

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

VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH MIKROČÁSTIC PRO IZOLACI A
PRUKAZ PROBIOTICKÉ BAKTERIÁLNÍ DNA V MASNÝCH
VÝROBCÍCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. ROMAN VAŠÍČEK

BRNO 2015



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

VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH MIKROČÁSTIC PRO IZOLACI A PRŮKAZ PROBIOTICKÉ BAKTERIÁLNÍ DNA V MASNÝCH VÝROBCÍCH

USE OF MAGNETIC MICROPARTICLES FOR ISOLATION AND PROVE OF PROBIOTIC
BACTERIAL DNA IN MEAT PRODUCTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. ROMAN VAŠÍČEK

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2015



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: FCH-DIP0916/2014 Akademický rok: 2014/2015
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: Bc. Roman Vašíček
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí práce: doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

Název diplomové práce:

Využití magnetických mikročástic pro izolaci a průkaz probiotické bakteriální DNA v masných výrobcích

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

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

Bc. Roman Vašíček
Student

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

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

ABSTRAKT

Tato práce pojednává o izolaci probiotické DNA z masných výrobků a jejím stanovení pomocí metod PCR. V práci je vyvinuta metoda homogenizace vzorků salámů kopistem, příprava hrubých lyzátů buněk salámů a izolace DNA z lyzátů buněk pomocí a magnetických mikročástic.

DNA byla izolována z hrubých lyzátů salámů pomocí magnetických mikročástic. Izolovaná DNA pak byla amplifikována v rodově i druhově specifických PCR. V testovaných výrobcích byla prokázána přítomnost DNA domény *Bacteria*, rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. V jednom výrobku byla prokázána DNA druhů *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium*.

ABSTRACT

This thesis deals with the isolation of probiotic DNA from meat products and its assesment by PCR methods. In this thesis is developed homogenization of samples of sausages with kopist, preparation of sausage cells lysates and isolation of DNA by using of magnetic microparticles.

The DNA was isolated from sausage lysates by using magnetic microparticles. Isolated DNA was further amplified in genus and spesies-specific PCR methods. In tested products was proven presence of DNA of domain *Bacteria*, type *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. In one product was proven presence of species *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis*.

KLÍČOVÁ SLOVA

fermentované masné výrobky, probiotika, PCR, izolace DNA, magnetické mikročástice

KEYWORDS

fermented meat products, probiotics, PCR, isolation of DNA, magnetic microparticles

VAŠÍČEK, R. *Využití magnetických mikročástic pro izolaci a průkaz probiotické bakteriální DNA v masných výrobcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 81 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Tímto bych chtěl poděkovat paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za odborné vedení a pomoc při tvorbě diplomové práce. Dále bych rád poděkoval paní Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. a kolegům za pomoc a spolupráci při práci v laboratoři. Také bych chtěl poděkovat mé rodině a přítelkyni za podporu.

Obsah

2	ÚVOD	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	Fermentované salámy.....	10
3.1.1	Výroba fermentovaných salámů.....	10
3.1.2	Bakterie mléčného kvašení.....	11
3.1.3	Rod <i>Lactobacillus</i>	11
3.1.4	Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	12
3.1.5	Rod <i>Bifidobacterium</i>	12
3.1.6	Plísně.....	13
3.2	Probiotika.....	13
3.2.1	Účinky probiotik.....	13
3.2.2	Prebiotika a synbiotika.....	14
3.2.3	Zástupci probiotických mikroorganismů.....	14
3.3	Identifikace bakterií mléčného kvašení v potravinách.....	15
3.3.1	Kultivační metody.....	15
3.3.2	Nekultivační metody.....	15
3.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	15
3.4.1	Komponenty pro PCR.....	16
3.4.2	Inhibitory PCR.....	17
3.4.3	Izolace DNA pomocí fenolové extrakce.....	18
3.4.4	Izolace DNA s využitím magnetických mikročastic.....	18
3.4.5	Izolace bakteriálních buněk s využitím magnetických mikročastic.....	19
4	MATERIÁL A METODY	20
4.1	Bakteriální kultury a DNA.....	20
4.2	Masné výrobky.....	20
4.2.1	Ovčácká klobása.....	20
4.2.2	Salám Orlík.....	21
4.3	Kultivační média.....	21
4.4	Chemikálie.....	21
4.5	Přístroje a vybavení.....	22
4.6	Roztoky.....	23
4.6.1	Roztoky pro lyzi bakteriálních buněk.....	23
4.6.2	Roztoky pro fenolovou extrakci bakteriální DNA.....	23
4.6.3	Komponenty pro přípravu PCR směsí.....	24
4.6.4	Primery pro jednotlivé PCR metody.....	25
	Složení PPP Master mixu:.....	25

4.6.5	Použité mikročástice.....	26
4.6.6	Roztoky pro Izolaci DNA magnetickými částicemi.....	26
4.6.7	Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu	26
4.7	Metody	27
4.7.1	Oživení lyofilizovaných bakteriálních kultur (<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 476 a <i>Bifidobacterium animalis</i> CCDM 246a).....	27
4.7.2	Uchovávání kultur zamražením v glycerolu	27
4.7.3	Kontrola čistoty kultury	27
4.7.4	Homogenizace vzorků salámu pomocí BagSystemu.....	30
4.7.5	Homogenizace vzorků salámů pomocí kopistu	30
4.7.6	Příprava hrubých lyzátů buněk	30
4.7.7	Izolace DNA pomocí fenolové extrakce	30
4.7.8	Srážení DNA přídatkem ethanolu	31
4.7.9	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	31
4.7.10	Izolace DNA pomocí magnetických mikročástic	31
4.7.11	Imunomagnetická separace bakteriálních buněk pomocí magnetických částic ...	32
4.7.12	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	32
4.7.13	Agarózová gelová elektroforéza DNA a produktů PCR	34
5	CÍL PRÁCE	35
6	VÝSLEDKY	36
6.1	Homogenizace vzorků salámů a příprava hrubých lyzátů buněk	36
6.1.1	Homogenizace vzorků salámů pomocí BagSystemu.....	36
6.1.2	Homogenizace vzorků salámu pomocí kopistu.....	36
6.1.3	Příprava hrubých lyzátů buněk	36
6.1.4	Izolace DNA z hrubých lyzátů salámů metodou fenolové extrakce.....	37
6.2	Izolace DNA z hrubých lyzátů salámů pomocí magnetických mikročástic	38
6.3	Optimalizace izolace DNA z hrubých lyzátů buněk salámů pomocí magnetických částic	38
6.3.1	Izolace DNA z hrubých lyzátů salámů připravených homogenizací pomocí BagSystemu.....	38
6.3.2	Izolace DNA z hrubých lyzátů salámů připravených homogenizací pomocí kopistu	39
6.3.3	Izolace DNA z bakteriálních kultur pomocí magnetických částic.....	40
6.4	Testování druhově specifických PCR.....	41
6.5	Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované ze salámů metodou fenolové extrakce	43
6.5.1	PCR s primery specifickými pro doménu <i>Bacteria</i>	43
6.5.2	PCR s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i>	46

6.5.3	PCR s primery specifickými pro rod <i>Bifidobacterium</i> z DNA izolované pomocí fenolové extrakce a magnetických částic	49
6.5.4	PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	52
6.5.5	PCR pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i>	55
6.6	Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované MČ ze salámů homogenizovaných kopistem	58
6.6.1	PCR s primery specifickými pro doménu <i>Bacteria</i> DNA izolovaná z HL salámů pomocí MČ F-kol 135ox (466bp).....	58
6.6.2	PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> (800 bp).....	61
6.6.3	PCR pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i>	64
6.7	Imunomagnetická separace buněk <i>Lactobacillus acidophilus</i>	65
6.7.1	IMS kultivace a IMS-PCR rod <i>Lactobacillus</i> z homogenizátů salámů	65
6.7.2	IMS-PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	67
6.8	Shrnutí výsledků testování amplifikovatelnosti DNA izolované ze salámů pomocí FE 69	
6.9	Srovnání metod izolace DNA FE a MČ	70
7	DISKUZE	71
8	ZÁVĚR	74
9	ZDROJE	75
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	80
11	PŘÍLOHY	81
1.1	Příloha 1- Publikované výsledky	81

1 ÚVOD

Na trhu v ČR se začínají nově objevovat trvanlivé fermentované salámy obohacené probiotiky. Tyto výrobky patří do skupiny trvanlivých tepelně neopracovaných masných výrobků (TTNMV). Tento druh probiotických výrobků se tak stává zajímavým artiklem. Konzumace fermentovaných salámů celosvětově roste včetně České republiky. Existuje mnoho variant těchto výrobků, lišící se svým složením, technologií výroby apod.

Cílem této práce je vyvinutí metody pro izolaci bakteriální DNA v kvalitě vhodné pro PCR z takovýchto masných výrobků a prokázat přítomnost DNA jednotlivých druhů bakterií *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis*. Metoda PCR se vyznačuje vysokou citlivostí, kdy dochází k zesílení signálu detekované molekuly PCR produktu. Další předností PCR je její vysoká specifita a poměrně rychle provedení metody.

K izolaci DNA je nejdříve nutné homogenizovat vzorek masného výrobku. Poté zhomogenizovaný vzorek zlyzovat a izolovat z něj DNA v kvalitě dostačující pro PCR metody specifické pro doménu *Bacteria*, rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, druhy *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis*. Prokázání samotných kmenů kultur obsažených ve výrobcích je pak otázkou přípravy a použití primerů specifických pro tyto kmeny.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fermentované salámy

Fermentované salámy patří mezi tepelně neopracované trvanlivé masné výrobky (TNTMV). Jsou to takové výrobky, při jejichž výrobě nebylo použito tepelné ošetření za účelem konzervace, a které mají trvanlivost minimálně 21 dní při skladovací teplotě 20 °C.

Fermentované salámy jsou jedny z nejvíce prostudovaných masných výrobků obsahující probiotika. Z hlediska jejich vysoké nutriční hodnoty jsou skvělým substrátem pro probiotické bakterie. Jelikož jsou fermentovaným výrobkem, tak neprochází tepelným ošetřením, což zaručuje životaschopnost probiotik ve výrobku. Z používaných kmenů v takovýchto salámech jsou častými bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, konkrétně kmeny: *L. gasseri* JCM1131, *L. casei* LC-01, *L. rhamnosus* FERM P-15120, *L. paracasei* ssp. *paracasei* FERM P-15121, *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. rhamnosus* CTC1679, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 [58] a *Pediococcus acidilactici* a *P. pentosaceus*. Tyto probiotické kmeny byly úspěšně použity k výrobě fermentovaných salámů [48, 55].

Při použití probiotických kultur ve fermentovaných masných výrobcích je důležitý i počet životaschopných mikroorganismů v okamžiku konzumace výrobku, proto je důležité vybírat takové kmeny, jejichž růstové nároky odpovídají výrobnímu procesu, nebo alespoň vykazují dobrý růst za těchto podmínek [57]. Tyto mikroorganismy také musí přežít kyselé prostředí v žaludku a být viabilní v gastrointestinálním traktu [56]. Probiotické mikroorganismy přidávané do fermentovaných salámů nesmí negativně ovlivňovat sensorický profil výrobku [54]. Probiotické kmeny jsou zdraví prospěšné a je ověřena jejich nepatogenita, mají i pozitivní vliv na sensorický profil a jsou tak vhodnější, než konvenční startovací kultury [39].

Do startovacích kultur používaných ve fermentovaných salámech se používají bakterie rodů *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Kocuria*, *Staphylococcus*. Do startovacích kultur se také používají některé druhy kvasinek *Candida* a *Debaryomyces*. Kvasinky druhu *Debaryomyces hansenii* napomáhají k rozvoji charakteristického vybarvení produktů a mají podíl na tvorbě aroma a chuti [3].

K výrobě fermentovaných salámů bylo také popsáno použití probiotických kultur produkujících bakteriociny zamezující růst ostatních mikroorganismů. Takto bylo dosaženo výroby jeseterových salámů s dobrým sensorickým profilem a vhodnými parametry [59].

2.1.1 Výroba fermentovaných salámů

Fermentované salámy se vyrábí přidávkem startovacích kultur do díla. Výroba fermentovaných masných výrobků se stává z pěti základních na sebe navazujících výrobních procesů. Jsou to tyto výrobní části: výběr a ošetření suroviny, tzv. kutrování (mělnění, míchání), plnění, zrání a balení. Při výrobě je kritickým bodem případná kontaminace okolní mikroflórou. Je proto třeba zabránit množení nežádoucích mikroorganismů (MO). K zabránění rozvoje nežádoucích MO se používá přídatku dusitanové solící směsi, optimální výrobní teploty, snížení aktivity vody (a_w), redoxního

potenciálu a vhodných startovacích kultur. Startovací kultury často vykazují vůči nežádoucím MO antagonistické vlastnosti – vytváří nepříznivé prostředí pro jejich růst [1].

Přídavek dusitanové solící směsi inhibuje růst salmonel, bakterií *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli*. Při mělnění díla se hodnota redoxního potenciálu zvyšuje. Naopak přídavkem kyseliny askorbové, askorbátu sodného a sacharidů se jeho hodnota snižuje. Hodnotu redoxního potenciálu také snižuje činnost startovacích kultur, zejména bakterií mléčného kvašení (BMK). BMK mohou produkovat bakteriociny, které inhibují růst ostatních MO. BMK použité jako startovací kultury produkují zejména kyselinu mléčnou, čímž dochází ke snížení pH prostředí. Ke snížení a_w dochází během fáze zrání a sušení. Aktivita vody v podstatě vyjadřuje dostupnost vody mikroorganismům [2].

2.1.2 Bakterie mléčného kvašení

BMK jsou grampozitivní nesporegenní mikroaerofilní nepatogenní bakterie, které fermentací sacharidů tvoří jako hlavní produkt kyselinu mléčnou. Bakteriemi mléčného kvašení se rozumí skupina bakterií, která má podobné vlastnosti metabolismu. Skupina těchto bakterií má velký význam pro potravinářský průmysl [41]. Do této rozsáhlé skupiny bakterií mléčného kvašení patří rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Paralactobacillus* a další. Hlavní charakteristickou vlastností bakterií mléčného kvašení je jejich schopnost pomocí enzymů přeměňovat sacharidy na kyselinu mléčnou a další produkty jako např.: ethanol, CO₂, nižší mastné kyseliny a další. Vyskytují se hlavně v mléčných výrobcích, ale i v masu, pivu, vinnu, kysaném zelí, kynutém těstu a v přírodním prostředí – na povrchu ovoce, v odpadních vodách atd. [42].

Účelem bakterií mléčného kvašení je zajištění správného a rychlého průběhu zrání díky přeměně sacharidů, dusičnanů, dusitanů, štěpení lipidů, snížení pH a hlavně také vytváří typické aroma a chuť daných výrobků. Jejich složení se liší podle oblastí vzniku nebo požadovanou jakostí [4].

Při výrobě fermentovaných salámů jsou nejdůležitější homofermentativní BMK. Při heterofermentativním kvašení vzniká kyselina octová, způsobující štiplavé aroma a pálivou chuť [5]. Jak již bylo zmíněno, BMK tvoří kyselinu mléčnou, která vzniká fermentací sacharidů přidaných do díla, dále látky s antimikrobiální aktivitou a látky aromatické a chuťově aktivní. Kyselina mléčná zpřičiňuje snížení hodnoty pH [5]. Protože cílem této diplomové práce byla identifikace bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* ve fermentovaných salámech, jsou níže uvedené tyto dva rody.

2.1.3 Rod *Lactobacillus*

Do rodu *Lactobacillus* patří grampozitivní bakterie, které mohou tvořit řetízky, příp. i tzv. palisády. Tyto bakterie nesporelují, nejsou pohyblivé, katalázový test je negativní. Jsou fakultativně anaerobní, nebo mikroaerofilní, některé bakterie vyžadují anaerobní prostředí. K růstu potřebují bohatá, komplexní média (např. MRS), 5%-ní obsah kyslíčnicku uhličitého může podporovat růst [43].

Bakterie *Lactobacillus* se taxonomicky řadí následovně:

doména: *Bacteria*

kmen: *Firmicutes*

třída: *Bacilli*

řád: *Lactobacillales*

čeleď: *Lactobacillaceae*

Bakterie rodu *Lactobacillus* mohou být rozděleny podle typů fermentace sacharidických substrátů do tří skupin: obligátně homofermentativní, obligátně heterofermentativní a fakultativně heterofermentativní.

Obligátně homofermentativní bakterie fermentují sacharidy- hexózy, z více, než 90-ti procent na kyselinu mléčnou. Obligátně heterofermentativní bakterie přeměňují sacharidy na kyselinu mléčnou, octovou, CO₂, případně i ethanol. Skupina fakultativně heterofermentativních bakterií fermentuje hexózu na kyselinu mléčnou, podobně jako homofermentativní bakterie, ale v případě nedostatku hexóz mohou fermentovat i další sacharidy na kyselinu mléčnou, octovou, CO₂ a ethanolu [44].

Bakterie rodu *Lactobacillus* mohou měnit charakter svého metabolismu podle toho, jak se mění podmínky prostředí, což může významným způsobem ovlivnit výsledné produkty vznikající během fermentace [45].

2.1.4 Druh *Lactobacillus acidophilus*

Bakterie tohoto druhu mají tvar tyčinek o rozměrech cca 0,5 až 1×10 μm, vyskytujících se jednotlivě, ve dvojicích, nebo v krátkých řetězcích. Mají obligátně homofermentativní metabolismus. Produkují zejména kyselinu mléčnou, která je schopná snižovat pH, což je důležité pro srážení kaseinu např. v mlékárenském průmyslu. Bakterie druhu *Lactobacillus acidophilus* se vyskytují v trávicím traktu savců, kde mají pozitivní vliv na složení střevní mikroflóry. Díky produkci kyseliny mléčné a následnému snižování pH tak působí inhibičně na hnilobné mikroorganismy. V mlékárenském průmyslu se využívají k výrobě např. acidofilního mléka, dále se některé kmeny bakterií tohoto rodu používají jako doplňky stravy, či farmaceutické přípravky pro obnovení rovnováhy střevní mikroflóry, jejíž disharmonie byla způsobena léčbou antibiotiky [44].

2.1.5 Rod *Bifidobacterium*

Bakterie tohoto rodu jsou gram-pozitivní. Buňky mající velmi rozmanité tvary (koky, tyčinky, tvar písmene Y, V...) jsou nepohyblivé, nesporulují a katalázový test je negativní. Bakterie rodu *Bifidobacterium* mají obligátně anaerobní nároky na prostředí. Některé druhy mohou tolerovat přítomnost vzdušného kyslíku za přítomnosti oxidu uhličitého [44]. Produktem fermentace cukrů je kyselina octová a mléčná zpravidla v poměru 3:2. Při fermentaci nevzniká kyselina máselná, nebo propionová [43].

Jejich výskyt byl popsán v dutině ústní a zažívacím traktu teplokrevných obratlovců (tzn. i u člověka), u hmyzu a v odpadních vodách. Bifidobakterie přispívají k udržování rovnováhy střevní mikroflóry, přičemž u kojenců představují až 90 % veškeré mikroflóry. Jsou i schopné detoxikace škodlivých složek vznikajících ve střevech a zabraňují množení patogenních mikroorganismů.

Společně s bakteriemi rodu *Lactobacillus* se používají ve směsích jako základ probiotických přípravků [46, 47].

Bakterie rodu *Bifidobacterium* se taxonomicky řadí následovně:

doména: *Bacteria*

kmen: *Actinobacteria*

třída: *Actinobacteria*

řád: *Bifidobacteriales*

čeleď: *Bifidobacteriaceae*

2.1.6 Plísně

Využití ušlechtilých plísní se objevuje jen u některých fermentovaných salámů. Tyto výrobky mají bíle porostlý povrch. Tvorba plísní přispívá i k aromatu výrobku. K rozvoji plísní je potřebné nízké množství složek udícího kouře zabraňujících rozvoji plísní. Proto se používá uzení studeným dýmem o teplotě do 25 °C. Poté, co fungicidní látky vyprchají, jsou opět aplikovány ušlechtilé plísně[4].

2.2 Probiotika

Probiotika odvozená od slova „pro bios“ tj. pro život se používají již dlouhou dobu v potravinách jako jejich přirozená složka. Podle definice FAO/WHO se probiotiky rozumí takové živé mikroorganismy, které při požití v dostatečném množství mají pro hostitele pozitivní zdravotní účinek. Probiotiky se tedy rozumí živé mikroorganismy. Mohou být konzumovány jako součást potravin, nebo jako doplněk stravy [23]. Mezi probiotika jsou v současné době nejčastěji řazeny laktobacily, bifidobakterie, streptokoky, enterokoky a sacharomycety, ale můžeme zde najít i další mikroorganismy. Forma, ve které je probiotikum podáváno, musí obsahovat dostatečné množství životaschopných bakterií. Užívání probiotických bakterií stimuluje růst preferovaných mikroorganismů, vytlačuje potenciálně nebezpečné bakterie a posiluje přirozený obranný mechanismus organismu [6].

2.2.1 Účinky probiotik

Probiotika působí v zažívacím traktu. Důležitou bariérou mezi vnitřním a vnějším prostředím je zde střevní sliznice, jejíž správná funkce závisí i na stavu střevního epitelu, ochranného hlenu a imunitního systému sliznice.

Byla popsána řada zdravích prospěšných účinků probiotik např.:

- Kontrola růstu nežádoucích (patogenních) střevních mikroorganismů. Činností probiotik vznikají organické kyseliny, což způsobuje pokles pH, které není optimální pro patogenní mikroorganismy a jejich růst je omezen.
- Prevence karcinomu střev. Díky již zmíněnému poklesu pH a následnému potlačení hnilobných bakterií klesne i tvorba karcinogenních látek ve střevech. Probiotika mohou karcinogenní sloučeniny také rozkládat a zabránit tak jejich působení.
- Kontrola cholesterolemie- hladiny cholesterolu v krvi. Probiotika mohou také ovlivňovat hladinu cholesterolu v krvi, kdy jejich činností dochází k rozkladu žlučových kyselin a uvolněný cholesterol se nemůže zpátky vstřebávat.

- Účinek proti zácpě. Příjmem probiotik a prebiotik lze omezit zácpu. V tomto případě je také důležitý příjem dostatečného množství vlákniny, pitný režim a aktivní pohyb.
- Mezi další účinky patří: Schopnost tvorby antimikrobiálních sloučenin, schopnost imunomodulace [12].

Střevní mikroflóra je také důležitá pro správnou funkci imunitního systému, jelikož se v přijímané potravě vyskytují potravinové antigeny, nebo i patogenní mikroorganismy [33].

2.2.2 Prebiotika a synbiotika

Prebiotiky se rozumí složka potravy, kterou lidský organismus nemůže strávit, ale která je fermentovatelná mikroorganismy a slouží tak jako stimulant růstu mikroorganismů prospěšných pro lidské zdraví. Prebiotika se dostávají zažívacím traktem do tlustého střeva, kde jsou hydrolyzována na monomery střevními bakteriemi. Mezi prebiotika patří oligosacharidy (fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy a laktulóza), inulin a některé polysacharidy. Zatím je nejlépe prozkoumané prebiotické působení fruktooligosacharidů [13].

Fermentací prebiotik ve střevech se zvyšuje i produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA - short chain fatty acids). Takto může dojít ke zlepšení funkce střev, zvýšení absorpce minerálů (vápník, magnezium, železo, zinek), změně metabolismu lipidů a snížení rizika vzniku kolorektálního karcinomu [14].

Synbiotika jsou kombinací probiotik a prebiotik, tj. mikroorganismů prospěšných pro zdraví hostitele a nestravitelných složek potravy, sloužících jako substrát pro jejich růst. Touto kombinací se přispívá k prodloužení životaschopnosti probiotik, kdy prebiotikum je specifickým substrátem vhodným k fermentaci. Nějčastějšími kombinacemi synbiotik bývají tyto kombinace: bakterie rodu *Bifidobacterium* a fruktooligosacharidy; bakterie rodu *Lactobacillus*, nebo bakterie rodu *Bifidobacterium* a galaktooligosacharidy [15].

