



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

**MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKA PŘÍTOMNOSTI
PROBIOTIK V FERMETOVANÝCH POTRAVINOVÝCH
MATRICÍCH ROSTLINNÉHO PŮVODU**

VALIDATION OF PROBIOTIC BACTERIA PRESENCE IN FERMENTED PLANT FOOD PRODUCTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bianka Péčiová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1717/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bianka Pěčiová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Mgr. Jan Smetana, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Molekulární diagnostika přítomnosti probiotik v fermentovaných potravinových maticích rostlinného původu

Zadání bakalářské práce:

- 1) Literární rešerše.
- 2) Zvládnutí techniky izolace bakteriální DNA z fermentovaných potravinových produktů rostlinného původu.
- 3) Kvantifikace a kontrola kvality DNA.
- 4) Zvládnutí techniky PCR a interpretace jejich výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Bianka Pěčiová
student(ka)

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Probiotické baktérie sú dôležitou súčasťou ľudskej výživy a prinášajú mnohé zdravotné benefity. Konzumujeme ich nielen v tradičných mliečnych fermentovaných potravinách, ale čoraz viac sa do popredia dostávajú aj fermentované výrobky rastlinného pôvodu.

V teoretickej časti práce sú zhrnuté všeobecné poznatky o probiotických mikroorganizmoch, jednotlivých druhoch používaných pri technológii spracovania rastlinných a mliečnych fermentovaných produktov, a ich vplyvov na ľudské zdravie. Nasledujúce kapitoly sú venované rôznym metódam identifikácie probiotických baktérií s dôrazom na molekulárnu diagnostiku, konkrétne metódou PCR.

Experimentálna časť sa sústreďuje na identifikáciu baktérií mliečneho kvasenia vo fermentovanom produkte rastlinného pôvodu – v kvasenej kapuste za použitia dvoch metód izolácie bakteriálnej DNA a následnej analýze metódou PCR.

ABSTRACT

Probiotic bacteria are an essential part of human nourishment which provide many health benefits. We consume them not only in traditional dairy fermented foodstuff, but also in the ever-expanding fermented plant products.

The theoretical part summarized general knowledge about probiotic microorganisms, individual species used in technology of processing plant and dairy fermented products, and their influence on human health. The following chapters are devoted to various methods of identification of probiotic bacteria with emphasis on molecular diagnostics, specifically by PCR method.

The experimental part is focused on the identification of lactic acid bacteria in a plant fermented product – in a fermented cabbage using 2 methods of isolation bacterial DNA and subsequent analysis by PCR method.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ

probiotiká, fermentácia, kapusta, identifikácia, PCR

KEYWORDS

probiotics, fermentation, cabbage, identification, PCR

PÉČIOVÁ, Bianka. *Molekulární diagnostika přítomnosti probiotik v fermentovaných potravinových maticích rostlinného původu* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-18]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131393>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jan Smetana.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

podpis študenta

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som sa chcela poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce Mgr. Janovi Smetanovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, venovaný čas, cenné rady, ochotu a ústretovosť.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
2.1	<i>Probiotiká</i>	9
2.2	<i>História probiotík</i>	9
2.3	<i>Probiotické mikroorganizmy</i>	9
2.3.1	Rod <i>Bifidobacterium</i>	10
2.3.1.1	Morfológia.....	10
2.3.1.2	Klinický význam	10
2.3.2	Rod <i>Lactobacillus</i>	11
2.3.2.1	Morfológia.....	11
2.3.2.2	Klinický význam	11
2.3.3	Ďalšie probiotické mikroorganizmy	12
2.4	<i>Účinky probiotických mikroorganizmov na ľudský organizmus</i>	12
2.4.1	Narušenie homeostázy črevnej mikroflóry	13
2.5	<i>Využitie probiotických mikroorganizmov</i>	13
2.6	<i>Probiotické potraviny</i>	14
2.6.1	Mliečne probiotické potraviny	14
2.6.1.1	Jogurt.....	14
2.6.1.2	Kefir.....	14
2.6.1.3	Syr	15
2.6.1.4	Zmrzlina	15
2.6.2	Nemliečne probiotické potraviny	15
2.6.2.1	Ovocné a zeleninové probiotické potraviny	16
2.6.2.2	Obilné a sójové probiotické potraviny.....	16
2.6.2.3	Probiotická čokoláda	16
2.6.2.4	Mäsové výrobky	17
2.6.3	Doplňky výživy	17
2.7	<i>Prebiotiká</i>	17
2.8	<i>Synbiotiká</i>	18
2.9	<i>Mechanizmus účinku</i>	18
2.9.1	Mechanizmus účinku probiotík	18
2.9.2	Mechanizmus účinku prebiotík	18
2.10	<i>Metódy identifikácie probiotických baktérií</i>	19
2.10.1	Fenotypové metódy	19
2.10.1.1	Morfologické metódy	19
2.10.1.2	Biochemické a fyziologické metódy	19

2.10.2	Genotypové metódy	20
2.11	<i>Izolácia nukleových kyselín</i>	20
2.11.1	Izolácia DNA	20
2.11.2	Izolácia RNA	21
2.12	<i>Polymerázová reťazová reakcia</i>	22
2.12.1	Zložky PCR	22
2.12.2	Základný princíp PCR	23
2.12.3	Detekcia a analýza PCR produktu	23
2.12.4	Modifikácie PCR	24
2.12.4.1	Multiplex PCR	24
2.12.4.2	Nested PCR	24
2.12.4.3	PCR s reverznou transkriptázou	25
2.12.4.4	Semikvantitatívna PCR	25
2.12.4.5	Real-time PCR	25
2.12.5	Inhibítory PCR	26
2.12.6	Výhody PCR	27
2.12.7	Nevýhody PCR	27
2.12.8	Aplikácia PCR v praxi	27
4	CIEĽ PRÁCE	29
5	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	30
5.1	<i>Materiál</i>	30
5.1.1	Vzorka testovaného potravinového produktu s obsahom probiotických baktérií	30
5.1.2	Kmene baktérií pre pozitívne kontroly	30
5.1.3	Chemikálie	31
5.1.4	Roztoky	31
5.1.4.1	Roztoky pre prípravu hrubých lyzátov bakteriálnych buniek	31
5.1.4.2	Roztoky pre izoláciu bakteriálnej DNA	32
5.1.4.3	Roztoky pre agarózovú gélovú elektroforézu	32
5.1.5	Komponenty PCR	33
5.1.6	Pomôcky a prístroje	33
5.2	<i>Metódy</i>	34
5.2.1	Izolácia bakteriálnej DNA z kvasenej kapusty fenolovou extrakciou	34
5.2.1.1	Príprava hrubého lyzátu bakteriálnych buniek	34
5.2.1.2	Fenolová extrakcia bakteriálnej DNA	34
5.2.1.3	Zrážanie DNA etanolom	34
5.2.2Izolácia bakteriálnej DNA z kvasenej kapusty pomocou komerčného kolonkového kitu OMNI Bacterial DNA Kit	34
5.2.2.1	Izolácia kolonkovým kitom OMNI Bacterial DNA Kit	34
5.2.2.2	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA	35
5.2.3	Agarózová gélová elektroforéza izolovanej genómovej DNA	35
5.2.4	Polymerázová reťazová reakcia (PCR) izolovanej DNA	36
5.2.4.1	Primery použité pri PCR	36

5.2.4.2	Amplifikačný program	37
5.2.4.3	Detekcia PCR produktov pomocou agarózovej gélovej elektroforézy.....	37
6	VÝSLEDKY	38
6.1	<i>Izolácia bakteriálnej DNA</i>	38
6.1.1	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovaných nukleových kyselín	38
6.1.2	Agarózová elektroforéza genómovej DNA	39
6.2	<i>PCR špecifická pre doménu Bacteria</i>	42
6.3	<i>PCR špecifická pre rod Lactobacillus</i>	44
7	DISKUSIA	47
7.1	<i>Izolácia bakteriálnej DNA</i>	47
7.1.1	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovaných nukleových kyselín	47
7.1.2	Agarózová elektroforéza genómovej DNA	47
7.2	<i>Porovnanie jednotlivých metód izolácie bakteriálnej DNA</i>	47
7.3	<i>PCR špecifická pre doménu Bacteria</i>	48
7.4	<i>PCR špecifické pre rod Lactobacillus</i>	48
8	ZÁVER.....	50
9	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	51
10	ZOZNAM POUŽITÝCH ZNAČIEK A SKRATIEK	55

1 ÚVOD

V súčasnej dobe sa čoraz viac stretávame s alternatívnymi druhmi stravovania, ako napríklad vegetariánstvo, vegánstvo, frutariánstvo, alebo s rôznymi potravinovými intoleranciami a alergiami. Tieto problémy boli impulzom pre vývoj a výskum tzv. funkčných potravín s bohatou nutričnou hodnotou a určitým zdravotným benefitom. K takým patria bezpodmienečne aj fermentované potraviny. Technológie procesu výroby takýchto potravín využíva metabolickú aktivitu probiotických baktérií.

Probiotické mikroorganizmy sú prirodzenými obyvateľmi ľudského črevného systému, ovplyvňujú procesy trávenia, pomáhajú udržiavať homeostázu organizmu a podporujú aj celkové zdravie hostiteľa. Na druhej strane inhibujú rast a množenie patogénnych črevných baktérií produkujúcich toxické metabolity. Probiotiká sa zabudovávajú do potravín najčastejšie procesom fermentácie.

Probiotické mikroorganizmy sa vyskytujú nielen vo fermentovaných potravinách mliečneho pôvodu, ale aj v mäse, čokoláde či detskej výžive. Významnú časť probiotických potravín tvoria aj kvasené produkty rastlinného pôvodu. Čoraz častejšie možno kúpiť fermentované obilniny, zeleninové a ovocné džúsy, sušené ovocie alebo kvasenú zeleninu s obsahom probiotík nielen v špeciálnych obchodoch so zdravou výživou, ale aj v komerčných obchodných reťazcoch.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Probiotiká

Probiotické mikroorganizmy sú živé kultúry vyskytujúce sa najmä v GIT (gastrointestinálnom trakte) hostiteľa a majú pozitívny vplyv na jeho zdravie. Probiotiká definuje Organizácia pre výživu a poľnohospodárstvo/Svetová zdravotnícka organizácia (FAO/WHO) doslovne ako živé mikroorganizmy, ktoré ak sa pridajú v primeranom množstve do potravín, majú pozitívne zdravotné účinky na hostiteľa. Probiotiká musia spĺňať niekoľko podmienok:

- musia byť bezpečné pre organizmus;
- odolné voči žalúdočnej šťave a žlči;
- schopné reprodukcie a kolonizácie GIT;
- a musia byť životaschopné počas celej doby výroby a trvanlivosti produktu.[1,2]

Probiotiká sú komerčne predávané vo forme zmesí živých a mŕtvych buniek, poprípade v kombinácii s prebiotikami. Živé bunky zabezpečujú imunitnú odpoveď a aktívne ovplyvňujú súčasnú mikroflóru, zatiaľ čo mŕtve bunky majú protizápalový účinok.[3]

2.2 História probiotík

Fermentované potraviny, ako napríklad pivo, víno, chlieb, kefír alebo syry, boli produkované už od pradávna. Kvasené výrobky mali oveľa dlhšiu dobu trvanlivosti, čo znamenalo, že sa rýchlo nepokazili a nebolo potrebné ich okamžite skonzumovať. Ich prospešné výživové a terapeutické účinky boli známe už dávno pred objavením kvasných mikroorganizmov.

Aj napriek tomu, že za objaviteľa mikroorganizmov spôsobujúcich fermentáciu je považovaný Louis Pasteur, až doktor Ilja Mečnikov v roku 1907 spojil tieto mikroorganizmy s určitým zdravotným benefitom. Jeho štúdiá skúmala príčinu dlhovekosti a vitality u osôb, ktoré pravidelne konzumovali fermentované mliečne potraviny. V GIT týchto osôb zistil prítomnosť laktobacilov, ktoré spôsobovali kvasenie mlieka.

Počas štúdie v roku 1922 bolo preukázané, že baktéria *Lactobacillus acidophilus* je príčinou zlepšenia zdravotného stavu 30 pacientov trpiacich chronickou zápchou, hnačkou alebo ekzémom. Termín *probiotický* bol prvýkrát použitý až v r.1965, kedy boli výskumami potvrdené pozitívne účinky probiotických mikroorganizmov na ľudské zdravie.[4]

2.3 Probiotické mikroorganizmy

K probiotikám sú najčastejšie zaraďované LAB (baktérie mliečného kvasenia), avšak aj iné mikroorganizmy vykazujú probiotické schopnosti. Z LAB sú najznámejšie rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Komplexne sú príklady probiotických mikroorganizmov zhrnuté v Tab.1.

Probiotické baktérie musia tolerantné k nízkemu pH v žalúdku, vysokej koncentrácii žlčových kyselín v tenkom čreve; nesmú byť patogénne, alergény ani karcinogénne. Navyše musia byť probiotické mikroorganizmy schopné rozmnožovania a kolonizácie ľudského črevného traktu. Všetky tieto aspekty zabezpečujú, aby probiotiká boli schopné prežiť v mieste plnenia svojej funkcie, v GIT. Z tohto dôvodu je veľkou výhodou, ak sú probiotiká ľudského pôvodu.[3,5]

LAB patria do skupiny heterofermentatívnych baktérií, čo znamená, že produkujú nielen kyselinu mliečnu, ale aj iné látky, ako napríklad kyselinu octovú, etanol alebo oxid uhličitý. Z tohto dôvodu našli

využitie pri výrobe a spracovaní mäsa, zeleniny, vína a mnohých iných potravinových kvasených výrobkov.[7]

Črevné baktérie začínajú kolonizovať GIT človeka okamžite po jeho narodení. Tento proces pretrváva až do 1. roku dieťaťa. Črevná mikroflóra je počas tohto obdobia najvýznamnejšie ovplyvnená konzumáciou materského mlieka, ktoré obsahuje laktobacily, bifidobaktérie a ďalšie neabsorbovateľné zložky, ako napríklad oligosacharidy, laktoferín, lyzozým a rôzne proteíny. Tieto zložky dokážu meniť črevné prostredie, stimulujú rast a množenie baktérií, čím zohrávajú úlohu prirodzene vyskytujúcich sa prebiotík. Problém absencie črevných baktérií môže nastať u nekojených detí. Z tohto dôvodu sa na výrobu detskej výživy používajú baktérie vyizolované z materského mlieka. Zloženie črevnej mikroflóry človeka sa dospievaním postupne mení.[2,8,9]

Tab.1: Probiotické baktérie.[upravené podľa 6]

Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Bifidobacterium</i>	Iné probiotické mikroorganizmy
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Clostridium botyricum</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. delbureckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>

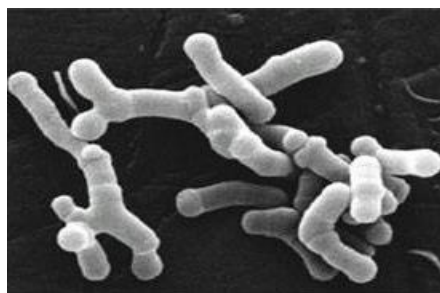
2.3.1 Rod *Bifidobacterium*

2.3.1.1 Morfológia

Bifidobaktérie patria medzi gram pozitívne (G^+), anaeróbne, nesporujúce, heterofermentatívne a nepohyblivé mikroorganizmy. Vyskytujú sa v mnohých tvaroch: krátke, zaguľatené, zakrivené alebo rozdvojené tyčinky tvaru ypsilon (viď. Obr.1). Nájdneme ich v GIT, kde sú súčasťou črevnej mikroflóry, ale aj v ústnej dutine či pošve.[2]

2.3.1.2 Klinický význam

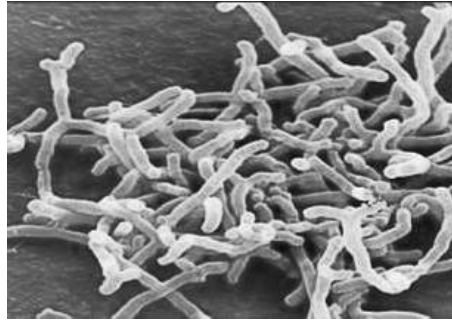
Bifidobaktérie započnú kolonizáciu čriev okamžite po narodení dieťaťa. Svojmu hostiteľovi poskytujú bifidobaktérie značné zdravotných výhod. Sú prevenciou proti hnačke, zmiernujú laktózovú intoleranciu, pomáhajú pri vylučovaní patogénov z organizmu, modulujú imunitný systém a obranyschopnosť hostiteľa, degradujú sacharidy prijaté v strave a iné.[10 – 13]



(A)



(B)



(C)

Obr.1 *Bifidobacterium longum* (A), *Bifidobacterium animalis* (B) a *Bifidobacterium brevis* (C).[14]

2.3.2 Rod *Lactobacillus*

2.3.2.1 Morfológia

Laktobacily sú gram pozitívne (G^+), nesporujúce, striktné anaeróbne a fermentatívne, bezbičíkaté tyčinky a koky (viď. Obr.2). Baktérie sú schopné homofermentatívneho aj heterofermentatívneho mliečného kvasenia. Taktiež sa prirodzene vyskytujú v GIT a v pošvovom sekréte.[2]

2.3.2.2 Klinický význam

Laktobacily majú široké využitie pri liečbe črevných ochorení. Uplatnenie nájdú pri liečbe IBS (syndróm dráždivého hrubého čreva), ako aj pri liečbe žalúdočných vredov spôsobených bakteriálnou infekciou.

Značnou výhodou týchto baktérií je produkcia kyseliny mliečnej, peroxidu vodíka a rôznych bakteriocínov, čo umožňuje ich využitie aj pri liečbe urogenitálnych a vaginálnych infekcií. Kyselina mliečna znižuje pH v pošve a vytvorí tak kyslé prostredie, čo spôsobí úhyn patogénnych baktérií. Peroxid vodíka zase napomáha obnove bakteriálnej mikroflóry vrátením hodnoty vaginálneho pH na pôvodnú. U detí laktobacily zmiernujú atopický ekzém pôsobením protizápalových cytokínov.[15,16]



(A)



(B)

Obr.2 *Lactobacillus casei* (A) a *Lactobacillus helveticus* (B).[14]

2.3.3 Ďalšie probiotické mikroorganizmy

Významnými probiotickými mikroorganizmami sú aj iné baktérie a kvasinky, ako len baktérie mliečneho kvasenia.

