

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2016

Renata Silná



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## PROBIOTIKA V POTRAVINOVÝCH VÝROBCÍCH

PROBIOTICS IN FOOD PRODUCTS

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Renata Silná

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

BRNO 2016





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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK1032/2015** Akademický rok: **2015/2016**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Renata Silná**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)  
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)  
Vedoucí práce **doc. RNDr. Alena Španová, CSc.**  
Konzultanti:

### Název bakalářské práce:

Probiotika v potravinových výrobcích

### Zadání bakalářské práce:

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

### Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

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

-----  
Renata Silná  
Student(ka)

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

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

V Brně, dne 31.1.2016

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



## **ABSTRAKT**

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které mají pozitivní zdravotní účinky na konzumenta, pokud jsou přidána v adekvátním množství do potravin. Nejznámější probiotika jsou bakterie mléčného kvašení a kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Teoretická část bakalářské práce byla zaměřena na využití probiotických mikroorganismů v potravinářství. V experimentální části bakalářské práce byly připraveny hrubé lyzáty ze třech potravinářských výrobků a metodou PCR byla dokázána přítomnost bakteriální DNA.

## **ABSTRACT**

Probiotics are living microorganisms with a positive effect on the consumer when they are added to food in adequate amount. The best known probiotic are lactic acid bacteria and yeast *Saccaromyces cerevisiae* var. *boulardii*. The theoretical part of the thesis is focused on using probiotics microorganisms in food. In the experimental part of the thesis were prepared crude lysates from three food products and the presence of bacterial DNA was proved by PCR method.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

probiotika, probiotické potraviny, polymerázová řetězová reakce (PCR), doména *Bacteria*, izolace DNA

## **KEY WORDS**

probiotics, probiotic food, polymerase chain reaction (PCR), domain *Bacteria*, DNA isolation



SILNÁ, R. *Probiotika v potravinových výrobcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 39 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc..

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
Renata Silná

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Aleně Španové za odborné vedení, ochotu a čas, který mi věnovala při vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za jejich podporu, trpělivost a povzbuzení po celou dobu studia.



## OBSAH

1. ÚVOD .....	11
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
2.1 Historie probiotik.....	12
2.2 Definice probiotik.....	12
2.3 Zdravotní efekty probiotik.....	12
2.4 Probiotické mikroorganismy .....	13
2.4.1 Rod <i>Bifidobacterium</i> .....	13
2.4.2 Rod <i>Lactobacillus</i> .....	14
2.4.3 Další probiotické mikroorganismy.....	14
2.5 Probiotické potraviny .....	15
2.5.1 Mléčné probiotické výrobky .....	15
2.5.2 Nemléčné probiotické výrobky .....	17
2.5.3 Doplnky stravy .....	19
2.6 Probiotika u dětí.....	19
2.7 Prebiotika.....	20
2.8 Symbiotika.....	20
2.9 Identifikace probiotických mikroorganismů .....	21
3. CÍL PRÁCE.....	23
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
4.1 Materiál.....	24
4.1.1 Použité potravinové výrobky .....	24
4.1.2 Pomůcky a přístroje.....	25
4.1.3 Chemikálie .....	26
4.1.4 Roztoky .....	26
4.2 Metody.....	27
4.2.1 Příprava vzorků pro analýzu .....	27
4.2.2 Lyze bakteriálních buněk .....	28
4.2.3 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk magnetickými mikročásticemi.....	28
4.2.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA .....	28
4.2.5 Příprava směsi pro PCR .....	29
4.2.6 Amplifikace DNA .....	29
4.2.7 Průkaz produktů PCR pomocí agarosové gelové elektroforézy.....	29

5.	VÝSLEDKY .....	31
5.1	Příprava hrubých lyzátů buněk z výrobků .....	31
5.2	Izolace DNA magnetickými mikročásticemi F kol B100 ox .....	31
5.3	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované DNA .....	31
5.4	Polymerázová řetězová reakce s primery Feub a Reub .....	32
5.5	Detekce produktů PCR specifických pro doménu <i>Bacteria</i> .....	32
6.	DÍZKUZE.....	34
6.1	Příprava hrubých lyzátů buněk a izolace DNA z výrobků .....	34
6.2	Polymerázová řetězová reakce pro doménu <i>Bacteria</i> .....	34
7.	ZÁVĚR.....	36
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	37



## 1. ÚVOD

Probiotické mikroorganismy jsou živé mikroorganismy přidávané do potravinářských výrobků a doplňků stravy podporujících zdraví spotřebitele. Je obecně známo, že stav střevní mikrobioty má vliv na celkovou pohodu a zdraví člověka. V posledních letech se lidé víc zajímají o zdravý životní styl a o stravu a proto neustále roste oblíbenost probiotických výrobků. Nejvíce známé jsou kysané mléčné výrobky obsahující bakterie mléčného kvašení, které zkvašují laktosu na kyselinu mléčnou, což ovlivňuje výslednou chuť, vůni i strukturu výsledného produktu. Probiotika udržují zdravou střevní mikrobiotu nahrazením škodlivých mikrobů za prospěšné bakterie. Příznivé zdravotní účinky probiotických mikroorganismů jsou závislé na kmenu daného mikroorganismu. Různé kmeny toho samého druhu jsou vždycky jedinečné a mohou mít odlišnou přilnavost na povrch střevní stěny, specifické imunologické a zdravotní efekty.

Nejčastěji se jako probiotika používají bakterie mléčného kvašení s rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Jediná známá probiotická kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* je významná v prevenci cestovatelského průjmu. O účincích probiotik na léčbu některých nemocí se stále vedou dohady a provádí výzkumy.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Historie probiotik

Fermentované výrobky obsahující probiotika byly vyobrazeny na egyptských hieroglyfech dlouho předtím, než byly vůbec objeveny mikroorganismy. Tibetští nomádi používali fermentované jačí mléko, protože se nekazilo při kočování z místa na místo. Ve starém Řecku a Římě také znali fermentované mléko a sýry a doporučovali tyto výrobky konzumovat lidem v rekonvalescenci a malý dětem. Prospěšné zdravotní účinky při konzumaci fermentovaných mléčných výrobků byly vědci zaznamenány už kolem roku 1800, avšak nebyla známá příčina. Elie Metchnikoff v roce 1905 předpokládal, že dlouhověkost národů konzumujících kysané mléčné výrobky je způsobena přítomností laktobacilů používaných pro fermentaci jogurtů a následnou přítomností těchto laktobacilů v jejich tlustém střevě. V roce 1922 při jedné z prvních studií na člověku, bylo prokázáno, že *Lactobacillus acidophilus* zlepšil zdravotní stav 30 pacientů trpících chronickou zácpou, průjmem nebo ekzémem. Termín probiotický byl poprvé použit v roce 1965, když byly u probiotik akceptovány pozitivní účinky na lidské zdraví. [1]

### 2.2 Definice probiotik

Slovo probiotický pochází z řeckého ‘pro bios‘ a znamená ‘pro život‘. Jedná se o poměrně nové slovo. Definice probiotik se během let měnily. Definice Organizace pro výživu a zemědělství/Světové zdravotnické organizace (Food and agriculture organization of the United Nations/World Health Organization, FAO/WHO) doporučovaná Mezinárodní vědeckou asociací pro probiotika a prebiotika (International scientific association for probiotics and prebiotics) nejlépe vystihuje vlastnosti probiotik a používá se dodnes: probiotika jsou živé mikroorganismy, které když se přidají v přiměřeném množství do potravin, mají pozitivní zdravotní účinky na hostitele. Tato definice uchovává historické prvky užívání živých mikroorganismů pro zdravotní účely, ale zároveň umožňuje aplikaci tohoto termínu nejen pro orální probiotika s účinky na střevní mikrobiotu. [4] Další definice uvádí, že probiotika jsou produkty, které obsahují životaschopné nepatogenní mikroorganismy schopné udělit zdravotní přínos hostiteli. Probiotická směs obsahující živé i mrtvé buňky způsobuje prospěšné biologické reakce. Přišlo se na to, že živé buňky jsou především zodpovědné za imunitní odpověď organismu a mají aktivní vliv na stávající mikrobiotu, zatímco mrtvé buňky mají protizánětlivé reakce. [3]

### 2.3 Zdravotní efekty probiotik

Zdravotní účinek probiotických mikroorganismů se může rozdělit na dva druhy. První je užívání probiotik ve zdraví, pro udržení vnitřní homeostázy organismu, ochrana před škodlivými mikroorganismy, posilování hostitelského imunitního systému a posílení střevní bariéry. Pro tyto účely je vhodné konzumovat mléčné výrobky nebo jiné potraviny obsahující probiotické mikroorganismy. Druhá možnost je užívání probiotik v nemoci, kdy se primárně jedná o léčbu gastrointestinálních chorob (nejčastěji průjem). Další aplikace probiotik je v prevenci urogenitálních chorob, zmírnění zácpy, jako ochrana proti cestovatelskému

průjmu, rakovině tlustého střeva a rakovině močového měchýře, prevence osteoporózy a prevence proti potravinovým alergiím. [4] Při nemoci se konzumují farmaceutické výrobky obsahující probiotické mikroorganismy. Bylo prokázáno, že probiotika můžou snižovat příznaky laktosové intolerance. Preventivně působí proti atopickému ekzému u kojenců. Zlepšení nálady bylo prokázáno u dospělých pacientů s mírnými symptomy deprese, kteří požívali fermentovaný nápoj. Úzkostlivé stavy se zlepšily u pacientů, kteří požívali po dobu osmi týdnů fermentovaný nápoj. [14]

