



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VYUŽITÍ PCR PRO DRUHOVOU IDENTIFIKACI A PRO
VYHLEDÁVÁNÍ VYBRANÝCH GENŮ LAKTOBACILŮ**

USE OF PCR FOR SPECIES IDENTIFICATION AND SEARCHING OF SELECTED GENES OF LACTOBACILLI

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Aleksandra Diado

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0967/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Aleksandra Diado	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Alena Španová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Využití PCR pro druhovou identifikaci a pro vyhledávání vybraných genů laktobacilů

Zadání diplomové práce:

1. Vyhledání a kritické zpracování dostupné literatury k dané problematice.
2. Izolace DNA z bakteriálních kultur a výrobků.
3. Amplifikace izolované DNA metodou PCR s využitím specifických primerů.
4. Zpracování získaných experimentálních výsledků.
5. Vyhodnocení experimentů formou diskuse.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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. Aleksandra Diado
Student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

ABSTRAKT

Probiotické potravinové výrobky - doplňky stravy obsahují různé druhy probiotických bakterií. Správná druhová identifikace kmenů a jejich charakteristických vlastností je velmi důležitá z hlediska kvality výrobků. K tomu se využívají metody DNA diagnostiky.

V této práci byla izolovaná DNA ze 4 probiotických výrobků. Pomocí amplifikace DNA metodou PCR byla ve 3 výrobcích prokázána přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* a druhu *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* v souladu s údaji uvedenými výrobcí.

Při druhově identifikaci byly pro každý druh použity dvě sady primerů. S využitím dalších primerů byly v DNA izolované z výrobků prokázány sekvence následujících genů: *bsh*, *lai* a *odc*.

Byly zjištěny rozdíly mezi výrobky, týkající se detekce *lai* genu *L. acidophilus*.

ABSTRACT

Probiotic food products - food additives contain different species of probiotic bacteria. Accurate species identification with their characteristics is very important from the view of products quality. Methods of DNA diagnostics are used for these purposes.

In this thesis DNA was isolated from 4 probiotic products. The presence of bacterial of genus *Lactobacillus* and species *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* were detected in three products by PCR. This information was in accordance with the data provided by the manufacturer.

Two sets of primers were used for identification of species. Using other primers sequences of genes such as *bsh*, *lai* and *odc* were detected in DNA isolated from the products.

Differences were estimated among products concerning the detection of *lai* gene *Lactobacillus acidophilus*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Probiotické výrobky, izolace DNA, polymerázová řetězová reakce, identifikace, rod *Lactobacillus*, druhy *Lactobacillus*, gen *bsh*, gen *lai*, gen *odc*

KEYWORDS

Probiotic products, DNA isolation, Polymerase Chain Reaction, identification, genus *Lactobacillus*, *Lactobacillus* species, *bsh* gene, *lai* gene, *odc* gene

Diado, A.. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. 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

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych upřímně poděkovat doc. RNDr. Aleně Španové, CSc za její čas, trpělivost a cenné rady, které jsem se snažila zohlednit v práci. Zároveň bych ráda poděkovala Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1 Probiotika.....	10
2.2 Probiotické mikroorganismy	10
2.3 Probiotické účinky.....	10
2.4 Probiotické vlastnosti	11
2.4.1 Hydroláza žlučových solí (Bsh).....	11
2.4.2 Linoleát izomeráza (Lai).....	11
2.4.3 Ornitin dekarboxyláza (Odc).....	12
2.5 Probiotika v potravinářském průmyslu.....	13
2.5.1 Probiotická kritéria.....	13
2.5.2 Formy probiotik	13
2.6 Prebiotika a symbiotika	14
2.7 Mléčné kvašení.....	14
2.7.1 Homofermentativní mléčné kvašení	14
2.7.2 Heterofermentativné mléčné kvašení	14
2.8 Bakterie mléčného kvašení.....	15
2.9 Rod <i>Lactobacillus</i>	16
2.9.1 Druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	16
2.9.2 Druh <i>Lactobacillus casei</i>	17
2.9.3 Druh <i>Lactobacillus plantarum</i>	17
2.9.4 Druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	18
2.10 Identifikace bakterií mléčného kvašení	18
2.10.1 Kultivační metody.....	19
2.10.2 Nekultivační metody	19
2.11 Polymerázová řetězová reakce	19
2.11.1 Princip PCR.....	19
2.11.2 Komponenty PCR směsi	19
2.11.3 Průběh PCR.....	20
2.12 Horizontální gelová elektroforéza DNA.....	21
2.13 Bioinformatika.....	22

2.13.1	Bioinformatické databáze.....	22
2.13.2	Primer-BLAST.....	23
3	CÍL PRÁCE.....	24
4	EXPERIMENTALNÍ ČÁST.....	25
4.1	Materiál.....	25
4.1.1	Výrobky.....	25
4.1.2	DNA kontrolních bakteriálních kmenů.....	27
4.1.3	Přístroje a pomůcky.....	27
4.2	Chemikálie.....	28
4.2.1	Chemikálie pro lyzi bakteriálních buněk.....	28
4.2.2	Chemikálie pro fenolovou extrakci DNA a sražení DNA etanolem.....	28
4.2.3	Komponenty pro přípravu směsí pro PCR.....	29
4.2.4	Chemikálie pro agarózovou gelovou elektroforézu.....	29
4.2.5	Primery pro jednotlivé PCR.....	29
4.3	Roztoky.....	32
4.3.1	Lyze bakteriálních buněk.....	32
4.3.2	Extrakce DNA.....	32
4.3.3	Srážení DNA etanolem.....	32
4.3.4	Agarózová gelová elektroforéza.....	33
4.4	Metody.....	33
4.4.1	Lyze bakteriálních buněk.....	33
4.4.2	Fenolová extrakce DNA.....	34
4.4.3	Srážení DNA etanolem.....	34
4.4.4	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	34
4.4.5	Kontrola intaktnosti DNA.....	34
4.4.6	Doménově specifická PCR.....	35
4.4.7	Rodově specifická PCR.....	36
4.4.8	Optimalizace podmínek pro rodově specifickou PCR.....	36
4.4.9	Druhově specifické PCR.....	37
4.4.10	Bioinformatická analýza primerů.....	38
4.4.11	Druhová identifikace pomocí nove navržených primerů.....	38
4.4.12	Bioinformatická analýza genů kódujících probiotické a další vlastnosti.....	39
4.4.13	Vyhledávání genu kódující probiotické a další vlastnosti.....	39

4.4.14	Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy	40
5	VÝSLEDKY	41
5.1	Příprava hrubých lyzátů buněk z výrobků	41
5.2	Izolace DNA fenolovou extrakce	41
5.3	DNA pro PCR.....	41
5.3.1	Spektrometrické stanovení koncentrace DNA	41
5.3.2	Ředění DNA pro PCR.....	42
5.4	Doménově specifická PCR.....	42
5.5	Rodově specifická PCR	43
5.5.1	Optimalizace podmínek pro rodově specifickou PCR.....	44
5.6	Druhově specifická PCR	45
5.6.1	Druhově specifická PCR pro druh <i>L. casei</i>	46
5.6.2	Druhově specifická PCR pro druh <i>L. rhamnosus</i>	47
5.6.3	Druhově specifická PCR pro druh <i>L. plantarum</i>	47
5.6.4	Druhově specifická PCR pro druh <i>L. acidophilus</i>	48
5.6.5	Bioinformatická analýza použitých primerů	49
5.7	Druhově specifické PCR s nově navrženými primery.....	50
5.7.1	Druhově specifická PCR pro druh <i>L. casei</i>	50
5.7.2	Druhově specifická PCR pro druh <i>L. rhamnosus</i>	50
5.7.3	Druhově specifická PCR pro druh <i>L. plantarum</i>	51
5.7.4	Druhově specifická PCR pro druh <i>L. acidophilus</i>	52
5.8	Využití PCR pro vyhledávání genů kódujících probiotické a další vlastnosti	52
5.8.1	Bioinformatická analýza genů kódujících probiotické a další vlastnosti.....	52
5.8.2	Vyhledávání genů kódujících Bsh-protein.....	53
5.8.3	Vyhledávání genu kódujících Lai-protein.....	54
5.8.4	Vyhledávání genu kódujícího Odc-protein	56
5.9	Souhrn výsledků amplifikací	57
6	DISKUZE.....	58
6.1	Izolace DNA fenolovou extrakcí.....	58
6.2	Doménově specifická PCR.....	58
6.3	Rodově specifická PCR	58
6.3.1	Optimalizace podmínek pro rodově specifickou PCR.....	58
6.4	Druhově specifické PCR	59

6.4.1	Druhově specifické PCR s primery převzatými z odborné literatury.	59
6.4.2	Bioinformatická analýza primerů publikovaných v odborné literatuře	59
6.5	Druhově specifické PCR s nově navrženými primery.....	60
6.6	Vyhledávání genů kódujících probiotické a další vlastnosti	61
7	ZÁVĚR.....	63
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	68

1. ÚVOD

V současné době neracionální stravování, stres a časté užívání antibiotik vede k poklesu počtu přirozených bakterií v lidském organismu, což způsobují snížení imunity. Za účelem obnovení a udržování zdravé střevní mikroflóry jako nezbytnou části jídelničky se doporučují výrobky obohacené probiotickými kulturami. V průmyslu se jako probiotika nejčastěji používají bakterie mléčného kvašení (BMK).

BMK jako hlavní fermentační produkt tvoří kyselinu mléčnou, která snižují pH prostředí, což působí proti patogenům. Nejširší zastoupení v skupině BMK patří rodu *Lactobacillus*. V nedávné době laktobacily zasloužily pozornost biochemiků, mikrobiologů, lékařů a ekologů z důvodů jejich potenciálního významu pro udržování homeostázy organismu, prevence a léčení mnoha nemocí různé etiologie. Proto jsou používány jako složky potravinářských, kosmetických a dalších výrobků a také samostatně ve formě léčiv a jako doplňky stravy.

Z důvodu vlivu na lidské zdraví se musí složení doplňků stravy a léků kontrolovat. Pro identifikaci BMK a přítomnosti genů kódujících probiotické vlastnosti existuje řada metod. V současné době je nejpoužívanější polymerázová řetězová reakce (PCR) a postupy na ní založené. Je to vysoce citlivá metoda, která umožňuje detekci specifických úseků DNA. Ty se dají vyhledat s využitím bioinformatických databází.

Cílem diplomové práce bylo izolovat bakteriální DNA z potravinových doplňků v kvalitě vhodné pro provedení PCR, a pomocí specifických primerů detegovat přítomnost jednotlivých druhů rodu *Lactobacillus*, uvedených na obale výrobcem a detegovat přítomnost některých genů, kódujících probiotické vlastnosti.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotika

Dle Iliji Mečnikova: "Naše předčasné a nešťastné stáří je výsledkem stálé otravy škodlivými látkami, které jsou vylučované některými mikroby tlustého střeva. Je zřejmé, že snížení počtu takových mikrobů oddali projevy stárnutí." Vědec sledoval, jak se Bulhaři, které každodenně konzumují "bulharský jogurt" (mléčný výrobek), vyznačují svou dlouhověkostí a dobrým zdravím. V roce 1907, Mečnikov došel k závěru, který byl založen na studiu normální mikroflóry lidského organismu, a doporučil využití mléčných výrobků v jídelníčku jako praktický krok k zlepšení zdravotního stavu. To byl začátek éry probiotik. [1]

V 60. letech Lilly a Stillwelle použili pojem *probiotika*. Slovo „*probiotic*“ pochází z řeckého jazyka, což znamená "pro život." Podle první definice dané v roce 1965 probiotika jsou živé mikroorganismy, které při přijetí v přiměřeném množství, udělují zdravotní výhodu hostitele. [2]

Podle definice zveřejněné v roce 1989 Royem Fullerem, probiotika jsou živé mikrobiální doplňky stravy, které prospívají zdraví spotřebitelů tím, že udržují nebo zlepšují jejich střevní mikrobiální rovnováhu. [3]

2.2 Probiotické mikroorganismy

Mezi mikroorganismy jsou jako probiotika nejvíc používané bakterie mléčného kvašení tj. zástupci rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus*, dále rodu *Bifidobacterium* a kvasinky rodu *Saccharomyces*. [4] Přehled probiotických organismů je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled některých probiotických organismů [4]

Druhy rodu <i>Lactobacillus</i>	Druhy rodu <i>Bifidobacterium</i>	Další mikroorganismy
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	
<i>Lactobacillus gasseri</i>		
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>		
<i>Lactobacillus reuteri</i>		

2.3 Probiotické účinky

Probiotické MO v lidském organismu vyvíjejí svou činnost na třech úrovních.

Na první úrovni (interakce mikrob-mikrob) - inhibice životaschopnosti patogenních bakterií v důsledku konkurence o živiny a schopnosti produkovat "bakteriociny" a další substráty (mléčná kyselina, máselná kyselina) s antimikrobiální aktivitou.

Na druhé úrovni (interakce mikrob - epitel trávicího traktu)-blokace adhezi nebo vytlačování z adhezních receptorů patogenních a potenciálně patogenních mikroorganismy. To brání translokaci střevních bakterií do vnitřního prostředí hostitele, čímž se zlepšuje bariérová funkce střevního epitelu.[5]

Třetí úroveň (mikrobiální interakce mikrob - imunitní systém) se podílí na aktivaci lokálních a systémových ochranných imunitních reakcí, jakož i na vytvoření imunologické tolerance (aktivace makrofágů, stimulace imunoglobulinu A (IgA) a inhibice uvolňování zánětlivých cytosinů).[5]

Nicméně, zůstává nejasné, zda jsou tyto účinky na imunitní systém systémové, jsou li stejné u zdravých a nemocných pacientů. Existují data, že některé probiotika stimulují fagocytózu u zdravých pacientů, ale inhibují si u pacientů s alergickou reakcí. Lze tedy konstatovat, že účinky probiotik na imunitní systém mohou záviset na stavu lidské imunity a dávce preparátu, a mohou se také lišit u různých probiotických kmenů. [4]

2.4 Probiotické vlastnosti

2.4.1 Hydroláza žlučových solí (Bsh)

Jedním z kritérií probiotika je životaschopnost v prostředí velmi nízkého pH a tolerance ke gastrointestinálním kyselinám a žluči. Žluč je syntetizována v centrálních hepatocytech jater a je uvolňována do dvanáctníku po příjmu potravy. Žluč je žlutozelený vodný roztok, jehož hlavní složky zahrnují žlučové kyseliny, cholesterol, fosfolipidy, a pigment biliverdin. Soli žlučových kyselin fungují jako biologický detergent, který emulguje a rozpouští lipidy a vitamíny rozpustné v tucích a hraje zásadní roli při trávení tuků. Mají zároveň antimikrobiální aktivitu, a to především díky rozpouštění bakteriálních membrán působením na fosfolipidy a proteiny buněčné steny. [6]

Účinek probiotických bakterií při snížení úrovně cholesterolu se vysvětluje aktivitou hydrolasy žlučových solí (Bile Salt Hydrolase), která se podílí na odstranění konjugovaných aminokyselinových zbytků v žlučových kyselinách. Bsh patří do rodiny choloylglycinových hydroláz, které jsou klasifikovány jako N-terminální nukleofilní (Ntn) hydrolázy s N-terminálním zbytkem cysteinu. Choloylglycinové hydrolázy se nachází v mnoha gastrointestinálních bakteriích např. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteriodes*, *Clostridium*, a *Enterococcus*. Soli žlučových kyselin jsou dekonjugované působením BSH, v nekonjugované formě jsou málo rozpustné a nejsou absorbované buňkami střeva. Tak, nekonjugované soli žlučových kyselin se vylučují přírodní cestou. [6]

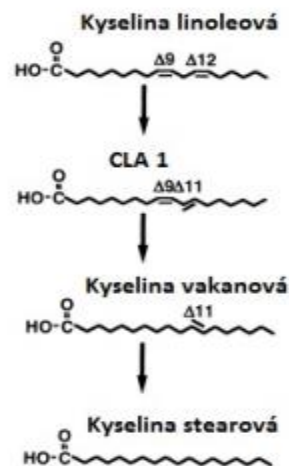
2.4.2 Linoleát izomeráza (Lai)

Konjugovaným mastným kyselinám je věnována velká pozornost jako novém typ funkčních lipidů. Konjugovaná kyselina linolová (conjugated linoleic acid, CLA) s konjugovanými dvojnými vazbami patří ke skupině polohových a geometrických izomerů kyseliny linolové

(LA, 18: 2 n-6). V posledních desetiletích je o CLA velký zájem vzhledem k fyziologicky prospěšným účinkům. Izomery CLA cis-9, trans-11-CLA (18:2) mají schopnost snižovat karcinogenezi, artrosklerozu a procento nadměrného tělového tuku. Hlavním zdrojem cis-9, trans-11-CLA (18:2) a trans-9,trans-11-18:2, což jsou izomery kyseliny linoleové, jsou převážně mléčné výrobky. Hlavními producenty jsou zástupci rodu *Lactobacillus*. [7]

CLA vzniká jako meziprodukt v průběhu hydrogenace kyseliny linolové na kyselinu stearovou působením anaerobních laktobacilů. Kompletní hydrogenace kyseliny linolové je vícestupňový proces viz Obrázek 1. První reakce je rychlá konverze kyseliny linolové na cis-9, trans-11-CLA (18:2) působením linoelat izomerazy (Lai). Druhý pomalejší krok je konverze cis-9, trans-11-CLA (18:2) na trans-11 kyselinu vakanovou, za kterým následuje redukce kyseliny vakanové na kyselinu stearovou pomocí mikrobiální činnosti laktobacilů. [8]

Obrázek 1: Hydrogenace kyseliny linoleové na stearovou kyselinu [8]



Lai vystupuje v kaskádě reakcí jako hlavní biokatalyzátor. Představuje intracelulární enzymový systém, který se skládá ze dvou forem enzymu (rozpustné enzymy CLA-HD a CLA-DC) a proteinu CLA-HY, vázaného na membránu. Poslední se vyskytuje u mléčných a probiotických bakterií, avšak je náročnější pro studium kvůli labilitě v rozpustné formě. [7],[8]

2.4.3 Ornitin dekarboxyláza (Odc)

Bakterie mléčného kvašení produkují enzymy, které v průběhu katabolických drah, dekarboxylují aminokyseliny na biogenní aminy (BA). Nejdůležitější BA v potravinách a nápojích jsou histamin, tyramin, putrescin, lyzin a beta-fenyletylamin. Histamin je produkován dekarboxylací histidinu díky aktivitě histidin dekarboxylázy, tyramin vzniká dekarboxylací aminokyseliny tyrozin pomocí tyrozin dekarboxylázy. Putrescin se produkuje dekarboxylací ornitinu působením ornitin dekarboxylázy.