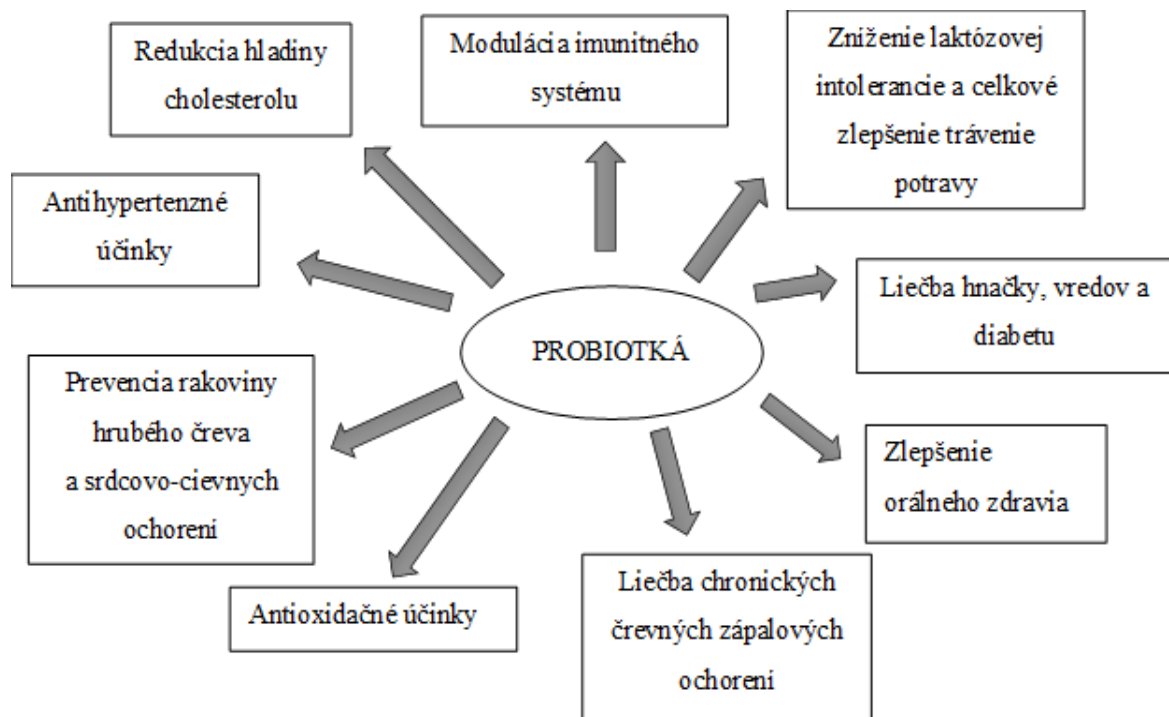
Rody *Pediococcus* a *Bacillus* sú význačné tvorbou spór, vďaka ktorým sa stanú rezistentnými voči vysokým teplotám a pH. Z tohto dôvodu je možné ich skladovať v sušenom stave. Podoba odolnej spóry zaisťuje bezpečný prechod žalúdočnými kyselinami až do miesta účinku, teda do čreva.

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* pomáhajú pri liečbe ochorení GIT, stimulujú imunitný systém, bránia tvorbe karcinogénnych látok v čreve a dokážu redukovať laktózovú intoleranciu. Nevýhodou tejto kvasinky je jej nedostatočná stabilita pri spracovaní potravín alebo pri prechode cez GIT. Z tohto dôvodu je výhodné použiť mikroenkapsuláciu kvasinkových buniek do koncentráty srvátky alebo do arabskej gummy.[2,17]

2.4 Účinky probiotických mikroorganizmov na ľudský organizmus

Probiotické baktérie vykazujú antimikrobiálne účinky, čo znamená, že pôsobia inhibične k ostatným mikroorganizmom. Táto vlastnosť je spôsobená produkciou kyselín (napr. kyselina mliečna, kyselina octová), baktériocínov, peroxidu vodíka a diacetylu pri mliečnom kvasení. Produkované metabolity prispievajú k zníženiu pH v GIT, čím napomáhajú vytvoriť nehostinné prostredie pre patogény a dokážu ich redukovať.

Zdravotné benefity probiotík sú kmeňovo, a niekedy aj druhovo špecifické. Klinické štúdie preukázali redukcii atopického ekzému u detí, ktorým boli perinatálne podané baktérie kmeňa *Lactobacillus* produkujúce protizápalový cytokín. Črevná mikróflóra bohatá na baktérie kmeňa *Bifidobacterium* pomáha znižovať alergické poruchy. Niektoré účinky a zdravotné benefity probiotík sú zhrnuté v Obr.3.[5,15]



Obr.3 Prospešné zdravotné vlastnosti probiotických mikroorganizmov.[upravené podľa 5]

2.4.1 Narušenie homeostázy črevnej mikroflóry

Ľudský GIT je jedným z najkomplexnejších ekosystémov plný mikroorganizmov, ktoré plnia dôležitú úlohu v zdraví človeka. Probiotické baktérie v čreve formujú fyziologické a metabolické procesy a vývoj imunitného systému. Zloženie črevnej mikrobioty je veľmi individuálne a počas života jedinca sa vyvíja. Mutualizmus, ktorý funguje medzi hosťiteľom a črevnou mikroflórou, je zásadný pre udržanie zdravia hosťiteľa. Baktérie poskytujú hosťiteľovi živiny, metabolizujú nestráviteľné zlúčeniny, produkujú vitamíny, bránia kolonizácii oportúnnych baktérií. Na druhej strane, hosťiteľ tvorí životné prostredie baktérií. V ľudskom tele však môže dôjsť k narušeniu mikrobiálnej rovnováhy v čreve, čo nabúra prirodzenú črevnú bariéru a spôsobí množenie patogénov.

V dôsledku abnormálnej aktivácie imunitného systému črevnej sliznice môžu vznikajú chronické poruchy spôsobujúce zápal GIT, ako napríklad IBD (zápalové črevné ochorenia), IBS (syndróm dráždivého hrubého čreva), CD (Crohnova choroba) a UC (ulcerózna kolitída). Na vznik týchto ochorení majú vplyv aj iné faktory, ako napríklad genetické komponenty, faktory životného prostredia alebo ďalšie imunologické poruchy. Analýzou fekálnych vzoriek bol zistený pokles zastúpenia kmeňa *Firmicutes* u IBD, kmeňa *Clostridium* u CD a kmeňa *Lactobacillus* u ochorenia UC. Podávanie probiotických baktérií značne prispieva k liečbe týchto zápalových ochorení, pretože obnovuje zdravý črevný mikrobióm. Zároveň probiotiká fungujú ako prevencia vzniku dysbiózy črevnej mikroflóry.[15,18]

2.5 Využitie probiotických mikroorganizmov

Hlavným odvetvím, ktoré využíva probiotiká je bezpodmienečne potravinárstvo. Probiotické baktérie sa prioritne využívajú na fermentáciu potravín. K asi najviac zastúpeným fermentovaným potravinám patria mliečne výrobky, ako napríklad syry, acidofilné mlieko alebo jogurty. Mlieko je komplexným zdrojom živín pre LAB, a preto je veľmi významným vektorom pre prenos týchto baktérií do hosťiteľského organizmu. Životaschopnosť baktérií vo fermentovaných mliečnych výrobkoch je ovplyvnená antagonistickými interakciami probiokultúr a produkovaných kyselín.

K ďalším fermentovaným potravinárskym produktom bohatým na probiotiká patria aj niektoré mäsové výrobky, najčastejšie sú to fermentované suché salámy. Mäso pomáha chrániť probiotické kultúry pred žľčovými kyselinami v GIT, preto sa baktérie dostanú nepoškodené až do miesta účinku. Fermentované salámy sa vyrábajú kvasením surového alebo vysušeného mäsa bez zahriatia a jeho následným zrením. Tieto výrobky sú bohaté nielen na LAB, ale aj na iné G⁺ baktérie, plesne a kvasinky. Súčasne sa do popredia čoraz viac dostávajú aj fermentované obilniny, a to najmä z dôvodu rôznych potravinových intolerancií, alergií alebo alternatívnych spôsoboch stravovania sa.

Obilniny obsahujú nestráviteľné sacharidy (GOS, FOS a beta-glukány), ktoré stimulujú rast laktobacilov a bifidobaktérií.

Probiokultúry však môžeme nájsť aj v nefermentovaných výrobkoch, napr. v káve, zmrzline, čokoláde, mede a ovocno-zeleninových šťavách. Najbohatšie probiotické šťavy sa pripravujú napr. z pomarančov, ananásu, paradajok, kapusty alebo repy.

Značné využitie nájdu probiotiká aj vo farmaceutickom priemysle ako súčasťou doplnkov stravy alebo liečiv. Nájdeme ich vo forme prášku, tabliet, kapsúl alebo vaginálnych čapíkov.

V kozmetickom a hygienickom priemysle sa probiotiká používajú na výrobu pleťových vôd, hydratačných krémov, sér proti starnutiu, zubných pást, tampónov, šampónov a sprchových gélov.[19]

2.6 Probiotické potraviny

Probiotické potraviny sa radia medzi tzv. funkčné potraviny, ktoré obsahujú biologicky aktívnu zložku s pozitívnym zdravotným účinkom na konzumenta, a zároveň majú aj určitú nutričnú charakteristiku. Takto upravené potraviny si však musia zachovať svoje typické sensorické vlastnosti.[5,20]

2.6.1 Mliečne probiotické potraviny

Mliečne výrobky tvoria hlavnú skupinu potravín vhodných na transfer probiotických baktérií do GIT konzumenta. Zatiaľ čo čerstvé mlieko funguje ako médium pre rast probiotických baktérií, fermentované mliečne výrobky sú vektormi týchto baktérií a poskytujú im ochranu pri prechode GIT.

Do fermentovaných mliečnych výrobkov sa probiotiká pridávajú ako štartovacie kultúry k iniciácii kvasenia. Pri tejto výrobe je nutné dodržať vhodnú inkubačnú teplotu, aby metabolity produkované počas kvasenia negatívne neovplyvnili sensorické vlastnosti produktov. Štartovacia kultúra musí byť kompatibilná s produkovanými probiotikami, aby nedochádzalo k tvorbe inhibítorov.[2,20]

2.6.1.1 Jogurt

Jogurty patria medzi najobľúbenejšie fermentované mliečne výrobky, ktoré sú zdrojom zdraviu prospešných baktérií. Jogurt pripravovaný tradičným spôsobom sa nechá prirodzene fermentovať pri 42 – 45 °C. Moderná výroba jogurtov je kontrolovaný technologický proces, pri ktorom sa využíva nielen čerstvé mlieko, ale aj sušené mlieko, sladidlá, ovocné arómy, farbivá, stabilizátory a emulgátory.

Na kvasenie mlieka je používaná čistá jogurtová kultúra zložená najmä z baktérií *L. bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. pH komerčných jogurtov sa pohybuje v kyslej oblasti, v rozmedzí 3,7 – 4,3.

V súčasnej dobe sa do popredia dostávajú tzv. bio jogurty, ktoré sa vyrábajú nielen pridaním štandardnej jogurtovej kultúry, ale aj pridaním živých probiotických kmeňov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Živé kultúry môžu byť zabudované do jogurtov niekoľkými spôsobmi:

- 1) spolu so štandardnou jogurtovou kultúrou;
- 2) dvojstupňovou fermentáciou (najprv je fermentované mlieko s probiotickou kultúrou, aby bolo dosiahnuté vysokej úrovne životaschopných buniek, a následné pridanie štandardnej štartovacej kultúry na dokončenie kvasenia);
- 3) samostatnou fermentáciou dvoch dávok pasterizovaného mlieka, jedna dávka s probiotickými kultúrami, druhá dávka so štartovacou kultúrou; nakoniec sú obe dávky zmiešané dohromady;
- 4) použitie samostatnej probiotickej kultúry ako štartovacieho média.

Použitím len probiotickej kultúry sa doba fermentácie predlžuje, získava sa nedostatočne kvalitný jogurtový produkt a v dôsledku produkcie metabolitov, môžu byť zhoršené aj sensorické vlastnosti.[21]

2.6.1.2 Kefír

Kefír patrí k tradičným stredoázijským kvaseným mliečnym nápojom krémovej konzistencie a mierne kyslastej osviežujúcej chuti. Získava sa prirodzeným fermentovaním mlieka za použitia tzv. kefirových zrn. Kefírové zrná sú malé zhluky MO spojených polysacharidovým matrix – kefiranom. Obsahujú zmesi LAB (kmene *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), baktérií octového

kvasenia, kvasiniek skvasujúcich laktózu (*Kluyveromyces lactis*) alebo nelaktózových kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*). Každá zložka dotvára typické sensorické vlastnosti kefiru, napr. perlivosť, kyslosť alebo miernu horkosť. Kvasinky produkujú etanol, aromatické zlúčeniny, oxid uhličitý a obohacujú nápoj o vitamíny B1 a B12. Baktérie vyrábajú kyselinu mliečnu a octovú.

Kefir má mnohé zdravotné výhody: podporuje trávenie, má antibakteriálne, protirakovinové, imunitné a hypocholesterolické účinky.

Tradičným spôsobom je kefir vyrábaný priamym pridaním kefirových zŕn do kravského, kozieho alebo ovčieho mlieka, a jeho následnou fermentáciou pri 20 – 25 °C po dobu 18 – 24 hodín. Po ukončení fermentácie je možné zrná prefiltrovať, usušiť a použiť pri ďalšej výrobe. Priemyselná produkcia kefiru je veľmi podobná tradičnému spôsobu. Kefir je po fermentácii distribuovaný do fliaš a necháva sa 24 hodín dozrievať pri 12 – 14 °C.[21]

2.6.1.3 Syr

Termín syr zahŕňa veľmi širokú škálu fermentovaných mliečnych produktov. Ich výroba však nie je technologicky ani principiálne veľmi náročná. Podľa obsahu vlhkosti delíme syry na mäkké, polotvrdé a tvrdé. Produkciu syra možno rozdeliť do dvoch základných rovín: samotná výroba syra a dozrievanie syra.

Ako prvé je potrebné pripraviť vybrané mlieko, štandardizovať ho a pasterizovať, aby boli odstránené patogénne MO. Následne je upravená kyslosť mlieka a pridá sa syridlo tak, aby sa vyzrážala syrenina a srvátka. Syrenina je ďalej upravovaná tvarovaním, lisovaním a solením. Takto pripravený syr je na 2 týždne až 2 roky odložený k dozretiu, kedy sa dotvára jeho charakteristická chuť a konzistencia.

V porovnaní s čistým mliekom a jogurtom, má syr vyššie pH, vyššiu výživovú hodnotu a energetickú hodnotu, vyšší obsah tuku a aj trvanlivosť. Husté prostredie a vysoký obsah tuku zabezpečí ochranu probiotikám pri prechode kyslým žalúdkom.[22]

2.6.1.4 Zmrzlina

Zmrzlina je mrazený mliečny výrobok s obsahom aromatických látok, sladidiel, stabilizátorov, emulgátorov, vitamínov a minerálov. Je veľmi obľúbenou naprieč všetkými vekovými kategóriami. Vyznačuje sa hladkou a jemnou konzistenciou, ktorú má za následok neustále miešanie počas zmrazovania. V posledných rokoch sa na trh dostávajú zmrzlinové výrobky s probiotickými kultúrami, čím sa vytvorila nová funkčná potravina s nutričnými benefitmi.

Zmrzlina je vhodným médiom pre prenos probiotík najmä z dôvodu nízkej teploty a prijateľného pH pre správnu životaschopnosť probiotických baktérií. Proces zmrazovania, topenia a mechanického miešania však môže bakteriálne bunky poškodiť a znížiť tak aj funkčnú účinnosť potraviny. Z časti je možné tomuto negatívne vplyvu predísť pridaním prebiotík, napr. inulínu alebo oligofruktózy. Životaschopnosť probiotík je závislá aj od množstva cukru obsiahnutého v zmrzline.[48]

2.6.2 Nemliečne probiotické potraviny

Mliečne probiotické produkty prinášajú mnoho obmedzení a nevýhod, ako napríklad vysoká hladina cholesterolu, prítomnosť alergénov alebo potreba skladovania pri nízkych teplotách. Tieto dôvody sú motiváciou pre tvorbu nových probiotických výrobkov na rastlinnej alebo mäsovej báze.[20]

2.6.2.1 Ovocné a zeleninové probiotické potraviny

Veľmi perspektívnym médiom pre distribúciu probiotík sa v poslednej dobe stali aj ovocie a zelenina. Najčastejšie sa stretávame s ovocnými alebo zeleninovými šťavami, kvasenou zeleninou a sušeným ovocím.

Príprava probiotických potravín s rastlinným pôvodom je však omnoho zložitejšia ako pri mliečnych produktoch. Aj keď ovocie a zelenina obsahujú množstvo potrebných živín, vitamínov, minerálov, antioxidantov či vlákniny, je potrebné rastlinné matrice pred inokuláciou baktériami modifikovať. Najväčší problém zohráva kyslé pH média, ktoré znižuje životaschopnosť baktérií. Z tohto dôvodu sa médium upravuje pridaním ďalšej zložky alebo sa baktérie do média zabudovávajú mikroenkapsuláciou. Princíp mikroenkapsulácie spočíva v tvorbe malých kvapôčok baktérií, ktoré sú obklopené povlakom ochrannej látky, najčastejšie agarom, chitosanom alebo alginátmi.

Iným spôsobom zabudovania probiotických baktérií do rastlinných nápojov je tzv. priama kvapalná inokulácia do hotového výrobku tesne pred plnením a balením. Veľkou výhodou tejto metódy je vyššia životaschopnosť baktérií, čím sa zvyšujú aj funkčné vlastnosti celého výrobku. Oproti probiotickým baktériám zastúpeným v mliečnych výrobkoch, rastlinným matriciam lepšie vyhovujú *L. rhamnosus*, *L. casei* a *L.plantarum*. [23]

2.6.2.2 Obilné a sójové probiotické potraviny

Probiotické výrobky na báze obilnín kombinujú priaznivé účinky samotného zrna a zdraviu prospešných baktérií. Ich výživová hodnota síce je v porovnaní s mliekom a mäsom nižšia (menej proteínov, nedostatok esenciálnych aminokyselín), ale benefitom je obsah tzv. prebiotík vo forme nestráviteľných sacharidov. Fermentáciou sú obilniny obohatené o probiotické baktérie a produkty ich metabolizmu, čo umožňuje ľahšiu dostupnosť polysacharidov, vitamínov skupiny B alebo minerálov. Životaschopnosť baktérií je podporovaná už spomínanými prebiotikami, konkrétne FOS, pektínom, betaglúkánmi a voľnými isoflavínmi. Ďalšími významnými zložkami celých zŕn sú fytoestrogény, fenolové zlúčeniny, antioxidanty, kyselina fytová a steroly. [49]

Jednou z najdôležitejších strukovín v ázijských krajinách je sója, ktorá obsahuje kvalitné proteíny. Sójový proteín poskytuje dobrý profil aminokyselín. Sója je bohatým zdrojom rozpustnej vlákniny, vitamínov, minerálov a kyseliny listovej. Fermentácia sójového substrátu prináša mnohé zdravotné benefity: redukcia sacharidov zodpovedných za produkciu plynov čreva, zabraňuje množeniu patogénnych baktérií v GIT, prospieva zdraviu kostí, má silnú antioxidačnú aktivitu, funguje ako prevencia degeneratívnych ochorení a v kombinácii s prebiotikami vedie k redukcii LDL cholesterolu. [23]

2.6.2.3 Probiotická čokoláda

Čokoláda patrí celosvetovo medzi najobľúbenejšie produkty nielen pre svoju lahodnú chuť, ale aj pre vysoké nutričné hodnoty a ľahkú stráviteľnosť. Čokoláda sa vyrába z kaka, kakaového masla, mlieka, mliečnych materiálov a cukru. Tieto zložky zabezpečujú príjem proteínov, sacharidov lipidov, minerálnych látok aj vitamínov. Dokáže zlepšiť náladu, podporuje duševné zdravie, pomáha pri kontrole chuti do jedla a zlepšuje zdravie srdca, za čo sú zodpovedné polyfenolové antioxidanty a flavonoidy. Obavy môžu nastať kvôli vysokému obsahu cukru, čo napomáha k rozvoju obezity, diabetu a osteoporózy. Čokoláda je sama o sebe funkčnou potravinou, pretože obsahuje dostatok polyfenolových antioxidantov a flavonoidov, a vykazuje prospešné zdravotné účinky.

