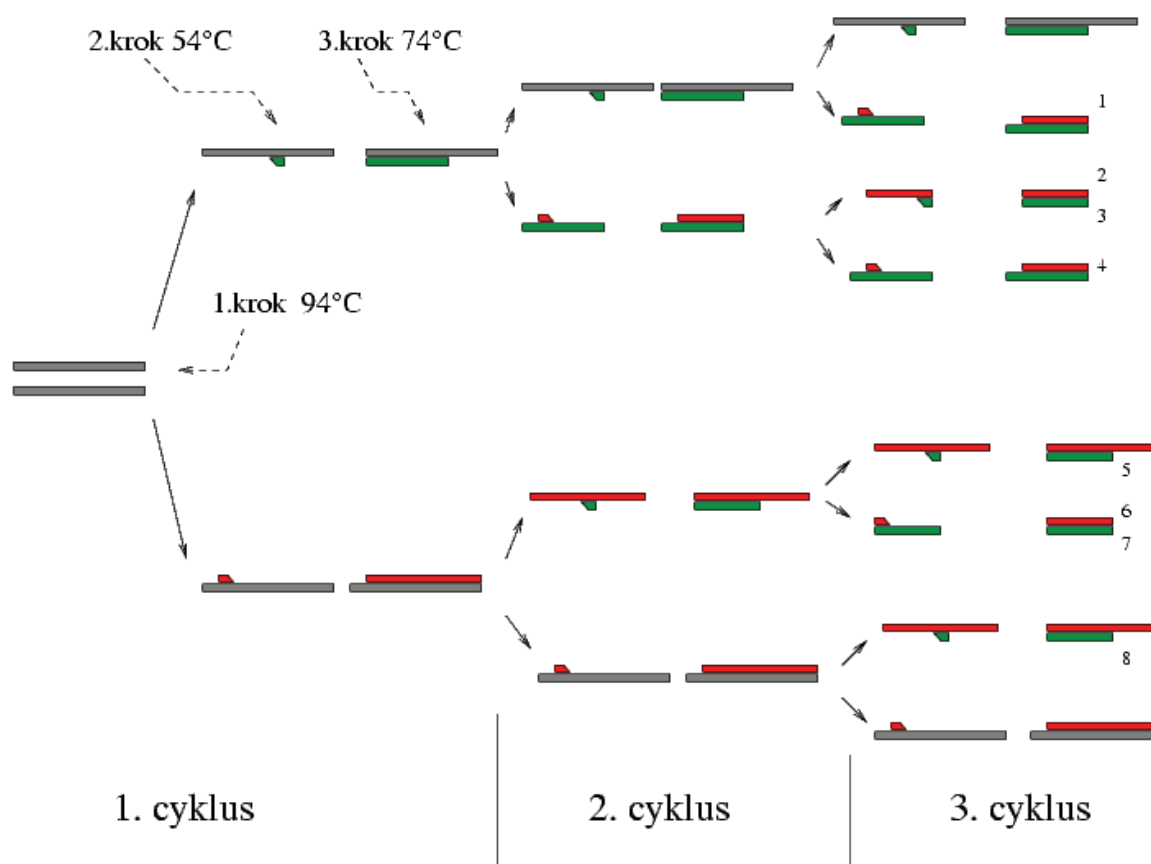
Termostabilní DNA polymeráza prodlužuje primery a syntetizuje nová vlákna DNA při teplotě 67 - 75 °C.

V jednom cyklu (t.j.v třech vyšše uvedených krocích) se počet molekul DNA zdvojnásobí. V každém následujícím cyklu slouží původní templát a podle něho syntetizované kopie jako předlohy pro vznik dalších produktů reakci, které se množí geometrickom řadou. Výsledkem je amplifikace původního počtu kopií cílového úseku DNA 2^n (kde n - počet cyklů).

Výsledný produkt PCR (amplifikovaný úsek DNA) lze analyzovat stanovením velikosti ampliconu gelovou elektroforézou, případně dalšími způsoby [20].

Denaturace, hybridizace (annealing) a polymerizace - syntéza nových vláken jsou znázorněny na Obrázku 1.

Obrázek 1. Namnožení DNA pomocí PCR [21]



3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo seznámení se s pojmem “probiotika”, stručný popis jeho využití v průmyslu a metody jeho identifikace. Cílem experimentální části byla izolace DNA z probiotických kmenů *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 900, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 908 a *Lactobacillus casei* LOCK 919 a ověření jejich zařazení do rodu *Lactobacillus* pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR). Celkem práce zahrnuje následující úlohy:

1. Kultivace buněk v tekutém a pevném mediu
2. Fenolová extrakce a purifikace bakteriální DNA
3. Příprava směsí pro PCR a amplifikace DNA
4. Provedení horizontální gelové elektroforézy za účelem průkazu specifického PCR produktu

4 EXPERIMENTALNÍ ČÁST

4.1 Bakteriální kultury

Práce byla provedena s kmeny *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 900, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 908 a *Lactobacillus casei* LOCK 919. Kultury narostlé v MRS mediu byly získány od doc. RNDr. Aleny Španové, CSc. (VUT v Brně, Fakulta chemická)

4.2 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Německo)
- Digitální fotoaparát Demage Z5 (Konica Minolta, USA)
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10, 20, 200 a 1000 µl (PZ HTL, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 5020 (SENCOR, ČR)
- Laboratorní váhy B0430 (Ohaus, USA)
- NanoPhotometerTM (Implen, Německo)
- Minicycler PTC-100TM (MJ Research, USA)
- Termocykler PTC-200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Mini gel unit 7x10 cm (Hoefer, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Lighting Volt Power Supply, model OSP 300 (Owl Scientific, USA)
- Běžné laboratorní sklo, umělohmotný materiál a běžné laboratorní pomůcky
- Kahan
- Bakteriologická klička
- Stojánek na zkumavky
- Petriho misky

