

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IZOLACE DNA V KVALITĚ PRO PCR Z MLÉČNÝCH VÝROBKŮ PRO DĚTSKOU VÝŽIVU

ISOLATION OF PCR-READY DNA FROM DAIRY PRODUCTS FOR BABY NUTRITION

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. JANA MANTLOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0598/2011** Akademický rok: **2012/2013**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Jana Mantlová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Alena Španová, CSc.**
Konzultanti: doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

Název diplomové práce:

Izolace DNA v kvalitě pro PCR z mléčných výrobků pro dětskou výživu

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jana Mantlová
Student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 17.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Práce byla zaměřena na izolaci DNA v kvalitě pro polymerasovou řetězovou reakci (PCR) a identifikaci probiotických bakterií mléčného kvašení z pěti mléčných výrobků pro dětskou výživu. DNA byla z hrubých lyzátů buněk výrobku izolována pomocí magnetických mikročástic P(HEMA-co-GMA). Metodou fenolové extrakce byla izolována DNA z hrubých lyzátů buněk kontrolních kmenů, která byla využita jako pozitivní kontrola. Pomocí metod PCR byly ve výrobcích identifikovány DNA rodu *Bifidobacterium* a druhů *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* ssp. *longum* *B. longum* ssp. *infantis* a druhu *Streptococcus thermophilus*. Dosažené výsledky jsou v souladu s údaji deklarovanými výrobcem.

ABSTRACT

The work was focused the isolation of PCR-ready DNA and the identification of probiotic lactic acid bacteria from five milk products for infant nutrition. DNA was isolated from crude cell-lysates of the products by magnetic P(HEMA-co-GMA) microspheres. DNAs isolated from crude cell lysates of control strains using phenol extraction method were used as positive controls. Using PCRs, DNA of genera *Bifidobacterium* and species *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* ssp. *longum* *B. longum* ssp. *infantis* and *Streptococcus thermophilus* species were identified in products. The results obtained are consistent with the data declared by the manufacturers.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mléčné výrobky, *Bifidobacterium*, izolace DNA, magnetické částice, polymerasová řetězová reakce

KEYWORDS

Dairy products, *Bifidobacterium*, DNA isolation, magnetic microspheres, polymerase chain reaction

MANTLOVÁ, J. Izolace DNA v kvalitě pro PCR z mléčných výrobků pro dětskou výživu. Brno, 2013. 66 s. Diplomová práce byla provedena na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, Ústavu potravinářské chemie a biotechnologie. 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.

.....

Jana Mantlová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala především doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. a doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za čas, cenné rady a odborné vedení, které mi věnovali při zpracování této diplomové práce.

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	Mateřské mléko a další výživa kojenců	11
3	Nároky na náhradní kojeneckou a dětskou výživu	13
4	Probiotika	14
4.1	Koncepce probiotických potravin.....	14
4.2	Požadavky na probiotika	15
4.3	Účinky probiotik	16
4.4	Stabilita střevní mikroflóry	16
4.5	Význam bakterií pro imunitní systém.....	17
5	Zástupci probiotických bakterií	18
5.1	Rod <i>Lactobacillus</i>	18
5.2	Rod <i>Bifidobacterium</i>	19
5.2.1	<i>Bifidobacterium longum ssp. infantis</i>	19
5.2.2	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	19
5.2.3	<i>Bifidobacterium breve</i>	20
5.2.4	<i>Bifidobacterium animalis</i>	20
5.2.5	<i>Bifidobacterium longum ssp. longum</i>	21
5.3	<i>Streptococcus thermophilus</i>	22
6	identifikace Probiotických bakterií s využitím nekultivačních metod	23
6.1	Polymerasová řetězová reakce.....	23
6.2	Komponenty směsi pro PCR	23
6.2.1	Teplotně rezistentní DNA-polymerasa	24
6.2.2	Pufr pro PCR	24
6.2.3	Směs dNTP	25
6.2.4	Templátová DNA.....	25
6.2.5	Primery	25
6.3	Průběh PCR.....	26
6.4	Detegce produktu PCR pomocí gelové elektroforézy na agarose	28
6.5	Provádění - optimalizace PCR.....	28
7	Magnetické nosiče pro izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR	29
8	Cíl práce	31

9	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
9.1	Přístroje a pomůcky.....	32
9.2	Materiál	32
9.2.1	Reálné vzorky výrobků.....	32
9.2.2	Kontrolní sbírkové bakteriální kmeny	33
9.2.3	Komponenty k promytí vzorku a izolaci buněk	34
9.2.4	Komponenty pro přípravu hrubého lyzátu buněk.....	34
9.2.5	Komponenty pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů.....	34
9.2.6	Komponenty pro izolaci DNA pomocí fenolové extrakce.....	34
9.2.7	Komponenty pro přípravu PCR směsi.....	34
9.2.8	DNA standard použitý při agarosové gelové elektroforéze	35
9.2.9	Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu	35
9.3	Metody – izolace DNA z reálných vzorků	35
9.3.1	Zpracování výrobků	35
9.3.2	Příprava hrubého lyzátu buněk	35
9.3.3	Separace DNA magnetickými mikročásticemi.....	36
9.4	Metody – izolace DNA z kontrolních sbírkových kmenů bakterií.....	36
9.4.1	Kultivace buněk	36
9.4.2	Kontrola čistoty bakteriální kultury.....	37
9.4.3	Lyze bakteriálních buněk.....	37
9.4.4	Izolace bakteriální DNA z hrubého lyzátu buněk fenolovou extrakcí.....	38
9.5	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA.....	38
9.6	Polymerasová řetězová reakce.....	38
9.7	Programy pro PCR	39
9.7.1	Rodově specifická PCR pro <i>Bifidobacterium</i>	39
9.7.2	Rodově specifická PCR pro <i>Lactobacillus</i>	39
9.7.3	Druhově specifická PCR pro <i>Bifidobacterium animalis</i>	40
9.7.4	Druhově specifická PCR pro <i>Bifidobacterium bifidum</i>	40
9.7.5	Druhově specifická PCR pro <i>Bifidobacterium breve</i>	40
9.7.6	Druhově specifická PCR pro <i>Bifidobacterium longum ssp. infantis</i>	40
9.7.7	Druhově specifická PCR pro <i>Bifidobacterium longum ssp. longum</i>	41
9.7.8	Druhově specifická PCR pro <i>Streptococcus thermophilus</i>	41
9.8	Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR.....	41
9.8.1	Příprava gelu.....	41

9.8.2	Nanášení produktů PCR na gel	41
9.8.3	Průběh elektroforézy.....	42
9.8.4	Detegce produktů PCR	42
10	Výsledky.....	43
10.1.1	Příprava hrubých lyzátů buněk z kultur kontrolních bakteriálních kmenů	43
10.2	Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk bakteriálních kultur kontrolních kmenů metodou fenolové extrakce	43
10.3	Příprava mléčných výrobků pro izolaci DNA	43
10.4	Příprava hrubých lyzátů buněk z 5 mléčných výrobků	43
10.5	Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk z 5 mléčných výrobků magnetickým nosičem.....	44
10.6	Příprava DNA pro PCR a provádění PCR	46
10.7	Identifikace bakterií pomocí PCR	46
10.7.1	Průkaz bakterií rodu <i>Lactobacillus</i>	47
10.7.2	Průkaz bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i>	48
10.7.3	Průkaz bakterií druhu <i>Bifidobacterium animalis</i>	49
10.7.4	Průkaz bakterií druhu <i>Bifidobacterium bifidum</i>	50
10.7.5	Průkaz bakterií druhu <i>Bifidobacterium breve</i>	51
10.7.6	Průkaz bakterií druhu <i>Bifidobacterium longum ssp. infantis</i>	52
10.7.7	Průkaz bakterií druhu <i>Bifidobacterium longum ssp. longum</i>	53
10.7.8	Průkaz bakterií druhu <i>Streptococcus thermophilus</i>	54
10.8	Shrnutí výsledků průkazu bakterií ve výrobcích pomocí PCR.....	55
10.9	Srovnání výsledků PCR s údaji deklarovanými výrobcem	56
11	Diskuze.....	57
11.1	Rodově specifické PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> a <i>Bifidobacterium</i>	57
11.2	Druhově specifické PCR.....	58
11.3	Druhově specifická PCR pro <i>Streptococcus thermophilus</i>	58
11.4	Shrnutí rodové a druhové identifikace probiotik ve výrobcích	58
	Výrobek č. 1 Nestlé BEBA pro 2	59
	Výrobek č. 2 Nestlé BEBA pro 2 good night.....	59
	Výrobek č. 3 Nestlé BEBA pro 1	59
	Výrobek č. 4 Hero Baby lactum 2	59
	Výrobek č. 5 Babio Biomléko 2 s probiotikem.....	59
12	ZÁVĚR	60
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	61

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	66
---	----

1 ÚVOD

Základem umělé výživy kojenců je kravské mléko, kterým lze nahradit mléko mateřské. Kravské mléko se však pro výživu kojenců musí upravit. Tato úprava se týká všech hlavních složek, tzn. proteinů, sacharidů i lipidů. U bílkovin se mění poměr syrovátky ke kaseinu. U sacharidů se mění zastoupení tak, aby byla přítomna buď jen laktóza, nebo jen malé množství jiných sacharidů. Pro nedonošené děti jsou stravitelnější právě ta mléka, která obsahují jen laktózu. Co se týče tuků, živočišné jsou v různé míře nahrazeny rostlinnými, především pro obsah některých nezastupitelných mastných kyselin. Dnes je tendence některá mléka obohacovat

i o prebiotika, probiotika a nukleotidy, které jsou přítomny v mateřském mléce a mají příznivý vliv jak na zrání imunitního systému, tak na růst a vývoj zažívacího traktu dítěte. Dále je mléko fortifikováno vitamíny, minerály a stopovými prvky, případně jinými látkami, které v mléce kravském chybí nebo jsou zastoupeny jen v malém množství a jsou pro vývoj dítěte nezbytné. Umělá výživa se tak snaží co nejvíce přiblížit mléku mateřskému, jehož kvality ale nemůže nikdy dosáhnout [1], [2], [3], [4].

2 MATEŘSKÉ MLÉKO A DALŠÍ VÝŽIVA KOJENCŮ

Složení mateřského mléka a mléka kravského, ze kterého se tzv. počáteční mléko pro dětskou výživu vyrábí, je rozdílné. Snahou výrobců náhradní mléčné výživy je aby se složením co nejvíce přiblížilo mléku mateřskému. Mateřské mléko obsahuje méně bílkovin, minerálních látek a vápníku a více sacharidů. Nízký obsah bílkovin odpovídá omezené funkci neúplně vyvinutých ledvin kojence. Zastoupení kaseinu mezi mléčnými bílkovinami je v mateřském mléce výrazně nižší. Mateřské mléko má ve srovnání s kravským více esenciálních vyšších mastných kyselin, vitaminů A, C, E, a méně vitaminů B a D. Dále obsahuje řadu hormonů a růstových faktorů: hormony štítné žlázy, estrogeny, kortisol, insulin, somatotropin a další, které přispívají k vývoji střevního traktu kojence [1], [4], [5], [6].

Při výrobě přípravků umělé kojenecké výživy z kravského mléka se pomocí bílkovin syrovátky snižuje podíl kaseinu, zvyšuje podíl laktózy a část mléčného tuku se nahrazuje rostlinným olejem. Takovými výrobky jsou např. Sunar nebo Feminar, které jsou navíc obohacovány železem [1], [4], [5], [6], [7], [8].

Pokračovací kojenecká výživa neboli pokračovací mléko je určeno pro kojence od ukončeného 6. měsíce do ukončeného 12. měsíce věku. Nekryje kompletně nutriční potřeby dítěte, ale je vhodné pro období kdy je součástí smíšené kojenecké stravy. Význam podávání mléka spočívá v obohacení železem, jodem a zinkem. Doporučeno je obohacování o vitaminy A, D, E a C. V posledních letech mnozí výrobci kojenecké stravy zavedli na trh mléka pro výživu batolat. Jedná se o plnotučné kravské mléko se sníženým obsahem bílkovin, fortifikované železem, stopovými prvky a vitaminy. Nutnost podávání těchto produktů nebyla zatím jednoznačně vědecky prokázána [4], [5], [6].

K mateřskému mléku nebo k mléku počátečnímu se začínají mezi 4. až 6. měsícem věku, v závislosti na psychomotorickém vývoji kojence, přidávat příkrmy kašovitě konzistence. Příkrmem se označují nemléčné a některé z mléka připravené doplňky, které se přidávají do stravy kojence. Vhodné příkrmování má začít v době, kdy dítě potřebuje vyšší příjem kalorií, než může poskytnout pouze kojení. Příkrm navíc poskytuje dostatek energetických zdrojů, bílkovin a mikronutrientů k naplnění výživové potřeby rostoucího dítěte [2], [4], [8], [9], [10].

Trávicí soustava kojence není do 17. týdne života zralá na to, aby vstřebávala složitější potravu, než je mléko. Dostane-li dítě předčasně kravské mléko nebo nemléčný příkrm, zbytečně se aktivuje a zatěžuje imunitní systém v době, kdy ještě není zralý. Reakcí na tuto

zátěž může být, dříve či později, spuštění vrozených sklonů k alergii. Zavedení příkrmů před ukončeným 4. měsícem bývá spojeno také s rizikem vdechnutí stravy, s rizikem vyšší propustností střevního traktu a dále hrozí nebezpečí nedostatečného příjmu mléčné stravy. Naopak pozdní zavedení příkrmu je spojeno s problémy, jako je například odmítání stravy či nedostatečné pokrytím nutričních potřeb dítěte (energie, bílkovin, železa a zinku). Při podávání příkrmu lžičkou je nutné, aby dítě dokázalo sedět samo nebo s oporou, otevřít ústa, když vidí lžičku a poté podané sousto polknout a nevytlačit jazykem zpět [2], [4], [6], [9], [10].

První příkrmy by měly být lehce stravitelné a nedráždivé. Jako první typ příkrmu se nejčastěji zavádí jednodruhá zeleninová kaše či hladké zeleninové pyré (z mrkve, brokolice, květáku, cukety, kedlubny). Následuje vícedruhá zeleninová kaše (přídavek bramboru k zelenině) a ovocné pyré (z jablek nebo banánu, hrušek). Dále se přidává masozeleninový příkrm (kombinace zeleniny a masa – kuřecí, králičí, krůtí, telecí, později vepřové a mladé hovězí). Od 9. měsíce se může dítěti podávat i syrová zelenina, těstoviny, rýže a cereálie, které podporují žvýkání. Od 10. – 12. měsíce se mohou zařadit mléčné výrobky, např. jogurty. Dítěti je možné podávat příkrm připravený v domácích podmínkách nebo komerčně vyráběný, označovaný většinou jako kojenecká výživa [5], [6], [9], [10], [11].

Příkrmy se do jednoho roku dítěte nesolí, nedoslazují a nemají být kořeněné. Příkrm bývá zdrojem více než 90% příjmu železa kojeného dítěte, a proto má obsahovat dostatečné množství biologicky dostupného železa (maso). Po ukončeném 6. měsíce věku se může zavádět podávání stravy obsahující oves, pšenici, pohanku, ječmen a rostlinný olej. Od roku 2005 je ale dle názoru řady odborníků vhodné odsunout zavedení lepku do stravy až na konec 1. roku života dítěte, a to jak u zdravých dětí, tak u dětí bez alergické dispozice. Pokud dítě začne jíst lepek až v době, kdy je jeho trávicí trakt dostatečně zralý, je nebezpečí nepříznivých alergických reakcí (ať okamžitých nebo dlouhodobých) podstatně menší [5], [6], [8], [12], [13].

V 6 měsících věku může dítě jíst pyré a kašovitou stavu. Do 8 měsíců je většina dětí schopna jíst také „jídlo do ruky“, kterým se krmí sami. Kolem 12. měsíce jsou děti většinou schopny jíst stejný typ stravy jako ostatní členové rodiny [4], [6].

3 NÁROKY NA NÁHRADNÍ KOJENECKOU A DĚTSKOU VÝŽIVU

Náhradní kojenecká výživa, která se v ČR vyrábí více než 70 let, našla své pevné místo ve výživě novorozenců a malých dětí. Výrobky kojenecké výživy musí odpovídat současným požadavkům na složení a přísným hygienickým normám. Potraviny pro kojence a malé děti musí projít složitým procesem schvalování – Českou pediatrickou společností, Ministerstvem zdravotnictví a Ministerstvem zemědělství. Výrobky musí vyhovovat požadavkům na složení a označení, které jsou stanoveny ve vyhlášce Ministerstva zdravotnictví č. 54/2004 Sb. o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití. Výrobky musí dále odpovídat zvláštním požadavkům na chemickou a mikrobiologickou nezávadnost. Nejsou povoleny žádné chemické konzervační látky, příchutě nebo umělá barviva. Celý výrobní proces je kontrolován. U výrobce a v prodejní síti jsou výrobky předmětem kontroly příslušných úřadů. Tato kontrola je přísnější než u běžných potravin [4], [14].