V súčasnosti sa trh zameriava na posilnenie zloženia čokoládových výrobkoch zabudovaním probiotických baktérií. Výber probiotík musí zahŕňať otázku životaschopnosti daného kmeňa a zároveň senzoryckú prijateľnosť spotrebiteľmi. V súlade s týmto kódexom bola vyvinutá čokoládová pena s obsahom probiotík aj prebiotík, konkrétne inulínu. Pre zlepšenie životaschopnosti je možné využiť aj zabudovanie so matrice metódou mikroenkapsulácie, čím budú probiotiká ochránené pred stresovými podmienkami v prostredí a bezpečne sa dopraví na miesto účinku.[21]

2.6.2.4 Mäsové výrobky

Mäso je veľmi výživná potravina s vysokým stupňom biologickej dostupnosti jednotlivých zložiek. Tieto výhody sa ukázali vhodné aj pre probiotické kmene baktérií a matrice mäsového pôvodu sa stali vhodnými pre prenos probiotík do GIT konzumenta.

Suché fermentované salámy sa vyrábajú zo zmesi hovädzieho alebo bravčového mäsa, bravčovej masti a ďalších aditív pre stabilizáciu a ochutenie výrobku, ktorá sa plní do čriev. Takto pripravené produkty sa nechajú fermentovať a následne zrieť. Na iniciáciu kvasenia sa pridáva štartovacia kultúra živých MO s požadovanou metabolickou aktivitou. Najviac zastúpené sú LAB *L.casei*, *L.curvatus*, *Pediococcus acidilacti* a *Pediococcus pentosaceus*. Pri technologickej výrobe salámy sa médium nezahrieva, takže nenastáva riziko poškodenia baktérií ohrevom. Výhodný spôsob prenosu baktérií do substrátu poskytuje aj mikroenkapsulácia s použitím alginátových ochranných látok.[24]

2.6.3 Doplnky výživy

Probiotiká je možné podávať aj ako synteticky vyrobené doplnky stravy vo forme tabliet, kapsúl alebo prášku. Pri výrobe takýchto produktov je dôležité zvážiť výber konkrétneho MO, jeho životaschopnosť počas doby výroby a dlhej doby skladovania, jeho rezistenciu voči žalúdočným kyselinám, dostatočnú stabilitu a presnosť dávkovania probiotík v konečnom produkte.

Na výrobu sú najčastejšie využívané lyofilizované probiotické kultúry. Pri procese lyofilizácie však nastáva riziko poškodenia biologickej kultúry, a tým aj životaschopnosti probiotík v produkte. Z tohto dôvodu sa pred zmrazením do vzorky pridávajú ochranné látky.[20]

2.7 Prebiotiká

Na stimuláciu rastu a životaschopnosti črevných baktérií je možné použiť nestráviteľné zložky potravy s prebiotickým účinkom. Potravina klasifikovaná ako prebiotikum musí spĺňať niekoľko podmienok:

- nesmie byť hydrolyzovaná ani absorbovaná v hornej časti GIT;
- musí byť selektívna pre daný druh baktérií;
- musí pozitívne meniť zloženie črevnej mikroflóry.

Vývoj prebiotických substrátov je zameraný najmä na nestráviteľné oligosacharidy, ktoré spĺňajú všetky vyššie uvedené kritériá.

Oligosacharidy sú cukry zložené z 2 – 20 monomérov, prirodzene sa vyskytujú v ovocí a zelenine a sú extrahovateľné. Oligosacharidy sa vyrábajú synteticky hydrolýzou polysacharidov (vlákniny alebo škrobu) alebo enzymatickým štiepením.

V súčasnej dobe je vykonávaných mnoho štúdií, ktoré skúmajú podporu črevnej mikroflóry pomocou fruktooligosacharidov (FOS) alebo galaktooligosacharidov (GOS). Zo zmesi FOS monomérov a iných polysacharidov spojených β -(1,2)-glykosidickou väzbou je zložené ďalšie prebiotikum rastlinného pôvodu – inulín. Prebiotický potenciál vykazujú aj pektín, polydextrózy alebo rastlinné polyfenoly. Pri produkcii prebiotík by mohli významnú úlohu zohrať vedľajšie produkty spracovania ovocia a zeleniny, liehovarníctva alebo pivovarníctva.[25,26]

2.8 Synbiotiká

Inou možnosťou ako modulovať črevnú mikroflóru je použitie synbiotík, ktoré sú kombináciou prebiotík a probiotík. Spájajú zdravotné benefity so stimuláciou rastu a životaschopnosti probiotických baktérií pomocou prebiotického substrátu. Synbiotiká znižujú výskyt infekčných ochorení, chránia pred patogénnymi baktériami, znižujú cholesterol, zlepšujú priepustnosť čriev a stimulujú imunitný systém.

K probiotickým kmeňom, ktoré sa používajú v synbiotických výrobkoch, patria kmene *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Ako podporné prebiotické substráty sú používané FOS, GOS, XOS a inulín.[27,29]

2.9 Mechanizmus účinku

2.9.1 Mechanizmus účinku probiotík

Skúmanie mechanizmu účinku probiotických baktérií je stále otvorené a zväčša sú tieto mechanizmy neznáme. Čo však vieme je, že probiotiká sa podieľajú na úprave zdravotného stavu hostiteľa mnohými spôsobmi:

- produkciou inhibičných látok, ako napr. H_2O_2 , bakteriocíny alebo organické kyseliny;
- blokovaním adhézných miest črevného epitelu pre patogénne baktérie;
- sú konkurenciou pre patogénne baktérie v oblasti dostupných živín;
- odbúravaním toxínov, ako aj blokovanie toxínových receptorov;
- modulácia imunitného systému.

Ovplyvnením črevného pH a produkciou antimikrobiálnych látok vytvára nehostinné prostredie pre patogénne MO, ktoré produkujú toxíny škodlivé pre hostiteľa.[28,29]

2.9.2 Mechanizmus účinku prebiotík

Účinok prebiotík na imunitný systém taktiež nebol ešte podrobne preskúmaný. Sú však navrhnuté niektoré možné mechanizmy:

- prebiotická vláknina znižuje pečenevé lipogénne enzýmy, v dôsledku produkcie mastných kyselín s krátkym reťazcom (SCFA);
- produkcia SCFA fermentáciou vlákniny funguje ako histónová modulácia a zvyšuje dostupnosť mnohých génov voči transkripčným faktorom;
- modulácia produkcie mucínu (hlien pokrývajúci črevný epitel);
- FOS a niektoré iné prebiotiká zvyšujú obsah lymfocytov a leukocytov v črevných lymfatických tkanivách a periférnej krvi.

Vláknina je utilizovaná na rast črevnej biomasy, čím sa zväčšuje aj objem stolice a pôsobí tak ako prevencia zápchy. V niektorých prípadoch môže byť vláknina metabolizovaná na vodík, metán alebo oxid uhličitý.[29]

2.10 Metódy identifikácie probiotických baktérií

Baktérie mliečneho kvasenia sú považované za hlavnú skupinu probiotík, ktoré sú pridávané do potravinových výrobkov za účelom obohatenia výživových vlastností alebo predĺženia trvanlivosti. Pre udržanie bezpečnosti a kontrolu kvality potravín je dôležité tieto baktérie monitorovať či sú splnené povolené normy.

Identifikácia probiotických baktérií, najmä na druhej úrovni, však nie je jednoduchá. V posledných rokoch sa spôsoby detekcie presúvajú z fenotypových metód na omnoho presnejšie a citlivejšie genotypové metódy.[30]

2.10.1 Fenotypové metódy

Tradične sa LAB klasifikovali na základe ich fenotypových vlastností, ako napr. morfológia, spôsob fermentácie glukózy, teplotné rastové optimum alebo štruktúra bunkovej steny. Nevýhodou týchto metód je nízka reprodukovateľnosť, nejednoznačnosť a časová náročnosť. Ďalším problémom je expresia génu priamo závislá na podmienkach prostredia v laboratóriu. Z týchto dôvodov sú fenotypové metódy nespoľahlivé pre identifikáciu bakteriálnych kultúr či už na druhej alebo rodovej úrovni.[30]

2.10.1.1 Morfologické metódy

Pozorovanie morfologických vlastností buniek pod mikroskopom je prvotným nástrojom určenia rodu a čistoty probiotickej kultúry podľa tvaru, veľkosti a usporiadania jednotlivých baktérií. Pre lepšie rozlíšenie buniek sa využívajú metódy farbenia endospór, kapsúl alebo farbenie Gramovým činidlom.

Princípom Gramovho farbenia je interakcie bunkovej steny s farbiacim roztokom, podľa čoho môžeme baktérie rozdeliť do gram pozitívnej (G^+) a gram negatívnej (G^-) skupiny. Tvarovo sú LAB veľmi rozmanité, môžu byť guľaté (koky) alebo predĺžené v tvare tyčínok (bacily).[31]

2.10.1.2 Biochemické a fyziologické metódy

Biochemické metódy identifikácie sa sústreďujú na metabolické pochody baktérií využitím špecifických médií, živín (sacharidových substrátov) alebo rastových podmienok (teplota, pH, prítomnosť O_2). Biochemický profil danej baktérie umožní jej identifikáciu a charakterizáciu na úrovni rodu aj druhu.

V súčasnosti sa využívajú miniaturizované testovacie súpravy vo forme jednorazových prúžkov. Ich výhodou je najmä rýchlosť, jednoduchá a ľahká obsluha a všestrannosť.

Ďalšou analýzou tohto typu s presnými výsledkami je analýza metylesterov mastných kyselín (FAME). Mastné kyseliny sú hlavnou zložkou lipidov a lipopolysacharidov, ktoré tvoria mnohé bunkové štruktúry. Veľká variabilita v štruktúre, v dĺžke reťazca, v pozíciách násobných väzieb a substitučných skupín týchto zložiek je zárukou spoľahlivej identifikácie baktérií. Táto metóda sa však neodporúča na identifikáciu laktobacilov, u ktorých presné výsledky preukázané neboli.[31,32]

2.10.2 Genotypové metódy

V posledných rokoch bolo vyvinutých niekoľko techník založených na molekulárnej diagnostike DNA alebo RNA obsiahnutých v bunke organizmu. Vďaka nim je možné spoľahlivo rozlíšiť kmene baktérií s podobným fenotypom. Technika polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) bola vyvinutá v 80. rokoch Kary Mullisom a do dnes sa považuje za základný nástroj molekulárnej biológie. Tejto technike je venovaná celá kapitola 2.12.[33]

2.11 Izolácia nukleových kyselín

2.11.1 Izolácia DNA

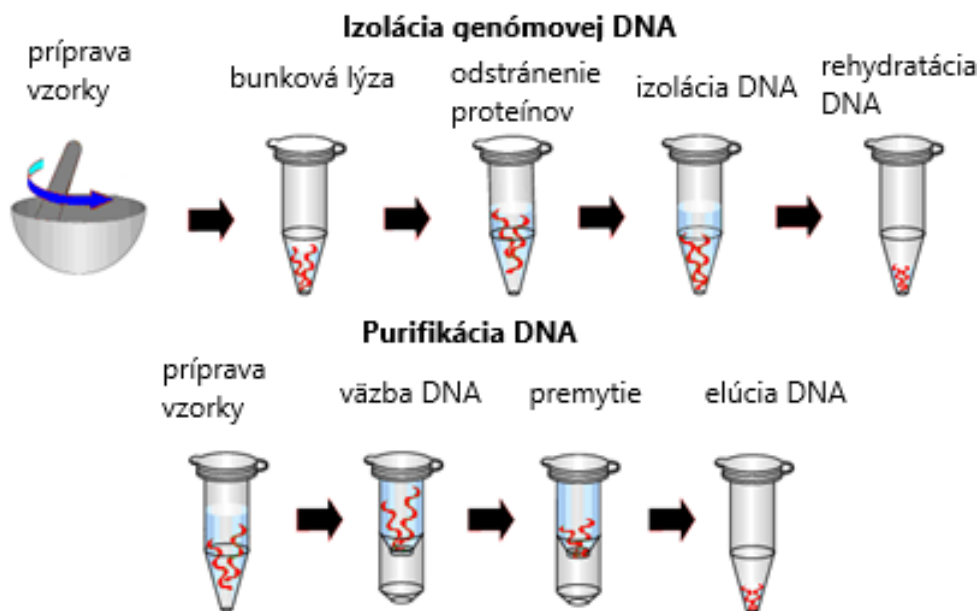
Izolácia DNA je základným procesom a krokom analyzačných metód molekulárnej biológie. Za účelom optimalizácie oddelenia DNA z komplexných biologických vzoriek boli vyvinuté mnohé postupy. Ich výber závisí od technického vybavenia laboratória, časového obmedzenia, použitého izolačného materiálu a získaného výťažku.

Všetky postupy izolácie zahŕňajú lýzu buniek, denaturáciu nukleoproteínového komplexu, inaktiváciu nukleáz a finálnu precipitáciu DNA (viď. Obr.4). Bunkovú lýzu je možné vyvolať detergentami, ktoré rozpúšťajú bunkovú membránu (napr. SDS), alebo enzýmami na štiepenie glykoproteínov a inaktiváciu deoxyribonukleáz, aby výsledný výťažok nebol znehodnotený. Následná precipitácia DNA z roztoku sa uskutočňuje prídavkom vysokej koncentrácie soli (napr. octan amónny) za prítomnosti rozpúšťadiel (napr. 70-80% etanol alebo 40-50% izopropanol). Získaná DNA je nakoniec podľa potrebnej doby uskladnenia rozpustená vo vode alebo v prufri (napr. TE).

DNA možno izolovať viacerými spôsobmi:

- A) *Príprava a použitie hrubého lyzátu* – lýza buniek prebehne pri vysokej teplote (90°C počas 20 minút) alebo sa uskutoční pomocou enzýmu proteináza K. DNA lyzáat môže byť okamžite použitý v ďalších procesoch.
- B) *Vysol'ovacie metódy* – najprv je pripravený hrubý lyzáat, ktorý sa následne vysol'uje. Počas vysol'ovania sa proteíny a ďalšie kontaminanty precipitujú pri vysokej koncentrácii soli (napr. octan draselný, octan amónny). Následne je roztok centrifugovaný a alkoholovou precipitáciou sa z neho získa DNA.
- C) *Organická extrakcia* – z bunkového lyzátu sú kontaminanty odstránené organickými rozpúšťadlami. Bunky sú lyzované detergentami a následne sa roztok zmieša so zmesou fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu. Potom je zmes centrifugovaná, čím sa získajú dve oddelené vrstvy – organická fáza s kontaminantmi a vodná fáza s DNA. Z vodnej fázy sa DNA izoluje najčastejšie alkoholovou precipitáciou.
- D) *Centrifugácia v gradiente chloridu cézneho* – postupom je možné získať vysoko kvalitnú genómovú DNA. Táto metóda je však veľmi časovo náročná, pracná, drahá a v rutinných analýzach sa nevyužíva. Roztok DNA je po alkoholovej precipitácii zmiešaný s chloridom céznym a etídiumbromidom, a následne je niekoľko hodín ultracentrifugovaný. Získaná DNA sa extrahuje izopropanolom, aby sa etídiumbromid odstránil. Nakoniec sa DNA precipituje etanolom.
- E) *Minikolonová (kolonková) purifikácia* – pri tomto postupe je využitá schopnosť materiálu v kolonke adsorbovať DNA za určitej pH a koncentrácii solí. Po lýze buniek nasleduje adsorpcia DNA na maticu minikolonky, ktoré možno centrifugovať. Po centrifugácii sa nukleová kyselina premyje, aby sa odstránili prítomné kontaminanty a nakoniec sa uskutoční uvoľnenie

DNA. Ako náplne do koloniek sa najčastejšie využívajú kremičitanové (silika) matrice alebo magnetické guľôčky pokryté materiálom viažucim DNA (polyméry, silika, hydroxyapatit).[53]



Obr.4 Postup izolácie DNA s využitím duálneho systému.[43]

2.11.2 Izolácia RNA

Izolácia vysokokvalitnej RNA je veľmi komplikovaným procesom, preto je potrebné dodržiavať presné pracovné postupy. Okrem dôkladného výberu optimálnej metódy, je potrebné dohliadať aj na opatrnú manipuláciu so vzorkami, z ktorých bude RNA izolovaná, a na dôsledné uskladnenie získaného produktu. Počas izolácie RNA sú v roztoku prítomné inhibítory ribonukleáz, aby sa zabránilo degradácii RNA (napr. guanidínové soli, SDS, chemikálie obsahujúce fenol). Ešte pred vlastnou izoláciou je veľmi dôležité sterilizovať všetky pomôcky, ktoré budú v kontakte so vzorkou. Vzorka vybraná na izoláciu RNA sa pred spracovaním udržiava v tekutom dusíku, v suchom ľade alebo je vložená do špeciálnych stabilizačných roztokov.