4.3 Chemikálie

4.3.1 Kultivační media

- MRS medium (Oxoid, Velká Británie)
- MRS agar (Oxoid, Velká Británie)
- Destilovaná voda

4.3.2 Lyze bakteriálních buněk

- EDTA (Serva, SRN)
- Hydroxid sodný (Pliva - Lachema, ČR)
- Lysozym (Reanal, Maďarsko)
- Proteináza K (Sigma, USA)
- SDS (Sigma, USA)
- Tris - base (Amresco, USA)

4.3.3 Fenolová extrakce DNA a sražení DNA ethanolem

- Fenol (Lachema, ČR)
- Chloroform (Lachema, ČR)
- Izoamylkohol (Lachema, ČR)
- Octan sodný (Lachema, ČR)
- Hydroxid sodný (Lachema, ČR)
- Ethanol (Lachema, ČR)

4.3.4 Komponenty pro agarozovou gelovou elektroforézu

- TBE pufr
- Agarosa (Top - Bio, ČR)
- Ethidium bromid (Sigma, USA)
- DNA standard (100 bp žebříček) (Malamite, ČR)

- Nanášecí pufr (Top - Bio, ČR)

4.4 Roztoky

4.4.1 Kultivace mikroorganismů

- **MRS medium**

Bylo odváženo 52 g MRS media a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Medium bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 20 minut. Hotové medium bylo rozlito do zkumavek.

- **MRS agar**

Bylo naváženo 15 g agaru a rozpuštěno v 1000 ml MRS media. Medium bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 20 minut. Připravené medium bylo poté sterilně nalito do Petriho misek a ponecháno zatuhnout.

4.4.2 Lyze bakteriálních buněk

- **Roztok proteinázy K (10 mg/ml)**

10 mg proteinázy K bylo rozpuštěno v 1 ml sterilní destilované vody. Před prací bylo nutné zředit roztok do hodnoty koncentrace 100 µg/ml.

- **Roztok 20% SDS**

Navážka 20 g SDS byla rozpuštěna za tepla (zahřeje se asi na teplotu 68 °C) v 80 ml destilované vody. Výsledný roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml. Při přípravě 20% SDS nutné používat rukavice.

- **Lyzační pufr I**

- 1M Tris-HCl (pH 7,8; 8)

V 800 ml destilované vody bylo rozpuštěno 121,1 g Tris-baze a výsledný roztok byl upraven na pH 7,8 koncentrovanou HCl. Poté roztok byl doplněn na objem 1000 ml destilovanou vodou a sterilizován se 20 min při 121 °C.

- 0,5 M EDTA (pH 8)

V 800 ml destilované vody bylo rozpuštěno 186,1 g EDTA. Do výsledného roztoku bylo přidáno NaOH pro úpravu pH (přidá se 15 g, zbytek asi 5 g se pak byl přidán po malých množstvích do dosažení hodnoty pH 8 potřebné pro rozpouštění). Rozpouštění probíhalo za stálého míchání na

magnetické míchače. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem asi 1 litr a sterilizován 20 min při 121 °C.

Na přípravu byli použity složky popsané výše (zásobní roztoky 1 M Tris-HCl (pH 7,8; 8), 0,5 M EDTA (pH 8)) v následujících objemech – 10 ml Tris – HCl (0,1 M) a 1 ml EDTA (0,5 M).

- **Lyzační pufr II (pufr s lysozymem)**

- Do lyzačního pufru I byl přidán lysozym na výslednou koncentraci 3 mg/ml.

4.4.3 Extrakce DNA

- **Fenol**

Destilovaný fenol, pH 7,8.

- **Chloroform – isoamylalkohol (roztok CIZ)**

Směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1.

4.4.4 Srážení DNA ethanolem

- **96% ethanol pro UV spektrofotometrie**

- **3 M octan sodný**

- V 80 ml destilované vody bylo rozpuštěno 40,81 g trihydrátu octanu sodného. Hodnota pH byla upravena na 5,2 ledovou kyselinou octovou. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml a sterilizován v autoklávu (121 °C, 20 minut).

- **TE pufr**

- Sterilně byl smíchán 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98,8 ml destilované vody. Roztok byl sterilizován v autoklávu 20 min při 121 °C.

4.5 Poplymerázová řetězová reakce

4.5.1 Komponenty pro PCR

- Voda pro injekce ČSL 4 (Top-Bio, ČR) - dále označovaná jako voda pro PCR

- 10 x koncentrovaný Blue pufr (Top-Bio, ČR)
 - 750 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 1% Tween 20, 25 mM MgCl₂
- dNTP směs (10 mM) (Top - Bio, ČR)
 - 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP a 10 mM dTTP
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/μl) (Top - Bio, ČR)
- Oligonukleotidové primery (10 pmol/μl) (Top - Bio, ČR)
 - specifické pro doménu *Bacteria* [22]
 - specifické pro rod *Lactobacillus* [23]
- PPP Master Mix (Purple DNA Polymeráza PCR Master mix) (Top - Bio, ČR)
 - 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory

4.6 Agarozová gelová elektroforéza

- **TBE pufr (5x koncentrovany)**
54 g Tris-HCl, 27,5 g H₃BO₃, 20 ml EDTA (0,5 M) byly smíchány a doplněny destilovanou vodou na objem 600 ml. Roztok se doplní destilovanou vodou na objem menší než 1 liter. Pomocí 1 M NaOH pH roztoku upraví se na hodnotu 8,0. Roztok poté se doplní na 1 liter. Před použitím byl roztok sterilizován v autoklávu (20 min při 121 °C) a následně zředěn destilovanou vodou 10 x.
- **Agarozový gel pro elektroforézu (1,8 %)**
Navážka 1,44 g agarozy byla rozpuštěna v 80 ml 0,5 x koncentrovaného TBE pufru.
- **Ethidium bromid (50 μg/ml)**
- **Nanášecí pufr (koncentrovaný 6 x)**
Roztok nanášecího pufru se smíchá s produkty PCR v poměru 1:5.
- **DNA standard**
DNA standard 100 bp žebříček obsahující fragmenty DNA délky 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp.

4.7 Metody

Celý postup byl vypracován podle script “Analýza vybraných druhů bakterií mlečného kvašení pomocí metod molekulární biologie” doc. RNDr. Aleny Španové, CSc., doc. Ing. Bohuslava Ritticha, CSc.

4.7.1 Kultivace bakteriálních buněk

4.7.1.1 Křížový roztěr

- Vyžíhanou očkovací kličkou asepticky bylo odebráno malé množství kultury
- Bylo nadzvednuto víčko Petriho misky a uděláno kličkou 3 - 4 vodorovné čáry po povrchu agaru
- Klička byla vyžíhána a byly provedeny další 3 - 4 tahy kolmo přes první čáry
- Klička byla opět vyžíhána a byly udělány další čáry
- Klička byla vyžíhána potřetí a přes poslední nanesené čáry byla udělána vlnovka
- Mezi jednotlivými kroky roztěru bylo přiklopeno víčko misky
- Inkubace probíhala v termostatu při 37 °C během 24 hodin

4.7.1.2 Kultivace v tekutém mediu

- Očkovací klička byla vyžíhána v nesvítivé části plamene a nechána zchladnout
- Hrdlo zkumavky s kulturou bylo ožehnuto nad kahanem
- Z tekutého média bakteriologickou kličkou byla odebraná kultura
- Do zkumavky s čistým mediem byla vložena klička s odebranou kulturou
- Hrdlo zkumavky bylo opět ožehnuto a uzavřené látkovým víčkem
- Inkubace probíhala v termostatu při 37 °C během 24 hodin až 48 hodin

4.7.2 Lyze bakteriálních buněk

- Z každé bakteriální kultury bylo odpipetováno po 1 ml do 1,5 ml zkumavky Eppendorf a centrifugovalo se 4 minuty rychlosti 15 000 ot/min

- Supernatant byl opatrně slit, sediment s bakteriálními buňkami byl nechán odkapat
- Do sedimentu bylo přidáno 1 ml lyzačního pufru I (nejprve bylo přidáno 100 μ l a promícháno, poté bylo přidáno 900 μ l)
- Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny
- Do vzniklé suspenze bylo přidáno 12,5 μ l 10 % SDS a 5 μ l proteinasy K (100 μ g/ml)
- Vzorky byly inkubovány při 55 °C do druhého dne

4.7.3 Fenolová extrakce DNA

- K lyzátu buněk (500 μ l) byl přidán stejný objem fenolu
- Směs byla kývavým pohybem opatrně promíchávána po dobu 4 min
- Vzorky byly centrifugovány při 15000 ot/min po dobu 3 min
- Byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky, ke které bylo přidáno 700 μ l směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1)
- Vzniklá směs byla opatrně promíchávána kývavým pohybem po dobu 4 min
- Vzorky byly centrifugovány při 15000 ot/min po dobu 3 min
- Vodní fáze s DNA byla odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky
- Byla změřena koncentrace získané DNA u všech třech vzorků

4.7.4 Srážení DNA ethanolem

- Ke vzorku DNA bylo přidáno 1/10 objemu 3 M octanu sodného a směs byla promíchána
- Byl přidán 800 μ l 96 % ethanolu p.a. a obsah byl promíchán
- DNA byla ponechána k vysrážení při -20°C po dobu 15 min
- Vzorky byly centrifugovány při 15000 ot/min po dobu 15 min, po centrifugaci byl supernatant opatrně slit
- Sediment DNA byl vysušen v exsikátoru po dobu asi 15 min

- Získaná DNA byla rozpuštěna v 200 µl TE pufru
- Takto připravená DNA byla použita pro spektrofotometrické měření a pro rodově specifickou PCR

4.7.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

- Pro měření byl používán spektrofotometr NanoPhotometer™
- Jako slepý vzorek se použil TE pufr
- Poté byly proměřeny vzorky DNA
- Z obrazovky přístroje byly odečteny hodnoty koncentrací

4.7.6 PCR pro doménu *Bacteria* a pro rod *Lactobacillus*

Pro PCR byla použita DNA ředěná na koncentraci asi 10 ng/µl a primery specifické pro doménu *Bacteria* o velikosti asi 466 bp [22]. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6. Sekvence primerů pro doménu *Bacteria* [22]

Primer	Sekvence primerů	Velikost produktu (bp)
F_eub (1)	5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3'	466
R_eub (2)	5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3'	

Pro rodově specifickou PCR byla použita DNA o koncentraci asi 10 ng/µl a primery specifické pro rod *Lactobacillus* (produkt PCR o velikosti asi 250 bp) [23]. Sekvence primerů jsou Tabulce 7.

