

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2015

Tereza Surá



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## REKOMBINANTNÍ PROBIOTIKA

RECOMBINANT PROBIOTICS

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

#### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tereza Surá

#### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

BRNO 2016



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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK1035/2015** Akademický rok: **2015/2016**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Tereza Surá**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)  
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)  
Vedoucí práce **doc. RNDr. Alena Španová, CSc.**  
Konzultanti:

### Název bakalářské práce:

Rekombinantní probiotika

### Zadání bakalářské práce:

1. Vyhledání a zpracování dostupné literatury k dané problematice.
2. V praktické části provést izolaci bakteriální DNA z vybraného výrobku magnetickými částicemi a její amplifikaci metodou PCR.
3. V teoretické části vyhodnotit získané poznatky formou diskuse.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

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.

-----  
Tereza Surá  
Student(ka)

-----  
doc. RNDr. Alena Španová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

## **ABSTRAKT**

V teoretické části se pojednává o současném stavu a výzkumu rekombinantních probiotik, jejich využitelnosti v potravinářství a zdravotnictví. Dále se zabývá jejich příznivými účinky na zdraví jedince. Experimentální část je zaměřena na identifikaci určitého bakteriálního kmene v probiotických doplňcích stravy. Z těchto výrobků byla izolována DNA pomocí magnetických mikročástic a následně analyzována pomocí polymerázové řetězové reakce.

## **ABSTRACT**

Theoretical part of this thesis focuses on present state and research of recombinant probiotics and their use in food industry and health care. It also concentrates on their beneficial effects on the health of individuals. The experimental part focuses on the identification of specific bacterial strain in a probiotics food supplements. The DNA was isolated from these products by use of magnetic microparticles and obtained DNA was subsequently analysed through polymerase chain reaction.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

probiotika, rekombinantní technologie, izolace DNA, PCR, doplňky stravy

## **KEYWORDS**

probiotics, recombinant technology, DNA isolation, PCR, dietary supplements

SURÁ, T. *Rekombinantní probiotika*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 38 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**

Tímto bych chtěla poděkovat především vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za odborné vedení, cenné připomínky a čas, který mi věnovala. Mé poděkování patří také rodině a přátelům, kteří mi byli oporou.

## OBSAH

ÚVOD.....	7
I. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
1 Pojem probiotikum.....	8
2 Účinky probiotik.....	9
2.1 Mechanismy působení probiotik.....	9
3 Probiotické mikroorganismy v potravinářství.....	12
3.1 Probiotické doplňky stravy.....	14
4 Rekombinantní DNA technologie a rekombinantní probiotika.....	16
4.1 Využití rekombinantních probiotik v potravinářství.....	16
4.1.1 <i>Lactobacillus paracasei</i> NFBC 338.....	16
4.1.2 Rekombinantní <i>Bacillus subtilis</i> .....	16
4.1.3 <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917.....	16
4.2 Využití rekombinantních probiotik ve zdravotnictví.....	17
4.2.1 Vakcíny.....	17
4.2.2 Produkce kyseliny gama-aminomáselné (GABA) BMK.....	19
4.2.3 Rekombinantní laktokoky.....	19
4.2.4 Rekombinantní <i>Lactobacillus paracasei</i> .....	20
4.3 Genetické aplikace v potravinářství.....	20
4.3.1 Rekombinantní <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	20
5 Bezpečnost nativních a rekombinantních probiotik.....	21
6 CÍL PRÁCE.....	22
II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
7 Materiál a metody.....	23
7.1 Použité probiotické doplňky stravy.....	23
7.2 DNA bakteriálního kmene pro pozitivní kontroly.....	23
7.3 Přístroje a pomůcky.....	23
7.4 Chemikálie.....	24
7.5 Roztoky.....	24
7.5.1 Roztoky pro lyzi bakteriálních buněk.....	24
7.5.2 Magnetické mikročástice.....	25
7.5.3 Komponenty pro PCR.....	25
7.5.4 Roztoky pro gelovou elektroforézu.....	25
7.6 Metody.....	26

7.6.1	Příprava hrubých lyzátů buněk z výrobků.....	26
7.6.2	Izolace DNA magnetickými mikročásticemi.....	26
7.6.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	26
7.6.4	Polymerázová řetězová reakce pro doménu <i>Bacteria</i> .....	27
7.6.5	Gelová elektroforéza produktů PCR.....	28
8	Výsledky.....	29
8.1	Zpracování vzorků doplňků stravy pro analýzu .....	29
8.1.1	Linex® Forte.....	29
8.1.2	Linex® Baby.....	29
8.2	Izolace DNA pomocí magnetického nosiče .....	29
8.3	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA.....	29
8.4	Amplifikace DNA a detekce produktů PCR.....	30
9	Diskuze.....	32
9.1	Izolace DNA z probiotických výrobků.....	32
9.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	32
9.3	Amplifikace bakteriální DNA pomocí PCR pro doménu <i>Bacteria</i> .....	33
	ZÁVĚR.....	34
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	35
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	38

## ÚVOD

Zájem o probiotika v posledních dvou desetiletí roste. Je to způsobeno jejich prospěšnými vlastnostmi pro zdraví člověka, především zajištěním rovnováhy střevní mikroflóry, ochranou proti různým gastrointestinálním patogenům apod. Vedle tradičních funkčních potravin se na trhu objevují doplňky stravy obsahující probiotika. Díky významnému rozvoji výzkumu probiotik začala být pozornost směřována i na spojitost rekombinantní DNA technologie s probiotiky. Rekombinantní probiotika se dostávají do popředí zájmu díky probíhajícím studiím a výzkumům. Dříve než mohou být tyto probiotika, ať už v podobě vakcín nebo probiotických doplňků stravy, dodána na trh, musí být klinicky prokázána jejich zdravotní nezávadnost a musí být vyloučeny všechny nežádoucí účinky. Je tak otázkou času, kdy se s rekombinantními probiotiky budeme běžně setkávat.

Probiotika obsažená v doplňcích stravy patří většinou mezi kmeny rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Tyto probiotické mikroorganismy můžeme identifikovat metodou polymerázové řetězové reakce.

# I. TEORETICKÁ ČÁST

## 1 POJEM PROBIOTIKUM

Probiotikum je relativně nové slovo znamenající "pro život", kterým bývají označovány mikroorganismy (MO), které mají prospěšné účinky na lidi a zvířata. Tyto MO přispívají ke střevní mikrobiální rovnováze a hrají roli v udržování zdraví. Probiotické MO jsou zařazovány převážně do rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, ale mezi další vhodné patří také zástupci rodu *Bacillus*, *Pediococcus*, některé kvasinky a další. [1]

Vztah mezi střevní mikroflórou a lidským zdravím vypořádal již Hippokrates, který uvedl: „Všechny nemoci začínají ve střevech.“ Zájem o studium mikrobiální flóry započal Theodor Escherich, který v roce 1886 popsal vliv střevních bakterií na fyziologii trávení u kojence. Avšak za otce probiotického konceptu je považován Ilja Iljič Mečnikov, který ve své práci z roku 1907 poznamenal, že bakterie v tlustém střevě hrají roli při stárnutí a nepříznivém zdravotním stavu u dospělých. Tato teorie byla založena na pozorování bulharských sedláků, kterým byla připisována jejich dlouhověkost díky konzumaci fermentovaných mléčných potravin. [2]

Probiotika lze nalézt především v mléčných výrobcích ale i jiných produktech. Často se užívají po antibiotické terapii, která ničí mikrobiální flóru přítomnou v zažívacím traktu. Hrají důležitou roli při ochraně organismu proti škodlivým mikroorganismům a také při posílení hostitelského imunitního systému. Pravidelná konzumace potravin, které obsahují probiotické mikroorganismy je doporučována k vytvoření pozitivní rovnováhy, prospěšných mikroorganismů ve střevní mikroflóře. [1]

## 2 ÚČINKY PROBIOTIK

Během onemocnění nastává celá řada významných přelomů v mikrobiální flóře lidského střeva. Tyto změny nastávají kvůli imunosupresi, užívání antibiotik, nedostatku živin a dalších. V experimentálních modelech bylo prokázáno, že změny se mohou objevit v průběhu 6 až 8 hodin. Endogenní kmeny *Lactobacillus* jsou nahrazovány patogenními bakteriemi. Dosažení rovnováhy a využití prospěšných účinků probiotických bakterií je pochopitelně oblast značného zájmu. Nicméně mechanismy, kterým tyto mikroorganismy uplatňují své účinky jsou různé. Řada z těchto účinků je specifických pro určitý kmen. [5]

K některým z funkčních účinků probiotik patří posílení střevní slizniční bariéry, antimutagenní a antikarcinogenní účinky, stimulace imunitního systému a snížení hladiny krevního cholesterolu. Roste počet vědeckých důkazů a klinických studií, dokazujících mnoho zdravotních výhod probiotik, včetně modulace metabolismu hostitelského organismu, snížení intolerance laktózy, zachování vyvážené střevní mikroflóry, prevence kolonizace oportunními patogeny a léčení či prevence alergií. Souvislost mezi střevní mikroflórou a alergickými onemocněními byla epidemiologicky prokázána. Epidemiologické studie ukázaly, že nižší spotřeba fermentovaných potravin je jedním z faktorů spojených s nárůstem alergických onemocnění. [3]

### 2.1 Mechanismy působení probiotik

Existuje celá řada mechanismů působení probiotik s potenciálně příznivými účinky na střeva. [2] Mnoho dostupných informací o mechanismu účinku probiotik se získalo z testování na zvířatech ve studiích *in vitro*. Co je však jasné, je to, že existuje více mechanismů, kterými uplatňují různé probiotické bakterie své účinky, a ty se mohou lišit u běžné populace. Tabulka 1 shrnuje hlavní mechanismy, kterými probiotika uplatňují své účinky. [5]