Schopnost mikroorganismů dekarboxylovat aminokyseliny je vysoce variabilní, často kmenově specifická. Geny kódující enzymy zodpovědné za vznik BA jsou často přenášeny plazmidy a kmeny, které obsahují určitý plazmid, jsou schopné produkce BA.

BA jsou přítomné ve mnoha potravinách, včetně v mléčných výrobcích. V prokaryotických buňkách je syntéza BA spojována s obranným mechanismem vůči vlivu kyselého prostředí trávicího traktu. Při konzumaci potravy s malým obsahem BA, se tyto sloučeniny ve střevě přeměňují díky aktivitě aminosydáz (mono a diamin oxidázy) na fyziologicky méně aktivní formy. [9]

I přesto, BA se někdy akumulují v potravě ve vysoké koncentraci. Vysoká koncentrace BA s sebou nese riziko toxicity. Působením BA se uvolňuje adrenalin a noradrenalin, zvyšuje se srdeční výkon, vzniká migréna a tachykardie, snižuje se množství cukru v krvi a zvyšuje se krevní tlak. Sekundární aminy (putrescin a kadaverin) jsou potenciální prekurzory pro karcinogenní nitrosaminy.[9]

2.5 Probiotika v potravinářském průmyslu

2.5.1 Probiotická kritéria

V souladu s doporučeními Světové gastroenterologické organizace (World Gastroenterology Organization) probiotické mikroorganismy, které se používají v potravinách a doplňcích stravy musí splňovat následující podmínky [10]:

- Životaschopnost během průchodu střeva (rezistence k účinkům žaludečních šťáv a žluči)
- Schopnost rozmnožení a kolonizace v trávicím traktu
- Bezpečnost a účinnost
- Udržovatelnost během skladovatelnosti výrobku [4]
- Zachování dobrých sensorických vlastností výrobku [10]

2.5.2 Formy probiotik

Jelikož jeden z nejdůležitějších kritérií je zachování životaschopnosti, velký pozor se věnuje formě, v jaké dochází k prodávání probiotického kmene. Podle formy se probiotika rozdělují na suché a tekuté. [11]

Probiotika v tekuté formě lze používat na sliznice (nosní, ústní, vaginální dutina). Tekutá forma značně usnadňuje distribuce probiotika podél trávicího traktu. [11]

Suchá probiotika jsou mikroorganismy lyofilizované vakuovým vymražením v anabióze v želatinové matici. Začínají působit po 1-4 hodin od přijetí. Během této doby MO vychází z anabiózy a začínají účinkovat v organismu hostitele. [11] Sušené probiotické mikroorganismy mohou být v následujících formách:

- **Kapsle**

Forma a struktura kapsul omezuje přístup vzduchu a vlhkost, které negativně ovlivňují účinek probiotika. Produkty obsahují částice o velikosti 50 až 250 μm . [12]

- **Prášky**

Jsou méně populární a efektivní formou probiotických preparátů než kapsle vzhledem k tomu, že vlhkost a vzduch jsou destruktivní pro probiotika. Přesto, pro děti nebo jednotlivce, kteří nemohou polykat tobolky, práškové probiotika mohou být přidány do potravin nebo nápojů. Mezi na trhu dostupné potravinové výrobky se sušenými probiotiky patří cereálie, dětská výživa a sušené mléko. [12]

2.6 Prebiotika a symbiotika

Prebiotika byly poprvé definovány jako nestravitelné složky potravy, které příznivě ovlivňují stav hostitele selektivní stimulací růstu a aktivity omezeného počtu bakterií v tlustém střevě. Podle výzkumů prebiotika zvyšují počet užitečných anaerobní bakterií a snižují populaci potenciálně patogenních mikroorganismů. [13] Prebiotika jsou ve významném množství obsažena v potravinách rostlinného původu: zelenině, ovocích a cereáliích. Do skupiny prebiotik patří oligosacharidy (oligofruktóza, galaktooligosacharidy, laktulóza, oligosacharidy mateřského mléka) a inulin. [13]

Kombinace probiotika s nestravitelnými složkami potravy (prebiotika) se nazývá **symbiotika**. Probiotikum kombinován s prebiotikem, které je pro něj specifické, např. oligofruktóza jako substrát pro rod *Bifidobacteria* přispívá k růstu prodloužení přežití probiotika. [14]

2.7 Mléčné kvašení

Kvašení je proces, při kterém probíhají chemické přeměny organických látek v důsledku metabolické aktivity mikroorganismů. Mléčného kvašení je proces, při kterém za anaerobních podmínek pyruvát se přeměňuje na laktát, a NADH na NAD^+ , čímž se udržuje rovnováha. Existují dva typy mléčného kvašení: homofermentativní a heterofermentativní. Mezi homofermentativní BMK se zařazují někteří zástupci rodů *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*. Heterofermentativní kvašení je charakteristické pro vybrané druhy *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella* a *Bifidobacterium*. [15]

2.7.1 Homofermentativní mléčné kvašení

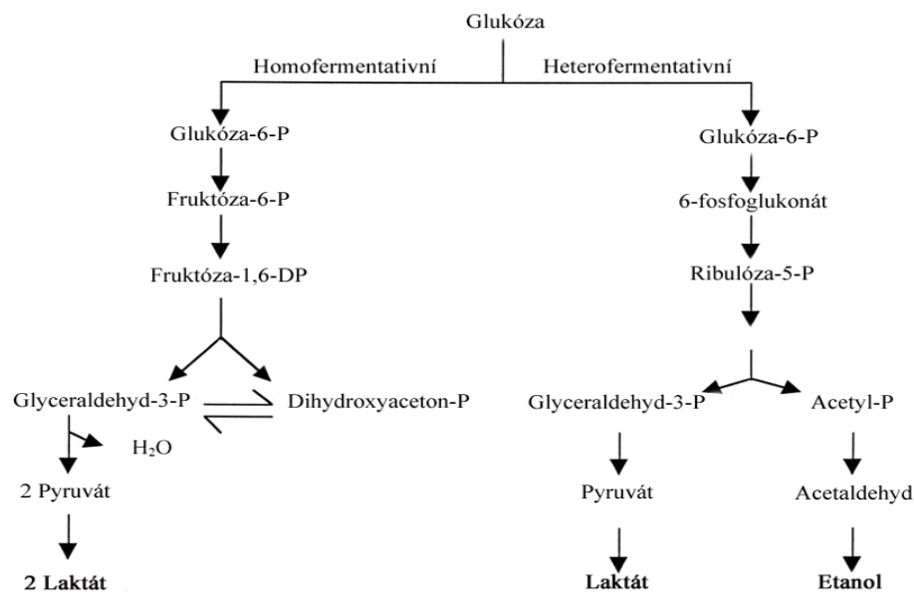
Homofermentativní mléčné kvašení je charakterizované tvorbou fruktózy-1,6-DP (FDP), která je rozštěpená pomocí FDP-aldolázy na dihydroxyaceton-P a glycerinaldehyd-3-P za podmínek přebytku glukózy a omezeného přístupu kyslíku. Produkty jsou 2 molekuly laktátu viz Obrázek 2. Tento proces poskytuje 2 moly ATP. [15]

2.7.2 Heterofermentativné mléčné kvašení

Heterofermentativní BMK v metabolismu využívají kombinace 6-fosfoglukonátového cyklu a fosfoketolazového cyklu, protože neobsahují aldolázu-enzym, který štěpí hexózu-1,6-DP na 2 trióza-P. Glukóza-6-P zpočátku dehydrogenuje na 6-fosfoglukonát a následně dekarboxyluje

za vzniku 1 molu CO₂. Výsledná ribulóza-5-P se štěpí na 1 mol glyceraldehyd-3-P (GAP) a 1 mol acetyl-P. GAP je dále přeměněn na laktát homofermentativním mléčným kvašením. Acetyl-P se přenáší na etanol pomocí acetyl-CoA. Tak za anaerobních podmínek, 1 mol glukózy se převede na ekvimolární množství kyseliny mléčné, etanolu a CO₂ viz Obrázek 2. [15],[16]

Obrázek 2: Obecné schéma fermentace glukózy u BMK [17]



2.8 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení neboli BMK jsou Gram-pozitivní, nesporogenní, nepatogenní mikroorganismy, které postrádají cytochromy a jsou neschopné syntezovat porfyriny. Hlavní jejich vlastností je schopnost enzymovou fermentací sacharidů tvořit jako hlavní produkt kyselinu mléčnou a takové produkty jako etanol, CO₂, nižší mastné kyseliny a další. [18]

Skupina bakterií mléčného kvašení zahrnuje rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Paralactobacillus* a další. Avšak největší význam pro potravinářský průmysl mají především rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* a rod *Bifidobacterium*, který je fylogeneticky nepříbuzný BMK, ale je často mezi nimi uváděn z důvodu podobným biochemickým a fyziologickým vlastností. [18]

Zástupci zmíněných rodů se už po dlouho dobu používají k fermentaci masových výrobků, v mlékárenském a konzervačním průmyslu. Účelem bakterií mléčného kvašení je zajištění správného a rychlého průběhu zrání díky přeměně sacharidů, dusičnanů, dusitanů, štěpení lipidů, zajištění konzervačního účinku snížením pH prostředí a také vytvoření typického aroma a chutí výrobků.

BMK se vyskytují v prostředí obohaceném na sacharidy: potraviny (mléčné výrobky, fermentované maso, zakysaná těsta, zeleniny, ovoce, nápoje), životní prostředí (dýchací cesty, genitální trakt lidí a zvířat, rostlinné materiály a odpadní vody). [19]

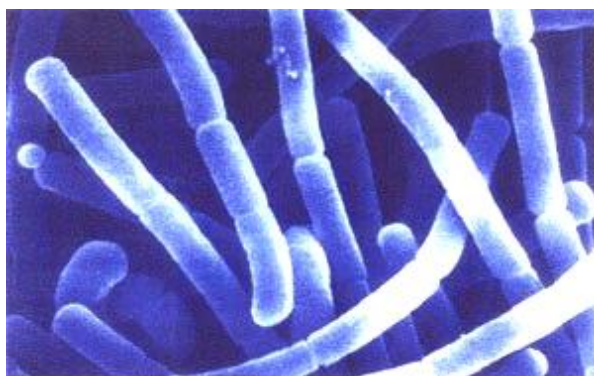
2.9 Rod *Lactobacillus*

Podle taxonomického zaražení patří rod *Lactobacillus* do domény *Bacteria*, kmen *Firmicutes*, třída *Bacilli*, řád *Lactobacillales*, čeleď *Lactobacillaceae*. [19]

Zástupci rodu *Lactobacillus* jsou tyčinkovité mikroorganismy. Mohou existovat samostatně nebo také tvoří shluky a řetězce viz Obrázek 3. Jsou kataláza negativní, podle závislosti na kyslíku se dělí na fakultativně anaerobní, mikroaerofilní anebo anaerobní. Optimální růstová teplota pro většinu druhů je 30 až 40 °C. [20] Podle konečných produktů fermentace laktobacily dělíme na:

- obligátně homofermentativní (hexóza fermentovaná na kyselinu mléčnou)
- fakultativně heterofermentativní (hexóza fermentovaná na kyselinu mléčnou nebo na směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a etanolu; pentóza fermentovaná na kyselinu mléčnou a octovou)
- obligátně heterofermentativní (hexóza fermentovaná na kyselinu mléčnou, octovou či etanol a oxid uhličitý; pentóza fermentovaná na kyselinu mléčnou a octovou). [20]

Obrázek 3: Morfologie buněk *Lactobacillus acidophilus* [21]



Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou výživově náročné, vyžadují nutričně bohatá media s vysokým obsahem sacharidů, aminokyselin, peptidů, esterů mastných kyselin, solí, derivátů nukleových kyselin, a vitaminů. [22]

Laktobacily se nacházejí v gastrointestinálním traktu a pohlavních cestách lidí a zvířat v proměnlivých množstvích v závislosti na druhu a věku hostitele. Jsou rovněž přítomné v rostlinných materiálech a ve fermentovaných potravinách (sýry, jogurty, fermentované mléko, maso, zelenina). [22]

2.9.1 Druh *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus je nejčastější druh rodu *Lactobacillus*. Zástupci druhu jsou součástí zdravé mikroflóry v ústní dutině, pochvě a tlustém střevě. [23] Používají se v potravinářství i jako léčiva. V Tabulce 2 jsou uvedené výrobky s obsahem *Lactobacillus acidophilus*.

Tabulka 2: Příklad výrobků s obsahem kmenů druhu *Lactobacillus acidophilus*

Kmen	Obchodní název	Výrobek	Účinek	Výrobce
<i>L. acidophilus</i> NK ₁	Acilactum [®]	Lék	Normalizace střevní, ústní, vaginální mikroflóry	Lanopharm , Rusko [24]
<i>L. acidophilus</i> DSM 4149	Hylak [®] forte	Lék	Stimulace regeneraci fyziologické flóry	Merckle, GmbH, Německo [25]
<i>L. acidophilus</i> , D-75/D-76	Vitaflor [®]	Doplněk stravy	Prevence primární a sekundární poruchy mikrobiální rovnováhy	Gos Nii, Rusko [26]
<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> LA- 5	<i>Bifiform</i> [®]	Lék	Normalizace střevní flóry	Ferrosan, Dánsko [27]

2.9.2 Druh *Lactobacillus casei*

Laktobacily uvedeného druhu jsou přítomné v ústní dutině, pochvě, tenkém a tlustém střevě jako součástí přirozené mikroflóry GI traktu. Bakterie druhu *Lactobacillus casei* jsou schopné měnit složení a metabolickou aktivitu střevní mikroflóry zvýšením počtu bifidobakterií a snížením aktivity β -glukuronidazy. [28] V Tabulce 3 jsou popsány výrobky s obsahem kmenů rodu *Lactobacillus casei*.

Tabulka 3: Příklad výrobků s obsahem kmenů druhu *Lactobacillus casei*

Kmen	Obchodní název	Výrobek	Účinek	Výrobce
<i>L. casei</i> DN- 11400	Actimel	Kysaný výrobek	Celková podpora imunity	Danone, Francie [28]
<i>L. casei</i> Shirota	Yakult	Kysaný výrobek	Udržování střevní flóry	Yakult Honsha Co., Ltd, Japonsko [28]
<i>L. casei</i> F19	Cultura	Kysaný výrobek	Udržování střevní flóry	Arla Foods, Dánsko [28]

2.9.3 Druh *Lactobacillus plantarum*

Bakterie druhu *Lactobacillus plantarum* lze nalézt v ústní dutině a trávicím traktu savců. Je prokázán zdravotně prospěšný účinek *Lactobacillus plantarum* při syndromu dráždivého tračníku díky produkci antimikrobiálních látek. [29] V Tabulce 4 jsou popsány výrobky s obsahem *L. plantarum*.

Tabulka 4: Příklad výrobků s obsahem *L. plantarum*

Kmen	Obchodní název	Výrobek	Účinek	Výrobce
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	Laktobakterin	Lék	Antagonistický účinek proti patogenním bakteriím	Microgen, Rusko [30]
<i>L. plantarum</i> 299V	GoodBelly	Ovocný napoj	Udržování střevní flóry	NextFoods Probi, USA [29]
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	Florin forte	Lék	Normalizace činnosti trávicího traktu,	Partner, Rusko [29]

Kromě účinku na imunitní systém, byla také prokázána schopnost *L. plantarum* produkovat aminokyselinu lysin. Z nejnovějších výzkumů se ukázalo, že použití *L. plantarum* je velmi účinné v prevenci alergií na sóju. Výzkumníci z Univerzity Illinois, Urbana-Champaign, USA v roce 2008 provedli dvě studie s fermentovanými sójovými semeny a sojovou moukou pomocí různých mikroorganismů. Kvašené a nekvašené sójové výrobky byly zavedeny do krevní plazmy lidí alergických na sóju. Výrobky fermentované druhem *L. plantarum* vykazovali největší snížením intenzity reakce na sójové produkty. [31]

2.9.4 Druh *Lactobacillus rhamnosus*

Stejně jako výše uvedené druhy rodu *Lactobacillus* mají i *L. rhamnosus* máji zdravotně prospěšné vlastnosti pro hostitele, a to zejména proti patogenům střevních a močových cest. *L. rhamnosus* je také používán jako přírodní konzervační látka v produktech na jogurtové bázi. [32] V Tabulce 5 jsou popsány výrobky s obsahem *L. rhamnosus*

Tabulka 5: Příklad výrobků s obsahem *L. rhamnosus*

Kmen	Obchodní název	Výrobek	Účinek	Výrobce
<i>L. rhamnosus</i> LB21	Vifit	Kysaný výrobek	Celková podpora imunity	Valio, Finsko [32]
<i>L. rhamnosus</i> LCR35	Linex Imunno®	Doplňek stravy	Normalizace střevní flory	Sandoz, Slovinsko [33]
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	Vagilak	Doplňek stravy	Zvýšení počtu laktobacilů a normalizace vaginální flory u žen	Hr. Hansen A/S, Dánsko [32]

2.10 Identifikace bakterií mléčného kvašení

BMK ve výrobcích se prokazují kultivací na vhodných médiích anebo novými molekulárně-genetickými metodami. [34]

2.10.1 Kultivační metody

Kultivace se provádí na Petriho miskách na vhodném médiu s nutrienty za určitých podmínek (teploty, tlaku, aerobně nebo anaerobně). Pozoruje se čistota kultur, zbarvení, tvar, počet kolonií. Po kultivaci je třeba mikroskopicky zkoumat morfologii buněk. Dále se stanovuje aktivita enzymů hydrolyzujících škrob, kasein, želatinu apod. a také produkce indolových barviv, redukce nitrátů, deaminace fenylalaninu, utilizace citrátu. Avšak kultivační metody jsou časově a ekonomicky náročné a neumožňují účinně rozlišit jednotlivé druhy. [34]

2.10.2 Nekultivační metody

Identifikace BMK je možné provést molekulárně-genetickými metodami, založenými na principu analýzy DNA. Mezi tyto metody patří nejvíce využívaná polymerázová řetězová reakce. [34]

2.11 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda „*in vitro*“, používaná pro amplifikaci určitého úseku DNA. Od zavedení v roce 1983 americkým biochemikem Kary B. Mullisem, se metoda stala významným nástrojem pro detekci cílových sekvence nukleových kyselin. [35]

2.11.1 Princip PCR

Princip polymerázové řetězové reakce založen na cyklicky se opakující syntéze řetězců určitého úseku DNA pomocí enzymu DNA-polymeráza. Směr syntézy je 5'→3'. Vybraný úsek jednořetězcové DNA je z obou konců ohraničen připojením primerů. Syntézu nového řetězce v protisměru zabezpečuje termostabilní DNA-polymeráza, izolovaná z termofilních mikroorganismů např. *Thermus aquaticus*. [35]

2.11.2 Komponenty PCR směsi

PCR reakční pufr je směs kationtů a aniontů o určité koncentraci, která zajišťuje prostředí s vhodným pH a iontovou silou pro optimální aktivitu DNA polymerázy. Vzhledem k požadavkům různých DNA polymeráz jsou reakční pufrы obvykle dodávány s DNA polymerázou. Mnohé reakční pufrы, které jsou dodávány spolu s DNA polymerázou obsahují chlorid hořečnatý (MgCl₂). Takový reakční pufr se nazývá kompletní. [36]

Ionty Mg²⁺ jsou nezbytné jako kofaktor pro činnost DNA polymerázy. Koncentrace Mg²⁺ musí být často optimalizovaná pro každou kombinaci primerů a DNA-templát. [36]

Voda pro doplnění PCR směsi do požadovaného objemu musí být bez specifických iontů, organických látek a bakterií. [37]

2'-deoxynukleosid -5'-trifosfáty (dNTP) - (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)-stavební jednotky pro syntézu nové DNA. Optimální koncentrace je 200 μM.