Tabulka 7. Sekvence primerů pro rod *Lactobacillus* [23]

Primer	Sekvence primerů	Velikost produktu (bp)
LbLMA1-rev (1)	5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3'	250
R16-1 (2)	5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA- 3'	

Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 8 a v Tabulce 9.

Tabulka 8. Složení směsi pro PCR pro doménu *Bacteria* a pro rod *Lactobacillus*

Komponenta	Objem (μl)
Voda pro PCR	19,0
Reakční pufr kompletní	2,5
Směs dNTP (10 mM)	0,5
Primer (1) (10 pmol/μl)	0,5
Primer (2) 10 pmol/μl)	0,5
Taq DNA-polymerasa Top-Bio (1U/μl)	1,0
DNA (asi 10 ng/μl)	1,0

Tabulka 9. Složení směsi PCR s PPP Master Mix pro doménu *Bacteria* a pro rod *Lactobacillus*

Komponenta	Objem (μl)
Voda pro PCR	10,5
PPP Master Mix	12,5
Primer (1) (10 pmol/μl)	0,5
Primer (2) (10 pmol/μl)	0,5
DNA (asi 10 ng/μl)	1,0

- Komponenty PCR (kap. 4. 5. 1) byly centrifugovány po dobu 20 sekund
- Jednotlivé komponenty v objemech, uvedených v Tabulce 9 a Tabulce 10, byly smíchány ve dvou zkumavkách Eppendorf o objemu 200 μl
- Jako šablona byla použita izolovaná a purifikovaná DNA *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 900, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 908, *Lactobacillus casei* LOCK 919

4.7.7 Průběh amplifikace

Vzorky byly vloženy do termocykleru, nastaveného předem na program BACT (Tabulka 10) pro primery specifické pro doménu *Bacteria* [22] a LBC ROD (Tabulka 11) pro detekci rodu *Lactobacillus* [23].

Vzorky byly vloženy do termocykleru, nastaveného předem na program BACT (Tabulka 10) a LBC ROD (Tabulka 10).

Tabulka 10. Program PCR pro domenu *Bacteria* se specifickými primery

	Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Opakování
1.	Hot start	95	5	
2.	Denaturace	95	0,5	30 - krát
3.	Hybridizace primerů	55	0,5	
4.	Syntéza vlákna DNA	72	0,5	
5.	Dosyntetizování DNA	72	10	

Tabulka 11. Program PCR pro rod *Lactobacillus* s rodově specifickými primery

	Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Opakování
1.	Hot start	95	5	
2.	Denaturace DNA	95	0,5	30 - krát
3.	Hybridizace primerů	55	0,5	
4.	Syntéza vlákna DNA	72	0,5	
5.	Dosyntetizování DNA	72	0,5	

4.7.8 Detekce produktů PCR pomocí agarosové gelové elektroforézy

- Pro detekce doménových PCR produktů byl připraven 1,8 % agarosový gel
- Pro detekci rodově specifických PCR produktů byl připraven 1,8 % agarosový gel

- V Eppendorfových zkumavkách bylo smíchané 25 μ l PCR produktu a 5 μ l nanášecího pufru
- Připravené PCR směsi, kontrolní vzorky a 100 bp žebříček byli nanášeny do komůrek gelu
- Gely byly následně vloženy do elektroforetické vany a zality 0,5 x koncentrovaným TBE pufrem (3 cm od horního okraje vání)
- Elektroforéza byla spuštěna pod napětím 80 V
- Jakmile nanášecí pufr doputoval do 2/3 délky gelu, elektroforéza byla ukončena (2,5 hodiny)
- Po skončení elektroforézy byly vloženy gely do lázni s ethidium bromidem (0,5 μ g/ml)
- Po půlhodině odbarvené gely byly sledovány na transiluminátoru v UV světle
- Výsledky byly dokumentovány fotoaparátem

5 VÝSLEDKY

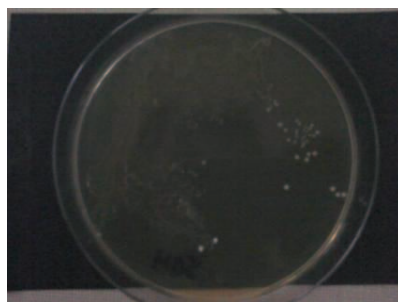
5.1 Kultivace bakterií

Bakteriální buňky byly kultivovány na pevném a v tekutém MRS mediu za účelem dokazání životoschopnosti mikroorganismů a čistoty kultury.

5.1.1 Růst bakteriálních buněk na pevném mediu

Z buněk narostlých v tekutém médiu byl proveden křížový roztěr na pevné médium s MRS agarem. Po 30 hodinách kultivace v termostatu při teplotě 37 °C hustě narostly krémově-mléčné malé kolonie okolo 0,5 mm v průměru. Kolonie narostlé z bakteriální kultury *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 900 jsou uvedeny na Obr. 2, kolonie narostlé z bakteriální kultury *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 908 jsou uvedeny na Obr. 3.