## 2.4 Probiotické mikroorganismy

Termín probiotika je často spojován s bakteriemi, nejvíc s bakteriemi mléčného kvašení, ale jsou i jiné mikroorganismy, které vykazují probiotické vlastnosti. Jako probiotické mikroorganismy jsou nejvíce známé bakterie mléčného kvašení, zvláště rody *Lactobacillus* a dále bakterie rodu *Bifidobacterium* a další. Příklad mikroorganismů, které se používají jako probiotika, je uveden v Tabulce 1. Je výhodou, když jsou probiotické bakterie lidského původu. Je důležité, aby probiotické kmeny přežily v místech, kde se předpokládá, že budou plnit svoji funkci. Často to bývá ve střevech (gastrointestinální trakt). Musí být tolerantní k nízkému pH, které je v žaludku, a vysoké koncentraci žlučových kyselin, které jsou v tenkém střevě. Pro maximální účinnost by měly být probiotické kmeny schopny rozmnožování a kolonizace ve specifických místech gastrointestinálního traktu (tlusté střevo). Nesmí být patogenní, alergenní a karcinogenní. [3, 15] Další funkční vlastnosti užívané pro charakterizaci probiotik jsou produkce antimikrobiálních sloučenin, adheze ke střevní sliznici, neschopnost produkce enzymů nezbytných pro vznik biogenních aminů, posuzuje se citlivost k antibiotikům a schopnost tolerance k přítomnosti enzymů slinivky břišní. [26]

**Tabulka 1:** Mikroorganismy obvykle používané jako probiotika [upraveno podle 19, 20]

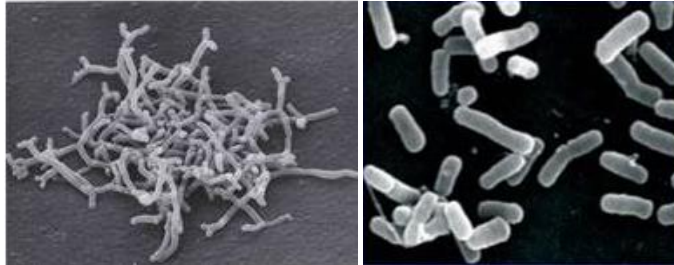
<b>Rod <i>Lactobacillus</i></b>	<b>Rod <i>Bifidobacterium</i></b>	<b>Další probiotické druhy</b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. longum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>

### 2.4.1 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou jedny z prvních mikroorganismů, které začínají kolonizovat střevo novorozenců a rychle se stávají převládající mikroflorou. [20] Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou Gram pozitivní, anareobní, nesporulující, heterofermentativní a nepohyblivé mikroorganismy. Vyskytují se v mnoha tvarech, mohou být krátké, zakřivené, zakulacené

nebo rozdvojené ypsilonové tyčinky. Bifidobakterie jsou složky zdravé střevní mikroflory, ale lze je nalézt i v pochvě a v ústní dutině. [4]

Nejznámější zástupci rodu *Bifidobacterium* jsou: *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* a *B. animalis* ssp. *lactis*. Morfologie dvou druhů je uvedena na Obrázku 1.

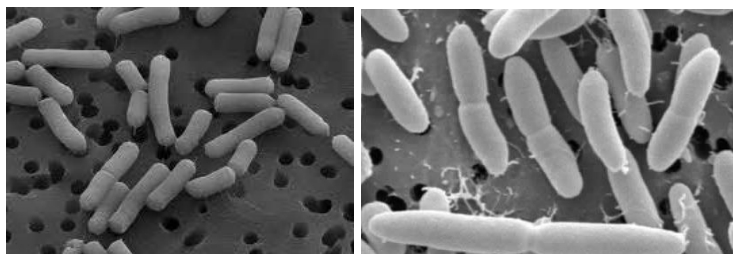


**Obrázek 1:** *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* [22, 23]

#### 2.4.2 Rod *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou Gram pozitivní, nesporogenní, bezbičíkaté tyčinky nebo koky. Jsou striktně fermentativní a anaerobní. Lactobacily jsou schopny homofermentativního a heterofermentativního mléčného kvašení. V prvním případě je glukosa zkvašována pouze na kyselinu mléčnou, ve druhém případě vznikají i vedlejší produkty, jako je oxid uhličitý, ethanol a někdy i kyselina octová. Laktobacily se přirozeně vyskytují v zažívacím traktu u zdravých jedinců a ve vaginálním sekretu u zdravých žen. [4]

Nejznámější zástupci rodu *Lactobacillus* jsou: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. debrueckii*. Morfologie buněk dvou druhů je uvedena na Obrázku 2.



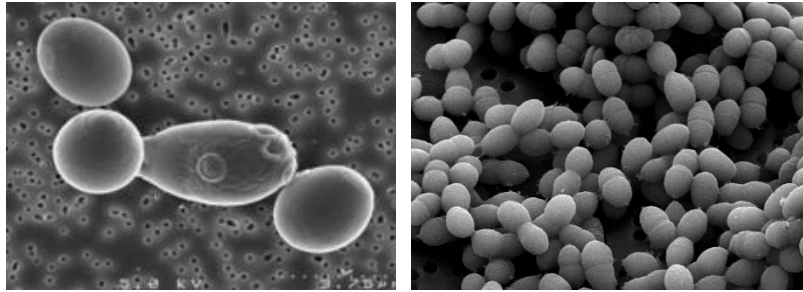
**Obrázek 2:** *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus acidophilus* [22, 25]

#### 2.4.3 Další probiotické mikroorganismy

Jako probiotické bakterie jsou známy zástupci rodu *Pediococcus* a dále rody *Bacillus* a jejich spory. Výhodou bakteriálních spor je jejich rezistence vůči vysokým teplotám, takže se mohou skladovat při pokojové teplotě v sušené formě. Spory jsou schopny dostat se do tenkého střeva, aniž by byly zničeny silnými kyselinami obsaženými v žaludku. [4] Probiotická bakterie *Streptococcus thermophilus* je mimo jiné používána pro zlepšení stravitelnosti laktosy u lidí trpících laktosou intolerancí. [19]

Známá kvasinka s prokázanými probiotickými vlastnostmi je *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*. Tato kvasinka se používá jako lék proti gastrointestinálním chorobám, stimuluje imunitní systém, zabraňuje tvorbě karcinogenních látek ve střevě a redukuje laktosovou intoleranci. Pro zpracování do potravin a pro gastrointestinální systém není

dostatečně stabilní, takže se používá mikroenkapsulace kvasinkových buněk např. do syrovátkového proteinového koncentráту nebo do arabské gumy. [4, 16, 17] Příklad morfologie buněk *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* a *Streptococcus thermophilus* je uveden na Obrázku 3.



**Obrázek 3:** *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* a *Streptococcus thermophilus* [24, 25]

## 2.5 Probiotické potraviny

Potraviny obsahující probiotika se řadí mezi tzv. funkční potraviny. Funkční potravina je konvenční potravina upravená tak, aby měla pozitivní zdravotní vliv na spotřebitele. Kromě obvyklých nutričních hodnot musí mít určitou zdravotní hodnotu navíc. Zdravotní efekt musí být prokázán v nezávislých klinických studiích. [6] Potraviny, které obsahují probiotika musí zachovávat typické sensorické vlastnosti pro danou potravinu. [15]

Probiotické výrobky mohou obsahovat jeden druh probiotik nebo obsahují více druhů. Nejvíce se vyskytují v mléčných výrobcích, ale na trhu jsou k dostání i probiotické výrobky, které neobsahují žádné mléčné složky. Spotřeba probiotických výrobků roste po celém světě. Důvodem jsou příznivé zdravotní vlastnosti probiotik.

### 2.5.1 Mléčné probiotické výrobky

Mléčné výrobky a jejich konzumace jsou ideálním prostředkem pro přenos probiotických bakterií do lidského gastrointestinálního traktu. Nejznámější mléčné probiotické výrobky jsou různé sýry, jogurty nebo zmrzliny. Používají se i v dětské výživě např. do dětských sušených mlék. [4]

Nejčastější způsoby výroby probiotických fermentovaných mléčných výrobků jsou následující:

- 1) přidavek probiotik spolu se startovací kulturou,
- 2) produkce dvou oddělených várek, první obsahuje probiotické mikroorganismy v mléce pro dosažení vysoké koncentrace životaschopných buněk, druhá se startovací kulturou; po dokončení fermentační fáze se obě várky smíchají,
- 3) použití probiotických mikroorganismů jako startovací kultury.