Ze studií vyplývá, že probiotické bakterie druhů *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium animalis* a *Lactobacillus acidophilus* vykazují rychlejší růst na médiu s přidavkem fruktooligosacharidů, inulinu, nebo škrobu. Synbiotické přípravky obsahující bakterie rodu *Bifidobacterium* a fruktooligosacharidy (případně inulin) byly podány laboratorním krysám a ve výkalech bylo pozorováno zastoupení bifidobakterií, koliformních bakterií a celkový počet mikroorganismů. Bylo pozorováno vyšší množství bakterií rodu *Bifidobacterium* a nižší množství koliformních bakterií [15].

2.2.3 Zástupci probiotických mikroorganismů

Nejčastěji používané probiotické kultury jsou bakterie rodu *Lactobacillus* konkrétně druhy *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. rhamnosus* (*Lactobacillus* GG), *L. casei* Shirota, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*

Dále sem patří bakterie rodu *Bifidobacterium*: *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. thermophilum*. Z řad gram pozitivních koků to jsou:

Lactococcus lactis subsp. *cremonis*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus intermedius*, *Escherichia coli* (sérotyp O83:K24:H1) [49]. Patří sem i některé druhy kvasinek, např: *Saccharomyces boulardii*. Probiotické kmeny se často používají i v kombinacích tří až čtyř kmenů [27, 28].

Ve fermentovaných salámech se objevují tyto kmeny: *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC-705, *L. rhamnosus* E-97800, and *L. plantarum* E-98098, *L. paracasei* L26, *Bifidobacterium lactis* B94, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* [29].

2.3 Identifikace bakterií mléčného kvašení v potravinách

BMK v potravinách je možné prokázat kultivačně na vhodných médiích nebo nejnověji molekulárně-genetickými metodami [30].

2.3.1 Kultivační metody

Při kultivaci se mikroorganismy očkují na Petriho misky s vhodným médiem a nutrienty. Jsou kultivovány po určitou dobu za dané teploty, aerobně nebo anaerobně. Pozoruje se zbarvení, tvar, počet kolonií, případná produkce specifických barevných produktů, čistota kultur. Po vykultivování lze mikroskopicky hodnotit morfologii buněk [33].

Dále se sleduje aktivita enzymů způsobujících hydrolýzu např. škrobu, kaseinu, želatiny, případně produkce indolových barviv, redukce nitrátů, deaminace fenylyalaninu, utilizace citrátu [34].

2.3.2 Nekultivační metody

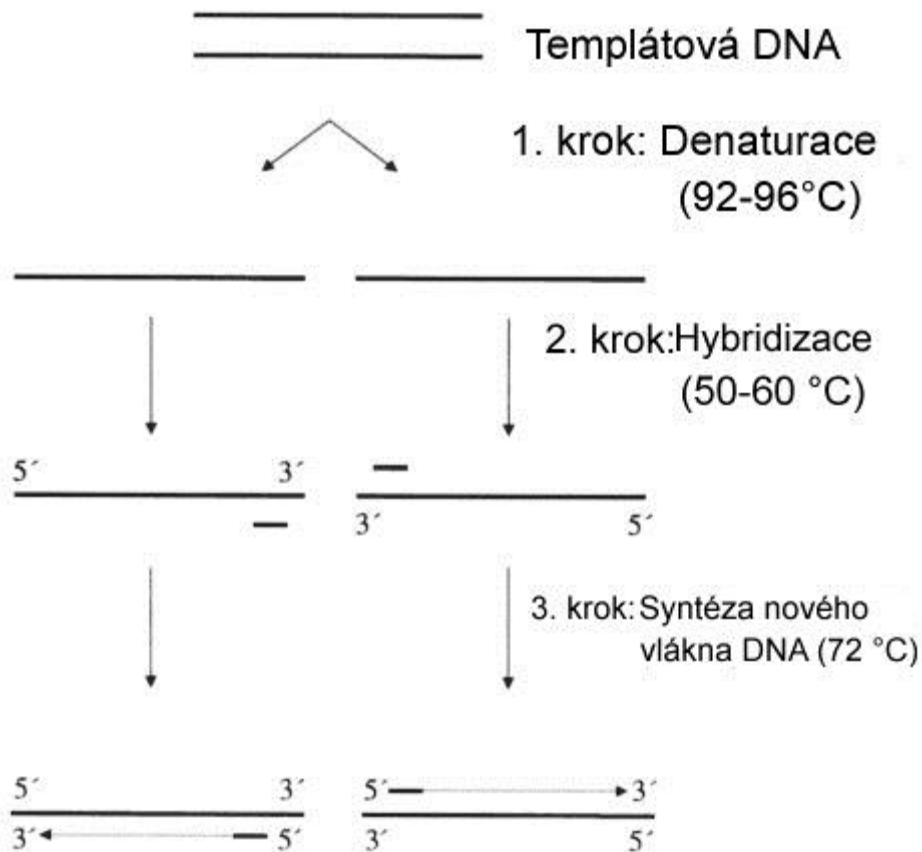
Místo kultivačních metod, které jsou často příliš složité, časově a ekonomicky nákladné a neumožňují rozlišit jednotlivé druhy. Proto se používají i nekultivační metody. Jedním z důvodů je i skutečnost, že zatím lze kultivovat cca 1 % mikroorganismů v laboratorním prostředí [34]. Tyto nekultivační metody se rychle rozvíjí a zaměřují se na identifikaci podle makromolekul, jako jsou např. lipidy, polysacharidy, cytoplazmatické proteiny a v neposledním případě nukleové kyseliny-DNA a RNA. Identifikace konkrétně BMK molekulárně-genetickými metodami je založena na analýze DNA s využitím amplifikačních metod. Mezi tyto metody patří nejvíce využívaná PCR. Tato metoda je blíže popsána v následující kapitole.

2.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Samotná reakce polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction) spočívá v opakování tří základních kroků. Prvním krokem je denaturace, při které dochází k rozpletení řetězce templátové DNA. Denaturace probíhá při teplotě od 92 do 96 °C. Pak následuje krok druhý- hybridizace, při kterém dochází k dosednutí primerů k řetězcům templátové DNA, kdy hybridizační teplota závisí na sekvenci primerů. Třetím krokem PCR reakce je syntéza nových řetězců DNA (72 °C). Tyto tři kroky se cyklicky opakují obvykle v 30 až 40 cyklech. Během cyklů se geometricky zvyšuje

počet produktů PCR, které jsou vyznačeny specifickými primery, které se navazují na specifických místech cílové DNA. Amplifikované úseky (amplikony) se detekují v konvenční PCR pomocí gelové elektroforézy. Průběh PCR reakce je graficky znázorněn na obrázku č. 1 [25].

Obr. č.1: Průběh PCR



(upraveno dle <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/pic/scanu8.gif>)

Metody PCR se mohou použít v těchto oblastech: detekce mikroorganismů a virů v potravinách, vodě a půdě, kontrola výrobků a potravin, mapování genomů, charakterizace genů, prenatální diagnostika dědičných chorob, získání důkazů a identifikace v kriminalistice. Charakterizace sekvenčních změn alel. Paleontologie-analýza DNA z prehistorických fosilií. Izolace genů z tkání. Značení DNA pomocí hybridizačních sond. Příprava komplementárních řetězců DNA způsobem reverzního přepisu mRNA pomocí reverzní transkriptázy. Izolace úseků DNA, které kódují například důležité reakční látky, peptidy aj. Klonování templátové DNA k jejímu následnému sekvenování. Úprava DNA pomocí řízené oligonukleotidové mutagenese změnou některých nukleotidů, delecí/insercí [40].

2.4.1 Komponenty pro PCR

Pro reakci PCR se používají tyto komponenty: matrice DNA, oligonukleotidové primery, DNA polymeráza, 2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dNTP), hořčičnaté ionty

(Mg²⁺), PCR pufr a PCR voda. Smícháním veškerých komponentů a správným teplotním programem se vytvoří podmínky pro průběh samotné reakce PCR, která se cyklicky opakuje.

Matrice DNA- matricí DNA (DNA templát) rozumíme makromolekulu DNA, podle které se komplementárně syntetizují nové řetězce DNA. Musí obsahovat specifická místa pro nasednutí primerů. Do směsi PCR je obvykle přidávána v koncentraci 10 ng/μl a nižší.

Primery- jsou chemicky syntetizované oligonukleotidy, které jsou komplementární k templátové DNA. Vykazují sekvenční specifitu. Většinou obsahují 18-30 nukleotidů, z toho 40-60 % GC bází. Teplota tání primerů je obvykle mezi 55-65 °C. Při nadbytku primerů ve směsi může dojít k jejich spárování a ke vzniku tzv. dimerů primerů. Primery ohraničují cílový úsek DNA. Tento úsek je pak amplifikován. Kratší primery mohou hybridizovat i k jiným místům DNA a delší primery vyžadují delší čas hybridizace. Hybridizaci primerů ovlivňuje teplota, při nízké teplotě může dojít k nespecifické hybridizaci, kdežto při příliš vysoké teplotě k hybridizaci vůbec nedochází [7].

DNA-polymeráza- je enzym syntetizující nový řetězec DNA ve směru 5' → 3' podle odpovídající sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci DNA od 3' konce primeru. Nejčastěji se používá Taq DNA-polymeráza. Je to termostabilní polymeráza získávaná z bakterie *Thermus aquaticus* [24].

dNTP- jsou stavebními kameny pro syntézu nových řetězců DNA. Jejich optimální koncentrace v PCR směsi se pohybuje mezi 20 – 400 μM. Vyšší koncentrace dNTP již vyvazují hořčnaté ionty, což působí inhibičně na DNA polymerázu.

Mg²⁺ ionty- jsou důležitým faktorem pro aktivitu DNA-polymerázy. Jejich koncentrace musí být optimalizována pro každý druh primerů a DNA templátu. Pohybuje se v rozmezí 0,5 – 8 mM. Vyšší koncentrace snižují specifitu PCR reakce.

PCR pufr- tvoří prostředí s optimálními podmínkami pro DNA-polymerázu. Jeho standardní složení je: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 – 8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂. Navíc může obsahovat acetamid, albumin, želatínu nebo Tween 20

PCR voda – používá se na doplnění objemu PCR směsi. Nejvhodnější je voda s odporem 18 mΩ nebo voda pro injekce ČSL 4 [26].

U komerční PCR se pro detekci produktů PCR používá gelová elektroforéza na agaróze.

2.4.2 Inhibitory PCR

Inhibitory PCR reakce se rozumí látky a sloučeniny, které negativně ovlivňují průběh PCR a způsobují falešně negativní výsledky- zamezí proběhnutí PCR reakce. Mohou to být organické a anorganické chemikálie, detergenty, antibiotika, enzymy, polysacharidy, tuky, nebo i proteiny. Inhibitory PCR mohou být endogenního, nebo exogenního původu. Z endogenních inhibitorů to jsou zejména enzymy, některé typy zkumavek, celulózoové a nitrocelulózoové filtry, apod. Exogenní inhibitory mohou být např.: nepřečištěná DNA, přítomnost DNáz, chemikálie používané k izolaci DNA (fenol, chloroform), ale také pyl, prach z rukavic a další nečistoty, nebo příměsi [16].

2.4.3 Izolace DNA pomocí fenolové extrakce

Prvním krokem PCR je izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Klasickou metodou je izolace DNA pomocí fenolové extrakce a dalších organických rozpouštědel. V přítomnosti fenolu dochází k denaturaci a precipitaci proteinů. Metoda izolace DNA pomocí fenolové extrakce je velmi účinná. Díky fenol-chloroformové extrakci lze izolovat DNA o dostatečné čistotě pro PCR. Tato metoda je jednou z nejstarších metod izolace nukleových kyselin. Její princip byl popsán již roku 1956 Kirbim [6]. DNA zůstala vázaná v proteinové mezivrstvě. Po nahrazení vody roztokem solí, došlo k přechodu DNA do vodní fáze [5]. Později došlo k nahrazení solí detergenty (nejčastěji dodecylsulfátem sodným- SDS). Důležitým faktorem při extrakci nukleových kyselin fenolem je hodnota pH, kdy při slabě zásaditém pH fenolu (obvykle 7,8) dochází k extrakci DNA do vodné fáze společně s RNA. Při kyselém pH (4,8–5,2) dochází k přechodu do vodní fáze pouze RNA a DNA se uvolňuje do proteinové mezivrstvy. Ve směsi dochází ke vzniku vodní a organické fáze, kdy se vytváří mezi těmito fázemi proteinová vrstva. Lipidy přechází do fáze organické [17].

Purifikovaný fenol má relativní hustotu 1,07, a proto tvoří po smísení s vodou spodní fázi. Pokud ovšem analyt obsahuje velké koncentrace rozpuštěných látek, může dojít k inverzi fází. V tom případě se doporučuje fenol smísit s chloroformem v poměru 1:1 (relativní hustota chloroformu je 1,47, chloroform tedy zajistí správnou separaci směsi) [18].

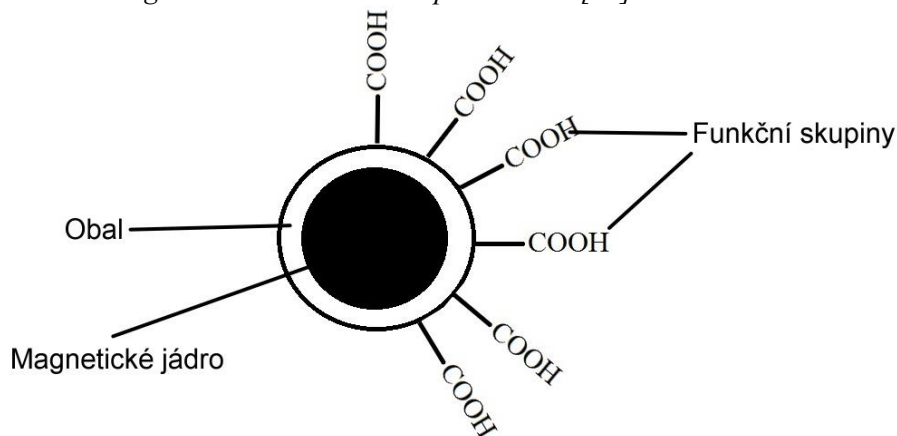
2.4.4 Izolace DNA s využitím magnetických mikročástic

Při izolaci DNA pomocí fenol-chloroformové extrakce se používají toxické látky. Tato metoda je také poměrně časově náročná a složitá. Proto byly vyvinuty metody pro izolaci DNA, kdy dochází k imobilizaci DNA na pevnou fázi např.: magnetické částice. Izolace DNA pomocí magnetických mikročástic je snazší a méně časově náročná metoda separace DNA. DNA se izoluje přímo z hrubých lyzátu buněk komplexních vzorků (např. buněk mléčných výrobků, lyofilizátů a nově i fermentovaných salámů) [19].

Magnetické částice mají magnetické vlastnosti jen za působení vnějšího magnetického pole, vykazují paramagnetismus. Neprojevuje se však reziduální magnetismus a po přerušení působení magnetického pole jejich magnetické vlastnosti mizí. Pokud nejsou v blízkosti magnetického pole, tvoří homogenní suspenzi [20,21].

Magnetické částice se skládají z feromagnetického jádra, tvořeného oxidy železa, obalové vrstvy a z povrchové vrstvy. Na povrchu částic jsou vázány karboxylové skupiny, na něž se reverzibilně adsorbuje DNA. Na obrázku č.2 je schematicky znázorněna magnetická částice vhodná pro izolaci DNA [22].

Obr. č.2: Schéma magnetické mikročástice. Upraveno dle [32]



Při adsorpci dochází ke vzniku kulovitěspirálovitého tvaru molekuly DNA tzv. kondenzaci. Ke kondenzaci DNA a jejímu navázání na částice je zapotřebí přítomnosti polyethylenglykolu (PEG 6000) a chloridu sodného [7].

Mechanismus izolace DNA pomocí MČ

Molekuly DNA se přirozeně vyskytují v tzv. hydratované dvoušroubovicovité formě, ve které nejsou schopny se navázat na magnetické mikročástice. Přidáním PEG 6000 a NaCl se konformace (působením změny iontové síly v roztoku) molekuly mění ze šroubovicovité na globulární a DNA v takovéto konformaci se na mikročástice váže pomocí vodíkových vazeb. DNA navázaná na mikročástice je poté oddělena působením magnetického pole od ostatních složek vzorku (proteiny, lipidy, sacharidy, buněčné části). Po eluci DNA z magnetických mikročástic s navázanou DNA v TE pufru dochází k přechodu DNA do šroubovicovité konformace. Takto se dá získat přečištěná DNA bez kontaminujících látek, které by mohly inhibovat PCR reakci.

Postup separace DNA se skládá z těchto kroků:

1. Vazba DNA na magnetické částice přidané do separační směsi.
2. Separace magnetických mikročástic magnetickým separátorem, jejich propláchnutí a odstranění kontaminujících látek.
3. Eluce DNA do TE pufru a separace magnetických mikročástic magnetickým koncentrátorem.

2.4.5 Izolace bakteriálních buněk s využitím magnetických mikročástic

Pro izolaci bakteriálních buněk byly použity magnetické mikročástice z magnetické perlové celulózy o velikosti 100-250 μ l, jejichž povrch byl funkcionalizován protilátkou anti-*Lactobacillus* (rabbit PAb) [51]. Postup samotné izolace je popsán v kapitole 3.7.11.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Bakteriální kultury a DNA

V práci byly použity následující bakteriální kultury:

- *Bifidobacterium animalis* CCM 4988 T
- *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 T
- *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 241a (získaná ze sbírky MO Tábor Laktoflora)
- *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476 (získaná ze sbírky MO Tábor Laktoflora)
- *Lactobacillus casei* CCM 4798
- *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919

3.2 Masné výrobky

Byly analyzovány dva tepelně neopracované trvanlivé masné výrobky (TNTMV)-fermentované salámy Ovčácká klobása a salám Orlik. Dle údajů výrobce by měly oba salámy obsahovat probiotika [52, 53].

3.2.1 Ovčácká klobása

Dle údajů výrobce obsahuje Ovčácká klobása kultury probiotických bakterií *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476 a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 241a [50]. Salám Ovčácká klobása je vyfotografován na obr. č. 3.

Obr. č.3: Fermentovaný salám Ovčácká klobása



Složení: vepřové maso 36 %, vepřové sádlo 30 %, skopové maso 20 %, jodidovaná sůl max. 4 %, pšen. vlák, koření, extr. koření, konzervant E250, zvr. chuti E621, hroz. cukr, maltodextrin, cukr, barv. E120, antiox. E815/E315, syrovátka, probiotické kultury, obsah tuku max. 50 %. Bílkoviny 21 g, cukry 0,6 g, sacharidy 9,8 g, tuky 48 g, vláknina 3,6 g, sodík NA 1,5 g, MK nasycené 16,7 g.

3.2.2 Salám Orlík

Dle údajů výrobce obsahuje běžně používané startovací kultury: *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Debaryomyces hansenii*. Salám Orlík je vyfotografován na obr.č.4.

Obr. č.4: *Salám Orlík*



Složení: vepřové maso, hovězí maso, vepřové syrové sádlo, jedlá sůl s jodem, směs koření, startovací kultura, glukóza, laktóza, cukr, antioxidant: kyselina askorbová, askorban sodný; konzervant: E250, aroma. Na 100g výrobku je spotřebováno 130g masa. Bílkoviny 19 g, max. obsah tuku 50 %, max. obsah soli 3,5 %

3.3 Kultivační média

• MRS agar

MRS médium bylo připraveno dle návodu dodavatele (Oxoid, England), hodnota pH byla upravena na 6,5 pomocí 1M roztoku NaOH. Poté byl přidán agar (15 g/l) a roztok byl sterilizován v autoklávu za teploty 121 °C po dobu 20 minut.

• MRS médium

MRS médium se připravilo dle návodu dodavatele a hodnota pH byla upravená na 6,5 pomocí 1M roztoku NaOH. Poté byl roztok vysterilizován v autoklávu za teploty 121 °C po dobu 20 minut.

3.4 Chemikálie

- Agaróza pro DNA elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)

- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- RNasa A (Sigma, St. Louis, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Všechny chemikálie byly v kvalitě p.a.

3.5 Přístroje a vybavení

- BagMixer® 400 CC® (Interscience, FRANCIE)
- Anaerostat (2,5 l, OXOID™, Anglie)
- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, USA)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, USA)
- Koncentrátor magnetických částic (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norsko)
- Mobilní digitální fotoaparát Alcatel 992 OT
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Polsko)
- NanoPhotometer (Implen, Německo)
- Mikrovlnná trouba (SENCOR, ČR)
- Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Německo)
- Hybridizační pec Micro Hybridization Incubator 2000 (Sci Gene, USA)
- Thermocycler PTC – 200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Transilluminator TVR-3121 (Spectroline, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy – Cast, (Owl Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, USA)
- Laboratorní sklo, umělohmotný materiál (Eppendorfovy zkumavky, špičky...), umělohmotné pomůcky, laboratorní pomůcky

3.6 Rostoky

Rostoky byly pripraveny podle skript Španové a Ritticha (2010). [1] Pro ředění rostoků byla použita sterilní destilovaná voda. Rostoky byly sterilizovány v autoklávu při 120 °C po dobu 15 min.

3.6.1 Rostoky pro lyzi bakteriálních buněk

- 1M Tris-HCl (pH 7,8; 8,0)

121 Tris báze se rozpustilo v 800 ml destilované vody. pH rostoku se upravilo pomocí HCl na hodnotu 7,8 (8,0). Rostok se poté doplnil destilovanou vodou na objem jednoho litru a rozdělil do alikvótů. Rostok byl sterilizován po dobu 20 minut za teploty 121°C v autoklávu.

- 0,5 M EDTA (pH 8,0)

186,1 g EDTA se rozpustilo v 800 ml destilované vody a pH se upravilo přidáním cca 20g NaOH. Nejdříve se přidalo cca 15 g NaOH, poté se hydroxid přidával postupně po perličkách za současného kontrolování pH. EDTA se rozpustilo při pH 8,0. Rozpuštění probíhalo za stálého míchání na magnetické třepačce. Rostok se pak doplnil destilovanou vodou na objem jednoho litru a rozdělil do alikvótů. Rostok byl poté sterilizován po dobu 20 minut za teploty 121°C v autoklávu.

- Lyzační rostok A

Rostok se připravil ze zásobního rostoku 1M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0). K 10 ml 0,1 M rostoku Tris-HCl byl přidán 1 ml 0,5 M rostok EDTA a výsledný rostok byl poté doplněn sterilní destilovanou vodou do objemu 100 ml.

- Lyzační rostok B

K lyzačnímu rostoku A byl přidán lysozym na výslednou koncentraci 3,0 mg/ml.

- 20% rostok dodecylsulfátu sodného (SDS)

20g SDS se rozpustilo v 80 ml destilované vody za ohřívání na 68 °C. Rostok se poté doplnil sterilovanou vodou do objemu 100ml a rozdělil do alikvótů. Rostok nebylo nutné sterilizovat. SDS je dráždivá látka, tudíž je při manipulaci doporučováno používat roušku. Rostok se uchovává při laboratorní teplotě.

- Rostok proteinázy K (1 mg/ml)

Navázilo se 10 mg proteinázy K a rozpustilo se v 10 ml sterilní vody. Rostok se uchovává při -20 °C. Před použitím se ředí na požadovanou koncentraci 100 µg/ml.

3.6.2 Rostoky pro fenolovou extrakci bakteriální DNA

- Fenol (pH 7,8)

Nasycený rostok předestilovaného fenolu v TE pufru.

- Směs isoamyl-chloroform (CIZ)

V poměru 24:1 se smíchal chloroform a isoamylalkohol.