**Tabulka č. 1:** Shrnutí mechanismů účinku probiotik [5]

Mechanismus účinku		Konkrétní příklady probiotik
Úprava pH	Produkce kyseliny mléčné a kyseliny octové redukuje pH, což vede ke vzniku nepříznivého prostředí pro patogeny	<i>Lactobacillus</i> ssp.: snížení hodnoty pH a zabránění růstu patogenů VSL #3: <i>in vivo</i> snížení hodnoty pH u pacientů s ulcerózní kolitidou
Produkce bakteriocinů	Bakteriociny jsou proteiny produkované bakteriemi, které inhibují růst jiných MO. Mohou mít úzké nebo široké spektrum účinku (inhibice celé řady bakterií, kvasinek a plísní).	Mutantní <i>Lactobacillus salivarius</i> bez bakteriocinového genu není schopný chránit myši proti infekci <i>Listeria monocytogenes</i> .
Narušení interbakteriální komunikace	Autoinduktory jsou signálními molekuly produkované bakteriemi, které tvoří základ bakteriální	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 narušuje bakteriální komunikaci a expresi genů virulence a dalších genů

	komunikace	<i>Escherichia coli</i> O157: H7
Vylepšení funkce slizniční bariéry	Zvýšená tvorba a sekrece buněčného hlenu střevním epitelem.	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v: zvýšení genové exprese mucinu <i>in vitro</i> a adheze na buňky tlustého střeva
	Snížená adheze a invaze do buněk střevního epitelu tím, že snižuje translokaci.	<i>Lactobacillus casei</i> a <i>L. rhamnosus</i> adhezuje k buňkám tlustého střeva <i>in vitro</i>
	Zvýšená produkce lidského $\beta$ -defensinu 2 buňkami epitelu.	<i>E. coli</i> Nissle 1917: indukuje zvýšení genové exprese mucinu a produkce lidského $\beta$ -defensinu 2 do buňky tlustého střeva
	Regenerace buněk epitelu a snížená apoptóza.	<i>Lactobacillus</i> snižuje narušení epitelu a adhezi patogenních <i>E. coli</i> . Probiotický přípravek VSL # 3 brání redistribuci epiteliálních adhezních proteinů při vystavení patogenním bakteriím. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG zabraňuje apoptóze střevních epiteliálních buněk zprostředkované <i>Lactobacillus casei</i> a <i>Clostridium butyricum</i> stimuluje střevní proliferaci epitelu u krys.
Resistence vůči patogenům	Probiotika soutěží s patogeny o živiny a o adhezi.	<i>L. casei</i> a <i>L. rhamnosus</i> adhezuje k buňkám tlustého střeva, snižuje růst patogenů a může přetrvávat v gastrointestinálním traktu <i>E. coli</i> Nissle 1917 inhibuje růst <i>E. coli</i> produkujících Shiga toxin
Imunologické účinky	Probiotické mikroorganismy ovlivňují vrozenou a adaptivní hostitelskou odpověď. Specifické receptory hrají ústřední roli při zprostředkování tohoto procesu.	VSL # 3 zvyšuje protizánětlivost a snižuje činnost prozánětlivých cytokinů, snižuje indukovatelnou syntézu oxidu dusnatého a aktivitu matriční metaloproteinázy u pacientů s pouchitidou. <i>L. plantarum</i> 299v zvyšuje sekreci IL-10 z makrofágů a T buněk u

		pacientů s ulcerózní kolitidou. <i>L. casei</i> a <i>Lactobacillus bulgaricus</i> výrazně snižuje hladinu TNF uvolněného ze zanícené sliznice při Crohnově chorobě. <i>E. coli</i> Nissle 1917 vykazují lokální a systémové antizánětlivé účinky na myším modelu s indukovanou sepsí.
	Zvýšená produkce imunoglobulinů	<i>L. rhamnosus</i> GG: indukuje zvýšení koncentrací cirkulujících IgA, IgG a IgM u dětí s gastroenteritidou.
	Aktivace a modulace makrofágů, T buněk a NK buněk	<i>L. casei</i> Shirota: buněčná stěna indukuje produkci IL-12 a kontroluje zánětlivé cytokinové odpovědi makrofágů, T buněk a NK buněk. <i>L. casei</i> Shirota a <i>Bifidobacterium breve</i> lze podávat před operací u pacientů s rakovinou žlučovodu, protože výrazně snižují pooperační hladiny IL-6, C-reaktivního proteinu a koncentraci bílých krvinek. <i>Lactobacillus acidophilus</i> a <i>Bifidobacterium longum</i> zvyšují fagocytární aktivitu makrofágů v myším modelu.

### 3 PROBIOTICKÉ MIKROORGANISMY V POTRAVINÁŘSTVÍ

Prospěšné mikroby byly využívány v průběhu staletí zejména v potravinářství a jsou jednou z cest vedoucích k bezpečnosti potravin. Za dostatečné minimální množství je považováno  $10^6$  životaschopných probiotických bakterií na mililitr nebo gram potravin, i když počet buněk potřebných k vyvolání příznivých účinků na zdraví se může lišit v závislosti na vypětí a zdravotním stavu jedince. [3]

Probiotika, jako jsou například bakterie mléčného kvašení (BMK) přítomné v jogurtu, jsou neinvazivní a nepatogenní grampozitivní bakterie, které jsou rovněž přítomny ve střevě. BMK se používají pro zpracování a konzervaci potravin, jako startovací kultury, směsné kultury a bioochranné kultury v potravinářském průmyslu. Bylo prokázáno, že BMK produkují ve fermentujících potravinách antimikrobiální sloučeniny jako například organické kyseliny, bakteriociny a antifungální peptidy. Instituce Food and Drug ve Spojených státech kategorizovala tyto druhy BMK jako "všeobecně považovaný za bezpečný" (GRAS). [3] BMK mohou prodloužit trvanlivost potravin, zvýšit bezpečnost, zlepšit texturu potravin a přispívají k příjemnému smyslovému profilu konečného produktu. [4]

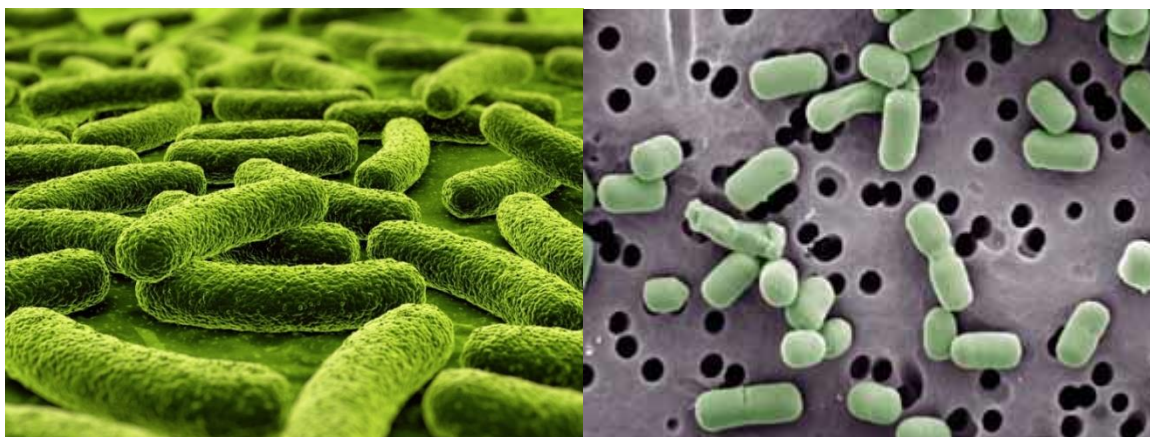
Laktobacily běžně se vyskytující v mléčných a probiotických doplncích zahrnují kmeny druhů *L. acidophilus*, *L. acidophilus* DDS-1, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. johnsonii* a *L. gasseri*. Bifidobakterie jsou složky normální střevní flóry, a lze je také nalézt v pochvě a v ústní dutině. Bifidobakterie, které se používají jako probiotika jsou např. druhy *B. bifidum*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. thermophilum*, a *B. pseudolongum*. Komerčně prodávané probiotika jsou k dispozici buď jako jediný druh nebo v kombinaci více druhů. Některé z nejběžněji používaných probiotik jsou uvedeny v Tabulce 2. [2]

**Tabulka č. 2:** MO nejčastěji využívané jako probiotika [7], [8]

Druhy rodu		Ostatní druhy
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Propionobacterium freudenreichii</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Pediococcus lactis</i>
<i>L. lactis</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. paracasei</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. reuteri</i>		<i>Saccharomyces boulardi</i>
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. helveticus</i>		
<i>L. delbrueckii</i>		
<i>L. plantarum</i>		

Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy, které stimulují růst anebo aktivitu bakterií v trávicím traktu způsobu, které mohou být prospěšné pro zdraví. K explozi zájmu o probiotika a jejich potenciální zdravotní přínosy došlo od roku 2000, kde se pozornost zaměřuje na gastrointestinální trakt. Symbiotika jsou kombinací probiotik a prebiotik. [5]

Probiotika jsou identifikovány na úrovni rodu, druhu, a kmene. Většina používaných probiotik jsou druhy ze tří rodů: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, a *Saccharomyces*. Laktobacily a bifidobakterie jsou sacharolytické bakterie, které mohou fermentovat cukry na kyselinu mléčnou, která inhibuje růst patogenních bakterií. Kromě toho pyruvát vznikající kvašením může být využit některými anaerobními bakteriemi k produkci prospěšných mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA). Laktobacily se běžně vyskytují ve střevech zdravých jedinců i u osob konzumujících probiotika. [2] Pro názornost jsou na Obrázku 1 zobrazeny mikroskopické snímky probiotických bakterií *L. rhamnosus* a *L. brevis*.