Při výrobě fermentovaných probiotických výrobků musí být dodržena vhodná inkubační teplota, případně musí být doplňována startovací kultura tak, aby metabolity tvořené probiotiky nezačaly vytvářet nežádoucí aroma. Probiotika použitá pro výrobu musí být kompatibilní se startovací kulturou, aby nedocházelo k produkci inhibitorů, které by zničily probiotika. [4]

### 2.5.1.1 Jogurty

Jogurty jsou nejoblíbenější probiotické fermentované výrobky. Na trhu jsou k dostání v různých variacích, např. přírodní bílý jogurt, míchaný jogurt, nebo různé jogurtové nápoje. Vyrábí se fermentací mléka při 42-45 °C za použití čistých mlékařských kultur *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus*. Během fermentace se poměr mezi těmito dvěma druhy kultur neustále mění. Někdy se v průběhu kultivace nebo po kultivaci přidávají další laktobacily nebo bifidobakterie. Takto vyrobené jogurty se nazývají "bio-jogurty". Nejčastější probiotické mikroorganismy používané do jogurtů jsou uvedeny v Tabulce 2. Životaschopnost probiotických bakterií v jogurtech závisí na pH, teplotě skladování, zbytku kyslíku, na antagonistických aktivitách mezi jednotlivými probiotickými kmeny, nebo na přidavku ovocných příchutí. [12, 13]

**Tabulka 2:** Probiotické kmeny přidávané do jogurtů a jejich účinky na zdraví [20]

Probiotický mikroorganismus	Zdravotní účinek
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Prevence proti průjmu způsobeného antibiotiky, léčba a prevence průjmu způsobeného rotaviry, imunomodulační reakce.
<i>Bifidobacterium animalis</i> Bb-12	Regulace střevní mikroflory, zmírnování alergií, zlepšení zácpy. Prevence cestovatelského a virového průjmu
<i>Lactobacillus reuterii</i> ATCC 55730	Kolonizace střevního traktu, léčba akutního průjmu, zkrácení průběhu průjmu způsobeného rotaviry.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Prevence cestovatelského průjmu, prevence průjmu způsobeného antibiotiky.

### 2.5.1.2 Sýry

Sýry jsou rozmanitá skupina mléčných výrobků, které se vyrábí z mléka, které se vysráží. Ze sraženiny se postupně sbírá vznikající syrovátka a sýřenina se dále upravuje. Poté se sýry tvarují, nasolují a nakonec se nechávají různou dobu zrát. [11] Sýry se dají rozdělit podle obsahu vlhkosti na měkké, polotvrdé a tvrdé sýry. Sýry jsou vhodné pro dodání probiotických bakterií do gastrointestinálního traktu. Mají mnoho výhod ve srovnání s jogurty a fermentovanými mléky. Patří mezi ně vyšší pH, vysoká výživová a energetická hodnota, vyšší obsah tuku a vyšší trvanlivost. Husté prostředí a relativně vysoký obsah tuku v sýru poskytují ochranu probiotickým bakteriím při průchodu žaludkem. V porovnání s jogurty se do sýra musí přidat větší množství probiotik s vyšší životaschopností, aby plnily svoji funkci. Probiotika nesmí negativně ovlivňovat senzorycké a nutriční vlastnosti během zrání a skladování sýra. [12, 13]

### 2.5.1.3 Zmrzlina

Zmrzlina je mražený mléčný výrobek, který se vyznačuje svojí nadýchaností. Je vyrobená z mléka, aromatických látek, sladidel, stabilizátorů, dalších číidel (vitamíny, minerály) a emulgátorů. Na trhu je dostupných mnoho zmrzlinových produktů, např. se sníženým obsahem tuku, ovocné zmrzliny, ovocné poháry, nebo mražené jogurty. V posledních letech se začínají na trh dostávat zmrzlinové výrobky s přidanými probiotickými kulturami. Přidáním probiotických kultur se z takto upravené zmrzliny stává funkční potravina s vysokou výživovou hodnotou obsahující mléčné složky, vitamíny a minerály. Životaschopnost probiotik přidaných do zmrzlin se snižuje v důsledku mražení, tání a mechanického namáhání během výroby. To má za následek nižší účinnost probiotických mikroorganismů ve zmrazených produktech po požití. Přidávkem inulinu se naopak zvyšuje množení některých probiotik. Na přežití probiotik má vliv i množství cukru ve zmrzlině. Hlavním cílem ve vývoji probiotických zmrzlin je udržení a zlepšení přežívání probiotických mikroorganismů. [12]

### 2.5.1.4 Kefír

Kefír je tradiční nápoj konzumovaný po tisíce let v centrální Asii a v zemích Středního východu. Je považován za přírodní probiotické fermentované mléko. Vyrábí se fermentací mléka kefírovými zrny, což jsou malé shluky mikroorganismů, které pohromadě drží polysacharidem kefiranem. Kefírová zrna obsahují směs bakterií mléčného kvašení rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc*, bakterie octového kvašení a kvasinky. Nejvíce je v kefíru zastoupena bakterie druhu *Lactobacillus kefir*. Kefír obsahuje kvasinky, které zkvašují laktosu, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, ale i ty, které laktosu nezkašují, *Saccharomyces cerevisiae*. [12] Kvasinky jsou při výrobě kefíru důležitou součástí, protože produkují ethanol a oxid uhličitý a obohacují nápoj o vitamíny skupiny B. [11]

## 2.5.2 Nemléčné probiotické výrobky

I přesto, že ideální nosiče pro probiotika jsou mléčné výrobky, kvůli trendu vegetariánství, veganství a pro laktosovou intoleranci nebo nutnost chlazení je stále větší poptávka po probiotických nemléčných výrobcích. Nejčastější nemléčné probiotické výrobky z ovoce a zeleniny jsou ovocné šťávy, dále se jedná o čokoládové a masné výrobky.

### 2.5.2.1 Ovocné a zeleninové probiotické výrobky

Ovoce a zelenina jsou zdravé potraviny, které obsahují mnoho prospěšných látek, například vitamíny, antioxidanty, minerální látky a vlákninu. Technologické postupy se zaměřují na úpravy jako je modifikace pH nebo obohacování kultivačního media při zpracování výrobku z ovoce a zeleniny tak, aby se z nich stal ideální nosič probiotických bakterií. Už nyní jsou vyvinuté a na trhu dostupné některé ovocné a zeleninové probiotické výrobky jako jsou ovocné a zeleninové šťávy, sušené ovoce, fermentovaná zelenina a vegetariánské dezerty. Mezi spotřebiteli jsou nejoblíbenější probiotické šťávy jablečné, pomerančové, rajčatové, zelné nebo mrkvové. Pro jejich výrobu se nejvíce používají bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, např. druhy *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum* a *B. bifidum*. Při výrobě jsou probiotické bakterie přidávány do výrobku aseptickými dávkovači těsně před plněním do

obalů. Životaschopnost probiotik v různých druzích nápojů se liší. Závisí na použitých kmenech probiotik, použitém substrátu, obsahu kyslíku a kyselosti konečného výrobku. [12]

### **2.5.2.2 Obilné a sojové probiotické výrobky**

Obiloviny mají v porovnání s mlékem a masem nižší nutriční hodnotu. Mají nižší obsah bílkovin, nedostatek některých esenciálních aminokyselin, zrna mají hrubý povrch a obsahují nevyživující látky (kyselinu fytovou, polyfenoly). I přesto jsou považovány za jednu z nejdůležitějších potravin pro podstatnou část světové populace díky zdroji bílkovin, sacharidů, vitaminů a minerálů. Obilná zrna jsou zdrojem nestravitelných polysacharidů, prebiotik, která selektivně stimulují růst laktobacilů a bifidobakterií v tlustém střevě.

Na trhu se dají zakoupit fermentované výrobky z obilovin nejčastěji nápojového typu. Fermentované obiloviny jsou vhodné médium pro růst probiotických bakterií, mají dostupnější živiny a větší množství lysinu. Mají optimální pH pro enzymatickou degradaci fytátu a uvolňování minerálních látek jako je mangan nebo vápník. Nejznámější je fermentovaný probiotický výrobek Yosa, který je vyrobený z ovesných otrub a obsahuje bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie. Prodává se především ve Finsku a jiných skandinávských zemích. Konzistencí a chutí je podobný jogurtu, ale neobsahuje žádné mléčné nebo jiné živočišné produkty, takže je vhodný pro vegetariány. Yosa je považován za zdravou potravinu, protože obsahuje ovesnou vlákninu a probiotické bakterie mléčného kvašení (BMK), které kombinují účinek beta-glukanu pro snížení hladiny cholesterolu a účinek BMK pro udržení a zlepšení střevní rovnováhy organismu konzumenta.