DNA-polymeráza musí být termostabilní, aby zůstala funkční za vysokých teplot. Nejčastěji se používá *Taq* DNA 18 polymeráza (katalytická aktivita 75°C-80°C), vysoce termostabilní DNA polymeráza z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. [37]

Primery jsou uměle syntetizované oligonukleotidy, mají zpravidla velikost 15 až 30 nukleotidů. Hrají klíčovou roli při amplifikaci DNA matrice. [35] Dobře zvolené primery zaručují specifickou a citlivost testovacího systému a musí splňovat řadu kritérií:

- Obsah G+C 40 - 60%
- Rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry
- Teplota tání primerů aspoň 50 °C, podobná u obou primerů
- Specifická primery-na matricové DNA nesmí být nespecifická vazebná místa
- Absence vnitřních sekundárních struktur
- Zařazení 1. a 2. G nebo C v sekvenci na 3'- koncích primeru pro zajištění přesné vazby na matrice. [35]

DNA templát (matrice) je makromolekula DNA, podle které se komplementárně syntetizují nové řetězce DNA. [35]

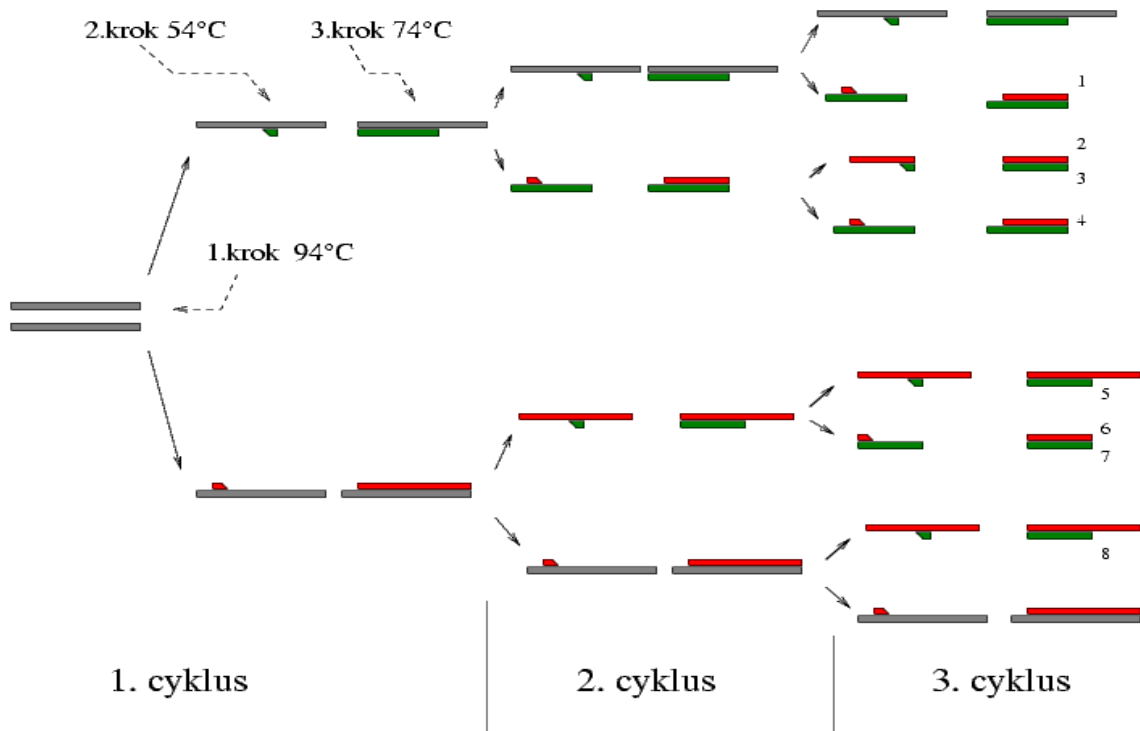
2.11.3 Průběh PCR

PCR je třístupňový proces, který zahrnuje:

- Denaturace-přechod dvouřetězové molekuly DNA matrice do jednořetězové formy rozrušením vodíkových můstků mezi komplementárními páry bázi za působení vysokých teplot (94°C).
- Hybridizace-připojení primerů k odděleným řetězcům DNA za teploty 50 - 65°C. Primery svým nasednutím ohraničí úsek DNA podle pravidla Chargaffa.
- Elongace-syntéza nových řetězců DNA od 3. konce primeru ve směru 5'-3' katalyzovaná *Taq*-polymerázou za optimální teploty 67-74°C

Postupným cyklickým opakováním těchto tří kroků se exponenciálně syntetizuje až 10^9 kopií úseku DNA ohraničeného primery. Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci DNA matrice a obvykle se pohybuje v rozmezí od 25-35 cyklů. [37] PCR probíhá v přístroji označovaném jako thermocykler. Syntéza nových vláken je znázorněna na Obrázku 4.

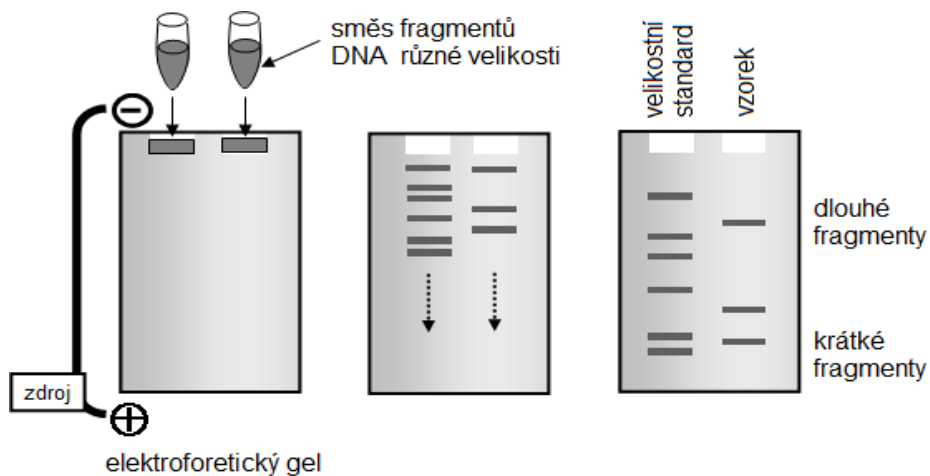
Obrázek 4. Namnožení DNA pomocí PCR [38]



2.12 Horizontální gelová elektroforéza DNA

Nejběžnější metoda detekce PCR produktu je agarózová gelová elektroforéza, která je používána pro rozdělení nukleových kyselin. Rozdělení makromolekul závisí na dvou proměnných: náboj a hmotnost. [39] Síla tření materiálu, tvořícího gel, působí jako síto a rozděluje fragmenty podle velikosti viz Obrázek 5.

Obrázek 5: Gelová elektroforéza DNA [39]



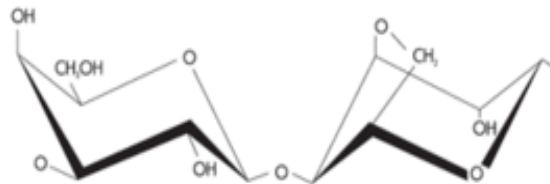
Při elektroforéze se molekuly pohybují skrze póry v gelu a rychlost jejich pohybu závisí na:

- síle elektrického pole

- velikosti a tvaru molekuly
- koncentraci agarózy v gelu [40]

Agaróza je přírodní lineární polysacharid, který tvoří opakující se jednotka-agarobióza viz Obrázek 6. Izoluje se z mořských řas. [40]

Obrázek 6: Struktura agarózy [41]



Pomocí hřebenu se v gelu vytvarují jamky, do kterých se pipetuje směs produktu amplifikace a nanášecího pufru. Gel se umístí do vány pro horizontální gelovou elektroforézu a připojí se zdroj napětí. Záporně nabitě molekuly DNA se pohybují od katody k anodě (kladně nabitá elektroda). Elektroforéza probíhá do momentu, až běh dosáhne 3/4 délky gelu. [42]

Po skončení elektroforézy, se gel umístí do roztoku fluorescenčního barviva. Molekuly barviva se zabudují do struktury DNA produktů PCR a fluoreskují při UV světle (305 nm). [42]

2.13 Bioinformatika

Na začátku 70. let, nizozemští biochemici Ben Hesper a Pauline Hogeweg začali používat termín "bioinformatika" pro označení "studium informačních procesů v biologických systémech". [43]

Širší definice popisuje bioinformatiku jako vědu na rozhraní informatiky a biologie. Hlavní oblastí zájmu bioinformatiky je vyhledávání informací v databázích, srovnávání sekvencí nukleových kyselin a proteinů, vyhledávání genů, funkční genomika, klasifikace proteinů a proteomika, fylogenetické studie a srovnávací genomika. [44]

2.13.1 Bioinformatické databáze

Bioinformatická databáze je sběr dat, který je k dispozici ve formě sekvencí a struktury proteinů (stavební kameny organismů) a nukleových kyselin (informačního nosiče). Databáze musí být organizována tak, aby její obsah byl aktualizován a vždy k dispozici pro uživatele. [45]

Databáze obecně lze rozdělit na primární a sekundární. Primární databáze obsahuje informace o sekvenci nebo struktuře samotného proteinu či DNA. Příklady těchto zahrnují trojici vzájemně propojených databází, která spojují americkou GenBank, evropskou EMBL (European Molecular Biology Laboratory), a japonskou DDBJ (DNA Data Bank of Japan) a proteinové databáze Uniprot a NCBI nr. Sekundární databáze obsahuje informace analýz z primárních databází. [45]

Orientace v databázích je umožněna existencí jednotných identifikačních čísel, která jsou sdílena všemi třemi hlavními databázemi. Po zařazení do databáze získává každý záznam přístupový kód a následně číslo GI (GenBank Identifier). [45]

Nukleotidové sekvence můžeme pomocí počítačových analýz dále zpracovávat pomocí vhodného softwaru. Software k podobným analýzám je volně přístupný na Internetu např. Primer-BLAST. [44]

2.13.2 Primer-BLAST

Nový softwarový nástroj Primer-BLAST byl vyvinut s cílem zmírnit obtíže při navrhování cílových specifických primerů. Tento software kombinuje program BLAST s celkovým algoritmem pro zajištění harmonizaci systému primer-cílové sekvence. Primer-BLAST je dostatečně citlivý při detekci značného počtu nesouladu s primery a také umožňuje navrhovat nové cílové specifické primery v jednom kroku, stejně jako kontrolovat specifičnost již existujících primerů. Na Obrázku 7 je uvedena úvodní stránka softwaru Primer-BLAST. [46]

Obrázek 7: Primer-BLAST software [47]

The screenshot displays the Primer-BLAST web interface. At the top, the title bar reads "Primer-BLAST" and "A tool for finding specific primers". Below this, a navigation bar includes links for "Reset page", "Save search parameters", "Retrieve recent results", "Publication", and "Tips for finding specific primers". The main content area is divided into two sections: "PCR Template" and "Primer Parameters".

The "PCR Template" section contains a text input field for "Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)" with a "Clear" button. To the right, there is a "Range" section with "Forward primer" and "Reverse primer" labels, each followed by "From" and "To" input fields and a "Clear" button. Below the text input field, there is a button for "Or, upload FASTA file" and a file selection button labeled "Выберите файл" (Choose file) with the status "Файл не выбран" (File not selected).

The "Primer Parameters" section includes several input fields and labels: "Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)" with a "Clear" button, "Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)" with a "Clear" button, "PCR product size" with "Min" (70) and "Max" (1000) input fields, "# of primers to return" with a value of 10, and "Primer melting temperatures (T_m)" with "Min" (57.0), "Opt" (60.0), "Max" (63.0), and "Max T_m difference" (3) input fields.

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo analyzovat probiotické výrobky (doplňky stravy) z hlediska přítomnosti probiotických bakterií rodu *Lactobacillus* pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR). K tomu bylo potřebně provést:

- Izolace DNA ze 4 probiotických doplňků stravy v kvalitě vhodné pro PCR
 - Rodová (rod *Lactobacillus*) a druhová identifikace laktobacilů deklarovaných ve výrobcích (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*)
 - Amplifikace a průkaz přítomnosti genů kódujících probiotické a další vlastnosti (*bsh*, *lai* a genu *odc*)

4 EXPERIMENTALNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Výrobky

V praktické části diplomové prací byly analyzované vzorky DNA izolované z potravinových doplňků uvedených na Obrázků 8 - 11. Výrobky byly zakoupeny v obchodní síti.

Obrázek 8: **Biopron 9 Premium**



Název	Výrobce	Druhy	Přídavné látky
Biopron 9 Premium	Valosum, ČR	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. platarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. lactis ssp. Lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Želatina, oxid titaničitý

Obrázek 9: **Lactobacillus acidophilus**



Název	Výrobce	Druhy	Přídavné látky
Lactobacillus acidophilus	Mediate s.r.o., Libchany, CR	<i>L. acidophilus</i>	Bramborový škrob, inulin, stearan horečnatý, želatina

Obrázek 10: Linex Forte



Název	Výrobce	Druhy	Přídavné látky
Linex Forte	Pharmaceuticals, Ljubljana, Slovinsko	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. animalis subsp. lactis</i>	Dextróza, mikrokrytalická celulóza, bramborový škrob, stearan horečnatý, inulin

Obrázek 11: Pangamin Bifi Plus



Název	Výrobce	Druhy	Přídavné látky
Pangamin Bifi Plus	Pivovar Staropramen, Praha, CR	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , laktobacily	Puckový olej, B1, B2, B6, kyselina pantothenová, kyselina pangamová, niacin, biotin, cholin, Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn

4.1.2 DNA kontrolních bakteriálních kmenů

DNA kontrolních kmenů byla izolována z čistých kultur fenolovou extrakcí. DNA byla získána od doc. RNDr. Aleny Španové, CSc. (VUT v Brně, Fakulta chemická)

- *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833T
- *Lactobacillus casei* CCM 4798
- *Lactobacillus casei* LOCK 919
- *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1823T
- *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 908
- *Lactobacillus plantarum* CCM 7039

4.1.3 Přístroje a pomůcky

- Laboratorní váhy B0430 (Ohaus, USA)
- Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Německo)
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10, 20, 200 a 1000 µl (PZ HTL, Polsko)
- Termostat-Mini incubator (Labnet, USA)
- NanoPhotometerTM (Implen, Německo)
- Mikrovlnná trouba SMW 5020 (SENCOR, ČR)
- Thermocykler PTC-200 (BIO-RAD Lab., USA)

Obrázek 12: Thermocykler PTC-200 (zpracováno autorkou)



- Zdroj elektrického napětí a zařízení pro elektroforézu Lighting Volt Power Supply, model OSP 300 (Owl Scientific, USA)

Obrázek 13: Zdroj elektrického napětí a zařízení pro elektroforézu (zpracováno autorkou)



- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, USA)

Obrázek 14: Transiluminátor TVR 3121 (zpracováno autorkou)



- Digitální fotoaparát Demage Z5 (Konica Minolta, USA)
- Běžné laboratorní sklo, umělohmotný materiál a běžné laboratorní pomůcky

4.2 Chemikálie

4.2.1 Chemikálie pro lyzi bakteriálních buněk

- EDTA (Serva, SRN)
- Lysozym (Reanal, Maďarsko)
- Proteináza K (Sigma, USA)
- SDS (Sigma, USA)
- Tris-base (Amresco, USA)

4.2.2 Chemikálie pro fenolovou extrakci DNA a sražení DNA etanolem

- Fenol (Lachema, ČR)

- Chloroform (Lachema, ČR)
- Isoamylkohol (Lachema, ČR)
- Octan sodný (Lachema, ČR)
- Ethanol (Lachema, ČR)
- Tris-base (Amresco, USA)
- EDTA (Serva, SRN)

4.2.3 Komponenty pro přípravu směsí pro PCR

- Voda pro injekce ČSL 4 (Top-Bio, ČR)
- 10 x koncentrovaný Blue pufr (Top-Bio, ČR)
- 750 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 1% Tween 20, 25 mM MgCl₂
- dNTP směs (10 mM) (Top - Bio, ČR)
- 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP a 10 mM dTTP
- *Taq*-DNA polymeráza 1.1 (1U/μl) (Top - Bio, ČR)
- Oligonukleotidové primery (10 pmol/μl) (Generi-Biotech, ČR).