Skupina potravinářského zboží označovaná jako „kojenecká a dětská výživa“ zahrnuje potravinářské výrobky, uzpůsobené pro stravování kojenců a malých dětí do dovršeného věku 3. let (tzv. batolat). Jejich účelem je jednak poskytnutí věkové skupině dětí plnohodnotnou stravu, jednak usnadnit práci jejich matkám. Kojenecká výživa se dělí na sušenou (sušená mléka, instantní mléčné kaše) a sterilovanou [15].

U průmyslově vyráběné kojenecké výživy se někdy vyskytuje názor, že je chuťově nevýrazná, na druhou stranu je v těchto přípravcích garantována hygienická nezávadnost, standardní obsah živin a je časově méně náročná na přípravu [11], [12].

4 PROBIOTIKA

Termín probiotikum použil Parker v roce 1974 na popis organismu a látek, které přispívají k mikrobiální rovnováze ve střevech. O 10 let později je označení „probiotikum“ univerzálním pojmem používaným v celosvětovém měřítku. Termín probiotikum pochází ze dvou řeckých slov znamenajících „pro život“ a je opakem termínu antibiotikum „proti životu“ [16].

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při konzumaci v dostatečném množství mají pozitivní vliv na zdraví hostitele. Probiotické bakterie v dnešní době zahrnují více mikroorganismů než tradičně uznávané bifidobakterie a některé laktobacily [17].

Užívání probiotik příznivě ovlivňuje celkový zdravotní stav a umožňuje předcházet nebo zmírňovat některé choroby. Po dobu podávání probiotik se zvyšuje počet bakterií s pozitivním účinkem na střevní funkce. Stejně tak však dochází ke zvyšování počtu jiných bakterií, které tvoří vlastní intestinální mikroflóru. Bylo tak prokázáno, že podáváním laktobacilů dochází k deseti až stonásobnému zvýšení počtu bakterií ve střevech a to nejen laktobacilů, ale i streptokoků již přítomných ve střevě. [18]

Přirozeným zdrojem probiotik jsou především zakysané mléčné výrobky (jogurty, kefíry). Mohou však být podávány i jako doplněk stravy. Bakterie plní svůj úkol pouze tehdy, jsou-li živé, tzn. většinou u výrobků s kratší dobou trvanlivosti [19]. Například ve formě jogurtů a zakysaných mléčných výrobků, ale také ve formě tablet, tobolek nebo kapslí.

4.1 Koncepce probiotických potravin

Již několik let probíhá vývoj potravin, které obsahují živé kultury mikroorganismů. Tyto výrobky se získávají buď fermentací, nebo přímým přidáním vhodných kultur k hotovému výrobku. Příkladem těchto tzv. probiotických potravin jsou v současnosti velmi propagované kysané mléčné výrobky, jogurty, fermentovaná zelenina a sojové produkty. Probiotika jsou dnes přidávána i do dalších druhů potravin jako je dětská výživa (obohacená bifidobakteriemi) nebo lze přímo používat probiotické mikroorganismy jako potravinové doplňky. Probiotika lze dodávat v mnoha různých formách. Mohou být přidávány samostatně nebo v kombinaci s jinými mikroorganismy do potravy, léků, potravinářských přísad nebo doplňků výživy [18].

Používané probiotické mikroorganismy jsou buď anaerobní nebo aerobní. Trávicí soustava člověka však neposkytuje v celé své délce vhodné podmínky pro jejich přežití. Překážkou může být kyselé prostředí žaludku, sekrece žluči nebo přítomnost dalších střevních bakterií.

Tyto problémy řeší výběr vhodných kmenů nebo přísávek vlákniny (tzv. prebiotikum – nestavitelná složka potravy), která je využívána přímo probiotickými mikroorganismy a pomáhá v přežití nepříznivých podmínek. Kombinace probiotik (živých bakterií) a prebiotik (substrátu) se uplatňuje při vývoji inovovaných potravinářských výrobků – synbiotik, jejichž příznivé účinky na zdravotní stav člověka závisí na použitém mikroorganismu a substrátu, které tvoří složku potravy. Nezbytný je však další výzkum k objasnění vzájemných funkcí a potvrzení zdravotních účinků přísádku do potravin [18].

Protože ne všechna probiotika jsou součástí kolonizující mikroflóry, musí se periodicky dodávat. Komerční přípravky zpravidla obsahují směs bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, někdy i kvasinky (*Sacharomyces*). Předmětem zájmu jsou hlavně bifidobakterie, anaerobní bakterie, které normálně hrají důležitou roli v degradaci cukrů v potravě a tvoří a secernují ve vodě rozpustné vitaminy. Jejich podíl je vysoký zvláště ve střevní mikroflóře kojených dětí (až 95% všech vykultivovaných bakterií), kde mají mimořádně velký význam pro ochranu před střevními infekcemi [18].

4.2 Požadavky na probiotika

Požadavky na probiotika jsou velmi přísná. Lze je shrnout do následujících bodů [18], [20]:

- Jasná definice mikroorganismu
- Zaručení čistoty mikroorganismu
- Vyloučení faktoru patogenity (tvorba enterotoxinu, cytotoxinu, hemolýza atd.).
- Mohou být přijímány jako součást stravy.
- Aplikace v živém stavu.
- Přítomnost ve výrobku ve velkém množství.
- Nesmí být zničeny během výrobního procesu a jejich životnost musí přesahovat dobu trvanlivosti výrobku.
- Musí být prokázány zdraví prospěšné účinky na hostitele.
- Důležitá je druhová identifikace probiotického mikroorganismu a stanovení jeho mikrobiologických, genetických, sérologických a biochemických vlastností.
- Musí mít odolnost k žaludeční šťávě, žluči, pankreatickým enzymům a enzymům tenkého střeva.
- Musí mít schopnost adherovat k buňkám epitelu střevní sliznice nebo k mucinu tlustého střeva, případně mít schopnost v dostatečné míře se uchytit v tlustém střevě a optimálně kolonizovat tračník.

Dalším kritériem je například i počet bakterií podávaných ve výrobku. V jednom ml výrobku (např. jogurtu) musí být nejméně 10 milionů bakterií, navíc ještě schopných přežít kyselé žaludeční prostředí a účinky žluči. Také chuť finálního výrobku se po přidání kultury probiotických bakterií nesmí zhoršit, ale naopak. Přednost se také dává bakteriím produkující vitaminy (B, K), aminokyseliny ap. [18].

4.3 Stabilita střevní mikroflóry

Střevní mikroflóra osidluje trávicí trakt člověka během prvních dvou let života a postupně se vyvíjí. Řada studií poukazuje na postupné změny střevní mikroflóry s věkem člověka. Ve většině těchto studií bylo provedeno porovnání střevní mikroflóry u skupin lidí různého věku. Zatím však nebyly provedeny žádné průběžné studie analýzy vývoje bakteriální mikroflóry v delším časovém úseku v průběhu života u jednoho člověka. U starých lidí však bezpochyby dochází k převaze negativní mikroflóry (zvláště se jedná o zástupce rodů *Clostridium*). Také osídlení střev střevní mikroflórou s nižším podílem bifidobakterií je běžnější u starých lidí než u ostatních dospělých. Tyto změny složení střevní mikroflóry v souvislosti se stárnutím jsou zřejmě způsobeny snižováním odolnosti endogenních bakterií vůči kolonizaci jinými bakteriemi. Tato snížená odolnost vůči kolonizaci jinými bakteriemi je pravděpodobně výsledkem fyzikálně-chemických vlastností střev a změn ve střevní sliznici v důsledku stárnutí organismu [21].

4.4 Účinky probiotik

Účinky probiotik jsou rozmanité. Nejčastější lze shrnout do následujících bodů [18]:

- Omezení působení patogenů ve střevech. Kultury probiotických mikroorganismů produkují organické kyseliny, které snižují pH, což má negativní vliv na patogenní mikroorganismy, které se v kyselém prostředí přestávají rozmnožovat a růst.
- Rozklad karcinogenních látek. Se snižujícím se pH a potlačením růstu patogenních bakterií současně klesá tvorba rakovinou tvorných látek v samotném střevě. Probiotika jsou mimo jiné schopna do jisté míry karcinogenní látky rozložit a tím jim zabránit v dalším negativním působení.
- Pokles hladin cholesterolu v krvi. Při zvýšené hladině cholesterolu v krvi mohou probiotika hrát důležitou roli v dietě při snížení hladiny cholesterolu. Působením probiotik dojde k rozkladu solí žlučových kyselin a uvolněný cholesterol se nemůže zpátky vstřebat. V této funkci si vede nejlépe druh *Lactobacllus acidophilus*.
- Prospěšnost při redukční dietě. Ochranné látky vyskytující se v probiotických potravinách mohou být prospěšné i při redukční dietě, která je pro organismus velmi

náročná. Proto by ve formě nízkotučných jogurtů, zákysů či jogurtových mlék měla být probiotika součástí každé redukční diety.

- Zvýšení odolnosti vůči průniku infekcí (např. při průjemových onemocněních virového nebo bakteriálního původu). Probiotika adherují k buňkám, jež tvoří epitel střev a tím zabraňují infekci.
- Posílení intestinální mikroflóry při tlumení alergických reakcí
- Zlepšení kvality života pacientů se zánětlivým onemocněním střev
- Posílení imunity
- Snížení recidivy povrchových nádorů močového měchýře
- Zmírnění symptomu intolerance laktosy

4.5 Význam bakterií pro imunitní systém

Některé složky grampozitivních a gramnegativních bakterií (např. lipopolysacharidy, lipoteichová kyselina nebo peptidoglykany) dávají silné podněty pro systémovou imunitu organismu a právě na takovém imunostimulačním působení se podílejí probiotické bakterie. Některé kmeny bifidobakterií mají *in vitro* dokonce velkou schopnost podněcovat tvorbu slizničních IgA protilátek. Prokázána již byla řada pozitivních reakcí laktobacilů a dalších probiotik s buňkami zajišťujícími imunitu. Imunitní reakce v případě *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum*, které byly podávány v kapslích starším lidem, vedla k potlačení zánětlivých procesů. *Laktobacilus* GG byl u 31 kojenců ve věku 6 až 12 měsíců s úspěchem použit k zvládnutí projevu alergie na bílkoviny kravského mléka a atopického ekzému [18].

5 ZÁSTUPCI PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ

Probiotika jsou živé mikroorganismy (většinou bakterie), dodávané organismu stravou. Probiotika jsou obvykle vybírána ze zástupců bakterií mléčného kvašení, které patří do rodu *Lactobacillus*. Laktobacily patří do první skupiny, která byla použita jako zdroj probiotik. Později se začala využívat i skupina bifidobakterií, a to zejména *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. animalis*. Tato „biologická agens“ jsou ve velké míře používána v mlékárenském průmyslu při výrobě jogurtu i některých jiných potravin [22], [18], včetně v mléčných výrobcích pro dětskou výživu.

5.1 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* náleží do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae*. [23] Většina druhů rodu *Lactobacillus* fermentuje glukosu a laktosu na laktát a odtud pochází název tohoto rodu [24].

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou katalasa negativní a nepohyblivé anaerobní až fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní tyčinkovité bakterie [25]. Tvoří robustní nesporeující grampozitivní tyčky, často řetízky [24]. Laktobacily upřednostňují mezofilní a mírně termofilní teploty. Některé kmeny druhů *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* rostou, i když pomalu, při nízkých teplotách blízkých k bodu mrazu, např. na chladném mase [26]. Mohou se množit i v kultivačním prostředí s hodnotou pH 5. Jestliže však pH poklesne pod 4, růst většiny laktobacilů se zastavuje [27], [28].

Do rodu *Lactobacillus* náleží druhy bakterií, které tvoří část přirozené mikroflóry úst člověka, jeho gastrointestinálního traktu a vaginy [24], [29]. Protože kyselina mléčná vzhledem ke snížení pH zastavuje množení hnilobných bakterií, využívá se laktobacilů při konzervaci potravin, kvašení zelí, okurek a k silážování píce. V mlékárenství se používá např. druh *Lactobacillus delbueckii* ssp. *bulgaricus* k výrobě jogurtu, *Lactobacillus acidophilus* k přípravě acidofilního mléka nebo *Lactobacillus casei* při přípravě sýrů [24]. Druhy využívané v průmyslové výrobě patří do skupiny bakterií obecně pokládaných za bezpečné tzv. GRAS (generally regarded as safe) [30]. Některé laktobacily se vyskytují také jako nežádoucí kontaminace ve vinařství, pivovarnictví a droždářství, kde způsobují chuťové vady výrobků, což vede k ekonomickým ztrátám.

5.2 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* náleží do domény *Bacteria*, kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, řádu *Bifidobacteriales* a čeledi *Bifidobacteriaceae* [31]. Rod *Bifidobacterium* jsou anaerobní nesporelující bakterie, které tvoří nepravidelné grampozitivní tyčky, které mohou být na jednom z konců rozštěpené do tvaru větvičky. Mohou tvořit i řetězky, nebo mají hvězdčovitě či nepravidelné uspořádání [26]. Patří k běžné flóře zažívacího traktu. Jako prokazatelně patogenní pro člověka byl prokázán pouze druh *Bifidobacterium dentium*, který participuje na vzniku zubního kazu [24].

5.2.1 *Bifidobacterium longum ssp. infantis*

Jedná se o anaerobní grampozitivní bakterie. Zástupci tohoto bakteriálního druhu jsou významným probiotickým zástupcem střevní mikroflóry u dětí, které jsou plně kojeny. Morfologicky se jedná o pravidelné tyčinky (Obr. 4). S věkem se jejich výskyt ve střevech snižuje, u dospělých jedinců se bakterie téměř nevyskytuje. Používá se pro zmírnění symptomu dráždivého tračníku a při potlačování alergických stavů u dětí [32].



Obr. 1 Buňky *Bifidobacterium longum ssp. infantis* [32]

5.2.2 *Bifidobacterium bifidum*

Jedná se o grampozitivní nepravidelné nesporelující tyčinky o různých tvarech (Obr. 2). Buňky mohou být krátké, pravidelné s protaženými konci, kokovité či naopak dlouhé, slabě zakřivené nebo vidličnatě rozvětvené. Tvar je často ovlivněn kultivačními podmínkami. Optimální teplota růstu je 37–40 °C. Pomáhá nastolit mikrobiální rovnováhu po léčbě antibiotiky. Výrazně zlepšuje peristaltiku, má protinádorové účinky a působí preventivně proti

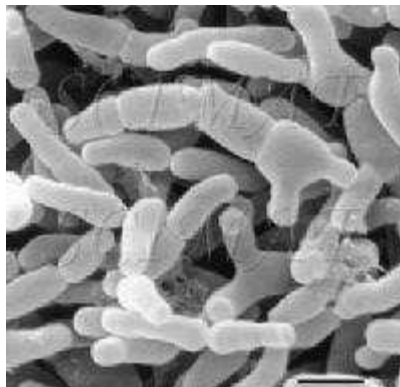
průjmovému onemocnění. Uplatňuje se při výrobě kysaných mléčných výrobků a ve farmaceutickém průmyslu [33], [34].



Obr. 2 Buňky Bifidobacterium bifidum barvené podle Grama [33]

5.2.3 Bifidobacterium breve

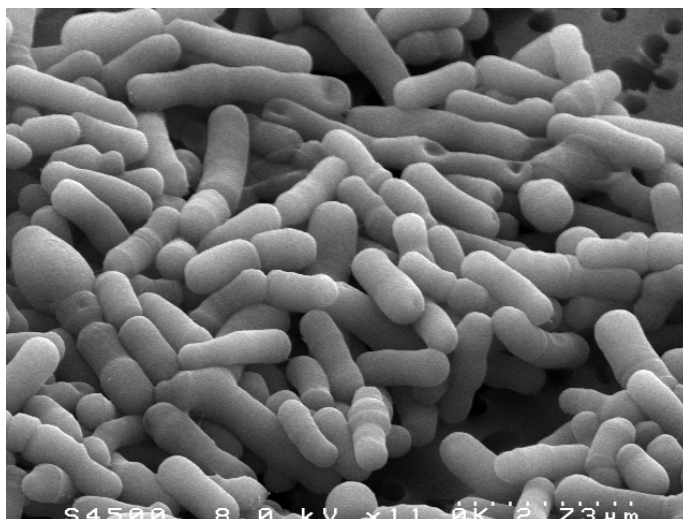
Jedná se o anaerobní grampozitivní bakterie. Vyznačují se výraznou aktivitou proti streptokokům odolným vůči antibiotikům. Buňky bývají slabě zakřivené a viditelně rozdvojené (Obr. 3) Stejně jako ostatní bifidobakterie se uplatňují při výrobě zakysaných mléčných výrobků a ve farmaceutickém průmyslu [33].