Obrázek 2. Kolonie bakteriální kultury *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 900



Obrázek 3. Kolonie bakteriální kultury *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 908

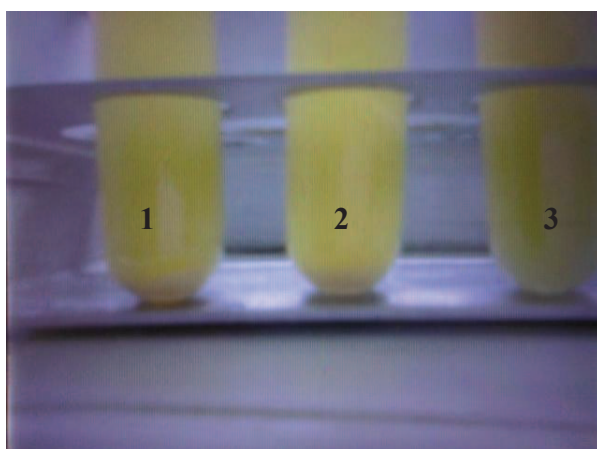


Na pevném mediu bakteriální buňky rostly ve formě kolonií stejné velikosti a barvy. Kultivace na MRS agaru prokázala čistotu a životoschopnost bakteriálních buněk.

5.1.2 Kultivace v tekutém mediu

Bakteriální kultury narostlé na pevném mediu byly přeočkovány do tekutého MRS média (inokulace 1 %) a byly kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C. Po 30 hodinách kultivace byl pozorován krémový sediment a krémový zákal ve všech třech zkumavkách. Růst bakteriálních buněk se projevoval zakalením media. V tekutém mediu se tvořil zákal, buňky rostly. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 4.

Obrázek 4. Zkumavky s tekutým MRS médiem s narostlými bakteriálními kulturami



1. *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 900
2. *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 908
3. *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 919

5.2 Izolace DNA fenolovou extrakce

Z buněčných kultur *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 900, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 908, *Lactobacillus casei* LOCK 919 byla izolována DNA metodou fenolové extrakce a následně srážena etanolem. Hodnoty koncentrace DNA stanovené spektrofotometricky jsou uvedeny v Tabulce 12. Hodnoty A260/A280 byly od 1,72 do 1,97 – DNA byla izolována a zbavena proteinů.

Tabulka 12. Koncentrace DNA *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 900, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 908, *Lactobacillus casei* LOCK 919 a adsorbance při různých vlnových délkách.

DNA kmene	c [ng/μl]	A 230	A 260	A 280	A 320	A 260/280	A260/320
LOCK 900	57,25	0,0615	0,1185	0,062	0,004	1,9745	1,9915
LOCK 908	38,5	0,057	0,083	0,0475	0,006	1,8555	1,512
LOCK 919	16,75	0,058	0,039	0,025	0,0055	1,7225	0,6375

DNA byla izolována v rozsahu koncentrací asi 16, 75, 38, 5 a 57, 25 ng/μl a v dostatečné čistotě.

5.2 Příprava DNA pro PCR

Pro PCR byla DNA ředěna na koncentraci asi 10 ng/μl. Po zředění byla opětovně změřena koncentrace DNA. DNA po zředění je v odpovídající koncentraci pro PCR. Koncentrace DNA po ředění je uvedena v Tabulce 13.

Tabulka 13. Hodnoty koncentrace DNA *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 900, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 908, *Lactobacillus casei* LOCK 919 po zředění

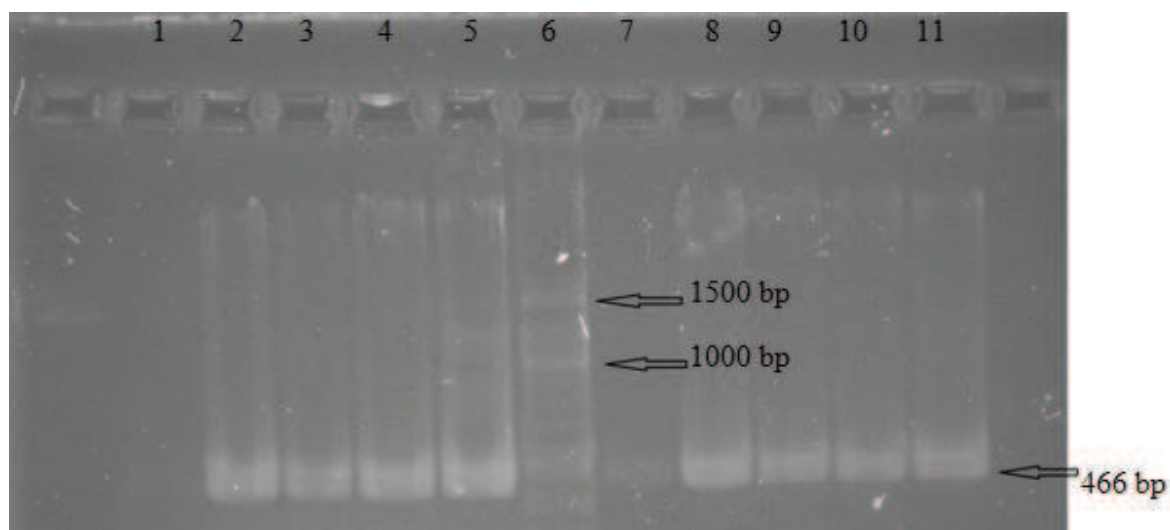
DNA kmene	c [ng/μl]
LOCK 900	11,0
LOCK 908	9,5
LOCK 919	11,0

5.3 PCR specifická pro doménu *Bacteria*

S cílem ověřit amplifikovatelnost izolovaných DNA byla provedena PCR specifická pro doménu *Bacteria*. V PCR pro doménu *Bacteria* byly použity primery F_eub a R_eub [22] a DNA zředěné na koncentraci asi 10 ng/μl.

PCR směsi byly připraveny dvakrát podle Tabulky 9 a Tabulky 10 tj. z jednotlivých komponentů bez PPP Master Mixu, a dále s využitím PPP Master Mixu. Amplifikace probíhala dle programu uvedeného v Tabulce 11. Výsledky agarozové gelové elektroforézy produktů PCR na 1,8 % gelu jsou uvedeny na Obrázku 5.