4.2.4 Chemikálie pro agarózovou gelovou elektroforézu

- Tris base (Amresco, USA)
- Kyselina boritá (merci, ČR)
- EDTA (Serva, SRN)
- Agarosa (Top - Bio, ČR)
- Ethidium bromid (Sigma, CR)
- DNA standard (100 bp žebříček) (Malamite, ČR)
- Nanášecí pufr (Top - Bio, ČR)

4.2.5 Primery pro jednotlivé PCR

Sekvence použitých druhově specifických primerů jsou uvedené v Tabulce 6, Tabulce 7, Tabulce 8.

Tabulka 6: Specifické primery pro jednotlivé PCR

PCR	N	Primer	Sekvence (5' - 3')	Velikost PCR produktu bp
Doména <i>Bacteria</i> [48]	1	F-eub	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	466
	2	R-eub	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	
Rod <i>Lactobacillus</i> [49]	1	LbLMA 1rev	CTCAAAACTAAACAAAGTTTC	250
	2	R16-1	CTTGTACACACCGCCCGTCA	
Druh <i>L. acidophilus</i> [50]	1	Aci 16SI	TCC AAG GAA GCG AAG GAT	750
	2	Aci 16SII	CTC TTC TCG GTC GCT CTA	
Druh <i>L. rhamnosus</i> [51]	1	PrI	CAGACTGAAAGTCTGACGG	200-400
	2	RhaII	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	
Druh <i>L. plantarum</i> [51]	1	PlanI	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	300
	2	PlanII	TTACCTAACGGTAAATGCGA	
Druh <i>L. casei/paracasei</i> [51]	1	PrI	CAGACTGAAAGTCTGACGG	300
	2	CasII	GCGATGCGAATTTCTTTTTC	

Tabulka 7: Nově navržené primery pro druhovou PCR [52]

Druh	Primer	Sekvence (5' - 3')	T _m (°C)	Délka bp	Velikost PCR produktu bp
<i>L. casei/paracasei</i> [52]	Cas/ParFW	TGC ACC GAG ATT CAA CAT GG	60	20	682
<i>L. plantarum</i> [52]	PlanFW	CTG AGA GTA ACT GTT CAG GTA T	62	22	277
<i>L. rhamnosus</i> [52]	RhamFW	TTG CAT CTT GAT TTA ATT TTG AAC	60	24	683
<i>L. acidophilus</i> [52]	AciFW	AAG CAG ATC GCA TGA TCA GC	60	20	565
Rod <i>Lbc</i> [52]	UniverRV	TTC GCC ACT GGT GTT CTT CC	62	20	-

Tabulka 8: Specifické primery pro detekci genů kódujících probiotické vlastnosti

PCR	Druh	N	Primer	Sekvence primerů (5' - 3')	Velikost produktu bp
Bsh-gen	<i>L. plantarum</i> [53]	1	LpBSHF1	ATG TGT ACT GCC ATA ACT TAT	975
		2	LpBSHR1	TTA GTT AAC TGC ATA GTA TTG	
	<i>L. casei</i> [52]	1	LcBSHFW	TAA AGG CGA GGA GTT TGT GA	283
		2	LcBSHRV	TCA GAC TGA CAT AAT TGC GC	
Lai-gen	<i>L. acidophilus</i> [54]	1	LaLIF4	AGG CGT GGA CAA GAA ATC TG	1378
		2	LaLIR4	ATC ACG ACG AGG CAT GAA G	
	<i>L. plantarum</i> [52]	1	LpLIFW	GTA TGA TAT TGC CCG CTT GA	1050
		2	LpLIRV	ATT TCC TTT TCC TTG TCC TTA	
Odc-gen	<i>L. rhamnosus</i> [52]	1	LrODFW	CCATGCTGATGAAACCTACT	1274
		2	LrODRV	CCGTTGGAATGTTGTTGGTC	

4.3 Roztoky

4.3.1 Lyze bakteriálních buněk

- **Roztok proteinázy K (10 mg/ml)**

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

- **Roztok 20% SDS**

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

- **Lyzační pufr A**

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

- **Lyzační roztok B**

Do lyzačního roztoku B byl přidán lysozym na výslednou koncentraci 3 mg/ml.

4.3.2 Extrakce DNA

- **Fenol**

Destilovaný fenol, pH upraveno na 7,8.

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

Směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1.

4.3.3 Srážení DNA etanolem

- **96% etanol pro UV spektrofotometrie**

- **3 M octan sodný**

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

- **TE pufr**

Sterilně byl smíchán 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98,8 ml destilované vody.

4.3.4 Agarózová gelová elektroforéza

- **TBE pufr (5x koncentrovaný)**

54 g Tris-HCl, 27,5 g H₃BO₃, 20 ml EDTA (0,5 M; pH 8) byly smíchány a doplněny destilovanou vodou na objem menší než 1 litr. Pomocí 1 M NaOH pH roztoku upraví se na hodnotu 8,0. Roztok poté se doplní na 1 litr. Před použitím byl roztok sterilizován v autoklávu (20 min při 121 °C) a následně zředěn destilovanou vodou 10x.

- **Agarózový gel (1, 5 %)**

Navážka 0,75 g agarozy byla rozpuštěna v 50 ml 0,5 x koncentrovaného TBE pufru.

- **Ethidium bromid (0,5 µg/ml)**

Barvicí lázeň se připraví přidáním 100 µl do zásobního roztoku

- **Nanášecí pufr (koncentrovaný 6 x)**

Roztok nanášecího pufru se smíchá s produkty PCR v poměru 1:5.

- **DNA standard**

DNA standard 100 bp žebříček obsahuje fragmenty DNA délky 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp.

4.4 Metody

Metody převzaté ze skript “Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie” doc. RNDr. Aleny Španové, CSc., doc. Ing. Bohuslava Ritticha, CSc.

4.4.1 Lyze bakteriálních buněk

1. Z každého výrobku byla sterilně odebrána 1 kapsle.
2. Obsah kapsle byl vysypán do zkumavky Eppendorf.
3. Tableta byla rozdrcena a vysypaná do zkumavky Eppendorf.
4. Do zkumavek bylo přidáno 1 ml lyzačního roztoku B (nejprve bylo přidáno 100 µl a promícháno, poté bylo přidáno 900 µl).
5. Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny.
6. Do vzniklé suspenze bylo přidáno 25 µl 20 % SDS a 10 µl proteinasy K (100 µg/ml).

7. Vzorky byly inkubovány při 55 °C do druhého dne.

4.4.2 Fenolová extrakce DNA

1. K lyzátu buněk (500 µl) byl přidán stejný objem fenolu.
2. Směs byla kývavým pohybem opatrně promíchávána po dobu 4 min.
3. Vzorky byly centrifugovány při 15000 ot/min po dobu 3 min.
4. Byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté Eppendorf zkumavky, ke které bylo přidáno 700 µl směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1).
5. Vzniklá směs byla opatrně promíchávána kývavým pohybem po dobu 4 min.
6. Vzorky byly centrifugovány při 15000 ot/min po dobu 3 min.
7. Vodní fáze s DNA byla odebrána do čisté Eppendorf zkumavky.

4.4.3 Srážení DNA etanolem

1. Ke každému vzorku DNA bylo přidáno 1/10 objemu 3 M octanu sodného a směs byla promíchána.
2. Byl přidán 800 µl 96 % etanolu p.a. a obsah byl promíchán.
3. DNA byla ponechána k vysrážení při -20°C po dobu 15 min.
4. Vzorky byly centrifugovány při 15000 ot/min po dobu 15 min, po centrifugaci byl supernatant opatrně slit.
5. Sediment DNA byl vysušen v exikátoru po dobu asi 15 min.
6. Získaná DNA byla rozpuštěna v 200 µl TE pufru.
7. Takto připravená DNA byla použita pro spektrofotometrické měření, pro kontrolu intaktnosti na gelu.

4.4.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

1. Pro měření byl používán spektrofotometr NanoPhotometer™.
2. Jako slepý vzorek se použil TE pufr.
3. Měřila se absorbance v rozmezí vlnových délek 220-320 nm.
4. Z obrazovky přístroje byly odečteny hodnoty koncentrací.

4.4.5 Kontrola intaktnosti DNA

1. DNA izolovaná ze vzorku byla pomocí TE pufru zředěna na cca 10 ng/µl.
2. DNA kontrolních kmenů byla následně zředěna na 10 ng/µl.

3. 30 μl DNA bylo smícháno s 6 μl nanášecího pufru.
4. Vzorčky byly nanesené na 0,8% agarozový gel.
5. Po skončení eLéktroforézy byla detekovaná DNA na transiluminátoru v UV světle.

4.4.6 Doménově specifická PCR

Pro PCR byly použité primery specifické pro doménu *Bacteria*, které jsou uvedeny v Tabulce 6. Jednotlivé komponenty PCR byly důkladně smíchány v objemech, uvedených v Tabulce 9. Reakce probíhala podle programu DOMBAC v Tabulce 10.

Tabulka 9: Složení směsi pro PCR pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*

Komponenta	Objem (μl)
Voda pro PCR	19,0
Reakční pufr kompletní	2,5
Směs dNTP (10 mM)	0,5
Primer 1 (10 pmol/ μl)	0,5
Primer 2 (10 pmol/ μl)	0,5
<i>Taq</i> DNA-polymerasa 1.1 (1U/ μl)	1,0
Matričná DNA	1,0

Tabulka 10: Program DOMBAC použitý pro doménovou specifickou PCR

Krok	Teplota ($^{\circ}\text{C}$)	Čas (min)	Opakování
1.	95	5	
2.	95	0,5	30-krát
3.	55	0,5	
4.	72	0,5	
5.	72	10	

4.4.7 Rodově specifická PCR

Pro PCR byly použité primery specifické pro rod *Lactobacillus*, které jsou uvedeny v Tabulce 6. Jednotlivé komponenty PCR byly důkladně smíchány v objemech, uvedených v Tabulce 9. Reakce probíhala podle programu LBCROD v Tabulce 11.

Tabulka 11: Program LBCROD použitý pro rodově specifickou PCR

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Opakování
1.	95	5	
2.	95	0,5	30-krát
3.	55	0,5	
4.	72	0,5	
5.	72	0,5	

4.4.8 Optimalizace podmínek pro rodově specifickou PCR

Pro optimalizaci PCR pro rod *Lactobacillus* byla použita DNA o koncentraci cca 10 ng/μl a primery specifické pro rod *Lactobacillus* viz Tabulka 6. Jednotlivé komponenty PCR byly důkladně smíchány v objemech, uvedených v Tabulce 12. Reakce probíhala podle programu LBCROD v Tabulce 11.

Tabulka 12: Složení směsi pro PCR na rod *Lactobacillus* při optimalizaci podmínek amplifikace

	1 experiment	2 experiment
Komponenta	Objem (μl)	Objem (μl)
Voda pro PCR	18,0	17,0
Reakční pufr kompletní	2,5	2,5
MgCl ₂ (50mM)	1	2
Směs dNTP (10 mM)	0,5	0,5
Primer 1 (10 pmol/μl)	0,5	0,5
Primer 2 (10 pmol/μl)	0,5	0,5
<i>Taq</i> DNA-polymeráza 1.1 (1U/μl)	1,0	1,0

Matričná DNA	1,0	1,0
--------------	-----	-----

4.4.9 Druhově specifické PCR

Pro identifikaci druhů rodu *Lactobacillus* byly použité primery o sekvencích uvedených v Tabulce 6. Jednotlivé komponenty PCR byly důkladně smíchány v objemech, uvedených v Tabulce 13. Reakce probíhali podle programu v Tabulce 14:

Tabulka 13: Složení směsí v [μl] pro druhově specifické PCR

Komponenta PCR	Objem (μl)/ druh			
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei/paracasei</i>	<i>L. rhamnosus</i>
PCR voda	18,5	15,5	15,5	15,5
PCR pufr kompletní	2,5	2,5	2,5	2,5
dNTP (10 mM)	1	1	1	1
MgCl ₂ (50mM)	-	2	2	2
Primer 1 (10 pmol/μl)	0,5	1	1	1
Primer 2 (10 pmol/μl)	0,5	1	1	1
DNA polymeráza (1U/μl)	1	1	1	1
Matričná DNA (10 ng/μl)	2	1	1	1

Tabulka 14: Seznam nastavených programu pro druhově specifické PCR

Krok	ACIDO	LBPLANT	LBCCAS	LBCRHA
1	95°C/5 min	95°C/5 min	95°C/5 min	95°C/5 min
2	95°C/0,5 min	95°C/0,5 min	95°C/0,5 min	95°C/0,5 min
3	58°C/0,5 min	55°C/0,5 min	55°C/0,5 min	58°C/0,5 min
4	72°C/1min	72°C/1 min	72°C/1 min	72°C/1min
5	30x krok 2-5	30x krok 2-5	30x krok 2-5	30x krok 2-5
6	72°C/5 min	72°C/5 min	72°C/5 min	72°C/5 min
7	10°C	10°C	10°C	10°C

Program ACIDO pro *L. acidophilus*

Program LBPLANT pro *L. plantarum*

Program LBCCAS pro *L. casei*

Program LBCRHA pro *L. rhamnosus*

4.4.10 Bioinformatická analýza primerů

Byla provedena bioinformatická analýza použitých primerů o sekvenci viz Tabulka 6. Pro ověření homologie byl použit program Primer-BLAST [46] a byly ověřené:

- Primery navržené pro druh *L. casei*
- Primery navržené pro druh *L. plantarum*
- Primery navržené pro druh *L. rhamnosus*
- Primery navržené pro druh *L. acidophilus*

4.4.11 Druhovú identifikace pomocí nove navržených primerů

Pro druhové zařazení bakterií rodu *Lactobacillus* byly použité nově navržené primery komplementární k sekvenci genu pro 16S rRNA. Sekvence použitých primerů uvedené v Tabulce 7. Jednotlivé komponenty PCR byly důkladně smíchány v objemech, uvedených v Tabulce 15. Reakce probíhaly podle programu v Tabulce 16:

Tabulka 15: Složení směsí v [μl] pro druhově specifické PCR pomocí nově navržených primerů [52]

Komponenta PCR	Objem (μl)/ druh			
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei/paracasei</i>	<i>L. rhamnosus</i>
PCR voda	18	18	18	18
PCR pufr kompletní	2,5	2,5	2,5	2,5
dNTP (10 mM)	0,5	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂ (50mM)	-	-	-	-
Primer 1 (10 pmol/μl)	0,5	0,5	0,5	0,5
Primer 2 (10 pmol/μl)	0,5	0,5	0,5	0,5
DNA polymeráza (1U/μl)	1	1	1	1
Matričná DNA (10 ng/μl)	1	1	1	1

Tabulka 16: Seznam nastavených programů pro druhově specifické PCR pomocí nově navržených primerů [52]

Krok	ACIDOI	LBPLANTI	LBCCASI	LBCRHAI
1	94°C/5 min	94°C/5 min	94°C/5 min	94°C/5 min
2	94°C/1 min	94°C/1 min	94°C/1 min	94°C/1 min
3	58°C/1 min	62°C/1 min	55°C/1 min	58°C/1 min
4	72°C/2min	72°C/2min	72°C/2min	72°C/2min
5	28x krok 2	28x krok 2	28x krok 2	28x krok 2
6	72°C/10 min	72°C/10 min	72°C/10 min	72°C/10 min
7	10°C	10°C	10°C	10°C

Program ACIDOI pro identifikace *L. acidophilus*

Program LBPLANTI pro identifikace *L. plantarum*

Program LBCCASI pro identifikace *L. casei*

Program LBCRHAI pro identifikace *L. rhamnosus*

4.4.12 Bioinformatická analýza genů kódujících probiotické a další vlastnosti

Výše uvedené kmeny rodu *Lactobacillus* byly testovány na přítomnost genů *bsh*, *lai* a *odc*, které kódují probiotické a další vlastnosti pomocí NCBI.

4.4.13 Vyhledávání genu kódující probiotické a další vlastnosti

Pro detekci genů kódující probiotické vlastnosti u vybraných druhů rodu *Lactobacillus* byly použité primery o sekvence uvedené v Tabulce 8. Jednotlivé komponenty PCR byly důkladně smíchány v objemech, uvedených v Tabulce 17. Reakce probíhaly podle programů v Tabulce 18.