Obr. 3 Buňky Bifidobacterium breve [33]

5.2.4 Bifidobacterium animalis

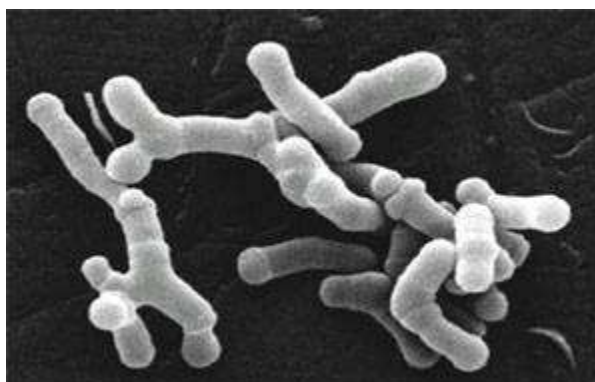
Grampozitivní anaerobní bakterie, tvaru krátké tyčinky (Obr. 1), které mají schopnost zabránit růstu některým druhům salmonely. Jedná se o primární bakterie kojenců, které napomáhají správné funkci gastrointestinálního traktu. Produkují kyseliny, které udržují pH rovnováhu ve střevech, a také napomáhají léčit kožní onemocnění u dětí tzv. atopický ekzém [35].



Obr. 4 Buňky *Bifidobacterium animalis* pod elektronovým mikroskopem [35]

5.2.5 *Bifidobacterium longum ssp. longum*

Tyto grampozitivní anaerobní nepravidelné tyčinky (Obr. 5) se ve vysokých koncentracích vyskytují v tlustém střevě. Během fermentace produkují kyselinu mléčnou. Buňky pomáhají zabraňovat kolonizaci střev invazivními patogenními bakteriemi. Vykazují vysokou adhezi k epitelovým buňkám střeva. Výrazně snižují gastrointestinální obtíže, jako je průjem a nevolnost během léčby antibiotiky. Používají se při výrobě mléčných výrobků obsahujících probiotickou kulturu a v mléčné kojenecké výživě. Nacházejí uplatnění i ve farmaceutickém průmyslu [36].



Obr. 5 *Bifidobacterium longum ssp. longum* [36]

Podle nejnovějších poznatků byly druhy *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium infantis* překlasifikovány na *Bifidobacterium longum ssp. longum* a *Bifidobacterium longum ssp. infantis*. Z tohoto vyplývá, že značení používané výrobci některých preparátů již neodpovídá současným poznatkům [37].

5.3 *Streptococcus thermophilus*

Náleží do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales*, čeled *Streptococcaeae*, rod *Streptococcus*.

Buňky *Streptococcus thermophilus* jsou kulovité nebo oválné, zřídka prodloužené obvykle tyčinkovitěho tvaru (Obr. 6). Jsou sdružené v párech, krátkých nebo dlouhých řetězcích a tvoří tetrády. Jedná se o grampozitivní, nepohyblivé, fakultativně anaerobní, kataláza negativní bakterie [38]. Tyto bakterie neredukují dusičnany na dusitany. Jedná se o mikroorganismy chemoorganotrofní, jejichž metabolismus je fermentativní, z cukrů tvoří především kyselinu mléčnou [31]. Nacházejí uplatnění v potravinářském průmyslu, zvláště při výrobě kysaných mléčných výrobků (jogurtů).



Obr. 6 Buňky *Streptococcus thermophilus* barvené podle Grama [38]

6 IDENTIFIKACE PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ S VYUŽITÍM NEKULTIVAČNÍCH METOD

Klasické mikrobiologické metody identifikace mají v některých případech jistá omezení. Tyto metody jsou méně citlivé a mají omezenou schopnost identifikovat špatně kultivovatelné či nekultivovatelné mikroorganismy. Biochemické testy vycházejí z fenotypových vlastností mikroorganismů, proto jsou v některých případech poměrně nejednoznačné. Často dochází k mylným závěrům, protože terénní kmeny a jejich vlastnosti se liší od sbírkových kmenů, podle kterých se biochemické testy vyhodnocují [39].

Řadu omezení lze vyřešit využitím metod molekulární biologie. Metody molekulární biologie jsou nezávislé na kultivaci a jsou specifické, vysoce citlivé a rychlé [39]. Molekulární techniky našly v mikrobiologii své uplatnění při detegci mikroorganismů, které vyžadují dlouhodobou kultivaci, nekultivovatelných mikroorganismů, mykobakterií či virů. V potravinářské mikrobiologii se často využívá metod molekulární biologie ke zjištění přítomnosti určitých druhů mikroorganismů v potravině při hodnocení její kvality [40].

Významné metody identifikace bakterií jsou založeny na analýze DNA s využitím amplifikačních metod. Nejvíce se využívá polymerasová řetězová reakce (PCR), která probíhá v podmínkách *in vitro* (bez kultivace buněk) [41].

6.1 Polymerasová řetězová reakce

PCR neboli polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction) je speciální identifikační metoda, která byla objevena v roce 1983 Karry Mullisem. Již v roce 1985 byla vydána první odborná publikace, ve které byla poprvé použita metoda PCR. PCR je základní používaná molekulární metoda, která spočívá v amplifikaci genů. Použití druhově i rodově specifických PCR umožňuje správnou identifikaci mikroorganismů [42], [43].

Tato metoda umožňuje *in vitro* zmnožení daného úseku DNA bez přítomnosti živých organismů. Podstatou metody PCR je opakující se enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA, ke které dochází po připojení dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3`OH-konce směřují proti sobě [44].

6.2 Komponenty směsi pro PCR

Reakční směs pro PCR je složena z teplotně-rezistentní DNA-polymerasy, pufru optimálního pro DNA-polymerasu, dNTP (stavební kameny DNA), templátové DNA a dvojice primerů [45].

6.2.1 Teplotně rezistentní DNA-polymerasa

DNA polymerasa se přirozeně vyskytuje ve všech organismech. Při dělení v buňce syntetizuje duplikát DNA. Tento enzym, nejprve izolovaný z *Escherichia coli*, byl použit ke klonování *in vitro*. Dvoušroubovice DNA byla denaturována při teplotě 96 °C. Takto vysokou teplotou byla DNA polymerasa *Escherichia coli* inaktivována a musela být po každé denaturaci doplněna. Proces amplifikace byl proto málo účinný. Jeho velká časová náročnost a velká spotřeba DNA polymerasy nebyla kompenzována odpovídajícími výsledky [46]. Tyto problémy vyřešilo použití termostabilní DNA polymerasy z *Thermus aquaticus* (*Taq* polymerasa).

Termostabilita DNA-polymerasy je důležitou podmínkou reakce, protože jedním z kroků polymerasové řetězové reakce je denaturace DNA. Denaturace je prováděna při teplotě asi 95 °C, při které jsou všechny běžné enzymy inaktivovány. Použitím termostabilní DNA-polymerasy je zajištěna dostatečná aktivita enzymu po celou dobu amplifikace. Název *Taq* DNA-polymerasa je odvozen z druhového názvu bakterií, ze kterých byla polymerasa izolována. *Taq* DNA-polymerasa byla izolována z bakterie *Thermus aquaticus*, která se vyskytuje ve vývěrech horkých minerálních pramenů [50]. Její teplotní optimum je 72 °C a poločas životnosti je asi 40 minut při teplotě 95 °C. Tento enzym vykazuje pouze 5'→3' polymerasovou aktivitu, postrádá 3'→5' exonukleázovou aktivitu, což znamená, že nedochází k opravě chyb, které vznikají při replikaci. Vzniklé amplifikační produkty tak mohou obsahovat nesprávně inkorporovanou bázi. Pro většinu aplikací je však přesnost *Taq* DNA-polymerasy dostačující. Výhodou této polymerasy je její vysoká procesivita. Tímto termínem je označena schopnost syntetizovat až 10 000 bp dlouhé úseky DNA [47].

Kromě *Taq* DNA-polymerasy mohou být použity další polymerasy např. Pwo a Pfu DNA-polymerasa, jejichž zdrojem jsou *Pyrococcus woesei* a *Pyrococcus furiosus*. Tyto enzymy vykazují i 3'→5' exonukleázovou aktivitu, která umožňuje opravu chybně inkorporovaných deoxyribonukleotidů. Jejich nevýhodou je nižší procesivita [47].

6.2.2 Pufr pro PCR

Základem pufru pro PCR je síran amonný nebo chlorid draselný. Součástí pufru je Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C) a zejména chlorid hořečnatý. PCR pufr může být různými firmami dodáván i bez chloridu hořečnatého, čímž je usnadněna optimalizace reakčních podmínek [45].

6.2.3 Směs dNTP

Směs dNTP je vodný roztok, ve kterém je obsažena ultračistá směs každého ze čtyř nukleotidů dATP, dCTP, dGTP a dTTP [45]. Jedná se o stavební kameny DNA, ze kterých je syntetizován nový řetězec DNA.

6.2.4 Templátová DNA

Templátová DNA (cílová DNA, DNA matrice) je DNA, jejíž část se v PCR amplifikuje. DNA může být získána z různých zdrojů, z buněk prokaryot, eukaryot a virů [48].

6.2.5 Primery

Primery jsou krátké syntetické oligonukleotidy o známé sekvenci, které jsou zpravidla tvořeny 18-30 nukleotidy [43], [44]. Primery jsou chemicky syntetizované sekvence [49]. Jsou komplementární ke koncovým oblastem fragmentu DNA, jenž má být amplifikován [50], [51]. Pro PCR reakci je nutné použít dva primery. Forward primer (upstream), po jehož nasednutí na 5'-konec řetězce je směr elongace dán směrem transkripce, a reversní primer (downstream), který nasedá na 3'-konec řetězce a elongace probíhá opačným směrem než transkripce. Pro každou polymerasovou řetězovou reakci je potřeba navrhnout vhodný pár primerů. Při návrhu primerů musí být zajištěno, aby oba primery měly přibližně stejnou teplotu tání. Teplota tání je závislá na délce molekuly a její sekvenci. Čím je molekula delší, tím větší energie je nutná k její denaturaci, protože obsahuje více vodíkových můstků. Čím více GC párů je v molekule obsaženo, tím je teplota tání vyšší. Teplota, při které dochází k nasedání primerů, musí být pak o něco nižší, než je teplota tání, eliminuje se tím nestabilní nasednutí primerů. Konkrétní teplota hybridizace primerů je určena experimentálně, optimalizací podmínek reakce [52].

Pro každou PCR je třeba navrhnout vhodný pár primerů, pomocí něhož se bude amplifikovat konkrétní požadovaný úsek templátové DNA. Ideální pár primerů je v současnosti možno určit pomocí moderních počítačových programů [49].

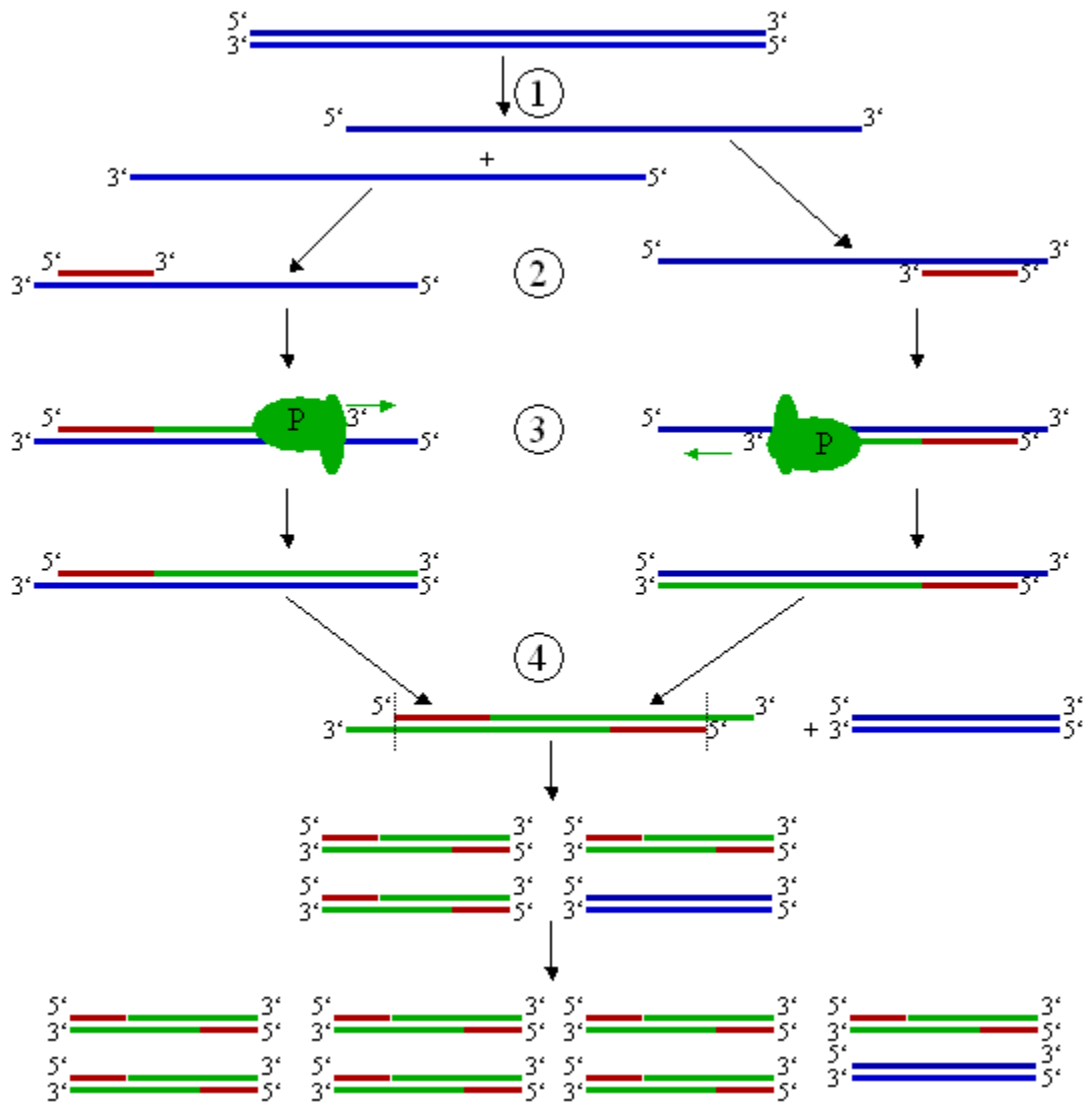
Primery nesmí být vzájemně komplementární, jinak hrozí vznik dimerů a vlásenek. Dimer primerů vzniká spárováním dvou primerů; podmínkou jeho vzniku je delší komplementární úsek v sekvenci obou primerů. Vlášenka vzniká spárováním konců stejného primeru, podmínkou je opět dostatečná komplementarita mezi konci primeru. Dimery i vlásenky mají za následek, že PCR neproběhne [52]. Ve většině reakcí jsou tedy vhodná sekvence primerů a koncentrace primerů parametry, které rozhodují o úspěšném výsledku reakce [47].

6.3 Průběh PCR

Amplifikační reakce je prováděna v tenkostěnných zkumavkách o objemu 200 nebo 500 mikrolitrů, v závislosti na typu termocykleru [51]. Termocykler je programovatelný termostat, do jehož bloku jsou zkumavky umístěny a který umožňuje přechod mezi jednotlivými teplotami při amplifikační reakci. Hlavními požadavky jsou přesnost teploty a rychlost přechodu mezi jednotlivými teplotami [47]. Většina moderních přístrojů je opatřena vyhřívaným víkem. Tím je zabráněno kondenzaci kapalně reakční směsi na vnitřní straně víka zkumavky a kontaminaci laboratoře produkty amplifikace při otevření zkumavky. Pokud není termocykler vybaven vyhřívaným víkem je reakční směs vrstvena minerálním olejem, kterým je zabráněno vypařování reakční směsi [51].