Obrázek 5. Agarozová gelová elektroforéza produktů PCR (466 bp) specifických pro doménu *Bacteria*



Běh č.	DNA kmene	Příprava PCR směs	Detekce produktů PCR
1	Negativní kontrola	bez PPP Master Mix	-
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 900	bez PPP Master Mix	+
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 908	bez PPP Master Mix	+
4	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 919	bez PPP Master Mix	+
5	Pozitivní kontrola	bez PPP Master Mix	+
6	Žebříček 100 bp		
7	Negativní kontrola	PPP Master Mix	+/- *
8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 900	PPP Master Mix	+
9	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 908	PPP Master Mix	+
10	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 919	PPP Master Mix	+
11	Pozitivní kontrola	PPP Master Mix	+

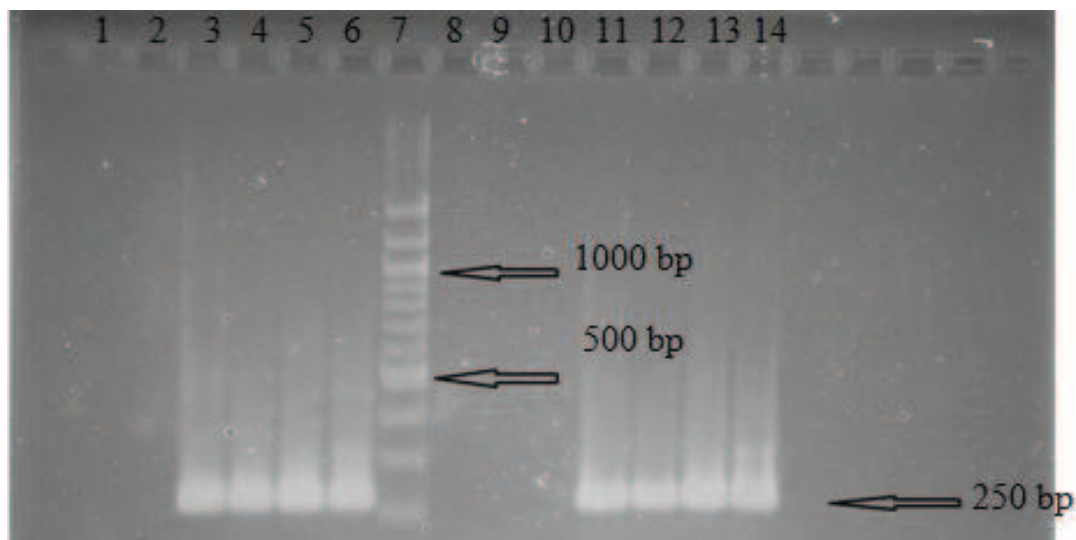
* při opakování nebyl v negativní kontrole produkt PCR detekován
+ PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

Produkt PCR o velikosti 466 bp specifický pro doménu *Bacteria* byl detekován po amplifikaci DNA všech testovaných kmenů. DNA všech bakteriálních kmenů se amplifikovala v PCR, což znamená, že vše zkoumané kmeny patří do domény *Bacteria*.

5.4 PCR specifická pro rod *Lactobacillus*

S cílem ověřit zařazení testovaných kmenů do rodu *Lactobacillus* byla provedena rodově specifická PCR. V PCR na rod *Lactobacillus* byly použity primery LbLMA1-rev a R16-1 [23] a DNA zředěné na koncentraci asi 10 ng/μl. PCR směsi byly připraveny dvakrát podle Tabulky 8 a Tabulky 9 tj. bez PPP Master Mix a s využitím PPP Master Mix. Amplifikace probýhala podle programu uvedeného v Tabulce 12. DNA všech testovaných bakteriálních kmenů se amplifikovala v PCR, kmeny patří do rodu *Lactobacillus*. Výsledky agarozové gelové elektroforézy produktů PCR na 1,8 % gelu jsou uvedeny na Obrázku 6.

Obrázek 6. Agarozová gelová elektroforéza produktů PCR (250 bp) specifických pro rod *Lactobacillus*



Běh č.	DNA kmene	Příprava PCR směsi	Detekce produktů PCR
1	Negativní kontrola	bez PPP Master Mix	-
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 900	bez PPP Master Mix	+
4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 908	bez PPP Master Mix	+
5	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 919	bez PPP Master Mix	+
6	Pozitivní kontrola	bez PPP Master Mix	+
7	Žebříček 100 bp		
9	Negativní kontrola	Master Mix	-
11	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 900	Master Mix	+
12	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 908	Master Mix	+
13	<i>Lactobacillus casei</i> LOCK 919	Master Mix	+
14	Pozitivní kontrola	Master Mix	+

+ PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

Produkt PCR o velikosti 250 bp specifický pro rod *Lactobacillus* byl detekován po amplifikaci DNA všech testovaných kmenů. Bylo potvrzeno zařazení všech kmenů do rodu *Lactobacillus*.

6 DISKUZE

6.1 Kultivace bakterií

Kultivace bakteriální kultury byla provedena křížovým roztěrem na pevném mediu a kultivací v tekutém mediu. Jsou to základní metody pro důkaz životaschopnosti mikroorganismů. Vzhledem k tomu, že získané kolonie měly stejný tvar, krémově-mléčnou, barvu a velikost můžeme soudit, že kultivace prokázala jejich životaschopnost a bakteriální kultury nebyly ničím kontaminovány.