Existuje niekoľko spôsobov ako možno RNA izolovať:

- A) *Organická extrakčná metóda* – štandardná metóda. Najprv je potrebné vzorku homogenizovať vo fenolovom roztoku a centrifugovať. Počas centrifugovania sa oddelia tri vrstvy: spodná organická fáza, stredná fáza s denaturovanými proteínmi a genómovou DNA, a vrchná vodná fáza s RNA. Z odobratej vrchnej fázy sa RNA vyzráža alkoholom a rehydratuje.
- B) *Minikolonová filtračná metóda* – v kolonkách sú vložené membrány zo sklenených vlákien, silika alebo iontomeničové membrány. Vzorka sa lyzuje v roztoku pufru s ribonukleázovými inhibítormi. Počas centrifugovania prechádza lyzátny roztok cez membrány, na ktorých sa zachytávajú nukleové kyseliny, a následne je niekoľkokrát premyvaný. Výsledná RNA sa potom získa elúciou vhodným elučným činidlom a ďalším centrifugovaním do novej skúmavky.
- C) *Metóda využívajúca magnetické partikuly* – partikuly sú zložené z paramagnetického vnútra, ktoré je obklopené obalom modifikovaným na naviazanie RNA. Po lýze sa vzorka zmieša s magnetickými partikulami, aby sa RNA naviazala na ich povrch. Pomocou externého magnetického poľa je možné partikuly odchytiť, previezť ich do premyvacieho roztoku a rozsuspendovať. Na záver je RNA uvoľnená do elučného činidla a magnetické partikuly sú odstránené.

D) *Priama lýza* – pri tomto postupe sú použité tzv. lyzačné roztoky, ktoré lyzujú bunky a zároveň aj stabilizujú nukleové kyseliny. Získanú RNA je možné okamžite použiť na ďalšiu analýzu.

Izolovanú RNA je nutné kvantifikovať. RNA možno skladovať rozsuspendovanú v špeciálnych roztokoch bez ribonukleáz, aby nedošlo k jej poškodeniu. Ideálne skladovanie je pri teplote 80°C v alikvotných množstvách určených na jedno použitie.[42]

2.12 Polymerázová reťazová reakcia

PCR je pomerne jednoduchá enzýmová technika, pomocou ktorej je možné rýchlo syntetizovať veľké množstvo potrebného úseku DNA opakovaním teplotných cyklov *in vitro*. Celá technika bola inšpirovaná prirodzeným replikačným systémom DNA. Metóda je využiteľná pre rôzne genetické sekvencie (DNA, RNA), dokáže detegovať prítomnosť akéhokoľvek MO aj vo veľmi malom množstve a je pomerne rýchla.[33]

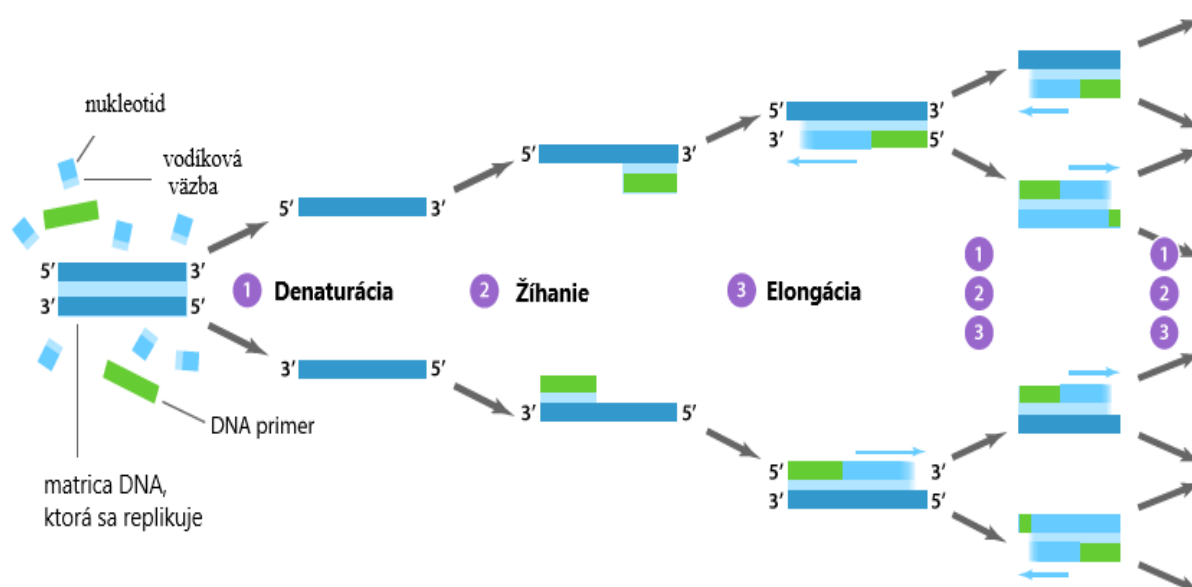
2.12.1 Zložky PCR

Reakčná zmes pre PCR sa skladá z niekoľkých komponentov:

- *Templát (matrica) DNA* – vzorka DNA, ktorá obsahuje cieľnú sekvenciu. Na začiatku je dvojzávitnica molekuly DNA vystavená vysokej teplote, čo zapríčini oddelenie jednotlivých vlákien. Primery nasadnú na cieľné miesta a vyčlenia tak prepisovaný úsek. Následne je podľa princípu komplementarity syntetizovaný nový reťazec DNA.
- *DNA-polymeráza* – enzým, ktorý syntetizuje nové vlákno DNA komplementárne k matrici. Najbežnejšie používanými enzýmami sú *Taq*-DNA-polymeráza (termostabilná polymeráza) alebo *Pfu*-DNA-polymeráza (polymeráza z *Pyrococcus furiosus*). Príliš veľké množstvo pridanej polymerázy môže mať za následok produkciu nešpecifických produktov PCR, čím sa výrazne znižuje výťažok cieľového fragmentu.
- *Primery* – krátke synteticky pripravené úseky jednovláknovej DNA komplementárne s cieľnou sekvenciou; vymedzujú úsek na templaté DNA, ktorý bude prepisovaný. Primery by nemali byť medzi sebou komplementárne, pretože hrozí riziko vzniku dimérov, najmä pri ich nadbytku.
- *Nukleotidy (dNTP a deoxynukleotidtrifosfáty : dATP, dCTP, dGTP a dTTP)* – jednotlivé zložky báz A, T, G a C, ktoré sú stavebnými komponentami nových reťazcov.
- Mg^{2+} (resp. $MgCl_2$) – ióny esenciálne pre aktivitu DNA-polymerázy. Ich koncentráciu je potrebné optimalizovať podľa konkrétneho množstva primerov a DNA matrice.
- *Tlmivý roztok (pufor)* – ovplyvňuje výsledky polymerázovej reťazovej reakcie, zvyšuje špecifickosť a výťažok amplifikácie.[38]

2.12.2 Základný princíp PCR

Podstatou PCR je cyklicky opakujúca sa syntéza nových fragmentov DNA za použitia enzýmu DNA-polymeráza v smere 5' → 3' (viď. Obr.5). Dvojreťazcová DNA vo vzorke je denaturovaná zahriatím na 90-95°C. Následne sa vzorka ochladí na 40-60°C, aby došlo k pripojeniu (žihanie) primerov na špecifické úseky jednovláknovej DNA, ktoré vymedzia replikačné fragmenty. Ďalším zahriatím na 70-75°C je iniciovaná syntéza nových reťazcov DNA-polymerázou, ktorá spája nukleotidy v reakčnej zmesi v presnom poradí podľa komplementarity k DNA matici (elongácia).



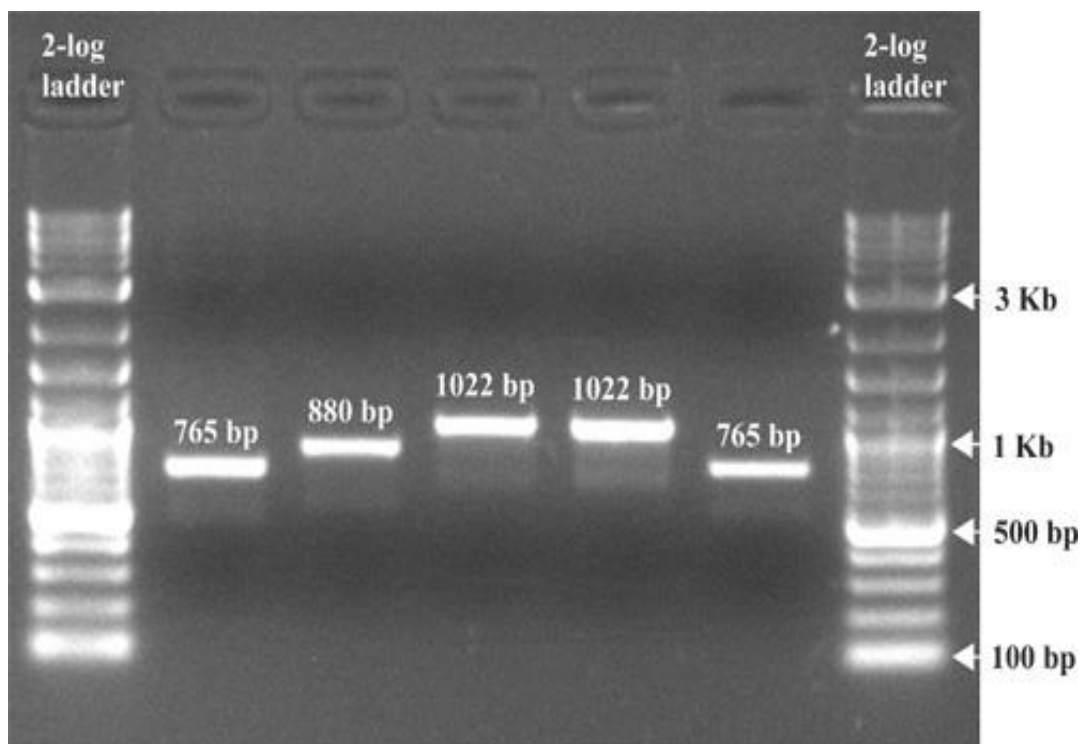
Obr.5 Priebeh polymerázovej reťazovej reakcie.[37]

Použitie tepelne odolnej *Taq*-DNA-polymerázy umožní opakovanie syntézy formou cyklov pričom polymeráza nebude zvýšením teploty zničená. Neustálym opakovaním troch základných krokov (denaturácia, nasadenie primerov a syntéza reťazca) sa získajú produkty PCR – amplikóny DNA. Prístroj, ktorý umožní presné naprogramovanie priebehu tepelných blokov pre jednotlivé kroky PCR sa nazýva termocyklér.[38,39]

2.12.3 Detekcia a analýza PCR produktu

Amplifikačný produkt PCR pozostáva z niekoľkých fragmentov DNA. Detekcia a analýza týchto produktov sa uskutoční jednoduchou metódou elektroforézy na agarózovom alebo na akrylamidovom géle. Vizualizácia produktu PCR môže prebieha farbením amplikónov DNA pomocou etídiumbromidu. Ďalším variantom ako vizualizovať produkty, je označenie PCR primerov alebo nukleotidov v reakčnej zmesi fluorescenčnými interkalačnými farbivami (fluorofory) ešte pred začatím amplifikácie, čím sa farbivo zabuduje priamo do amplifikačného produktu.

Počas elektroforézy sa jednotlivé fragmenty separujú podľa svojej veľkosti a náboja. Produkty PCR sú viditeľné pod UV svetlom ako fluorescenčné ružové pásy alebo škvrny na agarózovom géle zafarbenom v roztoku etídiumbromidu (viď. Obr.6). V automatizovaných systémoch sa používa analyzátor fragmentov založený na princípe kapilárnej elektroforézy. Detekcia v tomto prístroji sa vykonáva laserovou diódou. Avšak túto metódu je možné použiť len u PCR s primermi naviazanými na fluórchrómy.[40,41]



Obr.6 Vizualizácia produktov PCR na agarózovom géle.[50]

2.12.4 Modifikácie PCR

V posledných rokoch boli vyvinuté nové modifikácie a varianty založené na PCR, ktoré pomohli zvýšiť výkonnosť a špecifickosť.

2.12.4.1 Multiplex PCR

Multiplex PCR alebo aj mnohonásobná PCR umožňuje amplifikovať súčasne niekoľko sekvencií naraz, pretože sa do reakčnej zmesi pridáva väčší počet primerov rozoznávajúcich potrebné sekvencie. Veľkou výhodou tejto metódy je identifikácia viacerých MO vo vzorke počas jednej reakcie, čím sa znižujú náklady aj časová náročnosť. Prítomnosť viac ako jedného páru primerov však zvyšuje pravdepodobnosť získania falošných produktov amplifikácie, čo môže výsledky skresliť. Preto je nutné pripraviť správne primery podľa požadovanej špecifickej sekvencie DNA a metódu štandardizovať vykonaním viacerých pokusov.[34]

2.12.4.2 Nested PCR

Nested PCR, resp. vnorená PCR, je modifikáciou, ktorá zvyšuje citlivosť a špecifickosť polymerázovej reakcie. V metóde sú použité dve sady primerov v dvoch po sebe nasledujúcich PCR reakciách. Prvá sada amplifikuje požadovanú sekvenciu. Tieto amplikóny sú následne použité ako templát pre druhú sadu primerov a ďalšiu amplifikáciu. Potenciálnym problémom môžu byť falošne získané produkty z nešpecifických sekvencií.[35]

2.12.4.3 PCR s reverznou transkriptázou

Na amplifikáciu cieľovej sekvencie vo forme RNA sa využíva metóda PCR s použitím enzýmu reverzná transkriptáza. Templát RNA je práve týmto enzýmom prevedený na komplementárnu cDNA, ktorá je predlohou v ďalšej amplifikácii klasickou PCR. Metóda môže kombinovať obe reakcie do jednej skúmavky alebo sa syntetizovaná cDNA prenesie na PCR do ďalšej skúmavky. Jednokroková reakcia je vhodnejšia pre skríniny, dvojkroková dokáže detegovať niekoľko informácií z jednej vzorky RNA.[36]

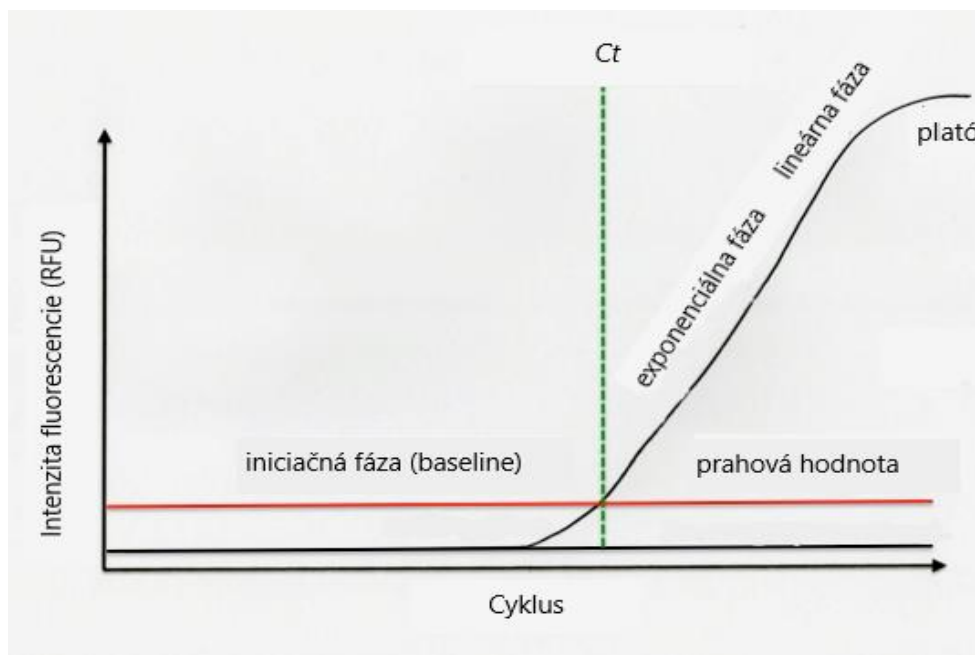
2.12.4.4 Semikvantitatívna PCR

Technika semikvantitatívnej PCR umožňuje aproximáciu množstva amplifikačnej cDNA vo vzorke k štandardizovaným hodnotám. Amplifikačný produkt zafarbený etídiumbromidom sa segreguje elektroforézou na agarózovom géle. Nakoniec je vypočítaná optická hustota vzorky pomocou hustomeru. Problémom je vznik nešpecifických hybridizácií, preto sa vykonáva kontrola špecificity pomocou špeciálnych hybridizačných sond.[33]

2.12.4.5 Real-time PCR

PCR v reálnom čase (RT-PCR) alebo kvantitatívna PCR (qPCR) je metóda, ktorá monitoruje vzniknuté amplikóny cDNA v reálnom čase sledovaním fluorescence. Výhodami tejto metódy sú rýchlosť získania výsledku, zníženie rizika kontaminácie, jednoduchosť techniky, možnosť detekcie mikroorganizmov v niekoľkých vzorkách naraz a presnosť rozlíšenia príbuzných kmeňov.

K detekcii cDNA sa využívajú fluorescenčné detekčné systémy s interkalačnou látkou alebo s fluóroforovými sondami. Počas amplifikácie sa interkalačné látky alebo fluórchrómy naviažu na vznikajúcu cDNA, čím sa podmieni emitácia žiarenia smerom k detektoru. Každým cyklom sa navyšuje množstvo amplifikačnej cDNA, a tým sa zvyšuje aj hladina fluorescence. Interkalačné látky však vykazujú nízku špecifickosť, pretože viažu sa aj na iné produkty alebo diméry primerov. Nešpecifickosť možno minimalizovať starostlivým výberom primerov a použitím optimálnym podmienok PCR. K detekcii hybridizačnými sondami sa najčastejšie využívajú hydrolyzačné alebo molekulárne sondy. Použitie sond umožňuje identifikáciu polymorfizmov a mutácií, avšak sú veľmi zložité a nákladné.[30,33]



Obr.7 Amplifikačná krivka priebehu PCR..[47]

Grafický priebeh qPCR znázorňuje amplifikačná krivka (viď. Obr.7), ktorá opisuje závislosť detegovanej fluorescence na konkrétnom cykle. Amplifikačná krivka sa skladá z niekoľkých fáz:

- 1) *Baseline fáza (resp. fáza pozadia)* – počiatočná koncentrácia templátu je nízka, preto je nízka aj intenzita fluorescence.
- 2) *Exponenciálna fáza* – po dosiahnutí detekčného prahu (červená čiara) sa začne amplifikácia, počet amplikónov sa zdvojnásobuje, čím rastie aj množstvo vznikajúcej fluorescence.
- 3) *Lineárna fáza* – koncentrácia templátu sa zvyšuje, avšak zložky reakcie sa spotrebúvajú, a tak reakcia sa spomaľuje.
- 4) *Plató fáza* – všetky primery a nukleotidy boli už spotrebované, čím množstvo amplikónu už nerastie a reakcia dosiahla maximálneho výťažku.