Koncept samotné amplifikace DNA poprvé navrhnul H. Gobind Khorana v roce 1971. Až o patnáct let později Kary Mullis metodu pojmenoval a uvedl ji do praxe. Zavedl metodu, kterou mohla být DNA namnožena během opakujících se cyklů s využitím termostabilní DNA polymerasy [46].

Proces amplifikace se skládá ze třiceti až čtyřiceti cyklů. Princip jednotlivých kroků PCR je uveden na Obr. 7.



Obr. 7 Průběh PCR [46].

1. Denaturace DNA

Denaturace DNA probíhá při teplotě 92 - 98 °C (obvykle 95 °C). Pro fragmenty do 1 kbp je doba denaturace obvykle 15 sekund. Pro větší fragmenty je doba denaturace 30 až 60 sekund [53].

Před prvním cyklem reakce bývá denaturace prodloužena na 5 minut, aby se zvýšila pravděpodobnost, že dlouhé molekuly templátové DNA budou plně denaturovány.

2. Připojení dvou primerů (hybridizace)

Hybridizace probíhá podle denaturační teploty dvouřetězcové templátové DNA s primerem snížené o 5 °C. Obvyklá teplota je mezi 50 a 55 °C. Nízká teplota podstatně snižuje specifitu reakce, vysoká teplota brání amplifikaci [53].

3. Syntéza nového řetězce

Probíhá obvykle při teplotě 72 °C, což je optimální teplota pro *Taq* DNA polymerasu. Délka kroku je dána rychlostí syntézy nového řetězce. Pro fragmenty do 1 kbp to bývá 30 až 60 sekund, pro úseky 6 – 10 kbp až 15 minut [53].

4. Opakování kroků

Produkt vzniklý třetím krokem se stává substrátem pro další cyklus. Cykly se obvykle opakují 30 až 40×.

6.4 Detegce produktu PCR pomocí gelové elektroforézy na agarose

PCR je metoda, která umožňuje identifikaci jediné kopie DNA ve vzorku tím, že tuto sekvenci namnoží do té míry, že jí můžeme detegovat [41]. PCR produkty (amplikony) se nejčastěji detegují pomocí gelové elektroforézy na agarose.

Po proběhnutí PCR je získána směs ampliconů, ve které je obsaženo velké množství amplifikovaných fragmentů DNA. Aby tyto amplicony mohly být detegovány, musí být vizualizovány. Nejvíce používanou metodou je v tomto případě agarosová gelová elektroforéza [50].

Velikost produktu PCR porovnááme se standardem DNA (DNA žebříček), který obsahuje DNA fragmenty o známé velikosti.

Gelová elektroforéza dělí fragmenty DNA podle velikosti. DNA se vzhledem k negativnímu náboji pohybuje směrem ke kladné elektrodě, přičemž delší fragmenty DNA se pohybují pomaleji, protože jsou v hustém gelu více zpomalovány. Po několika hodinách se fragmenty v gelu rozdělí podle velikosti.

DNA však není na agarosovém gelu možno vidět. Je proto nutné ji nějakým způsobem označit. Jednou z citlivých metod detegce je smíchání DNA s látkou (např. ethidium bromid), která po navázání na DNA fluoreskuje v ultrafialovém světle [41].

6.5 Provádění - optimalizace PCR

PCR je velmi citlivá metoda. Musíme proto přijmout adekvátní opatření, abychom se vyhnuli kontaminaci jinými molekulami DNA, vyskytujícími se v laboratorním prostředí (bakterie, viry, cizorodá DNA atd.). Míchání reakční směsi musí být prováděna ve speciálním boxu vyzářeném UV lampou za použití sterilních rukavic. Stejně tak musí být odděleny části laboratoře, v nichž se provádí izolace DNA, příprava směsí pro PCR a detegce produktů PCR. Vždy musí být prováděna pozitivní a negativní kontrola pro odhalení případné kontaminace některé komponenty reakce.

7 MAGNETICKÉ NOSIČE PRO IZOLACI DNA V KVALITĚ VHODNÉ PRO PCR

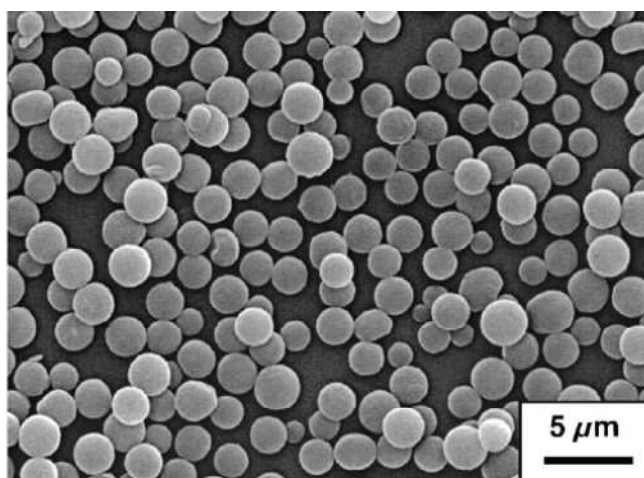
Magnetické sorbenty, nosiče nebo modifikátory je možno využít pro izolaci nebo magnetickou modifikaci biologicky aktivních látek, buněk, subcelulárních komponent, kontaminant životního prostředí nebo jiných složek studovaného systému [54], [55], [56], [57], [58], [59], [60]. Principem magnetických separací je obvykle adsorpce cílové sloučeniny nebo buňky na magnetické částice a následné odstranění vytvořeného komplexu ze studovaného systému pomocí vnějšího magnetického pole. V případě pozitivních separací jsou magneticky modifikovány a izolovány přímo žádané sloučeniny nebo buňky, v případě separace negativní se naopak ze systému odstraňují některé nežádoucí složky, přičemž dochází k nabohacení žádaných komponent systému. Magnetické separace jsou jednou z perspektivních možností, jak ve vybraných případech urychlit nebo usnadnit některé běžně používané separační postupy a metody. Obecně je použití selektivní magnetické separace výhodné zejména při práci v heterogenních, suspenzních systémech. Podobné výhody skýtají i enzymy nebo buňky imobilizované na magnetické nosiče, kdy je možné jejich selektivní odstranění ze systému po proběhnutí enzymové reakce. V současné době se magnetické separace využívají v mikrobiologii, buněčné biologii, molekulární biologii, lékařství, biochemii, biotechnologiích a ekologii.

Pro separace v magnetickém poli je potřebné základní vybavení, především vhodný magnetický separátor a podle charakteru práce příslušný magnetický sorbent nebo nosič s imobilizovanými afinitními ligandy.

Nejčastěji používanými magnetickými materiály pro přípravu magnetických nosičů a sorbentů jsou práškové oxidy železa magnetit (oxid železnato-železitý, Fe_3O_4) a maghemit (gama-oxid železitý, $\text{gamma-Fe}_2\text{O}_3$), dále oxid chromičitý CrO_2 , práškové železo, nikl a ferity. Tyto materiály mohou být zakoupeny od různých dodavatelů, nebo mohou být připraveny v laboratoři [61], [62]. Jsou popsány i experimenty s částicemi magnetovce izolovanými z magnetosomů magnetotaktických bakterií [63], [64], [65]. Kromě magnetických částic lze pro některé aplikace využít i tzv magnetické kapaliny (ferrofluids, magnetic fluids) tj. suspenze velmi jemných magnetických částic (o průměru 2 – 20 nm) ve vhodné nemagnetické nosné kapalině [66], [67].

Magnetické částice vykazují magnetické vlastnosti jen v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Nevykazují však reziduální magnetismus, a pokud nejsou v bezprostřední blízkosti magnetického pole, vytváří homogenní suspenzi (jsou tzv. paramagnetické).

Pro separaci celkové DNA se osvědčily hydrofilní neporézní nosiče o průměru asi 1 μm (Obr. 8). Tyto nosiče mají na svém povrchu karboxylové skupiny (výsledek oxidace hydroxylových skupin), pomocí nichž reverzibilně adsorbují DNA. Reverzibilní navázání DNA na tyto nosiče probíhá v přítomnosti poly(ethylen glykolu) 6000 a chloridu sodného [68], [69].



Obr. 8: Elektronová mikroskopie magnetických nosičů *P(HEMA-co-GMA)* (upraveno dle Španová a kol. 2004) [70]

Pro selektivní separaci DNA lze využít nosiče funkcionalizované streptavidinem s navázanou biotinylovanou sondou. Systém streptavidin-biotin je považován za nejsilnější nekovalentní biologicky známou interakci, jejíž disociační konstanta K_d je 4×10^{-14} M. Vazba se tvoří velmi rychle a stabilně v širokém rozmezí pH a teploty. Streptavidin je protein izolovaný z aktinobakterie *Streptomyces avidinii*, zatímco biotin je vitamin ze skupiny B přítomný ve všech buňkách [71].

Magnetické separační techniky jsou jednou z možností, jak urychlit nebo usnadnit některé běžně používané separační a purifikační techniky izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR, jakou je např. fenolová extrakce. Využívají malé magnetické částice [53].

8 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR z 5 mléčných výrobků pro dětskou výživu a provést rodovou a druhovou identifikaci probiotických bakterií.

Součástí práce bylo:

- Izolace a purifikace kontrolní bakteriální DNA metodou fenolové extrakce
- Příprava hrubých lyzátů buněk obsažených ve výrobcích a izolace DNA pomocí magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA).
- Provedení rodově specifických PCR pro rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*
- Provedení druhově specifických PCR pro druhy *Bifidobacterium animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* ssp. *infantis*, *B. longum* ssp. *longum* a *Streptococcus thermophilus*
- Porovnání výsledků s údaji od výrobců u analyzovaných výrobků

9 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

9.1 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
- Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Fotoaparát (Canon powershot A470)
- Laboratorní váhy (Kern & Sohn, Německo)
- Magnetický separátor Invitrogen Dynal AS (Dynal Biotech, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Discovery HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlná trouba SMW 5020 (Sencor, ČR)
- Minicentrifuga C1301 (Labnet international, Inc., USA)
- Minicycler PTC 150 (MJ Research, Watertown, USA)
- NanoPhotometr (Implen, Německo)
- Termocycler PTC-200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Termostat – Mini incubator (Labnet, USA)
- Transluminátor TVR 3121 (Spectroline, Paramount, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy-Cast, model B1 (Owl Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí Lighting volt Power Supply, model OSP-300 (Owl Scientific, USA)
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky.

9.2 Materiál

Všechny použité chemikálie byly v čistotě p. a.

9.2.1 Reálné vzorky výrobků

Výrobky vybrané k analýze a jejich složení jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Výrobky vybrané k analýze a jejich složení

Výrobek	Složení
Nestlé BEBA pro 2	Sušené odtučněné mléko a bílkoviny mléčné syrovátky, směs rostlinných olejů, syrovátkový permem, laktóza, vitaminy, obilninový a bramborový škrob, minerály a stopové prvky, sojový lecitin, rybí olej, rostlinný olej (LC-PUFA), sušené bakterie mléčného kvašení (termofilní a bifidogenní kultury)
Nestlé BEBA pro 2 good night	Sušené odtučněné mléko a bílkoviny mléčné syrovátky, směs rostlinných olejů, syrovátkový permem, laktóza, vitaminy, obilninový a bramborový škrob, minerály a stopové prvky, sojový lecitin, rybí olej, rostlinný olej (LC-PUFA), sušené bakterie mléčného kvašení (termofilní a bifidogenní kultury)
Nestlé BEBA pro 1	Syrovátková bílkovina a kasein, laktóza, LC-PUFA, vitaminy, minerály, nukleotidy
Hero Baby Lactum 2	Obsahuje probiotika a prebiotika
Babio Biomléko 2 s probiotiky	Odtučněné sušené biomléko, sladká sušená biosyrovátka z části demineralizovaná, rostlinné biooleje, biomaltodextrin, bioškrob kukuřičný, vaječné fosfolipidy, rybí olej, fosforečnan vápenatý, citran sodný, chlorid vápenatý, vitamín C, kultury bifidobakterií BiFiComplexu, citran železitý, niacin, síran zinečnatý, D-pantotenát vápenatý, vitamín E, vitamín A, síran měďnatý, vitamín B ₁ , vitamín B ₆ , vitamín B ₂ , jodid draselný, kyselina listová, vitamín K ₁ , biotin, seleničitan sodný, vitamín D ₃

9.2.2 Kontrolní sbírkové bakteriální kmeny

Byly použity sbírkové a typové kmeny:

- *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T
- *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762
- *Bifidobacterium breve* CCM 3763

- *Bifidobacterium infantis* CCM 17930
- *Bifidobacterium longum* CCM 4990
- *Lactobacillus acidophilus* CCM 48335
- *Streptococcus thermophilus* CCM 4757 (hrubý lyzát buněk)

Po kultivaci v MRS médiu byly připraveny hrubé lyzáty buněk. Byly použity pro izolaci DNA fenolovou extrakcí. DNA byla použita jako kontrola pro PCR.

9.2.3 Komponenty k promytí vzorku a izolaci buněk

Sterilní destilovaná voda

9.2.4 Komponenty pro přípravu hrubého lyzátu buněk

Lyzační roztok (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5mM EDTA, pH 8,0; lysozym 3mg/ml)

20% SDS

Proteinasa K (100 µg/ml)

9.2.5 Komponenty pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů

Voda

5 M NaCl

DNA (hrubý lyzát buněk)

PEG 6000 (40 %)

Magnetický nosič (2 mg/ml)

70% ethanol

TE pufr (10 mM Tris HCl, pH 7,8; 1mM EDTA pH 8,0)

9.2.6 Komponenty pro izolaci DNA pomocí fenolové extrakce

Hrubé lyzáty buněk

Fenol (pH 7,8)

TE pufr (pH 7,8)

Chloroform – isoamylalkohol (24:1)

9.2.7 Komponenty pro přípravu PCR směsi

Voda pro PCR

Reakční pufr kompletní (10× koncentrovaný)

Směs dNTP (10 mM)

Primer 1 (10 pmol/µl)

Primer 2 (10 pmol/µl)

Taq DNA polymerasa (1 U/ μ l) Top Bio

Matrice DNA

9.2.8 DNA standard použitý při agarosové gelové elektroforéze

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

9.2.9 Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu

Tris – borát – EDTA (TBE) pufr: Tris-HCl (54g), kyselina boritá (27,5g), 0,5 mol.l⁻¹ EDTA (pH 8,0; 20 ml) – před použitím byl koncentrovaný pufr 10 \times zředěn destilovanou vodou.

Nanášecí pufr (6 \times koncentrovaný): bromfenolová modř (Top-Bio, Praha, ČR)

Fluorescenční barvivo: ethidium bromid (500 μ g/ml)

Agarosový gel – 1,8%: 1,8 g agarosy/ 100 ml 0,5 \times koncentrovaný TBE pufr

9.3 Metody – izolace DNA z reálných vzorků

9.3.1 Zpracování výrobků

1. Byl navážen 1 g vzorku a byl rozpuštěn v 5 ml sterilní vody
2. Takto připravený vzorek byl rozdělen po 1 ml do 5 sterilních 1,5 ml mikrozkuavek
3. Vzorky se centrifugovaly při 14 000 ot/min po dobu 5 minut
4. Supernatant byl opatrně slit, sediment byl resuspendován a promyt 1 ml sterilní vody a opět centrifugován za stejných podmínek.
5. Promytí se opakovalo minimálně 5 \times s průběžným slučováním vzorku do jedné mikrozkuavky

9.3.2 Příprava hrubého lyzátu buněk

1. K sedimentu buněk byl přidán 1 ml lyzačního roztoku (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA; lysozym 3mg/ml), ve kterém byl sediment resuspendován.
2. Vzorek byl inkubován 1 hodinu při laboratorní teplotě.
3. Ke směsi bylo přidáno 50 μ l 20% SDS a 5 μ l proteinasy K (100 μ g/ml).
4. Vzorky byly inkubovány 3 hodiny při 55°C.

9.3.3 Separace DNA magnetickými mikročásticemi

1. Do 1,5 ml mikrozkušavek byla připravena směs dle Tabulky 2. Pro separaci byly použity magnetické mikročástice P(HEMA-co-GMA) připravené na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze (ing. D. Horák, CSc.).