6.2 Izolace DNA fenolovou extrakce

DNA z tří kmenů *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 900, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 908, *Lactobacillus casei* LOCK 919 byla izolována metodou fenolové extrakce a následně sražena etanolem. Fenolová extrakce je nejčastěji používaná metoda pro aplikace na molekulárně-genetické úrovni. Po extrakci byla změřena absorbance DNA každého kmenu v rozmezí 230 -320 nm a stanovena koncentrace pomocí přístroje NanoPhotometr. Z poměru absorbancí A260 nm/A280 nm byla stanovena čistota DNA. Tento poměr hodnot absorbance je 1,72 (*Lactobacillus casei* LOCK 919), 1,85 (*Lactobacillus rhamnosus* LOCK 908), 1,97 (*Lactobacillus rhamnosus* LOCK 900), což ukazuje na nezávadné znečištění DNA kmene *Lactobacillus casei* LOCK 919 bílkovinami.

Po stanovení koncentrace DNA byla zředěna na 10 ng/μl a použita k následné PCR, kde proběhla amplifikace řetězců DNA.

DNA byla izolovaná v čistotě a koncentraci vhodné pro použití v PCR.

6.3 PCR specifická pro doménu *Bacteria*

Izolovaná DNA byla použita jako DNA matrice pro PCR využívající primerů F-eub a R-eub specifické pro doménu *Bacteria* [22]. Po skončení PCR, byla specifické PCR produkty o velikosti 466 bp detekovány pomocí agarozové gelové elektroforézy na 1,8 % agarózovém gelu (Obrázek 5). Intenzita všech produktů PCR byla stejná, což potvrzuje výše uvedené výsledky ředení izolované DNA na požadovanou koncentraci. Ve všech testovaných vzorcích byl detekován specifický PCR produkt o velikosti 466 bp a byla tedy prokázána přítomnost bakteriální DNA.

Bylo potvrzeno zařazení daných mikroorganismů do domény *Bacteria*. Slabě zastoupení DNA v komůrce s negativní kontrolou se dá vysvětlit přetokem vzorku do příslušné komůrky během manipulace při přípravě agarozové gelové elektroforézy.

6.4 Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Lactobacillus*

Pro potvrzení zařazení vybraných kmenů do rodu *Lactobacillus* byly použity primery R16-1 a

LbLMA1-rev [23]. Po provedení gelové elektroforézy na 1,8 % agarozovém gelu byly prokázány produkty PCR o velikosti 250 bp, tedy produktu specifického pro rod *Lactobacillus*. Podle výsledků (Obrázek 6) lze soudit, že nenastala kontaminace vzorku a práce byla provedena správně.

Pomocí rodově specifické PCR byla prokázána přítomnost DNA bakterií rodu *Lactobacillus*, tj. dané mikroorganismy patří do rodu *Lactobacillus*.

Na základě výsledků dosažených v experimentální části této práce a práci jiných autorů [24] lze usuzovat, že daná metoda, zahrnující izolace a purifikace DNA a následnou PCR, je vhodná pro identifikace a určení domény, rodu mikroorganismu v buněčných kulturách.

7 ZÁVĚR

V současné době jsou probiotika považována za nezbytnou součást alternativní medicíny, zaměřené na udržení zdraví a prodloužení života. Probiotika potlačují patogeny prostřednictvím soutěže o živiny pro růst, vytvoření nízkých hodnot pH a produkci antimikrobiálních látek - bakteriocinů. Probiotické vlastnosti mají bakterie rodu *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a řada dalších mikroorganismů, včetně tzv. bakterií mléčného kvašení (BMK). Produkty metabolismu těchto mikroorganismů zabraňují rozmnožování patogenu a podporují homeostazi prostředí trávicího traktu. Zdraví prospěšné účinky probiotiku aktivně využívají se v různých průmyslových oblastech. V potravinářství se to týká zejména mléčných výrobků (jogurt, acidofilní mléko, kefir, kumys apod.), které v sobě spojují v měkkou příjemnou chuť, prospěšné účinky na mikroflóru střeva a celkovou imunitu. Stále jsou hledány nové způsoby jak zvýšit počet probiotik obsahujících výrobků na potravinářském trhu. Komplikuje se to náročnými funkčními a bezpečnostními požadavkami, kladenými na probiotika.

Při analýze probiotických výrobků je prvním a základním krokem identifikace obsažených mikroorganismů. Nejcitlivější a nejpoužívanější metodou identifikaci je polymerázová řetězová reakce (PCR). Principem metody je amplifikace určitého úseku DNA, charakteristického pro zkoumaný mikroorganismus, v průběhu opakovaných cyklu denuraci a replikace molekuly DNA.

V experimentální části práce byla provedena kultivace buněk bakteriálních kultur, izolace bakteriální DNA, následná amplifikace DNA pomocí PCR specifická pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus* a nakonec agarozová gelová elektroforéza produktů PCR.