Sója, nejdůležitější luštěnina v tradiční asijské stravě, je bohatá na kvalitní proteiny. Sójové jogurty jsou vyráběny z jogurtové kultury a z probiotických bakterií *L. johnsonii*, *L. rhamnosus* nebo z lidských bifidobakterií. V probiotických sójových výrobcích má fermentace význam pro redukci sacharidů, které jsou zodpovědné za produkci plynu ve střevech nebo zvýšení množství volných isoflavonů. Obohacování sójového mléka o prebiotika jako jsou fruktooligosacharidy a pektin vede ke zvýšení životaschopnosti probiotických bakterií. [12, 13]

### **2.5.2.3 Probiotická čokoláda**

Čokoláda je cukrovinka oblíbená mezi všemi věkovými skupinami díky své lahodné chuti, vysoké výživové energetické hodnotě a dobré stravitelnosti. Dokáže zlepšit náladu, zlepšuje duševní zdraví a zdraví srdce díky obsahu polyfenolových antioxidantů a flavonoidů. Kakaové máslo, mléko a cukr obsažené v čokoládě zajišťují příjem bílkovin, sacharidů, tuků, minerálů a vitaminů v přiměřených dávkách. Na druhou stranu vysoký obsah cukru u některých čokolád může přispívat k obezitě a diabetu. Proto se vyrábí funkční probiotické čokolády. Pro jejich výrobu je nutné vhodně vybrat probiotické kmeny i výrobní proces. Probiotické bakterie musí přežít výrobu a celou dobu trvanlivosti produktu, přechod přes kyselé prostředí v žaludku a přes enzymy a žlučové soli v tenkém střevě. Musí vyhovovat i sensorickým aspektům. [12] Probiotická čokoláda Biopron Méd'a se vyrábí v České republice v Brně a obsahuje probiotický kmen *Bifidobacterium lactis* BI-04.

#### 2.5.2.4 Masné probiotické výrobky

Aplikace probiotických bakterií do masných výrobků je omezena na fermentované suché salámy. Suché salámy se vyrábějí ze směsi vepřového a hovězího masa, z vepřového sádla s přidáním cukru, soli, dusitanů, dusičnanů, askorbátů, koření a startovacích kultur. Startovací kultury obsahují živé mikroorganismy, které vykazují požadovanou metabolickou aktivitu v mase. Nejčastěji se pro výrobu používají BMK, které produkují kyselinu mléčnou z glukosy nebo laktosy. Bakterie mléčného kvašení používané v kulturách pro masnou výrobu jsou *L. casei*, *L. curvatus*, *Pediococcus acidilactici* a *Pediococcus pentosaceus*. Protože se suché salámy při výrobě nezahřívají, nehrozí zničení probiotických bakterií ohřevem. I přesto, že se zdá, že by masné výrobky mohly být ideálními nosiči pro probiotické bakterie, musí ještě proběhnout klinické výzkumy, které by dokázaly příznivé účinky na zdraví spotřebitelů. [12, 13] Příkladem probiotického masného výrobku je Ovčácká klobása a salám Orlik vyráběné v České republice.

#### 2.5.3 Doplnky stravy

Doplnky stravy jsou preparáty určené pro přímou spotřebu, které obsahují koncentrované množství látek důležitých pro naše tělo. Jedná se například o probiotika, vitamíny, minerály, antioxidanty nebo rostlinné extrakty. Doplnky stravy jsou užívány v rekonvalescenci po nemoci, při zvýšeném psychickém a fyzickém vypětí nebo při hubnutí. Doplnky stravy nenahrazují vyváženou a pestrou stravu. [5] V preparátu se vyskytuje jeden, nebo více druhů probiotických bakterií ve vysokém počtu. Doplnky stravy se řadí mezi potraviny, nikoli mezi léčiva. [31]

Doplnky stravy jsou dostupné v několika podobách. Podle struktury výrobku se dají rozdělit na pevné a tekuté látky. Rozdělení doplňků podle formy je uvedeno v Tabulce 3.

**Tabulka 3:** *Formy doplňků stravy* [upraveno podle 5]

<b>Pevná forma</b>	<b>Tekutá forma</b>
Dražé (obalované, potahované, retardované)	Aerosol
Granulát (perorální, rozpustný, s postupným uvolňováním)	Kapky (rostlinné extrakty)
Prášek (perorální, rozpustný)	Kapsle (tobolka) (tvrdá, měkká, retardovaná)
Pastilka	Roztok
Tableta (potahovaná, obalovaná, žvýkací, šumivá, pro přípravu roztoku)	Olej (olejový rostlinný extrakt)

### 2.6 Probiotika u dětí

Kolonizace střev bakteriemi se začíná vyvíjet těsně po narození do prvního roku života. Obecně platí, že bakterie se začnou objevovat ve střevech už několik hodin po narození. Nicméně i ve třech až pěti letech života zdravého dítěte jsou znatelné změny ve složení a škále bakterií ve střevě v porovnání s dospělým člověkem. Ve střevě kojenců převažují

bakterie z rodu *Bifidobacterium*. Vliv genetické výbavy na mikrobiální osídlení střev je nízký. [3, 21]

Strava ovlivňuje střevní kolonizaci a to znamená, že mateřské mléko jako první zdroj potravy je důležitý pro zajištění prospěšných bakterií. Dříve bylo mateřské mléko považováno za sterilní, ale dnes je považováno za zdroj potenciálních probiotických bakterií, zahrnujících bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie. Některé složky mateřského mléka (nevstřebatelné oligosacharidy, lysozym, laktoferin a protilátky) mění střevní prostředí stimulací zvýšeného počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Tyto bakterie mají specifické účinky na novorozenecký imunitní systém. Byly vypracovány postupy pro využití bakterií izolovaných z mateřského mléka pro výrobu dětské výživy, kde je cílem co nejvíce napodobit mateřské mléko. [21]

## 2.7 Prebiotika

Prebiotika jsou definována jako nestravitelné složky potravin, které selektivně stimulují rozmnožování nebo aktivitu probiotických bakterií v tlustém střevě a tím přináší zdravotní benefity konzumentovi. Prebiotika přidaná do potravin regulují rozmnožování příznivých střevních bakterií a naopak tlumí ty nežádoucí. [10] Prebiotické oligosacharidy jsou v hojném množství obsaženy v mateřském mléce, ale v kravském mléce se prakticky nevyskytují. [21]

Prebiotika s nebo bez probiotik se často přidávají do kojenecké výživy. Mezi prebiotika, která jsou tam nejčastěji používána, patří galaktooligosacharidy (GOS), fruktooligosacharidy (FOS) a polydextrosa (PDX). Prebiotika jsou do kojenecké výživy přidávána s úmyslem vyrovnání osídlení gastrointestinálního traktu u dětí, které jsou živeny umělou výživou, na stejnou úroveň jakou má kojené dítě. Mění střevní metabolickou aktivitu, mají bifidogenní efekt a mění konzistenci stolice a frekvenci vyprazdňování, která se blíží kojencům. Klinický přínos pro imunitní systém a dlouhodobé zdravotní účinky užívání prebiotických doplňků stravy zatím nejsou známy. [21]

Mezi přední prebiotika se řadí inulin, což je oligosacharid, který je složený z fruktozových podjednotek spojených  $\beta$  (1,2)glykosidickou vazbou. Inulin je rozpustná a fermentovatelná vláknina, která není rozkládána enzymy lidského trávicího traktu a nepodílí se tedy na zvyšování kalorií ve stravě. Trávicím traktem prochází téměř nezměněná. Inulin stimuluje růst prospěšných bakterií (probiotik) v tlustém střevě, které potlačují aktivitu a rozmnožování nežádoucích bakterií. Inulin byl studován i pro další pozitivní efekty na lidské zdraví jako je zvyšování absorpce vápníku kostmi, zvyšování odolnosti vůči gastrointestinálním chorobám, při prevenci proti arteriální hypertenzi a jako prevence proti rakovině tlustého střeva. Může se také použít jako náhražka tuku pro snížený obsah energie za současného zlepšení sensorických aspektů výrobků. Inulin se vyskytuje v mnoha rostlinách. Nejvíce je ho v kořenu čekanky nebo pampelišky. Zdrojem může být i česnek, cibule nebo pórek. [8].

## 2.8 Symbiotika

Symbiotika se skládají z živých mikroorganismů, probiotik, s jedním nebo více prebiotiky. Když jsou podávána v dostatečném množství, tak mají pozitivní vliv na zdravotní stav

hostitele. Prebiotika jsou doplňková a synergická k probiotikům, takže tato kombinace umožňuje lepší přežití probiotických bakterií v potravinách a v kyselém prostředí žaludku.

Použití symbiotik kladně ovlivňuje střevní mikrofloru. Ve střevech je nižší výskyt infekčních mikroorganismů díky probiotikům. Probiotika uvolňují vysoké množství kyseliny mléčné a tím snižují pH ve střevech. K modulaci střevní mikroflory dochází mechanismem, který se nazývá konkurenční vylučování. [10] Druhy, které fungují na tomto mechanismu, jsou například *Bifidobacterium bifidum* nebo *Lactobacillus rhamnosus*. Mezi další pozitivní vlastnosti symbiotik patří snižování cholesterolu v krvi nebo zlepšení střevní propustnosti.