Tabulka 2: Směs pro separaci DNA

Krok	Složka	Podíl (hm)
1	Voda	100
2	NaCl (5 M)	200
3	DNA (hrubý lyzát buněk)	50
4	PEG 6000 (40 %)	100
5	Magnetický nosič (0,2 mg/ml)	50
Celkem		500

2. Směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě.
3. Směs byla umístěna do magnetického separátoru a magnetické částice byly separovány 15 minut při laboratorní teplotě.
4. Po uplynutí doby byl opatrně odebrán supernatant.
5. Z magnetického separátoru byl vyjmut magnetický pás, do mikrozkušavek s částicemi bylo přidáno 500 μ l 70% etanolu.
6. Vzorek byl promíchán, do separátoru byl zasunut magnetický pás a po 2 minutách byl etanol opatrně odebrán.
7. Mikrozkušavky byly vyjmuty ze separátoru a etanol se nechal samovolně odpařit.
8. DNA adsorbovaná na magnetických částicích byla eluována při laboratorní teplotě do 50 μ l TE pufru.
9. Po 30 minutách se částice odseparovaly pomocí magnetického separátoru a eluát obsahující DNA byl odebrán do čistých 1 ml mikrozkušavek.

9.4 Metody – izolace DNA z kontrolních sbírkových kmenů bakterií

DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk.

9.4.1 Kultivace buněk

- Byly kultivovány buňky bakteriálních kmenů uvedené v kapitole 9.2.2.

1. Pelet lyofilizované kultury byl rehydratován a naočkován do tekutého MRS (de Man, Rogosa, Sharp) média s cysteinem (3 % inokulace) a souběžně na MRS agar s cysteinem (0,05 %) pro kontrolu čistoty kultury.
2. Buňky rodu *Lactobacillus* se kultivovaly za aerobních podmínek při 37°C po dobu 24 hodin., resp. 48 hodin při kultivaci na pevném médiu.
3. Buňky rodu *Bifidobacterium* se kultivovaly za anaerobních podmínek při 37°C po dobu 24 hodin., resp. 48 hodin při kultivaci na pevném médiu.
4. Poté byly přeočkovány do tekutého média (1 % inokulace)
5. Po kultivaci byla provedena lyze buněk a izolace bakteriální DNA
6. U buněk narostlých v tekuté kultuře byla provedena kontrola čistoty bakteriální kultury.

9.4.2 Kontrola čistoty bakteriální kultury

Čistá kultura musí obsahovat pouze jeden druh kolonií.

1. Kontrola byla provedena výsevem (křížovým roztěrem) bakteriální kultury narostlé v tekutém živném médiu na misku s pevným MRS agarem
2. Kultivace byla provedena přes noc (cca 2 dny) v termostatu při teplotě 37°C
3. Po kultivaci byla provedena kontrola vzhledu (velikost, zbarvení, morfologie) jednotlivých kolonií.

9.4.3 Lyze bakteriálních buněk

1. 1 ml buněčné kultury v 1,5 ml Eppendorfových zkumavkách se centrifugoval při 15 000 ot/min po dobu 5 minut
2. Supernatant byl opatrně slit, sediment byl ponechán dobře okapat.
3. Sediment byl resuspendován v 1 ml lyzačního pufru (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5mM EDTA, pH 8,0) – nejdříve bylo přidáno 100 µl pufru, a po promíchání bylo přidáno zbylých 900 µl a suspenze byla opět promíchána.
4. Suspenze byla centrifugována při 15 000 ot/min po dobu 5 minut.
5. K sedimentu bylo přidáno 500 µl lyzačního pufru II (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0; 3 mg/ml lysozymu). Sediment byl dobře nesuspendován.
6. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě za občasného promíchání.
7. K suspenzi bylo přidáno 12,5 µl 20 % SDS a 5 µl proteinasy K (100 µg/ml) a suspenze byla promíchána.
8. Vzorky byly za občasného promíchání inkubovány při 55°C do projasnění roztoku (asi 3 hodiny).

9. Poté bylo přidáno 10 μl RNasy A (100 $\mu\text{g/ml}$) a směs byla po promíchání inkubována při 37°C, 30 minut.
10. Z takto připraveného hrubého lyzátu buněk byla izolována DNA. Hrubý lyzát buněk byl uchováván při -20°C.

9.4.4 Izolace bakteriální DNA z hrubého lyzátu buněk fenolovou extrakcí

1. K 500 μl lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu (předestilovaný, pH upraveno na hodnotu 7,8). Směs byla kývavým pohybem opatrně promíchávána 4 minuty.
2. Směs byla centrifugována při 15 000 ot/min po dobu 5 minut.
3. Pomocí špičky s ustřiženým hrotem byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky.
4. Vodní fáze s DNA byla doplněna TE pufrém na objem 500 μl a bylo přidáno 700 μl směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1). Směs byla opatrně promíchávána kývavým pohybem po dobu 4 minut.
5. Směs byla centrifugována při 15 000 ot/min po dobu 5 minut.
6. Horní vodní fáze s DNA byla odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky

9.5 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

1. Spektrometr byl vynulován na TE pufr
2. Byla změřena absorbance všech vzorků DNA při vlnových délkách 230, 260, 280 a 320 nm; byla odečtena koncentrace DNA [$\text{ng}/\mu\text{l}$] a poměry vlnových délek 260 nm / 280 nm.

9.6 Polymerasová řetězová reakce

Pokud se složení reakční směsi neliší, je vhodné připravit tzv. master mix smícháním jednotlivých komponent vynásobených počtem vzorků. Složení PCR směsi pro jeden vzorek je uvedeno v Tabulce 3. Pro ověření čistoty všech komponent je nutné zařadit do reakce negativní kontrolu. Její složení je totožné se složením PCR směsi, pouze místo DNA matrice se přidá sterilní PCR voda.

Tabulka 3: Směs pro PCR

PCR komponenta	Množství [μl]
Voda pro PCR	19,0
10 × reakční pufr kompletní	2,5
DTP [10 mM]	0,5
Primer 1 [10 pmol/μl]	0,5
Primer 2 [10 pmol/μl]	0,5
<i>Taq</i> DNA polymerasa [1 U/μl]	1,0
DNA matrice [10 ng/μl]	1,0

1. Bylo připraveno potřebné množství master mixu a do 0,2 ml mikrozkušavek bylo napipetováno 24 μl této směsi.
2. Do mikrozkušavek byl přidán 1 μl DNA matrice.
3. Směs byla důkladně promíchána a mikrozkušavky byly umístěny do termocykleru.
4. K reakci byly použity předem nastavené programy. (Parametry jednotlivých programů a použité primery jsou uvedeny v následující kapitole).

9.7 Programy pro PCR

Prvnímu kroku předcházelo u všech programů zahřátí na teplotu 94 °C po dobu 5 minut a po posledním kroku dosyntetizování produktů PCR při 72 °C po dobu 10 minut.

9.7.1 Rodově specifická PCR pro *Bifidobacterium*

Specifické primery (velikost ampliconu 914 bp) [72]:

Pbi F1 CCG GAA TAG CTC

Pbi R2 GAC VAT GCA CCA CCT GTG A

Program pro amplifikaci DNA: **BIFI 30**

Počet cyklů: 30

1. Denaturace 94 °C / 60 sekund
2. Hybridizace 50 °C / 60 sekund
3. Syntéza DNA řetězce 72 °C / 120 sekund

9.7.2 Rodově specifická PCR pro *Lactobacillus*

Specifické primery (velikost ampliconu asi 250 bp) [73]:

LbLMA 1-rev CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC

R16-1 CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA

Program pro amplifikaci DNA: **LBC ROD**

Počet cyklů: 30

1. Denaturace 94 °C / 60 sekund
2. Hybridizace 55 °C / 60 sekund
3. Syntéza DNA řetězce 72 °C / 60 sekund

9.7.3 Druhově specifická PCR pro *Bifidobacterium animalis*

Specifické primery (velikost ampliconu 925 bp) [72]:

Pbi F1 GCA CCA CCT GTG AAC CG
Ban F2 AAC CTG CCC TGT

Program pro amplifikaci DNA: **B.ANIM**

Počet cyklů: 30

1. Denaturace 94 °C / 60 sekund
2. Hybridizace 55 °C / 60 sekund
3. Syntéza DNA řetězce 72 °C / 60 sekund

9.7.4 Druhově specifická PCR pro *Bifidobacterium bifidum*

Specifické primery (velikost ampliconu 278 bp) [74]:

BiBIF-1 CCA CAT GAT CGC ATG TGA TT
BiBIF-2 CCG AAG GCT TGC TCC CAA

Program pro amplifikaci DNA: **MATSUKI**

Počet cyklů: 35

1. Denaturace 94 °C / 20 sekund
2. Hybridizace 55 °C / 20 sekund
3. Syntéza DNA řetězce 72 °C / 30 sekund

9.7.5 Druhově specifická PCR pro *Bifidobacterium breve*

Specifické primery (velikost ampliconu 288 bp) [74]:

BiBRE-1 CCG GAT GCT CCA TCA CA
BiBRE-2 ACA AAG TGC CTT GCT CCC

Program pro amplifikaci DNA: **MATSUKI** viz kapitola 9.7.4.

9.7.6 Druhově specifická PCR pro *Bifidobacterium longum ssp. infantis*

Specifické primery (velikost ampliconu 828 bp) [74]:

BiINF-1 TTC CAG TTG ATC GCA TGG T
BiINF-2 GGA AAC CCC ATC TCT GGG AT

Program pro amplifikaci DNA: **MATSUKI** viz kapitola 9.7.4.

9.7.7 Druhově specifická PCR pro *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*

Specifické primery (velikost amplikonu 831 bp) [74]:

BiLON-1 TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC

BiLON-2 CGA AGG CTT GCT CCC AG

Program pro amplifikaci DNA: **MATSUKI** viz kapitola 9.7.4.

9.7.8 Druhově specifická PCR pro *Streptococcus thermophilus*

Specifické primery (velikost amplikonu 968 bp) [75]:

S.therm-1 CAC TAT GCT CAG AAT ACA

S.therm-2 CGA ACA GCA TTG ATG TTA

Program pro amplifikaci DNA: **STRT**

Počet cyklů: 35

1. Denaturace 95 °C / 60 sekund
2. Hybridizace 58 °C / 60 sekund
3. Syntéza DNA řetězce 72 °C / 60 sekund

9.8 Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR

Agarosová gelová elektroforéza byla použita k detegci vzniklých produktů PCR. Byl použit gel o hustotě 1,8 %

9.8.1 Příprava gelu

1. Agarosa byla smíchána s TBE pufrem v poměru: 1,8 g agarosy na 100 ml 0,5× koncentrovaného TBE pufru.
2. Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě za vzniku homogenní směsi.
3. Směs se nechala vychladnout na teplotu asi 60°C
4. Směs byla nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem, která byla umístěna ve vodorovné poloze.
5. Gel se ponechal 30 – 60 minut tuhnout.
6. Před nanášením vzorku na gel byl hřebínek z vaničky opatrně vyjmut.

9.8.2 Nanášení produktů PCR na gel

1. Do mikroskopavky s PCR produktem (25 µl) bylo přidáno 5 µl nanášecího pufru (6× koncentrovaného).
2. Celá směs (30 µl) byla nanášena do komůrky gelu.

3. Na gel byl nanesen DNA standard (5 μ l) 100 bp žebříček (100 – 1500 bp).
4. Gel byl vložen do elektroforetické vany a převrstven 0,5 \times koncentrovaným TBE pufrem (do výšky 3 – 5 mm nad gel) tak, aby mohla DNA migrovat od katody k anodě.

9.8.3 Průběh elektroforézy

1. Elektroforéza byla spuštěna zapnutím zdroje s napětím 80 V.
2. Separace byla ukončena po migraci nanášecího pufu do 2/3 délky agarosového gelu (asi 2 hodiny).

9.8.4 Detegce produktů PCR

1. Po skončení elektroforézy byl gel barven v lázni s ethidiumbromidem (0,5 μ g / ml) minimálně 30 minut.
2. Obarvený gel byl opláchnut vodou a prohlížen pod transluminátorem v UV světle o vlnové délce 305 nm.
3. Obarvený gel byl zdokumentován fotograficky.

10 VÝSLEDKY

Bylo analyzováno 5 vzorků mléčných výrobků určených pro dětskou výživu (Tabulka 1).

10.1.1 Příprava hrubých lyzátů buněk z kultur kontrolních bakteriálních kmenů

Dle kapitoly 9.4.1 a 9.4.2 byly z čistých bakteriálních kultur (kapitola 9.2.2) připraveny hrubé lyzáty buněk. Dále z nich byla izolována DNA pomocí fenolové extrakce.

10.2 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk bakteriálních kultur kontrolních kmenů metodou fenolové extrakce

Seznam kontrolních sbírkových kmenů je uveden v kapitole 9.2.2.

Pomocí fenolové extrakce byla z hrubých lyzátů buněk izolována DNA. Kvalita této izolované DNA byla ověřena spektrofotometricky (Tabulce 4).

Tabulka 4: Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA sbírkových kmenů

Bakteriální kmen:		c [ng/μl]	A 230 nm	A 260 nm	A 280 nm	A 320 nm	A 260 nm / 280 nm
<i>Bifidobacterium animalis</i>	CCM 4988 ^T	56,50	0,007	0,089	0,038	-0,015	2,132
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CCM 3762	93,00	0,015	0,171	0,072	-0,015	2,138
<i>Bifidobacterium breve</i>	CCM 3763	91,00	0,013	0,164	0,069	-0,018	2,092
<i>Bifidobacterium infantis</i>	CCM 17930	63,50	-0,001	0,113	0,047	-0,014	2,082
<i>Bifidobacterium longum</i>	CCM 4990	210,00	0,138	0,409	0,188	-0,011	2,111
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCM 48335	107,00	0,032	0,191	0,076	-0,022	2,173
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CCM 4757	134,50	0,003	0,143	0,092	-0,053	2,003

- DNA byla izolována v koncentraci 56,50 až 210,00 ng/μl

10.3 Příprava mléčných výrobků pro izolaci DNA

Z analyzovaných 5 výrobků byly izolovány a promyty buňky dle kapitoly 9.3.1.

10.4 Příprava hrubých lyzátů buněk z 5 mléčných výrobků

Dle kapitoly 9.3.1 a 9.3.2 byly z 5 reálných vzorků (kapitola 9.2.1) připraveny hrubé lyzáty buněk. Dále z nich byla izolována DNA pomocí magnetického nosiče.

10.5 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk z 5 mléčných výrobků magnetickým nosičem

Dle kapitoly 9.3.3 byla izolována DNA pomocí magnetického nosiče. Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky (postup viz kapitola 9.5)

DNA byla izolována z jednotlivých výrobků v 5 opakováních. Výsledky spektrofotometrického stanovení DNA udává následujících 5 tabulek (Tabulka 5, 6, 7, 8, 9)

Tabulka 5: Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA z Nestlé BEBA pro 2

	1	2	3	4	5
c [ng/μl]	40,20	30,30	32,00	34,50	32,30
A 230 nm	0,836	0,733	0,613	0,657	0,845
A 260 nm	0,275	0,187	0,226	0,247	0,201
A 280 nm	0,293	0,215	0,226	0,280	0,240
A 320 nm	0,114	0,066	0,098	0,109	0,072
A 260 nm / A 280 nm	0,899	0,812	1,000	0,979	0,768

- Ze vzorku Nestlé BEBA pro 2 byla izolována DNA v koncentraci 32,00 až 40,20 ng/μl.

Tabulka 6: Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA z Nestlé BEBA pro 2 good night

	1	2	3	4	5
c [ng/μl]	25,80	30,50	22,00	28,50	30,50
A 230 nm	0,340	0,313	0,293	0,340	0,377
A 260 nm	0,167	0,240	0,142	0,197	0,209
A 280 nm	0,150	0,179	0,128	0,166	0,182
A 320 nm	0,064	0,118	0,054	0,083	0,087
A 260 nm / A 280 nm	1,198	1,544	1,189	1,373	1,284

- Ze vzorku Nestlé BEBA pro 2 good night byla izolována DNA v koncentraci 25,80 až 30,50 ng/μl.

Tabulka 7: Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA z Nestlé BEBA pro 1

	1	2	3	4	5
c [ng/μl]	7,00	5,75	6,00	12,30	14,50
c [ng/μl]	0,125	0,107	0,128	0,160	0,093
A 230 nm	0,034	0,027	0,028	0,032	0,029
A 260 nm	0,037	0,034	0,036	0,035	0,040
A 280 nm	0,006	0,004	0,004	0,006	0,005
A 320 nm	0,903	0,767	0,750	0,832	0,793

- Ze vzorku Nestlé BEBA pro 1 byla izolována DNA v koncentraci 5,75 až 14,50 ng/μl.