- 3M rostok octanu sodného

V 80ml destilované vody se rozpustilo 40,81 g trihydrátu octanu sodného ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). Rostok se doplnil do objemu 100 ml a poté sterilizoval po dobu 20 minut za teploty 121 °C v autoklávu. Poté se rostok rozdělil do alikvótů.

- TE pufr

Byly použity zásobní roztoky 1ml Tris-HCl a 0,2 ml EDTA). Po smíchání uvedených objemů se roztok doplnil sterilní destilovanou vodou do objemu 100 ml a sterilně se rozlil do alikvótů. Roztok se uchovává při teplotě -20 °C.

- **PBS pufr**

V objemu 800 ml destilované vody se rozpustilo 80 g NaCl, 2 g KCl, 26,8 g Na₂HPO₄ · 7H₂O a 2,4 KH₂PO₄. Takto se připravil 10x koncentrovaný roztok, který byl před použitím naředěn desetinásobně.

3.6.3 Komponenty pro přípravu PCR směsí

Komponenty pro přípravu směsí pro PCR a jejich objemy jsou uvedeny v Tab. č. 1. V tabulce č. 2 je uvedené složení PCR směsí za použití PPP master mixu, který se použil pro PCR metody pro rod *Bifidobacterium*, druhy *Bifidobacterium animalis* a *Lactobacillus acidophilus*.

Tabulka č. 1: Komponenty pro PCR

Pořadí	Komponenta	PCR pro/ Objem [μl]		
		Doména <i>Bacteria</i>	Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Bifidobacterium</i>
1.	Voda pro PCR	17,5	19,0	19,0
2.	10× reakční pufr kompletní	2,5	2,5	2,5
3.	Směs dNTP (10 mM)	1,0	0,5	0,5
4.	primer1 (10 pmol/μl)	1,0	0,5	0,5
5.	primer 2 (10 pmol/μl)	1,0	0,5	0,5
6.	<i>Taq</i> DNA-polymeráza (1U/ μl)	1,0	1,0	1,0
7.	Matrice DNA (10 ng/μl)	1,0	1,0	1,0

Tabulka č. 2: Složení PCR směsí s PPP master mixem

		Zvýšení citlivosti			
Rod	Druh	Druh	Druh	Druh	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
Složka	Objem (μl)				
PCR voda	10,5	10,5	9,5	7,5	5,5
PPP master mix	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
primer 1	1	0,5	1	1	2
primer 2	1	0,5	1	1	2
DNA matrice	1	1	1	3	3

Protože metody PCR pro druhy *Bifidobacterium animalis* a *Lactobacillus acidophilus* nebyly dostatečně citlivé, použilo se komerčního PPP Master mixu a zvýšilo se množství přidávaných primerů, DNA a zvýšil se počet cyklů z 30-ti na 40 cyklů.

3.6.4 Primery pro jednotlivé PCR metody

Jednotlivé metody PCR (celkem 6) se lišily sekvencí primerů, které jsou uvedeny spolu s velikostí v Tab. č. 3.

Tabulka č. 3: Primery specifické pro jednotlivé PCR [8]

PCR pro doménu <i>Bacteria</i> [8]	Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR	[8]
	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp	
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> [9] Chyba! Nebyl zadán název	LbLMA 1-rev	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250 bp	[9]
	R16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA		
PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i> [10]	Pbi F1	CCG GAA TAG CTC C	914 bp	[10]
	Pbi R2	GAC CAT GCA CCA CCT GTG AA		
PCR pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i> [10]	Ban F2	AAC CTG CCC TGTG	925 bp	[10]
	Pbi R1	GCA CCA CCT GTG AAC CG		
PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> [37]	Aci 16SI	TCC AAG GAA GCG AAG GAT	750 bp	[37]
	Aci 16SII	CTC TTC TCG GTC GCT CTA		
PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> [38]	Aci 16SI	AGC TGA ACC AAC AGA TTC AC	800 bp	[38]
	Aci 16SII	ACT ACC AGG GTA TCT AAT CC		

Složení PPP Master mixu:

PPP Master Mix se dodává 2x koncentrovaný: 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 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a barviva.

3.6.5 Použité mikročástice

Byly použity magnetické mikročástice funkcionalizované karboxylovými skupinami F-kol 15 ox (HEMA-co-GMA) a F-kol B100 (GMA) a Dynabeads. V tabulce č. 4 jsou uvedeny jejich parametry.

Tab.č.4: Parametry použitých mikročástic:

Označení částic	Polymer	Velikost částice (průměr μ m)	Hustota průměrné částice (g/cm ³)	Obsah Fe (%)	Zdroj
F-kol 135ox	PGMA	1,16	1,27	11	Ing. D. Horák, ÚMCH Praha, ČR
F-kol B100ox	PGMA	0,70	0,81	5,36	Ing. D. Horák, ÚMCH Praha, ČR
Dynabeads DNA Direct	PS	4,5	1,5	20	Life technologies

PGMA-polyglycid metakrylát; PS- polystyren;

3.6.6 Roztoky pro Izolaci DNA magnetickými částicemi

V Eppendorfových zkumavkách se smíchal 5M NaCl, 40 % PEG, hrubý lyzát a magnetický nosič. Složení separační směsi je uvedeno v kapitole 3.7.10 Tab.č. 6.

3.6.7 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- TBE pufr (5x konc.)

Navážilo se 54 g Tris- báze, 27,5g kyseliny borité a 20 ml 0,5 ml EDTA (pH 8,0). Navážka byla rozpuštěna v 600 ml destilované vody. Roztok se doplnil destilovanou vodou na objem menší než 1 litr. Hodnota pH se upravila pomocí 1 M NaOH na hodnotu 8,0 a roztok se doplnil do objemu jednoho litru destilovanou vodou. Případné tuhé nebo nerozpuštěné částice se přefiltrovaly. Před použitím se roztok TBE pufru ředil 10x destilovanou vodou.

- Barvicí lázeň

V 500 ml destilované vody se rozpustilo 100 μ l roztoku ethidiumbromidu (5 mg/ml).

- DNA standard

DNA standard 100 bp (Malamité, Moravské Prusy, ČR) obsahuje fragmenty DNA o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp.

3.7 Metody

Následující postupy byly prováděny dle skript Španové a Ritticha (2010) [1], byly částečně modifikované dle doporučení paní doc. RNDr. Aleny Španové, CSc.

3.7.1 Oživení lyofilizovaných bakteriálních kultur (*Lactobacillus acidophilus* CCDM 476 a *Bifidobacterium animalis* CCDM 246a)

- S konzervou lyofilizované kultury bylo pracováno supersterilně
- Po opatrném otevření skleněné ampule a odstranění zátky se k vysušené suspenzi mikroorganismů přidalo asi 0,3 ml MRS média.
- Suspenze se opatrně promíchala a přenesla do 10 ml tekutého MRS média.
- Takto byla poté kultura kultivována při teplotě 37 °C po dobu 2-3 dnů.
- Poté bylo odebráno 0,1 ml suspenze narostlých mikroorganismů a přeočkováno do 10 ml MRS média.
- Kultura se poté kultivovala 2-3 dny.

Bakterie rodu *Lactobacillus* byly kultivovány aerobně. Bakterie rodu *Bifidobacterium* byly kultivovány za anaerobních podmínek.

3.7.2 Uchovávání kultur zamražením v glycerolu

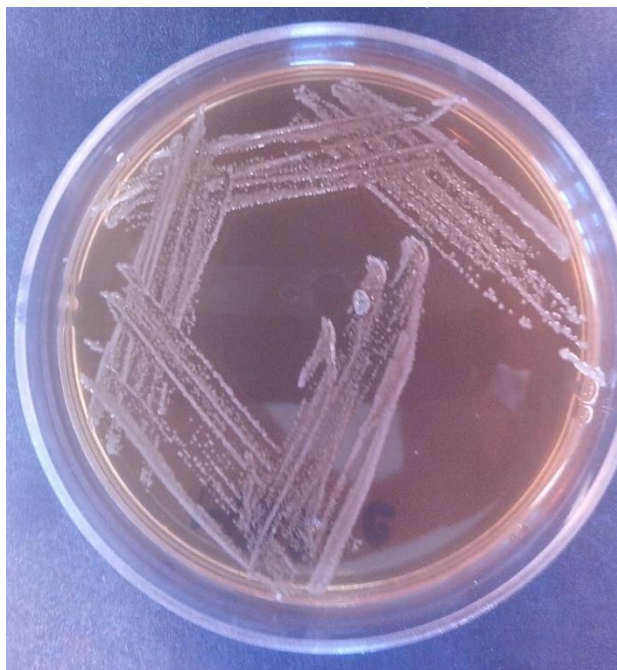
Do Eppendorfových zkumavek se smíchaly 2/3 objemu inokula s 1/3 objemu glycerolu (40 %). (resp.: 200 µl promíchané čerstvě narostlé kultury v tekutém MRS médiu se 100 µl glycerolu (40%)). Tímto se dosáhlo cca 15%-ní koncentrace glycerolu, která je pro zamrazování kultur ideální. Kultura je uchovávána při -20 °C.

3.7.3 Kontrola čistoty kultury

- Vykultivované bakteriální kultury se přeočkovaly do 10 ml sterilního tekutého MRS média po 100 µl a byly kultivovány při 37°C další tři dny.
- Kontrola čistoty bakteriální kultury se provedla pomocí křížového roztěru, kdy se narostlé kultury v MRS médiu křížovým roztěrem vysely na Petriho misky s pevným MRS agarovým médiem a kultivovaly se při teplotě 37 °C po dobu 3 dnů.

Křížový roztěr a růst kolonií buněk *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 241a. a buněk *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476 je uveden na Obr.č.5 a Obr.č.6. Růst těchto buněk v tekutém médiu je uveden na Obr.č.7 a Obr.č.8., kde lze ve zkumavkách s kultivovanými buňkami pozorovat zákal média.

Obr.č.5: Křížový roztěr *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 241a



Obr.č.6: Křížový roztěr *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476



Obr.č.7: *Submerzní kultivace Bifidobacterium animalis ssp. lactis CCDM 241a*



Zprava- kontrolní zkumavka, kultivované buňky, kultivované buňky

Obr č.8: *Submerzní kultivace Lactobacillus acidophilus CCDM 476*



Zprava- kontrolní zkumavka, kultivované buňky, kultivované buňky

3.7.4 Homogenizace vzorků salámu pomocí BagSystemu

5 g sterilně naváženého vzorku salámu bylo vloženo do sterilního sáčku s membránou BagFilter, ke kterému byl přidán 2,5x násobek sterilní vody (12,5 ml). BagFilter byl vložen do stomacheru a vzorek byl homogenizován 15 min za občasného promíchání. Z prostoru za membránou bylo pipetou odsáto 1,5 ml homogenizátu a ten byl stočen při 10 000 ot/3 min, supernatant byl slit a k sedimentu bylo přidáno dalších 1,5 ml zhomogenizovaného salámu a vzorek byl stočen při 10 000 ot/3 min. Celkem tak bylo zpracováno 3 ml homogenizátu a buněk v něm. Supernatant byl opět slit a byl přidán 1 ml vody (promyti), vzorek byl následně stočen 10 000 ot/3 min.

3.7.5 Homogenizace vzorků salámů pomocí kopistu

- Navážka 300 mg vzorku salámu se v Eppendorfově zkumavce (1,5 ml) smíchala s 500 µl Lyzačního roztoku B.
- Vzorek byl opatrně a pečlivě rozmělněn a promíchán pomocí kopistu.
- Poté se přidalo dalších 500 µl lyzačního roztoku B a směs se opět promíchala.
- Směs byla inkubována do druhého dne při teplotě 55 °C za občasného promíchání.
- Zlyzované hrubé lyzáty byly následně použity k izolaci DNA a uchovávány při teplotě -20 °C.

3.7.6 Příprava hrubých lyzátů buněk

- 1 ml buněčné kultury v MRS médiu se centrifugoval při 14 500 ot/min po dobu 5 minut.
- Supernatant se opatrně slil a nechal dobře okapat. Poté se resuspendoval v 1 ml lyzačního roztoku A, suspenze byla opět centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 5 minut.
- K sedimentu se přidalo 500 µl lyzačního roztoku B a sediment byl dokonale resuspendován.
- Vzorky se pak inkubovaly po dobu 1 hod při laboratorní teplotě za občasného promíchání.
- K inkubované suspenzi se přidalo 12,5 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K (100 µg/ml). Směs byla důkladně promíchána a inkubovala se při 55 °C do druhého dne.
- Takto vzniklé hrubé lyzáty buněk byly uchovávány při teplotě -20 °C, aby se zamezilo případné degradaci DNA.

3.7.7 Izolace DNA pomocí fenolové extrakce

- K 500 µl hrubých lyzátů (HL) se přidalo 500 µl fenolu.
- Směs byla kývavým pohybem opatrně promíchávána po dobu 4 minut.
- Poté se vzorky centrifugovaly při 15 000 ot./min po dobu 5 minut.
- Pomocí špičky s ustřiženým hrotem byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky.
- K vodní fázi s DNA se přidalo 500 µl TE pufru a poté se přidalo 700 µl směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1) a směs se opět promíchala kývavým pohybem po dobu 4 minut.

- Takto připravené vzorky byly centrifugovány při 15 000 ot./min po dobu 5 minut.
- Z centrifugovaných vzorků se odebrala vodní fáze s DNA a přepipetovala se do čisté Eppendorfovy zkumavky.

3.7.8 Srážení DNA přidavkem ethanolu

- Ke vzorku DNA se přidalo 1/20 objemu 3 M octanu sodného a vzorek byl promíchán.
- Poté bylo přidáno 1 ml 96% ethanolu, směs se promíchala a při teplotě -20 °C po dobu 15 minut se nechala srážet DNA.
- Směs byla zcentrifugována při 15 000 otáčkách po dobu 15 minut, po centrifugaci se supernatant opatrně slil.
- Sediment DNA se vysušil v exikátoru po dobu asi 10 min. Získaná DNA byla rozpuštěna v 50 µl TE pufru.
- Takto připravená DNA byla naředěna a použita pro PCR.

3.7.9 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA se spektrofotometricky stanovovala přístrojem NanoPhotometer™ s objemem vzorku 4 µl. Jako referenční vzorek byl použit TE pufr. Měření bylo provedeno víčkem "lid 50" (viz tab. č. 5).

Tabulka č. 5: Parametry pro NanoPhotometer™

Označení víčka	lid 50
Optická dráha (mm)	0,2
Objem vzorku (µl)	0,7-4
Měřitelný rozsah DNA (ng/µl)	150-4000

3.7.10 Izolace DNA pomocí magnetických mikročástic

Složení směsi pro izolaci DNA pomocí magnetických mikročástic je uvedeno v Tab. č. 6.

Tabulka č. 6: Složení směsi pro izolaci DNA pomocí magnetických částic

Krok	Komponenty	Separáčn		
		směs/množství (µl)		
Roztok č.		1	2	3
1	NaCl (5 M)	200	200	200
2	hrubý lyzát buněk	50	150	175
3	PEG (6000 (40 %))	200	100	100
4	Magnetický nosič (2 mg/ml)	50	50	25
Celkem objem		500	500	500

- Po smíchání komponentů se směs inkubovala po dobu 15 minut při laboratorní teplotě.
- Poté se směs umístila do magnetického separátoru a magnetické mikročástice byly separovány po dobu 10 minut při laboratorní teplotě.
- Po uplynulém času byl odebrán supernatant, z magnetického separátoru se vyjmul magnetický pás a do Eppendorfových zkumavek s mikročásticemi se přidalo 500 μ l 70 % ethanolu.
- Poté, co byl vzorek promíchán, se do separátoru opět zasunul magnetický pás a po 1 minutě se ethanol opatrně odebral.
- Poté se mikrozkušavky vyjmuly ze separátoru a zbytkový ethanol se odpařil.
- Poté byla do 50 μ l TE pufru eluována DNA, která byla adsorbována na povrchu magnetických mikročástic. Směs byla inkubována do druhého dne v ledničce.
- Po uplynulé době se magnetickým separátorem odebraly magnetické mikročástice a DNA byla odebrána do čistých Eppendorfových zkumavek.
- U izolované DNA byla následně spektrofotometricky stanovená koncentrace.

Kromě izolace DNA z hrubých lyzátů buněk byl postup izolace DNA s využitím magnetických částic a separační směsi č.1 použit pro přečištění DNA.

3.7.11 Imunomagnetická separace bakteriálních buněk pomocí magnetických částic

- K homogenizátu získaného homogenizací BagSystémem se přidalo 100 μ l MČ z magnetické perlové celulózy funkcionalizovanou potilátkou Anti-Lbc.
- Směs se poté inkubovala při laboratorní teplotě po dobu 2 h za stálého míchání.
- Poté byly MČ odseparovány pomocí magnetického separátoru a supernatant byl odebrán.
- Zbylé MČ byly promyty přidáním 800 μ l PBS pufru a směs se míchala 5 minut.
- Poté byly MČ opět odseparovány a znovu promyty.
- Po 5-ti minutách se částice odseparovaly a resuspendovaly v 50 μ l PBS pufru.
- MČ s navázanými buňkami v 50 μ l PBS pufru bylo poté lyzováno v termocycleru při teplotě 99 °C po dobu 10 min. 30 μ l PBS pufru s navázanými buňkami bylo lyzováno a 5 μ l se vyselo na Petriho misky, pro ověření viability buněk.
- Vzniklé lyzáty buněk se použily jako DNA matrix do PCR směsí.

3.7.12 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- Všechny komponenty pro PCR se před použitím rozmrazily, promíchaly a zcentrifugovaly.
- Připravilo se 25 μ l PCR směsi s DNA matricí vzorků. Směs pro PCR byla připravována sterilně v UV boxu.
- Jednotlivé komponenty pro PCR se smíchaly v pořadí uvedeném v Tabulce č. 1 do malých 200 μ l Eppendorfových zkumavek.
- Negativní kontrola se připravila přidáním 1 μ l PCR vody místo DNA matrice.
- Pozitivní kontrola se připravila použitím DNA matrice o koncentraci 10 ng/ μ l některého ověřeného bakteriálního kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 T, *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bifidobacterium animalis* CCM 4988 T.

- Vzorke obsahující všechny komponenty PCR byly promíchány a krátce zcentrifugovány a umístěny do termocykleru, kde se nastavil specifický program pro amplifikaci dle Tabulek č.7 a č.8.
- Po ukončení amplifikačního programu se vzorky nanesly na 1,8 % agarózový gel a detekovaly se specifické produkty PCR reakce.

Tabulka č. 7: Amplifikační programy pro doménu *Bacteria* a rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*

Doména <i>Bacteria</i>		Rod <i>Lactobacillus</i>		Rod <i>Bifidobacterium</i>	
94 °C	5 min	94 °C	5 min	94 °C	5 min
94 °C	30 s	95 °C	30 s	94 °C	1 min
56 °C	30 s	55 °C	30 s	50 °C	1 min
72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	2 min
72 °C	5 min	72 °C	7 min	72 °C	10 min
30 cyklů					

Tabulka č. 8: Amplifikační programy pro bakteriální druhy *L. acidophilus* a *B. animalis*

Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> [37]		Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> [38]		Druh <i>Bifidobacterium animalis</i> [10]	
94 °C	5 min	94 °C	5 min	94 °C	5 min
95 °C	30 s	94 °C	30 s	92 °C	30 s
62 °C	30 s	58 °C	30 s	58 °C	30 s
72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	1 min
72 °C	7 min	72 °C	5 min	72 °C	10 min
30 cyklů		40 cyklů		30 cyklů	

[37] primery specifické pro PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus* (Tilsala, 1997)

[38] primery specifické pro PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus* (Walter, 2000)

3.7.13 Agarózová gelová elektroforéza DNA a produktů PCR

- V Erlenmayerově baňce se v mikrovlnné rozvařil 0,8% nebo 1,8 % agarózový gel rozpuštěním 1,8 g agarózy ve 100 ml 0,5× TBE pufrem.
- Po vychladnutí na cca 60 °C se směs přelila do elektroforetické vaničky s hřebínkem a nechala tuhnout 30 minut. Po ztuhnutí gelu se hřebínek odňal.
- Na polyethylenové podložce se smíchalo 15 µl DNA a 3 µl nanášecího pufre. Vzniklá směs byla nanášena do komůrky gelu.
- Vanička s nanášenou DNA v gelu se vložila do elektroforetické vany a převrstvila se 0,5× TBE pufrem.
- Poté probíhala elektroforéza při 80 V po dobu cca 1,5 hodiny.
- Po doběhnutí elektroforézy se gel barvil v roztoku ethidium bromidu (1 µg/ml) po dobu 30 minut.
- Obarvený gel byl pozorován na transilluminátoru v UV světle a fotograficky zdokumentován.

4 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo testovat využití magnetických mikročásteček pro izolaci a průkaz probiotické DNA v kvalitě vhodné pro PCR z fermentovaných masných výrobků.

Dalším cílem práce bylo prokázat přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis* v masných výrobcích s probiotiky.

5 VÝSLEDKY

5.1 Homogenizace vzorků salámů a příprava hrubých lyzátů buněk

5.1.1 Homogenizace vzorků salámů pomocí BagSystému

Pro izolaci DNA bylo třeba vzorky salámů homogenizovat. K homogenizaci byl použit BagSystem a kopist (viz kap. 3.7.4 a 3.7.5).

Bylo testováno zpracování vzorků salámů pomocí BagSystému a poté se připravily hrubé lyzáty buněk. Buňky ze 3 ml homogenizátu byly promyty a zlyzovány (dle 3.7.6) a použity pro izolaci DNA (dle 3.7.7). V tabulce č.9 je zaznamenáno potřebné množství vzorku a sterilní vody potřebné pro výtěžek určitého množství DNA.

Tabulka č. 9: Testování homogenizace vzorků salámů v BagSystému

Vzorek č.	Navážka vzorku (g)	Množství přidané sterilní vody (ml)	Doba homogenizace (min)	Množství homogenizátu pro izolaci DNA (ml)	Koncentrace DNA (ng/μl)	Celkové množství DNA (μg)
1	5	12,5	15	3	165,0	8250
2	5	25	15	3	113,5	5675
3	10	25	15	3	68,3	3415
4	10	90	15	3	72,1	3605

→ Nejvyšší množství DNA bylo izolováno z 5 g navážky salámu s 12,5 ml vody. Na 1 g výrobku je třeba použít minimálně 2,5 ml sterilní vody.

5.1.2 Homogenizace vzorků salámu pomocí kopistu

Byla testována homogenizace 400mg, 300 mg a 200 mg vzorku salámu. Po přidání 500 μl lyzačního roztoku B (viz kap. 3.7.5) byl vzorek inkubován při 55 °C do druhého dne. Po důkladném zvortexování se postupovalo dle postupu uvedeného v kapitole 3.7.6. Vizually byla kontrolována homogenizace vzorků.

→ Pro důkladnou homogenizaci bylo potřeba 2,5 ml lyzačního roztoku B na 1 g výrobku (0,5 ml na 200 mg).

5.1.3 Příprava hrubých lyzátů buněk

Z homogenizovaných vzorků salámů byly připraveny hrubé lyzáty buněk podle postupu uvedeného v kapitole 3.7.6. Vizually byl kontrolován vzhled hrubých lyzátů. Po inkubaci při 55 °C byl vzniklý hrubý lyzát u navážky 400mg Ovčácké klobásy velmi hustý, na stěnách zkumavky ulpíval tuk. U salámu Orlík byl HL méně hustý, části salámu byly sedimentovány na dně a v horní části Eppendorfovy zkumavky byla vrstva lyz. roztoku. HL získané ze salámu Orlíky byly výrazně čistší.

→ Hrubé lyzáty z jednotlivých salámů se lišily svou hustotou, zákalem a přítomností částeczek tuku. Byly použity pro izolaci DNA fenolovou extrakcí a magnetickými částicemi.