Mikroorganismy, zejména bifidobakterie v zažívacím traktu, příznivě ovlivňují množství, biologickou dostupnost a stravitelnost některých živin ve stravě. K tomu dochází snížením pH ve střevě díky rozmnožení bakterií mléčného kvašení. Různé enzymy v lumenu mají synergické účinky na trávení, takže eliminují příznaky nedostatečného vstřebávání živin, mezi které patří vápník, hořčík a železo. [10]

## 2.9 Identifikace probiotických mikroorganismů

Nejčastější metoda pro identifikaci probiotických bakterií je polymerázová řetězová reakce (PCR). Polymerázová řetězová reakce je metoda používaná k amplifikaci specifického DNA fragmentu *in vitro*. Pro syntézu DNA metodou PCR stačí pouze stopová množství DNA matrice k vytvoření dostatečného množství kopií řetězce, který má být dále analyzován. Proto je PCR velmi citlivá metoda.

Pro provedení amplifikace DNA pomocí PCR je zapotřebí templatová DNA izolovaná z výrobku, DNA-polymerasa, což je enzym, který spojuje jednotlivé nukleotidy do jednoho řetězce. Nukleotidy obsahují čtyři báze (adenin, thymín, cytosin a guanin), které využívá DNA polymeráza k vytvoření PCR produktu. Dále jsou zapotřebí dva primery, což jsou syntetické oligonukleotidy s definovanou sekvencí komplementární k DNA, která má být namnožena. Primery také vymezují úsek DNA, který má být amplifikován.

Princip PCR spočívá v opakování teplotních cyklů (25-35 opakování) v přístroji zvaném termocycler. Jeden cyklus má tři fáze, denaturaci, připojení primerů a syntézu DNA. Každá z nich probíhá při jiné teplotě. Do reakce patří ještě počáteční denaturace (94 -95 °C, 2-5 min) a konečná syntéza (72 °C, 5 min).

Nejprve se reakční směs zahřívá na vysokou teplotu (94-95 °C, 20-45 s), aby se dvouvláknový řetězec zdenaturoval na dva jednovláknové řetězce DNA. Potom dochází ke snížení teploty (50-60 °C, 30-90 s), při které dochází k připojení primerů na cílové DNA sekvence podle komplementarity dusíkatých bází. Poté se teplota opět zvýší (72 °C, 45-90 s) a dochází k syntéze nového DNA řetězce pomocí DNA-polymerasy. Po každém opakování těchto tří kroků se počet kopírovaných molekul DNA zdvojnásobí. Počet cyklů a přesná teplota jednotlivých průběhů PCR se liší podle amplifikované DNA.

Vyhodnocení produktu PCR (amplikonu) se nejčastěji provádí agarosovou gelovou elektroforézou, kdy DNA, která má záporný náboj, putuje směrem ke katodě. Produkt PCR se rozděluje podle velikosti. Velikost DNA je porovnána se standardem s fragmenty o známé velikosti. [7, 27]

### **3. CÍL PRÁCE**

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo pojednat o probiotických bakteriích a jejich využití v potravinářských výrobcích.

Cílem experimentální části bakalářské práce byla izolace DNA ze třech potravinových výrobků, amplifikace DNA pomocí PCR a důkaz přítomnosti bakterií metodou polymerázové řetězové reakce.



## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Použité potravinové výrobky

Vzorek 1: Walmark Laktobacily FORTE s fruktooligosacharidy

Doplňěk stravy

Výrobce: Walmark, a.s., Oldřichovice 44, 739 61 Třinec, ČR

Datum spotřeby: 09/2015

Složení 1 tobolky:

*Lactobacillus acidophilus* 3,48 mld. KTJ,  
*Lactobacillus rhamnosus* 0,52 mld. KTJ,  
*Bifidobacterium infantis* 0,52 mld. KTJ,  
*Lactobacillus plantarum* 0,31 mld. KTJ,  
*Lactobacillus casei* 0,26 mld. KTJ,  
*Bifidobacterium longum* 0,05 mld. KTJ,  
*Streptococcus thermophilus* 0,04 mld. KTJ,  
*Bifidobacterium breve* 0,01 mld. KTJ,

Fruktooligosacharidy 100,0 mg, maltodextrin, fruktooligosacharidy, želatina, probiotika (obsahuje: mléčné a sójové složky), látka protispěková: stearát hořečnatý, antioxidant: kyselina askorbová.

<http://www.lekarna.cz/walmark-laktobacily-forte-s-fruktooligosach-60-60/>



Vzorek 2: Bifolac FORTE

Doplňěk stravy.

Výrobce: Bifodan A/S, DK-3390 Hundested, Dánsko.

[www.bifodan.com](http://www.bifodan.com)

Distributor: OBRA, s.r.o., V Chotejně 7, 102 00 Praha 10 – Hostivař.

[www.obra.cz](http://www.obra.cz)

Datum spotřeby: 31. 8. 2015

1 tobolka obsahuje: minimálně  $5 \cdot 10^8$  živých mléčných bakterií

*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*.

Další složky: kukuřičný škrob, předželatinový kukuřičný škrob, hypromelosa, oligofruktosa, lešticí látka, šelak, lubrikant, stearan hořečnatý, potahovací látka, kyselina alginová, trietyl-citrát, karubin, olivový olej, barvivo: oxid titaničitý, antioxidant: kyselina askorbová.

<http://www.bifolac.cz/produkty/forte>



## Vzorek 2.: NUTRICIA Nutrilon (1 porce) 18,3 g

Počáteční mléčná kojenecká výživa v prášku.

Vyrobeno v Německu.

Prodávající NUTRICIA a.s., Na Hřebenech II 1718/10, 140 00 Praha 4.

Datum spotřeby: 21. 7. 2012

Složení: sušená demineralizovaná syrovátka (z mléka), rostlinné oleje, laktóza (z mléka), sušené odtučněné mléko, galaktooligosacharidy (z mléka) 8 %, koncentrát syrovátkové bílkoviny (z mléka), fruktooligosacharidy 0,6%, uhličitan vápenatý, citran tridraselný, chlorid draselný, rybí olej, chlorid hořečnatý, fosforečnan vápenatý, kyselina L-askorbová, sojový lecitin, chlorid cholinu, taurin, L-askorban sodný, síran železnatý, DL- $\alpha$ -tokoferyl acetát, síran zinečnatý, sodná sůl uridin 5'-monofosfátu, cytidin 5'-monofosfát, inositol, adenosin 5'-monofosfát, sodná sůl inosin 5'-monofosfátu, nikotinamid, L-tryptofan, sodná důl guanosin 5'-monofosfátu, L-kamitin, D-pantothenát vápenatý, kyselina pteroylmonoglutamová (kyselina listová), síran měďnatý, retinyl palmitát, DL- $\alpha$ -tokoferol, D-biotin, kyanokobalamin, thiamin hydrochlorid, cholekalciferol, pyridoxin hydrochlorid, síran manganatý, jodid draselný, fytomenadion, seleničitan sodný.

Složení se vztahuje k sušenému stavu potraviny. GOS/FOS = 0,8 g/100 ml kojeneckého mléka.

<http://www.zdravapotravina.cz/sunar/nutrilon-1-nutricia>



### 4.1.2 Pomůcky a přístroje

- Centrifuga MINI Spin 13 400 min<sup>-1</sup> (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Laboratorní váhy (Kern & Sohn, Německo)
- Magnetický separátor Invitrogen Dynal AS (Dynal Biotech, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Discovery HTL (Discovery HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 5020 (Sencor, ČR)
- Mobilní telefon s fotoaparátem Lenovo VIBE P1
- NanoPhotometer (Implen, Mnichov, Německo)
- Termocycler PTC-200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Termostat-Mini incubator (Labnet, USA)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, 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 laboratorní pomůcky z umělé hmoty

### 4.1.3 Chemikálie

- Agarosa pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- DNA standard (100 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR). Obsahuje fragmenty o délce: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp.
- Destilovaná voda (FCH VUT Brno, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- dNTP (Top-Bio, Praha, ČR)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethilidium bromid (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraotová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol pH 7,8 (Sigma, St. Louis, USA)
- GoldView (Ecoli, Bratislava, Slovensko)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Nanášecí pufr Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Oligonukleotidy (Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR)
- PCR pufr kompletní (Top-Bio, Praha, ČR)
- PEG 40 % (Sigma, St. Louis, USA)
- Pozitivní kontrola: DNA *L. acidophilus* 10 ng/μl (doc. RNDr. Alena Španová, CSc.)
- Proteinasa K (100 μg/ml) (Sigma, St. Louis, USA)
- RNAsa A (100 μg/ml) (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Taq 1.1 DNA polymerasa (Top-Bio, Praha, ČR)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris base) (Ampresco, Solon, USA)

### 4.1.4 Roztoky

- Roztok obsahující magnetické mikročástice 2 mg/ml vody (Tabulka 4)

**Tabulka 4:** Vlastnosti magnetických mikročástic *F kol B100 ox*

Polymer	Fe (% hm.)	Průměr nosiče (μm)	PDI	-COOH (mM/g)
P(HEMA-co-GMA)	6,6	1,0	1,05	2,61

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

Všechny roztoky byly připraveny podle skript Španové a Ritticha. [18]

- Lyzační pufr A

Roztok byl připraven ze zásobních roztoků 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0). Bylo smícháno 10 ml 0,1M Tris-HCl a 1 ml 0,5 M EDTA. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml.