Tabulka 8: Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA z Hero Baby Lactum 2

	1	2	3	4	5
c [ng/μl]	21,50	51,00	37,00	50,30	51,00
A 230 nm	0,495	1,147	0,856	1,067	1,091
A 260 nm	0,135	0,305	0,227	0,313	0,302
A 280 nm	0,142	0,326	0,245	0,340	0,319
A 320 nm	0,049	0,101	0,079	0,112	0,098
A 260 nm / A 280 nm	0,925	0,907	0,892	0,882	0,923

- Ze vzorku Hero Baby Lactum 2 byla izolována DNA v koncentraci 21,50 až 51,00 ng/μl.

Tabulka 9: Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA z Babio Biomlého 2 s probiotiky

	1	2	3	4	5
c [ng/μl]	11,80	16,00	9,50	13,50	10,50
A 230 nm	0,319	0,394	0,213	0,254	0,232
A 260 nm	0,060	0,081	0,054	0,071	0,054
A 280 nm	0,077	0,096	0,058	0,071	0,055
A 320 nm	0,013	0,017	0,016	0,017	0,012
A 260 nm / A 280 nm	0,734	0,810	0,905	1,000	0,977

- Ze vzorku Babio Biomléko 2 s probiotiky byla izolována DNA v koncentraci 9,50 až 16,00 ng/μl.
- Ze všech výrobků byla izolována DNA v dostatečném množství pro PCR

10.6 Příprava DNA pro PCR a provádění PCR

Jednotlivé vzorky DNA byly naředěny na koncentraci 10 ng / μ l. Na koncentraci 10 ng / μ l byla naředěna i DNA izolována z kontrolních sbírkových kmenů metodou fenolové extrakce (pozitivní kontrola).

Směsi pro PCR byly připraveny do 0,2 ml mikrozkušavek dle kapitoly 9.6

Mikrozkušavky s připravenými směsmi pro PCR byly vloženy do termocykleru a dle použitých primerů byl zvolen program pro amplifikaci (viz kapitola 9.7).

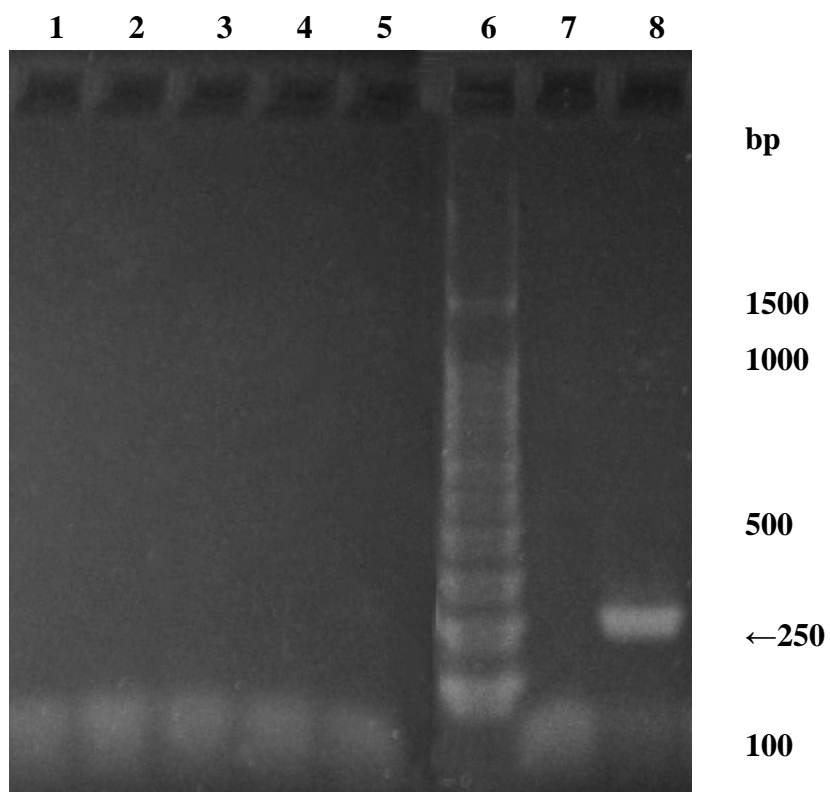
10.7 Identifikace bakterií pomocí PCR

Byly provedeny PCR (celkem 8 různých PCR reakcí) dle kapitoly 9.7 a byly detegovány produkty PCR dle kapitoly 9.8. Amplifikováno bylo 10 ng DNA / PCR směs izolované z jednotlivých výrobků.

10.7.1 Průkaz bakterií rodu *Lactobacillus*

Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* je uvedena na Obr. 9. Specifické produkty PCR byly o velikosti 250 bp.

Obr. 9: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus*



Číslo běhu	DNA	Produkt PCR
1	Nestlé BEBA pro 2	-
2	Nestlé BEBA pro 2 good night	-
3	Nestlé BEBA pro 1	-
4	Hero Baby Lactum 2	-
5	Babio Biomléko 2 s probiotiky	-
6	Standard	Standard
7	Negativní kontrola	-
8	Pozitivní kontrola [10 ng/μl] <i>Lactobacillus</i> CCM 48335	+

+...produkt PCR detegován

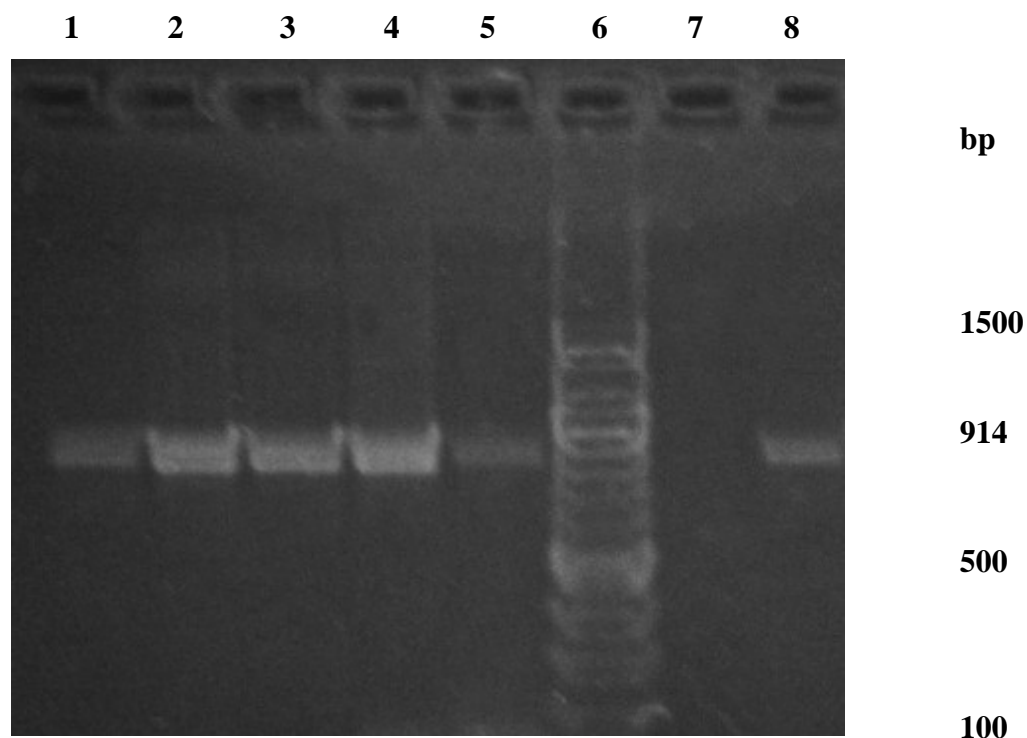
-...produkt PCR nebyl detegován

- Produkty PCR specifické pro rod *Lactobacillus* nebyly detegovány, s výjimkou kontroly

10.7.2 Průkaz bakterií rodu *Bifidobacterium*

Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Bifidobacterium* je uvedena na Obr. 10. Specifické produkty PCR byly o velikosti 914 bp.

Obr. 10: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Bifidobacterium*



Číslo běhu	DNA	Produkt PCR
1	Nestlé BEBA pro 2	+
2	Nestlé BEBA pro 2 good night	++
3	Nestlé BEBA pro 1	++
4	Hero Baby Lactum 2	++
5	Babio Biomléko 2 s probiotiky	+
6	Standard	Standard
7	Negativní kontrola	-
8	Pozitivní kontrola [10 ng/μl] <i>B. animalis</i> CCM 4988 ^T	+

+...produkt PCR detegován

-...produkt PCR nebyl detegován

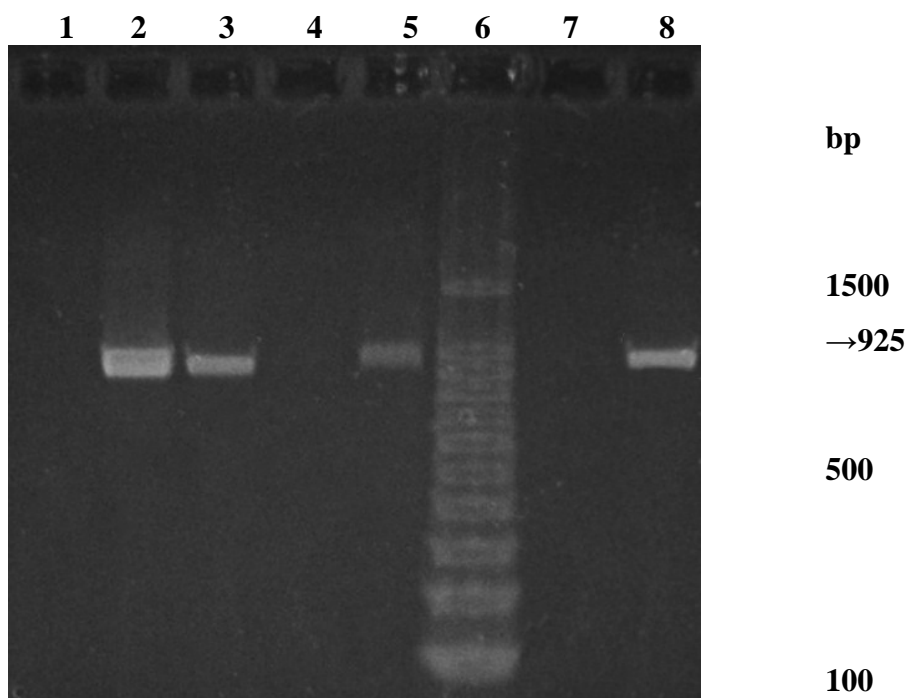
- Produkty PCR specifické pro rod *Bifidobacterium* byly detegovány po amplifikaci DNA izolované ze všech výrobků.

10.7.3 Průkaz bakterií druhu *Bifidobacterium animalis*

Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro druh *Bifidobacterium animalis* je uvedena na Obr. 11. Specifické produkty PCR byly o velikosti 925 bp.

Obr. 11: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro druh

Bifidobacterium animalis



Číslo běhu	DNA	Produkt PCR
1	Nestlé BEBA pro 2	-
2	Nestlé BEBA pro 2 good night	++
3	Nestlé BEBA pro 1	+
4	Hero Baby Lactum 2	-
5	Babio Biomléko 2 s probiotiky	+
6	Standard	Standard
7	Negativní kontrola	-
8	Pozitivní kontrola [10 ng/μl] <i>B. animalis</i> CCM 4988 ^T	+

+...produkt PCR detegován

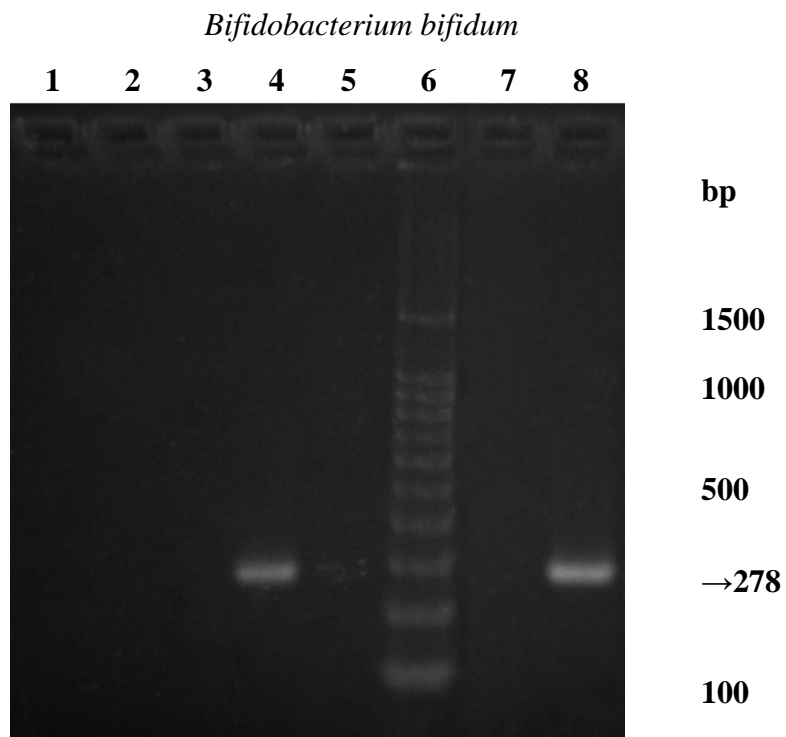
-...produkt PCR nebyl detegován

- Produkty PCR specifické pro druh *Bifidobacterium animalis* byly detegovány po amplifikaci DNA v běhu 2, 3 a 5 (izolované z Nestlé BEBA pro 2 good night, Nestlé BEBA pro 1 a Babio Biomléko 2 s probiotiky). Po amplifikaci DNA z výrobků Nestlé BEBA pro 2 a Hero Baby Lactum 2 produkty PCR detegovány nebyly.

10.7.4 Průkaz bakterií druhu *Bifidobacterium bifidum*

Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro druh *Bifidobacterium bifidum* je uvedena na Obr. 12. Specifické produkty PCR byly o velikosti 278 bp.

Obr. 12: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro druh



Číslo běhu	DNA	Produkt PCR
1	Nestlé BEBA pro 2	-
2	Nestlé BEBA pro 2 good night	-
3	Nestlé BEBA pro 1	+
4	Hero Baby Lactum 2	-
5	Babio Biomléko 2 s probiotiky	-
6	Standard	Standard
7	Negativní kontrola	-
8	Pozitivní kontrola [10 ng/μl] <i>B. bifidum</i> CCM 3762	+

+...produkt PCR detegován

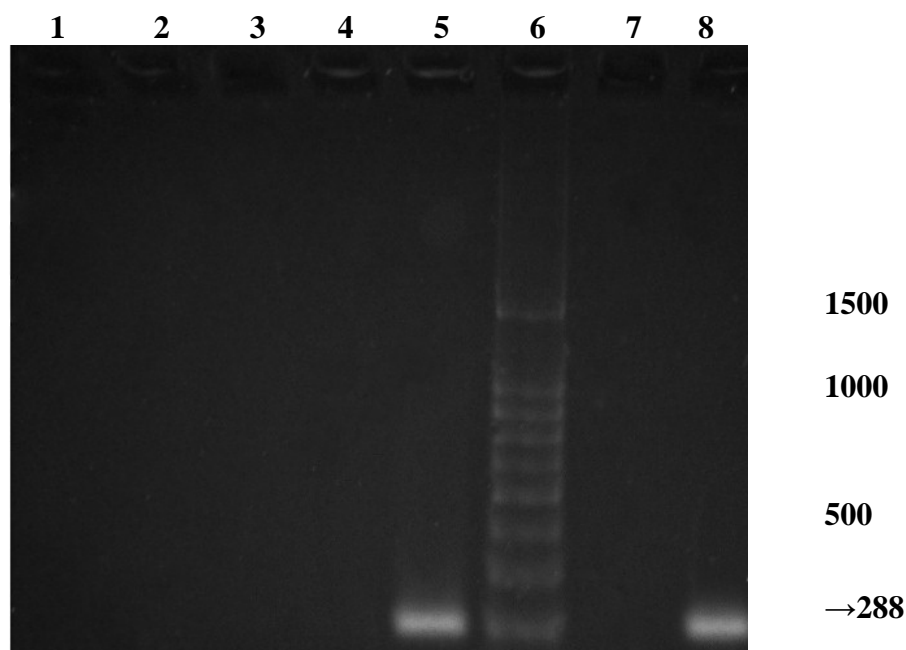
-...produkt PCR nebyl detegován

- Produkty PCR specifické pro druh *Bifidobacterium bifidum* byly detegovány po amplifikaci DNA v běhu 3 izolované z Nestlé BEBA pro 1. Po amplifikaci DNA z výrobků Nestlé BEBA pro 2, Nestlé BEBA pro 2 good night, Hero Baby Lactum 2 a Babio Biomléko 2 s probiotiky produkty PCR detegovány nebyly.