Jednotlivé reakcie prebiehajú v cykle, kde intenzita fluorescence najprv narastá nad prahovú hodnotu C_q (niekedy aj C_t). Koreláciou vznikajúcej fluorescence, hodnoty C_q a množstva amplifikačného produktu možno kvantifikovať výťažok PCR.[46]

2.12.5 Inhibitory PCR

Metóda PCR je založená na enzymatických reakciách. Z tohto dôvodu je veľmi citlivá na prítomnosť inhibitorov pochádzajúcich z pôvodnej vzorky alebo vnesených do vzorky počas manipulácie a prípravy na PCR. K inhibitorom patria organické aj anorganické zlúčeniny, tuhé alebo rozpustené, ktoré sa vyskytujú v rôznych biologických materiáloch, vzorkách životného prostredia alebo potravinách (viď. Tab.2).

PCR môže byť ovplyvnená hneď niekoľkými inhibičnými mechanizmami: inhibitory DNA-polymerázy pôsobia na enzým priamo jeho degradáciou alebo nepriamo chelatáciou Mg^{2+} iónov; nukleotidové inhibitory alebo inhibitory nukleových kyselín blokujú amplifikáciu väzbou na DNA alebo ju zničia; a inhibitory fluorescence ovplyvňujú detekciu amplikónov tvorbou zrazením, ktoré blokujú fluorescence, alebo interagujú s fluoroformi.

Ďalšiu kategóriu inhibítorov možno definovať v prípade, že pri PCR sú použité celé bunky – inhibítory bunkovej lýzy. Dôsledkom inhibície sú falošne negatívne výsledky.[44,45]

Tab.2: *Inhibítory PCR v rôznych matriciach.*[upravené podľa 44,45]

Matrica	Inhibítor
Bobule	Fenoly, polysacharidy
Rastliny	Pektín, polyfenoly, polysacharidy, xylán
Syr, mlieko	Proteázy (plazmín), ióny vápnika
Morské plody, lastúrniky, ustrice	Glykogén, polysacharidy
Ľudské vzorky (kosti, krv, vlasy, koža)	Kolagén, hemoglobín, laktoferín, melanín, IgG
Stolica	Polysacharidy, kyseliny fytovej, žlčové soli
Pôda	Fenoly, kyselina fulmová, kyselina trieslová, humínové zložky

2.12.6 Výhody PCR

- Vysoká špecifickosť – umožňuje identifikáciu príbuzných kmeňov, čo je výhodou najmä u laktobacilov.
- Rýchlosť – generuje miliardu kópií za menej ako 3 hodiny.
- Vysoká citlivosť – analýza aj veľmi malej vzorky.
- Široká škála využitia – umožňuje detekciu DNA ako aj RNA, od MO až po rastlinnú a živočíšnu ríšu.
- Relatívne ľahko vykonateľná technika.[41]

2.12.7 Nevýhody PCR

- Cena – v porovnaní s konvenčnými technikami je nákladná.
- Vyžaduje veľkú mieru zručností a odborných znalostí.
- Tvorba falošných pozitívnych výsledkov – farbivá sa viažu aj na nešpecifické PCR produkty alebo na primery, ak sú v nadbytku.
- Možná kontaminácia pri manipulácii
- Vyžaduje znalosti z bioinformatiky – je potrebné navrhnuť vhodné primery komplementárne pre vybrané restrikčné miesta.
- Narábanie so škodlivými chemikáliami – najmä farbivá (etídiumbromid alebo fluórochrómy) a UV svetlo, ktoré sú karcinogénne.[41]

2.12.8 Aplikácia PCR v praxi

PCR metóda má veľmi široké využitie. Vo forennej vede je dôležitým nástrojom pri profilovaní odtlačkov prstov a identifikácii neznámej osoby prostredníctvom DNA.

V oblasti medicíny a diagnostiky slúži na zistenie pravdepodobnosti genetických ochorení prenášaných z rodičov na potomkov. Ochorenie môže byť zistené už počas prenatálneho vývinu amniocentickým vyšetrením, kedy sa odoberú bunky plodu cirkulujúce v krvi matky a vyšetruje sa

možnosť mutácií v embryu. Z dôvodu vyšetrenia bezpečnosti darovanej krvi boli vyvinuté PCR testy umožňujúce detekciu vírusu HIV už v počiatočnom štádiu alebo prítomnosť bakteriálnej kontaminácie v krvi.

PCR testy sprostredkujú detekciu živých aj mŕtvych MO, prípadne aj ich rezistenciu na antibiotiká, počas tuberkulózy a pomáhajú stanoviť účinky terapie.[41]

4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom teoretickej časti práce bolo spracovať dostupné poznatky o vybraných druhoch probiotických baktérií, ich využití a výskyte vo fermentovaných potravinových výrobkoch, a spôsobe identifikácie takýchto druhov baktérií v potravinách.

Experimentálna časť je zameraná na detekciu prítomnosti probiotík vo fermentovaných rastlinných matriciach, konkrétne v kvasenej kapuste. Pre porovnanie som sa pokúsila sama pripraviť kvasenú kapustu v domácich podmienkach a porovnať množstvo baktérií v nej so zakúpenou kvasenou kapustou. V rámci experimentálnej časti boli zvládnuté nasledovné protokoly:

- Príprava domácej kvasenej kapusty.
- Príprava hrubého lyzátu.
- Fenol-chloroformová izolácia bakteriálnej DNA s etanolovou precipitáciou.
- Izolácia bakteriálnej DNA komerčným kolonkovým kitom.
- Kvantifikácia izolovanej DNA, kontrola kvality a čistoty DNA spektrofotometrickým meraním.
- Diagnostika bakteriálnej DNA metódou PCR špecifickou pre doménu *Bacteria* a pre rod *Lactobacillus*, následná vizualizácia výsledkov na agarózovom géle.

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Všetky postupy použitých metód v experimentálnej časti boli prevedené podľa skript Španová a Rittich (2010).[51]

5.1 Materiál

5.1.1 Vzorka testovaného potravinového produktu s obsahom probiotických baktérií

- **Domáca kvasená kapusta**

Ingrediencie:

Čerstvá kapusta 15 kg
Soľ 750 g
Rasca 20 g
Chren 100 g
Nové korenie 20 g
Čierne korenie 20 g
Bobkový list 4ks



Postup prípravy:

- 1) Kapusta bola nastrúhaná a natlačená do čistej hlinenej nádoby určenej priamo na fermentáciu s objemom 17 l.
- 2) Každá vrstva (asi po 8 cm) bola posypaná soľou.
- 3) Kapusta sa takto vrstvila až do naplnenia nádoby. Bolo potrebné kapustu poriadne utlačiť, aby sa odstránil všetok vzduch.
- 4) Nakoniec bolo pridané korenie, rasca, bobkový list a kúsok chrenu vcelku.
- 5) Takto naložená kapusta bola zaťažená a ponechaná pri izbovej teplote 4 – 5 týždňov, aby sfermentovala. Počas fermentácie bola odoberaná prebytočná šťava.

- **Komerčne dostupná kvasená kapusta**

Kysané zelí ve slaném nálevu

Výrobca: Lidl Česká republika v.o.s., Nárožní 1359/11,
CZ-158 00 Praha 5

Zloženie: kyslá kapusta (hlávková kapusta biela, jedlá soľ), slaný nálev (pitná voda, jedlá soľ, konzervant: sorban draselný; antioxidant: kyselina L-askorbová).

Dátum spotreby: 17.09.2021



5.1.2 Kmene baktérií pre pozitívne kontroly

Pre kontrolné vzorky bola vedúcim bakalárskej práce Mgr. Janom Smetanom, Ph.D. poskytnutá bakteriálna kultúra *Lactobacillus plantarum*.

5.1.3 Chemikálie

Potrebné roztoky a médiá boli pripravené z nasledujúcich chemikálií:

- Agaróza FastGene (NIPPON Genetics EUROPE, Nemecko)
- BB pufor (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- CBH pufor (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA štandard (FastGene 1Kb DNA Ladder plus, NIPPON, Genetics EUROPE, Nemecko)
- DNA štandard 100 bp Malamité (Moravské Prusy, ČR)
- DLB pufor (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- DW pufor (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- EB pufor (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- EliDNA PS Green (ELISABETH PHARMACON, Brno, ČR)
- EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Etanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lyzozým (Serva, Heidelberg, SRN)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tris-báza (Serva, Heidelberg, SRN)
- Yellow load PCR Loading Buffer (Top-Bio, Praha, ČR)
- Zmes chloroform-izoamylalkohol (CIZ) (Lachema Brno, ČR)

5.1.4 Roztoky

5.1.4.1 Roztoky pre prípravu hrubých lyzátov bakteriálnych buniek

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

186,1 g EDTA bolo rozpustené v 800 ml destilovanej vody za stáleho miešania na magnetickej miešačke. Následne sa postupne pridávalo NaOH pre úpravu pH na hodnotu 8,0. Roztok bol doplnený destilovanou vodou na 1 l a sterilizovaný v autokláve na 20 minút pri 121 °C.

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

121,1 g Tris-báze bolo rozpustené v 800 ml destilovanej vody a pH roztoku bolo upravené koncentrovanou HCl na hodnotu 7,8. Roztok bol doplnený destilovanou vodou na 1 l a sterilizovaný 20 minút pri 121 °C.

- 20% SDS

20 g tuhého SDS bolo za stáleho miešania rozpustené v 80 ml destilovanej vody. Roztok bol okamžite zahriaty na hodnotu 68 °C. pH roztoku bolo upravené na hodnotu 7,0 koncentrovanou HCl a doplnený na objem 100 ml destilovanou vodou. Následne bol rozdelený do alikvotov a uchovávaný pri laboratórnej teplote.

- Lyzačný roztok A

Bolo zmiešané 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 0,5 ml 1 M EDTA (pH 8,0) a roztok bol doplnený na 100 ml destilovanou vodou.

- Lyzačný roztok B

Zmiešané 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 0,5 1 M EDTA (pH 8,0) a lyzozýmu na výslednú koncentráciu 3,0 mg/ml.

- Proteináza K (10 mg/ml; 100 µg/ml):

10 mg proteinázy K bolo rozpustené v 1 ml sterilnej destilovanej vody. Roztok bol následne zriedený na koncentráciu 100 µg/ml, prevedený do alikvotov a uchovávaný pri -20 °C.

5.1.4.2 Roztoky pre izoláciu bakteriálnej DNA

- Fenol (pH 7,8)

Nasýtený roztok fenolu upravený na pH 7,8 v TE pufre. Fenol bol rozdelený do alikvotov a uchovávaný pri -20 °C.

- Octan sodný (3M)

40,81 g trihydrátu octanu sodného bolo rozpustené v 80 ml destilovanej vody. pH upravená na 5,2. Roztok bol doplnený na 100 ml a sterilizovaný 20 minút pri 121 °C, následne rozdelený do alikvotov a uchovávaný pri 4 °C.

- TE pufor

Zmiešaný 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a sterilná destilovaná voda doplnená na 100 ml. Roztok bol sterilne rozdelený do alikvotov a uchovaný pri -20 °C.

5.1.4.3 Roztoky pre agarózovú gélovú elektroforézu

- 0,5 x TBE pufor

54 g Tris-báze bolo zmiešané s 27,5 g kyseliny boritej a rozpustené v 600 ml destilovanej vody, následne bolo pridané 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a roztok bol doplnený na 1 l. Pred použitím bol roztok 10x zriedený destilovanou vodou.

- Agarózový gél

1,2 g agarózy bolo rozpustené v 100 ml 0,5 x TBE pufru. Po vychladnutí bolo do roztoku primiešaných 5 µl farbiva EliDNA PS Green (ELISABETH PHARMACON, spol. s.r.o., Brno, ČR).

- Nanášací pufor

5 µl farbiva Yellow load PCR Loading Buffer (Top-Bio, Praha, ČR) bolo zmiešané s 15 µl analyzovanej vzorky.

5.1.5 Komponenty PCR

- Primery špecifické pre doménu *Bacteria* (F_eub, R_eub) (GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové)
- Primery špecifické pre rod *Lactobacillus* (F_allact, R_allact) (GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové)
- qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- Voda pre PCR (Top-Bio, Praha, ČR)

5.1.6 Pomôcky a prístroje

- 2ml zberné skúmavky (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- Centrifúga mini Spin (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Eppendorfove skúmavky (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Exikátor typ N 86 KN.18 (KNF Neuberger Labport, Freiburg, SRN)
- Detekčný systém pre vizualizáciu gélu (Azure biosystems C200, Dublin, Írsko)
- Laboratórne váhy OHAUS SCOUT SKX622 (USA)
- Laminárny box AURA MINI (EUROCLONE, Taliansko)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Poľsko)
- Mikrovlnná rúra PROLINE SM117
- Mini kolonky (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- Minicentrifúga SPECTRAFUGE MINI
- NanoDrop 2000c UV-VIS spektrofotometer (Thermo Scientific, USA)
- Termocyklér GeneQ (BIOER)
- Thermo-Shaker (TS-100C BioSan, Riga, Lotyšsko)
- Zariadenie pre elektroforézu Owl EasyCast, model B1(Thermo Scientific, USA)
- Zdroj napätia pre elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Bežné laboratórne sklo a iné umelohmotné pomôcky

5.2 Metódy

5.2.1 Izolácia bakteriálnej DNA z kvasenej kapusty fenolovou extrakciou

5.2.1.1 Príprava hrubého lyzátu bakteriálnych buniek

- Bol odobraný 1,5 ml šťavy z kvasenej kapusty do 1,5 ml Eppendorfových skúmaviek.
- Vzorky boli centrifugované pri 13 400 ot/min po dobu 5 minút.
- Supernatant bol zliaty a sediment sa nechal dobre odkvapkať.
- K sedimentu bol pridaný 1 ml lyzačného roztoku A; zmes bola dostatočne premiešaná .
- Suspenzia bola opäť centrifugovaná pri 13 400 ot/min po dobu 5 minút.
- K sedimentu bolo pridané 500 µl lyzačného roztoku B, zmes bola dobre premiešaná a inkubovaná 30 minút pri laboratórnej teplote za občasného premiešania.
- K suspenzii bolo pridané 12,5 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K (100 µl/ml), zmes bola premiešaná a inkubovaná pri 55 °C po dobu 1 hod.

5.2.1.2 Fenolová extrakcia bakteriálnej DNA

- K 500 µl lyzátu buniek bol pridaný rovnaký objem fenolu (predestilovaného, pH upravené na hodnotu 7,8) a zmes bola kývavým pohybom premiešavaná presne po dobu 4 min.
- Zmes bola centrifugovaná pri 13 400 ot/min po dobu 5 minút.
- Pomocou špičky bola opatrne odobratá vodná fáza s DNA do čistej Eppendorfovej skúmavky.
- Vodná fáza bola doplnená TE pufrom na 500 µl, následne bolo pridané 700 µl zmesi CIZ a zmes bola kývavým pohybom premiešavaná presne 4 min.
- Zmes sa centrifugovala pri 13 400 ot/min po dobu 5 min.
- Vrchná vodná fáza s DNA bola odobratá do čistej Eppendorfovej skúmavky.

5.2.1.3 Zrážanie DNA etanolom

- K vzorke bola pridaná 1/20 objemu 3M octanu sodného (20 µl) a zmes bola premiešaná.
- Následne bol pridaný 1 ml 96% etanolu vychladeného na -20 °C a zmes bola opäť premiešaná.
- DNA bola zrážaná pri -20 °C po dobu 30 minút.
- Zmes bola centrifugovaná pri 13 400 ot/min po dobu 15 minút.
- Sediment DNA bol vysušený v exikátore (asi 15 minút).
- DNA bola rozpustená v 200 µl TE pufru .
- Takto pripravená DNA bola ďalej použitá v gélovej elektroforéze a pri spektrofotometrickom stanovení.

5.2.2 Izolácia bakteriálnej DNA z kvasenej kapusty pomocou komerčného kolonkového kitu OMNI Bacterial DNA Kit

5.2.2.1 Izolácia kolonkovým kitom OMNI Bacterial DNA Kit

- Do 1,5ml Eppendorfovej skúmavky bol napipetovaný 1 ml bakteriálnej kultúry, ktorá bola následne centrifugovaná (4000 g/10 minút).
- Jedným prevrátením skúmavky bol zliaty supernatant do odpadnej nádoby.
- K pelete bolo pridané 200 µl roztoku B (s obsahom lyzozýmu) a peleta bola kompletne rozsuspendovaná. Roztok bol inkubovaný pri 37 °C 10 minút.
- Do roztoku bolo pridané 25 µl roztoku proteázy a 100 µl DLB pufru. Skúmavka bola uzavretá a dôkladne premiešaná.

- Vzorky boli vložené do termobloku a inkubované pri teplote 55 °C 30-60 minút. Po inkubácii boli vzorky centrifugované pri 10 000 g/2 minúty.
- Supernatant bol prepipetovaný do novej sterilnej 1,5ml Eppendorfovej skúmavky, tak aby nebola narušená peleta.
- K supernatantu bolo pridané 220 µl BB pufru, skúmavka bola uzavretá a premiešaná. Vzorka bola inkubovaná pri 65 °C/10 minút.
- Následne bolo pridané 220 µl 100% etanolu, skúmavka bola uzavretá a dôkladne premiešaná.
- Omni DNA Mini kolonka bola vložená do 2ml zbernej skúmavky a roztok vzorky bol prepipetovaný z 1,5ml skúmavky na kolonku (vrátane prípadných zrazenín). Takto pripravený roztok bol centrifugovaný pri 10 000g/1 minútu.
- Kolonka bola preložená na novú zbernú skúmavku.
- Na kolonku bolo napipetované 500 µl CBH pufru a kolonka bola centrifugovaná pri 10 000 g/1 minútu.
- Kolonka bola preložená na novú zbernú skúmavku a na kolonku bolo napipetované 700 µl DW pufru. Bolo vykonané centrifugovanie pri 10 000 g/1 minútu.
- Supernatant bol odstránený a kolonka bola vrátená späť na zbernú skúmavku. Opäť bolo vykonané centrifugovanie pri 10 000 g/2 minúty.
- Kolonka bola preložená do novej sterilnej 1,5ml Eppendorfovej skúmavky a na kolonku bolo napipetované 100 µl EB pufru prehriateho na 65 °C.
- Vzorka bola následne inkubovaná pri 65 °C 3-5 minút. Po inkubácii bola vzorka centrifugovaná pri 10 000 g/2 minúty.
- Kolonka bola odstránená, Eppendorfova skúmavka bola uzavretá a skladovaná pri izbovej teplote.

5.2.2.2 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA

- Meranie prebiehalo na spektrofotometre NanoDrop .
- Najprv bol premeraný TE pufr (3 µl) na nastavenie prístroja.
- Následne boli premerané vzorky izolovanej DNA (3 µl).
- Z prístroja bola odčítaná hodnota A_{260}/A_{280} vyjadrujúca čistotu DNA a koncentrácia vzorky DNA.