- Lyzační pufr B

K lyzačnímu pufru A byl přidán lysozym na výslednou koncentraci 3 mg/ml.

- Magnetické mikročástice (2 mg/ml vody)
- PEG 6 000 (40 %)
- Proteinasa K

10 mg proteinasy K bylo rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Před použitím se roztok zředil na koncentraci 100 µg/ml.

- 10 % SDS

10 g dodecyl sulfátu sodného bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody.

- TE pufr (pH 7,8)

Roztok byl připraven ze zásobního roztoku 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0). Byl smíchán z 1 ml 1 M Tris-HCl a 0,2 ml 0,5 M EDTA a doplněn destilovanou vodou do 100 ml. Výsledný roztok obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 7,8) a 1 mM EDTA (pH 8,0).

- Voda pro PCR
- Reakční pufr pro PCR (10x koncentrovaný)
- Směs dNTP (10 mM)
- *Taq* 1.1 DNA- polymerasa
- Nanášecí pufr Yellow load (6x koncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR)
- TBE pufr (5x koncentrovaný)

54 g Tris-báze, 27,5 g kyseliny borité a 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Roztok byl doplněn na objem menší než 1 litr. pH bylo upraveno 1 M NaOH na hodnotu 8,0 a konečný objem byl doplněn na 1 litr. Před použitím byl TBE pufr 10x zředěn destilovanou vodou.

- Primery Feub a Reub (10 pmol/µl). Sekvence primerů je uvedena v Tabulce 5.

**Tabulka 5:** Primery pro doménu *Bacteria*

Primer	Sekvence primeru	PCR produkt (bp)
Feub	5' TCC TAC GGG AGG CAG CAG T 3'	466
Reub	5' GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT 3'	

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Příprava vzorků pro analýzu

#### 4.2.1.1 Doplněk stravy Walmark Laktobacily a Bifolac FORTE

Z výrobku Walmark Laktobacily a Bifolac FORTE byly sterilně odebrány čtyři tobolky. Tobolky byly opatrně rozebrány a jejich obsah byl zvážen. Ke stanovení bylo použito celkem 1,2 g prášku z tobolek Walmark Laktobacily a 1,4 g prášku z tobolek Bifolac FORTE. Vzorky byly rozpuštěny v 5 ml lyzačního pufru A. 4,5 ml bylo zcentrifugováno při 14 500 ot./min po dobu 3 minut. Supernatant se slil a buňky v sedimentu byly použity pro lyzi.

#### 4.2.1.2 Kojenecká strava v prášku NUTRICIA Nutrilon

Z výrobku NUTRICIA Nutrilon bylo sterilní lžičkou odváženo 1,5 g pro další stanovení. Sáček s výrobkem byl otevřený po dobu několika měsíců a byl uchovávan v lednici. Vzorky byly rozpuštěny v 5 ml lyzačního pufru A. 4,5 ml bylo zcentrifugováno při 14 500 ot./min po dobu 3 minut. Supernatant se slil a buňky v sedimentu byly použity pro lyzi.

#### 4.2.2 Lyze bakteriálních buněk

K sedimentu buněk bylo přidáno 500 µl lyzačního pufru B. Vzorky se inkubovaly 1 hodinu při laboratorní teplotě za občasného promíchání. K suspenzi bylo přidáno 25 µl 10 % SDS a 5 µl proteinasy K (100 µg/ml). Po promíchání se vzorky inkubovaly při 55 °C do druhého dne. Hrubé lyzáty buněk byly uchovávány při -20 °C.

#### 4.2.3 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk magnetickými mikročásticemi

K izolaci DNA byly použity hrubé lyzáty buněk a magnetické mikročástice. Složení separační směsi je uvedeno v Tabulce 6.

**Tabulka 6:** Složení separační směsi a pořadí přidávání jednotlivých složek

Pořadí	Složka	Přidaný objem (µl)
1	NaCl (5 M)	200
2	Hrubý lyzát buněk	150
3	PEG 40 %	100
4	Magnetický nosič (2 mg/ml)	50
Celkem		500

Po smíchání uvedených komponent se směs inkubovala 15 minut při pokojové teplotě. Poté se směs umístila do magnetického separátoru na 10 minut. Po této době se supernatant opatrně odpipetoval. Bylo přidáno 500 µl 70 % ethanolu. Vzorek byl promíchán, do separátoru byl zasunut magnetický pás a po 2 minutách se ethanol opatrně odebral. Mikrozkuhavky byly vyjmuty ze separátoru a bylo přidáno 250 µl ethanolu. Po 2 minutovém odseparování se ethanol opatrně odlil. Zbytek ethanolu se nechal odpařit při laboratorní teplotě. Ke vzorku bylo přidáno 100 µl TE pufru (pH 7,8) a DNA se eluovala 30 minut. Poté byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát obsahující DNA byl odebrán do čistých mikrozkuhovek a řádně označen.

#### 4.2.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA

6 µl roztoku DNA v TE pufru bylo umístěno na spektrofotometrickou kyvetu. Byla změřena absorbance v rozmezí vlnových délek 230-320 nm proti TE pufru. Použitý spektrofotometr vypočítal i koncentraci DNA a poměr absorbancí A260/A280.

#### 4.2.5 Příprava směsi pro PCR

Komponenty pro PCR byly sterilně namíchány do vysterilizovaných Eppendorfových zkumavek podle Tabulky 7.

**Tabulka 7:** Množství komponent pro přípravu směsi pro PCR

Komponenta	Objem (μl)
Voda pro PCR	19
Reakční pufr kompletní (10x koncentrovaný)	2,5
Směs dNTP (10 mM)	0,5
Primer 1 (F eub) (10pmol/μl)	0,5
Primer 2 (R eub) (10pmol/μl)	0,5
<i>Taq</i> 1.1 DNA-polymerasa (1 U/μl)	1,0
Matrice DNA	1,0
Celkem	25,0

Po každém přidání další složky byla směs promíchána. Byly připraveny čtyři Eppendorfové zkumavky se směsí pro PCR. Tři vzorky s DNA izolovanou z výrobků Walmark Laktobacily, NUTRICIA Nutrilon a Bifolac FORTE, pozitivní kontrola, s DNA *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476 (10 μg/μl) a negativní kontrola, kde místo matrice DNA byla voda pro PCR.

#### 4.2.6 Amplifikace DNA

Před vložením do termocycleru byly všechny mikrozkušavky krátce centrifugovány. Na termocycleru byl nastavený program pro doménu *Bacteria*. Postup programu je uveden v Tabulce 8.

**Tabulka 8:** Program PCR pro doménu *Bacteria*

Krok č.	Teplota	Doba
1	95 °C	5 min
2 (denaturace DNA)	95 °C	30 s
3 (připojení primerů)	55 °C	30 s
4 (syntéza DNA)	72 °C	30 s
5	72 °C	5 min

Kroky 2-4 se 30x opakovaly.

#### 4.2.7 Průkaz produktů PCR pomocí agarosové gelové elektroforézy

Byl připraven 1,2 % agarosový gel pro elektroforézu (0,6 g agarosu/50 ml 0,5x TBE pufru). Suspenze byla rozvařena v mikrovlnné troubě a po vychlazení na asi 60 °C k ní bylo přidáno

0,5  $\mu$ l Goldview. Potom byla opatrně nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem a nechala se půl hodiny tuhnout. Před nanášením vzorků byl hřebínek vyjmut.

K 25  $\mu$ l amplikonů bylo přidáno 5  $\mu$ l nanášecího pufu. Po rozmíchání byly tyto vzorky naneseny do komůrek gelu. Na gel bylo naneseno 5  $\mu$ l standardu DNA (viz 4.1.3).

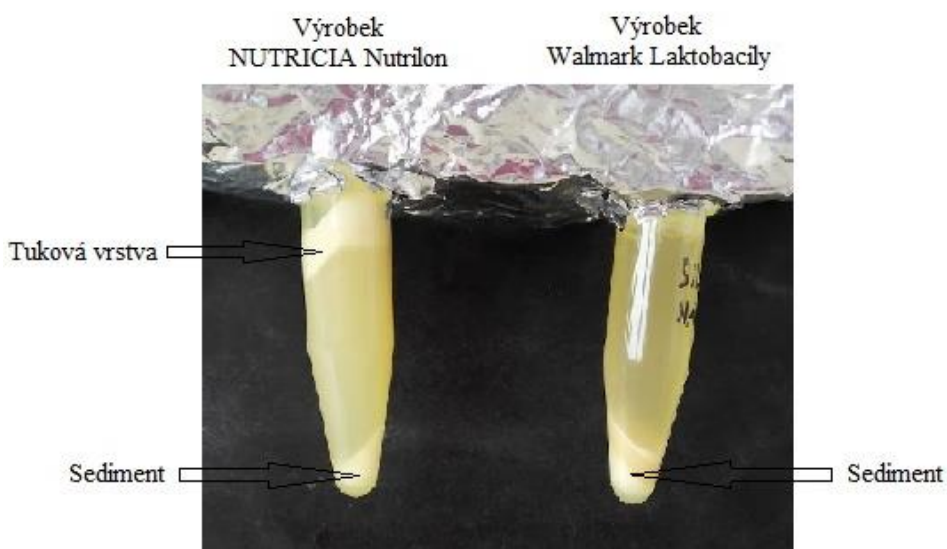
Gel byl vložen do elektroforetické vaničky tak, aby záporně nabitá DNA putovala k anodě. Vanička s gelem byla převrstvena 0,5x TBE pufrem do výšky zhruba 0,3 mm nad gel (asi 0,4 l). Byl zapojen a zapnut zdroj elektrického napětí (60 V/2 hod). Separace byla ukončena v okamžiku doputování nanášecího pufu do 2/3 agarosového gelu.