10.7.5 Průkaz bakterií druhu *Bifidobacterium breve*

Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro druh *Bifidobacterium breve* je uvedena na Obr. 13. Specifické produkty PCR byly o velikosti 288 bp.

Obr. 13: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro druh *Bifidobacterium breve*



Číslo běhu	DNA	Produkt PCR
1	Nestlé BEBA pro 2	-
2	Nestlé BEBA pro 2 good night	-
3	Nestlé BEBA pro 1	-
4	Hero Baby Lactum 2	-
5	Babio Biomléko 2 s probiotiky	+
6	Standard	Standard
7	Negativní kontrola	-
8	Pozitivní kontrola [10 ng/μl] <i>B. breve</i> CCM 3763	+

+...produkt PCR detegován

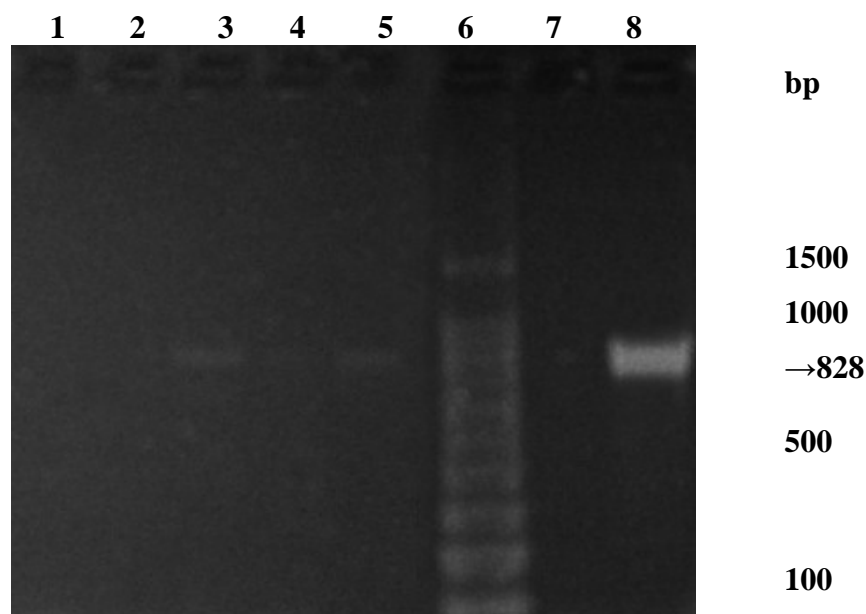
-...produkt PCR nebyl detegován

- Produkty PCR specifické pro druh *Bifidobacterium breve* byly detegovány po amplifikaci DNA v běhu č. 5 (izolované z výrobků Babio Biomléko 2 s probiotiky). Po amplifikaci DNA z výrobků Nestlé BEBA pro 2, Nestlé BEBA pro 2 good night, Nestlé BEBA pro 1 a Hero Baby Lactum 2 produkty PCR detegovány nebyly.

10.7.6 Průkaz bakterií druhu *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*

Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* je uvedena na Obr. 14. Specifické produkty PCR byly o velikosti 828 bp.

Obr. 14: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro kmen *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*



Číslo běhu	DNA	Produkt PCR
1	Nestlé BEBA pro 2	-
2	Nestlé BEBA pro 2 good night	-
3	Nestlé BEBA pro 1	+
4	Hero Baby Lactum 2	-
5	Babio Biomléko 2 s probiotiky	+
6	Standard	Standard
7	Negativní kontrola	-
8	Pozitivní kontrola [10 ng/μl] <i>B. infantis</i> CCM 17930	+

+...produkt PCR detegován

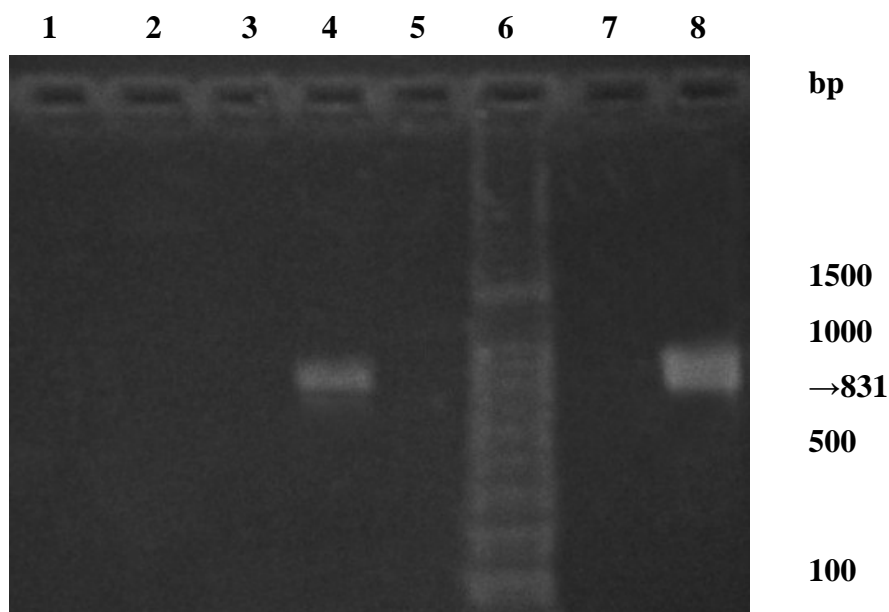
-...produkt PCR nebyl detegován

- Produkty PCR specifické pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* byly detegovány po amplifikaci DNA v běhu č. 3 a 5 (izolované z výrobků Nestlé BEBA pro 1 a Babio Biomléko 2 s probiotiky). Po amplifikaci DNA z výrobků Nestlé BEBA pro 2, Nestlé BEBA pro 2 good night a Hero Baby Lactum 2 produkty PCR detegovány nebyly.

10.7.7 Průkaz bakterií druhu *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*

Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro druh *Bifidobacterium longum* je uvedena na Obr. 15. Specifické produkty PCR byly o velikosti 831 bp.

Obr. 15: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*



Číslo běhu	DNA	Produkt PCR
1	Nestlé BEBA pro 2	-
2	Nestlé BEBA pro 2 good night	-
3	Nestlé BEBA pro 1	-
4	Hero Baby Lactum 2	+
5	Babio Biomléko 2 s probiotiky	-
6	Standard	Standard
7	Negativní kontrola	-
8	Pozitivní kontrola [10 ng/μl] <i>B. longum</i> CCM 4990	+

+...produkt PCR detegován

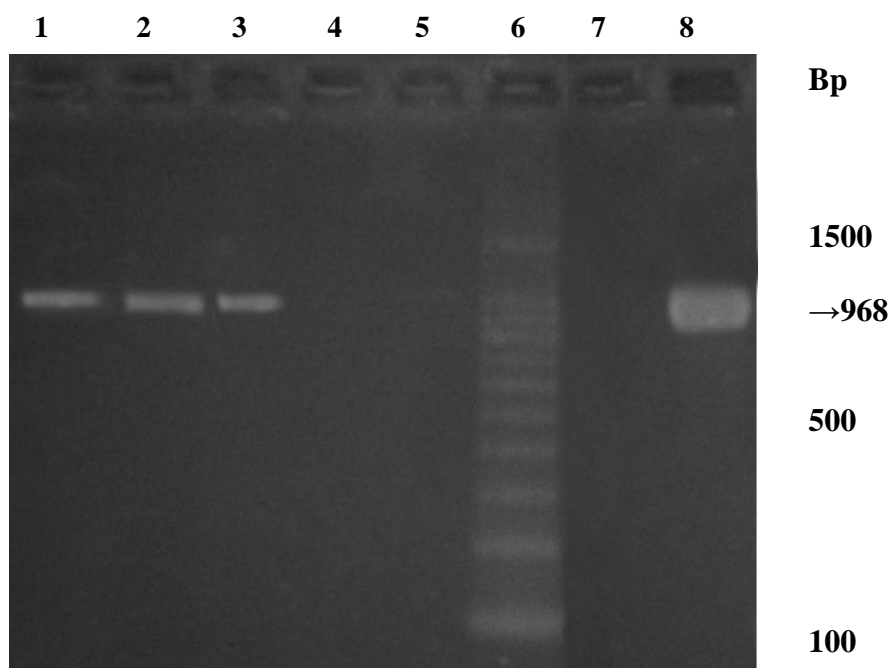
-...produkt PCR nebyl detegován

- Produkty PCR specifické pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* byly detegovány po amplifikaci DNA v běhu č. 4 (izolované z výrobku Hero Baby Lactum 2). Po amplifikaci DNA z výrobků Nestlé BEBA pro 2, Nestlé BEBA pro 2 good night, Nestlé BEBA pro 1 a Babio Biomléko 2 s probiotiky produkty PCR detegovány nebyly.

10.7.8 Průkaz bakterií druhu *Streptococcus thermophilus*

Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro druh *Streptococcus thermophilus* je uvedena na Obr. 14. Specifické produkty byly o velikosti 968 bp.

Obr. 16: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro druh *Streptococcus thermophilus*



Číslo běhu	DNA	Produkt PCR
1	Nestlé BEBA pro 2	+
2	Nestlé BEBA pro 2 good night	+
3	Nestlé BEBA pro 1	+
4	Hero Baby Lactum 2	-
5	Babio Biomléko 2 s probiotiky	-
6	Standard	Standard
7	Negativní kontrola	-
8	Pozitivní kontrola [10 ng/μl] <i>S. thermophilus</i> CCM 4757	+

+...produkt PCR detegován

-...produkt PCR nebyl detegován

- Produkty PCR specifické pro druh *Streptococcus thermophilus* byly detegovány po amplifikaci DNA v běhu č. 1, 2 a 3 (izolované z výrobků Nestlé BEBA pro 2, Nestlé BEBA pro 2 good night a Nestlé BEBA pro 1). Po amplifikaci DNA z výrobků Hero Baby Lactum 2 a Babio Biomléko 2 s probiotiky produkty PCR detegovány nebyly.

10.8 Shrnutí výsledků průkazu bakterií ve výrobcích pomocí PCR

Shrnutí výsledků PCR v analyzovaných mléčných výrobcích pro dětskou výživu je uvedeno v Tabulce 10.

Tabulka 10: Shrnutí výsledků PCR

Vzorek	<i>Rod Lactobacillus</i>	<i>Rod Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. infantis</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
1. Nestlé BEBA pro 2	-	+	+	-	-	-	-	+
2. Nestlé BEBA pro 2 good night	-	+	+	-	-	-	-	+
3. Nestlé BEBA pro 1	-	+	+	-	-	+	-	+
4. Hero Baby Lactum 2	-	+	-	+	-	-	+	-
5. Babio Biomléko 2S s probiotikem	-	+	+	-	+	+	-	-

- Ve všech výrobcích byla prokázána DNA rodu *Bifidobacterium*.
- Rod *Lactobacillus* nebyl detegován ani v jednom výrobku.
- Ve všech třech výrobcích od firmy Nestlé byla detegována DNA *Bifidobacterium animalis* a *Streptococcus thermophilus*.
- V Nestlé BEBA pro 1 bylo detegováno vedle DNA druhu *Bifidobacterium animalis* i DNA *Bifidobacterium longum ssp infantis*.
- V Hero Baby Lactum 2 byla detegována DNA dvou druhů *Bifidobacterium*, a to *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum ssp. longum*.
- V Babio Biomléko 2S s probiotikem byly detegovány 3 druhy rodu *Bifidobacterium*, a to *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium longum ssp infantis*.

10.9 Srovnání výsledků PCR s údaji deklarovanými výrobcem

Jednotliví výrobci udávali rámcové složení probiotik ve výrobcích (s výjimkou jednoho výrobce). Srovnání výsledků je uvedeno v Tabulce 11.

Tabulka 11: Srovnání výsledků

Výrobek	Co udává výrobce	Vlastní výsledek
Nestlé beba pro 2	Termofilní bakterie Bifidogenní bakterie	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>
Nestlé BEBA pro 2 good night	Termofilní bakterie Bifidogenní bakterie	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>
Nestlé BEBA pro 1	Neudává	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>infantis</i>
Hero Baby Lactum 2	Probiotika	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>longum</i>
Babio Biomléko 2 s probiotikem	Bifidobakterie	<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>infantis</i>

- Výsledky PCR jsou v souladu s údaji deklarovanými výrobcem (s výjimkou jednoho výrobku, u něhož nebyly uvedeny). Probiotické bakterie byly navíc zařazeny do druhů.

11 DISKUZE

Doplňěk stravy není léčivo, léčivý přípravek ani léčivá látka. Definice doplňků stravy je uvedena v zákoně o potravinách. Jde o potraviny, jejichž účelem je doplňovat běžnou stravu. Mají vysoký obsah vitamínů, minerálů nebo jiných látek s nutričním či fyziologickým účinkem [76]. Jako doplňěk stravy se mohou využívat i probiotika. Probiotické bakterie se mohou navíc přidávat i do nejrůznějších potravinových výrobků.

Tato diplomová práce byla zaměřena na průkaz probiotických bakterií u 5 výrobků probiotické mléčné výživy pro děti.

Cílem byla identifikace druhů probiotických a termofilních druhů bakterií (Rod *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a druhů *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*, *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* a *Streptococcus thermophilus*.). Vybráno bylo pět volně prodejných mléčných výrobků pro děti. Bakterie byly identifikovány v přípravcích Nestlé BEBA pro 2, Nestlé BEBA pro 2 good night, Nestlé BEBA pro 1, Hero Baby lacrum 2, Babio Biomléko 2 s probiotikem. Pro analýzu byla využita nekultivační molekulárně – biologická metoda DNA amplifikace (PCR).

Jak je uvedeno výše, v současné době se pro rychlou identifikaci mikroorganismů stále ve větší míře využívají molekulárně biologické postupy, zejména polymerasová řetězová reakce. Reálné vzorky potravin a hrubé lyzáty buněk v nich obsažené však často obsahují inhibitory PCR, které jsou příčinou falešně negativních výsledků nebo snižují citlivost PCR. Proto je třeba věnovat pozornost izolaci a purifikaci DNA. Nejvíce používanou metodou izolace DNA je fenolová extrakce. Uvedený postup je však pracný a zdlouhavý. Proto jsou hledány alternativní metody izolace bakteriální DNA. K izolaci DNA z buněk bakterií mléčného kvašení přítomných ve výrobcích se osvědčila metoda využívající nespecifické adsorpce DNA na magnetické nosiče v prostředí vysoké koncentrace PEG 6000 a chloridu sodného [77]. Tento postup izolace DNA byl zvolen i pro tuto diplomovou práci. Takto izolovaná DNA byla amplifikovatelná v PCR.

11.1 Rodově specifické PCR pro rod *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*

V PCR pro rod *Lactobacillus* byl detegován specifický produkt PCR o velikosti 250 bp pouze u pozitivní kontroly, u všech pěti testovaných vzorků (Nestlé BEBA pro 2, Nestlé BEBA pro 2 good night, Nestlé BEBA pro 1, Hero Baby lacrum 2, Babio Biomléko 2 s probiotikem) detegován nebyl. Nebyla tím prokázána přítomnost bakterií rodu *Lactosacillus* v testovaných

výrobci. Žádný výrobce bakterie rodu *Lactobacillus* ve výrobcích nedeklaroval, tj. tedy nevyužil bakterie rodu *Lactobacillus* jako přídavek probiotických bakterií.

V PCR pro rod *Bifidobacterium* byl detegován specifický produkt PCR 914 bp u všech pěti testovaných vzorků (Nestlé BEBA pro 2, Nestlé BEBA pro 2 good night, Nestlé BEBA pro 1, Hero Baby lacrum 2, Babio Biomléko 2 s probiotikem).

Byla tím potvrzena přítomnost bakterií rodu *Bifidobacterium* ve všech testovaných preparátech. Ve výrobcích Nestlé BEBA pro 2, Nestlé BEBA pro 2 good night a Babio Biomléko 2 s probiotikem výrobce přímo uvádí, že obsahují bifidobakterie.

Ve výrobku Hero Baby lacrum 2 výrobce uvádí, že výrobek obsahuje probiotika. Vzhledem k tomu, že bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou považovány za probiotické, je toto konstatování ve shodě s údaji deklarovanými na výrobku. Pouze u výrobku Nestlé BEBA pro 1 výrobce neuvádí přítomnost probiotik na obalu, byly tam však detegovány zástupci rodu *Bifidobacterium*. Dle nové legislativy bude nezbytné uvádět veškeré údaje. Používání více druhů probiotických bakterií ve výrobcích se využívá z důvodu různých probiotických vlastností, kterým se neodlišují pouze druhy, ale i jednotlivé kmeny jednoho druhu [79].