**Obrázek č. 1:** *Lactobacillus rhamnosus* (vlevo) [9], *Lactobacillus brevis* (vpravo) [10]

### 3.1 Probiotické doplňky stravy

V dnešní době existuje nepřehledné množství potravin obsahujících probiotika. Nejčastějšími probiotickými výrobky rozumíme funkční potraviny jako kysané mléčné výrobky a nápoje, zmrzliny, ale i výrobky neobsahující mléko, například cereální probiotické výrobky, ovocné a zeleninové výrobky či probiotické čokolády. V této práci je pozornost zaměřena na probiotika obsažená v doplňcích stravy.

Trh probiotik v podobě doplňků stravy je dnes mnohem rozmanitější a aktivnější než trh probiotik obsažených v mléčných výrobcích. Doplnky stravy se prodávají v mnoha různých provedeních, nejčastěji ve formě kapslí, tablet nebo kapek. Nejvíce používané doplňky stravy jsou kapsle a lyofilizované prášky. [12] V Tabulce 3 jsou uvedeny údaje o běžně používaných probiotických přípravcích – doplňcích stravy.

**Tabulka č. 3: Souhrn probiotických preparátů [5]**

Probiotický výrobek	Složka	Doporučené dávkování
Mutaflor (Ardeypharm GmbH, Herdecke, Německo)	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917.	$2,5 \times 10^9$ až $25 \times 10^9$ bakterií na kapsli. Dávka pro dospělého 1 nebo 2 kapsle denně.
Proviva (Skanemejerier, Malmo, Švédsko)	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v a ovesné složky.	Nápoj obsahující ovesné vločky, $5 \times 10^7$ CFU / ml. Doporučená dávka 500 ml.
Synbiotic 2000 Forte (Medipharm, Kagerod, Sweden and Des Moines, IA, USA)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 5-33: 3, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 32-77: 1, <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 19, <i>L. plantarum</i> 2362, inulin, ovesné otruby, pektin a rezistentní škrob.	Sáček obsahuje $10^{10}$ bakterií každého druhu a 10 g prebiotické vlákniny. Podáváno v dávkách 12 g (1 sáček) denně po dobu 15-ti dnů.
Trevis (Christen Hansen, Hørsholm, Denmark)	<i>L. acidophilus</i> LA5, <i>Lactobacillus</i> <i>bulgaricus</i> , <i>B. lactis</i> Bb-12 a <i>Streptococcus thermophilus</i> .	$4 \times 10^9$ CFU / kapsle. Jedna kapsle třikrát denně.
VSL#3 (Ferring Pharmaceuticals, West Drayton, UK)	Čtyři druhy rodu <i>Lactobacillus</i> ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i> ), tři druhy rodu <i>Bifidobacterium</i> ( <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> ) a jeden druh <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> .	Prášek se podává s vodou nebo před jídlem. Jeden sáček obsahuje $4,5 \times 10^{11}$ BMK. K dostání také jako kapsle obsahující $2,25 \times$ $10^{11}$ bakterií. Dávky pro dospělé jedince od 0,5 do 8 sáčků (2 až 32), tobolky v závislosti na aktuálním zdravotním stavu. 6 g jednou denně po dobu 12 měsíců.
Linex Forte (Lek Pharmaceuticals d.d., Ljubljana, Slovinsko)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 a <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12.	Tobolka obsahuje $10^9$ bakterií každého druhu. Doporučené dávkování pro dospělé je jedna tobolka třikrát denně.
Biopron Forte (Valosun, Brno, ČR)	Kombinace probiotických bakterií ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> ) a probiotických kvasinek <i>Saccharomyces boulardii</i> doplněné o prebiotika inulin a fruktooligosacharidy.	$5 \times 10^9$ CFU / tobolka. Doporučená dávka pro dospělé jedince 1 tobolka 1–2× denně.

## 4 REKOMBINANTNÍ DNA TECHNOLOGIE A REKOMBINANTNÍ PROBIOTIKA

Rekombinantní DNA technologie jsou definovány jako soubor technik umožňujících přenos genu z jednoho organismu do jiného organismu. Rozvoj těchto technologií vedl k obrovským pokrokům ve vývoji prospěšných látek a zasahuje i do oblasti probiotik. [3]

Zatímco probiotika podávané jako jediný druh MO nebo jako směs druhů MO, rekombinantní probiotika se stále více používají jako nástroj pro expresi a cílené dodání nativních nebo rekombinantních proteinů v oblasti výživy a zdraví. To umožňuje eliminovat ve velkém měřítku potřebu čištění proteinů. Koncept "bioléciv" je založen na orálním podávání živých rekombinantních mikroorganismů pro prevenci nebo léčbu různých onemocnění. [3] Jejich bezpečnost, probiotické účinky a schopnosti přežít průchod trávicím traktem, z mnohých dělá vhodné kandidáty pro cílení terapeutických molekul. [13]

### 4.1 Využití rekombinantních probiotik v potravinářství

Výhledově by rekombinantní probiotika mohly vnést do potravinářského průmyslu mnoho výhod. Některé z nich jsou uvedeny níže.

#### 4.1.1 *Lactobacillus paracasei* NFBC 338

Bylo hodnoceno chování rekombinantního probiotického kmene *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, který obsahuje gen glykosyltransferázy *Pediococcus parvulus* (zodpovědný za produkci beta-glukanu), při výrobě jogurtu. V průběhu výroby a skladování jogurtu byly významně vylepšeny jogurtové texturní vlastnosti v důsledku dvojnásobného zvýšení viskozity. Nebyl nalezen žádný vliv na růst a životaschopnost jogurtových kultur (*Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*). Rekombinantní probiotický kmen si zachovává vysokou životaschopnost ( $>10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) během skladování. Při výrobě *in situ* beta-glukanu nebyly ovlivněny pH, titrační kyselost nebo proteolytická aktivita kultur. Tyto výsledky ukazují výhodné funkční vlastnosti mikrobiálně produkovaného beta-glukanu v jogurtu. [16]

#### 4.1.2 Rekombinantní *Bacillus subtilis*

Rekombinantní probiotický *Bacillus subtilis* s povrchovou expresí Ara h2 pomáhá snížit anafylaxe u myši vyvolané arašídou. Potravinové alergie jsou závažné a někdy až fatální stavy. Nejčastější příčinou smrtelných reakcí s potravinovou alergií jsou právě alergie na arašídou. Rekombinantní *B. subtilis* sporuluje. Spory *Bacillus subtilis* jsou považovány za nepatogenní. Vzhledem k jejich bezpečnosti a stabilitě se používají pro dodání heterologních antigenů do gastrointestinálního traktu. [21]

#### 4.1.3 *Escherichia coli* Nissle 1917

Omega-3 mastné kyseliny, včetně kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dokosaheptaenové kyseliny (DHA), mají příznivý vliv na lidské zdraví. Probiotické bakterie *Escherichia coli* Nissle nejsou schopné produkovat EPA nebo DHA. *Escherichia coli* Nissle byl transformován plazmidem nesoucím shluk genů EPA/DHA, který byl dříve izolován z mořské bakterie. Rekombinantní probiotické bakterie *E. coli* Nissle produkující EPA/DHA mohou být použity jako bezpečný, alternativní a ekonomický zdroj při průmyslové a farmaceutické výrobě EPA a DHA. [19]

## 4.2 Využití rekombinantních probiotik ve zdravotnictví

Během posledních několika let bylo prokázáno velké množství zdravotních výhod rekombinantních BMK zejména laktokoků a laktobacilů. Nedávný výzkum se zabývá rekombinantní laktokoky a laktobacily jako vektory. Zaměřuje se zejména na prevenci a léčbu zánětlivých onemocnění střev (IBD) rekombinantními laktokoky a laktobacily schopnými syntetizovat a produkovat antiproteázy a antioxidační enzymy. Další výzkum se zabývá léčbou autoimunitních onemocnění s využitím rekombinantní *L. lactis* produkujících autoantigenní peptidy. [13]

Rekombinantní probiotika mohou být úspěšně využita pro přípravu různých léčiv jako jsou antimikrobiální látky. Mohou být využita jako vektory pro genovou terapii. Pro budoucí vývoj mají geneticky modifikovaná probiotika, kterým se stanoví kritéria bezpečnosti, velký význam. Jejich potenciál tkví v řešení nových přístupů k prevenci a léčbě různých lidských a zvířecích patologických stavů. [17]

### 4.2.1 Vakcíny

V průběhu posledních 25 let bylo studováno použití potravinářských mikroorganismů při přípravě rekombinantních vakcín pro expresi cizorodých genů v hostiteli a jako vektorů pro doručení proteinu, které otevírají nové cesty vakcinologii. Vzhledem k tomu, že orální imunizace je prospěšná z hlediska nákladů, pohodlí pacienta a ochrany sliznic tkání, používání potravinářských organismů může vést k přípravě velmi vhodných vakcín. Organismy v současné době používané pro tento účel jsou bakterie (*Lactobacillus* a *Bacillus*), kvasinky, řasy, rostliny a druhy hmyzu. [11]

*Escherichia coli* se vyznačuje velmi vysokou produktivitou při syntéze cizorodých proteinů, ale antigeny musí být čištěny z důvodu eliminace endotoxinu před bezpečným použitím u lidí. V těchto buňkách se často vytváří nerozpustné, nesprávně složené, nefunkční proteiny. U buněk rodu *Lactobacillus* tomu tak není. [11]

Dosud bylo vyvinuto několik orálních vakcín, které však jsou složeny z oslabených forem choroboplodných patogenů a tedy existuje riziko reverze do patogenních forem. Kromě toho výroba těchto očkovacích látek obvykle vyžaduje vysokou úroveň biologické bezpečnosti zařízení, které nejsou potřebné pro výrobu podjednotkové vakcíny s využitím BMK. Proto je nezbytné překonat výše uvedená omezení a vyvinout nové přístupy pro rozvoj podjednotkových vakcín. [11]

Řešení se nabízí použitím neškodného organismu jako expresního hostitele pro rekombinantní vakcíny. Potravinářské organismy mohou sloužit zároveň jako biologické továrny a jako prostředek pro orální podání podjednotkové vakcíny. Tím by se mohlo předejít nákladným čistícím procesům. Tento postup nazýváme food-grade vakcíny (FGVs), tedy rekombinantní podjednotkové vakcíny produkované v bezpečném organismu, který rovněž může sloužit pro dodání vakcíny. FGVs představují vynikající prostředek pro přípravu nízkonákladových a snadno aplikovatelných očkovacích látek s potenciálem univerzálního pokrytí. Bylo vypracováno několik systémů pro výrobu potravinových vakcín. Každý systém má specifické vlastnosti a omezení, které musí být hodnoceny při výběru nejvhodnější formy pro vývoj vakcíny. [11] Dále jsou uvedeny některé z druhů potravinových vakcín (FGVs).