Bylo prokázáno, že použitým postupem byla izolována DNA v kvalitě vhodné pro PCR, což bylo potvrzeno její amplifikací v PCR. Výsledky potvrdily, že testované probiotické kultury *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 900, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 908 a *Lactobacillus casei* LOCK 919 obsahují bakteriální buňky rodu *Lactobacillus*.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GUANER F., KHAN A G. Пробиотики и пребиотики. *Всемирная гастроэнтерологическая организация: Практические рекомендации*. 2008. Dostupné také z: <http://www.belmapo.by/downloads/gastroenterology/2009/recomend/probiotiki.pdf>
- [2] MATTILA-SANDHOLM T., et al. Technological challenges for future probiotic foods. *Internacional Dairy Journal*. 2002, vol. 12, no. 3, pp. 173-182. ISSN 0958-6946.
- [3] БЕРЕЗНЯКОВ, В.И. Прокариотические и эукариотические пробиотики. *Болезни и антибиотики*. 2012, ISSN 2307-1117. Dostupné také z: <http://www.mif-ua.com/archive/article/34691>
- [4] КУЛИКОВА, Л., ПРОБИОТИКИ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ. *НАУЧНОЕ СООБЩЕСТВО СТУДЕНТОВ XXI СТОЛЕТИЯ. ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ*. 2013, no. 7(10), pp. 11-24. Dostupné z: <http://sibac.info/archive/nature/Natur07.11.2013.pdf>
- [5] ЯКОВЕНКО, Э. П., ЛАВРЕТЬЕВА С.А. Инновационные пробиотики – ключ к управлению функциями нормальной кишечной микрофлоры. *Лечащий врач*. 2012, vol. 97. ISSN 1560-5175. Dostupné z: <http://www.lvrach.ru/2012/07/15435468/>
- [6] ROBERFOID, M. Prebiotics: The Concept Revisited. *Journal of Nutrition*. 2007, no. 3, vol.137, pp. 830-837. ISSN 1541-6100. Dostupné také z: <http://jn.nutrition.org/>
- [7] Schrezenmeir, J., de Vrese, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001, vol. 73, no 2, pp. 361-364. ISSN 1938-3207. Dostupné z WWW: <http://ajcn.nutrition.org/content/73/2/361s.full>
- [8] BENOIT, F., DANIEL, C., POT, B. Probiotics from research to market: the possibilities risks and challenges. *Current Opinion In Microbiology*. 2013, no. 16, pp. 284-292. ISSN 1369-5274.
- [9] KNUT, H. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001, vol. 73, no. 2, pp. 374-379. Dostupné z: <http://ajcn.nutrition.org/content/73/2/374s.full>
- [10] COEURET, V., GUEGUEN, M., VERNOUX, JP. In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *Journal of Dairy Research*. 2004, no. 4, pp. 451-460. ISSN 0022-0299. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15605712>
- [11] Products with Probiotics. *California Dairy Research Foundation* [online]. 2011 [cit. 2014-05-13]. Dostupné z: <http://cdrf.org/home/checkoff-investments/usprobiotics/products-with-probiotics/#products>

- [12] ШАМАЕВ, А. Г. *Башкирский кумыс*. 1-ое издание. Уфа: Башкирское книжное издательство, 1989. 224 p. ISBN 5-295-00409-0.
- [13] Аципол. In: *OTCpharm* [online]. [cit.2014-05-12]. Dostupné z: <http://otcpharm.ru/consumers/catalog/details/v/code/acipol/>
- [14] Бондаренко, В. М., Грачева, Н.М. Пробиотические препараты в терапии и профилактике дизбактериоза кишечника. *Инфекционные болезни* [online]. 2004, го. 2004, ч. 2, s. 53-58 [cit. 2014-05-12]. Dostupné z: <http://www.gastroportal.ru/php/content.php?id=1395>
- [15] Бифиформ комплекс. *Регистр лекарственных средств России* [online]. 2010, last revision 16th of July 2010 [cit. 2014.05.13]. Dostupné z: http://www.rlsnet.ru/baa_tn_id_38206.htm
- [16] РОЖКОВА, В.Ф., И.В. СЕМЕНИХИНА а А.В. БЕГУНОВА. Особенности использования бифидобактерий при производстве пробиотических кисломолочных продуктов. *НАУКА - ПРОИЗВОДСТВУ*. 2011, no. 2, pp. 15-17. Dostupné z: http://vnimi.org/isp_bifido_bak.pdf
- [17] ŠMARDÁ, J., DOŠKAŘ, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. p. 194. ISBN 80-210-3841-1.
- [18] ŠPANOVÁ A., RITTIČH B. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. 1.vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 86 p. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [19] PARKER, K. PCR Technology Buying Guide. In: *SelectScience* [online]. [cit. 2014-05-13]. Dostupné z: http://www.selectscience.net/pcr_buying_guide.aspx
- [20] BAUEROVÁ, M., TURČÁNI, M. Princípy a využitie polymerázovej retazovej reakcie. 2004. Dostupné z: <http://www.kbg.fpv.ukf.sk/publikacie/PCRmaterial.pdf>
- [21] ROBOTIKA [online]. 2005 [cit. 2014-05-14]. Namnožení DNA pomocí PCR. Dostupné z: <http://robotika.cz/articles/gerda/cs>
- [22] HAARMAN, M., KNOL, J. Quantitative Real – Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Enviromental Microbiology*. 2006, no. 4. ISSN 2359-2365.
- [23] DUBERNET, S., DESMASURES, N., GUÉGUEN, M. A PCR- based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS microbiology Letters*. 2001, no. 214, pp. 271-275.

[24] BUBENIKOVÁ, Bc.Lucia. *Izolace bakteriální DNA z potravin s využitím magnetických nosičů*. Brno, 2011. Dostupné z:
https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=36977. Diplomová práce. VUT v Brně. Vedoucí práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

bp	Pár bází
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
GC	Guanin a cytosin
AT	Adenin a thymin
TBE	Pufř tris-borát-EDTA
PCR	Polymerázová řetězová reakce
dNTP	Deoxyribonukleosidtrifosfát
GRAS	Všeobecně považovaný za bezpečný
GI	Gastrointestinální trakt
CIZ	Chloroform – isoamylalkohol