11.2 Druhově specifické PCR

Bylo provedeno 5 druhově specifických PCR pro druhy *Bifidobacterium animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* ssp. *infantis*, *B. longum* ssp. *longum*. Z literatury je známo, že tyto druhy se často využívají jako probiotické [20].

Různé druhy byly ve výrobcích prokázány. Ve 2 výrobcích byl prokázán 1 druh, ve dvou výrobcích 2 druhy a v 1 výrobku 3 druhy. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 13.

Srovnání dosažených výsledků s údaji deklarovanými výrobcem (Tabulka 11), ukazují, že tato práce umožnila identifikovat jednotlivé druhy *Bifidobacterium*.

11.3 Druhově specifická PCR pro *Streptococcus thermophilus*

PCR pro druh *Streptococcus thermophilus* byl detegován specifický PCR produkt 968 bp u 2. a 3. vzorku (Nestlé BEBA pro 2 good night, Nestlé BEBA pro 1).

Byla tím potvrzena přítomnost bakterií *Streptococcus thermophilus* ve vzorcích Nestlé BEBA pro 2 good night, Nestlé BEBA pro 1, u nichž výrobce udává přítomnost termofilních bakterií.

11.4 Shrnutí rodové a druhové identifikace probiotik ve výrobcích

Shrnutí rodové a druhové identifikace probiotických bakterií ve výrobcích je následující:

Výrobek č. 1 Nestlé BEBA pro 2

Ve vzorku Nestlé BEBA pro 2 výrobce udává termofilní a bifidogenní bakterie. Ve výrobku byl prokázán rod *Bifidobacterium*, druh *Bifidobacterium animalis*. Byla prokázána přítomnost termofilních bakterií *Streptococcus thermophilus*.

Výrobek č. 2 Nestlé BEBA pro 2 good night

Ve vzorku Nestlé BEBA pro 2 good night výrobce udává, stejně jako u vzorku č. 1 – Nestlé BEBA pro 2, termofilní a bifidogenní bakterie. U tohoto výrobku byla prokázána přítomnost bakterií rodu *Bifidobacterium*, druhu *Bifidobacterium animalis* a dále *Streptococcus thermophilus*.

Výrobek č. 3 Nestlé BEBA pro 1

Ve výrobku Nestlé BEBA pro 1 výrobce neudává bakteriální složení. Ve vzorku byl prokázán výskyt bakterií rodu *Bifidobacterium*, a druhů *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* a *Streptococcus thermophilus*.

Výrobek č. 4 Hero Baby lactum 2

Ve výrobku Hero Baby lactum 2 výrobce udává, že obsahuje probiotika. Z probiotických bakterií byly stanoveny rody *Bifidobacterium* a druhy *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*.

Výrobek č. 5 Babio Biomléko 2 s probiotikem

Ve výrobku Babio Biomléko 2 s probiotikem výrobce udává, že obsahuje bifidobakterie. V tomto výrobku byly potvrzeny bakterie rodu *Bifidobacterium* a stanoveny druhy *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*.

V diplomové práci bylo určováno pouze 5 druhů bifidobakterií, je možné že výrobce využil i jiného druhu, než bylo sledováno.

PCR je metoda vhodná pro důkaz obsahu probiotik ve výrobcích určených pro v umělou mléčnou výživu pro děti. Je poměrně rychlá a snadná. Výrobce na obalu deklaroval přítomnost bakterií, které jsme pomocí PCR prokázali. Nevýhodou je, že jsme nezjistili, zda tyto bakterie byly opravdu živé. To se může zjistit buď kultivačně, nebo pomocí metody EMA – PCR.

12 ZÁVĚR

Byla provedena analýza přítomnosti probiotických druhů bakterií (rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, pěti vybraných druhů *Bifidobacterium* a bakterie *Streptococcus thermophilus*) v pěti mléčných výrobcích určených pro dětskou výživu.

Ani v jednom z výrobků nebyla prokázána přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus*. Ve všech výrobcích byly prokázány bakterie rodu *Bifidobacterium*, které byly zařazeny do 5 různých druhů. Ve dvou výrobcích byl prokázán druh *Streptococcus thermophilus*. Lze konstatovat, že výsledky jsou v souladu s údaji deklarovanými výrobcí. Probiotické bakterie byly identifikovány ve všech výrobcích a navíc byly zařazeny do druhů.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Gregora, M., Paulová, M. Výživa kojenců. Grada Publishing, a.s., Praha, 2005. ISBN 80-247-1291-1
- [2] Nevoral, J. a kol.: Výživa v dětském věku. Nakladatelství H&H Vyšehradská, s.r.o., Praha, 2003. ISBN 80-86-022-93-5
- [3] Hrstková, H. Výživa kojenců a mladších batolat. 1.vyd. Brno: NCO-NZO, 2003. 77s. ISBN 80-7013-385-6
- [4] Kudlová, E. Mydlilová, A. Výživové poradenství u dětí do dvou let. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2005. 148s. ISBN 80-247-1039-0
- [5] FRÜHAUF, P.: Výživa kojence. Vychází jako příloha časopisu *Pediatric pro praxi*, *Pediatr. pro Praxi*, SOLEN, s. r. o. Olomouc, 2008. ISSN 1213-0494. Dostupné z WWW: http://kddl.lf1.cuni.cz/download/brozura_ped_fruhauf.pdf
- [6] Illková, O., Nečasová, L., Vašíčková, Z.: Zdravá výživa malých dětí: od narození do 6 let. Portál, Praha, 2005. ISBN 80-7367-030-5
- [7] Optimální kojenecká a batolecí výživa [online]. Dostupná z WWW: <http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/optimalni-kojenecka-a-batolecivyviva-445457>
- [8] Marounek, M., Březina, P., Šimůnek, J.: Fyziologie a hygiena výživy. Vyškov, 2000. ISBN 80-7231-057-7
- [9] Gregora, M.: Péče o novorozence a kojence. Grada Publishing, a.s., Praha, 2001. ISBN 80-247-0060-3
- [10] Karmel, A.: Vaříme pro kojence a batolata, ANAG, Olomouc, 2007, ISBN 978-80-7263-417-0
- [11] Drdák, M.: *Technologia rastlinných neúdržných potravín*. Alfa, Bratislava, 1987. ISBN 80-05-00121-5
- [12] <https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_2283.html>
- [13] Kejvalová, L.: Výživa dětí od A do Z. Vyšehrad, Praha, 2005. ISBN 80-7021-773-1
- [14] Dědek, M.: Pověry a mýty o kojenecké výživě. *Výživa a potraviny*, 61, 2006, č. 6, s. 150-151 [online]. Dostupné z WWW: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=150&ch=13&typ=1&val=53870>

- [15] Kavina, J.: Zbožíznalství potravinářského zboží pro 3. ročník. IQ 147 s.r.o., Praha, 1997.
- [16] Ūrgeová, E., Marecová, M., 2003. Probiotické kmene mikroorganizmov a ich účinnok na hostiteľský organizmus. Nova Biotechnologica III-2, p. 145-157
- [17] Jan G., Leverrier P., Proudly I., Roland N. (2002): Survival and beneficial effects of propionibacteria in the human gut: in vivo and in vitro investigations. Lait 82: 131-144.
- [18] Kohoutková, J., Možnosti využití biologických agens v ochraně potravního řetězce, [online]. [cit. 2012-01-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.phyotosanitary.org/projekty/2004/vvf-08-04.pdf>>
- [19] Ordinace: Lactobacillus [online]. [cit. 2012-02-04]. Dostupný z WWW: <<http://www.ordinace.cz/clanek/lactobacillus/>>
- [20] Beneš, Z., Krtek, V., Lacidofil v léčbě dráždivého tračníku, [online]. [cit. 2012-03-06]. Dostupný z WWW: <<http://www.rougier.cz/lacidofil01.pdf>>
- [21] Aktivia: Monografie o výrobku [online]. [cit. 2006-02-06]. Dostupný z WWW: <<http://www.activia.cz/activia/monografie.pdf>>
- [22] Gibson, G., Williams, CH., Functional foods, Boca Raton USA: Woodhead Publishing Limited, 2000. první vydání.
- [23] Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotik lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbio. 1998.
- [24] Voltava M., kolektiv. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun, 2003. stránky 136-137.
- [25] Merk K., Borelli C., Korting H. CH. Lactoacilli - bacteria- host interactions with special regard to the urogenital trakt. Int. J. Food Microbio. 24. Novembre 2004. stránky 9-18.
- [26] Görner F., Valík L'. Aplikovaná mikrobiológia poživatin 1. vydání. Bratislava: Malé centrum, 2004. str. 528. ISBN 80-967064-9-7.
- [27] Klaban V. Svět mikrobů / Malý mikrobiologický slovník. 1. vydání. Hradec Králové : Gaudeamus. 1999. str. 303. 80-7041-639-4.
- [28] Espinoza Y. R., Gallardo-Navarro Y. Non-dairy probiotic products. Scien. Dir. 17. July 2008. stránky 1-11.
- [29] Tomás M. S. J., Nader-Macías M. E. Viability of vaginal probiotic lactobacilli during refrigerated and frozen storage. Els. Ltd. 28. January 2004. stránky 1-5.

- [30] Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. F. Encyklopedia of dairy sciences. Acad. Els. Scien. Ltd. 2003.
- [31] Sedláček I. Taxonomie prokaryot. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2007. 270s.
- [32] Proč užívat probiotika? Protexin, ASP CZECH s.r.o.
- [33] Žižka, B., Korbelová, M. Mikrobiologie, 1. vydání, Praha 1992.
- [34] Holm, F. Gut Health, Evropský projekt Flair – Flow souhrnná zpráva o vlivech pro a prebiotik, Food Group Denmark
- [35] *Bifidobacterium animalis* [online]. [cit. 2013-03-05]. Dostupný z WWW: < <http://room185swikiatpacs.wikispaces.com/Alison's+Bacteria> >
- [36] Rada, V., Nevoral, J., Vlková, E., Trojanová, I., Killer, J. Růst bifidobakterií v kravském a mateřském mléce, Sborník celostátních přehlídek sýrů, VŠCHT Praha 2006, s. 78–81 .
- [37] Mattarelli, P., Bonaparte, C., Pot, B., Biavati, B., 2008. Proposal to reclassify the three biotypes of *Bifidobacterium longum* as three subspecies: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* subsp. nov., *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*.: comb. nov. And *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* comb. nov. *Int. J. syst. Evol. Microbiol.* 58, 767-772.
- [38] Teplý, M. Čisté mlékařské kultury: Výroba, kontrola, použití. Praha, SNTL, 1984. 295 s.
- [39] Metody detegce a charakterizace *Campylobacter* sp. [on-line]. [cit.2012-10-26]. Dostupný z WWW: < [http:// www.chemicke-listy.cz](http://www.chemicke-listy.cz) >.
- [40] Burdychová, R. Sládková, P. Mikrobiologická analýza potravin. 1. vyd. Brno: Editační středisko MZLU, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7375-116-6.
- [41] Bruce A., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Základy buněčné biologie. Ústí nad Labem : Esperopublish, 1998. str. 630s. 80-902906-0-4.
- [42] Grennan, B., O'Sullivan N. A. PCR-ELISAs for Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Poultry Symplex. *Bio Techniques.* 2001, roč. 30, č. 3, s. 602- 610.
- [43] Čikoš, Š., Koppel, J., Kantíková, M. Polymerasová reťazová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a diagnostike. 1. vyd. Košice: Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, 2001. 203 s.
- [44] Rosypal, S., a kol. Úvod do molekulární biologie. 3. vyd. Brno: GRAFEX, 2002. 1199 s. ISBN 80-902562-4-4.

- [45] DNA polymerasy a pufry [online]. [cit. 2012-03-03]. Dostupný z WWW: <<http://www.top-bio.cz/kat-info.asp?kat=1>>
- [46] Biocrawler: encyclopedia. Polymerase chain reaction. [cit. 2012-03-03]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction>
- [47] Ruml, T., Rumlová M., Pačes, V. Genové inženýrství. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [48] Zeidan, H. M., Dashek, W. V. Experimental approaches in biochemistry and molecular biology. Dabuque: Wm. C. Brown. 219 s. ISBN 0697167356.
- [49] Debruyne, L., Sanym, E., De Brandt, E. Comparative performance of different PCR assays for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Research in Microbiology*. 2008, roč. 159, č. 2, s. 88-93.
- [50] Kočárek, E. Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika. 1. vyd. Praha: Scientia, 2004. 211 s. ISBN 80-7183-326-6.
- [51] Pavlík, E. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 3 [online]. 2005 [cit. 2012-03-03]. Dostupný z WWW: <<http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf>>.
- [52] Raclavský, V. Amplifikace DNA pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) [online]. 2003 [cit. 2009-03-03]. Dostupný z WWW: <<http://biologie.upol.cz/metody/Amplifikace%20pomoci%20PCR.htm>>
- [53] Petrová K. Identifikace bakterií mléčného kvašení (BMK) v mléčných výrobcích s využitím metod amplifikace DNA. Diplomová práce. Brno: Masarykova univerzita v Brně. 2004.
- [54] Hirschbein B. L., Brown D. W., Whitesides G. M.: *Chemtech March*, 172 (1982)
- [55] Whitesides G. M., Kazlauskas R. J., Josephson L.: *Trends Biotechnol.* 1, 144 (1983)
- [56] Dunlop E. H., Feiler W. A., Mattione M. J.: *Biotech. Adv.* 2, 63 (1984)
- [57] Setchell C. H.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 35B, 175 (1985)
- [58] Mohr P., Kaiser G., Holtzauer M., *Wiss Fortschr.* 40, 132 (1990)
- [59] Bolto B. A., Spurling T. H.: *Environ. Monit. Assess.* 19, 139 (1991)
- [60] Liberti P. A., Feeley B. P. v knize: *Cell Separation Science and Technology* (Kompala D. S., Todd P., ed.), ACS Symposium Series 464. Str. 268. American Chemical Society, Washington DC 1991.
- [61] Burns M. A., Kvesitadze G. I., Graves D. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 27, 137 (1985)
- [62] Shinkai M., Honda H., Kobayashi T.: *Biocatalysis* 5, 61 (1991)
- [63] Matsunaga T.: *Trends Biotechnol.* 9, 91 (1991).

- [64] Nakamura N., Matsunga T.: *Anal. Chem. Acta* 281, 585 (1993)
- [65] Nakamura N., Burgess J. G., Yaguida K., Kudo S., Sakaguchi T., Matsunga T.: *Anal. Chem.* 65, 2036 (1993).
- [66] Rosensweig R. E.: *Sci. Am.* 247, 136 (1982).
- [67] Odenbach S.: *Adv. Colloid Interface Sci.* 46, 263 (1993).
- [68] Horák D., Rittich B., Španová A. (2007): Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311: 249–254
- [69] Šafařík I., Šafaříková M. (1999): Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B*, 722: 33–53.
- [70] Španová A., Horák D., Soudková E., Rittich B. (2004): Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres designed for polymerase chain reactions applications. *Journal of Chromatography B*, 800: 27–32.
- [71] Holmberg A., Blomstergren A., Nord O., Lukacs M., Lundeberg J., Uhlén M. (2005): The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* 26, 501–510.
- [72] Roy D., Sirois S. (2000): Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 191: 17-24
- [73] Dubernet S., Desmasures N., Guéguen M. (2002): A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.* 214: 271-275.
- [74] Matsuki T., Watanabe k., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H. (1999): Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-genetargeted species-specific primers. *Am. Soc. Microbiol.* 65: 4506-4512.
- [75] Sonja L., Drescher K., Heller K. J. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated göttingen minipigs. *App. Environ. Microbio.* 21. June 2001. stránky 4137-4143.
- [76] Michaelová I. *Doplňky stravy (Potraviny k doplnění jídelníčku)*. Praha : Sdružení českých spotřebitelů, o.s. 2007. str. 35. 978-80-903930-1-1.
- [77] Rittich B., Španová A., Horák D., Beneš M. J., Klesnilová L., Petrová K., Rybníkář A. (2006): Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 52: 143–148.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

bp	pár bází
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
MRS	Mann, Rogosa, Sharpe (MRS médium)
PCR	polymerázová řetězová reakce
pH	potenciál vodíku
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PEG	polyetylen glykol