#### 4.2.1.1 Vakcíny s využitím bakterií mléčného kvašení

Mnoho BMK bylo v průběhu posledních dvou desetiletí studováno jako nosiče a producenti rekombinantních proteinů. Většina probiotických BMK pro výrobu vakcín a jejich dodání

patří do rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, protože jsou obecně považovány za bezpečné. [11], [4] Dalším důvodem jsou jejich vhodné adjuvantní vlastnosti, mukoadhezivní schopnost, snadná genetická manipulace a dostupnost průmyslových výrobních procesů. Hlavní druh BMK použitý pro vývoj potravinových vakcín (FGVs) představuje *Lactococcus lactis*. S jeho využitím byly připraveny vakcíny vůči několika virovým a bakteriálním patogenům např. vakcína namířena proti lidskému papilomaviru E7. Po dokončení klinických studií by se mohla stát první schválenou vakcínou pro terapii založenou na bázi BMK, které umožní přípravu dalších aplikací včetně jiných vakcín. [11]

#### 4.2.1.2 Vakcíny s využitím *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* je gram-pozitivní bakterie se statutem GRAS. Je používán jako probiotikum pro lidskou a zvířecí spotřebu. Jedinečnou charakteristikou těchto bakteriálních druhů je tvorba endospor, kdy nepřijímá živiny. Je zajímavé, že zralá spora přežívá v metabolicky spící fázi za extrémních teplot, vysychání, vystavení rozpouštědel a jiných škodlivých chemických látek. Díky těmto vlastnostem je spora atraktivní pro přípravu nosičů pro orální vakcinaci, protože spóry působí jako tepelně stabilní nosiče a lze je vyrábět při nízkých nákladech prostřednictvím zavedených průmyslových procesů. [11]

Studie rekombinantních *B. subtilis* na bázi vakcíny ukázaly, že indukují účinnou imunoprotektivní odpověď proti několika patogenům bez nutnosti používání pomocných látek. Celkově lze říci, že schopnost vakcín na bázi *B. subtilis* vyvolat silnou odezvu imunoprotektivity je dobře prokázána. [11]

#### 4.2.1.3 Vakcíny s využitím buněk kvasinek

Druhy kvasinek jsou používány při expresi biofarmaceutik pro průmyslové účely. Příslušné atributy těchto expresních hostitelů zahrnují status GRAS. Mají schopnost provádět různé posttranslační modifikace heterologních proteinů. Nevýhodou je hyperglykosylace rekombinantních proteinů, nicméně tento aspekt je částečně řešen vytvořením kmenů, které jsou defektní pro *N*-glykosylaci. Použití buněk *Saccharomyces cerevisiae* exprimujících antigen (vakcínu) pro provádění inovačních přístupů imunizace vede k nízkonákladovým vakcínám bez potřeby čištění. Vakcíny založené na buňkách kvasinek byly připraveny proti nepřenositelným chorobám. Co se týče vakcín proti infekčním onemocněním, bylo připraveno deset prototypů kvasinkových vakcín vůči různým patogenům, z nichž byla většina virových patogenů a pouze jeden byl parazit *Plasmodium*. Pozitivní se také jeví studie vakcíny proti viru hepatitidy C. Kromě běžného *S. cerevisiae* se využívá několik dalších druhů kvasinek. Vakcíny proti viru hepatitidy B a *Plasmodium* byly připraveny v *Pichia pastoris*. Pozitivní výsledky získané s těmito vakcínami jsou spojeny s adjuvantní aktivitou kvasinek, protože úzce interagují s imunitním systémem. [11]

#### 4.2.1.4 Výhledy do budoucna

Ačkoli bakteriální systémy využívajících genových manipulací nabízejí rychlý vývoj a krátké výrobní časy, syntéza komplexních antigenů, které vyžadují posttranslační modifikace je obtížný úkol, a v některých případech není schůdný. V případě bakterií na bázi živé vektorové vakcíny, je další nevýhodou riziko uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí z hostitele po imunizaci. Kvasinky jsou považovány za atraktivní systém s ohledem na rychlý růst, vysoký výnos biomasy, jednoduchou manipulaci a znalosti průmyslové výroby. Nicméně, hyperglykosylace (přebytek mannózových zbytků) je faktor, který musí být hodnocen případ od případu, protože může vést k nežádoucím imunogenním účinkům. Obecně platí, že potravinové vakcíny (FGVs) mají tu výhodu, že mají přijatelnou stabilitu v lyofilizovaných preparátech, které vyvolávají imunitní odpovědi při perorálním podání. [11]

Už více společností začalo investovat do realizace potravinových vakcín. Jedna společnost vyrábí vakcíny na bázi *B. subtilis* (SporeGen®), a alespoň jedna společnost zavedla výrobu vakcín na bázi kvasinek a nabízí tak nové terapie v krátkodobém horizontu (GlobeImmune). Předpokládá se, že zařazení nových druhů kvasinek pro výrobu tohoto typu vakcín, jakož i pro rozšíření nabídky cílových nemocí bude mít pozitivní dopad na možnosti rozvoje nízkonákladových vakcín. [11]

Technologie na bázi BMK pro výrobu biologických farmaceutik byl vyvinut firmou Bioneer. Podobně, ActoGeniX vyvinutý ActoBiotics TM, který poskytuje technologii na bázi *L. lactis* pro výrobu a dodávku biofarmaceutik jako protizánětlivých interleukinů (pro zánětlivé střevní onemocnění a celiakie), protilátek neutralizujících toxin (*Clostridium difficile*), antigeny (pro celiakii a diabet 1. typu), alergeny (pro alergické astma) a protilátky a konjugáty peptid-toxinu (cílená modulace mikrobiomy). [11]

Ačkoli několik potravinových vakcín (FGVs) je v současné době v klinických studiích se slibnými perspektivami, je třeba některé problémy ještě překonat s ohledem na globální zdraví. Patří mezi ně například rozšíření dostupnosti postupů genetického inženýrství pro optimalizaci exprese imunogenů, optimalizace pro perorální podání vakcíny (např. využití nových pomocných látek), provádění strategií k udržení životaschopnosti/ bioaktivity při skladování při pokojové teplotě nebo podrobná charakteristika adjuvantní aktivity potravinářských expresních hostitelů. [11]

#### 4.2.2 Produkce kyseliny gama-aminomáselné (GABA) BMK

Kyselina gama-aminomáselná (GABA) je neproteinová aminokyselina, která je v přírodě velmi rozšířená u MO, rostlin a zvířat, a to i v hydrotermálních systémech. Je dobře známo, že GABA působí u zvířat jako hlavní inhibiční neurotransmitter. Kromě toho GABA má několik dobře charakterizovaných fyziologických funkcí jako je indukce hypotenze, diuretické účinky, a uklidňující účinky. Vzhledem k tomu, že GABA má velký potenciál jako bioaktivní složka v potravinách a léčivech, započal vývoj funkčních potravin obsahujících GABA a tento vývoj stále pokračuje. Použití GABA produkujících kmenů BMK jako startovacích kultur ve fermentačních procesech může přispět k dosažení biosyntetické produkce GABA. [4]

Spotřeba potravin obohacených o GABA napomáhá snížení vysokého systolického krevního tlaku u spontánně hypertenzních potkanů a mírně hypertenzních lidí. Dekarboxylázy glutamové kyseliny (GAD) katalyzují nevratnou  $\alpha$ -dekarboxylaci kyseliny glutamové za vzniku GABA. GAD může být produkován mnoha MO, včetně bakterií, hub a kvasinek. [4]

V posledních letech se mnoho studií zaměřuje na výrobu GABA pomocí BMK. Studie je zaměřena na druhy BMK produkujících GABA, izolační metody, způsoby, jak zlepšit produkci GABA a potenciální aplikace GABA produkované pomocí BMK. [4]

#### 4.2.3 Rekombinantní laktokoky

Rekombinantní laktokoky produkující antiproteázy by mohly být využity k prevenci a boji se zánětlivými střevními onemocněními (IBD) jako jsou ulcerativní kolitida a Crohnova nemoc. [13]

Střevní tkáň u pacientů vykazuje zvýšenou proteolytickou aktivitu, což je způsobeno buď vysokou expresí proteáz nebo sníženou účinností nebo expresí endogenních inhibitorů proteáz. Elafin je endogenní inhibitor proteázy v lidském střevě a byl studován pro jeho

protizánětlivé vlastnosti na povrchu sliznic. Transgenní myši produkující lidský elafin jsou chráněny proti kolitidě u různých myších modelů IBD. Tato zjištění naznačují, že endogenní antiproteázy, jako je například elafin, mohou přirozeně chránit proti střevním zánětům. Probiotické bakterie, *L. lactis* a *L. casei*, byly manipulovány genetickým inženýrstvím pro produkci a sekreci elafinu a mohou být podávány orálně. V tlustém střevě brání zánětu, urychlují hojení sliznice tlustého střeva a obnovují homeostázu u myší. Kultury lidských střevních epiteliálních buněk kultivovány s těmito BMK schopnými produkovat elafin jsou chráněny proti zánětlivým poškozením. [13]