Tabulka 17: Složení směsí v [μl] pro identifikaci genů kódujících probiotické a další vlastnosti za použitím navržených primerů. [52]

Komponenta PCR	Objem (μl)/ gen				
	<i>bsh</i>		<i>lai</i>		<i>odc</i>
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>
PCR voda	18	18	18	18	18
PCR pufr kompletní	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
dNTP (10 mM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂ (50mM)	-	-	-	-	-
Primer 1 (10 pmol/μl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Primer 2 (10 pmol/μl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
DNA polymeráza (1U/μl)	1	1	1	1	1
Matričná DNA (10 ng/μl)	1	1	1	1	1

Tabulka 18: Programy pro identifikaci genů kódujících probiotické a další vlastnosti pomocí nově navržených primerů [52]

Krok	PLANTI	CAS	PLANTII	ACIDOI	RHAMI
1	94°C/5 min	94°C/5 min	94°C/5 min	94°C/5 min	94°C/5 min
2	94°C/1 min	94°C/1 min	94°C/1 min	94°C/1 min	94°C/1 min
3	54°C/1 min	58°C/1 min	56°C/1 min	60°C/1 min	58°C/1 min
4	72°C/2min	72°C/2min	72°C/2min	72°C/2min	72°C/2min
5	28x krok 2	28x krok 2	28x krok 2	28x krok 2	28x krok 2
6	72°C/10 min	72°C/10 min	72°C/10 min	72°C/10 min	72°C/10 min

7	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C
---	------	------	------	------	------

Program PLANTI pro identifikace genu *bsh* pro druh *L. plantarum*

Program CAS pro identifikace genu *bsh* pro druh *L. casei*

Program PLANTII pro identifikace genu *lai* pro druh *L. plantarum*

Program ACIDOI pro identifikace genu *lai* pro druh *L. acidophilus*

Program RHAMI pro identifikace genu *odc* pro druh *L. rhamnosus*

4.4.14 Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy

1. Pro detekce doménově specifických PCR produktů byl připraven 1,5 % agarózový gel.
2. Pro detekci rodově a druhově specifických PCR produktů vzniklých po amplifikaci PCR směsi byl připraven 1,2 % agarózový gel.
3. V Eppendorf zkumavkách bylo smícháno 25 μ l PCR produktu a 5 μ l nanášecího pufru.
4. Připravené směsi, kontrolní vzorky a 5 μ l 100 bp DNA standard o velikosti 100 bp byly nanášeny do komůrek gelu.
5. Gely byly následně vloženy do elektroforetické vany a zality 0,5 x koncentrovaným TBE pufrem (3 cm od horního okraje vání).
6. Elektroforéza byla spuštěna pod napětím 80 V.
7. Jakmile nanášecí pufr doputoval do 2/3 délky gelu, elektroforéza byla ukončena (asi 2,5 hodiny).
8. Po skončení elektroforézy byly vloženy gely do lázně s ethidium bromidem (0,5 μ g/ml).
9. Po půlhodině byly barvené gely opláchnuté vodou a byly pozorovány na transiluminátoru v UV světle a dokumentovány.

5 VÝSLEDKY

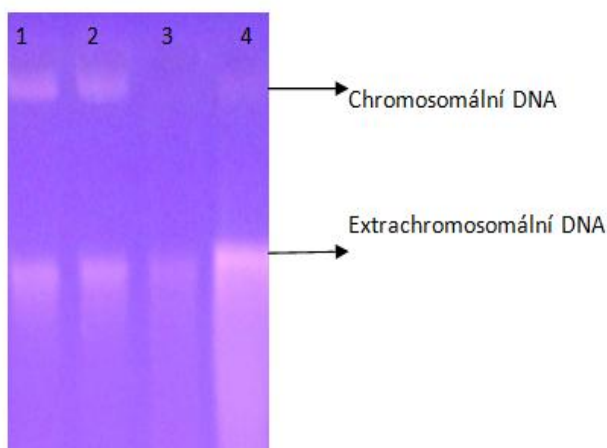
5.1 Příprava hrubých lyzátů buněk z výrobků

Z 1 kapsle výrobků viz Obrázky 8-11 byly připraveny hrubé lyzáty buněk podle postupu v podkapitole 4.4.1.

5.2 Izolace DNA fenolovou extrakce

Z lyzátů byla izolována DNA metodou fenolové extrakce a srážena etanolem viz podkapitola 4.4.2-4.4.3. Pomocí agarózové gelové elektroforézy na 0,8 % gelu byla ověřena izolovaná DNA a její relativní intaktnost. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 15.

Obrázek 15: Agarózová gelová elektroforéza vysokomolekulární chromosomální DNA izolované z potravinových doplňků



Běh č.	DNA výrobku	Detekce DNA	Nanesené množství na gel (μl)
1	Pangamin Bifi Plus	+	30
2	Biopron 9 Premium	+	30
3	Linex Forte	+	30
4	Lactobacillus acidophilus	+	30

+DNA byla detegována;- DNA nebyla detegována

- Ve všech vzorcích byla detegována DNA.
- Vedle chromosomální DNA byla detegována extrachromosomální DNA.

5.3 DNA pro PCR

5.3.1 Spektrometrické stanovení koncentrace DNA

Na přístroji Nanodrop 2000 byla změřena absorbance vzorkované DNA v rozmezí vlnových délek 220 - 320 nm a stanovena koncentrace DNA vzorku, která uvedena v Tabulce 19.

Tabulka 19: Hodnoty koncentrace DNA stanovené spektrofotometricky

Výrobky	DNA	
	c [ng/μl]	A 260/280
Lactobacillus acidophilus	248,0	1,91
Biopron 9 Premium	818,3	1,70
Pangamin Bifi plus	1051,2	1,77
Linex Forte	1223,3	1,99

- DNA byla izolovaná v množství 248 ng až 1223ng/μl, což je dostačující pro následující PCR. Hodnoty A260/A280 byly od 1,72 do 1,99.

5.3.2 Ředění DNA pro PCR

Pro PCR byla DNA ředěna na koncentraci asi 10 ng/μl. Koncentrace DNA po ředění je uvedena v Tabulce 20.

Tabulka 20: Hodnoty koncentrace DNA zředěné pro PCR

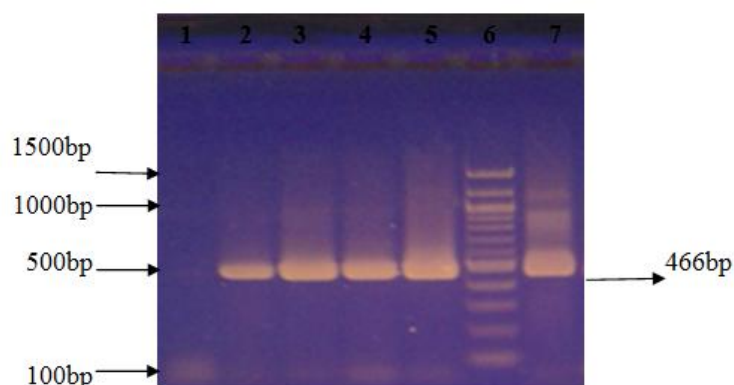
DNA výrobku	c [ng/μl]	A 260/280
Linex Forte	8,9	1,98
Lactobacillus acidophilus	9,6	1,89
Pangamin Bifi plus	12,1	1,8
Biopron 9 Premium	10,3	1,70

- Pro PCR byla DNA naředěna na koncentrace 8,9 až 12,1 ng/μl.

5.4 Doménově specifická PCR

S cílem ověřit amplifikovatelnost izolovaných DNA byla provedena PCR specifická pro doménu *Bacteria*. Amplifikace probíhala pomocí primerů F-eub, R-eub viz Tabulka 6 a dle programu uvedeného v Tabulce 14. Jako pozitivní kontrola se použil DNA kmene *L. acidophilus* CCM 4833T o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR na 1,8 % gelu jsou uvedeny na Obrázku 16.

Obrázek 16: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 466 bp specifických pro doménu *Bacteria*



Běh č.	DNA výrobku	Detekce produktů PCR
1	NK	-
2	Pangamin Bifi Plus	+
3	Biopron 9 Premium	+
4	Linex Forte	+
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+
6	Standard 100 bp	
7	PK	+

PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

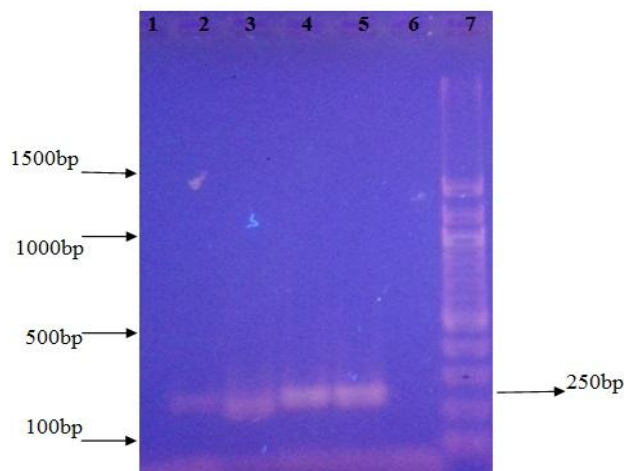
+ produkt PCR byl detekován,- produkt PCR nebyl detekován

- Přítomnost produktu PCR specifického pro doménu *Bacteria* o velikosti 466 bp byla detekována po amplifikaci DNA ze všech testovaných výrobků.
- Ve všech vzorcích byla prokázána přítomnost bakteriální DNA.

5.5 Rodově specifická PCR

S cílem prokázat přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* byla provedena rodově specifická PCR. Pro PCR na rod *Lactobacillus* byly použity primery R16-1 a LbLMA1-rev viz Tabulka 6. Amplifikace probíhala podle programu uvedeného v Tabulce 11. Jako pozitivní kontrola se použila DNA kmene *L. acidophilus* CCM 4833T o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR na 1,5 % gelu jsou uvedeny na Obrázku 17.

Obrázek 17: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti asi 250 bp specifických pro rod *Lactobacillus*



Běh č.	DNA výrobku	Detekce produktů PCR
1	NK	-
2	PK	+
3	Biopron 9 Premium	+
4	Linex Forte	+
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+
6	Pangamin Bifi Plus	-
7	Standard 100 bp	

PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

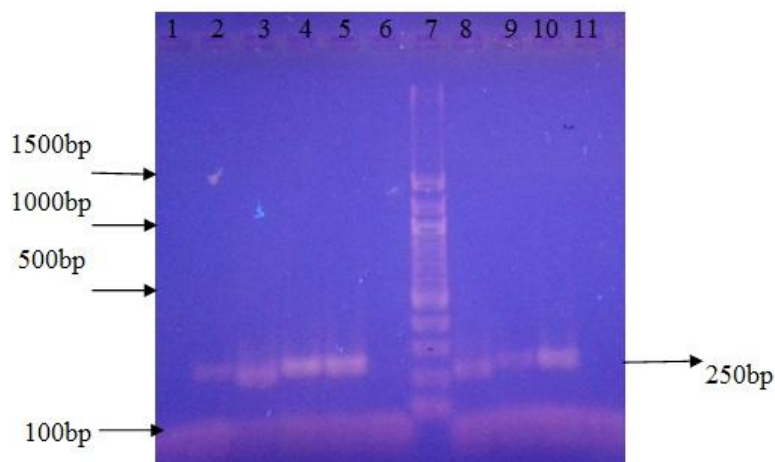
+ produkt PCR byl detekován, - produkt PCR nebyl detekován

- Po amplifikaci DNA z 3 výrobků: Biopron 9 Premium, Linex Forte, *Lactobacillus acidophilus* byl detekován produkt PCR o velikosti asi 250 bp specifický pro rod *Lactobacillus*. Byla potvrzena přítomnost DNA bakterií rodu *Lactobacillus*.
- Po amplifikaci DNA izolované z výrobku Pangamin Bifi Plus nebyl detekován produkt PCR.

5.5.1 Optimalizace podmínek pro rodově specifickou PCR

S cílem ověřit přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* ve výrobku Pangamin Bifi Plus byly optimalizované podmínky PCR tím, že ke směsím pro PCR byl přidán 50 mM roztok $MgCl_2$ v množství 1 μl a 2 μl a byl testován větší počet cyklů PCR (35 cyklu). Jako pozitivní kontrola se použila DNA kmene *L. acidophilus* CCM 4833T o koncentraci 10 ng/ μl . Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR na 1,5 % gelu jsou uvedeny na Obrázku 18.

Obrázek 18: Gelová elektroforéza PCR produktů o velikosti asi 250 bp specifických pro rod *Lactobacillus*



Běh č.	DNA výrobku	Přídavek MgCl ₂ [μl]	Detekce produktů PCR
1	NK	-	-
2	PK	-	+
3	Biopron 9 Premium	1	+
4	Linex Forte	1	+
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	+
6	Pangamin Bifi Plus	1	-
7	Standard 100 bp		
8	Biopron 9 Premium	2	+
9	Linex Forte	2	+
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	+
11	Pangamin Bifi Plus	2	-

PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

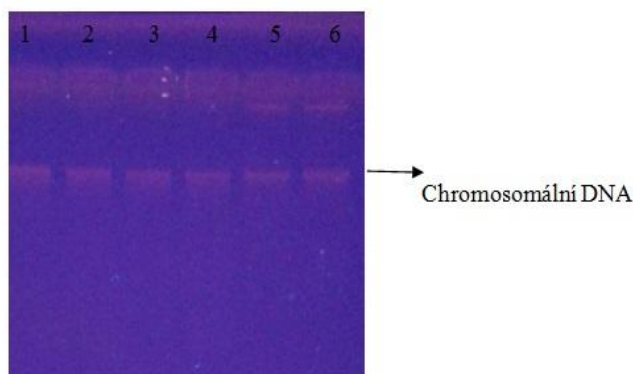
+ produkt PCR byl detegován, - produkt PCR nebyl detegován

- Přidání MgCl₂ neovlivňovalo intenzitu produktů PCR.
- Nebyl detekován produkt PCR po amplifikaci DNA izolované z výrobku Pangamin Bifi Plus.

5.6 Druhově specifická PCR

DNA izolovaná z 3 výrobků byla amplifikovatelná s primery specifickými pro druhy uvedené výrobcem. Použité primery byly převzaty z literatury. Jako kontrola byly použité DNA izolované ze sbírkových kmenů. Pomocí agarózové gelové elektroforézy na 0,8 % gelu byla nejprve ověřena intaktnost DNA sbírkových kmenů vybraných jako pozitivní kontroly dle kapitoly 4.1.2. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 19.

Obrázek 19: Agarózová gelová elektroforéza DNA kmenů vybraných za pozitivní kontrolu



Běh č.	DNA testovaného kmene	Detekce DNA
1	<i>L. plantarum</i> RL26	+
2	<i>L. plantarum</i> CCM7039T	+
3	<i>L. casei/paracasei</i> CCM7089	+
4	<i>L. casei</i> LOCK919	+
5	<i>L. acidophilus</i> CCM4833T	+
6	<i>L. rhamnosus</i> CCM1825T	+

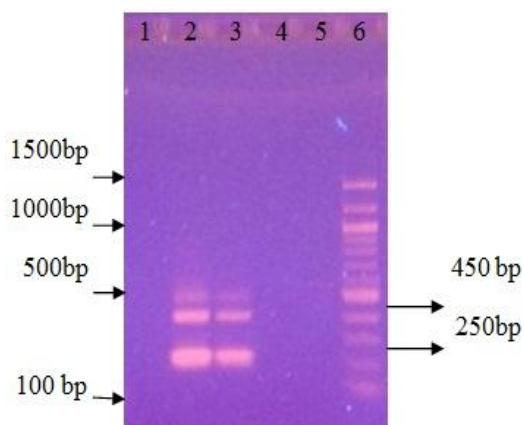
+DNA byla detegována, - DNA nebyla detegována

- DNA kontrolních kmenů byla relativně intaktní, vhodná pro PCR.

5.6.1 Druhově specifická PCR pro druh *L. casei*

S cílem prokázat přítomnost bakterií druhu *L. casei* byla provedena specifická PCR za použití primerů PrI a CasII viz Tabulka 6. Amplifikace probíhala podle programu uvedeného v Tabulce 17. Jako pozitivní kontrola se použil DNA kmene *L. casei* CCM7089 o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR na 1,2% gelu jsou uvedeny na Obrázku 20.

Obrázek 20: Gelová elektroforéza PCR produktů o velikosti asi 250 a 450 bp specifických pro druh *L. casei*



Běh č.	DNA výrobku	Detekce produktů PCR
1	NK	-
2	PK	+
3	Biopron 9 Premium	+
4	Linex Forte	-
5	Lactobacillus acidophilus	-
6	Standard 100 bp	

PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

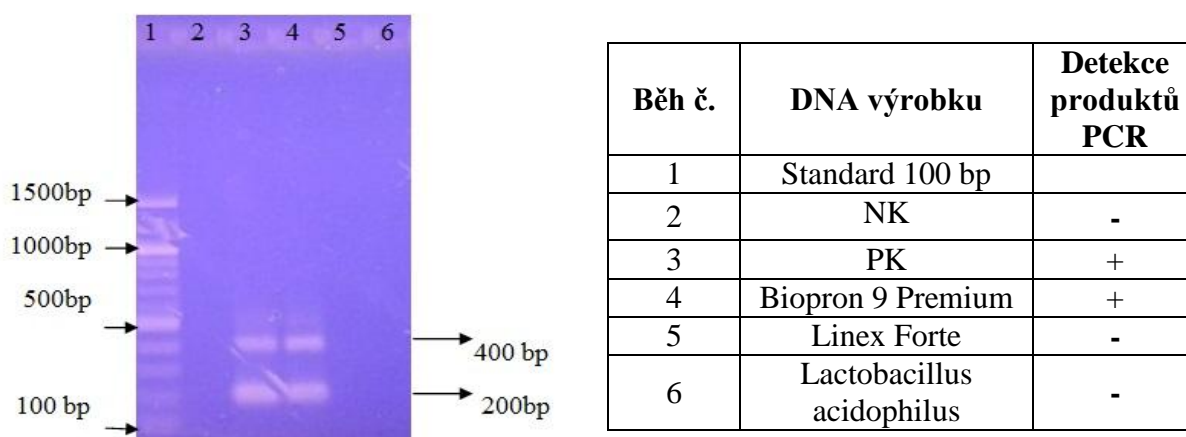
+PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

- Produkt PCR byl detekován po amplifikaci DNA z výrobku Biopron 9 Premium.
- Ve výrobku Biopron 9 Premium byla prokázána DNA druhu *L. casei*.

5.6.2 Druhově specifická PCR pro druh *L. rhamnosus*

Pro prokázání přítomnosti bakterií druhu *L. rhamnosus* byla provedena specifická PCR za použití primerů PrI a RhaII viz Tabulka 6. Amplifikace probíhala podle programu uvedeného v Tabulce 14. Jako pozitivní kontrola se použila DNA kmene *L. rhamnosus* CCM1825T o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agaróзовé gelové elektroforézy produktů PCR na 1,2% gelu jsou uvedeny na Obrázku 21.