5.2.3 Agarózová gélová elektroforéza izolovanej genómovej DNA

- Bol pripravený 0,8% agarózový gél (0,8 g agarózy, 100 ml 0,5x TBE pufru).
- Suspenzia bola niekoľkokrát rozvarená v mikrovlnnej rúre.
- Po vychladnutí bola do suspenzie pridaná farbička PS Green.
- Suspenzia bola naliata do elektroforetickej vaničky s hrebienkom a nechala sa 30 minút tuhnúť. Z tuhého gélu bol vybratý hrebienok.
- V malých Eppendorfových skúmavkách bolo zmiešané 15 µl izolovanej DNA a 5 µl pufru Yellow load.
- Takto pripravené vzorky DNA boli krátko stočené na centrifúge a následne nanášané do jamiek agarózového gélu. Do jednej jamky bol nanesený veľkostný štandard.
- Vanička s gélom bola vložená do elektroforetickej vane, preliata 0,5x TBE pufrom a bola spustená elektroforéza (80V po dobu 1 hod). Po skončení elektroforézy bol gél vybratý a vyhodnotený.

5.2.4 Polymerázová reťazová reakcia (PCR) izolovanej DNA

- Bola vykonaná PCR špecifická pre doménu *Bacteria* a pre rod *Lactobacillus* vzoriek bakteriálnej DNA z komerčnej a domácej kapusty, ktoré boli izolované fenolovou extrakciou a kolonkovým kitom.
- Všetky vzorky obsahovali izolovanú DNA v koncentrácii 20 ng/μl.
- Komponenty pre PCR boli rozmrazené a krátko centrifugované. Master Mix (po 24 μl) bol pripravovaný v boxe vyžiarenom UV svetlom podľa Tab.3 priamo do PCR skúmaviek.
- Do Master Mixu bola ako templát pipetovaná izolovaná DNA do celkového objemu 25 μl pre doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*.

Tab.3 Zloženie zmesi pre PCR špecifickej pre doménu *Bacterie* a rod *Lactobacillus*.

Reagenty	Objem (μl)	
	<i>Bacteria</i>	<i>Lactobacillus</i>
qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5	12,5
Primer F (0,1 mM)	1	1
Primer R (0,1 mM)	1	1
Templátová DNA (20 ng/μl)	1	1
PCR voda (kat. č. P042)	9,5	9,5

- Pre jednotlivé PCR boli použité špecifické primery pre doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus* uvedené v Tab.4.
- Pre každú PCR boli pripravené pozitívne a negatívne kontroly. Negatívna kontrola slúži k zisteniu prípadnej kontaminácie Master Mixu, pričom nie je pridaná žiadna templátová DNA. Ako pozitívna kontrola bola pripravená DNA z kultúry *Lactobacillus plantarum* s koncentráciou 20 ng/μl.
- Po zmiešaní všetkých zložiek PCR bola zmes zcentrifugovaná a umiestnená do termocykléru BIOER, ktorý bol naprogramovaný na príslušný amplifikačný program (viď. Tab.5).
- Výsledky PCR boli vyhodnotené pomocou elektroforézy na agarózovom géle.

5.2.4.1 Primery použité pri PCR

Pri amplifikácii analyzovaných vzoriek boli použité primery špecifické pre doménu *Bacteria* (F_eub a R_eub) a primery špecifické pri rod *Lactobacillus*. Použité primery sú popísané a zhrnuté v Tab.4.[52]

Tab.4 Primery špecifické pre jednotlivé PCR a ich charakteristika.[52]

	Primer	Sekvencia (5'→3')	PCR produkt
Doména <i>Bacteria</i>	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	
Rod <i>Lactobacillus</i>	F_allact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92 bp
	R_allact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT	

5.2.4.2 Amplifikačný program

Amplifikačné programy izolovanej DNA špecifické pre doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus* boli nastavené podľa Tab.5.

Tab.5 Teplotné programy použité pri amplifikácii izolovanej DNA pre doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*.

Krok		Doména <i>Bacteria</i>		Rod <i>Lactobacillus</i>	
		Teplota	Čas	Teplota	Čas
1	Predĺžená denaturácia DNA	95 °C	5 min	95 °C	5 min
2	Denaturácia DNA	95 °C	1 min	95 °C	1 min
3	Nasadenie primerov	55 °C	30 s	55 °C	30 s
4	Syntéza DNA	72 °C	30 s	72 °C	30 s
5	Predĺžená syntéza DNA	72 °C	5 min	72 °C	5 min
Počet cyklov (2-4)		35		35	

5.2.4.3 Detekcia PCR produktov pomocou agarózovej gélovej elektroforézy

- Pre vyhodnotenie PCR produktov bol pripravený 1,6% agarózový gél (1,6 g agarózy, 100 ml 0,5x TBE pufri).
- Suspenzia bola niekoľkokrát privedená k varu v mikrovlnnej rúre a po vychladnutí bol do nej pridaný PS Green.
- Suspenzia bola naliata do elektroforetickej vaničky s hrebienkom a nechala sa 30 minút tuhnúť. Z tuhého gélu bol vybratý hrebienok.
- V PCR skúmavkách bolo zmiešané 25 µl amplifikačnej DNA a 5 µl loading pufri.
- Pripravené vzorky boli krátko stočené na centrifúge a nanášané do jamiek v agarózovom géle. Do jednej jamky bol nanesený veľkostný štandard, pozitívna a negatívna kontrola.
- Vanička s gélom bola vložená do elektroforetickej vane, preliata 0,5x TBE pufrom a bola spustená elektroforéza (80V po dobu 1,5 hod). Po skončení elektroforézy bol gél vybratý a vyhodnotený.

6 VÝSLEDKY

6.1 Izolácia bakteriálnej DNA

Diagnostika prítomnosti baktérií mliečného kvasenia zahŕňala analýzu a porovnanie vzoriek 2 pôvodov: kvasenej kapusty bežne dostupnej v obchodných reťazcoch a kvasenej kapusty pripravenej v domácich podmienkach.

V práci boli použité 2 izolačné metódy bakteriálnej DNA: fenolová extrakcia a kolonkový kit. Obe metódy boli vykonané pre domácu aj pre kupovanú kapustu. Získaná genómová DNA z oboch izolačných metód bola analyzovaná spektrofotometrickým meraním, a následne aj agarózovou gélovou elektroforézou (viď *Obr.8* a *Obr.9*).

6.1.1 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovaných nukleových kyselín

Absorbancia izolovanej DNA z analyzovaných vzoriek bola premeraná spektrofotometricky na prístroji NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) v rozmedzí vlnových dĺžok 230-280 nm, ako pre fenolovú extrakciu, tak aj pre kolonkový kit. Na základe výsledkov absorbancie bola stanovená koncentrácia NK v analyzovaných vzorkách a ich čistota (viď *Tab.6* a *Tab.7*).

Tab.6 Spektrofotometrická analýza NK izolovaných fenolovou extrakciou z domácej kapusty.

Vzorka	Koncentrácia NK(ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	94,5	1,889	1,130	1,67	1,52
2	75,8	1,516	0,906	1,67	1,74
3	77,8	1,556	0,953	1,63	1,52
4	30,8	0,616	0,335	1,84	1,58
5	96,1	1,923	1,235	1,56	1,61
6	10,4	0,207	0,092	2,24	3,38

Tab.7 Spektrofotometrická analýza NK izolovaných fenolovou extrakciou z kupovanej kapusty.

Vzorka	Koncentrácia NK(ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	393,4	7,868	4,179	1,88	1,87
2	156,5	3,131	1,714	1,83	1,82
3	417,6	8,351	4,476	1,87	1,79
4	306,8	6,137	3,190	1,92	1,87
5	439,5	8,791	4,330	2,03	1,87
6	292,1	5,841	3,207	1,82	1,84

Tab.8 Spektrofotometrická analýza NK izolovaných kolonkovým kitom z kupovanej kvasenej kapusty.

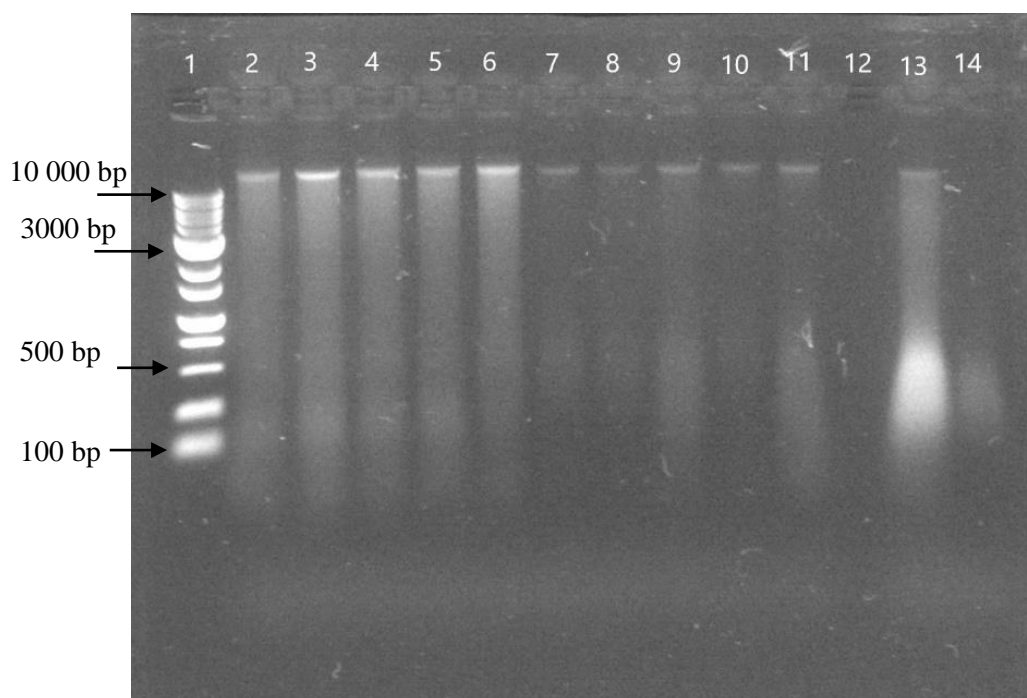
Vzorka	Koncentrácia NK(ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	106,8	2,135	0,962	2,22	2,22
2	198,4	3,968	1,798	2,21	2,33
3	255,6	5,112	2,345	2,18	2,22
4	253,5	5,071	2,325	2,18	2,27

Tab.9 Spektrofotometrická analýza NK izolovaných kolonkovým kitom z domácej kvasenej kapusty.

Vzorka	Koncentrácia NK(ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	90,7	1,814	0,871	2,08	2,05
2	67,0	1,339	0,651	2,06	2,00
3	64,4	1,288	0,631	2,04	1,95
4	27,2	0,544	0,258	2,11	1,66

6.1.2 Agarózová elektroforéza genómovej DNA

Prítomnosť genómovej DNA izolovanej metódou fenolovej extrakcie a kolonkovým kitom bola detegovaná elektroforézou na agarózovom géle (vid'. Obr.8 a Obr.9).



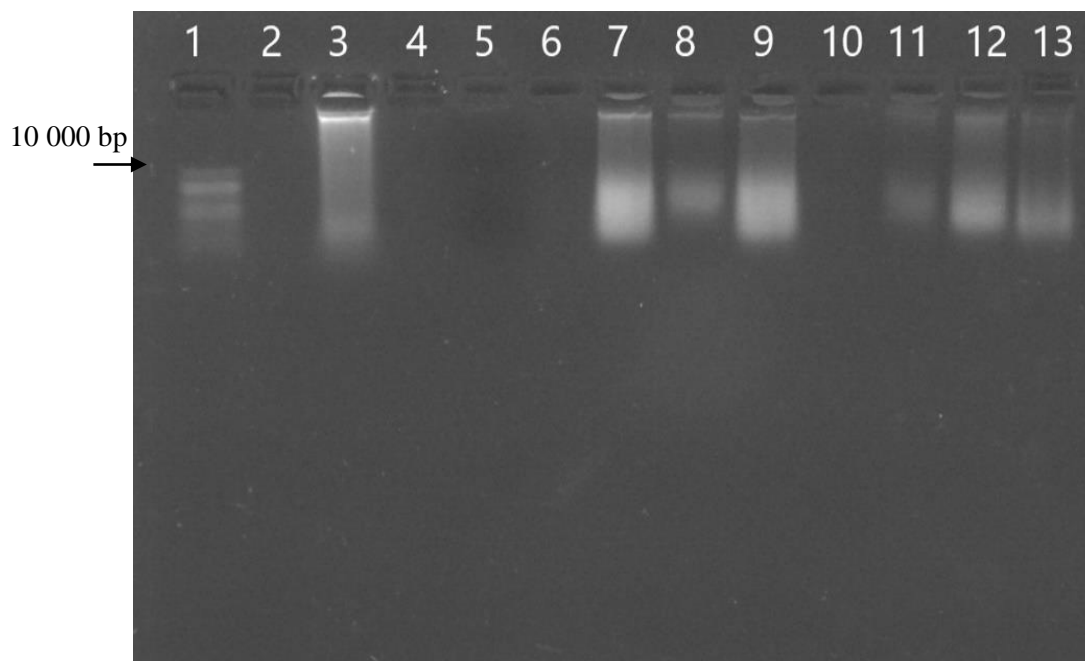
Obr.8 Agarózová gélová elektroforéza genómovej DNA izolovanej fenolovou extrakciou.

Tab.10 Detekcia prítomnosti vysokomolekulárnej genómovej DNA vo vzorkách izolovaných fenolovou extrakciou..

Číslo	Vzorka DNA	Detekcia genómovej DNA
1	DNA štandard 1kb	-
2	FE_KK_1	+++
3	FE_KK_2	+++
4	FE_KK_3	+++
5	FE_KK_4	+++
6	FE_KK_5	+++
7	FE_DK_1	++
8	FE_DK_2	++
9	FE_DK_3	++
10	FE_DK_4	++
11	FE_DK_5	++
12	--	--
13	Pozitívna kontrola	++
14	Negatívna kontrola	-

- FE_KK_ fenolová extrakcia z kupovanej kapusty
- FE_DK fenolová extrakcia z domácej kapusty
- - genómová DNA nebola detegovaná
- ++ genómová DNA bola slabšie detegovaná
- +++ genómová DNA bola silno detegovaná
- -- medzera
- Pozitívna kontrola (20 ng/μl *Lactobacillus plantarum*)
- Negatívna kontrola (bez genómovej DNA)

Prítomnosť bakteriálnej genómovej DNA bola potvrdená vo všetkých vzorkách izolovaných pomocou fenolovej extrakcie. Z elektroforézy možno usúdiť, že vzorky kupovanej kapusty mali vyššiu koncentráciu bakteriálnej DNA (silno viditeľné pásy) ako doma pripravená kvasená kapusta, kde sú jednotlivé pásy slabšie viditeľné.



Obr.9 Agarózová gélová elektroforéza genómovej DNA izolovanej kolonkovým kitom.

Tab.11 Výsledky agarózovej elektroforézy genómovej DNA izolovanej kolonkovým kitom.

Číslo	Vzorka DNA	Detekcia genómovej DNA
1	DNA štandard 1kb	-
2	--	--
3	Pozitívna kontrola	+++
4	--	--
5	Negatívna kontrola	-
6	--	--
7	KK_KK_1	++
8	KK_KK_2	++
9	KK_KK_3	++
10	--	--
11	KK_DK_1	+
12	KK_DK_2	+
13	KK_DK_3	+

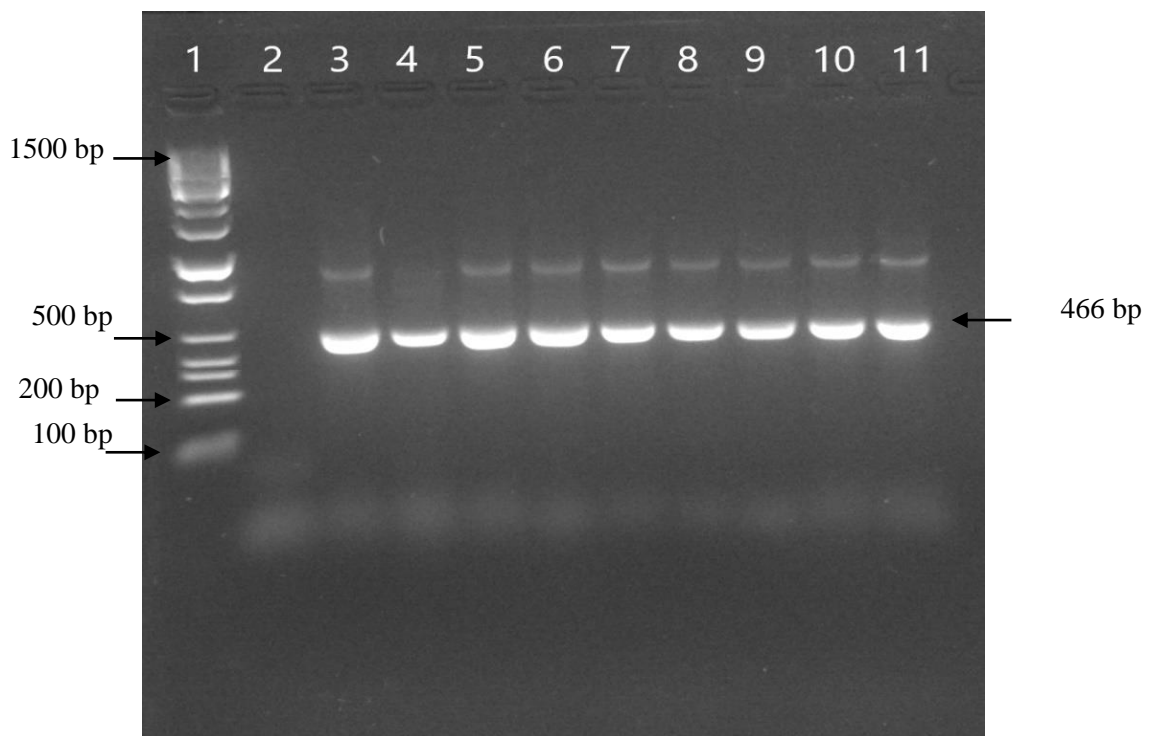
- KK_KK kolonkový kit z kupovanej kapusty
- KK_DK kolonkový kit z domácej kapusty
- - genómová DNA nebola detegovaná
- + genómová DNA bola veľmi slabo detegovaná
- ++ genómová DNA bola slabšie detegovaná
- +++ genómová DNA bola silno detegovaná
- -- medzera
- Pozitívna kontrola (20 ng/μl *Lactobacillus plantarum*)
- Negatívna kontrola (bez genómovej DNA)

Elektroforéza vzoriek izolovaných pomocou kolonkového kitu taktiež potvrdila prítomnosť vysokomolekulárnej bakteriálnej DNA. Koncentrácia DNA v kupovanej kapuste bola v porovnaní s domácou kvasenou kapustou opäť vyššia.