#### 4.2.4 Rekombinantní *Lactobacillus paracasei*

Rekombinantní probiotický *L. paracasei* snižuje adhezi, invazi a transepitální translokaci patogenní *Listeria monocytogenes* do Caco-2 buněk. *L. monocytogenes*, významný patogen potravinářského řetězce, je přenášen prostřednictvím kontaminovaných potravin. Strategie k zabránění přenosu *L. monocytogenes* může potenciálně minimalizovat infekci u vysoce rizikových populací. Probiotické bakterie divokého typu byly schopny zabránit infekci *L. monocytogenes in vitro*. Na rozdíl od toho probiotický *L. paracasei* zablokuje adhezi, invazi a translokaci *L. monocytogenes* při interakci s hostitelskou buňkou pomocí receptoru a tím chrání buňky před infekcí. [18]

### 4.3 Genetické aplikace v potravinářství

Genetické aplikace se už dříve používaly k zušlechtní potravin a potravinářských výrobků. Pomocí šlechtění nebo spontánní mutace bylo vyrobeno velké množství odrůd rostlin, plemen zvířat a mikrobiálních kmenů. Nejnovější techniky rekombinantní DNA byly použity v potravinářské technologii k vytváření tzv. "geneticky modifikovaných potravin" (GM potraviny). Jako příklady lze uvést transgenní brambory schopny působit jako perorální vakcína proti choleře, rekombinantní vinné kvasinky, které produkují víno s ovocnou vůní nebo transgenní krávy a ovce, jejichž mléko obsahuje vysoký podíl farmaceutických proteinů. Pro budoucnost potravinářské biotechnologie byl zásadní rok 2001, kdy byla publikována první verze lidského genomu. To umožňuje hledání genů, které se aktivují nebo deaktivují v reakci na specifické živiny. Každý den přibývá kompletně sekvencovaných genomů živočichů, rostlin nebo mikroorganismů, jako jsou kvasinky a probiotické bakterie včetně *Bifidobacterium bifidum*. Biotechnologické aplikace v potravinách a výživě jsou čím dál vyspělejší. [15]

#### 4.3.1 Rekombinantní *Lactobacillus plantarum*

Rekombinantní *Lactobacillus plantarum* napomáhá při zvýšené produkci kyseliny D-mléčné z obnovitelných zdrojů. D-mléčná kyselina se používá jako monomer při výrobě polymeru poly-D-mléčné kyseliny, který se používá pro vytvoření tepelně odolného stereokomplexu. Byl připraven rekombinantní kmen *L. plantarum* NCIMB 8826 schopný produkovat kyselinu D-mléčnou. Nynější přístupy jsou zaměřeny na dosažení vysoké produkce kyseliny D-mléčné z biomasy obsahující cukry, především z kukuřičné píče a z extraktu ze sójové mouky, s cílem vyrábět cenově efektivní, vysoce teplotně stabilní biologicky rozložitelné plasty. [14]

## 5 BEZPEČNOST NATIVNÍCH A REKOMBINANTNÍCH PROBIOTIK

Teoreticky mohou být probiotika zodpovědné za čtyři typy nežádoucích účinků u náchylných jedinců: systémových infekcí, škodlivých metabolických aktivit, nadměrné imunitní stimulace a přenosu genů. Nicméně v praxi existují jen vzácné případy infekcí u lidí způsobené laktobacily a bifidobakteriemi. Tento nedostatek sahá napříč všemi věkovými skupinami a týká se také jedinců s narušeným imunitním systémem. [1] U několika kmenů probiotických bakterií byly provedeny tradiční studie toxicity s negativním výsledkem. Nové druhy a další specifické kmeny probiotických bakterií jsou neustále testovány. Nelze totiž předpokládat, že tyto nové probiotické organismy sdílejí dříve prokázanou bezpečnost testovaných nebo tradičně používaných kmenů. Před jejich začleněním do výrobků jsou nové kmeny pečlivě posuzovány a testovány na bezpečnost a účinnost. Pokud funkční potraviny mají být ve stále větším množství k dispozici na celosvětovém trhu s potravinami, je nutné zajistit, aby spotřebitel obdržel přesné informace a jasná sdělení o zdravotních výhodách. [20]

K posouzení bezpečnosti probiotických kmenů mohou být použity tři přístupy: studie vlastností kmene, studie farmakokinetiky kmene (přežití, aktivita ve střevě, závislost odpovědi na dávce, fekální a slizniční obnova) a studie interakcí mezi kmenem a hostitelem. Přežití probiotik v zažívacím traktu, jejich translokace, kolonizační vlastnosti a osud jejich aktivních složek musí být znám z důvodu předpovězení nejen pozitivních účinků, ale i vedlejších účinků. Přežívání probiotik na různých úrovních gastrointestinálního traktu, se liší mezi kmeny. [20]

BMK jako jsou enterokoky, které jsou důležité pro dozrávání a vývoj aroma některých sýrů a uzenin, obzvláště těch, které se vyrábí v oblasti Středozemního moře, mohou zkazit zpracované maso a pak se mohou chovat jako nozokomiální patogeny způsobující bakteremie, endokarditidy a další infekce u lidí. Některé kmeny enterokoků jako je *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* mohou nést plasmidy s geny kódujícími virulentní faktory, odolnost vůči antibiotikům, adhesinům, invasinům a haemolysinům. Z tohoto důvodu je nutné, aby každý kmen měl pečlivě vyhodnocenu přítomnost determinantů virulence a citlivost vůči klinicky používaným antibiotikům a to ještě předtím, než je vůbec považován za vhodný jako probiotikum. [3]

## **6 CÍL PRÁCE**

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo pojednat o probioticích s důrazem na rekombinantní probiotika a jejich využití.

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo provést izolaci DNA v kvalitě vhodné pro polymerázovou řetězovou reakci ze dvou probiotických doplňků stravy. Následně pomocí PCR prokázat přítomnost bakteriální DNA.

## II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 7 MATERIÁL A METODY

#### 7.1 Použité probiotické doplňky stravy

- Linex<sup>®</sup> Forte

Doplňěk stravy

Výrobce: Lek Pharmaceuticals d.d.

1526 Ljubljana, Slovinsko

Email: [info@lek.si](mailto:info@lek.si)

Dovozce: Sandoz s.r.o., Praha

Email: [office.cz@sandoz.com](mailto:office.cz@sandoz.com)

Datum spotřeby: 03/2017

Složení (1 tobolka):  $1 \times 10^9$  kolonií bakterií *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) jako lyofilizát a  $1 \times 10^9$  kolonií bakterií *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (BB-12).

- Linex<sup>®</sup> Baby

Doplňěk stravy

Výrobce: Lek Pharmaceuticals d.d.

1526 Ljubljana, Slovinsko

Email: [info@lek.si](mailto:info@lek.si)

Dovozce: Sandoz s.r.o., Praha

Email: [office.cz@sandoz.com](mailto:office.cz@sandoz.com)

Datum spotřeby: 06/2012

Složení (1 sáček):  $1 \times 10^9$  kolonií živých mléčných bakterií druhu *Bifidobacterium animalis* jako lyofilizát a maltodextrin.

#### 7.2 DNA bakteriálního kmene pro pozitivní kontroly

- *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476

Bakteriální DNA byla poskytnuta vedoucí práce doc. RNDr. Alenou Španovou, CSc. DNA byla izolována pomocí fenolové extrakce a následně vyředěna na koncentraci  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ .

#### 7.3 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, New Jersey, USA)
- Centrifuga miniSpin plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Inkubační box UVC/T-AR, DNA/RNA, UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)

- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- NanoPhotometer (Implen, München, Německo)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermocycler Minicycler™ (BIO-RAD Lab., USA)
- Transilluminátor TVR- 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Další laboratorní pomůcky (laboratorní sklo, špičky z umělé hmoty, Eppendorfovy zkumavky, umělohmotný materiál, atd.)

## 7.4 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid ( $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fluorescenční barvivo GoldView (Ecoli, Bratislava, SR)
- Hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid sodný (Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Isoamylalkohol (Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Nanášecí pufr Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-báze (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) (Serva, Heidelberg, SRN)

## 7.5 Roztoky

Následující roztoky byly připraveny podle upravených postupů ze skript Španové a Ritticha (2010). [22]

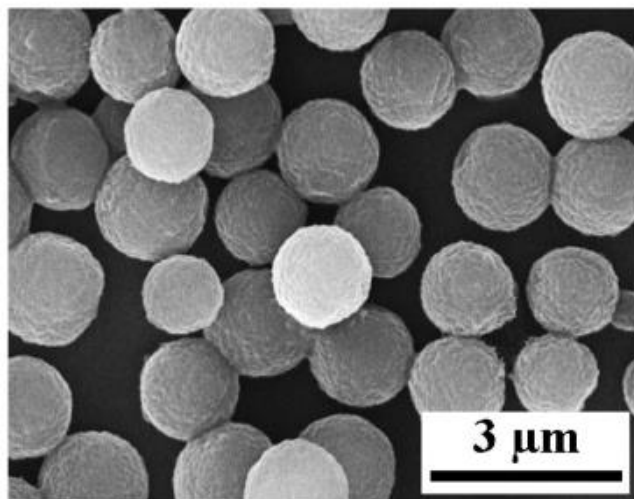
### 7.5.1 Roztoky pro lyzi bakteriálních buněk

- 0,5 M EDTA (186,1 g EDTA, 800 ml destilované vody, NaOH pro úpravu pH na 8,0)
- 1 M Tris-HCl (Tris-báze 121 g, 80 ml destilované vody, koncentrovaná HCl pro úpravu pH na 7,8)
- Lyzační roztok A (10 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), destilovaná voda do objemu 100 ml)
- Lyzační roztok B (lyzační roztok A s přidavkem lysozymu, 3 mg/ml)
- 20% SDS (20 g SDS, sterilní destilovaná voda do objemu 100 ml)

- Proteináza K (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1 mg proteinázy K, 10 ml destilované vody)

### 7.5.2 Magnetické mikročástice

Pro izolaci DNA z hrubých lyzátů buněk byly použity magnetické mikročástice Fkol B 100 ox (Ing. D. Horák, CSc., Akademie věd, Praha, ČR), které jsou zobrazeny na Obrázku 2. Vlastnosti těchto částic jsou uvedeny v Tabulce 4.