Obrázek 21: Gelová elektroforéza PCR produktů velikosti asi 200 a 400 bp specifických pro druh *L. rhamnosus*



PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

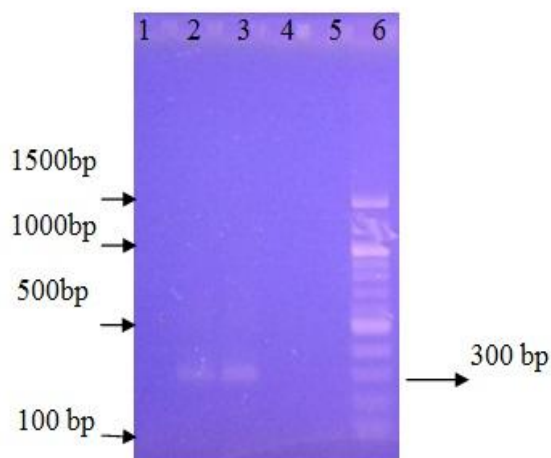
+PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

- Produkt PCR byl detekován po amplifikaci DNA z výrobku Biopron 9 Premium.
- Ve výrobku Biopron 9 Premium byla prokázána DNA druhu *L. rhamnosus*.

5.6.3 Druhově specifická PCR pro druh *L. plantarum*

S cílem prokázat přítomnost bakterií druh *L. plantarum* byla provedena specifická PCR za použití primerů PlanI a PlanII viz Tabulka 6. Amplifikace probíhala podle programu uvedeného v Tabulce 14. Jako pozitivní kontrola se použila DNA kmene *L. plantarum* CCM7039T o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agaróзовé gelové elektroforézy produktů PCR na 1,2% gelu jsou uvedeny na Obrázku 22.

Obrázek 22: Gelová elektroforéza PCR produktů o velikosti 300 bp specifických pro druh *L. plantarum*



Běh č.	DNA výrobku	Detekce produktů PCR
1	NK	-
2	PK	+
3	Biopron 9 Premium	+
4	Linex Forte	-
5	Lactobacillus acidophilus	-
6	Standard 100 bp	

PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

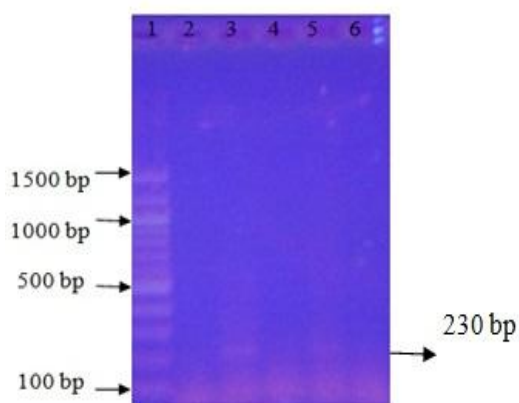
+PCR produkt byl detekován, - PCR produkt nebyl detekován

- Produkt PCR byl detekován po amplifikaci DNA z výrobku Biopron 9 Premium.
- Ve výrobku Biopron 9 Premium byla prokázána DNA druhu *L. plantarum*.

5.6.4 Druhově specifická PCR pro druh *L. acidophilus*

S cílem prokázat přítomnost bakterií druhu *L. acidophilus* byla provedena specifická PCR za použití primerů Aci16SI a Aci16II viz Tabulka 6. Amplifikace probíhala podle programu uvedeného v Tabulce 14. Jako pozitivní kontrola se použila DNA kmene *L. acidophilus* CCM4833T o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agaróзовé gelové elektroforézy produktů PCR na 1,2% gelu jsou uvedeny na Obrázku 23.

Obrázek 23: Gelová elektroforéza PCR produktů o velikosti asi 230 bp nespecifických pro druh *L. acidophilus*



Běh č.	DNA výrobku	Detekce produktů PCR
1	Standard 100 bp	
2	NK	-
3	PK	+/-
4	Biopron 9 Premium	-
5	Linex Forte	+/-
6	Lactobacillus acidophilus	-

PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

+ PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

+/- detegce produktu PCR ve velmi slabé intenzitě

- Místo předpokládaných produktů PCR o velikosti 750 bp po amplifikaci DNA pozitivní kontroly a DNA izolované z Linex Forte byly detegovány nespecifické produkty PCR o velikosti asi 230 bp ve velmi slabé intenzitě.
- Nebyly prokázány po amplifikaci DNA z výrobků Biopron í Premium a *Lactobacillus acidophilus*.

5.6.5 Bioinformatická analýza použitých primerů

Vzhledem k tomu, že nedošlo k amplifikaci DNA pomocí primerů Acil6SI a Acil6II, specifických pro druh *L. acidophilus*, byla provedena bioinformatická analýza použitých primerů. Sekvence byly zadané do serveru NCBI viz Tabulka 6. Pro ověření homologie byl použit program Primer-BLAST a byly ověřené:

- Primery navržené pro druh *L. casei*

Byla prokázána komplementárnost primerů PrI a CasII k genetickým sekvencím kmenů druhů *L. casei*, *L. paracasei*, k některým kmenům druhů *L. rhamnosus*, *L. curvatus*, *L. reuteri*, *L. pentosus* a *L. gasseri*.

- Primery navržené pro druh *L. rhamnosus*

Byla prokázána komplementárnost primerů PrI a RhaII k genetickým sekvencím kmenů druhů *L. rhamnosus*, k některým kmenům druhů *L. casei*, *L. paracasei* a nekultivovatelných laktobacilů.

- Primery navržené pro druh *L. plantarum*

Byla prokázána komplementárnost primerů PlanI a PlanII k genetickým sekvencím kmenů druhů *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, k některým kmenům druhů *L. brevis* a *L. japonicus*.

- Primery navržené pro druh *L. acidophilus*

Byla prokázána komplementárnost primerů Aci 16SI a Aci 16SII k genetickým sekvencím kmenů druhů *L. acidophilus*, k některým kmenům druhů *L. amylovorus*, *L. crispatus* a *L. delbrueckii*.

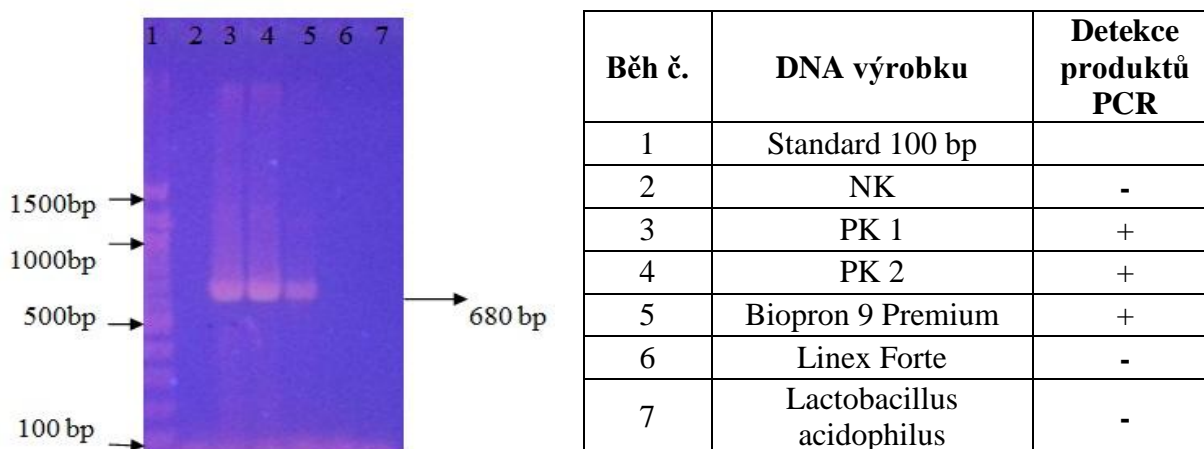
- Primery nejsou zcela specifické a nemusí být vhodné pro druhovou identifikaci.

5.7 Druhově specifické PCR s nově navrženými primery

5.7.1 Druhově specifická PCR pro druh *L. casei*

S cílem prokázat přítomnost bakterií druhu *L. casei* byla provedena specifická PCR za použití nově navržených primerů Cas/ParFW a UniverRV viz Tabulka 7. Amplifikace probíhala podle programu uvedeného v Tabulce 16. Jako pozitivní kontrola se použila DNA kmenů *L. casei* CCM7089 (PK 1) a *L. casei* LOCK919 (PK 2) o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR na 1,2% gelu jsou uvedeny na Obrázku 24.

Obrázek 24: Gelová elektroforéza PCR produktů o velikosti 680 bp specifických pro druh *L. casei*



PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

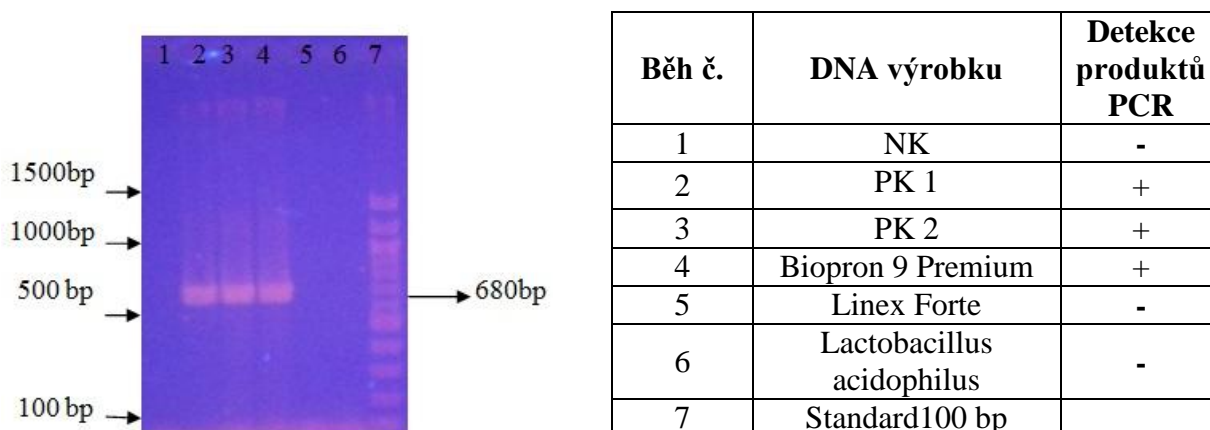
+PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

- Produkt PCR byl detegován po amplifikaci DNA z výrobku Biopron 9 Premium.
- Ve výrobku Biopron 9 Premium byla prokázána DNA druhu *L. casei*.

5.7.2 Druhově specifická PCR pro druh *L. rhamnosus*

S cílem prokázat přítomnost bakterií druhu *L. rhamnosus* byla provedena specifická PCR za použití nově navržených primerů RhamFW a UniverRV viz Tabulka 7. Amplifikace probíhala podle programu uvedeného v Tabulce 16. Jako pozitivní kontrola se použily DNA kmene *L. rhamnosus* LOCK908 (PK 1) a *L. rhamnosus* CCM1825T (PK 2) o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR na 1,2% gelu jsou uvedeny na Obrázku 25.

Obrázek 25: Gelová elektroforéza PCR produktů o velikosti 680 bp specifických pro druh *L. rhamnosus*



PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

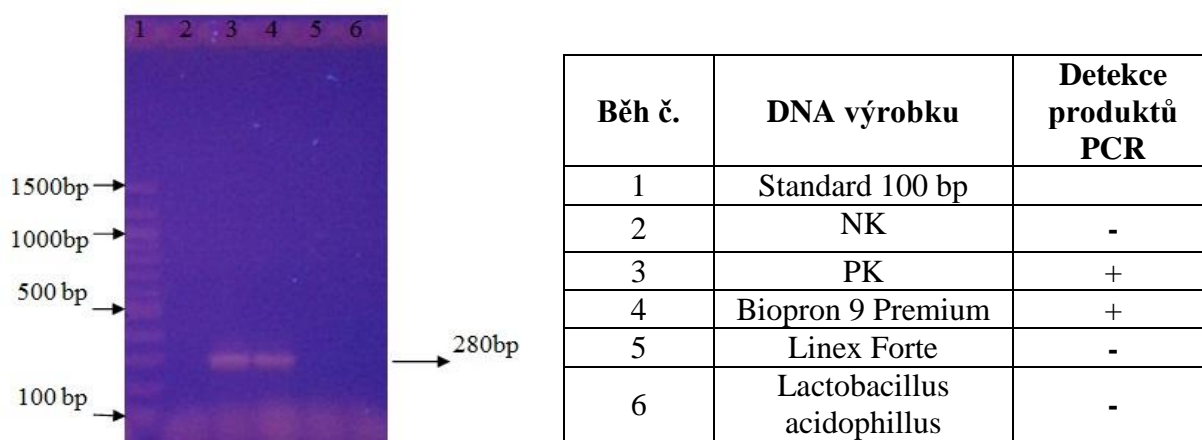
+PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

- Produkt PCR byl detegován po amplifikaci DNA z výrobku Biopron 9 Premium.
- Ve výrobku Biopron 9 Premium byla prokázána DNA druhu *L. Rhamnosus*.

5.7.3 Druhově specifická PCR pro druh *L. plantarum*

S cílem prokázat přítomnost bakterií druhu *L. plantarum* byla provedena specifická PCR za použití nově navržených primerů PlanFW a UniverRV viz Tabulka 7. Amplifikace probíhala podle programu uvedeného v Tabulce 16. Jako pozitivní kontrola se použila DNA kmene *L. plantarum* CCM7039T o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR na 1,2% gelu jsou uvedeny na Obrázku 26.

Obrázek 26: Gelová elektroforéza PCR produktů o velikosti 280 bp specifických pro druh *L. plantarum*



PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

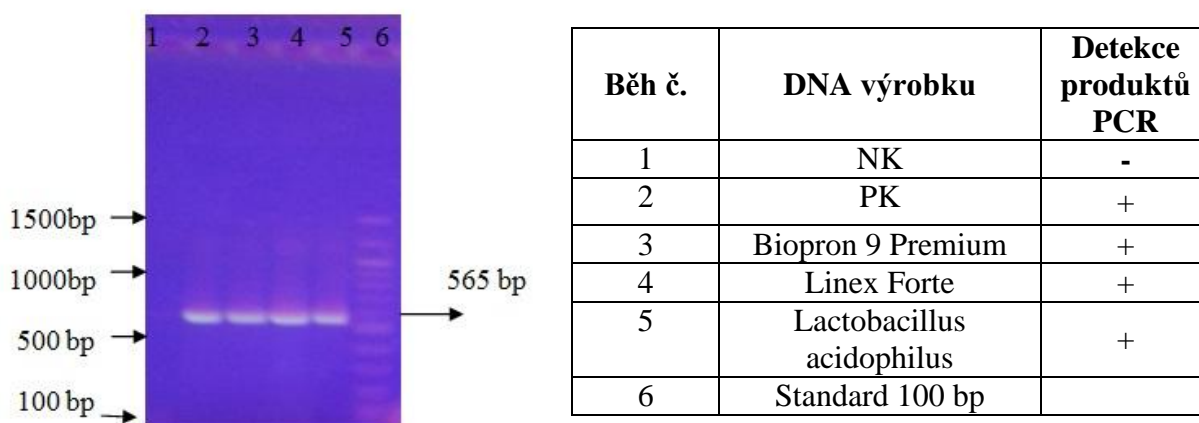
+ PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

- Produkt PCR byl detegován po amplifikaci DNA z výrobku Biopron 9 Premium.
- Ve výrobku Biopron 9 Premium byla prokázána DNA druhu *L. plantarum*

5.7.4 Druhově specifická PCR pro druh *L. acidophilus*

S cílem prokázat přítomnost bakterií druhu *L. acidophilus* byla provedena specifická PCR za použití nově navržených primerů AciFW a UniverRV viz Tabulka 7. Amplifikace probíhala podle programu uvedeného v Tabulce 16. Jako pozitivní kontrola se použila DNA kmene *L. acidophilus* CCM4833T o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agaróзовé gelové elektroforézy produktů PCR na 1,2% gelu jsou uvedeny na Obrázku 27.

Obrázek 27: Gelová elektroforéza PCR produktů o velikosti 565 bp specifických pro druh *L. acidophilus*



PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

+PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

- Produkt PCR byl detegován po amplifikaci DNA z 3 výrobků: Biopron 9 Premium, Linex Forte a Lactobacillus acidophilus.
- V 3 výrobcích byla prokázána DNA druhu *L. acidophilus*.

5.8 Využití PCR pro vyhledávání genů kódujících probiotické a další vlastnosti

5.8.1 Bioinformatická analýza genů kódujících probiotické a další vlastnosti

- **Gen pro Bsh-protein**

Zdroj NCBI prokázal gen pro Bsh-protein u bakteriálních druhů: *L. casei*, *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. acidophilus*, *L. brevis* a dalších bakterií. Přítomnost genu *bsh* se ověřovala pomocí primerů LpBSHF1 a

LpBSHR1, které jsou komplementární genu *bsh* *L. plantarum*. Sekvence primerů je uvedena v Tabulce 8. Další par navržených primerů o sekvenci uvedené v Tabulce 8 jsou primery LcBSHFW a LcBSHRV komplementární genu *bsh* druhu *L. casei*.

- **Gen pro Lai-protein**

Gen pro Lai byl nalezen pomocí serveru NCBI u bakteriálních druhů: *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. curvatus* a *L. sakei*. Přítomnost genu *lai* se ověřovala pomocí primerů LaLIF4 a LaLIR4, které jsou komplementární jen pro druh *L. acidophilus*. Další par navržených primerů o sekvenci uvedené v Tabulce 12 jsou LpLIFW a LpLIRV, které jsou komplementární genu *lai* druhu *L. plantarum*.

- **Gen pro Odc-protein**

Gen pro Odc byl nalezen pomocí serveru NCBI u bakteriálních druhů *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, a dalších bakterií. Přítomnost genu *odc* se ověřovala pomocí primerů LrODFW a LrODRV, které jsou komplementární jen pro druh *L. rhamnosus*.

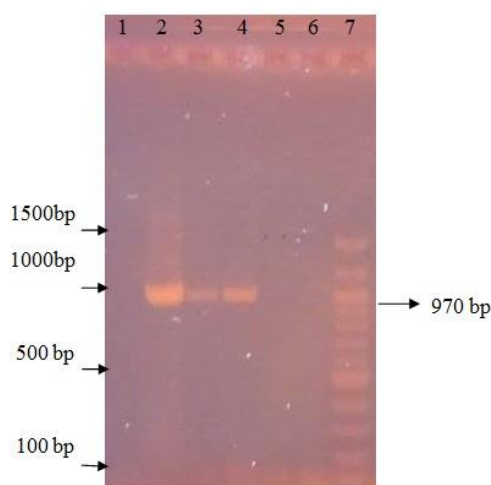
5.8.2 Vyhledávání genů kódujících Bsh-protein

Byly použité primery navrhnuté pro amplifikaci *bsh* genu *L. plantarum* a *bsh* genu *L. casei*. Pro amplifikaci byla použita DNA izolovaná z výrobků.