Po odpojení zdroje napětí byl gel vyjmut z elektroforetické vaničky a dobarven ethilidium bromidem. Druhý den byl vložen na transiluminátor, vyhodnocen a vyfotografován pod UV světlem při vlnové délce 305 nm.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Příprava hrubých lyzátů buněk z výrobků

Vzorky výrobků byly připraveny pro analýzu podle postupu 4.2.1. Po rozpuštění a odstředění výrobku NUTRICIA Nutrilon vznikla na hladině eppendorfky bílá vrstva, narozdíl od tablet Walmark Laktobacily a Bifolac FORTE. Jednalo se o tuk obsažený v tomto mléčném výrobku. Tato tuková vrstva ztížila odstranění supernatantu. Tuková vrstva je zobrazena na Obrázku 4. Na obrázku jsou vyznačeny i sedimenty výrobků NUTRICIA Nutrilon a Walmark Laktobacily použité pro přípravu hrubých lyzátů buněk. Hrubé lyzáty buněk byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.2.



**Obrázek 4:** Vzorek NUTRICIA Nutrilon s tukem a sedimentem. Vzorek Walmark Laktobacily se sedimentem.

→ Hrubé lyzáty buněk byly použity pro izolaci DNA. Byly uchovávány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2 Izolace DNA magnetickými mikročásticemi F kol B100 ox

Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk byla provedena magnetickými mikročásticemi podle kapitoly 4.2.3.

→ Vzorky izolované DNA byly uchovány v lednici.

### 5.3 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované DNA

U DNA izolované z výrobků Walmark Laktobacily, NUTRICIA Nutrilon a Bifolac FORTE byla změřena absorbance při 230, 260, 280 a 320 nm. Hodnoty absorbancí a koncentrací DNA jsou uvedeny v Tabulce 9.



**Tabulka 9:** Spektrofotomerické stanovení DNA izolované z výrobků

Výrobek	A230	A260	A280	A320	A260/280	A260/A230	c (ng/μl)
Walmark Lactobacily	0,08	0,059	0,049	0,021	1,357	0,644	9,5
Bifolac Forte	0,024	0,023	0,023	0,005	1,000	0,947	4,5
Nutricia Nutrilon	Nezměřitelné.						

→ Koncentrace DNA izolovaná z výrobku Walmark Laktobacily byla 9,5 ng/μl, koncentrace DNA izolovaná z výrobku Bifolac FORTE byla 4,5 ng/μl. Koncentrace DNA izolovaná z výrobku NUTRICIA Nutrilon nebyla měřitelná.

#### **5.4 Polymerázová řetězová reakce s primery Feub a Reub**

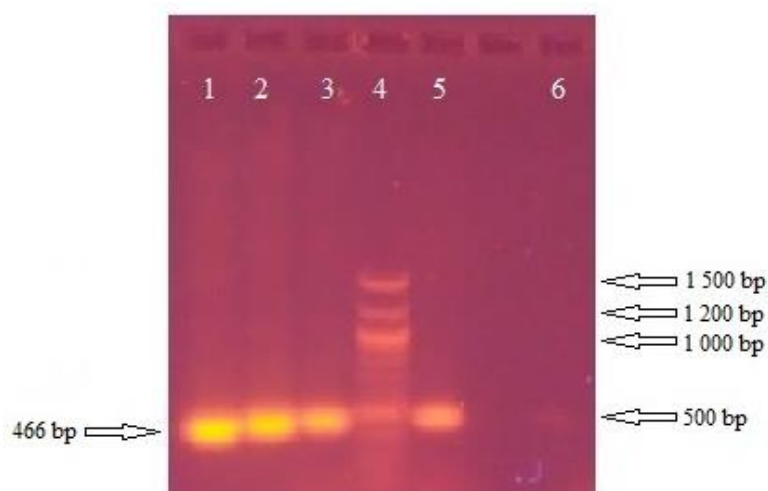
Po změření koncentrace DNA byla provedena amplifikace DNA metodou polymerázové řetězové reakce podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.6. Spolu s DNA izolovanými z výrobků byla amplifikována i DNA pozitivní kontroly *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476 (10 ng/μl).

#### **5.5 Detekce produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria***

Detekce produktů PCR byla provedena gelovou elektroforézou na agarose (4.2.7).

Výsledky PCR jsou uvedené na Obrázku 5.

**Obrázek 5:** Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR (466 bp) specifických pro doménu *Bacteria*. DNA ze třech výrobků byla amplifikovaná pomocí primerů Feub a Reub.



Běh	DNA výrobku	Množství DNA (ng) na PCR směs	Detekce produktu PCR
1	Walmark Laktobacily	9,5	++
2	Bifolac FORTE	4,5	++
3	NUTRICIA Nutrilon	*	+
4	Standard 100 bp	9,5	100 bp žebříček
5	Pozitivní kontrola	10	+
6	Negativní kontrola	-	-

Detekce produktu PCR: ++ silná, + zřetelná, - nedetekovaná.

\* Množství DNA nezměřitelné.

→ V doplňcích stravy byl detekován produkt PCR (466 bp) specifický pro doménu *Bacteria*. Byla prokázána přítomnost bakteriální DNA.

## 6. DIZKUZE

### 6.1 Příprava hrubých lyzátů buněk a izolace DNA z výrobků

Z výrobků Walmark Lactobacily, Bifolac FORTE a NUTRICIA Nutrilon byly připraveny hrubé lyzáty buněk. Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk byla provedena magnetickými mikročásticemi.

DNA byla izolována magnetickými mikročásticemi P(HEMA-*co*-GMA), které jsou pokryté karboxylovými skupinami. DNA z buněk se na částice adsorbuje v prostředí 2 M chloridu sodného a 9,1 % hm. polyethylen glykolu (PEG 6000). [33]

Čistota a koncentrace izolované DNA byla změřena na NanoPhotometru při různých vlnových délkách. Koncentrace DNA izolovaná z výrobku Walmark Lactobacily byla 9,5 ng/μl a poměr absorbcí  $A_{260}/A_{280}$  byl 1,357. Koncentrace DNA izolovaná z výrobku Bifolac FORTE byla 4,5 ng/μl a poměr absorbcí  $A_{260}/A_{280}$  byl 1,000. Poměr absorbcí  $A_{260}/A_{280} < 1,7$  znamená, že izolovaná DNA je kontaminovaná bílkovinami. [29] Poměr absorbcí ovlivňují nízké hodnoty absorbcí. [Španová, ústní sdělení] Koncentrace DNA izolovaná z výrobku NUTRICIA Nutrilon byla pod mezí změřitelnosti použitým NanoPhotometrem. Nízká koncentrace byla způsobena nízkým množstvím buněk ve výrobku způsobených kontaminací.

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

Polymerázová řetězová reakce byla provedena v ThermoCycleru podle programu Bacteria se specifickými primery Feub a Reub. Pro doménu *Bacteria* je specifický produkt PCR dlouhý 466 bp. [28] Tento produkt PCR byl detekován po amplifikaci DNA z výrobků.

V sušené kojenecké stravě NUTRICIA Nutrilon nebyla DNA izolována v souladu s údaji danými výrobcem. Výrobce do sušené kojenecké stravy přidává klinicky ověřenou prebiotickou směs oligosacharidů GOS/FOS. Probiotické bakterie do výrobku nejsou přidávány. [30] Prokázána byla zřejmě DNA bakterií, které otevřený výrobek kontaminovaly. PCR pro doménu *Bacteria* umožňuje amplifikovat velmi malé množství DNA (pg) a proto byla prokázána DNA bakterií, které kontaminovaly otevřený vzorek [Španová, ústní sdělení a Laštovičková, Nutricia a.s., soukromý e-mail].