**Obrázek č. 2:** Magnetické mikročástice *P(HEMA-co-GMA)* [24]

**Tabulka č. 4:** Vlastnosti magnetického polymerního nosiče Fkol B 100 ox

Polymer	Fe [% hm]	Průměr nosiče [ $\mu\text{m}$ ]	PDI	-COOH [ $\text{mM} \cdot \text{g}^{-1}$ ]
<i>P(HEMA-co-GMA)</i>	6,6	1,0	1,05	2,61

*P(HEMA-co-GMA)* – poly(2-hydroxyethyl methakrylát-co-glycidyl methakrylát), PDI – index polydisperzity (poměr hmotnosti a počtu nosičů o průměrné velikosti)

### 7.5.3 Komponenty pro PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- 10 $\times$  PCR Blue Buffer (PCR reakční pufr kompletní, obsahující  $\text{MgCl}_2$ ) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Směs dNTP (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery F eub a R eub (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/ $\mu\text{l}$ ) (Top-Bio, Praha, ČR)

### 7.5.4 Roztoky pro gelovou elektroforézu

- 5 $\times$  TBE pufr (54 g Tris-báze, 27,5 g kyseliny borité, 600 ml destilované vody, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)). Před použitím byl 10 $\times$  naředěn
- Barvicí lázeň (100  $\mu\text{l}$  roztoku ethidiumbromidu 5 mg/ml, 500 ml destilované vody)
- DNA standard (100 bp žebříček), obsahuje fragmenty DNA o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200, 1 500 bp)
- Nanášecí pufr Yellow load (6 $\times$  koncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Fluorescenční barvivo GoldView (Ecoli, Bratislava, SR)

## 7.6 Metody

### 7.6.1 Příprava hrubých lyzátů buněk z výrobků

- Z probiotického doplňku stravy Linex<sup>®</sup> Forte byla sterilně odebrána tobolka, která byla ořena ethanolem. Její obsah byl důkladně rozpuštěn v 5 ml lyzačního roztoku B s lysozymem a poté inkubován při laboratorní teplotě asi 1 hodinu.
- Z doplňku stravy Linex<sup>®</sup> Baby byl obsah sáčku rozpuštěn v 5 ml lyzačního roztoku B s lysozymem a inkubován při laboratorní teplotě asi 1 hodinu.
- Směsi byly zcentrifugovány a k 500 µl sedimentu bylo přidáno 25 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K (100 µg/ml).
- Po promíchání byly vzorky inkubovány 1 hodinu v inkubátoru při 55 °C.
- Hrubé lyzáty buněk byly uchovány při -20 °C a poté byly použity pro izolaci DNA magnetickými mikročásticemi.

### 7.6.2 Izolace DNA magnetickými mikročásticemi

- Izolace celkové DNA z hrubého lyzátu byla provedena pomocí magnetických mikročástic F-kol B 100 ox.
- Složení separační směsi a pořadí přidávání složek je uvedeno v následující Tabulce 5.

**Tabulka č. 5:** *Separací směs pro izolaci DNA*

Krok	Složka	Objem [µl]
1	NaCl (5 M)	200
2	Hrubý lyzát buněk	150
3	PEG 6000 (40 %)	100
4	Magnetické částice (2 mg/ml)	50
Celkem		500

- Výsledná koncentrace složek PEG 6 000 je 8 % [hm], NaCl 2,0 M.
- Směs všech složek byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě.
- Poté byla směs umístěna do magnetického separátoru. Magnetické částice s navázanou DNA byly separovány 10 minut při laboratorní teplotě.
- Po uplynutí uvedené doby byl opatrně odebrán supernatant a do zkumavky bylo přidáno 500 µl 70% ethanolu.
- Směs byla promíchána a částice byly separovány pomocí magnetického separátoru. Po dvou minutách byl opatrně odebrán ethanol a DNA navázaná na magnetické nosiče byla znova promyta ethanolem stejným způsobem (70%, 250 µl).
- Zbýlý ethanol byl odpařen a DNA absorbovaná na magnetických částicích byla eluována do 100 µl TE pufru při laboratorní teplotě.
- Po 30 minutách byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát obsahující DNA byl odebrán do čistých mikrozkuvek.

### 7.6.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

- Koncentrace izolované DNA byla zjištěna spektrofotometricky pomocí přístroje NanoPhotometer, kde byla měřena absorbance proti TE pufru.

- Absorpce byla proměřena v rozmezí vlnových délek 230– 320 nm.
- Z hodnoty absorbance pro 260 nm byla zjištěna koncentrace DNA. Z poměru hodnot  $A_{260}/A_{280}$  byla posouzena čistota vzorku DNA.

#### 7.6.4 Polymerázová řetězová reakce pro doménu *Bacteria*

- Byla použita PCR s primery F eub a R eub. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 6.
- Všechny komponenty pro PCR byly před použitím rozmrazeny, promíchány a zcentrifugovány.
- Byla připravena směs pro PCR o objemu 25  $\mu$ l.
- Komponenty byly smíchány v pořadí uvedeném v Tabulce 7.
- Negativní kontrola byla připravena analogickým způsobem, matrice DNA byla nahrazena stejným množstvím PCR vody.
- Obdobným způsobem byla připravena pozitivní kontrola, která obsahovala 1  $\mu$ l DNA bakteriálního kmene *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476 (10  $\mu$ g/ $\mu$ l)
- Vzorky se všemi složkami PCR směsi byly po promíchání umístěny do thermocycleru s nastaveným specifickým programem podle Tabulky 8 a amplifikovány.

**Tabulka č. 6:** *Specifické primery pro doménu Bacteria* [23]

Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktu PCR
F eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp
R eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	

**Tabulka č. 7:** *Směs pro PCR*

Pořadí	Komponenta	Objem pro PCR [ $\mu$ l]
		<i>Bacteria</i>
1.	Voda pro PCR	19,0
2.	10 $\times$ reakční pufr kompletní	2,5
3.	Směs dNTP (10 mM)	0,5
4.	Primer F eub (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5
5.	Primer R eub (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5
6.	<i>Taq</i> DNA- polymeráza (1 U/ $\mu$ l)	1,0
7.	Matrice DNA	1,0

**Tabulka č. 8:** Amplifikační program

Krok	Doména <i>Bacteria</i> (Program EUBACTER)		
1	95 °C	5 min	30× krok 2–4
2	95 °C	30 s	
3	55 °C	30 s	
4	72 °C	30 s	
5	72 °C	5 min	

### 7.6.5 Gelová elektroforéza produktů PCR

- Po dokončení PCR byly produkty PCR detegovány gelovou elektroforézou na 1,2 % agarózovém gelu.
- Byl připraven 1,2 % agarózový gel z 0,84 g agarózy a 70 ml 0,5× TBE pufru.
- Suspenze byla rozvařena v mikrovlnné troubě a po vychladnutí cca na 60 °C bylo ke směsi přidáno fluorescenční barvivo GoldView (0,5 µl barviva/100 ml).
- Směs byla vylita do předem připravené vaničky s hřebínkem a ponechána 45 min ztuhnout. Následně byl odstraněn hřebínek.
- K promíchaným produktům PCR bylo přidáno 5 µl nanášecího pufru.
- Do vzniklých komůrek gelu byly postupně nanášeny směsi produktů PCR a nanášecího pufru (30 µl). Do jedné z komůrek byl nanesen DNA standard (100 bp žebříček) o objemu 5 µl.
- Gel byl vložen do elektroforetické vany a převrstven 0,5× TBE pufrem do výšky asi 3–5 mm nad gel. Elektroforéza probíhala při napětí 80 V asi 1,5 hod.
- Po skončení elektroforézy byl gel přenesen na transiluminátor, byl pozorován v UV světle o vlnové délce 305 nm.
- Gel byl fotograficky zdokumentován.

## 8 VÝSLEDKY

### 8.1 Zpracování vzorků doplňků stravy pro analýzu

Pro přípravu hrubých lyzátů buněk z probiotických výrobků bylo postupováno podle kapitoly 7.6.1. Přídavkem SDS došlo k lyzi bakteriálních buněk a přídavkem proteinázy K k degradaci proteinů.

#### 8.1.1 Linex<sup>®</sup> Forte

Z doplňku stravy Linex<sup>®</sup> Forte byly použity 2 tobolky každá o hmotnosti asi 0,4 g pro přípravu dvou paralelních stanovení a byly označeny jako tobolka č. 1 a tobolka č. 2. Sterilně odebrané tobolky byly ořeny ethanolem a jejich obsah byl rozpuštěn v 5 ml roztoku B s lysozymem a inkubován asi 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl přidán SDS a proteináza K podle postupu uvedeném v kapitole 7.6.1.

#### 8.1.2 Linex<sup>®</sup> Baby

Z výrobku Linex<sup>®</sup> Baby byl na přípravu hrubého lyzátu použit 1 sáček. Obsah sáčku o hmotnosti 1,5 g byl rozpuštěn v 5 ml roztoku B s lysozymem a inkubován asi 1 hodinu při laboratorní teplotě. Dále byl přidán SDS a proteináza K podle postupu uvedeném v kapitole 7.6.1.

Všechny takto přichystané hrubé lyzáty buněk byly uchovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby se předešlo degradaci DNA.

→ Byly připraveny hrubé lyzáty buněk z probiotických výrobků Linex<sup>®</sup> Forte (tobolka č. 1 a tobolka č. 2) a Linex<sup>®</sup> Baby.

### 8.2 Izolace DNA pomocí magnetického nosiče

Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk (150  $\mu\text{l}$ ) byla provedena pomocí magnetických mikročástic Fkol B 100 ox. Izolace byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 7.6.2. DNA byla eluována do 100  $\mu\text{l}$  TE pufru.