5.1.4 Izolace DNA z hrubých lyzáků salámů metodou fenolové extrakce

Z homogenizovaných vzorků salámů byly připraveny hrubé lyzáty buněk podle postupu v kapitole 3.7.6. Poté se provedla izolace DNA pomocí metody fenolové extrakce uvedené v kapitole 3.7.7. Pomocí agarózové gelové elektroforézy pak byla ověřena izolace DNA a její relativní intaktnost. Výsledky jsou uvedeny na obrázku č. 9. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je uvedeno v tabulce č. 10. Z hodnoty absorbance A₂₆₀ se stanovila koncentrace DNA, z poměru hodnot A₂₆₀/A₂₈₀ se určila čistota DNA (viz. tab.10).

Obr. č. 9.: Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované ze salámů



Běh	DNA	Detekce DNA	Nanesené množství na gel (μl)	Množství DNA (ng)
1	Ovčácká klobása	+++	20	3300
2	Salám Orlík	+++	20	2260

+, ++, +++ Intenzita detekované DNA; – DNA nebyla detekována

Tabulka č.10: Spektrofotometrické stanovení DNA

Název vzorku	A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}	A _{260nm/280nm}	Objem vzorku [μl]	Koncentrace DNA [μg/μl]
Ovčácká klobása	0,047	0,076	0,047	0,01	1,784	100	165
Salám Orlík	0,017	0,046	0,024	0,001	1,957	100	113

→ Z Ovčácké klobásy i ze salámu Orlík byla izolovaná DNA v dostatečné koncentraci a kvalitě vhodné pro metodu PCR.

→ Byla izolována DNA o koncentraci 165ng/μl (Ovčácká klobása) a 113ng/μl (salám Orlík).

5.2 Izolace DNA z hrubých lyzátů salámů pomocí magnetických mikročástic

Hrubé lyzáty salámů (HL) připravené inkubací do druhého dne při 55 °C byly zcentrifugovány po dobu 5min při 10 000 ot/min. Po centrifugaci byly opatrně promíchány a ze dna bylo odebráno 50 µl HL a přidáno do separační směsi č.1 (kap. 3.7.10, tab.č.6) Dále se postupovalo dle 3.7.10.:

- Po separaci magnetických částic (MČ) magnetem byl odebrán supernatant a MČ s navázanou DNA byl 2x propláchnut 70%-ním ethanolem (500 µl).

→ MČ se lišily svým chováním při separaci magnetickým separátorem. Po propláchnutí ethanolem a separaci magnetickým separátorem byly nejvíce viditelné MČ F-kol 135ox a B-100, MČ Dynabeads byly na stěně zachyceny jen částečně a klesaly ke dnu.

5.3 Optimalizace izolace DNA z hrubých lyzátů buněk salámů pomocí magnetických částic

Byly testovány hrubé lyzáty salámů připravované homogenizací pomocí BagSystemu a kopistem. K optimalizaci byly použity částice F-kol B-100 a tři různé separační směsi. Separací směsi se lišily množstvím hrubých lyzátů salámů (viz kap. 3.7.10, Tab. č.6).

5.3.1 Izolace DNA z hrubých lyzátů salámů připravených homogenizací pomocí BagSystemu

Hrubé lyzáty buněk byly přečištěny třemi různými separačními směsmi (viz kap. 3.7.10, Tab.č.6) a magnetickým nosičem. Separací směsi se lišily množstvím hrubých lyzátů buněk, množstvím PEG a množstvím použitého nosiče. Následně byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA u jednotlivých vzorků.

Z hrubých lyzátů připravených pomocí BagSystemu byla izolována DNA s využitím částic F-kol B-100 a separačních směsí č.1, č.2 a č.3 (viz kap. 3.7.10, Tab.č.6). Průměrné výsledky jsou zaznamenány v tabulce č.11.

Tabulka č.11: Izolace DNA z HL salámů pomocí MČ F-kol B-100 Vzorky salámů byly homogenizovány BagSystémem.

Sep. směs		A230	A260	A280	A320	A260/A280	c (ng/µl)
č.1	Ovčácká klobása	0,025	0,026	0,020	0,009	1,420	4,250
	salám Orlický	0,038	0,028	0,016	0,003	1,849	6,688
č.2	Ovčácká klobása	0,021	0,048	0,042	0,020	1,272	0,278
	salám Orlický	0,034	0,034	0,028	0,012	1,352	0,225
č.3	Ovčácká klobása	0,079	0,082	0,064	0,030	1,504	0,520
	salám Orlický	0,013	0,036	0,033	0,011	1,119	0,248

→ Nejvyšších výtěžků DNA se dosáhlo použitím separační směsi č. 1., která měla složení: 200 µl NaCl, 50 µl HL, 200 µl PEG a 50 µl magnetického nosiče F-kol B-

100 (2mg/ml). Tato směs pak byla použita k izolaci DNA třemi druhy MČ z HL salámů homogenizovaných kopistem.

5.3.2 Izolace DNA z hrubých lyzátů salámů připravených homogenizací pomocí kopistu

Pomocí kopistu se připravily hrubé lyzáty salámů z různých množství vzorku (200, 300 a 400 mg), z nichž byla poté pomocí MČ izolovaná DNA pomocí separační směsi č.1 (kap. 3.7.10, viz Tab.č.6). Testovala se izolace DNA pomocí magnetických částic F-kol 135ox, Dynabeads a F-kol B-100. V tabulce č. 12a (Ovčácká klobása) a 12b (salám Orlík) jsou zaznamenány spektrofotometricky získané koncentrace DNA.

Tabulka č. 12: Spektrofotometrické stanovení DNA izolované z hrubých lyzátů salámů. Vzorky salámů byly homogenizovány kopistem.

a) Ovčácká klobása

Navážka pro homogenizaci	Druh MČ	A230	A260	A280	A320	A260/A280	c (ng/μl)
200 mg	F-kol 135 ox	0,095	0,085	0,053	0,000	1,604	21,2
	F-kol B-100	0,027	0,018	0,019	0,007	0,917	5,5
	Dynabeads	0,095	0,039	0,027	0,000	1,444	9,8
300 mg	F-kol 135 ox	0,084	0,061	0,043	0,013	1,600	24,0
	F-kol B-100	0,045	0,020	0,018	0,007	1,727	9,8
	Dynabeads	0,092	0,026	0,024	0,006	1,111	10,0
400 mg	F-kol 135 ox	0,082	0,067	0,050	0,019	1,548	12,0
	F-kol B-100	0,096	0,066	0,045	0,022	1,913	11,0
	Dynabeads	0,301	0,164	0,134	0,071	1,476	23,2

b) salám Orlík

Navážka pro homogenizaci	Druh MČ	A230	A260	A280	A320	A260/A280	c (ng/μl)
200 mg	F-kol 135 ox	0,091	0,109	0,084	0,030	1,463	19,8
	F-kol B-100	0,145	0,073	0,054	0,032	1,864	10,3
	Dynabeads	0,186	0,096	0,078	0,041	1,292	13,8
300 mg	F-kol 135 ox	0,358	0,305	0,227	0,102	1,624	50,8
	F-kol B-100	0,051	0,038	0,027	0,011	1,688	6,8
	Dynabeads	0,091	0,048	0,033	0,017	1,938	7,8
400 mg	F-kol 135 ox	0,169	0,149	0,111	0,053	1,655	24,0
	F-kol B-100	0,102	0,062	0,043	0,020	1,826	10,5
	Dynabeads	0,060	0,033	0,026	0,016	1,700	4,3

→ Nejvyšší množství DNA bylo izolováno pomocí MČ F-kol 135ox (kromě navážky 400 mg vzorku salámu Ovčácká klobása), následované Dynabeads a pak F-kol B-100.

Pomocí FE bylo izolováno ze 3 ml homogenizátu tj. 1,2 g vzorku 8250 ng DNA ze salámu Ovčácká klobása a 5675 ng DNA ze salámu Orlík. Což je z 1g vzorku v přepočtu asi 6900 ng DNA (Ovčácká klobása) a asi 4700 ng DNA (Orlík). Kromě bakteriální DNA vzorky pravděpodobně obsahují i eukaryotní DNA z masa. Maso obsahuje hemoglobin, což je známá sloučenina inhibující PCR [62].

Pomocí MČ bylo z 200 mg vzorku izolováno 1060 ng DNA ze salámu Ovčácká klobása a 990 ng DNA ze salámu Orlík. To je v přepočtu na 1 g vzorku 5300 ng DNA u ovčácké klobásy a 5050 ng DNA u salámu Orlík.

→ Z 1 g salámů bylo izolováno pomocí FE přibližně o 20 % DNA více, než pomocí MČ.

5.3.3 Izolace DNA z bakteriálních kultur pomocí magnetických částic

Pro srovnání byla provedena izolace DNA kmenů *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476 a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 241a pomocí magnetických částic F-kol 135ox, B-100 ox a Dynabeads. Buňky byly kultivovány dle kap. 3.7.3. Z nich byly připraveny hrubé lyzáty buněk (dle 3.7.6) a DNA byla izolována dle postupu 3.7.10. Následně bylo provedeno spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 13 a), b).

Tabulka č.13: Spektrofotometrické měření DNA izolované pomocí MČ z bakteriálních kultur

a) *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476

F-kol 135ox	Vz.č	A230	A260	A280	A320	A260/a280	c (ng/μl)
	1.	0,136	0,172	0,120	0,033	1,598	69,5
	2.	0,146	0,183	0,128	0,038	1,610	72,5
F-kol B-100	1.	0,004	0,034	0,200	-0,005	1,560	19,5
	2.	-0,034	0,012	0,004	-0,011	1,533	11,5
Dynabeads	1.	0,114	0,104	0,064	-0,007	1,563	55,5
	2.	0,148	0,100	0,067	-0,013	1,413	56,5

b) *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 241a

F-kol 135ox	Vz.č	A230	A260	A280	A320	A260/a280	c (ng/μl)
	1.	0,052	0,096	0,078	0,025	1,340	35,5
	2.	0,019	0,081	0,070	0,019	1,216	31,0
F-kol B-100	1.	0,001	0,012	0,010	0	1,200	3,0
	2.	0,008	0,019	0,016	0,003	1,231	4,0
Dynabeads	1.	0,169	0,060	0,056	0,013	1,093	11,8
	2.	0,148	0,074	0,059	0,019	1,375	13,8

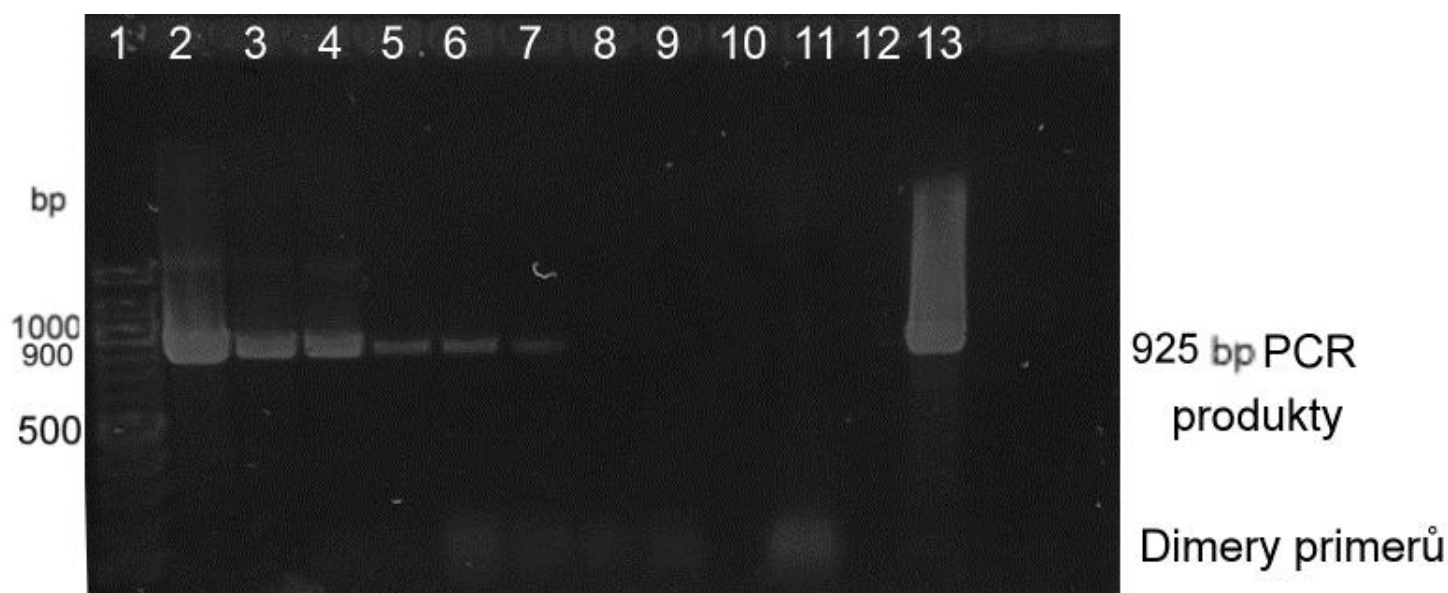
→ Nejvyšších koncentrací izolované DNA bylo dosaženo pomocí v následujícím pořadí: F-kol 135ox > Dynabeads > F-kol B-100. Pořadí bylo stejné jako u salámů.

5.4 Testování druhově specifických PCR

Byla ověřena přítomnost druhů *Bifidobacterium animalis* a *Lactobacillus acidophilus* v DNA izolovaných z buněk kmenů *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 241a a *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476. Tyto dva kmeny se vyskytují v salámu Ovčácká klobása. Pro stanovení bylo použito metody PCR pro druh *Bifidobacterium animalis* (kap. 3.7.12) [10]. Na obrázku č. 10 jsou zobrazeny výsledky gelové elektroforézy produktů PCR.

Pro stanovení přítomnosti bakteriální DNA druhu *Lactobacillus acidophilus* bylo použito metody PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*[38]. Pro zvýšení citlivosti metody bylo zvýšeno množství přidávaných primerů, matrice DNA a počet cyklů (viz. kap. 3.7.12, Tab. č.8). Složení PCR směsi viz kapitola 2.6.5. Jako DNA matrice byla použita DNA izolovaná pomocí MČ z HL buněk kultury *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476. Jako vzorek pozitivní kontroly byla použita ověřená DNA kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833T. Vzorky PCR byly nanесeny na 1,5%-ní agarózový gel a dokumentovány (Obr. č. 11).

Obrázek č.10: Gelová elektroforéza produktů PCR pro druh *Bifidobacterium animalis* (925 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA získané izolované pomocí MČ F-kol 135ox z HL buněk čisté bakteriální kultury.

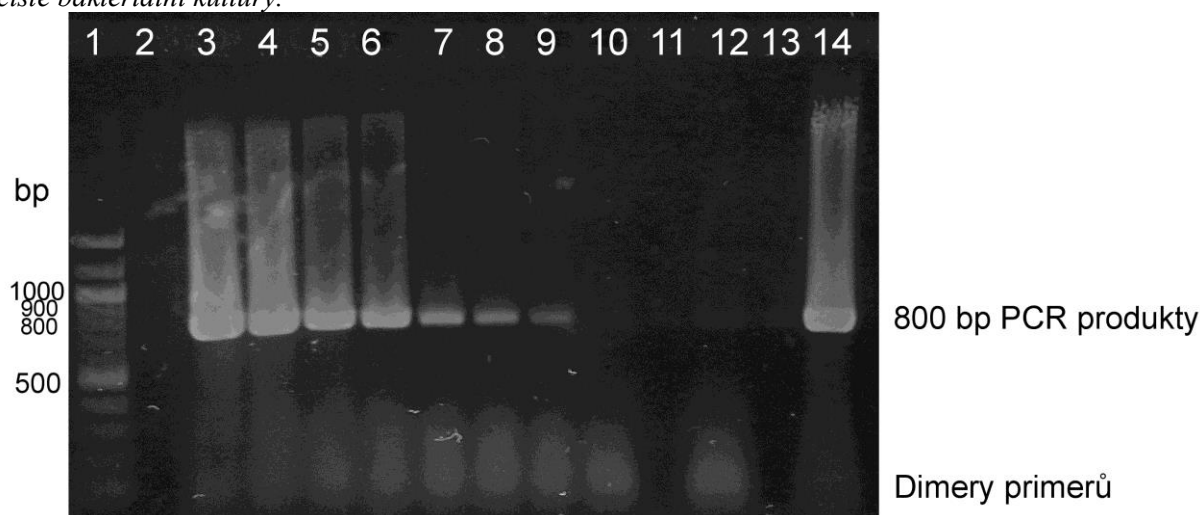


	Běh	Izolace DNA	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
PCR pro <i>Bifidobacterium animalis</i> s primery [10]	1		Standard 100 bp		
	2	MČ	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 241a	10 ng	+++
	3			1 ng	+++
	4			100 pg	+++
	5			10 pg	++
6					

	6			1 pg	++
	7			100 fg	+
	8			10 fg/	---
	9			1 fg	---
	10		prázdný běh		
	11		negativní kontrola		---
	12		prázdný běh		
	13		pozitivní kontrola	10 ng/ μ l	+++

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

Obrázek č.11: Gelová elektroforéza produktů PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus* (800 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA izolované pomocí MČ F-kol 135ox z HL buněk čisté bakteriální kultury.



PCR pro <i>Lactobacillus acidophilus</i> s primery [38]	Běh	Izolace DNA	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
	1			Standard 100 bp	
2			prázdný běh		
3		MČ	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 476	10 ng	+++
4	1 ng			+++	
5	100 pg			+++	
6	10 pg			+++	
7	1 pg			++	
8	100 fg			+	
9	10 fg			+	
10	1 fg			---	

	11		prázdný běh		
	12		negativní kontrola		---
	13		prázdný běh		
	14		pozitivní kontrola	10 ng/μl	+++

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

→ **Specifické produkty PCR pro druh *Bifidobacterium animalis* byly detekovány po amplifikaci 10 ng až 100 fg DNA/PCR směs.**

→ **Specifické produkty PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus* byly detekovány po amplifikaci 10 ng až 10 fg DNA/PCR směs.**

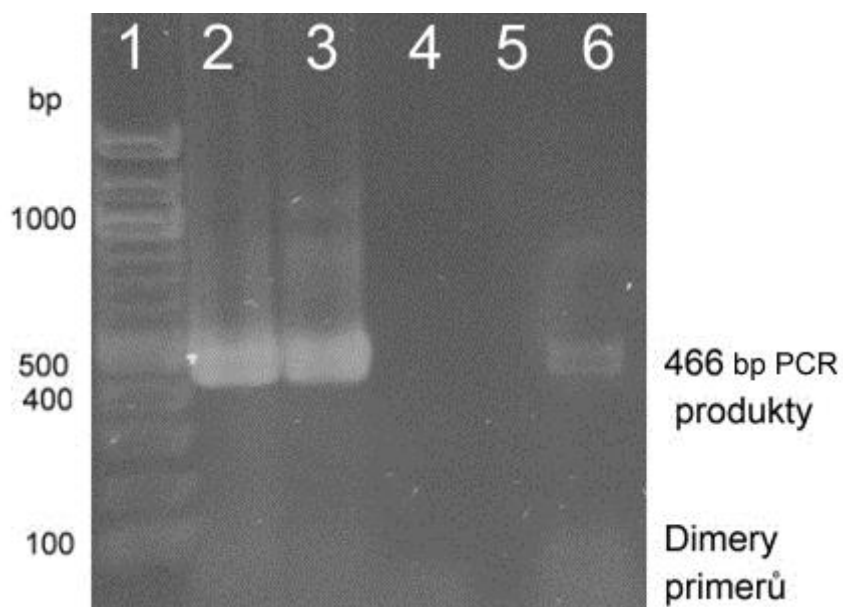
5.5 Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované ze salámů metodou fenolové extrakce

Byla ověřena amplifikovatelnost DNA izolované ze salámů metodou fenolové extrakce. Byla provedena PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*, rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, druhy *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis*.

5.5.1 PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*

Pro ověření amplifikovatelnosti a přítomnosti bakteriální DNA byla použita metoda PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*. Postupovalo se podle postupu uvedeném v kapitole 2.7.12. Do PCR byla použita DNA izolovaná z masných výrobků pomocí fenolové extrakce naředěná na různé koncentrace. Byly amplifikovány produkty PCR specifické pro doménu *Bacteria* o velikosti 466 bp. Tyto produkty byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy. Výsledky jsou zobrazeny na Obrázku č.12 a č.13. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA kmene *Lactobacillus casei* CCM 4798 vyředěná na koncentraci 10 ng/μl.

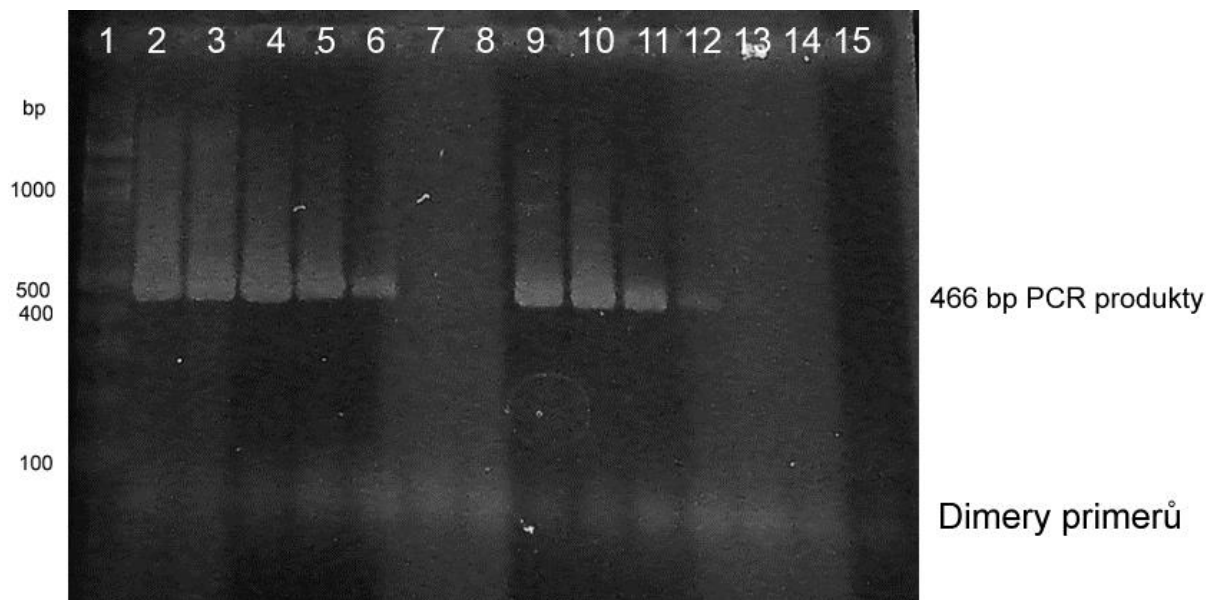
Obrázek č. 12: Gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria* (466 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná ze salámů pomocí FE.



	Běh	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce PCR produktu
PCR pro doménu <i>Bacteria</i> s primery [8]	1	Standard 100 bp		+++
	2	Salám Orlík	20 ng	+++
	3	Ovčácká klobása	20 ng	+++
	4	Negativní kontrola		---
	5	prázdný běh		
	6	Pozitivní kontrola	10 ng	++

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

Obr. č. 13.: Gelová elektroforéza produktů PCR pro doménu *Bacteria* (466bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA izolované ze salámů pomocí FE.