Polymerázová řetězová reakce je velmi citlivá metoda. I stopové množství DNA může vést k nesprávným výsledkům. Při přípravě směsi pro PCR se musí pracovat sterilně. Pro správné provedení PCR se připravuje pozitivní a negativní kontrola. Pozitivní kontrolou se sleduje amplifikovatelnost DNA, zatímco negativní kontrola je nutná pro detekci případné kontaminace amplifikované DNA. [32] Do negativní kontroly se místo matrice DNA přidává voda pro PCR. Do pozitivní kontroly se jako matrice DNA používá DNA z typového nebo sbírkového kmene o koncentraci 10 ng/μl, o které je známo, že se amplifikuje. [18]

Detekce produktů PCR byla provedena gelovou elektroforézou na 1,2 % agarosovém gelu. Elektroforéza na agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu se používá pro separaci a identifikaci DNA fragmentů. Polyakrylamidový gel má vyšší rozlišovací schopnost pro

krátké fragmenty DNA než agarosový gel, ale hůř se připravuje a hůř se s ním pracuje. Agarosový gel má větší rozsah dělení delších fragmentů (od 50 bp výš). Platí, že čím větší jsou póry v gelu, tím větší fragmenty se můžou rozdělit. Jednotlivé sekvence jsou rozdělovány podle své velikosti a různou rychlostí prostupují gelem. [32] Porovnáním s DNA žebříčkem se přímo určuje velikost amplifikovaného fragmentu DNA. [35] Na agarosový gel se spolu s amplikony a negativní a pozitivní kontrolou nanáší i porovnávací DNA standard. Porovnávací DNA standard obsahuje fragmenty DNA o známých velikostech. [32]

Vyhodnocení gelu s produkty PCR bylo provedeno na transiluminátoru pod UV světlem. Při přípravě gelu bylo použito 0,5 μl roztoku GoldView a gel byl dobarvován ethilidium bromidem. GoldView je barvivo, které se používá jako nekarcinogenní náhrada ethilidium bromidu. DNA barví zelenou barvou. [34] Ethilidium bromid barví DNA červeně.

Detekce na agarosovém gelu je kvalitativním stanovením produktu PCR. Rozdílná intenzita produktu PCR na gelu byla způsobena různou koncentrací izolované DNA přidávané do PCR směsí. [7]

Byla prokázána přítomnost bakteriální DNA v analyzovaných doplňcích stravy.

## 7. ZÁVĚR

Byly připraveny hrubé lyzáty buněk z doplňků stravy Walmark Lactobacily, Bifolac FORTE a z mléčné kojenecké výživy v prášku NUTRICIA Nutrilon. Z hrubých lyzáatů buněk byla izolována DNA v kvalitě pro PCR pomocí magnetických mikročástic. DNA se amplifikovala v PCR specifické pro doménu *Bacteria*. Ve dvou výrobcích (Walmark Laktobacily a Bifolac FORTE) byla prokázána přítomnost bakterií domény *Bacteria* v souladu s údaji deklarovanými výrobcí. Výrobek NUTRICIA Nutrilon byl kontaminován bakteriemi z vnějšího prostředí, které se do výrobku dostaly po jeho otevření v průběhu skladování.

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MCFARLAND, L. V. From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 2015, **60**(suppl 2), S85-S90.
- [2] OZYURT, V. Hazal a Semih ÖTLES. Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 2015, **13**(4), 413-424. DOI: 10.17306/J.AFS.2014.4.8. ISSN 16440730. Dostupné také z: <http://www.food.actapol.net/volume13/issue4/abstract-8.html>
- [3] WAIKAR, Yogesh. Review of probiotics in children. *Pediatric Infectious Disease* [online]. 2013, **5**(1), 9-12 [cit. 2016-04-22]. DOI: 10.1016/j.pid.2013.01.002. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212832813000398>
- [4] SOCCOL, C., et al. The potential of probiotics: A review. *Food Technol. Biotechnol.*, 2010, 48, 413-434.
- [5] MACH, Ivan. *Doplňky stravy*. Vyd. 1. Praha: Svoboda Servis, 2004. ISBN 80-863-2034-0.
- [6] HUBÁČEK, Jaroslav. Funkční potraviny. *Www.dlouhovekostbezleku.cz* [online]. 2014 [cit. 2016-03-31]. Dostupné z: <http://www.dlouhovekostbezleku.cz/mod/forum/discuss.php?d=180>
- [7] GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, **133**(3), E1-E4.
- [8] Inulin. *Prebiotic Canada* [online]. [cit. 2016-03-31]. Dostupné z: <http://www.prebiotic.ca/inulin.html>
- [9] KUNTZ, Marilyn G.F., Giovanna M.R. FIATES a Evanilda TEIXEIRA. Characteristics of prebiotic food products containing inulin. *British Food Journal*. 2013, **115**(2-3), 235-251.
- [10] FLESCH, Aline Gamarra Taborda, Aline Kirjner POZIOMYCK a Daniel De Carvalho DAMIN. The therapeutic use of symbiotics. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*. 2014, **27**(3), 206-209.
- [11] PAVELKA, Antonín. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. Vyd. 1. Brno: Litera, 1996. ISBN 80-857-6309-5.
- [12] S., Saddam. Probiotic Food Products Classes, Types, and Processing. *Probiotics*. InTech, 2012, 551-582. DOI: 10.5772/51267. ISBN 978-953-51-0776-7. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/probiotics/probiotic-food-products-classes-types-and-processing>
- [13] SONG, Danfeng, Salam IBRAHIM a Saeed HAYEK. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. *Probiotics*. InTech, 2012, 3-36. DOI: 10.5772/50121. ISBN 978-953-51-0776-7. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/probiotics/recent-application-of-probiotics-in-food-and-agricultural-science>
- [14] LEE, Yuan Kun. What could probiotic do for us? *Food Science and Human Wellness* [online]. 2014, **3**(2), 47-50 [cit. 2016-04-09]. DOI: 10.1016/j.fshw.2014.06.001. ISSN 22134530. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213453014000196>

- [15] NAGPAL, Ravinder, Ashwani KUMAR, Manoj KUMAR, Pradip V. BEHARE, Shalini JAIN a Hariom YADAV. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiology Letters*. 2012, **334**(1), 1-15.
- [16] TRIGUEROS, D.E.G., FIORESE, A.D. KROUMOV, HINTERHOLZ, B.L. NADAI a ASSUNCAO. Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Biochemical Engineering Journal*. 2016, 110. DOI: 10.1016/j.bej.2016.02.014. ISSN 1369703x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X16300584>
- [17] ARSLAN, Sultan, Mustafa ERBAS, Ismail TONTUL a Ayhan TOPUZ. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*. 2015, **63**(1), 685-690.
- [18] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [19] SAAD, N., C. DELATTRE, M. URDACI, J.M. SCHMITTER a P. BRESSOLLIER. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*. 2013, **50**(1), 1-16.
- [20] KAILASAPATHY, Kasipathy. Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits - a review. *International Journal of Fermented Foods*. 2013, **2**(1), 1-17.
- [21] BERTELSEN, Randi J., Elizabeth T. JENSEN a Tamar RINGEL-KULKA. Use of probiotics and prebiotics in infant feeding. *Best Practice* [online]. 2016, **30**(1), 39-48 [cit. 2016-04-16]. DOI: 10.1016/j.bpg.2016.01.001. ISSN 15216918. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521691816000020>
- [22] *Hopeland Bio-Tech Co. Ltd.* [online]. Changzhou City, China: Hopeland Bio-Tech, 2010 [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: <http://www.probiotic-cn.com/index.html>
- [23] *Probiotik.sk* [online]. S&D Pharma SK [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: <http://www.probiotik.sk/>
- [24] *Probiotics database: Strains and supplements* [online]. [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: <http://probioticsdb.com/probiotic-strains/saccharomyces-boulardii/>
- [25] *MIKROBIOLOGY* [online]. 2016 [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: <http://microbiology.ucoz.com/>
- [26] RUBIO, Raquel, Anna JOFRÉ, Belén MARTÍN, Teresa AYMERICH a Margarita GARRIGA. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiology* [online]. 2014, **38**, 303-311.
- [27] PCR (polymerázová řetězová reakce). *Molekulární biologie* [online]. 2011 [cit. 2016-04-22]. Dostupné z: [http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-pcr&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz)

- [28] HAARMAN, Monique a Jan KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* [online]. 2006, **72**(4), 2359-2365.
- [29] CULLEN, D.W. a P.R. HIRSCH. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology and Biochemistry*. 1998, **30**(8-9), 983-993.
- [30] Jak fungují GOS/FOS a LCP? *Nutricia a.s.: Nuriklub* [online]. 2016 [cit. 2016-04-23]. Dostupné z: <https://www.nutriklub.cz/clanek/jak-funguji-lcp-a-gos-fos>
- [31] *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. Brno, 2016 [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz>
- [32] SAMBROOK, Joseph a David W. RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2001. ISBN 08-796-9576-5.
- [33] RITTICH, B., A. ŠPANOVÁ, D. HORÁK, M.J. BENEŠ, L. KLESNILOVÁ, K. PETROVÁ a A. RYBNÍKÁŘ. Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006, **52**(2), 143-148.
- [34] *Ecoli* [online]. Bratislava, 2016 [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://www.ecoli.sk/sk/Ecoli.alej>
- [35] GONZÁLEZ, T. Iglesias, M. ESPINA, L. M. SIERRA, J. BETTMER, E. BLANCO-GONZÁLEZ, M. MONTES-BAYÓN a A. SANZ-MEDEL. Enhanced Detection of DNA Sequences Using End-Point PCR Amplification and Online Gel Electrophoresis (GE)-ICP-MS: Determination of Gene Copy Number Variations. *Analytical Chemistry*. 2014, **86**(22), 11028-11032.