→ DNA byla eluována do TE pufru (100  $\mu\text{l}$ ) a magnetické mikročástice byly odseparovány.

### 8.3 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace a čistota DNA. Absorbance byla změřena pomocí přístroje NanoPhotometer v rozmezí vlnových délek 230–320 nm dle postupu v kapitole 7.6.3. Koncentrace DNA byla stanovena z hodnoty  $A_{260\text{nm}}$ . Z hrubých lyzátů buněk výrobků Linex<sup>®</sup> Baby a Linex<sup>®</sup> Forte (tobolka č. 1) byla izolovaná DNA o neměřitelné koncentraci. Výsledky stanovení jsou uvedeny v Tabulce 9.

**Tabulka č. 9:** *Spektrofotometrické stanovení DNA izolované*

Výrobek	A <sub>230nm</sub>	A <sub>260nm</sub>	A <sub>280nm</sub>	A <sub>320nm</sub>	A <sub>260nm</sub> /A <sub>280nm</sub>	c [ng/μl]	DNA [ng]
Linex <sup>®</sup> Forte (tobolka č. 2)	-0,107	0,015	0,012	0,001	1,273	3,5	350
Linex <sup>®</sup> Forte (tobolka č. 1)	Neměřitelné						
Linex <sup>®</sup> Baby (sáček)	Neměřitelné						

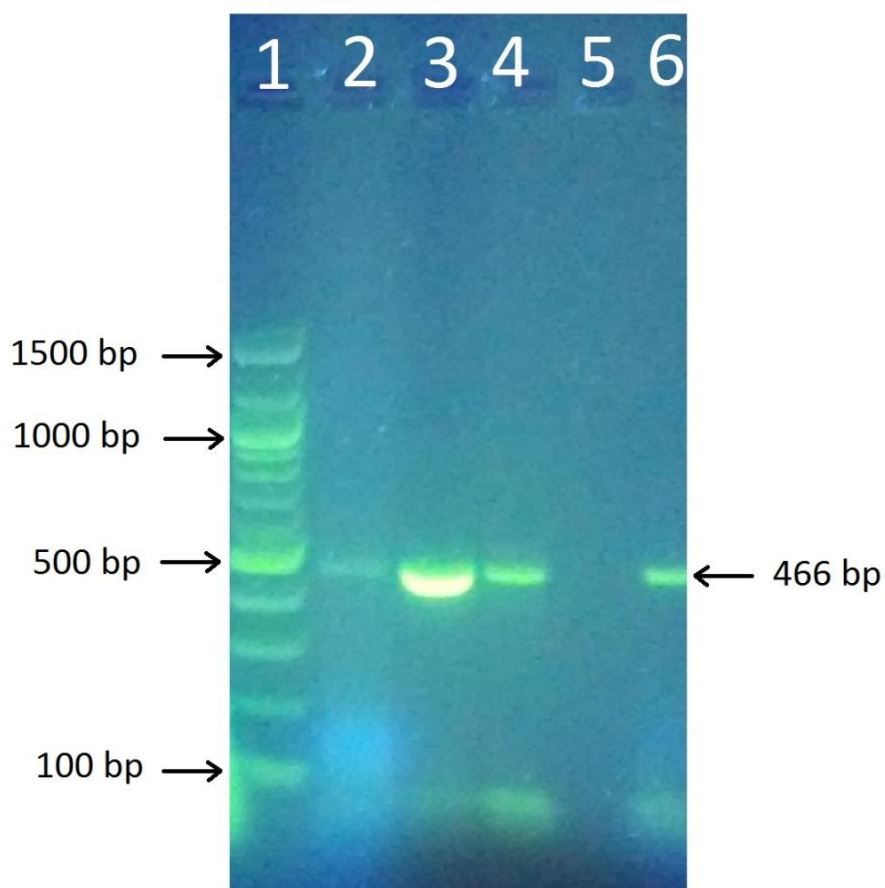
→ Z výrobku Linex<sup>®</sup> Forte (tobolka č. 2) byla izolovaná DNA o koncentraci 3,5 ng/μl, z výrobků Linex<sup>®</sup> Forte (tobolka č. 1) a Linex<sup>®</sup> Baby nebyla koncentrace DNA stanovena.

#### 8.4 Amplifikace DNA a detekce produktů PCR

Směsi pro PCR s primery pro doménu *Bacteria* byly namíchány podle postupu uvedeném v kapitole 7.6.4. Po dokončení amplifikačního programu byly produkty PCR detegovány pomocí gelové elektroforézy.

Důkaz přítomnosti produktů PCR byl proveden pomocí agarózové gelové elektroforézy. Velikost specifických produktů PCR byla 466 bp. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA bakteriálního kmene *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476. Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR je uvedena na Obrázku 3.

DNA izolovaná ze všech analyzovaných vzorků byla pomocí PCR amplifikována. Produkty PCR různé intenzity byly detegovány po amplifikaci DNA izolované z Linex<sup>®</sup> Forte (tobolka č. 1), Linex<sup>®</sup> Forte (tobolka č. 2) a Linex<sup>®</sup> Baby. Intenzita produktů PCR odráží množství DNA matrice přidané ke směsi pro PCR.



Běh	DNA	Detekce produktu PCR	Množství DNA [ng] pro PCR směs
1	DNA standard 100 pb		
2	Linex <sup>®</sup> Forte (tobolka č. 1)	+	neměřitelné
3	Pozitivní kontrola ( <i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 476) 10 ng/μl	+++	10
4	Linex <sup>®</sup> Baby	++	neměřitelné
5	Negativní kontrola	–	
6	Linex <sup>®</sup> Forte (tobolka č. 2)	++	3,5

– produkt PCR nedetegován

+, ++, +++ detegován produkt PCR různé intenzity

**Obrázek 3:** Agarósová gelová elektroforéza produktů PCR (466 bp) pro doménu *Bacteria*

→ Byly detekovány produkty PCR (466 bp) specifické pro doménu *Bacteria* po amplifikaci DNA ze všech výrobků.

→ Ve všech výrobcích byla prokázána přítomnost bakteriální DNA.

## 9 DISKUZE

### 9.1 Izolace DNA z probiotických výrobků

DNA byla izolována ze dvou probiotických výrobků (Linex<sup>®</sup> Forte a Linex<sup>®</sup> Baby) pomocí magnetických mikročastic. Bakteriální DNA byla izolována metodou reverzibilní imobilizace na pevné fázi za použití magnetických částic nesoucích na povrchu karboxylové skupiny. Magnetické částice mohou reversibilně vázat DNA v přítomnosti polyethylenglykolu (PEG) a chloridu sodného. Magnetické mikročastice nesoucí karboxylové skupiny byly použity pro izolaci DNA z různých typů výrobků. [24] Proto byly použity i v této práci. Výhodou použití magnetických částic je i možnost zakoncentrování analytu. V této práci bylo pro izolaci DNA použito 150  $\mu$ l hrubého lyzátu buněk, zatímco DNA byla eluována do 100  $\mu$ l TE pufru. [24]

Magnetické částice mají superparamagnetické vlastnosti, tzn. že vykazují magnetické vlastnosti pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Bez přítomnosti vnějšího magnetického pole se neshlukují a vytvářejí homogenní suspenzi. [22] Pomocí magnetického separátoru byly odseparovány částice s navázanou DNA. Po promytí byla DNA eluována do TE pufru, částice byly odseparovány a DNA byla použita pro amplifikaci. Tím se prokázalo, že DNA byla izolována v kvalitě vhodné pro PCR.

Klíčovým aspektem této metody je úspora času, snadná manipulace, možnost automatizace a miniaturizace procesu izolace DNA. [24] Přítomnost magnetických částic v separační směsi však může snížit citlivost PCR nebo může vést k falešně negativním výsledkům PCR. To může být způsobeno přítomností některých složek z roztoku nebo únikem kovových iontů, stabilizátorů a zbytků činidel používaných při jejich přípravě. [26] Částice Fkol B 100 ox použité v této práci interferenci v PCR neprojevovaly. [27]

### 9.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Je známo, že koncentraci i kvalitu DNA lze ověřit spektrofotometricky. [25] Koncentrace a čistota DNA byla stanovena pomocí přístroje NanoPhotometr, kde byla změřena absorbance v rozmezí vlnových délek 230–320 nm. Čistota DNA byla zjištěna z poměru absorbancí  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ . U probiotického výrobku Linex<sup>®</sup> Forte byl tento poměr 1,273, hodnoty adsorbancí byly však velmi nízké. Hodnota  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,8$  značí znečištění DNA bílkoviny. Jestliže platí podmínka  $A_{230\text{nm}} < A_{260\text{nm}}$ , znamená to, že izolovaná DNA nebyla znečištěna fenolem. Znečištění vzorků také může být způsobeno pomocnými látkami obsaženými v tobolkách a je nesnadné je odstranit. Spektrofotometricky byla cDNA měřitelná jen u jednoho vzorku (3,5 ng/ $\mu$ l) a u ostatních změřena nebyla.

U probiotického výrobku Linex<sup>®</sup> Forte (tobolka č. 2) byla koncentrace DNA stanovena na 3,5 ng/ $\mu$ l. Příčina malého množství izolované DNA byla pravděpodobně způsobena nutností rozpustit tobolku v relativně velkém objemu (5 ml roztoku B). Další příčinou může být nedostatečné narušení a lyze buněk (1 hod. při 55 °C). V další práci je třeba optimalizovat postup lyze buněk tj. přípravu hrubých lyzátů buněk. U výrobků Linex<sup>®</sup> Baby a Linex<sup>®</sup> Forte (tobolka č. 1) byla koncentrace DNA tak nízká, že nebyla na přístroji NanoPhotometr měřitelná. Pro amplifikaci DNA s primery specifickými pro doménu Bacteria však stačí velmi malé množství DNA, i DNA z několika bakteriálních buněk. [25] Z důvodu vyšší citlivosti metody, byly DNA izolované z obou výrobků podrobeny amplifikaci v PCR a detekci produktů PCR na agarózovém gelu.