	Běh	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
PCR pro doménu <i>Bacteria</i> s primery [8]	1	Standard 100 bp		+++
	2	Pozitivní kontrola	10ng	+++
	3	Ovčácká klobása	20ng	+++
	4	Ovčácká klobása	10ng	+++
	5	Ovčácká klobása	1ng	+++
	6	Ovčácká klobása	100pg	++
	7	Ovčácká klobása	10pg	-
	8	Ovčácká klobása	1pg	-
	9	salám Orlík	20 ng	+++
	10	salám Orlík	10 ng	+++
	11	salám Orlík	1 ng	++
	12	salám Orlík	100 pg	+
	13	salám Orlík	10 pg	-
	14	salám Orlík	1 pg	-
	15	Negativní kontrola		-

+ , ++ , +++ různá intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

→ DNA byla z obou salámů izolována v kvalitě vhodné pro metodu PCR. Byly detekovány specifické produkty PCR pro doménu *Bacteria*- amplicony o velikosti

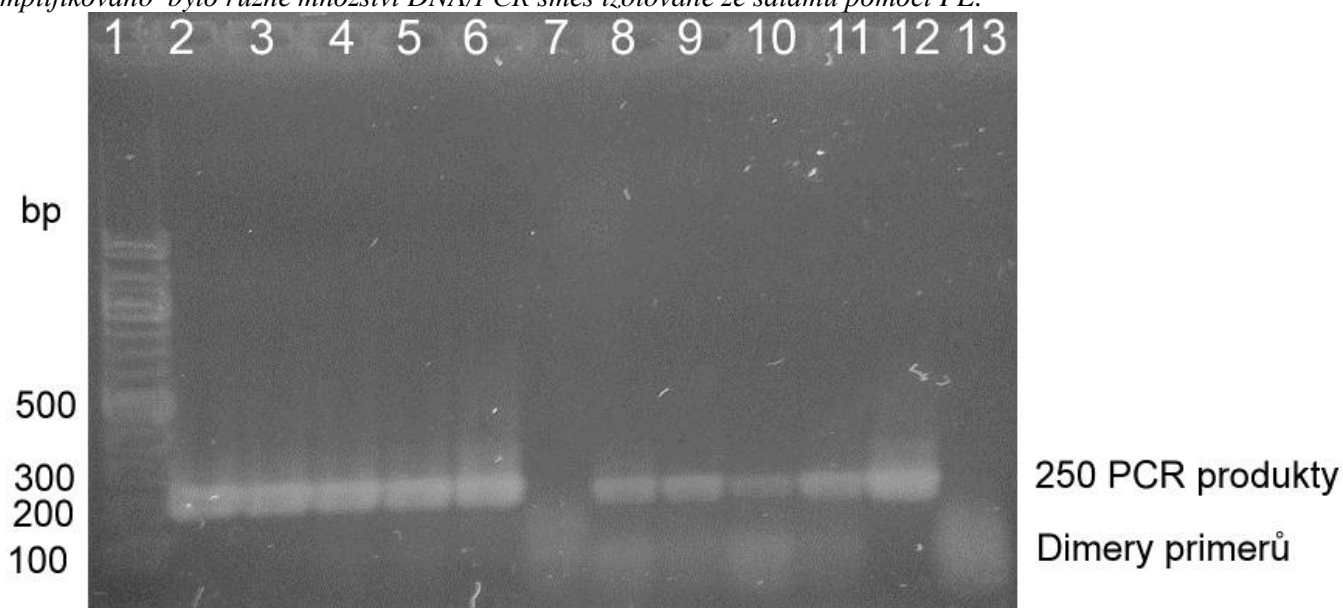
466 bp. Nejnižší množství DNA matrice nezbytné pro průkaz produktu PCR pomocí gelové elektroforézy bylo 100 pg/PCR.

5.5.2 PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

Pro ověření přítomnosti DNA bakterií rodu *Lactobacillus* byla použita metoda PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*. Byla použita DNA získaná metodou FE. Postupovalo se podle postupu uvedeném v kapitole 3.7.12. V PCR směsích bylo testováno různé množství $MgCl_2$ přidané ke směsi komplexního pufru. Byly amplifikovány produkty PCR specifické pro rod *Lactobacillus* o velikosti 250 bp. Tyto produkty PCR byly detekovány pomocí agaróзовé gelové elektroforézy (Obrázek č.13).

Citlivost PCR pro rod *Lactobacillus* byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.7.12. DNA byla vyředěná desítkovým ředěním až do koncentrace 1 fg a použita pro amplifikaci. Na Obrázku č. 14, 15 a 16 jsou zaznamenané výsledky. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA kmene *Lactobacillus casei* CCM 4798 (10 ng/ μ l).

Obr. č.14: Gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* (250 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA/PCR směs izolované ze salámů pomocí FE.

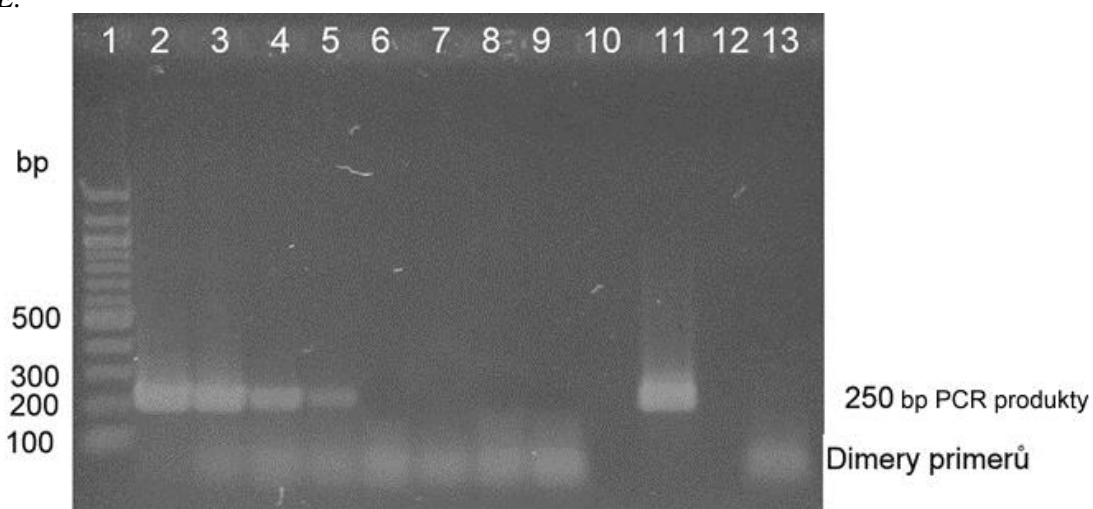


	Běh	DNA	Množství DNA/PCR směs	Množství přidaného $MgCl_2$ (50 mM)/PCR směs	Detekce produktu PCR
PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> s primery [9]	1	Standard 100 bp			+++
	2	Ovčácká klobása	10 ng	0	+++
	3		10 ng	0,5 μ l	+++
	4		10 ng	1 μ l	+++
	5		10 ng	1,5 μ l	+++
	6		pozitivní kontrola	100pg	
	7	negativní kontrola			-

	8	salám Orлік	1pg	0	++
	9		10 ng	0,5 μ l	++
	10		10 ng	1 μ l	++
	11		10 ng	1,5 μ l	++
	12	pozitivní kontrola	10 ng		+++
	13	negativní kontrola			-

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

Obrázek č. 15.: Gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* (250 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA/PCR směs izolované z ovčácké klobásy pomocí FE.

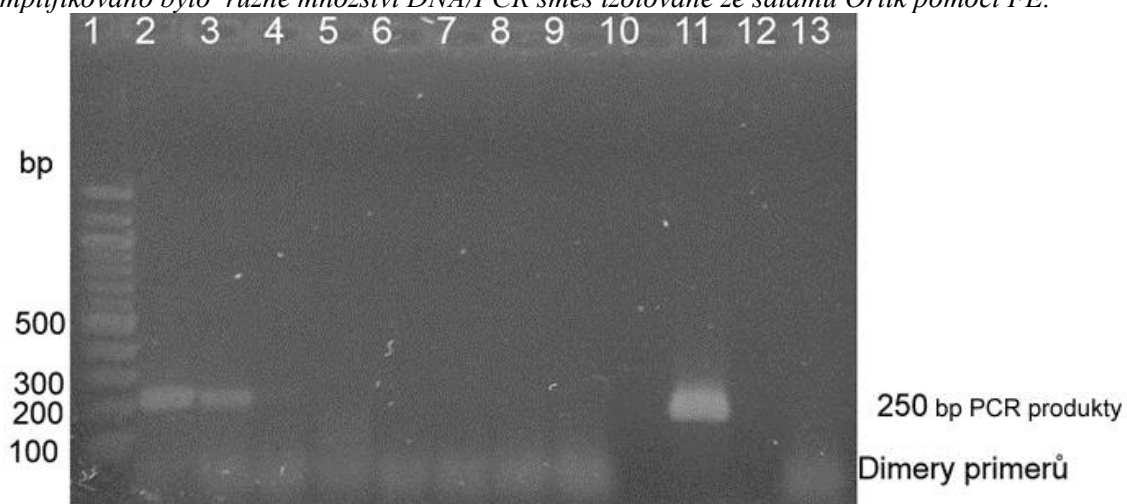


	Běh č.	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce PCR produktu
PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> s primery [9]	1	Standard 100 bp		+++
	2	Ovčácká klobása	10 ng	+++
	3		1 ng	+++
	4		100 pg	+++
	5		10 pg	++
	6		1 pg	-
	7		100 fg	-
	8		10 fg	-
	9		1 fg	-

	10	prázdný běh		-
	11	Pozitivní kontrola	10 ng	+++
	12	prázdný běh		-
	13	Negativní kontrola		-

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

Obrázek č. 16.: Gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus* (250 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA/PCR směs izolované ze salámu Orlík pomocí FE.



	Běh č.	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce PCR produktu
PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> s primery [9]	1	Standard 100 bp		+++
	2	salám Orlík	10 ng	+++
	3		1 ng	++
	4		100 pg	-
	5		10 pg	-
	6		1 pg	-
	7		100 fg	-
	8		10 fg	-
	9		salám Orlík	1 fg
	10	prázdný běh		-
	11	Pozitivní kontrola	10 ng	+++
	12	prázdný běh		-

	13	Negativní kontrola		-
--	----	--------------------	--	---

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

→ Po amplifikaci byly detekovány produkty PCR specifické pro rod *Lactobacillus*. Tím byla prokázána přítomnost DNA bakterií rodu *Lactobacillus* ve vzorcích obou salámů. Množství Mg^{2+} iontů nemělo vliv na specifitu reakce.

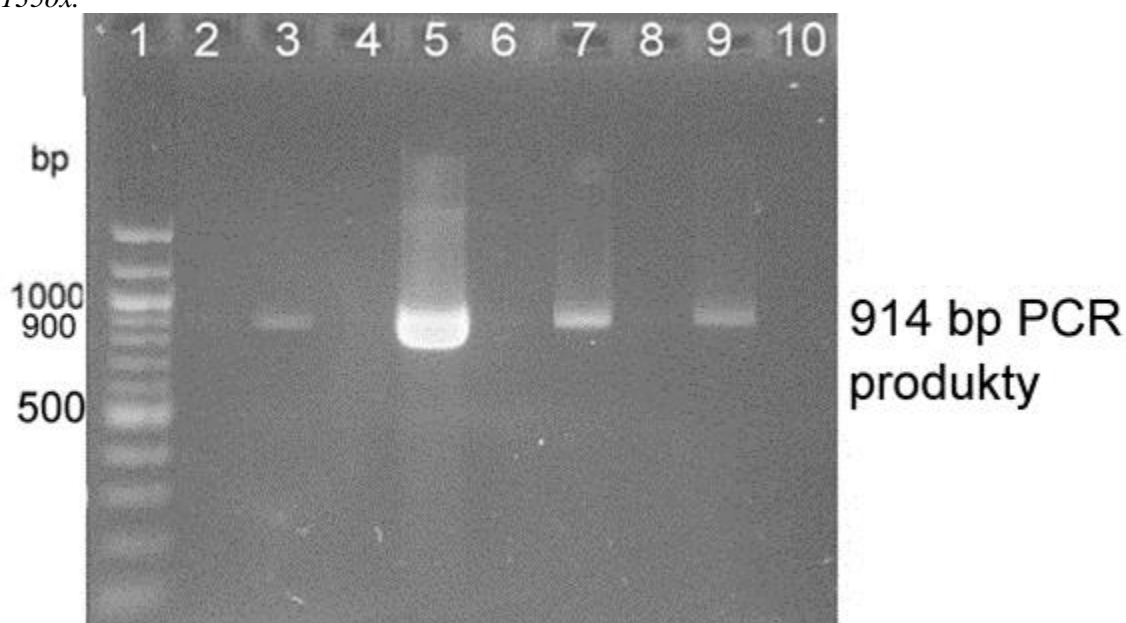
→ Nejnižší množství DNA matrice nezbytné pro průkaz produktů PCR bylo 10 pg u Ovčácké klobásy a 1 ng u salámu Orlík.

5.5.3 PCR s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium* z DNA izolované pomocí fenolové extrakce a magnetických částic

DNA byla izolována pomocí fenolové extrakce a magnetických mikročástic F-kol 135ox. Postupovalo se podle postupu popsaného v kapitole 3.7.12. Poté byla přečištěná DNA použita k PCR reakci specifické pro rod *Bifidobacterium*. Pomocí agarózové gelové elektroforézy byly detekovány produkty PCR specifické pro rod *Bifidobacterium*- amplikony o velikosti 914 bp. Určilo se tak, který salám obsahuje bakterie rodu *Bifidobacterium*. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku č. 17. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z kmene *Bifidobacterium animalis* CCM 4988 T.

Při posouzení citlivosti PCR byla použita DNA matrice vyředěná desítkovým ředěním až do koncentrace 1 fg/μl. Na Obrázcích č. 18 a 19 jsou uvedené výsledky.

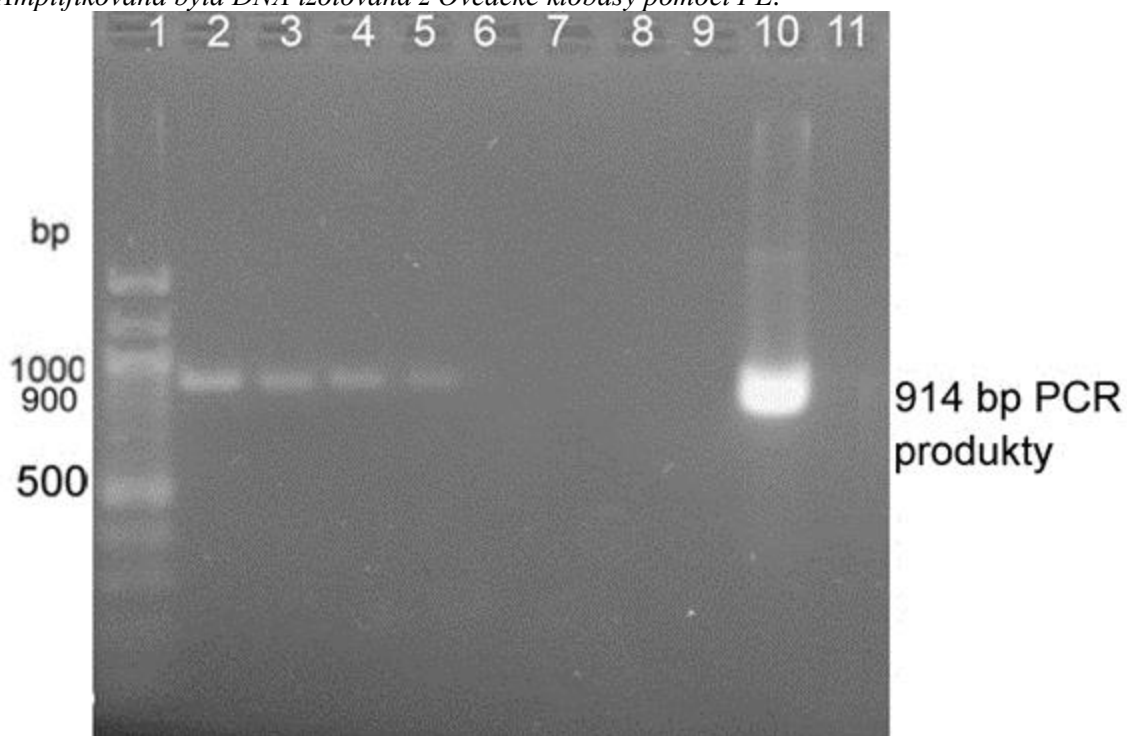
Obr. č. 17: Gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Bifidobacterium* (914 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná fenolovou extrakcí a magnetickými částicemi F-kol 135ox.



PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i> s primery [10]	Běh	Izolace DNA	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
	1		Standard 100 bp		+++
	2				
	3	MČ	Ovčácká klobása	66 ng	+
	4	MČ	salám Orlík	59 ng	---
	5	MČ	PK	10 pg	+++
	6		negativní kontrola		---
	7	MČ	PK	10 ng	++
	8	FE	Orlík	10 ng	---
	9	FE	Ovčácká klobása	10 ng	++
	10		prázdný běh		

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

Obr. č. 18. Gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Bifidobacterium* (914 bp). Amplifikovaná byla DNA izolovaná z Ovčácké klobásy pomocí FE.

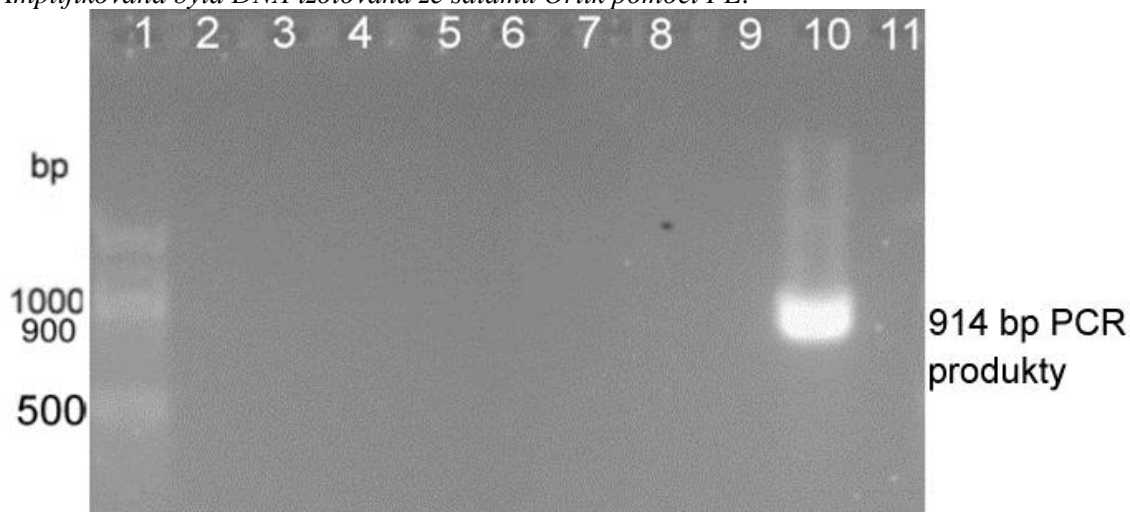


	Běh	Izolace DNA	DNA č.	Množství DNA/PCR směs	Detekce PCR produktu
--	-----	-------------	--------	-----------------------	----------------------

PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i> s primery [10]	1		Standard 100 bp		
	2	FE	Ovčácká klobása	10 ng	++
	3			1 ng	+
	4			100 pg	+
	5			10 pg	+
	6			1 pg	-
	7			100 fg	-
	8			10 fg	-
	9			1 fg	-
	10		pozitivní kontrola	10 ng	+++
	11		negativní kontrola		-

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

Obr. č. 19. Gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Bifidobacterium* (914 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná ze salámu Orlík pomocí FE.



PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i> s primery [10]	Běh	Izolace DNA	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
	1			Standard 100 bp	
2	FE		salám Orlík	10 ng	-
3				1 ng	-
4				100 pg	-
5				10 pg	-
6				1 pg	-

	7			100 fg	-
	8			10 fg	-
	9			1 fg	-
	10		pozitivní kontrola	10 ng	+++
	11		negativní kontrola		-

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

→ Přítomnost DNA bakterií rodu *Bifidobacterium* byla prokázána ve výrobku Ovčácká klobása.

→ Nejnižší množství DNA, které bylo amplifikováno v PCR za vzniku produktu PCR detekovatelného pomocí gelové elektroforézy bylo 10 pg.

→ V DNA izolované ze salámu Orlík nebyly opakovaně detekovány žádné produkty PCR specifické pro rod *Bifidobacterium*, což vypovídá o nepřítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium*.

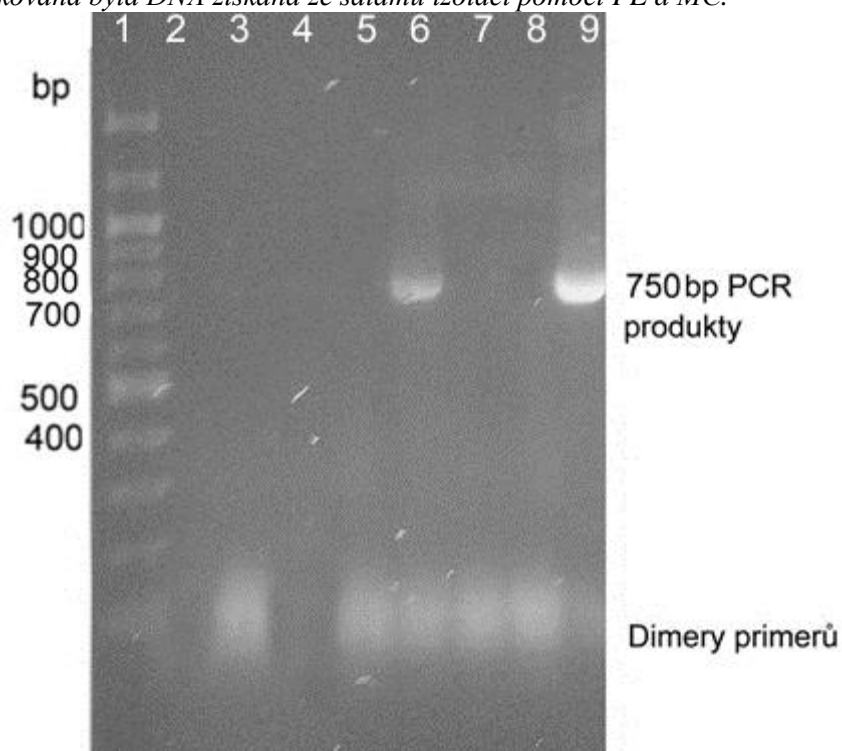
5.5.4 PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Pro stanovení přítomnosti bakteriální DNA druhu *Lactobacillus acidophilus* ve vzorcích izolovaných pomocí FE a MČ z HL vzorků salámů bylo použito metody PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*. Při použití metody PCR pro druh *L. acidophilus* byly detekovány pouze amplikony po amplifikaci DNA Ovčácká klobása izolované pomocí FE. Z tohoto důvodu byly testovány jiné primery. Složení PCR směsi viz kapitola 3.6.3. Jako pozitivní kontrola byla použita ověřená DNA typového kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 T. Produkty PCR byly nanášeny na 1,5% agarózový gel. Na další straně jsou na obrázku č. 20 jsou fotograficky zdokumentovány výsledky vypovídající o nízké citlivosti metody (10ng/PCR směs).

Ke zvýšení citlivosti se dvojnásobně navýšilo množství přidávaných primerů a trojnásobně množství DNA (viz kapitola 3.6.3).

Při posouzení citlivosti PCR byla použita DNA matrice získaná fenolovou extrakcí ze vzorku salámu Ovčácká klobása. Při použití primerů Aci 16SI a Aci 16SII (Walter, 2000) s velikostí produktů 800 bp byly produkty PCR již zřetelné po amplifikaci 100 fg DNA. Na obrázku č. 21 jsou zobrazeny výsledky gelové elektroforézy.

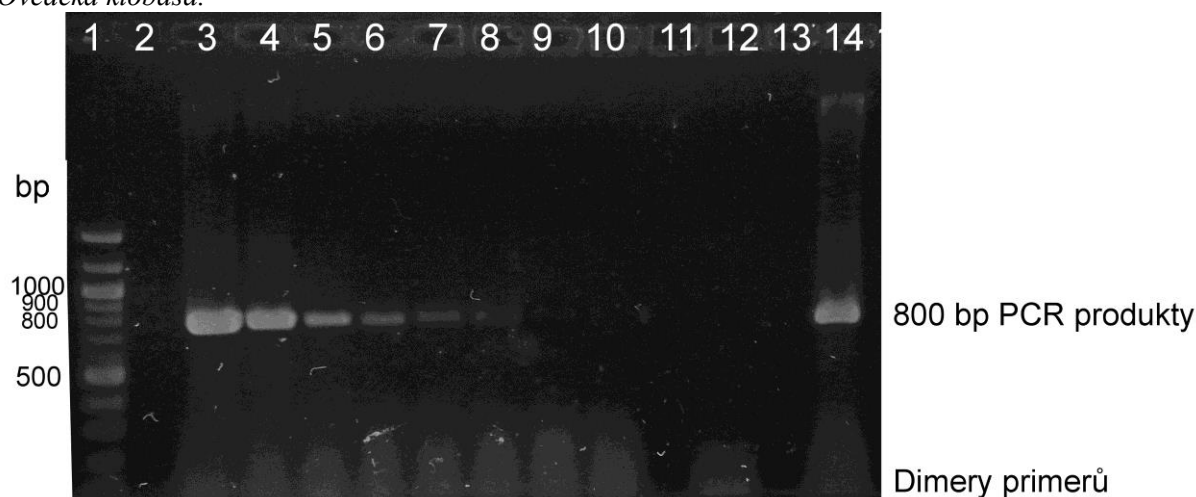
Obrázek č.20: Gelová elektroforéza PCR produktů pro druh *Lactobacillus acidophilus* (750 bp). Amplifikována byla DNA získaná ze salámů izolací pomocí FE a MČ.



PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> s primery [37]	Běh	Izolace DNA	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
	1		Standard 100 bp		
	2		prázdný běh		
	3	MČ	salám Orlík	10 ng	---
	4		prázdný běh		
	5	MČ	salám Orlík	15 ng	---
	6	FE	Ovčácká klobása	10 ng	++
	7	FE	salám Orlík	10 ng	---
	8		NK		---
	9	MČ	PK	10 ng	+++

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; - Produkt PCR nebyl detekován

Obrázek č.21: Gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro druh *Lactobacillus acidophilus* (800 bp). Amplifikována byla DNA získaná izolací pomocí FE z HL salámu Ovčácká klobása.



	Běh	Izolace DNA	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> s primery [38]	1		Standard 100 bp		
	2		prázdný běh		
	3	FE	Ovčácká klobása	10 ng	+++
	4			1 ng	+++
	5			100 pg	+++
	6			10 pg	+++
	7			1 pg	++
	8			100 fg	+
	9			10 fg	---
	10			1 fg	---
	11		prázdný běh		
	12		negativní kontrola		---
	13		prázdný běh		
	14	MČ	pozitivní kontrola	10 ng/μl	+++

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

→ **Specifické produkty PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus* byly detekovány v DNA Ovčácká klobása do koncentrace 100 fg/PCR směs u DNA izolované pomocí FE Ovčácká klobása.**

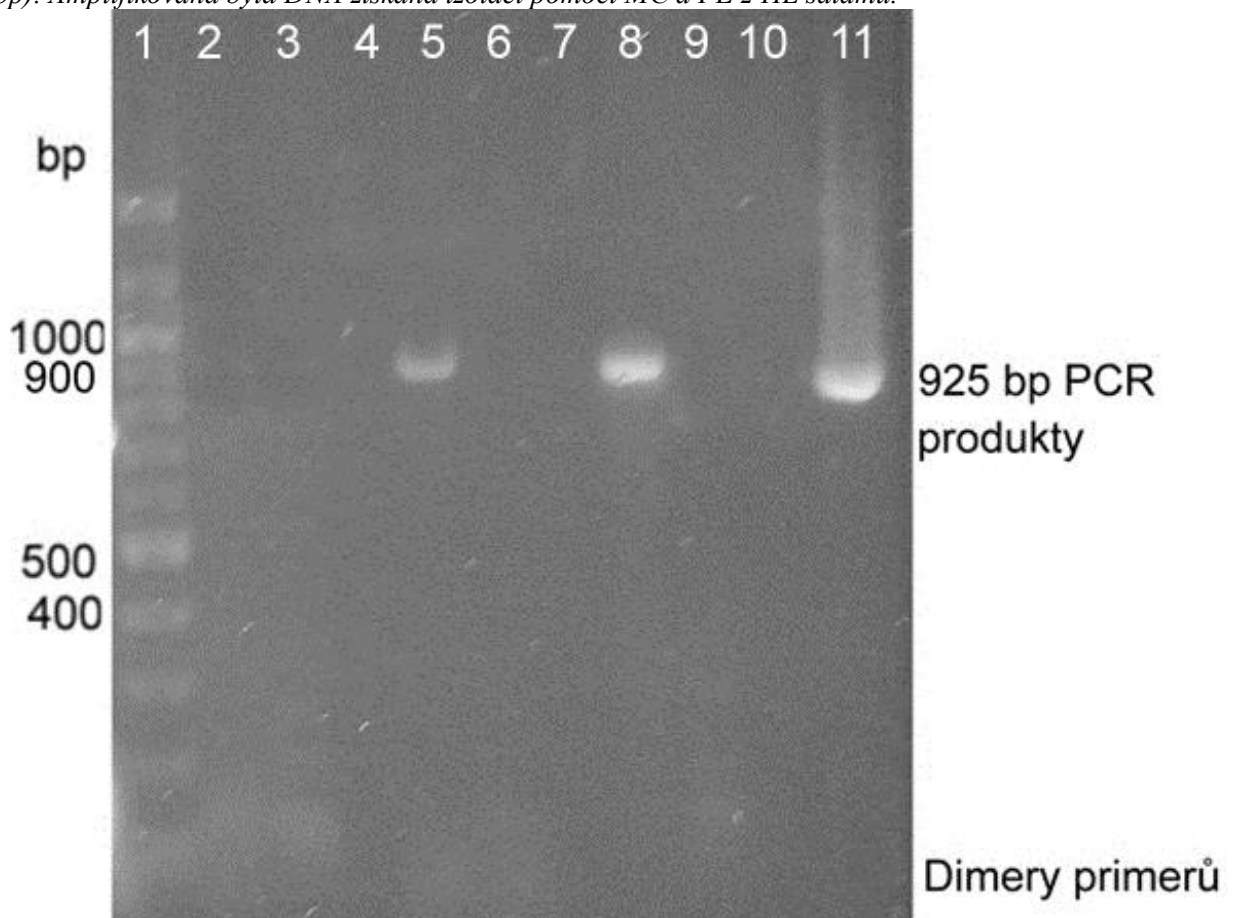
→ **V DNA izolované ze salámu Orlik nebyly detekovány žádné specifické produkty pro druh *Lactobacillus acidophilus*.**

5.5.5 PCR pro druh *Bifidobacterium animalis*

Pro stanovení přítomnosti bakteriální DNA druhu *Bifidobacterium animalis* v DNA izolované pomocí FE a MČ z HL salámů bylo použito metody PCR pro druh *Bifidobacterium animalis*. Složení PCR směsi viz kapitola 3.7.12. Jako pozitivní kontrola byla použita ověřená DNA typového kmene *Bifidobacterium animalis* CCM 4988 T. PCR produkty byly naneseny na 1,5% agarózový gel. Protože PCR produkty byly detekovány pouze u vzorků obsahujících vyšší množství cílové DNA (vzorek získaný pomocí FE a vzorek získaný pomocí MČ o koncentraci 26 ng/μl), bylo v následujících PCR reakcích zvýšeno množství přidávaných primerů, DNA matrice a počet cyklů. Na obrázku č. 22 jsou zobrazeny výsledky gelové elektroforézy amplikonů.

Při posouzení citlivosti PCR byla použita DNA matrice získaná fenolovou extrakcí ze vzorku salámu Ovčácká klobása. Pro zvýšení citlivosti metody bylo zvýšeno množství přidávaných primerů, matrice DNA a počet cyklů (viz. kapitola 3.6.3) Na obrázku č. 23 jsou zobrazeny výsledky gelové elektroforézy.

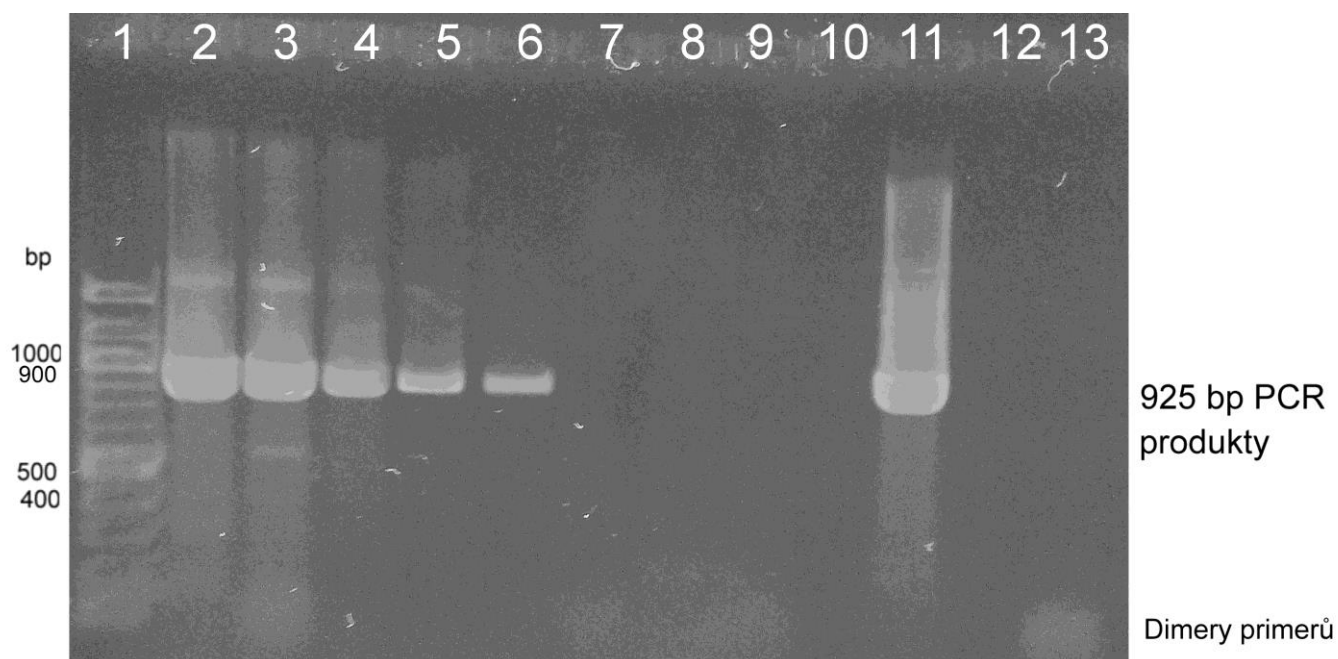
Obrázek č.22: Gelová elektroforéza produktů PCR pro druh *Bifidobacterium animalis* (925 bp). Amplifikována byla DNA získaná izolací pomocí MČ a FE z HL salámů.



PCR pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i> s primery [10]	Běh	Izolace DNA	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
	1		Standard 100 bp		
	2		prázdný běh		
	3	MČ	salám Orlík	10 ng	---
	4		prázdný běh		
	5	MČ+ kopist	Ovčácká klobása	26 ng	++
	6	MČ+ kopist	salám Orlík	15 ng	---
	7		prázdný běh		
	8	FE	Ovčácká klobása	10 ng	++
	9	FE	salám Orlík	10 ng	---
	10		NK		---
	11		PK	10 ng/μl	+++

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

Obrázek č.23: Gelová elektroforéza produktů PCR pro druh *Bifidobacterium animalis* (925 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná pomocí FE z HL salámu Ovčácká klobása.



PCR pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i> s primery [10]	Běh	Izolace DNA	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
	1		Standard 100 bp		
	2	FE	Ovčácká klobása	10 ng	+++
	3			1 ng	+++
	4			100 pg	+++
	5			10 pg	++
	6			1 pg	++
	7			100 fg	---
	8			10 fg	---
	9				
	10		prázdný běh		
	11		pozitivní kontrola	10 ng/ μ l	+++
	12		prázdný běh		
13		negativní kontrola		---	

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

→ **Specifické produkty PCR pro druh *Bifidobacterium animalis* byly detekovány po amplifikaci DNA Ovčácká klobása izolované FE. Homogenizace salámu byla provedena KOPISTEM.**

→ **Specifické produkty PCR byly detekovány do koncentrace 1 pg/PCR směs.**

→ **V DNA izolované ze salámu Orlík nebyly amplifikovány produkty PCR specifické pro druh *Bifidobacterium animalis*.**

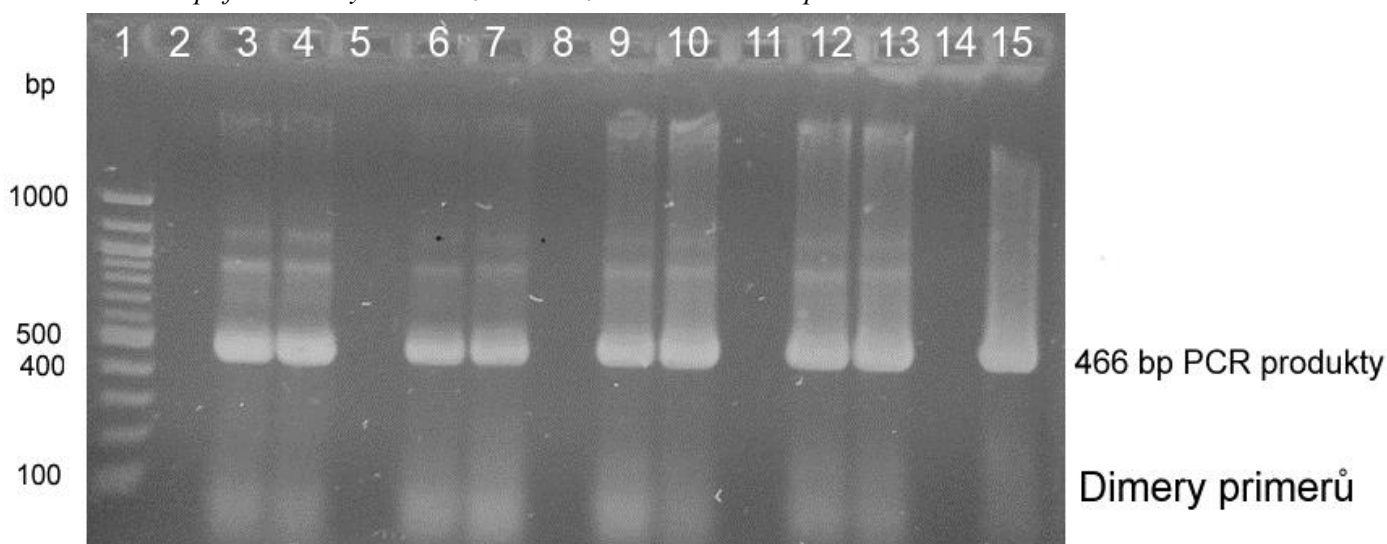
5.6 Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované MČ ze salámů homogenizovaných kopistem

Byla ověřena amplifikovatelnost DNA izolované z masných výrobků pomocí magnetických částic F-kol 135ox. Byla provedena PCR pro doménu *Bacteria*, druh *Lactobacillus* a *Bifidobacterium animalis*.

5.6.1 PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* DNA izolovaná z HL salámů pomocí MČ F-kol 135ox (466bp)

Byla testována amplifikace DNA izolované z masných výrobků homogenizovaných kopistem pomocí magnetických částic F-kol 135ox. Pro stanovení přítomnosti bakteriální DNA ve vzorcích izolovaných z HL vzorků salámů bylo použito metody PCR pro doménu *Bacteria*. Reakční složení směsi viz kapitola 3.7.12. Jako pozitivní kontrola byla použita ověřená DNA rodu *Lactobacillus*. Bylo amplifikováno různé množství DNA ve dvou opakováních. Produkty PCR byly detekovány na 1,5% agarózovém gelu. Na obrázcích č. 24, 25 a 26 jsou vizualizované produkty PCR specifické pro doménu *Bacteria*.

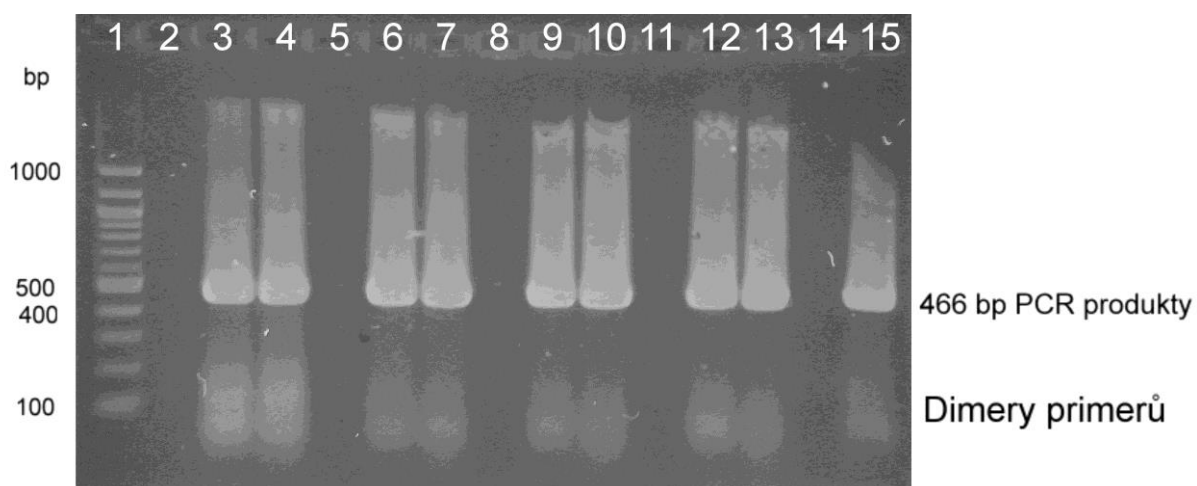
Obrázek č.24: Gelová elektroforéza produktů PCR pro doménu *Bacteria* (466 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z HL salámu Orlík pomocí MČ.



PCR pro doménu <i>Bacteria</i> s primery [8]	Běh	Izolace DNA	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
	1		Standard 100 bp		
	2		prázdný běh		
	3	MČ	salám Orlík	6 ng	+++
	4	MČ		12 ng	+++
	5		prázdný běh		
	6	MČ	salám Orlík	9 ng	+++
	7	MČ		18 ng	+++
	8		prázdný běh		
	9	MČ	salám Orlík	17 ng	+++
	10	MČ		34 ng	+++
	11		prázdný běh		
	12	MČ	salám Orlík	19 ng	+++
	13	MČ		38 ng	+++
	14		NK		-
15	MČ	PK	10 ng	+++	

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

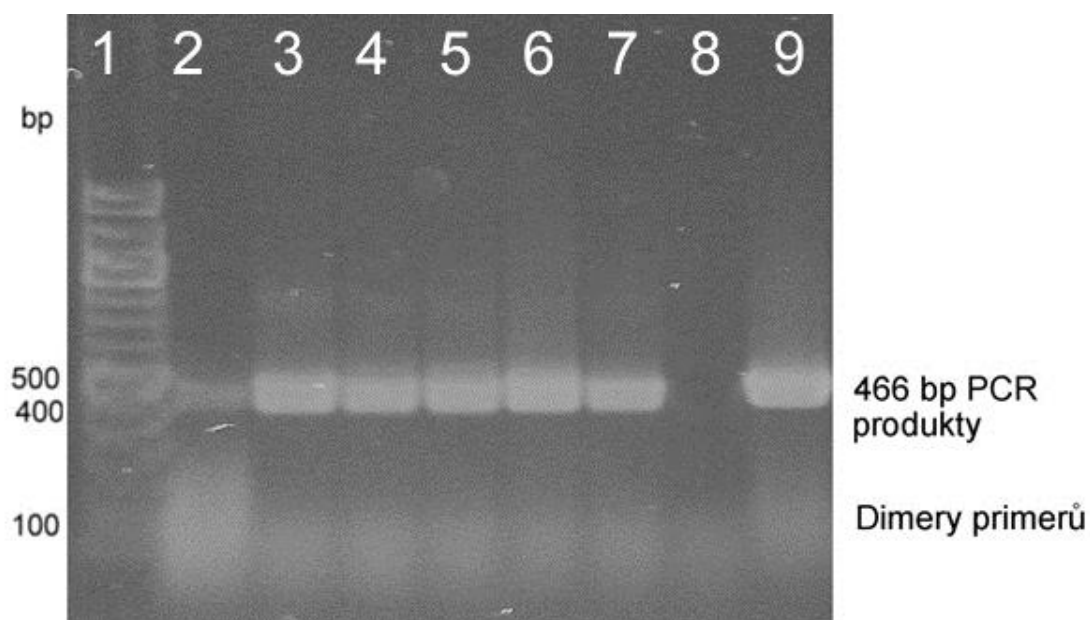
Obrázek č.25: Gelová elektroforéza produktů PCR pro doménu *Bacteria* (466 bp). Amplifikována byla DNA izolována z HL salámu Ovčácká klobása pomocí MČ.



PCR pro doménu <i>Bacteria</i> s primery [8]	Běh	Izolace DNA	DNA č.	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
	1		Standard 100 bp		
	2		prázdný běh		
	3	MČ	Ovčácká klobása	12 ng	+++
	4			24 ng	+++
	5		prázdný běh		
	6		Ovčácká klobása	10 ng	+++
	7			20 ng	+++
	8		prázdný běh		
	9		Ovčácká klobása	10 ng	+++
	10			20 ng	+++
	11		prázdný běh		
	12		Ovčácká klobása	10 ng	+++
	13			20 ng	+++
	14		NK		-
15	PK		10 ng	+++	

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

Obrázek č.26: Gelová elektroforéza produktů PCR pro doménu *Bacteria* (466 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z HL salámů pomocí MČ.



	Běh	Izolace DNA	DNA č.	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
PCR pro doménu <i>Bacteria</i> s primery [8]	1		Standard 100 bp		
	2	MČ	salám Orlík	15 ng	++
	3			14 ng	+++
	4			11 ng	+++
	5		Ovčácká klobása	13 ng	+++
	6			26 ng	+++
	7			16 ng	+++
	8			NK	
	9	MČ	PK	10 ng/μl	+++

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

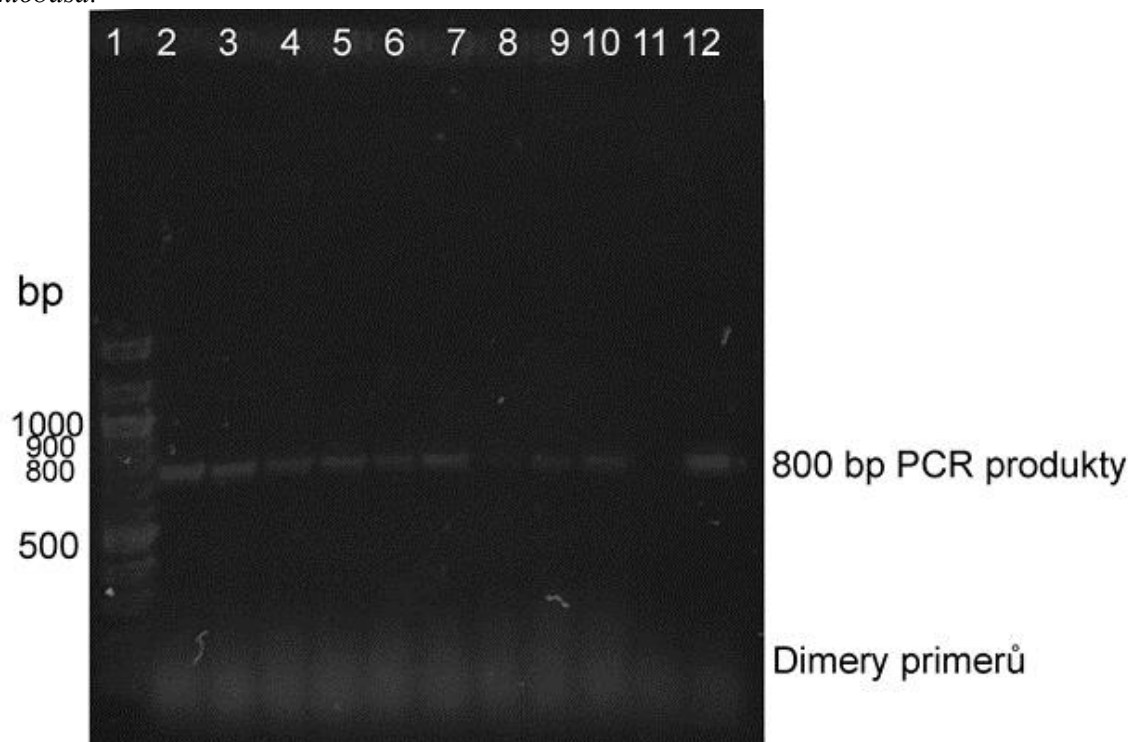
→ Ve vzorku DNA izolované ze salámu Orlík a Ovčácká klobása byla pomocí metody PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* prokázána přítomnost bakteriální DNA.