Druh *L. plantarum*

Pro detekci *bsh* genu byla provedena specifická PCR pomocí primerů LpBSHF1 a LpBSHR1 viz Tabulka 8. Amplifikace probíhala podle programu uvedeného v Tabulce 18. Jako pozitivní kontrola se použila DNA kmene *L. plantarum* RL26 (PK 1) a *L. plantarum* CCM7039T (PK 2) o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR na 1,2% gelu jsou uvedeny na Obrázku 28.

Obrázek 28: Gelová elektroforéza PCR produktů o velikosti 970 bp specifických pro *bsh* gen *L. plantarum*



Běh č.	DNA výrobku	Detekce produktů PCR
1	NK	-
2	PK (1)	+
3	PK (2)	+
4	Biopron	+
5	Linex Forte	-
6	Lactobacillus acidophilus	-
7	Standard100 bp	

PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

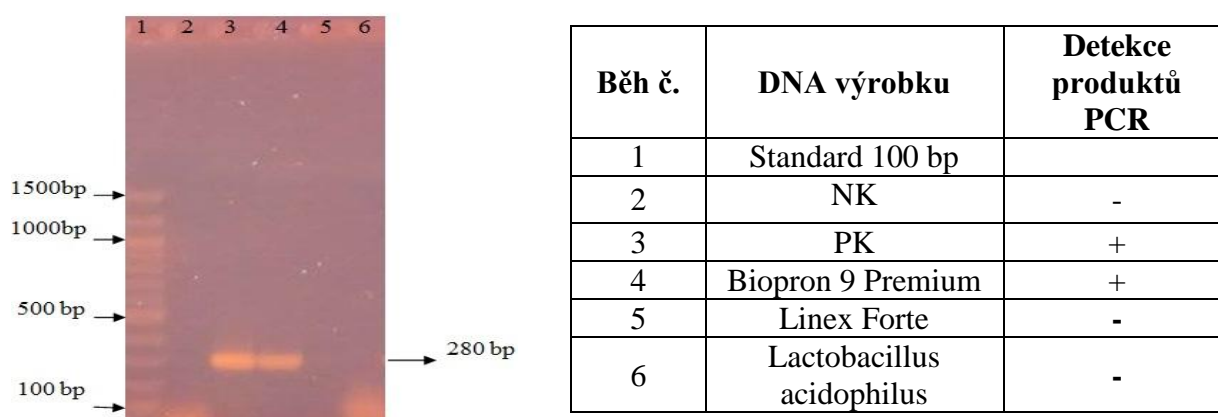
+PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

- Produkt PCR byl detegován po amplifikaci DNA z výrobku Biopron 9 Premium.
- Výrobek Biopron 9 Premium obsahuje *bsh* gen *L. plantarum*

Druh *L. casei*

Pro detekci genu *bsh* byla provedena specifická PCR pomocí primerů LcBSHFW a LcBSHRV viz Tabulka 8. Amplifikace probíhala podle programu uvedeného v Tabulce 18. Jako pozitivní kontrola se použila DNA kmene *L. casei* CCM7089 o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR na 1,2% gelu jsou uvedeny na Obrázku 29.

Obrázek 29: Gelová elektroforéza PCR produktů o velikosti 280 bp specifických pro gen *bsh* *L. casei*



PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

+ PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

- Produkt PCR byl detegován po amplifikaci DNA z výrobku Biopron 9 Premium.
- Výrobek Biopron 9 Premium obsahuje *bsh* gen *L. casei*.

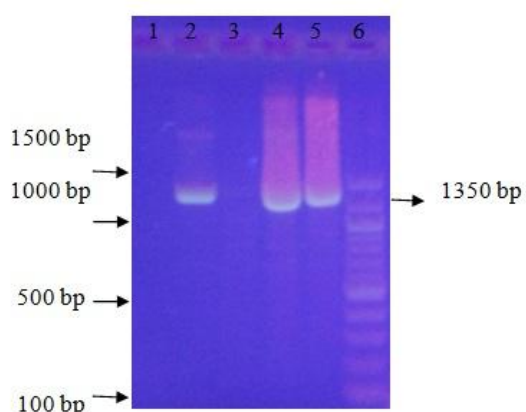
5.8.3 Vyhledávání genu kódujících Lai-protein

Byly použity primery navržené pro amplifikaci *lai* genu *L. acidophilus* a *lai* genu *L. plantarum*. Pro amplifikaci byla použita DNA izolovaná z výrobků.

Druh *L. acidophilus*

Pro detekci genu kódujícího Lai se použily primery LaLIF4a LaLIR4 o sekvenci viz Tabulka 8. Amplifikace probíhala podle program uvedených v Tabulce 18. Jako pozitivní kontrola se použila DNA kmene *L. acidophilus* CCM4833T o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR na 1,2% gelu jsou uvedeny na Obrázku 30.

Obrázek 30: Gelová elektroforéza PCR produktů o velikosti 1350 bp specifických pro druh *L. acidophilus*



Běh č.	DNA výrobku	Detekce produktů PCR
1	NK	-
2	PK	+
3	Biopron 9 Premium	-
4	Linex Forte	+
5	Lactobacillus acidophilus	+
6	Standard 100 bp	

PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

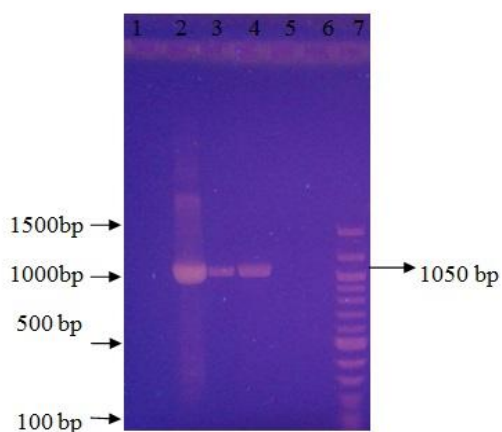
+ PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

- Produkt PCR byl detegován po amplifikaci DNA z výrobků Linex Forte a Lactobacillus acidophilus. Tyto výrobky obsahují *lai* gen *L. acidophilus*.
- Produkt PCR nebyl detegován po amplifikaci DNA z výrobku Biopron 9 Premium.

Druh *L. plantarum*

Pro detekci *lai* genu se použily primery LpLIFW a LpLIRV o sekvenci viz Tabulka 8. Amplifikace probíhala podle programu uvedenému v Tabulce 18. Jako pozitivní kontrola se použila DNA kmenů *L. plantarum* RL26 (PK 1) a *L. plantarum* CCM7039T (PK 2) o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agaróзовé gelové elektroforézy produktů PCR na 1,2% gelu jsou uvedeny na Obrázku 31.

Obrázek 31: Gelová elektroforéza PCR produktů o velikosti asi 1050 bp specifických pro druh *L. plantarum*



Běh č.	DNA kmene	Detekce produktů PCR
1	NK	-
2	PK 1	+
3	PK 2	+
4	Biopron 9 Premium	+
5	Linex Forte	-
6	Lactobacillus acidophilus	-
7	Standard 100 bp	

PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

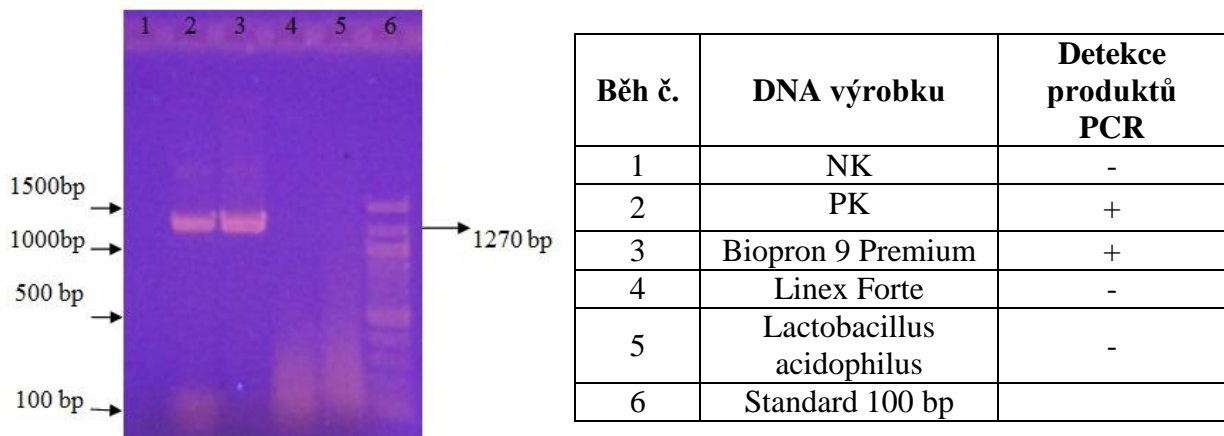
+PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

- Produkt PCR byl detegován po amplifikaci DNA z výrobku Biopron 9 Premium.
- Výrobek Biopron 9 Premium obsahuje *lai* gen *L. plantarum*.

5.8.4 Vyhledávání genu kódujícího Odc-protein

Pro detekci genu *odc* se použili primery LrODFW a LrODRV o sekvenci viz Tabulka 8. Amplifikace probíhala podle programu uvedenému v Tabulce 18. Jako pozitivní kontrola se použila DNA kmene *L. rhamnosus* CCM1825T o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR na 1,2% gelu jsou uvedeny na Obrázku 32.

Obrázek 32: Gelová elektroforéza PCR produktů o velikosti 1270 bp specifických pro druh *L. rhamnosus*



PK - pozitivní kontrola

NK - negativní kontrola

+PCR produkt byl detekován, - PCR produkt nebyl detegován

- Produkt PCR byl detekován po amplifikaci DNA z výrobku Biopron 9 Premium.
- Výrobek Biopron 9 Premium obsahuje *odc* gen *L. rhamnosus*.

5.9 Souhrn výsledků amplifikací

Souhrn výsledků amplifikaci DNA izolované ze 4 výrobků je uveden v Tabulce 19.

Tabulka 19: Souhrn výsledků provedených PCR

Výrobek	Doména	Rod	Druh				Druh				Gen <i>bsh</i>		Gen <i>lai</i>		Gen <i>odc</i>
			Primery viz Tabulka 6*				Primery viz Tabulka 7**				Primery viz Tabulka 8		Primery viz Tabulka 8		Primery viz Tabulka 8
	<i>Bacteria</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>
Linex Forte	+	+	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Bropron 9 Premium	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Lactobacillus acidophilus	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Pangain Bifi Plus	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ PCR produkt byl detegován, - PCR produkt nebyl detegován

+/- detegce produktu PCR ve velmi slabé intenzitě

*-primery převzaté z odborné literatury

**- nove navržené nepublikované primery

- Výrobky obsahují druhy rodu *Lactobacillus* deklarované výrobcí.
- Výrobky se liší přítomností genu *lai* *L. acidophilus*.
- Výrobky pravděpodobně obsahují 2 různé kmene *L. acidophilus*.

6 DISKUZE

6.1 Izolace DNA fenolovou extrakcí

DNA ze 4 různých potravinových doplňků různých výrobců byla izolována a purifikována metodou fenolové extrakce. Tato metoda se běžně používá pro extrakci DNA [55] a byla použita i pro extrakci DNA z různých výrobků analyzovaných v této práci. Po extrakci byla změřena koncentrace DNA v rozmezí vlnových délek 230 - 320 nm a stanovena koncentrace DNA. Byla v rozsahu 248 - 1223 ng/μl. Takový velký rozdíl v koncentraci se může vysvětlovat přítomnosti různého počtu buněk. Dalším důvodem může být různé složení bakteriální stěny u bakteriálních kmenů a tím i různá citlivost k lyzi (za daných experimentálních podmínek). Z poměru A260 nm/A280 nm byla stanovena čistota DNA. Tento rozsah hodnot absorbance je od 1,70 do 1,99, což ukazuje na relativně malé znečištění DNA bílkovinami. [37] DNA byla izolovaná v čistotě a koncentraci vhodné pro provedení PCR.

Po stanovení koncentrace byla DNA zředěna na 10 ng/μl a použita k následné PCR.

6.2 Doménově specifická PCR

Izolovaná DNA byla použita jako templát pro doménově specifickou PCR. DNA byla amplifikovaná pomocí primerů F-eub a R-eub specifických pro doménu *Bacteria* [48]. Po skončení PCR byl podle očekávání pomocí agaróзовé gelové elektroforézy detegován specifický produkt PCR o velikosti 466 bp. Tím byla prokázána přítomnost bakteriální DNA ve všech výrobcích. Zároveň byla potvrzena amplifikovatelnost izolované DNA a zařazení přítomných mikroorganismů do domény *Bacteria*.

6.3 Rodově specifická PCR

Pro zařazení přítomných mikroorganismů do rodu *Lactobacillus* byla provedena PCR s primery R16-1 a LbLMA1-rev [49]. Po provedení PCR byly prokázány amplikony specifické pro rod *Lactobacillus* o velikosti asi 250 bp v třech testovaných výrobcích: Biopron 9 Premium, *Lactobacillus acidophilus*, Linex Forte. V analyzovaném vzorku DNA z výrobku Pangamin Bifi Plus produkt PCR nebyl detegován. Může to být způsobeno nadbytkem buněk *S. cerevisiae* a nižším obsahem bakterií rodu *Lactobacillus*, které poté nebyly prokázány z důvodu nižší citlivosti použité metody PCR.

Amplifikace DNA izolovanou z výrobku Pangamin Bifi Plus bylo třeba optimalizovat.

6.3.1 Optimalizace podmínek pro rodově specifickou PCR

S cílem prokázat přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* byly testovány podmínky PCR přidáním 1 μl a 2 μl roztoku MgCl₂ a byl zvýšen počet cyklů PCR na 35. Po provedení PCR byly prokázány specifické produkty PCR o velikosti asi 250 bp pro rod *Lactobacillus* v třech testovaných výrobcích: Biopron 9 Premium, *Lactobacillus acidophilus*, Linex Forte. Přítomnost DNA bakterií rodu *Lactobacillus* se ve výrobku Pangamin Bifi Plus prokázat nepodařilo ani po přidání počtu cyklů. Zřejmě je příliš nízká koncentrace laktobacilů ve vzorku analyzované DNA. Proto následující druhově specifické identifikace se prováděly s 3 výrobky: Biopron 9 Premium, *Lactobacillus acidophilus*, Linex Forte.

6.4 Druhově specifické PCR

6.4.1 Druhově specifické PCR s primery převzatými z odborné literatury.

Každá druhově specifická PCR byla prováděna ve dvou odlišných reakcích s 2 různými sadami primerů.

Byly použity druhově specifické primery převzaté z odborné literatury. [50],[51]

PCR specifická pro druh *L. casei*

Pro prokázání přítomnosti laktobacilů druhu *L. casei* byly použité specifické primery PrI a CasII [51]. Po provedení PCR byl prokázán amplikon specifický pro druh *L. casei* silné intenzity o velikosti 290 bp v jednom testovaném výrobku: Biopron 9 Premium. Pomocí druhově specifické PCR byla prokázána přítomnost DNA bakterií druhu *L. casei*, jak bylo uvedené výrobcem, ve výrobku Biopron 9 Premium. Byla prokázána nepřítomnost *L. casei* ve výrobcích Lactobacillus acidophilus a Linex Forte v souladu s údaji deklarovanými na obalu.

PCR specifická pro druh *L. rhamnosus*

Za účelem prokázat přítomnost laktobacilů druhu *L. rhamnosus* byly použité specifické primery PrI a RhaII [51]. Po provedení PCR byl prokázán specifický produkt PCR o velikosti 260 bp v jednom testovaném výrobku: Biopron 9 Premium. Ve výrobcích Lactobacillus acidophilus a Linex Forte produkt PCR nebyl detegován. Pomocí druhově specifické PCR byla prokázána přítomnost DNA bakterií druhu *L. rhamnosus*, jak bylo uvedené výrobcem, ve výrobku Biopron 9 Premium. Nebyla prokázána přítomnost *L. rhamnosus* ve výrobcích Lactobacillus acidophilus a Linex Forte, jak bylo deklarováno na obalu.

PCR specifická pro druh *L. plantarum*

Pro průkaz bakterií druhu *L. plantarum* byly použité specifické primery PlanI a PlanII [51]. Po provedení PCR byl prokázán specifický produkt PCR ve velmi slabé intenzitě o velikosti 300 bp v jednom testovaném výrobku: Biopron 9 Premium. Ve výrobcích Lactobacillus acidophilus a Linex Forte produkt PCR nebyl detegován. Pomocí druhově specifické PCR byla prokázána přítomnost DNA bakterií druhu *L. plantarum*, jak bylo uvedené výrobcem, ve výrobku Biopron 9 Premium. Nebyla prokázána přítomnost *L. plantarum* ve výrobcích Lactobacillus acidophilus a Linex Forte a to v souladu s údaji na obalu.

PCR specifická pro druh *L. acidophilus*

Pomocí specifických primerů Aci16SI a Aci16SII [50] byla provedena PCR pro prokázání přítomnosti DNA druhu *L. acidophilus*. Po provedení PCR nebyl detegován produkt u žádného výrobku, respektive nespecifické kratší produkty PCR o velikosti asi 230 bp ve velmi slabé intenzitě. Přesto druh *L. acidophilus* byl deklarován u všech 3 výrobků.