Pre následnú analýzu metódou PCR boli vzorky nariadené približne na koncentráciu 20 ng/μl.

6.2 PCR špecifická pre doménu *Bacteria*

Po izolácii bakteriálnej DNA bola vykonaná PCR za použitia špecifických primerov R_eub a F_eub, ktoré diagnostikujú prítomnosť domény *Bacteria* (466 bp) podľa teplotného programu uvedeného v Tab.5. Amplifikácii boli podrobené sady vzoriek DNA z domácej a komerčnej kvasenej kapusty izolované fenolovou extrakciou, ako aj kolonkovým kitom. Amplifikačné fragmenty DNA boli následne vizualizované na agarózovom géle (viď. Obr.10 a Obr.11).

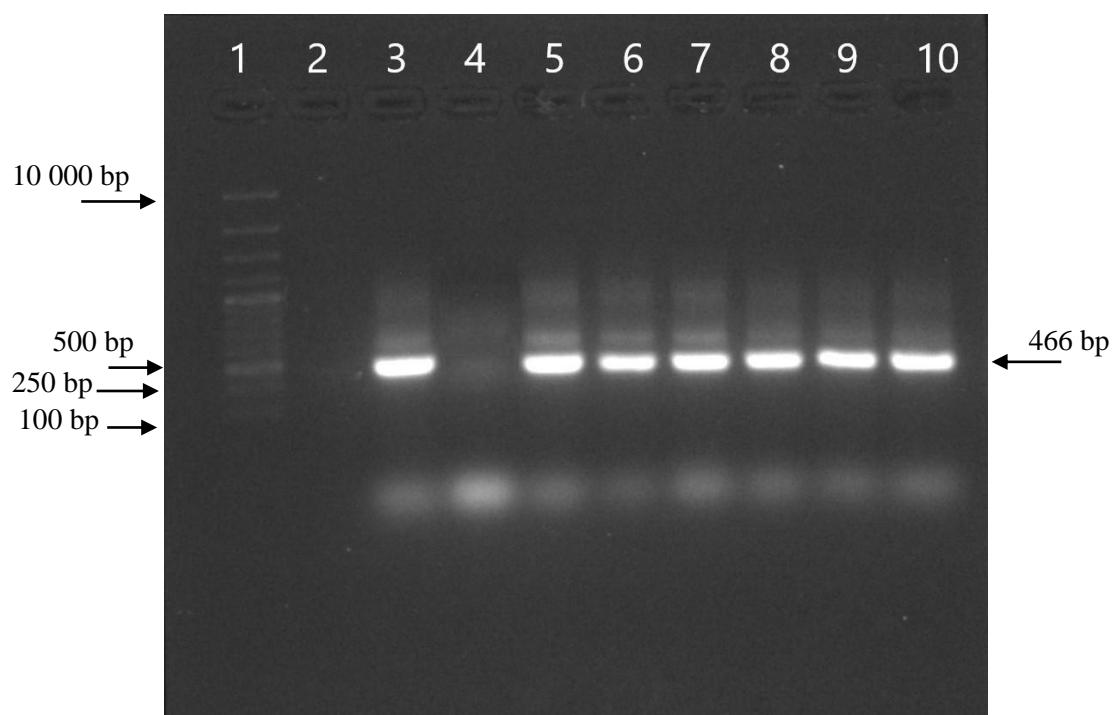


Obr.10 Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR špecifických pre doménu *Bacteria* z fenolovej extrakcie.

Tab.12 Detekcia PCR produktov špecifických pre doménu Bacteria z fenolovej extrakcie.

Číslo	Vzorka	Detekcia PCR produktu (466 bp)
1	DNA štandard 100 bp	-
2	Negatívna kontrola	-
3	Pozitívna kontrola	+++
4	FE_KK_1	+++
5	FE_KK_2	+++
6	FE_KK_3	+++
7	FE_KK_4	+++
8	FE_DK_1	+++
9	FE_DK_2	+++
10	FE_DK_3	+++
11	FE_DK_4	+++

- FE_KK fenolová extrakcia z kupovanej kvasenej kapusty
- FE_DK fenolová extrakcia z domácej kvasenej kapusty
- - PCR produkt nebol detegovaný
- +++ PCR produkt bol silno detegovaný
- Pozitívna kontrola (20 ng/μl *Lactobacillus plantarum*)
- Negatívna kontrola (bez bakteriálnej DNA)



Obr.11 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov pre doménu Bacteria z kolonkového kitu.

Tab. 13 Detekcia PCR produktov pre doménu *Bacteria* pre vzorky izolované kolonkovým kitom.

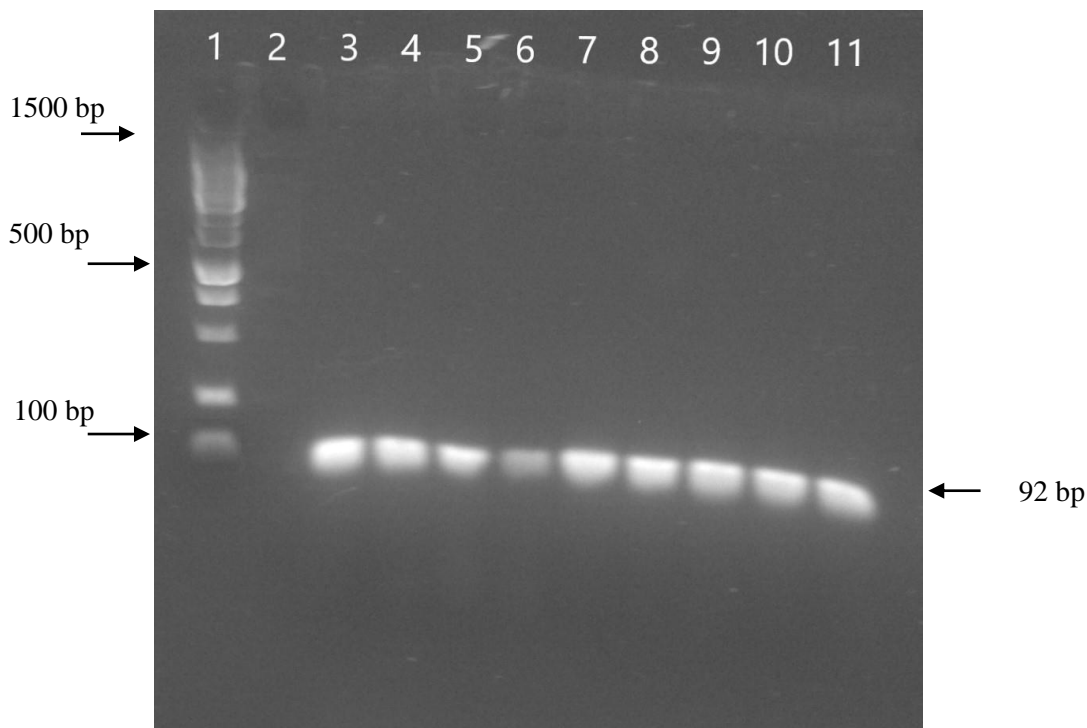
Číslo	Vzorka	Detkcia PCR produktu (466 bp)
1	DNA štandard 1 kb	-
2	--	--
3	Pozitívna kontrola	+++
4	Negatívna kontrola	-
5	KK_KK_1	+++
6	KK_KK_2	+++
7	KK_KK_3	+++
8	KK_DK_1	+++
9	KK_DK_2	+++
10	KK_DK_3	+++

- KK_KK kolonkový kit z kupovanej kvasenej kapusty
- KK_DK kolonkový kit z domácej kvasenej kapusty
- - PCR produkt nebol detegovaný
- +++ PCR produkt bol silno detegovaný
- -- medzera
- Pozitívna kontrola (20 ng/μl *Lactobacillus plantarum*)
- Negatívna kontrola (bez bakteriálnej DNA)

Analýza na agarózovom géle potvrdila prítomnosť domény *Bacteria* vo všetkých vzorkách domácej a kupovanej kvasenej kapusty izolovaných fenolovou extrakciou ako aj kolonkovým kitom.

6.3 PCR špecifická pre rod *Lactobacillus*

Po potvrdení prítomnosti baktérií vo vzorkách, boli tieto ďalej analyzované rodovo špecifickou PCR pre *Lactobacillus* za použitia primerov R_allact a F_allact (viď. Obr.12 a Obr.13) podľa teplotného programu uvedeného v Tab.5. Amplifikačné fragmenty o veľkosti 92 bp boli následne analyzované na agarózovom géle.

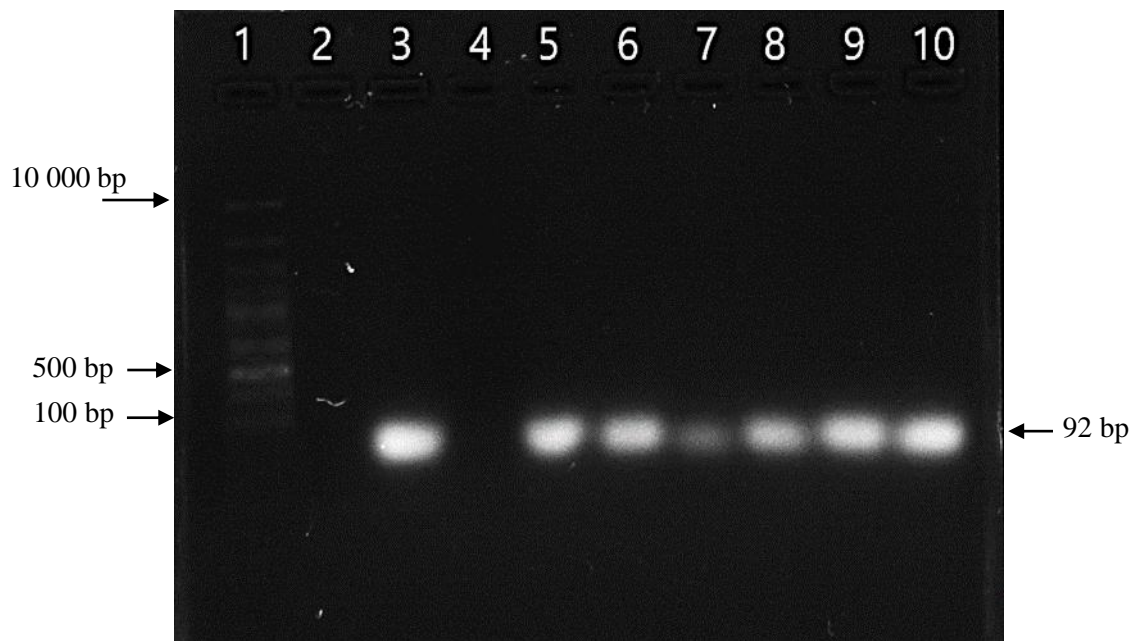


Obr.12 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre rod *Lactobacillus* z fenolovej extrakcie.

Tab.14 Detekcia PCR produktov pre rod *Lactobacillus* z fenolovej extrakcie.

Číslo	Vzorka	Detekcia PCR produktu (92 bp)
1	DNA štandard 100 bp	-
2	Negatívna kontrola	-
3	Pozitívna kontrola	+++
4	FE_KK_1	+++
5	FE_KK_2	+++
6	FE_KK_3	++
7	FE_KK_4	+++
8	FE_DK_1	+++
9	FE_DK_2	+++
10	FE_DK_3	+++
11	FE_DK_4	+++

- FE_KK fenolová extrakcia z kupovanej kvasenej kapusty
- FE_DK fenolová extrakcia z domácej kvasenej kapusty
- - PCR produkt nebol detegovaný
- ++ PCR produkt bol slabšie detegovaný
- +++ PCR produkt bol silno detegovaný
- -- medzera
- Pozitívna kontrola (20 ng/μl *Lactobacillus plantarum*)
- Negatívna kontrola (bez bakteriálnej DNA)



Obr.13 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre rok *Lactobacillus* z kolonkového kitu.

Tab.15 Detekcia PCR produktov špecifických pre rod *Lactobacillus* z kolonkového kitu.

Číslo	Vzorka	Detekcia PCR produktu (92 bp)
1	DNA štandard 1 kb	-
2	--	--
3	Pozitívna kontrola	+++
4	Negatívna kontrola	-
5	KK_KK_1	+++
6	KK_KK_2	+++
7	KK_KK_3	++
8	KK_DK_1	+++
9	KK_DK_2	+++
10	KK_DK_3	+++

- KK_KK kolonkový kit z kupovanej kvasenej kapusty
- KK_DK kolonkový kit domácej kvasenej kapusty
- - PCR produkt nebol detegovaný
- ++ PCR produkt bol slabšie detegovaný
- +++ PCR produkt bol silno detegovaný
- -- medzera
- Pozitívna kontrola (20 ng/μl *Lactobacillus plantarum*)
- Negatívna kontrola (bez bakteriálnej DNA)

Prítomnosť baktérií rodu *Lactobacillus* bola potvrdená u všetkých analyzovaných vzoriek získaných fenolovou extrakciou aj kolonkovým kitom pre domácu, ako aj kupovanú kvasenú kapustu.

7 DISKUSIA

7.1 Izolácia bakteriálnej DNA

Bakteriálna DNA bola izolovaná 2 metódami: fenolovou extrakciou (6 vzoriek z kvasenej kapusty kúpenej v obchodnom reťazci; 6 vzoriek z domácej kvasenej kapusty) a kolonkovým kitom (4 vzorky z kúpenej kvasenej kapusty; 4 vzorky z kvasenej kapusty pripravenej v domácich podmienkach). V jednotlivých vzorkách bola koncentrácia bakteriálnej DNA zmeraná spektrofotometricky a následne boli vzorky vizualizované agarózovou gélovou elektroforézou.

7.1.1 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovaných nukleových kyselín

Čistota a koncentrácia DNA v jednotlivých vzorkách boli zmerané na prístroji NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) v rozmedzí vlnových dĺžok 230 – 280 nm. Pomer absorbančie A_{260}/A_{280} vypovedá o čistote izolovanej bakteriálnej DNA. V prípade čistej nekontaminovanej DNA sa má tento pomer pohybovať v rozmedzí 1,8-2,0. [51]

Bakteriálna DNA vyzisovaná fenolovou extrakciou vykazovala koncentráciu 10,4 – 96,1 ng/μl pre vzorky z domácej kvasenej kapusty a 156,5 – 439,5 ng/μl pre vzorky z kupovanej kvasenej kapusty. Koncentrácia DNA izolovanej kolonkovým kitom sa pohybovala od 106,8 ng/μl do 255,6 ng/μl pre kupovanú kvasenú kapustu a od 27,2 ng/μl do 90,7 ng/μl pre domácu kvasenú kapustu.

Podľa hodnoty pomeru absorbančie A_{260}/A_{280} bola zistená čistota vzoriek, resp. miera kontaminácie proteínmi. Vyššiu mieru čistoty vykazovali vzorky izolované komerčným kolonkovým kitom (nad 2,0). Fenolová extrakcia vykazovala o niečo nižšiu čistotu (väčšina hodnôt sa pohybovala v rozmedzí 1,6-2,0). V prípade porovnania kupovanej a domácej kvasenej kapusty, vykazovala vyššiu mieru čistoty kupovaná kapusta.

7.1.2 Agarózová elektroforéza genómovej DNA

Zo vzoriek premeraných spektrofotometricky bolo vybraných po 5 vzoriek s najvyššou koncentráciou izolovaných fenolovou extrakciou z kupovanej a domácej kvasenej kapusty. Pre vzorky izolované komerčným kolonkovým kitom OMNI Bacterial DNA Kit boli vybrané po 3 vzorky s najvyššou koncentráciou z domácej a kupovanej kvasenej kapusty. Vybrané vzorky boli analyzované agarózovou gélovou elektroforézou (80 V, po dobu 1 hod).

Po vizualizácii gélu boli viditeľné koncentračné rozdiely v izolovanej DNA z kupovanej a domácej kvasenej kapusty. Vyššiu koncentráciu bakteriálnej DNA vykazovali vzorky z kupovanej kapusty (silnejšie viditeľné pásy), čo bolo potvrdené aj spektrofotometrickým meraním.

7.2 Porovnanie jednotlivých metód izolácie bakteriálnej DNA

Z výsledkov je zrejmé, že izolácia DNA metódou fenolovej extrakcie poskytuje relatívne vysokú koncentráciu, no na druhej strane je náchylnejšia na kontamináciu proteínmi. Komerčným kolonkovým kitom (OMNI Bacterial DNA Kit) možno získať vzorky s nižšou koncentráciou, ale s výrazne vyššou čistotou. Komerčný kit je určený priamo na izoláciu bakteriálnej DNA, pričom výsledky sú presnejšie v porovnaní s fenolovou extrakciou, pri ktorej mohlo dôjsť aj k vyzisovaniu iných mikroorganizmov alebo rastlinnej DNA.

Získaná bakteriálna DNA v oboch prípadoch izolácie vykazovala vhodnú kvalitu, koncentráciu a čistotu potrebnú k ďalšej PCR analýze.

7.3 PCR špecifická pre doménu *Bacteria*

Pred amplifikáciou boli jednotlivé vzorky nariadené približne na koncentráciu 20 ng/μl. Prítomnosť bakteriálnej DNA bola overená metódou PCR s použitím primerov špecifických pre doménu *Bacteria* (R_eub a F_eub) a vyhodnotením agarózovou elektroforézou.

Amplifikačné PCR produkty o predpokladanej veľkosti 466 bp viditeľné po vizualizácii gélovou elektroforézou (1,6% géľ) potvrdili prítomnosť baktérií vo všetkých analyzovaných vzorkách. Veľkosť fragmentov bola odčítaná porovnaním s DNA štandardom (1 kb a 100 bp). Intenzita bandov na agarózovom géle je rovnaká pre všetky vzorky, čo je spôsobené nariadením DNA pred amplifikáciou. V oblasti nižšej ako 100 bp boli viditeľné ďalšie produkty. Jedná sa pravdepodobne o diméry použitých primerov, ktoré mohli vzniknúť v dôsledku nízkej koncentrácie DNA v amplifikačných vzorkách.

Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA izolovaná z *Lactobacillus plantarum* taktiež nariadená na 20 ng/μl. Negatívna kontrola potvrdzuje, že počas prípravy nebola PCR zmes nijako kontaminovaná.