5.6.2 PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus* (800 bp)

Protože přítomnost DNA bakterií rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* byla testována ve vzorcích izolovaných pomocí fenolové extrakce, stanovovala se přítomnost DNA druhů *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis*. Pro stanovení přítomnosti bakteriální DNA druhu *Lactobacillus acidophilus* ve vzorcích izolovaných pomocí MČ F-kol 135ox bylo použito metody PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*. Složení PCR směsi viz kapitola 3.7.12. Pro zvýšení citlivosti metody bylo zvýšeno množství přidávaných primerů, matrice DNA a počet cyklů (viz. kapitola 3.6.3). Jako pozitivní kontrola byla použita ověřená DNA kmene *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476. Vzorky PCR byly nanесeny na 1,5% agarózový gel. Na obrázku č. 27 jsou zobrazeny výsledky gelové elektroforézy produktů PCR.

Při posouzení citlivosti PCR byla použita DNA matrice získaná izolací MČ F-kol 135ox z HL salámu Ovčácká klobása. Na obrázku č. 28 jsou zobrazeny výsledky gelové elektroforézy produktů PCR.

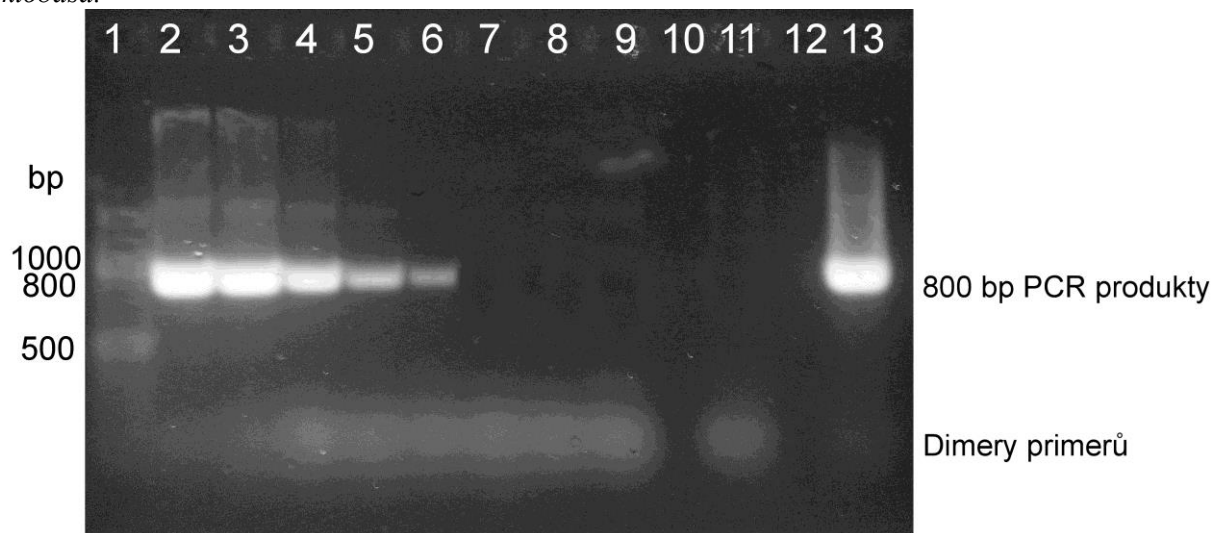
Obrázek č.27: Gelová elektroforéza produktů PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus* (800 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná pomocí MČ F-kol 135ox z HL salámu Ovčácká klobása.



	Běh	Izolace DNA	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> s primery [38]	1		Standard 100 bp		
	2	MČ	Ovčácká klobása	17 ng/	++
	3			19 ng	++
	4			13 ng	++
	5			26 ng	++
	6			21,2 ng	++
	7			23,2 ng	++
	8			9,7 ng	---
	9			12 ng	+
	10			10 ng	+
	11		negativní kontrola		---
	12	MČ	pozitivní kontrola	10 ng/μl	++

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován; *pravděpodobně chyba při přípravě PCR směsi

Obrázek č.28: Gelová elektroforéza produktů PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus* (800 bp). Amplifikováno bylo různé množství DNA izolované pomocí MČ z HL salámu Ovčácká klobása.



	Běh	Izolace DNA	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
PCR pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> s primery [38]	1		Standard 100 bp		
	2	MČ	Ovčácká klobása	20 ng	+++
	3			10 ng	+++
	4			1 ng	+++
	5			100 pg	++
	6			10 pg	++
	7			1 pg	---
	8			100 pg	---
	9			10 pg	---
	10				prázdný běh
	11		negativní kontrola		---
	12		prázdný běh		
	13	MČ	pozitivní kontrola	10 ng	+++

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

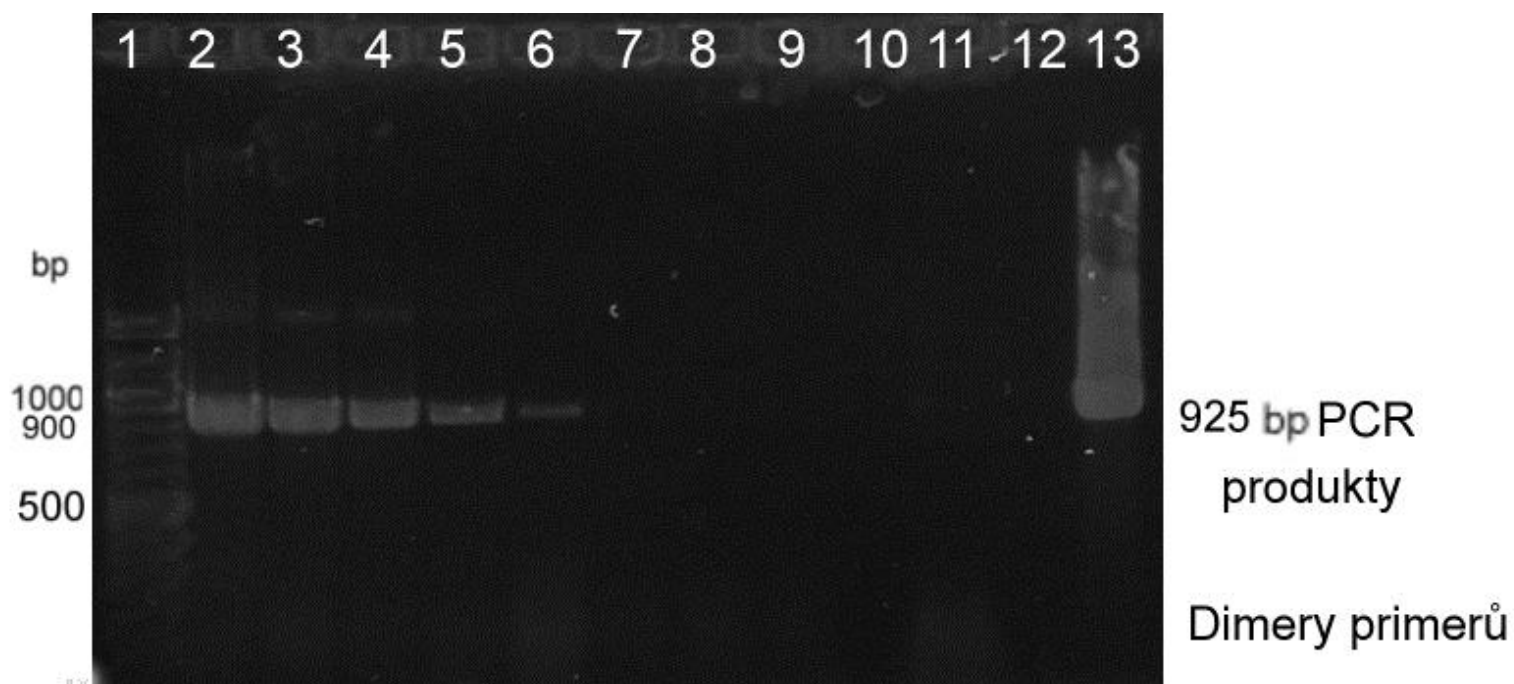
→ Specifické produkty PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus* byly detekovány po amplifikaci DNA izolované pomocí MČ.

→ Specifické produkty PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus* byly detekovány do koncentrace 10 pg/PCR směs.

5.6.3 PCR pro druh *Bifidobacterium animalis*

Pro stanovení přítomnosti bakteriální DNA druhu *Bifidobacterium animalis* ve vzorcích izolovaných pomocí MČ F-kol 135ox ze salámu Ovčácká klobása homogenizovaných kopistem bylo použito metody PCR pro druh *Bifidobacterium animalis*. Složení PCR směsi viz kapitola 3.7.12. Pro zvýšení citlivosti metody bylo zvýšeno množství přidávaných primerů, matrice DNA a počet cyklů (viz. kapitola 3.6.3). Jako DNA matrice byla použita DNA izolovaná pomocí MČ z HL salámu Ovčácká klobása. Jako pozitivní kontrola byla použita ověřená DNA kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 241a. Produkty PCR byly detekovány na 1,5 agarózovém gelu. Na obrázku č. 29 jsou zobrazeny výsledky gelové elektroforézy.

Obrázek č.29: Gelová elektroforéza produktů PCR pro druh *Bifidobacterium animalis* (925 bp). Amplifikována byla DNA získaná izolací pomocí MČ z HL salámu Ovčácká klobása.



	Běh	Izolace DNA	DNA	Množství DNA/PCR směs	Detekce produktu PCR
PCR pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i> s primery [10]	1		Standard 100 bp		
	2	MČ	Ovčácká klobása	10 ng	+++
	3			1 ng	+++
	4			100 pg	+++
	5			10 pg	++
	6			1 pg	+

	7			100 fg	---
	8			10 fg	---
	9			1 fg	---
	10		prázdný běh		
	11		negativní kontrola		---
	12		prázdný běh		
	13		pozitivní kontrola	10 ng	+++

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

→ **Specifické produkty PCR pro druh *Bifidobacterium animalis* byly detekovány po amplifikaci 10 ng až 1 pg DNA izolované pomocí MČ z HL salámu Ovčácká klobása.**

5.7 Imunomagnetická separace buněk *Lactobacillus acidophilus*

Sakámy byly homogenizovány (10 g salámu v 25 ml ster. H₂O) pomocí BagSystému. K homogenizátu byly přidány MČ z magnetické perlové celulózy funkcionalizované protilátkou anti-*Lactobacillus*. Popis separace buněk je popsán v kapitole 3.7.11. Imunomagnetická separace (IMS) byla provedena ve třech opakováních. Jako kontrola byly použity buňky kmene *L. acidophilus* CCDM 476.

5.7.1 IMS kultivace a IMS-PCR rod *Lactobacillus* z homogenizátů salámů

Postupovalo se podle návodu popsaného v kapitole 3.7.11. Lyzáty buněk získané byly použity pro IMS-PCR specifickou pro rod *Lactobacillus*. Složení PCR směsi viz kapitola 2.6.5. Jako DNA matrice bylo použito vzorků lyzovaných izolovaných buněk pomocí MČ z perlové celulózy. Pomocí agarózové gelové elektroforózy byly detekovány specifické amplikony o velikosti 250 bp (Obrázek č. 30). Jako vzorek pozitivní kontroly byla použita ověřená DNA kmene *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476., která byla vyředěná na koncentraci 10 ng/ μl.

Obrázek č.30: Gelová elektroforéza IMS-PCR produktů pro rod *Lactobacillus* (250 bp). Amplifikována byla DNA získaná povařením buněk narostlých po imunomagnetické separaci buněk.



	Běh	IMS buněk z výrobku	DNA	Detekce produktu PCR
PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> s primery [9]	1		pozitivní kontrola	+++
	2		negativní kontrola	---
	3		Standard 100 bp	
	4	salám Orlický	<i>Lactobacillus</i>	++
	5			++
	6			++
	7	Ovčácká klobása		+++
	8			+++
	9			+++

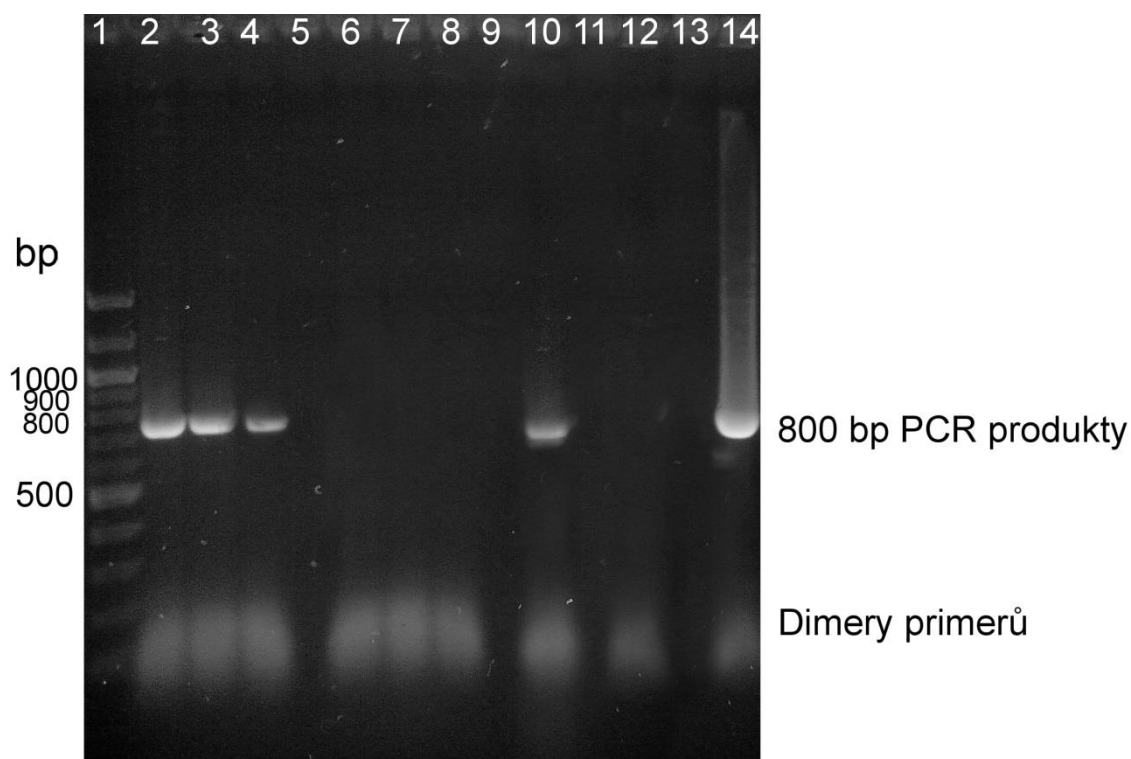
+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

→ V buňkách izolovaných z homogenizátů salámů byly detekovány produkty PCR v různé intenzitě. Přítomnost bakteriální DNA rodu *Lactobacillus* byla prokázána.

5.7.2 IMS-PCR pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Pomocí magnetických nosičů funkcionalizovaných protilátkou anti-*Lactobacillus* byly izolovány buňky dle postupu uvedeného v kap. 3.7.11. Po lyzi komplexů MČ-buňka byl použit lyzát buněk pro amplifikaci pro IMS-PCR specifickou pro druh *Lactobacillus acidophilus*. Složení PCR směsi viz kapitola 2.6.5. Po kultivaci buněk izolovaných pomocí IMS narostla pouze 1 kolonie, která byla použita do IMS-PCR specifické pro druh *Lactobacillus acidophilus*. Jako pozitivní kontrola byla použita ověřená DNA kmene *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476, vyředěná na koncentraci 10 ng/ μ l. Produkty IMS-PCR byly nanášeny na 1,5%-ní agaróзовý gel. Pro zvýšení citlivosti metody bylo zvýšeno množství přidávaných primerů, matrice DNA a počet cyklů (viz. kapitola 2.6.5). Při použití primerů Aci 16SI a Aci 16SII s velikostí produktů 800 bp byly produkty PCR již zřetelné. V běhu č. 10 je amplikon získaný amplifikací DNA narostlé bakteriální kolonie. Na obrázku č. 31 jsou zobrazeny výsledky gelové elektroforézy.

Obrázek č.31: Gelová elektroforéza IMS PCR produktů pro druh *Lactobacillus acidophilus* (800 bp). Amplifikována byla DNA buněk izolovaných imunomagnetickou separací buněk z homogenizátů salámů.



PCR pro druh	Běh	IMS buněk z výrobk	DNA	Detekce PCR produktu
<i>Lactobacillus acidophilus</i> s primery [38]	1		Standard 100 bp	
	2			+++

	3	Ovčácká klobása	<i>L. acidophilus</i>	+++
	4			+++
	5		prázdný běh	
	6	salám Orlík	<i>L. acidophilus</i>	---
	7			---
	8			---
	9		prázdný běh	---
	10		bakteriální kolonie	+++
	11		prázdný běh	
	12		Negativní kontrola	---
	13		prázdný běh	
	13		pozitivní kontrola	+++

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

→ Po IMS-PCR byly detekované produkty PCR specifické pro druh *Lactobacillus acidophilus*.

Buňky izolované z homogenizátů salámu Ovčácká klobása byly druhu *Lactobacillus acidophilus*.

→ V DNA buněk izolovaných z homogenizátů salámu Orlík nebyla prokázána přítomnost bakteriální DNA druhu *Lactobacillus acidophilus*.

5.8 Shrnutí výsledků testování amplifikovatelnosti DNA izolované ze salámů pomocí FE

V tab. č. 14 jsou porovnány metody PCR použité při průkazu bakteriální DNA v masných výrobcích. DNA byla izolována metodou FE z HL salámů připravených homogenizací BagSystémem.

Tabulka č. 14: Detekce specifických produktů PCR pro doménu *Bacteria*, rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, druhy *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis*

PCR	doména <i>Bacteria</i>		rod <i>Lactobacillus</i>		rod <i>Bifidobacterium</i>		druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>		druh <i>Bifidobacterium animalis</i>	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Množství DNA/PCR směs										
10ng	+++	+++	+++	+++	++	---	+++	---	+++	---
1ng	+++	++	+++	++	+	---	+++	---	+++	---
100pg	++	+	+++	---	+	---	+++	---	+++	---
10pg	---	---	++	---	+	---	+++	---	++	---
1pg	---	---	---	---	---	---	++	---	++	---
100 fg	---	---	---	---	---	---	+	---	---	---
10 fg	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1 fg	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

I-Ovčácká klobása, II- salám Orlík; +, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR;

– Produkt PCR nebyl detekován

→ V DNA izolované z Ovčácké klobásky byla prokázána přítomnost bakteriální DNA, DNA rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* a DNA druhů *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis*.

→ U DNA izolované ze salámu Orlík byla prokázána přítomnost bakteriální DNA a DNA rodu *Lactobacillus*. Ve vzorku DNA izolované pomocí FE z HL salámu Orlík nebyla detekována DNA rodu *Bifidobacterium* a druhů *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis*.

5.9 Srovnání metod izolace DNA FE a MČ

V následující tabulce č.16 jsou shrnuty výsledky PCR metod pro DNA izolované ze salámu Ovčácká klobása a pro DNA bakteriálních kultur izolovaných pomocí MČ F-kol 135ox. druh *Lactobacillus acidophilus*

Tabulka č. 16: Výsledky pro druh *Lactobacillus acidophilus*

PCR	druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>		druh <i>Bifidobacterium animalis</i>		PK <i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 476	PK <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 241a
DNA	Ovčácká klobása				Bakteriální kultury	
Množství DNA/PCR směs	FE	MČ	FE	MČ	MČ	MČ
10ng	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1ng	+++	+++	+++	+++	+++	+++
100pg	+++	++	+++	+++	+++	+++
10pg	+++	++	++	++	++	++
1pg	++	---	++	+	+	++
100 fg	+	---	---	---	+	+
10 fg	---	---	---	---	---	---
1 fg	---	---	---	---	---	---

+, ++, +++ Intenzita detekovaného produktu PCR; – Produkt PCR nebyl detekován

→ Citlivost PCR s DNA matricí izolované pomocí MČ vyšla 100x nižší (10 pg/PCR směs). než s DNA matricí izolovanou pomocí MČ. Citlivosti ostatních PCR (pro druh *B. animalis*) byly stejné (1 pg/PCR směs).

6 DISKUZE

Na našem trhu se začínají objevovat fermentované salámy obohacené probiotiky. Tento druh výrobků se tak stává zajímavým artiklem. Cílem této práce je vyvinutí metody pro izolaci bakteriální DNA v kvalitě vhodné pro PCR z takovýchto masných výrobků a využitím magnetických nosičů.

Salám Ovčácká klobása dle dostupných údajů má obsahovat probiotické kultury *L. acidophilus* CCDM 476 a *B. animalis* ssp. *lactis* CCDM 241a. Další kultury nejsou výrobcem deklarované [50].

Salám Orlík obsahuje dle informací dodaných výrobcem běžně používané startovací kultury: *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Debaryomyces hansenii* (Tyto informace byly poskytnuty na základě telefonického rozhovoru.). Výrobce neuvádí, který z druhů je probiotický. Ve výrobku byly prokázány bakterie rodu *Lactobacillus*, jehož některé druhy jsou zdraví prospěšné.

Prvním krokem v PCR je izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR. K tomu je potřeba homogenizovat vzorek potravin a zlyzovat buňky. Z lyzovaných buněk se pak izoluje DNA. Toto popsala řada autorů [60]. Pomocí homogenizace vzorků salámů BagSystémem byly získány homogenizáty bez viditelného podílu tuků, což usnadnilo izolaci DNA pomocí MČ. Pomocí homogenizace vzorků salámů kopistem bylo ve vzorku HL přítomno velké množství tuku, který znesnadňoval izolaci DNA pomocí MČ a přecházel pak i do PCR směsi. Přítomný tuk tak mohl interferovat v PCR. Inhibitorů PCR je znám velký počet [61]. Tím se dá vysvětlit rozdíl v citlivosti PCR, který byl detekován pouze v PCR specifických pro druh *L. acidophilus*.

Při izolaci DNA z hrubých lyzátů salámů tvořily MČ F-kol 135ox a F-kol B-100 sediment rychle se usazující na dně zkumavek; MČ Dynabeads po promíchání tvořily stejnorodou suspenzi, která pěnila (nejspíše kvůli přísadce povrchově aktivních látek). HL Ovčácké klobásy byly výrazně hustší, než u salámu Orlík, také obsahovaly mnoho pevných částic masa a tuku. Po separaci magnetickým separátorem byla zřetelná sraženina u Ovčácké klobásy, která byla přitažena spolu s MČ ke stěně Eppendorfovy zkumavky. Při odebírání supernatantu ze zkumavek s MČ Dynabeads tyto částice klesaly ke dnu a byly strhávány od stěny. Nejlépe se pracovalo s částicemi F-kol 135ox, které byly vybrány pro další testování.