6.4.2 Bioinformatická analýza primerů publikovaných v odborné literatuře

Vzhledem k tomu, že nedošlo k amplifikaci DNA u některých výrobků pomocí primerů Aci16SI a Aci16II [50], specifických pro druh *L. acidophilus*, byla provedena bioinformatická analýza použitých primerů pomocí serveru NCBI. Primery PrI a CasII [51]

navržené pro druh *L. casei* byly komplementární ke genetickým sekvencím kmenů druhů *L. casei*, *L. paracasei*, k některým kmenům druhů *L. rhamnosus*, *L. curvatus*, a k dalším. Primery PriI a RhaII [51] navržené pro druh *L. rhamnosus* byly komplementární ke genetickým sekvencím kmenů druhu *L. rhamnosus*, k některým kmenům druhů *L. casei*, *L. paracasei* a nekultivovatelným laktobacilům. Primery PlanI a PlanII [51] navržené pro druh *L. plantarum* byly komplementární též ke genetickým sekvencím kmenů druhu *L. paraplantarum*, k některým kmenům druhů *L. brevis* a *L. japonicus*. Primery Aci 16SI a Aci 16SII [50] navržené pro druh *L. acidophilus* byly komplementární také k některým kmenům druhů *L. amylovorus*, *L. crispatus* a *L. delbrueckii* a nebyly komplementární ke všem kmenům *L. acidophilus*. Tento problém byl řešen v diplomové práci [52].

6.5 Druhově specifické PCR s nově navrženými primery

Byly použité nově navržené, dosud nepublikované druhově specifické primery.

Druhově specifická PCR pro druh *L. casei*

Pro prokázání přítomnosti laktobacilů druhu *L. casei* byly použity primery ParFW a UniverRV [52]. Po provedení PCR byl prokázán produkt PCR o velikosti 680 bp v jednom testovaném výrobku: Biopron 9 Premium. Po amplifikaci DNA výrobků *Lactobacillus acidophilus* a Linex Forte produkt PCR nebyl detegován. Pomocí druhově specifické PCR byla prokázána přítomnost DNA bakterií druhu *L. casei*, jak bylo uvedené výrobcem, ve výrobku Biopron 9 Premium a nebyla prokázána přítomnost *L. casei* ve výrobcích *Lactobacillus acidophilus* a Linex Forte, což bylo to souladu s tím, co bylo deklarováno na obalu.

Druhově specifická PCR na druh *L. rhamnosus*

Pomocí nově navržených primerů RhamFW a UniverRV [52] byla provedena PCR pro prokázání přítomnosti druhu *L. rhamnosus*. Produkt PCR silné intenzity o velikosti 680 bp byl prokázán po amplifikaci DNA jen jednoho testovaného výrobku Biopron 9 Premium. Podařilo se prokázat deklarovaný druh *L. rhamnosus* ve výrobku Biopron 9 Premium, zatímco ve výrobcích Linex Forte a *Lactobacillus acidophilus*, kde druh nebyl deklarován, nebyla prokázána přítomnost zástupců *L. rhamnosus*.

Druhově specifická PCR na druh *L. plantarum*

Primery PlantFW a UniverRV [52] byly použité v PCR pro amplifikaci DNA druhu *L. plantarum*. Byl prokázán produkt PCR silné intenzity o velikosti 277 bp po amplifikaci jen jednoho testovaného výrobku Biopron 9 Premium. Bylo to v souladu s údaji výrobce, protože přítomnost *L. plantarum* byla deklarována na obalu výrobku. Ve výrobcích Linex Forte a *Lactobacillus acidophilus*, kde druh nebyl deklarován, druh nebyl prokázán.

Druhově specifická PCR na druh *L. acidophilus*

Pomocí nově navržených specifických primerů AciFW a UniverRV [52] byla provedena PCR pro prokázání přítomnosti druhu *L. acidophilus*. Po provedení PCR byl prokázán produkt

PCR o velikosti 565 bp po amplifikaci DNA izolované ze všech výrobků. Tím pádem lze říct, že výrobci deklarovaní zástupci druhu *L. acidophilus* jsou přítomní ve všech výrobcích.

6.6 Vyhledávání genů kódujících probiotické a další vlastnosti

Z literatury je známo, že co se týče probiotických vlastností, existují rozdíly mezi kmeny [53]. Proto byla další část práce věnována vyhledávání genů kódujících probiotické a další vlastnosti. K amplifikaci byly použity jak publikované tak nově navržené primery pro vyhledávání genu *bsh* (kódující hydrolázu soli žlučových kyselin), genu *lai* (kódující linoleát izomerazu) a genu *odc* (kódující ornitin dekarboxylázu). Bioinformatická analýza [52] dále ukázala, že sekvence DNA mají různé druhy odlišné, ač mají proteiny stejnou funkci a patří do stejné proteinové rodiny. Proto pro amplifikaci genů různých druhů bylo nutno navrhnout jiné primery. Průkaz přítomnosti daného genu je důležitý pro charakteristiku probiotického kmene. V dalších krocích bude nutno ověřit, že dochází k expresi tohoto genu a k syntéze požadovaného proteinu.

Gen *bsh* *L. plantarum*

Za použití primerů LpBSHF1 a LpBSHR1 [53], komplementárních k sekvenci druhu *L. plantarum*, se vyhledávaly *bsh* geny v DNA testovaných výrobků. Specifický produkt PCR o velikosti 975 bp byl detegován po amplifikaci DNA z výrobku Biopron 9 Premium. Lze říct, že ve výrobku Biopron 9 Premium, s buňkami druhu *L. plantarum*, byl prokázán gen *bsh*. Tím buňky *L. plantarum* splňují jedno základní probiotické kritérium zdravotní prospěšnosti.

Gen *bsh* *L. casei*

Navržené primery LcBSHF1 a LcBSHR1 [52], komplementární k sekvenci *bsh* genu druhu *L. casei*, se použily pro vyhledávání *bsh* genu u testovaných DNA výrobků. U výrobku Biopron 9 Premium byl detegován specifický produkt PCR o velikosti 280 bp. Ve výrobku Biopron 9 Premium byly prokázány buňky druhu *L. casei* s genem *bsh*. Tyto buňky splňují kritérium pro zdraví prospěšné účinky na organismus.

Gen *lai* *L. acidophilus*

Pomocí primerů LaLIF4 a LaLIR4 [54], komplementárních k sekvenci genu *lai* *L. acidophilus*, byla provedena PCR s DNA matricí ze všech testovaných výrobků. Po provedení PCR byl prokázán produkt PCR o velikosti 1380 bp po amplifikaci DNA výrobků *Lactobacillus acidophilus* a Linex Forte. Produkt PCR nebyl detegován u výrobku Biopron 9 Premium. Můžeme tím pádem říct, že kmeny druhu *L. acidophilus* mající gen *lai* jsou ve výrobcích *Lactobacillus acidophilus* a Linex Forte přítomné na rozdíl od výrobku Biopron 9 Premium. Výrobek Biopron 9 Premium zřejmě obsahuje jiný kmeny druhu *L. acidophilus*.

Gen *lai* *L. plantarum*

Specifický produkt PCR o velikosti 1050 bp byl detegován po amplifikaci DNA ve výrobku Biopron 9 Premium. Primery LpLIFW a LpLIRV [52] byly komplementární k sekvenci genu *lai* druhů *L. plantarum*. Detekce produktu ukazuje na přítomnost druhu *L. plantarum* s genem *lai*, který kóduje probiotickou vlastnost ve výrobku Biopron 9 Premium.

Gen *odc* *L. rhamnosus*

Pro prokázání přítomnosti kmene *L. rhamnosus*, obsahující gen *odc*, byly použité nově navržené specifické primery LrODRW a LrODRV [52]. Po provedení PCR byl prokázán produkt PCR o velikosti 1280 bp v testovaném výrobku: Biopron 9 Premium. V tomto výrobku druh *L. rhamnosus* byl prokázán druhově specifickou PCR. Výsledek ukazuje, že ve výrobku Biopron 9 Premium přítomný kmen druhu *L. rhamnosus*, který kóduje gen *odc*. Ornitin dekarboxyláza dekarboxyluje aminokyselinu ornitin za vzniku biogenního aminu putrescinu. Tato vlastnost nemusí být vždy prospěšná. [9] Záleží na hladině exprese příslušného genu.

7 ZÁVÉR

Byly připravené hrubé lyzáty buněk ze 4 výrobků doplňků potravy. Z hrubých lyzátů byla DNA izolována pomocí fenolové extrakce. Ve všech výrobcích byla pomocí PCR prokázána přítomnost bakteriální DNA. Pomocí dalších metod PCR byly ve 3 výrobcích identifikovány deklarované druhy bakterií rodu *Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*. Ve výrobcích byla také prokázána přítomnost probiotických genů: *bsh*, *lai* a dále genu *odc*. Výrobky pravděpodobně obsahují odlišné kmeny druhu *L. acidophilus*. Výrobky se liší přítomností genu *lai* *L. acidophilus*, který kóduje linoleát izomerazu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Горелов А. В., Усенко Д. В. / Использование пробиотических продуктов в лечении кишечных инфекций у детей / Вопросы современной педиатрии. 2003 (2); 4: s. 87–90
- [2] SAULNIER, M.A., D. Synbiotics: making the most of probiotics and prebiotics by their combinations? *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. Shinfield, UK, 2008, (4), s. 9-16. ISSN 978-0-86014-192-1.
- [3] MATTLA-SANDHOLM T., et al. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*. 2002, vol. 12, no. 3, s. 173-182. ISSN 0958-6946.
- [4] БЕРЕЗНЯКОВ, В.И. Прокариотические и эукариотические пробиотики. *Болезни и антибиотики*. 2012, ISSN 2307-1117. Dostupné z: <http://www.mif-ua.com/archive/article/34691>
- [5] ЯКОВЕНКО, Э. П., ЛАВРЕТЬЕВА С.А. Инновационные пробиотики – ключ к управлению функциями нормальной кишечной микрофлоры. *Лечащий врач*. 2012, vol. 97. ISSN 1560-5175. Dostupné z: <http://www.lvrach.ru/2012/07/15435468/>
- [6] POOJA S., JAYASHREE S., PUSHPANATHAN M. Identification and Characterization of Bile Salt Hydrolase Genes from the Genome of *Lactobacillus fermentum* MTCC 8711. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014,s. 855-866.
- [7] YANG, B., H. CHEN a Z. GU. Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 2014(117), 430-439.
- [8] OGAWA J., KISHINO S., ANDO A., SUGIMOTO S., MIHARA K., SHIMIZU S. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria, *J. Biosci. Bioeng*. 2005, s. 355–364
- [9] Spano G., Russo P., Lonvaud-Funel A., Lucas P., Alexandre H., Grandvalet C., Coton E., Coton M., and kol.(2010) Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*. 64, s. 95–100.
- [10] GUANER F., KHAN A G. Пробиотики и пребиотики. *Всемирная гастроэнтерологическая организация: Практические рекомендации*. 2008. Dostupné z: <http://www.belmapo.by/downloads/gastroenterology/2009/recomend/probiotiki.pdf>
- [11] Helping to understand probiotics: live or freeze-dried? single & multiple strains. Dostupné z: www.learnaboutprobiotics.org [online] [cit. 2016-04-21].
- [12] What is The Difference Between Taking Probiotics in Tablets, Capsules, Powder Sachets and Juices and Which Form is the best and most beneficial? In: *Probiotics 101* [<http://probiotics101.probacto.com/what-is-the-diff>]. [cit. 2016-04-26].
- [13] ROBERFOID, M. Prebiotics: The Concept Revisited. *British Journal of Nutrition*. 2007, s. 830-837. ISSN 1541-6100.

- [14] NEVORAL, J. aj. Probiotika, prebiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*, 2005, 6 (2) , s. 59-65
- [15] TODAR, Kenneth. *Lactic Acid Bacteria* [online], 1-5 [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: http://textbookofbacteriology.net/lactics_2.html.
- [16] WISSELINK, H.W., R.A. WEUSTHUIS a G. EGGINK. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*. 2002, (12), s. 151–161.
- [17] *Homofermentativní a heterofermentativní bakterie mléčného kvašení v pekařských kvasech vyrobených na bázi ječmene* [online]. [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: http://www.vupp.cz/czvupp/publik/14poster/kvasy_2014.pdf.
- [18] KÖNIG, H, GOTTFRIED U, FRÖHLICH J. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, 2009. ISBN 978-3-540-85462-3.
- [19] FELIS, Giovanna E. a Franco DELLAGLIO. *Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria*. 2007, (10), 44-61. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/6294675_Taxonomy_of_Lactobacilli_and_Bifidobacteria. ISSN Current issues in intestinal microbiology.
- [20] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9
- [21] *Lactic Acid Bacteria* [online]. In: [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net/lactics.html>.
- [22] LEBEER, S. a J. VANDERLEYDEN. Genes and Molecules of Lactobacillus Supporting Probiotic Action. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*. American Society for Microbiology, 2008, (72), s. 728–764.
- [23] Лактобактерии ацидофильные (*Lactobacillus acidophilus*). Dostupné z: *Gastro Scan*[<http://www.gastroscan.ru/handbook/144/1876> online]. [cit. 2016-04-21].
- [24] Acilactum ®. Dostupné z: *Gastro Scan* [<http://www.gastroscan.ru/handbook/145/1879>]. [cit. 2016-04-21].
- [25] Hylak® forte. Dostupné z: *Gastro Scan* [<http://www.gastroscan.ru/handbook/145/1748> online]. [cit. 2016-04-21].
- [26] Витафлор ®. Dostupné z: *Gastro Scan* [<http://www.gastroscan.ru/handbook/369/7004>]. [cit. 2016-04-21].
- [27] Biform ®. Dostupné z: *Gastro Scan* [<http://www.gastroscan.ru/handbook/145/1548>]. [cit. 2016-04-21].
- [28] Лактобактерии казеи (*Lactobacillus casei*). Dostupné z: *Gastro Scan*[<http://www.gastroscan.ru/handbook/118/3170> online]. [cit. 2016-04-21].

- [29] Лактобактерии плантарум (*Lactobacillus plantarum*). Dostupné z: *Gastro Scan* [<http://www.gastroscan.ru/handbook/118/5612>]. [cit. 2016-04-21].
- [30] *Lactobacterinum*. Dostupné z: *Gastro Scan* [<http://www.gastroscan.ru/handbook/145/1878>]. [cit. 2016-04-21].
- [31] *Lactobacillus Plantarum* [online]. [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: <http://www.probiotic.org/lactobacillus-plantarum.htm>.
- [32] *Lactobacillus rhamnosus* [online]. [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: http://www.gastroscan.ru/handbook/118/2135?sphrase_id=107713
- [33] Linex ®. Dostupné z: *Gastro Scan* [<http://www.gastroscan.ru/handbook/145/1687> online]. [cit. 2016-04 21]. DOI: <http://www.gastroscan.ru/handbook/145/1687>.
- [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] ŠMARDÁ, J., DOŠKAŘ, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. p. 194. ISBN 80-210-3841-1.
- [36] PARKER, K. PCR Technology Buying Guide., *SelectScience* [online]. [cit. 2014-05-13]. Dostupné z: http://www.selectscience.net/pcr_buying_guide.aspx
- [37] ŠPANOVÁ A., RITTICH B. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. 1.vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 86 p. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [38] ROBOTIKA [online]. 2005 [cit. 2014-05-14]. Namnožení DNA pomocí PCR. Dostupné z: <http://robotika.cz/articles/gerda/cs>
- [39] Gelová elektroforéza. In: *VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat: Molekulární biologie*. 2011 [cit. 2016-04-21]. Dostupné z http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelo.
- [40] Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов, *World Health Organization* [cit. 2016-04-21]. Dostupné z <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/m>.
- [41] Agarosas - descripción. In: *Conda Prodinasa* [cit. 2016-04-21]. Dostupné z <http://www.condalab.com/es/productos/agaroses/agar>.
- [42] *Основы полимеразной цепной реакции*. Moskva, Rusko: ДНК-Технология, 2012.
- [43] HOGEWEG, P. The Roots of Bioinformatics in Theoretical Biology. *Plos Computational Biology*. 2011, (7).

- [44] Genomika, bioinformatika. In: *VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat: Molekulární biologie*. [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-geno.
- [45] CVRČKOVÁ, F., Úvod do praktické bioinformatiky. Praha: Academia, 2006. ISBN 80-200-1360- 1
- [46] YE, J, COULOURIS G, a ZARETSKAYA I. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. In: *BioMed Central Bioinformatics*. [cit. 2016-04-21]
- [47] *Primer-BLAST* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/Primer-BLAST/> on]. [cit. 2016-04-21]
- [48] HAARMAN, M., KNOL, J. Quantitative Real – Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotics Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, no. 4. ISSN 2359-2365.
- [49] DUBERNET, S., DESMASURES, N., GUÉGUEN, M. A PCR- based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS microbiology Letters*. 2001, no. 214, s. 271-275.
- [50] 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, s. 49-56.
- [51] WALTER J., TANNOCK G.W., TILSALA-TIMISJÄRVI A , (2000): Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied Environ Microbiology* 66: 297-303.
- [52] GRILLOVÁ, L. Vyhledání genů kódujících probiotické a další vlastnosti vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií. *Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta*, 2012, vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc
- [53] KAUSHIK J. K., KUMAR A., DUARY R. K., MOHANTY A. K., GROVER S., BATISH V. K. (2009) Functional and probiotics attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PLoS ONE*. 4: 8099.
- [54] MACOUZET M., ROBERT N., LEE B. H. (2010) Genetic and functional aspects of linoleate isomerase in *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 1737–1742.
- [55] SAMBROOK, Joseph a David RUSSELL. *Inverse PCR*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení
BA	Biogenní aminy
Bsh	Hydroláza žlučových solí (Bile Salt Hydrolase)
Ntn	N-terminální nukleofilní hydrolázy
Lai	Linoleát izomeráza
CLA	Konjugovaná kyselina linoleová
Odc	Ornitin dekarboxyláza
GAP	Glyceraldehyd fosfát
PCR	Polymerázová řetězcová reakce
bp	Pár bází
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
GC	Guanin a cytosin
AT	Adenin a thymin
TBE	Pufr trisborátový
PCR	Polymerázová řetězcová reakce
dNTP	Deoxyribonukleosidtrifosfát
GI	Gastrointestinální trakt
CIZ	Chloroform-isoamylalkohol
PK	Pozitivní kontrola
NK	Negativní kontrola