Overenie prítomnosti domény *Bacteria* bolo vykonané s použitím rovnakých primerov (F_eub a R_eub) aj v ďalšej štúdií pri analýze fekálnych baktérií u dojčiat.[52]

7.4 PCR špecifické pre rod *Lactobacillus*

Vzorky nariadené na 20 ng/μl boli podrobené ďalšej PCR analýze s vyhodnotením na agarózovom géle. Rodovo špecifickou PCR s primermi R_allact a F_allact bola detegovaná prítomnosť laktobacilov vo vzorkách domácej ako aj kupovanej kapusty.

Amplifikačné fragmenty s predpokladanou veľkosťou 92 bp preukázali prítomnosť rodu *Lactobacillus* u všetkých analyzovaných vzoriek.

Ako pozitívna kontrola bola použitá aj v tomto prípade *Lactobacillus plantarum* poskytnutá vedúcim práce o koncentrácii 20 ng/μl. Negatívna kontrola nepreukázala kontamináciu pri príprave PCR zmesi. Vysoká koncentrácia DNA vo vzorkách mohla spôsobiť rozmazanie jednotlivých bandov pri vizualizácii gélu (viď. Obr.12-13).

Konvenčná PCR je dostatočne citlivá, aby detegovala rod *Lactobacillus*, prípadne niektoré druhy tohto rodu, avšak pri vyhodnení sa objavujú mnohé obmedzenia (obmedzenia analýzy koncových bodov) a poskytuje len semikvantitatívne hodnotenie. V prípade zhotovenia dôkladnejšej analýzy s presnejšími výsledkami by dobre poslúžila kvantitatívna real-time PCR (qPCR), ktorá umožňuje monitoring celého procesu amplifikácie spolu s analýzou koncových bodov. [52]

Prítomnosť rodu *Lactobacillus* použitím primerov F_allact a R_allact bola overená aj v ďalších štúdiách pri skúmaní črevného mikrobiómu alebo pri kvantitatívnej PCR analýze fekálnych laktobacilov u dojčiat s prebiotickou výživou. Iné PCR primery použili Plengvidhya et al., ktorí sa zamerali na monitorovanie výskytu rôznych druhov a rodov LAB počas jednotlivých fáz procesu fermentácie kyslej kapusty s využitím databázy ITS-PCR a sekvenovaním 16S RNA génov. Počas kvasenia dochádzalo k pomerne rýchlym zmenám dominujúcej mikroflóry. Celý proces kvasenia trvá asi 2 týždne závisle od nastavených podmienok. V prvých dňoch kvasenia (do 3.dňa) dominovali heterofermentatívne LAB, ktoré však do 7. – 14. dňa úplne vymizli a boli nahradené homofermentatívnymi druhmi LAB, konkrétne rodom *Lactobacillus*. V prvom týždni fermentácie bola produkovaná kyselina octová, manitol

a kyselina mliečna, ktorej koncentrácia prudko stúpala až do ukončenia fermentácie. Hodnota pH sa v 14. deň fermentácie vykazovala výrazne kyslú oblasť v rozmedzí 3,4 – 3,7. Ako prevládajúci druh v ranom štádiu fermentácie bol identifikovaný *Lactobacillus mesenteroides*. Dominantnou LAB v neskorom homofermentatívnom štádiu fermentácie bola identifikovaná *Lactobacillus plantarum* (51 – 75 %). Oba druhy tvorili až 67 % všetkých izolátov.[52,54,55]

8 ZÁVER

Práca je venovaná charakteristike probiotických baktérií a ich identifikácii v rastlinných fermentovaných potravinárskych produktoch prostredníctvom molekulárnych diagnostických metód.

V teoretickej časti práce sú charakterizované probiotické baktérie, ich vlastnosti, využitie, význam a účinok na ľudskú črevnú mikroflóru. Významná časť práce je venovaná probiotickým potravinám mliečneho a nemliečneho pôvodu, ktoré možno na trhu v súčasnej dobe dostať. Ďalej sú v tejto časti popísané metódy izolácie DNA a metódy identifikácie probiotických baktérií so zameraním na molekulárne diagnostické metódy (PCR).

V experimentálnej časti bola vykonaná detekcia prítomnosti probiotických baktérií vo vzorke fermentovaného potravinového výrobku rastlinného pôvodu – v kvasenej kapuste. Najprv boli pripravené hrubé lyzáty, z ktorých sa bakteriálna DNA izolovala fenolovou extrakciou. Priamo z tekutého podielu kvasenej kapusty bola bakteriálna DNA izolovaná komerčným kolonkovým kitom OMNI Bacterial DNA Kit. Pre porovnanie boli obe metódy využité na izoláciu DNA z kúpenej kvasenej kapusty a domácej kvasenej kapusty. Pre každú sadu vzoriek bola vykonaná agarózová elektroforéza a spektrofotometrické meranie čistoty a koncentrácie získanej DNA. Izolácia kolonkovým kitom bola účinnejšia v otázke kvality a čistoty získanej DNA, zatiaľ čo fenolová extrakcia poskytla vyššiu výťažok bakteriálnej DNA. Čistota bola v prípade fenolovej extrakcie nižšia, čo napovedalo o kontaminácii proteínmi. Následne bola vyizolovaná DNA poslúžila ako matrica pri amplifikácii v metóde PCR špecifickej pre doménu *Bacteria* a v rodovo špecifickej PCR pre *Lactobacillus*.

Prítomnosť domény *Bacteria* ako aj rodu *Lactobacillus* bola jasne preukázaná vyhodnotením na agarózovom géle vo všetkých analyzovaných vzorkách pochádzajúcich z domácej ako aj kupovanej kvasenej kapusty.

9 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

[1] Report of a Joint Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina: Amerian Córdoba Park Hotel, 1-4 October 2001.

[2] SOCCOL, C. et al. The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.* 2010, **48**(4), 413-434. ISSN 1330-9862.

[3] WAIKAR, Yogesh. Review of probiotics in children. *Pediatric Infectious Disease* [online]. 2013, **5**(1), 9-12 [cit. 2021-02-15]. doi:10.1016/j.pid.2013.01.002 Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212832813000398>

[4] MCFARLAND, L. V. From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases.* 2015, **60**(suppl.2), S85-S90. ISSN 1058-4838. doi:10.1093/cid/civ054

[5] 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.

[6] SONG, Danfeng, Salam IBRAHIM a Saeed HAYEK. *Recent Application od Probiotics in Food and Agricultural Science: Probiotics.* InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0776-7.

[7] KONINGS, W. N., J. KOK, O. P. KUIPERS a B. POOLMAN. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millenium. *Current Opinion in Microbiology.* 2000, **3**(3), 276-282. doi: 10,1016 / s1369-5274 (00) 00089-8.

[8] BERTELSEN, Randi J., Elizabeth T. JENSEN a Tamar RINGEL-KULKA. Use of probiotics and prebiotics in infant feeding. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2016, **30**(1), 39-48. ISSN 1521-6918.

[9] HICKEY, Rita M. The role of oligosaccharides from human milk and other sources in prevention of pathogen adhesion. *International Dairy Journal.* 2012, **22**(2), 141-146. ISSN 0958-6946.

[10] ROUND, June L. a Sarkis K. MAZMANIAN. The gut microbiota shapes intestinal immune response during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009, **9**(5), 313-323. doi:10,1038/nri2515.

[11] POKUSAEVA, Karina, Gerald F. FITZGERALD a Douwe van SINDEREN. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & Nutrition.* 2011, **6**(3), 285-306. doi:10,1007/s12263-010-0206-6.

[12] EL-SOUD, N. H. A., R. N. SAID, D. S. MOSALLAM, N. A. M. BARAKAT a M. A. SABRY. Bifidobacterium lactis in Treatment of Children with Acute Diarrhea. A Randomized Double Blind Controlled Trial. *Open Access Maced J Med Sci.* 2015, **3**(3), 403-407. doi:10.3889/oamjms.2015.088.

[13] SINGHI, Sunit C. a Suresh KUMAR. Probiotics in critically ill children. 2016. doi:10.12688/f1000research.7630.1.

[14] Hopeland Bio - Tech Co. Ltd. [online]. In: Changzhou City, China: Hopeland Bio-Tech, 2010 [cit. 2021-02-17]. Dostupné z: <http://www.probiotic-cn.com/>

[15] MARTÍN, R., S. MIQUEL, J. ULMER, N. KECHAOU, P. LANGELLA, L.G. BERMÚDEZ-HUMARÁN. Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease. *Microb Cell Fact.* 2013, **12**: 71. doi:10.1186/1475-2859-12-71

- [16] CRIBBY, Sarah, Michelle TAYLOR a Gregor REID. Vaginal microbiota and the use of probiotics. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2008 (1687-708X), 256490. doi:10.1155/2008/256490.
- [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. doi:10.1016/j.lwt.2015.03.034.
- [18] SHEEHAN, Donal a Fergus SHANAHAN. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2017, **46**(1), 143-154. ISSN 08898553. doi:10.1016/j.gtc.2016.09.011.
- [19] KUMAR, B. V., S. V. N. VIJAYENDRA a O. V. S. REDDY. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *J Food Sci Technol*. 2015, **52**(10): 6112-24. doi:10.1007/s13197-015-1795-2.
- [20] NM, Meybodi a Mortazavian AM. *Probiotic Supplements and Food Products: A Comparative Approach*. 2017, **06**(02). ISSN 21670501. doi:10.4172/2167-0501.1000227.
- [21] Saddam, S. Probiotic Food Products Classes, Types, and Processing. *Probiotics*. InTech, 2012, 2012-10-03. ISBN 978-953-51-0776-7. doi:10.5772/51267
- [22] FOX, Patrick, Paul MCSWEENEY, Timothy COGAN a Timothy GUINEE. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects [online]. Academic Press: Springer, 2004 [cit. 2021-03-04]. ISBN 9780080500935.
- [23] GRANATO, Daniel, Gabriel F. BRANCO, Filomena NAZZARO, Adriano G. CRUZ a José A.F. FARIA. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. InTech, 2010, 2012-10-03, **9**(3), 292-302. ISBN 978-953-51-0776-7. ISSN 15414337. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x
- [24] SONG, Danfeng, Salam IBRAHIM a Saeed HAYEK. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. *Probiotics*. InTech, 2012, 2012-10-03. ISBN 978-953-51-0776-7. doi:10.5772/50121
- [25] PARRACHO, Helena, Anne L. MCCARTNEY a Glenn R. GIBSON. Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2007, **66**(3), 405-411. ISSN 0029-6651. doi:10.1017/S0029665107005678
- [26] GIBSON, Glenn R., Hollie M. PROBERT, Jan Van LOO, Robert A. RASTALL a Marcel B. ROBERFROID. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 2004, **17**(2), 259-275. ISSN 0954-4224. doi:10.1079/NRR200479
- [27] FLESCH, Aline Gamarra Tabora, Aline Kirjner POZIOMYCK, Daniel De Carvalho DAMIN, Robert A. RASTALL a Marcel B. ROBERFROID. The therapeutic use of symbiotics: updating the concept of prebiotics. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. 2014, **27**(3), 206-209. ISSN 0102-6720. doi:10.1590/S0102-67202014000300012
- [28] AMARA, A.A., A. SHIBL, Daniel De Carvalho DAMIN, Robert A. RASTALL a Marcel B. ROBERFROID. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management: updating the concept of prebiotics. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2015, **23**(2), 107-114. ISSN 13190164. doi:10.1016/j.jsps.2013.07.001
- [29] PANDEY, Kavita. R., Suresh. R. NAIK, Babu. V. VAKIL, Robert A. RASTALL a Marcel B. ROBERFROID. Probiotics, prebiotics and synbiotics – a review: updating the concept of

prebiotics. *Journal of Food Science and Technology*. 2015, **52**(12), 7577-7587. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-015-1921-1

[30] MOHANIA, Dheeraj, Ravinder NAGPAL, Manoj KUMAR, et al. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of Digestive Diseases*. 2008, **9**(4), 190-198. ISSN 17512972. doi:10.1111/j.1751-2980.2008.00345.x

[31] PATEL, A, JB PRAJAPATI a BM NAIR. Methods for isolation, characterization and identification of probiotic bacteria to be used in functional foods. *International Journal of Fermented Foods*. 2012, (1), 1-13. ISSN 2319-3549 12/2012.

[32] DONELLI, Gianfranco, Claudia VUOTTO a Paola MASTROMARINO. Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. 2013, 24. ISSN 1651-2235. doi:10.3402/mehd.v24i0.20105

[33] HERNANDEZ-RODRIGUEZ, Patricia, Arlen GOMEZ a Paola MASTROMARINO. Polymerase Chain Reaction: Types, Utilities and Limitations. *Polymerase Chain Reaction. InTech*, 2012, 2012-05-30, 24. ISBN 978-953-51-0612-8. ISSN 1651-2235. doi:10.5772/37450

[34] ELNIFRO, E. M., A. M. ASHSHI, R. J. COOPER a P. E. KLAPPER. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000, **13**(4), 559-570. ISSN 0893-8512. doi:10.1128/CMR.13.4.559-570.2000

[35] WILCZYNSKI, SHARON P., A. M. ASHSHI, R. J. COOPER a P. E. KLAPPER. Molecular Biology: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Modern Surgical Pathology. Elsevier*, 2009, 2009, **13**(4), 85-120. ISBN 9781416039662. ISSN 0893-8512. doi:10.1016/B978-1-4160-3966-2.00006-0

[36] JALALI, Mehdi, Justyna ZABOROWSKA a Morteza JALALI. The Polymerase Chain Reaction. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier, 2017, 2017, 1-18. ISBN 9780128030776. doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1

[37] PCR AMPLIFICATION OF GFP. In: *benchling.com* [online]. [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://benchling.com/protocols/GP1fQ08o/pcr-amplification-of-gfp/sbs>

[38] ATAWODI, SE, JC ATAWODI a AA DZIKWI. Polymerase chain reaction: Theory, practice and application. *Sahel Medical Journal*. 2011, **13**(2). ISSN 1118-8561. doi:10.4314/smj2.v13i2.64834

[39] GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, **133**(3), 1-4. ISSN 0022202X. doi:10.1038/jid.2013.1

[40] KADRI, Karim. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen, 2020, 2020-2-12. ISBN 978-1-78984-089-6. doi:10.5772/intechopen.86491

[41] SINGH, Jagtar, Niti BIRBIAN, Shweta SINHA a Akshra GOSWAMI. A critical review on PCR, its types and applications. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 2014, (1), 65-80. ISSN 2348-8069.

[42] PASTORÁKOVÁ, Andrea a Robert PETROVIČ. MOLEKULÁRNE METÓDY AKTUÁLNE POUŽÍVANÉ V KLINICKEJ GENETIKE [online]. Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, 2016 [cit. 2021-04-03]. ISBN 978-80-223-4231-5. Dostupné z: https://www.fmed.uniba.sk/fileadmin/lf/sluzby/akademicka_kniznica/PDF/Elektronicke_knihy_LF_UK/Molekularne_metody_aktualne_pouzivane_v_klinickej_genetike.pdf

- [43] Dual-System Tissue DNA Isolation Kit. In: Fairbiotech.com [online]. [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: https://fairbiotech.com/shopping_show-2a16844.html
- [44] SCHRADER, C., A. SCHIELKE, L. ELLERBROEK a R. JOHNE. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, **113**(5), 1014-1026. ISSN 13645072. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- [45] HEDMAN, Johannes a Peter RÅDSTRÖM. Overcoming Inhibition in Real-Time Diagnostic PCR. PCR Detection of Microbial Pathogens. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, 2013-9-13, 17-48. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-60327-352-7. doi:10.1007/978-1-60327-353-4_2
- [46] SIGMA-ALDRICH, CO. A Technical Guide to PCR Technologies [online]. 2012 [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/pcr-technologies-guide.pdf.
- [47] The real-time PCR amplification curve. In: *Nordic BioSite* [online]. [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.nordicbiosite.com/blog/the-lowdown-on-real-time-pcr-part-1-2>
- [48] CRUZ, Adriano G., Adriane E.C. ANTUNES, Ana Lúcia O.P. SOUSA, José A.F. FARIA a Susana M.I. SAAD. Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*. 2009, **42**(9), 1233-1239. ISSN 09639969. doi:10.1016/j.foodres.2009.03.020
- [49] JAKUBCZAK, Antoni, Milena Alicja STACHELSKA, Renata ŚWISLOCKA a Włodzimierz LEWANDOWSKI. THE APPLICATION OF PROBIOTIC BACTERIA IN THE FERMENTED VEGETABLE, CEREAL AND MEAT PRODUCTS. *Polish Journal of Natural Sciences*. 2012, **27**(1), 81-92.
- [50] LEE, Pei Yun, John COSTUMBRADO, Chih-Yuan HSU a Yong Hoon KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (62). ISSN 1940-087X. doi:10.3791/3923
- [51] 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.
- [52] 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*. 2006, **72**(4), 2359-2365. ISSN 0099-2240. doi:10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006
- [53] GRIFFITHS, Lyn a Diego CHACON-CORTES. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*. ISSN 2253-1785. doi:10.2147/BSAM.S46573
- [54] PLUPJEEN, Sa-ngapong, Wireeya CHAWJIRAPHAN, Suvimol CHAROENSIDDHI, Sunee NITISINPRASERT a Massalin NAKPHAICHIT. Lactococcus lactis KA-FF 1-4 reduces vancomycin-resistant enterococci and impacts the human gut microbiome. *3 Biotech*. 2020, **10**(7). ISSN 2190-572X. doi:10.1007/s13205-020-02282-6
- [55] PLENGVIDHYA, Vethachai, Fredrick BREIDT, Zhongjing LU a Henry P. FLEMING. DNA Fingerprinting of Lactic Acid Bacteria in Sauerkraut Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, **73**(23), 7697-7702. ISSN 0099-2240. doi:10.1128/AEM.01342-07

10 ZOZNAM POUŽITÝCH ZNAČIEK A SKRATIEK

bp	pár báz
CD	Crohnova choroba
DNA	deoxyribonukleová kyseliny
dNTP	2'-deoxynukleosid-5'trifosfáty
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAME	analýza methylesterov mastných kyselín
FOS	fruktooligosacharidy
G ⁺	gram pozitívne
G ⁻	gram negatívne
GIT	gastrointestinálny trakt
GOS	galaktooligosacharidy
HCl	chlorid sodný
H ₂ O ₂	peroxid vodíka
IBD	zápalové črevné ochorenia
IBS	syndróm dráždivého hrubého čreva
IgG	imunoglobulín triedy G
LAB	baktérie mliečneho kvasenia
MO	mikroorganizmus
NK	nukleová kyseliny
NaOH	hydroxid sodný
O ₂	kyslík
PCR	polymerázová reťazová reakcia
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomálna ribonukleová kyselina
SCFA	mastné kyseliny s krátkym reťazcom
SDS	sodná soľ dodecylsulfátu
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA pufor
UC	ulcerózna kolitída
XOS	xylózaoligosacharidy