Izolace DNA z HL buněk bakteriálních kultur byla výrazně jednodušší než u masných výrobků. Především z důvodu nepřítomnosti masa a tuku. Z obou kmenů byla izolována DNA o dostatečné koncentraci. Pomocí MČ F-kol 135ox a Dynabeads byly izolovány nejvyšší koncentrace DNA. Vyšších koncentrací bylo dosaženo u kmene *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476, který po oživení měl větší nárůst v médiu a bylo tak použito větší množství buněk pro izolaci DNA. Používané metody byly popsány pro izolaci DNA [62].

Při stanovení citlivosti PCR domény *Bacteria* [1] se DNA ředila desítkovým ředěním z hodnoty 10 ng/μl na koncentraci 1 fg/μl. Ve směsi pro PCR reakci se amplifikovalo vždy 1 μl DNA matrice. Nejnižší množství DNA, při kterém byly ještě dobře detekovatelné PCR produkty pomocí agarózové gelové elektroforézy bylo při koncentraci 100 pg/PCR směs. Množství 100 pg DNA odpovídá asi množství DNA

z 10^5 bakteriálních buněk. DNA z tohoto množství byla získána ze 3 ml homogenizátu. V celkových 12,5 ml homogenizátu tedy bylo asi $4,125 \cdot 10^5$ buněk/ 5 g zamraženého salámu.

Pro průkaz přítomnosti DNA rodu *Lactobacillus* se použila PCR specifická pro rod *Lactobacillus* s rodově specifickými primery LbLMA 1 a R 16-1 [9]. Pomocí amplifikace a následné agarózové gelové elektroforézy na 1,8% agarózovém gelu se detekovaly produkty PCR (250 bp) u vzorků salámů Ovčácká klobása a Orlík ve shodě s autory. U Ovčácké klobásy byly detekovány produkty s koncentrací DNA matrice do 10 pg/ μ l. U salámu Orlík byly detekovány produkty s koncentrací DNA matrice do 1 ng/ μ l. To vypovídá o nižší koncentraci DNA bakterií rodu *Lactobacillus* ve vzorku DNA ze salámu Orlík v porovnání s Ovčáckou klobásou.

Pro průkaz přítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium* byly použity rodově specifické primery Pbi F1a Pbi R2 [4]. Pomocí amplifikace a následné agarózové gelové elektroforézy na 1,8% agarózovém gelu se detekovaly produkty PCR u vzorku salámu Ovčácká klobása s koncentrací DNA matrice do 10ng/ μ l. Ve vzorcích salámu Orlík nebyly detekovány žádné specifické produkty, což vypovídá o nepřítomnosti bakterií rodu *Bifidobacterium* ve vzorku salám Orlík. V tomto výrobku nebyly bakterie rodu *Bifidobacterium* výrobcem deklarovány.

Ve výrobku Ovčácká klobása byla pomocí metody PCR pro rod *Bifidobacterium* [9] prokázána přítomnost DNA bakterií rodu *Bifidobacterium*. Pomocí metod PCR pro druhy *Lactobacillus acidophilus* [9] a *Bifidobacterium animalis* [9] byla prokázána DNA druhů *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis*. Ve výrobku Orlík nikoliv. Tato skutečnost taktéž odpovídá deklarovaným vlastnostem výrobků.

Z porovnání metod izolace DNA (FE a MČ) vyplynulo, že vzorky DNA izolované pomocí FE dávaly stejné výsledky jako vzorky DNA izolované pomocí MČ. Pomocí PCR metody pro rod *Lactobacillus* [9] byla ve vzorcích obou salámů prokázána bakteriální DNA rodu *Lactobacillus*, což odpovídá složení MO v obou výrobcích [50].

Z porovnání testovaných postupů izolace DNA fenolovou extrakcí a magnetickými částicemi z testovaných výrobků vyplývají výhody FE a MČ. K výhodám fenolové extrakce patří získání vyšší koncentrace DNA a odstranění inhibitorů (tuk). Při použití MČ je pracovní postup méně časově náročný, méně složitý. DNA se může izolovat i z komplexních vzorků a z menšího objemu HL.

Z porovnání citlivosti PCR po amplifikaci DNA izolované FE a MČ vyplývá:

- Druh *Lactobacillus acidophilus*

U salámu Ovčácká klobása byly detekovány PCR produkty do koncentrace DNA matrice 100 fg/PCR směs u vzorků získaných pomocí FE. U vzorků získaných pomocí MČ byly detekovány PCR produkty do koncentrace DNA matrice 10 pg/PCR směs.

- Druh *Bifidobacterium animalis*

U salámu Ovčácká klobása byly detekovány intenzivnější PCR produkty do koncentrace DNA matrice 1 pg/PCR směs u vzorků získaných pomocí FE. U vzorků získaných pomocí MČ byly detekovány méně výrazné PCR produkty do koncentrace DNA matrice 1 pg/PCR směs.

Výtěžky se příliš neliší, pro PCR se DNA musí přidat na vhodnou koncentraci, aby nevznikaly nespecifické produkty PCR [11].

Výsledky byly potvrzeny také metodou IMS-PCR po imunomagnetické separaci buněk částicemi s imobilizovanou protilátkou anti-Lactobacillus. Bylo prokázáno, že izolované buňky byly druhu *L. acidophilus*.

7 ZÁVĚR

Byla optimalizována metoda homogenizace salámů a příprava hrubých lyzátů buněk. Z hrubých lyzátů vzorků salámů byla DNA izolována pomocí fenolové extrakce a magnetických částic (F-kol 135ox, F-kol B100ox a Dynabeads). Nejvyšších koncentrací izolované DNA bylo dosaženo pomocí částic F-kol 15ox. Kvalita DNA byla dostačující k provedení polymerázové řetězové reakce. Po amplifikaci DNA izolované ze salámu Ovčácká klobása byla prokázána přítomnost DNA domény *Bacteria*, DNA rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* a druhů *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis*. V DNA salámu Orlík byla prokázána přítomnost DNA domény *Bacteria* a rodu *Lactobacillus*.

Magnetické částice jsou vhodné k izolaci DNA v kvalitě pro PCR z trvanlivých masných výrobků.

8 ZDROJE

- [1] KAMENÍK, J. Startovací kultury v masném průmyslu. 1. vyd. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1994, 51 s. ISBN 80-85120-46-1.
- [2] INGR, I. Produkce a zpracování masa. 2. nezm. vyd. v Brně: Mendelova univerzita, 2011, 202 s. ISBN 978-80-7375-510-2.
- [3] KAMENÍK, J. Hygiena a technologie masa: Trvanlivé masné výrobky. vyd.1 Brno: veterinární a farmaceutická fakulta, 2012, 117 s. ISBN 978-80-7305-608-7
- [4] MALÝ, J. Použití startovacích kultur pro fermentované masné výrobky, *Maso*, 2005, č. 2, 21-26 s.
- [5] STEINHAUSER, L. Hygiena a technologie masa. 1. vyd. Brno: LAST, 1995, 643 s. ISBN 80-900260-4-4.
- [6] Salminen, S. et.al. (1998): Demonstration of safety of probiotics - a review: *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2), 93-106.
- [7] 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. ISBN 978-80.214-4004-3.
- [8] HAARMAN, M., KNOL, J. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72, 2359–2365.
- [9] DUBERNET, S., et al. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, 214, 271–275.
- [10] ROY D., SIROIS S. Molecular differentiation of Bifidobacterium species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 191 (2000) 17-24.
- [11] ŠMARDA, J., et al. *Metody molekulární biologie*. 1st ed. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [12] KUNOVÁ, V. *Zdravá výživa - 2., přepracované vydání, Zdravý a životní styl*. Praha : Grada Publishing a.s., 2011. str. 140. ISBN 8024734338.
- [13] JIRÁSEK, V. Terapie funkčních poruch trávicí trubice. In *Funkční poruchy trávicího traktu*. Praha: Grada 2003, s. 113-114, ISBN 80-247-0296-7
- [14] HRONEK, M., KUDLAČKOVÁ, Z. - JILEK, P. Probiotika v profylaxi a terapii nádorových onemocnění a vulvovaginitid. *Interní medicína pro praxi*, 2006, roč. 8, č. 3, s. 109-111
- [15] NEVORAL, J. aj. Probiotika, prebiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*, 2005, roč. 6, č.2, s. 59-65
- [16] WILSON, I. G. Minireview: Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1997, vol. 63, 10, s. 3741 – 3751 [cit. 2012-05-03]. Dostupné z: <http://www.mendeley.com/research/inhibition-facilitationnucleic-acid-amplification-1/#>. ISSN 1098-5336.
- [17] KIRBY, K. S. A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochemical Journal*. 1957, vol. 66, p. 495-504. ISSN 0264-6021.
- [18] BOWTELL, D. a SAMBROOK, J. *DNA Microarrays: A molecular cloning Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. ISBN 0-87969-624-9.

- [19] RITTICH, B.; ŠPANOVÁ, A.; HORÁK, D. Carboxyl-functionalized magnetic carrier for isolation and identification of DNA in dairy products, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2007, 311, s. 247-254.
- [20] ŠAFAŘÍK, I.; ŠAFAŘÍKOVÁ, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatogr. B*. 1999, 722, s. 33-53.
- [21] NĚMCOVÁ, P. Využití magnetických nosičů při izolaci genomové DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Brno, 2006. 64 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- [22] RITTICH, B.; ŠPANOVÁ, A.; HORÁK, D.; BENEŠ, M.J.; KLESNILOVÁ, M.; PETROVÁ, K.; RYBNÍKÁŘ, A. Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids and Surfaces. B: Interfaces*. 2006, 52, s. 143-148.
- [23] GUARNER, F., SCHAAF SMA, G. J. www.sciencedirect.com. *International Journal of Food Microbiology*. [Online] Probiotics, 17. 2 1998. [Citace: 5. 1 2013.] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160597001360>. ISSN 0168-1605
- [24] DNA polymerázy [cit 2012-04-15]. Top-Bio. Dostupné z WWW: <<http://www.topbio.cz/>>
- [25] ROSYPAL, S. – DOŠKA Ř, J. – PETRZIK, K. – RŮŽIČKOVÁ, V.: Úvod do molekulární biologie. Díl IV. Molekulární biologie rostlinných virů, priony, molekulární evoluce, vznik života, metody molekulární biologie, genové inženýrství. Brno, 2002.
- [26] BROWN, T. A. Klonování genů a analýza DNA. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.
- [27] GÖRNER, F. - VALÍK, Ľ. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava: Malé centrum 2004, s. 133-135, 225-262, ISBN 80-967064-9-7
- [28] VOTAVA, M. aj. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun 2003, s. 136-137, ISBN 80-902896-6-5
- [29] VUYST, Luc De, Gwen FALONY a Frédéric LEROY. Probiotics in fermented sausages. *Meat Science*. 2008, vol. 80, issue 1, s. 75-78. DOI: 10.1016/j.meatsci.2008.05.038. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174008001836>
- [30] BERNARDEAU, M., GUEGUEN, M., VERNOUX, J. P. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006, Vol. 30, pp. 487 – 513.
- [31] ŠPELINA, V., WINKLEROVÁ, D. Principy hodnocení účinnosti a bezpečnosti probiotik a charakteristika registrovaných doplňků stravy s obsahem probiotik a prebiotik. *Pediatric pro praxi*. 2009, 10, s. 247-249
- [32] DOBSON, V. et. al., Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 2008. DOI: 10.5772/34768.
- [33] HARRIGAN, W. F. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3. vyd. Bridgend: Gulf Professional Publishing, 1998. ISBN 0-12-326043.
- [34] CHATTERJI, A., FURLONG, J., *Introduction to environmental biotechnology: theory and application*. 2nd ed., Eastern economy ed. New Delhi: Prentice-Hall of India, 2007, xii, 275 p. ISBN 978-812-0331-600.
- [35] SAIZ-JIMENEZ, C., FURLONG, J. *Molecular biology and cultural heritage: proceedings of the International Congress on Molecular Biology and Cultural Heritage, 4-7 March 2003, Sevilla, Spain*. 2nd ed., Eastern economy ed. Exton, Pa.: Balkema, 2003, xi, 287 p. ISBN 90-580-9555-X

- [36] ROY, D., SIROIS, S., Molecular differentiation of Bifidobacterium species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, vol. 191, issue 1, s. 17-24. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09313.x
- [37] TILSALA-TIMISJÄRVI, A., ALATOSSAVA, T., Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 1997, vol. 35, issue 1, s. 49-56. DOI: 10.1016/s0168-1605(97)88066-x.
- [38] WALTER, J. et.al., Detection of Fusobacterium Species in Human Feces Using Genus-Specific PCR Primers and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, vol. 14, issue 3, s. 15-27. DOI: 10.3402/mehd.v14i3.8240.
- [39] S., Saddam. Probiotic Food Products Classes, Types, and Processing. *Probiotics*. InTech, 2012-10-03. DOI: 10.5772/51267. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/probiotics/probiotic-food-products-classes-types-and-processing>
- [40] KRÁLOVÁ, Blanka, FUKAL Ladislav, RUML Tomáš a Pavel RAUCH. Bioanalytické metody. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN80-708-0449-1.
- [41] KLAENHAMMER, Todd R., Rodolphe BARRANGOU, B. Logan BUCK, M. Andrea AZCARATE-PERIL a Eric ALTERMANN. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, roč. 29, č. 3, s. 393-409. ISSN 01686445.
- [42] VESELÁ, Mária. Praktikum z obecné mikrobiologie. 3. vyd. Brno: VUT FCH, 2004, 99 s. ISBN 80-214-2567-9.
- [43] SEDLÁČEK, Ivo. Taxonomie prokaryot. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [44] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [45] POT BRUNO, TSAKALIDOU EFFIE. Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*. In: *Lactobacillus molecular biology: from genomics to probiotics*. Editor Åsa Ljungh, Torkel Wadström. Norfolk: Caister Academic Press, 2009, 205 s. ISBN 978-1-904455-41-7.
- [46] FRANK, Hanns K. Dictionary of Food Microbiology. 1. vyd. Lancaster: Technomic Publishing CO., INC., 1992, 298 s. ISBN 15-667-6010-0.
- [47] KLABAN, Vladimír. Ilustrovaný mikrobiologický slovník. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 654 s. ISBN 80-726-2341-9
- [48] HAMMES, W.P. a C. HERTEL. New developments in meat starter cultures. 1998, vol. 49. DOI: 10.1016/S0309-1740(98)90043-2.
- [49] LODINOVÁ-ZÁDNÍKOVÁ R, et. al, Oraal Administration of Probiotic *Escherichia coli* after Birth Reduces Frequency of Allergies and Repeated Infections Later in Life (after 10 and 20 Years). *Int Arch Allergy Immunol* 2003; vol. 131, s.209-211
- [50] HOLKO, I., J. HRABĚ a RADA. The substitution of a traditional starter culture in mutton fermented sausages by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis*. *Meat Science*. 2013, vol. 94, issue 3.

- [51] PECOVÁ, M, et. al, Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chem. List.* 2011, 530, 524-530
- [52] Z našeho regionu - Výrobky - Uzeniny: ORLÍK SALÁM - ŽŘUD-MASOKOMBINÁT PÍSEK. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.znasehoregionu.cz/?c=6&kt=1&pd=57&jihocesky/orlik-salam---zrud-masokombinat-pisek>
- [53] Z našeho regionu - Výrobky - Uzeniny: KLOBÁSA S PROBIOTIKY 200g - CARNEX. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.znasehoregionu.cz/?c=6&kt=1&pd=275&/olomoucky-/klobasa-s-probiotiky-200g---carnex>
- [54] AYMERICH, T, et. al, Probiotic strains *Lactobacillus plantarum* 299V and *Lactobacillus rhamnosus* GG as starter cultures for fermented sausages. *LWT - Food Science and Technology*. vol 54, issue 1, s. 51-56. DOI: doi:10.1016/j.lwt.2013.05.014. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643813001758>
- [55] RUBIO, R, et. al, Nutritionally enhanced fermented sausages as a vehicle for potential probiotic lactobacilli delivery. *Meat Science*. 2014, vol. 96, issue 2, s. 937-942. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.09.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174013005263>
- [56] MARTÍN, B, et. al, The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 survives the passage through the gastrointestinal tract and its use as starter culture results in safe nutritionally enhanced fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, vol.186, issue 1, s.55-60. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.013. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160514002979>
- [57] ROUHI, M., et. al, Probiotic Fermented Sausage: Viability of Probiotic Microorganisms and Sensory Characteristics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2013, vol. 53, issue 4, s. 331-348 [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.1080/10408398.2010.531407. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2010.531407>
- [58] LIBERA, J, et. al, Microbiological and physicochemical properties of dry-cured neck inoculated with probiotic of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12: Viability of Probiotic Microorganisms and Sensory Characteristics. *International Journal of Food Science* [online]. 2015, vol. 53, issue 4, n/a-n/a [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.1111/ijfs.12806. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2010.531407>
- [59] WANG, Y., et. al, Bacteriocin-producing probiotics enhance the safety and functionality of sturgeon sausage: Viability of Probiotic Microorganisms and Sensory Characteristics. *Food Control* [online]. 2015, vol. 50, issue 4, s. 729-735 [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.09.045. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713514005660>
- [60] GRUBE, S., J. SCHÖNLING a A. PRANGE. Comparison of different methods for the recovery of DNA from spores of mycotoxin-producing moulds in spiked food samples. *Letters in Applied Microbiology*. 2015, n/a-n/a. DOI: 10.1111/lam.12405. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/lam.12405>
- [61] DAY, J.B., et. al, Real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in infant formula and lettuce following macrophage-based isolation and enrichment. *Journal of Applied Microbiology*. 2015, vol. 118, issue 1, s. 233-244. DOI: 10.1111/jam.12674. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12674>

- [62] WANG, Yu, et. al, PH-responsive deoxyribonucleic acid capture/release by polydopamine functionalized magnetic nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*. 2015, vol. 862, issue 1, s. 33-40. DOI: 10.1016/j.aca.2015.01.009. Dostupnéz: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267015000422>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

BMK= bakterie mléčného kysání

PCR= polymerázová řetězová reakce

HL= hrubý lyzát

PK= pozitivní kontrola

NK= negativní kontrola

PEG= polyethylenglykol

MČ= magnetické částice

10 PŘÍLOHY

1.1 Příloha 1- Publikované výsledky

16. slovenská ŠVK v odbore chémie a chemickej a potravinárskej technológie
12.11.2014, FCHPT STU v Bratislave (Sborník ISBN 978-80-227-4268-9)

IZOLACE A PRŮKAZ PROBIOTICKÉ DNA V TRVANLIVÝCH MASNÝCH VÝROBCÍCH

Roman Vašíček, Štěpánka Trachtová, Alena Španová

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno

xcvasicekr@fch.vutbr.cz

Úvod

Na trhu v ČR jsou dostupné masné výrobky s probiotiky od dvou výrobců. Jedná se o trvanlivé fermentované salámy, tj. tepelně nepracované trvanlivé masné výrobky. Mimo jiné se vyrábí salám Ovčácká klobása s probiotiky a salám Orlický. Salámy s probiotiky jsou zdravější alternativou k jiným běžným masným výrobkům a mají tak pozitivní vliv na zdraví konzumenta. Mezi probiotické bakterie patří zejména zástupci rodu *Lactobacillus*.

Cíl práce

Cílem této práce byla izolace a průkaz bakteriální DNA v trvanlivých masných výrobcích.

Experimentální část

V experimentální části jsem se zabýval přípravou vzorků salámu pro izolaci DNA. Počínaje homogenizací vzorků salámu za pomoci stomacheru BagSystem. Po té jsem připravil hrubé lyzáty buněk, provedl fenolovou extrakci celkové DNA, spektrofotometricky stanovil koncentrace a čistotu DNA, provedl kontrolou relativní intaktnosti DNA pomocí agarosové gelové elektroforézy. Pak byla provedena PCR a detekce samotných produktů PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* [1], po té byla provedena PCR a detekce produktů PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* [2].

Výsledky a diskuze

Byla vyvinuta metoda přípravy vzorků salámů pro izolaci DNA. Jako optimální byla použita navážka 10g salámu a jeho homogenizace ve 25 ml sterilní vody po dobu 15 minut. Pro izolaci bylo použito 1,5 ml homogenátu, které byly sedimentovány centrifugací při 10 000 ot/min po dobu 5 minut, poté bylo ke slitému sedimentu přidáno opět 1,5

homogenátu a vzorek byl opět centrifugován. Získaný sediment byl poté resuspendován v 1ml lyzačního roztoku B (tris, EDTA, lysozym 3mg/ml). Takto upravený vzorek byl inkubován po dobu 1h za laboratorní teploty. Poté bylo přidáno 50 µl 20 % SDS, 5 µl proteinasy K (100 µg/ ml) a vzorek byl inkubován při teplotě 55°C po dobu 15h. DNA byla izolována metodou fenolové extrakce a rozpuštěna v 50µl TE pufru ve výsledné koncentraci 165 ng/µl (Ovčácká klobása) a 113 ng/µl(salám Orlick). Spektrofotometricky se ověřilo, že DNA byla izolována v kvalitě vhodné pro PCR. Pomocí PCR a detekce produktů PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* byla prokázána přítomnost bakteriální DNA . Pomocí PCR a detekce produktů PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* byla prokázána přítomnost DNA bakterií rodu *Lactobacillus*[2].

Závěr

V DNA izolované ze vzorků salámů byla prokázána přítomnost bakteriální DNA a DNA rodu *Lactobacillus*- v souladu s údaji od výrobců.

Literatura

- [1] Haarman, M.; Knol, J.; Appl. Environ. Microbiology. (2006), 72, 2359-2365
- [2] Dubernet, S.; Desmases, N.; Guéguen, M.; FEMS Microbiol. Lett. (2002), 214, 271-275

Část výsledků byla připravena k publikaci ve formě posteru na konferenci Chemistry and life, 2.-4.9. 2015 FCH VUT v Brně

Konference Chemistry and Life – Abstrakt

Průkaz buněk druhu *Lactobacillus acidophilus* v probiotickém masném výrobku
Roman Vašíček, Jakub Vaňásek, Jana Konečná, Štěpánka Trachtová, Alena Španová,
Bohuslav Rittich

Chemická fakulta VUT Brno, Purkyňova 118, 612 00 Brno

Probiotické bakterie mají pozitivní účinek na lidské zdraví. Příznivě ovlivňují imunitní systém hostitele a složení střevní mikroflóry. Do gastrointestinálního traktu se mohou dostávat s potravou. Probiotické bakterie jsou nejčastěji obsaženy v mléčných výrobcích a v doplňcích stravy. Nacházejí se i v dalších matricích, včetně masných výrobků. Cílem této práce bylo prokázat přítomnost buněk *Lactobacillus acidophilus* ve fermentovaném probiotickém masném výrobku Ovčácká klobása s využitím metody PCR. Pozornost byla věnována přípravě vzorku (homogenizace, lyze buněk) a optimalizaci metody izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR s využitím magnetických mikročástic. Bylo rovněž testováno použití magnetických částic s imobilizovanou protilátkou anti-*Lactobacillus* pro separaci bakteriálních buněk *Lactobacillus acidophilus* z homogenizovaného výrobku. Buňky navázané na nosiči byly použity v PCR. V obou případech byly po amplifikaci v PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus acidophilus* detegovány specifické produkty PCR. V kontrolním fermentovaném masném výrobku salám Orlík, kde nebyly deklarovány bakterie druhu *L. acidophilus*, nebyl uvedený druh detegován. Bylo prokázáno, že imunomagnetickou separací lze použít pro izolaci a zakoncentrování buněk.