### 9.3 Amplifikace bakteriální DNA pomocí PCR pro doménu *Bacteria*

Identifikace bakterií za použití PCR je rychlá a přesná metoda založená na specifických sekvencích primerů, které hybridizují s komplementárními sekvencemi DNA matrice. [26] DNA izolovaná z výrobků Linex<sup>®</sup> Forte a Linex<sup>®</sup> Baby byla amplifikována v PCR pro doménu *Bacteria* pomocí specifických primerů F-eub a R-eub podle programu EUBACTER. Primery byly převzaty z literatury. [23] Amplifikace probíhala v 30 cyklech. Amplifikacím předchází krok denaturace 95 °C/ 5 min, v posledním cyklu se syntéza komplementárního řetězce prodlouží na 5 min. [22]

Produkty PCR byly detekovány na předem připraveném 1,2% agarózovém gelu. [25] Byly na něj nanoseny se standardem (100 bp žebříček), pozitivní i negativní kontrolou. Jako negativní kontrola byla použita PCR směs, kdy místo DNA matrice byla přidána PCR voda. Tato kontrola slouží k odhalení případné kontaminace složek PCR. Pozitivní kontrola DNA *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476 byla použita pro kontrolu specifity PCR. Byla připravena smícháním PCR směsi s DNA matricí izolovanou pomocí metody fenolové extrakce (obvykle 1–10 ng/ PCR směs).

Po skončení elektroforézy byl gel obarven ethidium bromidem (0,5 µg/ml) po dobu 0,5–1 hod. Gel byl opláchnut v destilované vodě a umístěn na transiluminátor a vyhodnocen v UV světle při vlnové délce  $\lambda = 305$  nm.

Pomocí agarózové gelové elektroforézy byly podle očekávání [23] detekovány specifické produkty PCR o velikosti 466 bp. Různou intenzitu produktů PCR lze vysvětlit odlišným množstvím DNA ve směsích pro PCR.

## ZÁVĚR

Teoretická část bakalářské práce se zabývá probiotickými bakteriemi a jejich vlastnostmi s důrazem na rekombinantní probiotika. Pozornost se hlavně zaměřuje na jejich možné použití v praxi.

V experimentální části bakalářské práce byla z hrubých lyzátů buněk probiotických doplňků stravy Linex<sup>®</sup> Forte a Linex<sup>®</sup> Baby izolována DNA v kvalitě vhodné pro PCR. DNA byla izolována pomocí magnetických mikročastic. Pomocí metody PCR bylo dokázáno, že v analyzovaných vzorcích probiotických výrobků Linex<sup>®</sup> Forte a Linex<sup>®</sup> Baby byly přítomny bakterie. Získané výsledky jsou v souladu s údaji deklarovanými výrobcem.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SOCCOL, C. R., et al. The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.*, 2010, **48**(4): 413–434. ISSN 1330-9862.
- [2] MIZOCK, Barry A. Probiotics. *Disease-a-Month*. 2015, **61**(7): 259-290. ISSN 0011-5029.
- [3] ICY D'SILVA. Recombinant Technology and Probiotics. *International Journal of Engineering and Technology* [online]. 2011, **3**(4), 288-293 [cit. 2016-04-30]. ISSN 0975-4024.
- [4] LI, Haixing a Yusheng CAO. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids*. 2010, **39**(5): 1107-1116. ISSN 0939-4451.
- [5] CROOKS, Neil H, Catherine SNAITH, Deborah WEBSTER, Fang GAO a Peter HAWKEY. Clinical review: Probiotics in critical care. *Critical Care*. 2012, **16**(6): 1-12. ISSN 1364-8535.
- [6] FAYOL-MESSAOUDI, D., BERGER, C.N., Coconnier-Polter M-H, Liévin-Le Moal V, Servin AL: pH-, lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic Lactobacilli against Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, **71**(10): 6008-6013. ISSN 0099-2240.
- [7] SAAD, N., C. DELATTRE, M. URDACI, J. M. SCHMITTER, P. BRESSOLLIER a Sueli RODRIGUES. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT – Food Science and Technology*. 2013, **50**(1): 1-16. ISSN 00236438.
- [8] KAILASAPATHY, Kasipathy. Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits: a review. *International Journal of Fermented Foods*. 2013, **2**(1): 1-17. ISSN 2319-3549.
- [9] *L. rhamnosus probiotic shows long-lasting anti-eczema benefits for kids: RCT* [online]. Nutra, 2013 [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <http://www.nutraingredients-usa.com/Research/L.-rhamnosus-probiotic-shows-long-lasting-anti-eczema-benefits-for-kids-RCT>
- [10] *Zenkefir.blogspot.cz* [online]. 2011 [cit. 2016-04-20]. Dostupné z: <http://zenkefir.blogspot.cz/2011/02/so-what-is-milk-kefir.html>
- [11] ROSALES-MENDOZA, Sergio, Carlos ANGULO a Beatriz MEZA. Food-Grade Organisms as Vaccine Biofactories and Oral Delivery Vehicles. *Trends in Biotechnology*. 2016, **34**(2): 124-136. ISSN 01677799.
- [12] CZINN, A., et al. Probiotics in Foods and Supplements. In MICHAEL, S., SHERMAN, P. (ed.). *Probiotics in Pediatric Medicine*. Totowa: Humana Press, 2009, s. 299–306. ISBN 978-1-60327-288-9.
- [13] BERMUDEZ-HUMARAN, Luis G., et. al. Engineering lactococci and lactobacilli for human health. *Current Opinion in Microbiology*. 2013, **16**(3): 278-283. ISSN 13695274.

- [14] ZHANG, Yixing, Praveen V. VADLANI, et. al. Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, **100**(1): 279-288. ISSN 0175-7598.
- [15] RAMÓN, Daniel. Avances en biotecnología de alimentos. *Arbor* [online]. 2014, **190**(768): a151 [cit. 2016-04-24]. DOI: 10.3989/arbor.2014.768n4005. ISSN 0210-1963. Dostupné z: <http://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/view/1953/2275>
- [16] KEARNEY, Niamh, et. al. *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 producing recombinant beta-glucan positively influences the functional properties of yoghurt. *International Dairy Journal*. 2011, **21**(8): 561-567. ISSN 09586946.
- [17] SOROKULOVA, Iryna. Recombinant Probiotics: Future Perspectives in Disease Treatment. *Journal of Probiotics* [online]. 2014, **02**(02), - [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.4172/2329-8901.1000e109. ISSN 23298901. Dostupné z: <http://omicsonline.org/open-access/recombinant-probiotics-future-perspectives-in-disease-treatment-2329-8901.1000e109.php?aid=33570>
- [18] KOO, Ok Kyung, et al. Recombinant Probiotic Expressing *Listeria Adhesion Protein* Attenuates *Listeria monocytogenes* Virulence In Vitro. *Plos one*. 2012, **7**(1): e29277. ISSN 1932-6203.
- [19] AMIRI-JAMI, Mitra, Ahmed Ghamry ABDELHAMID, Mahmoud HAZAA, Yukio KAKUDA, Mansel W. GRIFFITHS, Célia FERREIRA, R. Paul ROSS a Catherine STANTON. Recombinant production of omega-3 fatty acids by probiotic *E scherichia coli* Nissle 1917. *FEMS Microbiology Letters*. 2015, **362**(20): fnv166. ISSN 1574-6968.
- [20] SALMINEN, S. Demonstration of safety of probiotics- a review. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, **44**(1-2): 93-106. ISSN 01681605.
- [21] ZHOU, Zhenwen, et. al. Recombinant Probiotic *Bacillus Subtilis* Spores with Surface Expression of Ara h2 Reduce Peanut-Induced Anaphylaxis in Mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. St. Louis: Elsevier Science Ltd, 2015, **135**(2), AB29 [cit. 2016-04-24]. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.12.1024. ISSN 00916749.
- [22] ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: VUT v Brně, Fakulta chemická, 2010. 86 s. 978-80-214-4004-3.
- [23] HAARMAN, M., KNOL, J. Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotics infant formula. *Applied and environmental microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, 2006, **72**(4): 2359-2365. ISSN 00992240.
- [24] RITTICH, B., A. ŠPANOVÁ, D. HORÁK, M. J. BENEŠ, L. KLESNILOVÁ, K. PETROVÁ a A. RYBNÍKÁŘ. Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*. 2006, **52**(2): 143-148. ISSN 09277765.

- [25] SAMBROOK, Joseph a David William RUSSELL. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3. New York: Cold Spring Harbor Labor.: CSHL Press, 2001. ISBN 0879695773.
- [26] ŠPANOVÁ, Alena, Bohuslav RITTICH, Milan J. BENEŠ a Daniel HORÁK. Ferrite supports for isolation of DNA from complex samples and polymerase chain reaction amplification. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1080**(1): 93-98. ISSN 0021-9673.
- [27] TRACHTOVÁ, Štěpánka, Alena ŠPANOVÁ, Judit TÓTH, Zsolt PRETTL, Daniel HORÁK, János GYENIS a Bohuslav RITTICH. Solid-phase DNA isolation from food matrices using hydrophilic magnetic microspheres. *Food and Bioproducts Processing*. 2015, **94**: 375-381. ISSN 0960-3085.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BMK	bakterie mléčného kvašení
bp	pár bází (base pair)
CCDM	Sbírka mlékařských mikroorganismů v Táboře (Culture Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora)
CFU	kolonie tvořící jednotku (colony forming unit)
DHA	kyselina dokosahexaenová
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EPA	kyselina eikosapentaenová
FGVs	potravinové vakcíny
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GAD	dekarboxyláza kyseliny glutamové
GM	geneticky modifikované
GRAS	všeobecně považované za bezpečné
IBD	zánětlivé onemocnění střev
MO	mikroorganismy
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SDS	dodecylsulfát sodný
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA