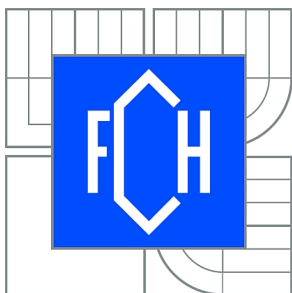




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

POTRAVINOVÉ VÝROBKY S PROBIOTIKY

FOOD PRODUCTS WITH PROBIOTICS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

TEREZA ZEMANOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. ŠTĚPÁNKA TRACHTOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0919/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Tereza Zemanová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	

Název bakalářské práce:

Potravinové výrobky s probiotiky

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární přehled k řešené problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Zpracujte experimentální výsledky a vyhodnoťte je formou diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

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

Tereza Zemanová
Student(ka)

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

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

Abstrakt

Fermentované mléčné výrobky s obsahem probiotických mikroorganismů, které se vyznačují příznivými účinky na střevní mikroflóru, jsou v dnešní době konzumovány ve velkém množství. Nabídka výrobků, do kterých jsou mikroorganismy přidávány, se v posledních letech velmi rozšířila. V současné době jsou na trhu dostupné nejen mléčné, ale například i masné či zeleninové výrobky tohoto typu.

Cílem práce je seznámení se s probiotickými mikroorganismy, popis jejich využití v potravinářství a toho, zda mají pro nás „*Homo sapiens sapiens*“ příznivé či nepříznivé účinky a dokázat přítomnost těchto bakterií ve vybraných fermentovaných mléčných výrobcích.

Klíčová slova

Mléčné bakterie, probiotika, prebiotika, fermentované mléčné výrobky, polymerázová řetězová reakce (PCR)

Abstract

Fermented dairy products containing probiotic microorganisms which are distinguished by favorable effects on the intestinal microflora, are in present time consumed in large quantities. Products range in which microorganisms are contained in recent years expanded greatly. On the market are currently available not only milk, but also meat or vegetable products of this type.

The aim of work was to get acquainted with probiotic microorganisms, a description of their use in food industry, and whether they have for us “*Homo sapiens sapiens*,” favorable or unfavorable effects. In the practical part of work was showed the presence of probiotic bacteria in fermented dairy product using the polymerase chain reaction methods.

Keywords

Lactic acid bacteria, probiotic, prebiotic, fermented dairy products, polymerase chain reaction (PCR)

ZEMANOVÁ, T. *Význam probiotik v potravinových produktech*. Brno:

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. s. Vedoucí bakalářské práce
Ing. Štěpánka Trachtová Ph. D,

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce Ing. Štěpánce Trachtové, Ph. D., za odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za jejich podporu, trpělivost a povzbuzení.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	PROBIOTIKA.....	8
2.1.1	Historie probiotik	8
2.1.2	Probiotické bakterie.....	8
2.1.3	Účinky probiotik na lidský organismus.....	10
2.1.4	Využití probiotických bakterií	10
2.1.5	Kysané mléčné výrobky a nápoje	10
2.1.5.1	Jogurt.....	10
2.1.5.2	Kefír	11
2.1.6	Doplňky stravy.....	11
2.1.7	Prebiotika.....	11
3	CÍL PRÁCE.....	13
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	14
4.1	MATERIÁL A METODY	14
3.1.1	Použitý vzorek probiotického mléčného výrobku	14
3.1.2	Použité bakteriální kmeny pro pozitivní kontroly.....	14
3.1.3	Přístroje a pomůcky.....	14
3.1.4	Chemikálie	15
3.1.5	Roztoky.....	15
4.1.5	Magnetické nosiče.....	16
3.1.6	Komponenty pro PCR	16
4.2	LYZE BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK	16
4.3	FENOLOVÁ EXTRAKCE BAKTERIÁLNÍ DNA	17
4.4	SRÁŽENÍ DNA ETHANOLEM	17
4.5	SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY DNA.....	17
4.6	GELOVÁ ELEKTROFORÉZA BAKTERIÁLNÍ DNA.....	18
4.7	IZOLACE DNA Z HRUBÉHO LYZÁTU BUNĚK Z MLÉČNÝCH VÝROBKŮ POMOCÍ MAGNETICKÝCH MIKROČÁSTIC.....	18
4.8	PŘÍPRAVA SMĚSI PRO PCR.....	19
4.9	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZCOVÁ REAKCE	20
4.10	GELOVÁ ELEKTROFORÉZA PRODUKTU PCR.....	20
5	VÝSLEDKY	22
5.1	IZOLACE DNA Z HRUBÝCH LYZÁTŮ BUNĚK.....	22
5.1.1	Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk z mléčného výrobku metodou fenolové extrakce	22
5.1.2	Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk z mléčného výrobku pomocí magnetických nosičů 22	
5.1.3	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA.....	22

5.1.4	Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA.....	23
5.2	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZCOVÁ REAKCE.....	24
5.2.1	Důkaz přítomnosti bakteriální DNA	24
5.3	DŮKAZ PŘÍTOMNOSTI DNA BAKTERIÍ RODU LACTOBACILLUS	25
5.4	DŮKAZ PŘÍTOMNOSTI DNA BAKTERIÍ RODU BIFIDOBACTERIUM	26
6	DISKUZE.....	27
7	ZÁVĚR	29
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	30

1 ÚVOD

Probiotika jsou živé organismy, které přinášejí zdravotní prospěch svému hostiteli. Mnoho lidí si ani neuvědomuje, že probiotické mikroorganismy jsou přítomny v celé řadě potravin, jako jsou mléčné či masné výrobky a ani netuší, jaký vliv na lidský organismus mají. Již po staletí jsou probiotické mikroorganismy využívány při výrobě celé řady kysaných mléčných výrobků, sýrů, masných výrobků, ale i čokolády nebo dětské výživy.

Sterilní trávicí trakt má pouze dítě po narození. Trávicí trakt je průběžně osídluje v závislosti na stravě. Bakteriální osídlení trávicího traktu se v průběhu lidského života mění. Trvá přibližně dva roky, než se mikroflóra dítěte ustálí. Celkové složení mikroflóry trávicího traktu u starších osob se výrazně mění, neboť dochází ke snižování počtu bakterií *Bifidobacterium*, někdy bakterie *Bifidobacterium* zcela vymizí.

Jako probiotika se nejčastěji používají kmeny bakterií, jako jsou *Laktobacillus* a *bifidobakterie*. Díky působení probiotických mikroorganismů, které napomáhají zachování optimálního složení střevní mikroflóry, je lidský organismus lépe odolný proti různým patogenům. Přítomnost probiotik v produktech, které konzumujeme je pro naše tělo prospěšná, protože pomáhá k udržení homeostázy. Díky zlepšení stavu střevní mikroflóry v důsledku působení probiotických bakterií, je náš imunitní systém lépe odolný proti různým nákazám. Tyto kmeny pomáhají zejména při léčbě střevních onemocnění, jako je například průjem. Z toho důvodu je vhodná konzumace potravin či doplňků stravy s obsahem probiotik jako prevence při cestách do ciziny. Probiotika snižují aktivitu nebezpečných látek, které vznikají při špatném trávení ve střevě. Stejný pozitivní efekt je využíván po léčbě antibiotiky nebo u pacientů s chronickým onemocněním tlustého střeva. Bylo prokázáno, že přítomnost bakterií *Laktobacillus acidophilus* způsobuje v důsledku rozkladu žlučových kyselin snížení vysoké hladiny cholesterolu v organismu.

Celkově lze tedy říci, že konzumace probiotických mikroorganismů má pozitivní vliv na lidské zdraví. Potravin s obsahem probiotických mikroorganismů by měly být zařazeny do zdravého jídelníčku, abychom si udrželi stabilní stav střevní mikroflóry, aby tak lépe chránění proti vzniku celé řady chronických a infekčních onemocnění.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotika

Jako probiotické mikroorganismy, neboli probiotika označujeme aktivní kultury, které s lidským organismem žijí v symbióze a přispívají lidskému organismu ke zdraví.[1] Můžeme je nalézt v ústní dutině, v nose, ale především ve střevech, kde je jejich vliv na zdraví hostitele nejvýznamnější.[2]

Mikroorganismy, které jsou označovány jako probiotické, musí splňovat celou řadu podmínek a vykazovat množství vlastností. Hlavní a nejdůležitější je, jejich bezpečný a pozitivní vliv na lidský organismus, a to bez jakýchkoli negativních vedlejších účinků. Doporučená denní dávka je 10^6 - 10^9 životaschopných probiotických organismů pro nejúčinnější příznivý účinek na lidský organismus [3][4]

Probiotické mikroorganismy používané v potravinářství musí být schopné odolat žaludečním šťávám a expozici žluči, protože musí přežít průchod zažívacím traktem až do střev. Kromě toho musí být schopny pomnožit se a tím následně kolonizovat trávicí trakt. V neposlední řadě, je velmi důležité zachování jejich účinnosti neboli životaschopnosti po celou dobu trvanlivosti výrobku, v němž jsou probiotické mikroorganismy obsaženy.[1]

2.1.1 Historie probiotik

Slovo probiotikum vzniklo z řeckého slova „*pro bios*“, v překladu „*pro život*“. Na přelomu 19. a 20. století ruský vědec a doktor Ilja Iljič Mečnikov, objevil ve zkoumaném jogurtu zvláštní bakterie produkující kyselinu mléčnou. K objevu jej přivedlo studium dlouhověkosti a vitality obyvatel Bulharského venkova. Základem jejich stravy byly právě fermentované mléčné výrobky, konkrétně jogurty. V roce 1908 byl za svůj výzkum imunitního systému odměněn Nobelovou cenou za medicínu.[2]

V Japonsku roku 1980 byl poprvé využit termín funkční jídlo pro potravinové produkty, které mají speciální vlastnosti a příznivě ovlivňují lidské zdraví. V roce 1984 byl poprvé představen koncept funkčních potravin, japonským vědcem, který studoval vztah mezi výživou a posílením fyziologického stavu organismu. Potravina může být považována za funkční, jen v případě, kdy její příznivý vliv na jednu nebo více tělesných funkcí mimo přiměřených výživových účinků na zdravotní stav nebo snížení rizika onemocnění, byl dostatečně prokázán. Jejich příznivý vliv se musí projevit již při konzumaci množství odpovídajícím běžné potravíně.

2.1.2 Probiotické bakterie

V současné době mezi probiotika řadíme kmeny *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* [5]. Ty jsou nejčastěji obsaženy ve fermentovaných mléčných výrobcích nebo v doplňcích stravy či lécích.

Příkladem- jiných probiotik nehumánního původu je *Saccharomyces boulardii*, které se používá při fermentaci mléčných výrobků po mnoho let. [6] Na rozdíl od mnoha jiných, toto

probiotikum nebylo izolováno z lidských výkalů, ale z ovoce. [1] V potravinářství jej i přesto bylo možné použít, neboť si zachovalo své terapeutické vlastnosti, mezi které patří schopnost zachování životaschopnosti během výroby i v průběhu tranzitu přes žaludek a tenké střevo. Díky tomu může spotřebiteli poskytnout požadované zdravotní výhody.

Mikroorganismy nejčastěji používané jako probiotika, patří do heterogenní skupiny bakterií mléčného kvašení *Lactobacillus*, *Enterococcus* do rodu *Bifidobacterium*. Dalšími méně rozšířenými probiotickými mikroorganismy jsou kmeny *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Bacillus* a *Saccharomyces*. Bakterie *Streptococcus thermophilus* byla použita v probiotikách pro zlepšení trávení laktózy u pacientů s nesnášenlivostí [7].

Bakterie mléčného kvašení (Lactic Acid Bacteria – LAB) tvoří významnou skupinu mikroorganismů používaných nejen při výrobě fermentovaných mléčných produktů. V současné době se bakterie mléčného kvašení využívají při výrobě mléčných fermentovaných potravin nebo se mohou přidávat do zeleniny, masa a vína [8].

Jak už bylo zmíněno, probiotika se nejlépe aplikují do mléčných výrobků, jako jsou jogurty, kefír nebo mléčné nápoje. [9] Do mléčných výrobků se velmi často přidávají probiotické kmeny bakterií, plísní nebo kvasinek. [10] Většina dostupných probiotických přípravků se prodává v kombinaci s *Lactobacillus species* nebo *Bifidobacterium species*. [11]. Vícedruhové probiotické směsi jsou ve srovnání se směsmi s jedním kmenem probiotik stále populárnější, protože mohou mít aditivní nebo dokonce synergické účinky, takže mohou mít za následek vyšší účinnost [12]. Některé bakterie mléčného kvašení jsou uvedeny v Tabulce 1. Kromě nich se v současné době používají v probiotických přípravcích i kmeny *Bacillus sp.*, *E. coli Nissle 1917* kvasinky (*S. boulardii*, *S. cerevisiae*) nebo vláknité houby (*Aspergillus oryzae*). Probiotické přípravky ať už z jednoho bakteriálního kmene, nebo jakosoubor probiotických produktů, mohou být k dispozici buď v kapalném formě, prášků, gelu, pasty, granulí nebo ve formě kapslí či tablet. [13]

Probiotické mikroorganismy jsou pro přímou nebo nepřímou lidskou spotřebu primárně k dispozici ve třech různých typech formách: 1) kultura přidávaná do potravin (sušené nebo v hluboce zmražené formě) 2) potravinářské výrobky (fermentovaný nebo nefermentovaný) a 3), doplňky stravy (léčivé přípravky v prášku, kapslích nebo tabletách). [14]

Tabulka 1 Bakterie mléčného kvašení

Lactobacillus	Bifidobacterium	Jiné mléčné bakterie	Jiné
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli strain Nissle</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	

<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

2.1.3 Účinky probiotik na lidský organismus

Účinek probiotik na lidský organismus je v současné době intenzivně studován. Mikroorganismy používané jako probiotika je nezbytné důkladně testovat, aby splňovaly bezpečnostní normy stanovené Evropskou unií (EU). Hlavní účinky probiotických mikroorganismů jsou prokazovány klinickými pokusy, také pomocí testů tzv. „*in vitro*“ (ve zkumavce), které vyžadují ověření „*in vivo*“ (v buňce) se zjistili další významné účinky probiotik.[15]

Podle posledních výzkumů jsou probiotika používána zejména pro léčbu infekčních onemocnění, poskytují úlevu od chronických střevních zánětlivých onemocnění, imuno-modulace, přispívají ke snížení cholesterolu [16], zlepšují trávení laktózy, mají antihypertenzní účinky, antioxidační účinky [17], zlepšují ochranu proti rakovině, zejména tlustého střeva a močového měchýře [18], snižují příznaky alergie zejména u kojenců [19], napomáhají snížit obezitu a mají vliv na střevní mikroflóru [20]. Současně zvyšují schopnost přirozené imunitní funkce lidského organismu, mají protinádorové a anti-infekční schopnosti, a proto chrání proti rakovině a aktivují neutrofilů a nukleové kyseliny v buňkách.

2.1.4 Využití probiotických bakterií

Mezi nejlepší prostředí pro přenos a úchovu probiotických bakterií patří mléko. Mléko podporuje růst probiotických bakterií a přežití při průchodu trávicím traktem lidského organismu. Životaschopnost probiotických kmenů ve fermentovaných mléčných výrobcích je ovlivněna antagonickou interakcí probiotických kultur a také produkcí kyselin v kysaných produktech. Existuje i řada nefermentovaných probiotických mléčných výrobků jako je sýr a zmrzlina.

Mezi typické příklady komerčních mléčných produktů patří pasterované mléko, jogurt, zmrzlina, kysaná mléka, sýry a kojenecké mléko.[21]

2.1.5 Kysané mléčné výrobky a nápoje

2.1.5.1 Jogurt

Produkty označované názvem jogurt jsou mléčné výrobky vzniklé prokysáním mléka čistou jogurtovou kulturou, která obsahuje mikroorganismy druhu *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus* ve vhodném poměru. Výroba jogurtu musí být prováděna z kvalitních surovin. Hlavní surovinou, která nám určuje konzistenci jogurtu, je

mléko, které musí být nezahuštěné nebo různě zahuštěné o různé tučnosti. Tučnost použitého mléka je různá v závislosti na druhu jogurtu. Nízkotučné jogurty obsahují 0-1% tuku a ty vysokotučné až 10%. Směs se homogenizuje, opětovně se pasteruje a temperuje na zračí teplotu. Pak se k ní přidá čista mikrobiální kultura ve formě jogurtového zákysu. Množství zákysu, doba a teplota zrání je závislá na dalším technologickém postupu. Teplota 37-45°C se používá pro krátkodobé zrání, dávka zákysu se pohybuje okolo 2 - 4% a doba zrání trvá 2 a půl – 4 hodiny. Po uplynuté době je jogurt rychle ochladí pod teplotu 10°C a poté se stáčí do nádob, kde bude probíhat proces zrání. Po dosažení požadované kyselosti a konzistence se rychle vychladí. Kysání se musí řídit, aby ve výsledku nebyl jogurt překysaný, ale ani nesmí být nedokysaný. Takovým technologickým postupem získáme bílý jogurt, pokud z něj chceme vyrobit jogurt ovocný, přidává se do něj ovocná složka před plněním jogurtové směsi na dno kelímku či láhve nebo se přímo do jogurtové směsi zamíchá ovocný sirup a sráží se současně s jogurtem.[22]

V současné době se začal vyrábět nový druh jogurtů tzv. „Biojogurt“, který kromě standardních kultur *S. thermophilus* a *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* obsahuje i další živé probiotické druhy např. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis*, *B. longum* subsp. *infantis* a *B. longum* subsp. *longum*. [23]

2.1.5.2 Kefír

Kefír je oblíbený kysaný, alkoholický, mléčný produkt, původem z Kavkazu. Vyrábí se pomocí tzv. kefírových zrn, které drží pohromadě polysacharidová matrix zvaná kefiran. Kefírová zrna vzhledem připomínají květák a obsahují komplexní směs bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), octových bakterií a kvasinek. Kvasinky jsou ve fermentaci kefiru důležité z důvodu produkce ethanolu a CO₂. Při fermentaci kefiru vzniká kyselina mléčná, kyselina octová, CO₂, ethanol a aromatické sloučeniny. Tyto látky dávají kefiru jeho jedinečné sensorické vlastnosti: perlivost, kyselost, mírnou hořkost a osvěžující chuť.

Konzumace kefiru má několik výhod: podporuje gastrointestinální trakt, má antibakteriální, protirakovinné, imunitní a hypocholesterolemické účinky. [16]

2.1.6 Doplnky stravy

Po použití probiotika jako doplňku stravy s *Lactobacillus rhamnosus* HN001 bylo prokázáno, že počet nukleových kyselin se v buňkách v lidském organismu zvyšuje. [24] U *Lactobacillus casei*, které patří do kmenu *Shirota*, bylo zjištěno, že zvyšuje cytotoxickou aktivitu nukleových kyselin v buňkách. [25]

2.1.7 Prebiotika

Prebiotika jsou složky potravin, které jsou pro náš organismus nestravitelné, ale jsou stejně důležitá jako probiotika, neboť podporují růst a aktivitu střevní mikroflóry a tak zlepšují náš zdravotní stav. Mezi nejvýznamnější pozitivní účinky prebiotik na lidský organismus patří

pozitivní vliv na mikroflóru tlustého střeva, snížení energetického příjmu z potravy, potlačení zácpy.

Prebiotika rozdělujeme do dvou skupin, přirozená a syntetická. Syntetické probiotické oligosacharidy můžeme připravit oligomerací sacharózy, laktózy anebo chemickou úpravou škrobu. Od přirozených se neliší strukturou, ale způsobem vzniku.

Oligosacharidy jsou těžko stravitelné až nestravitelné látky, které se nacházejí v tlustém střevě a slouží jako substrát pro některé žádoucí bifidobakterie. Všechny oligosacharidy nejsou vhodné pro použití v prebiotikách, některé z nich způsobují nadýmání anebo trávicí problémy (tj. rafinóza, stachyóza).

Mezi nejvýznamnější oligosacharidové prebiotikum patří o inulin. Můžeme ho získat z kořene čekanky, hlíz topinambury, cibule, česneku a z hlíz jakonu. Jako přídavek do jogurtu, marmelád a nealkoholických nápojů se může použít sirup z čekanky a topinambur, který má velký obsah inulinu.[26]

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vysvětlit základní pojmy týkající se problematiky probiotik. Dále popsat význam probiotik ve výživě člověka a jakým způsobem působí na jeho zdraví.

Dalším cílem bylo naučit se detekovat probiotické mikroorganismy při laboratorním stanovení rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* ve fermentovaných mléčných výrobcích s probiotickou kulturou dodaných vybranou mlékárnou.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a metody

Pokud není uvedeno jinak, byly níže uvedené postupy a metody převzaty ze skript. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie autorů Španové a Ritticha. [28]

3.1.1 Použitý vzorek probiotického mléčného výrobku

- Activia bílá

Mléčný výrobek - jogurt

Výrobce: Danone a.s.

Vinohradská 2828/151

130 00 Praha 3, Česká republika

Datum spotřeby: 6. 4. 2015

Složení: mléko, mléčné bílkoviny, jogurtové kultury (*Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* a *Streptococcus salivarius thermophilus*) a *Bifidus ActiRegularis DN-173 010*. Obsah tuku nejméně 3,1% hmot sodík, vápník nenasycené mastné kyseliny, sacharidy.

- Jihočeský tradiční jogurt bílý

Mléčný výrobek - jogurt

Výrobce: AGRO-LA, spol. s.r.o.

Dodavatel: Madeta, a.s.

Jiráskovo předm. 630

377 01 Jindřichův Hradec, Česká Republika

Datum spotřeby 2. 4. 2015

Složení: mléko plnotučné, mléko sušené, živá jogurtová kultura. Obsah tuku 7,2 g/200 g, sacharidy 10,2 g/200g, bílkoviny 11,8 g/200g

3.1.2 Použité bakteriální kmeny pro pozitivní kontroly

V experimentech byly pro izolaci DNA a ověření účinnosti specifické separace buněk pomocí magnetických částic použity bakteriální kmeny, které byly získány z České sbírky mlékařských mikroorganismů Laktoflóra Tábor, ČR (CCDM

- *Bifidobacterium brevis*
- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (CCDM 211/06)

3.1.3 Přístroje a pomůcky

- Minicentrifuga SPECTRAFUGE MINI
- Centrifuga miniSpin plus 14 500 ot·min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)

- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- NanoPhotometer (Implen, München, Německo)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New jersey, USA)
- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, New jersey, USA)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- MiniInkubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- Zařízení pro elektroforézu OWL Buffer PufferTM
- Zdrojelektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Transilluminátor TVR- 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermocycler MinicyclerTM (BIO-RAD Lab., USA)
- Laboratorní sklo
- Špičky z umělé hmoty
- Další laboratorní pomůcky (špachtle, lžička, buničina...)

3.1.4 Chemikálie

- Agarosa pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Nanášecí pufř Yeallow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Polyethylen glykol (PEG 6000) (FLUKA BioChemika, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-báze (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) (Serva, Heidelberg, SRN)

3.1.5 Roztoky

- Lyzační pufř I (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0)

- Lyzační pufr II (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0 a 3 mg·ml⁻¹ lysozymu)
- Tris-HCl (Tris-báze, destilovaná voda, koncentrovaná HCl pro úpravu pH)
- TE pufr (1M Tris-HCl (pH 7,8), 0,5M EDTA (pH 8) a destilovaná voda)
- CIZ (směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1)
- 0,5 × TBE pufr (molární Tris-base, molární kyselina boritá, destilovaná voda a EDTA)
- DNA standard (obsahuje fragmenty DNA o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200 a 1500 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)

4.1.5 Magnetické nosiče

- Magnetické polymerní nosiče PGMA byly připraveny Ing. D. Horákem, CSc. z Makromolekulárního ústavu Akademie věd ČR, Praha.

Tabulka 2: Charakterizace magnetických nosičů

značení	polymer*	Fe (%hm)	Průměr nosiče [μl]	PDI*	Dn*	Dw*	-COOH [mM/g]
Fkol B 100 ox	PGMA	5,36	0,7	1,16	0,70	0,81	0,67

*PGMA – polyglycidyl methakylát, PDI – index polydispersity (poměr hmotnosti a počtu nosičů o průměrné velikosti), Dn – počet částic průměrné velikosti, Dw – hmotnost částic průměrné velikosti

3.1.6 Komponenty pro PCR

- PPP Master mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery specifické pro rod *Bacteria* (F_eub, R_eub) (citace)
- Primery specifické pro rod *Lactobacillus* (R_alllact, F_alllact) (citace)
- Primery specifické pro rod *Bifidobacterium* (Pbi F1, Pbi R2) (citace)

4.2 Lyze bakteriálních buněk

- 1 ml probiotického mléčného výrobku Activia bílá od výrobce Danone se centrifugoval při 10 000 ot/min po dobu 3 minut v 1,5 ml Eppendorfových zkumavkách.
- Supernatant se opatrně slil a sediment se nechal okapat.
- Sediment se resuspendoval v 1 ml lyzačního pufru I, nejdříve se přidalo 100 μl pufru, dobře se promíchalo a poté se přidalo zbývajících 900 μl pufru a suspenze se opět promíchala.
- Suspenze se centrifugovala při 10 000 ot/min po dobu 3 minut.
- K sedimentu se přidalo 500 μl lyzačního pufru II a dokonale se resuspendoval.
- Vzorky se inkubovaly půl hodiny při laboratorní teplotě, občas se promíchaly.
- K suspenzi se přidalo 12,5 μl 20% dodecyl síran sodného (SDS) a 5 μl proteinasy K (100 μg/ml) a promíchala se.

- Vzorke se inkubovaly při 55°C do projasnění roztoku (1 hodinu 30 minut). Vzorke se občas promíchaly.
- Stejně se postupovalo i s výrobkem Jihočeský jogurt od výrobce MADETA

Takto lyzované buňky jsou označovány jako hrubý lyzát bakteriálních buněk. Z hrubého lyzátu se izolovala DNA metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických nosičů (Fkol B100ox) v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl.

4.3 Fenolová extrakce bakteriální DNA

- K 500 μ l lyzátu buněk se přidal stejný objem fenolu (předestilovaného, pH bylo upraveno na hodnotu 7,8). Směs se kývavým pohybem opatrně promíchávala 4 minuty.
- Směs se centrifugovala při 15 000 ot/min po dobu 5 minut.
- Pomocí špičky s ustríženým hrotem se odebrala vodní fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky (nesměla se odebrat proteinová vrstva)
- Vodní fáze s DNA se doplnila TE pufrem na objem 500 μ l a poté se přidalo 700 μ l směsi chloroform – isoamylalkohol (24:1). Směs se opatrně kývavým pohybem promýčávala 4 minuty.
- Směs se centrifugovala při 15 000 ot/min po dobu 5 minut.
- Horní vodní fáze DNA se odebrala do čisté Eppendorfovy zkumavky.
- DNA se přečistilo srážením ethanolem.

4.4 Srážení DNA ethanolem

- Pomocí automatické pipety se změřil objem vzorku DNA ve zkumavce a celkový objem se upravil TE pufrem na 400 μ l (pokud objem vzorku DNA neměl 400 μ l).
- Ke vzorku DNA se přidala 1/20 objemu 3M octanu sodného (20 μ l). Promíchal se.
- Přidal se 1 ml (2,5 násobek objemu) ethanolu (96 %) vychlazeného na -20°C. Směs se promíchala.
- DNA se sráželo při -20°C po dobu 15 min.
- Směs se centrifugovala při 15 000 Ot/min po dobu 15 minut (při 4°C). Opatrně se se odlil supernatant. Dále se pracovalo se sedimentem.
- Sediment DNA se vysušil v exikátoru (asi 10 min).
- DNA se rozpustila v 100 μ l TE pufru a uchovalo se při 4°C (30 min).

Takto připravená DNA se použila pro agarózovou gelovou elektroforézu a pro spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.

4.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

- Roztok DNA v TE pufru se umístil do křemenné spektrofotometrické kyvety přístroje NanoPhotometer (Implen)
- Měřila se absorbance v rozmezí vlnových délek 220-320 nm proti TE pufru. Byly odečteny hodnoty absorbancí při 230 nm (minimum), 260 (maximum), 280 a 310 nm.
- Z hodnoty absorbance $A_{260/280}$ se vypočetla koncentrace DNA.

4.6 Gelová elektroforéza bakteriální DNA

- Připravil se 0,8 % agarosový gel (0,8 g agarosy na 100 ml TBE pufru); suspenze se pečlivě rozvařila v mikrovlnné troubě, nechala se vychladnout na teplotu asi 60 °C, nalil se do elektroforetické vaničky s hřebínkem a nechal se půl hodiny tuhnout. Před nanášením vzorků na gel se hřebínek opatrně vyjmul.
- V mikroskopu se smíchalo 15 μ l DNA s 3 μ l nanášecího pufru (6- krát koncentrovaný). Směs se nanasla do komůrky gelu.
- Gel se vložil do elektroforetické vaničky v takové orientaci, aby záporně nabitá DNA migrovala k anodě. Vanička s gelem se opatrně převrtstvil TBE pufrem do výšky 2-3 mm nad gel a zapnul se zdroj gelové elektroforézy (80 V 1,5 hod).
- Separace se ukončila v okamžiku, kdy bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufru doputovala do 2/3 délky agarosového gelu.
- Po skončení elektroforézy se gel obarvil ethidium bromidem (0,5 μ g/ml) po dobu 10 minut.
- Gel se opláchnul v destilované vodě a umístil na transluminátor a vyhodnotil se v UV světle při vlnové délce $\lambda = 305$ nm.
- Provedla se fotografická dokumentace.

4.7 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z mléčných výrobků pomocí magnetických mikročástic

K izolaci DNA byl použit hrubý lyzát buněk bakteriálních kultur, které jsou obsaženy v mléčném výrobku Activia od výrobce Danone a Jihočeský jogurt od výrobce Madeta. Separace byla provedena pomocí magnetických mikročástic polyglycidyl methakrylátového typu P(GMA) na jejichž povrchu jsou navázány karboxylové funkční skupiny v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl.

- Po smíchání komponent (Tabulka 3) se směs inkubovala 10 minut při laboratorní teplotě.
- Směs se umístila do magnetického separátoru (se zasunutým magnetickým pásem) a magnetické částice se separovali 5 min při laboratorní teplotě.
- Po uplynutí uvedené doby se opatrně odebral supernatant.
- Z magnetického separátoru se vyjmul magnetický pás, do mikroskopu se přidalo 500 μ l 70 % ethanolu.
- Vzorek se promíchal, do separátoru se zasunul magnetický pás a po 2 minutách se ethanol opatrně odebral.
- Mikroskopu se vyjmul ze separátoru a ethanol se nechal odpařit.
- DNA adsorbovaná na magnetických částicích se eluovala při laboratorní teplotě do 50 μ l TE pufru.
- Po 5 minutách se částice odseparovali pomocí magnetického separátoru a eluát obsahující DNA se odebral do čistých mikroskopu.

Tabulka 3: Komponenty separační směsi pro izolaci DNA magnetickým nosičem

Krok	Složka	Podíl (μl)
1	NaCl (5M)	400
2	DNA	100
3	PEG 6000 (40%)	400
4	Magnetický nosič (0,2 mg/ml)	100
Celkem		1000

4.8 Příprava směsi pro PCR

- Pro přípravu PCR směsi byly použity primery specifické pro doménu *Bacteria* (F eub, R eub) dle Haarman [16], pro rod *Lactobacillus* (R_allact, F_allact) (citace) a pro rod *Bifidobacterium* (Pbi F1, Pbi R2) (citace). Sekvence použitých primerů a velikosti specifických produktů PCR shrnuje Tabulka 4.

Tabulka 4: Charakteristika primerů použitých pro PCR.

Primery	Sekvence primeru (5' – 3')	Velikost produktů PCR	citace
F eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAGT	466 bp	[16]
R eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
Y 2	5' CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT 3'	92 bp	
para	5' CAC CGA GAT TCA ACA TGG 3'		
BiBRE-1	5' CCGGATGCTCCATCACAC 3'	914 bp	
BiBRE-2	5' ACAAAGTGCCTTGCTCCCT 3'		

- Všechny komponenty PCR (Tabulka 5) byly před použitím rozmrazeny promíchány a krátce zcentrifugovány.
- Byla připravená směs pro PCR o celkovém objemu 25 μl

Tabulka 5: Komponenty pro přípravu PCR směsi

Komponenta	Objem (μl)
Voda pro PCR	9,5
PPP master mix (Top Bio)	12,5
Primer (10 pmol/μl)	1,0
Primer (10 pmol/μl)	1,0
DNA matrice	1,0

- Jako DNA matrice byla použita purifikovaná DNA jednotlivých vzorků, zředěná na koncentraci 10 ng/μl. Do reakční směsi byla přidávána jako poslední.

- Negativní kontrola (kontrola kontaminace reakčních komponent) byla připravena smícháním směsi pro PCR a 1 µl vody pro PCR, která nahradila DNA matici.
- Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z typového kmene (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06). DNA bylo zředěno na koncentraci 10 ng/µl.

4.9 Polymerázová řetězová reakce

- Připravená PCR směs obsahující všechny komponenty PCR včetně DNA byla promíchána a po krátké centrifugaci umístěna do termocycleru
- Byl spuštěn odpovídající program uvedený v Tabulka 6

Tabulka 6: Programy pro PCR

Doména <i>Bacteria</i>		
94 °C	5 min	30 cyklů
94 °C	30 s	
55 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
Doména <i>Lactobacillus</i>		
94°C	60	30 cyklů
55°C	60	
72°C	120	
Doména <i>Bifidobacterium</i>		
94°C	60	30 cyklů
50°C	60	
72°C	120	

4.10 Gelová elektroforéza produktu PCR

- Byl připraven 1,8 % agarosový gel (0,8 g agarosy na 100 ml TBE pufru); suspenze byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě, byla ponechána k vychlazení na teplotu asi 60 °C, suspenze byla nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem a byla ponechána půl hodiny tuhnout. Před nanášením vzorků na gel byl hřebínek opatrně vyjmut.
- V mikroskopu bylo smícháno 25 µl produktu PCR a 5 µl nanášecího pufru (6- krát koncentrovaný). Směs byla nanášena do komůrky gelu.
- Do jedné z komůrek byl nanášen DNA standard 100 bp
- Gel byl vložen do elektroforetické vaničky v takové orientaci, aby záporně nabitá DNA migrovala k anodě. Vanička s gelem byla opatrně převrstvena TBE pufrům do výšky 2-3 mm nad gel a byl zapnut zdroj gelové elektroforézy (80 V 1,5 hod).
- Separace byla ukončena v okamžiku, kdy bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufru doputovala do 2/3 délky agarosového gelu.

- Po skončení elektroforézy byl gel obarven ethidium bromidem (0,5 µg/ml) po dobu 10 minut.
- Gel byl opláchnut v destilované vodě a byl umístěn na transluminátor, kde byl vyhodnocen v UV světle při vlnové délce $\lambda = 305 \text{ nm}$.
- Byla provedena fotografická dokumentace.

5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk

Pomocí fenolové extrakce byla provedena izolace DNA z hrubých lyzátů buněk z mléčného výrobku Activia Bílá od výrobce Danone a Jihočeský jogurt tradiční od výrobce Madeta.

5.1.1 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk z mléčného výrobku metodou fenolové extrakce

Pomocí fenolové extrakce byla provedena izolace DNA z hrubých lyzátů buněk z mléčného výrobku Activia Bílá od výrobce Danone a Jihočeský jogurt tradiční od výrobce Madeta.

5.1.2 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk z mléčného výrobku pomocí magnetických nosičů

Izolace DNA, z hrubých lyzátů buněk z mléčného výrobku Activia Bílá od výrobce Danone a Jihočeský jogurt tradiční od výrobce Madeta, byla provedena pomocí magnetických nosičů.

5.1.3 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

V rozmezí vlnových délek 220-320 nm byla spektrofotometricky změřena absorbance DNA izolované fenolovou extrakcí a metodou magnetické separace yhrubého lyzátu buněk mléčných výrobků Activia bílá od Danone a Jihočeský jogurt tradiční od výrobce MADETA.

Na základě hodnot absorbance byla stanovena koncentrace a čistota DNA. Výsledky spektrofotometrického stanovení uvádí Tabulka 7..

Tabulka 7 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z mléčných výrobků

Absorbance	230 A	260 A	280 A	320 A	260/280 A	260/230 A	Koncentrace ng/μl
Fenolová extrakce							
Activia bílá 1	0,241	0,086	0,081	0,025	1,089	0,282	30,5
Activia bílá 2	0,486	0,201	0,180	0,066	1,184	0,321	67,5
Jihočeský 1	0,336	0,072	0,087	0,017	0,786	0,172	27,5
Jihočeský 2	0,429	0,121	0,118	0,026	1,033	0,236	47,5
Magnetické nosiče							
Activia bílá 2	0,457	0,134	0,094	0,007	1,460	0,282	63,5
Jihočeský 1	0,291	0,114	0,081	0,000	1,359	0,414	62,5

5.1.4 Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA

Pomocí agarózové gelové elektroforézy byla zjištěna přítomnost a intaktnost DNA izolované z mléčných výrobků metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických nosičů. Gel je uveden na Obrázek 1. Vzorek izolované DNA kultury *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 byl nanesen v agarózovém gelu v běhu 6. Nejvýše na obrázku lze vidět zářící proužek, kterým je výsledek chromozomální DNA, uprostřed lze vidět extrachromozomální DNA a dole na obrázku se nachází RNA, která nebyla v průběhu odstraněna. Takže výsledek odpovídal předpokladům.

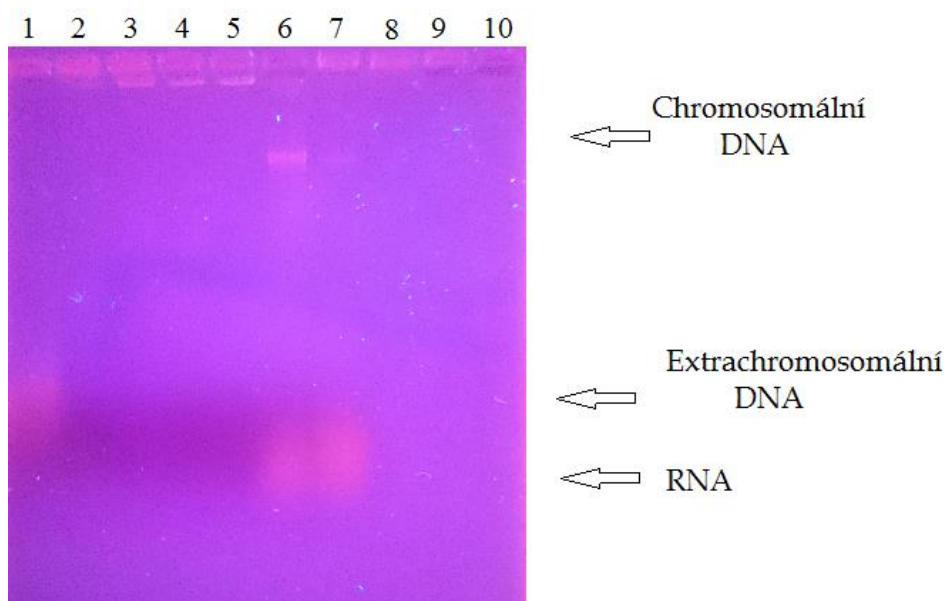


Schéma nanesení: běh č. 1 – Pozitivní kontrola CCDM 211/06 , běh č. 2 Jihočeský (1) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů, běh č. 3 – Jihočeský (2) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů, běh č. 4 Activia (1) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů, běh č.5 – Activia (2) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů, běh č.6 – Jihočeský (2) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů, běh č. 7 – Activia (2) DNA izolovaná z výrobku pomocí fenolové extrakce

Obrázek 1: Agarózová gelová elektroforéza DNA

Výsledky agarózové gelové elektroforézy DNA izolované z mléčných výrobků metodou fenolové extrakce potvrdily přítomnost bakteriální DNA (chromozomální a extrachromozomální) a RNA. V případě izolace DNA metodou magnetické separace nebyla koncentrace získané DNA dostatečně vysoká, aby mohla být agarózovou gelovou elektroforézou prokázána.

5.2 Polymerázová řetězcová reakce

Izolovaná bakteriální DNA byla vyředěna na koncentraci 10 ng/μl a použita jako DNA matrice do PCR za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. [28]

5.2.1 Důkaz přítomnosti bakteriální DNA

Důkaz přítomnosti bakteriální DNA v DNA izolovaného výrobku Activia a Jihočeský jogurt byl proveden metodou PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*. [28]

Byl amplifikován specifický úsek o délce 466 bp. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA bakteriálního kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 o 10 ng/μl. Výsledky PCR jsou uvedeny na Obrázek 1.

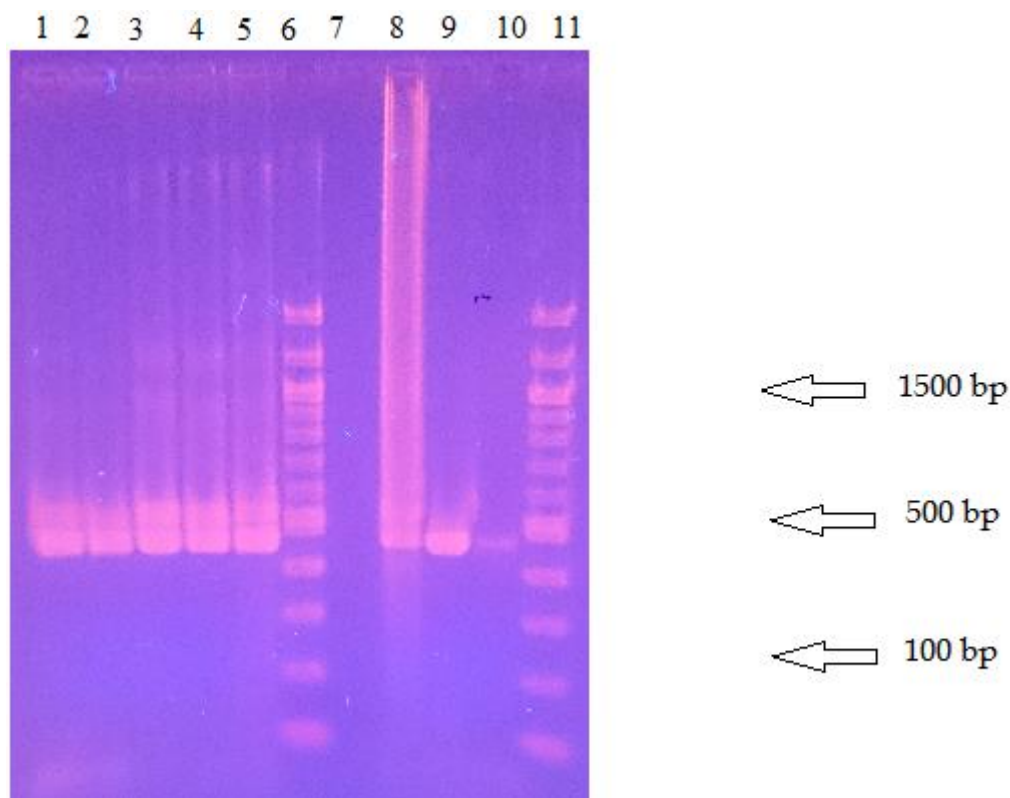


Schéma nanesení: běh č. 1 – Activia (1) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů, běh č. 2 – Activia (2) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů, běh č. 3 – Jihočeský (1) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů, běh č. 4 – Jihočeský (2) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů, běh č. 5 – Activia (2) DNA izolovaná z výrobku pomocí fenolové extrakce, běh č. 6 – DNA standard 100bp, běh č. 8 Jihočeský(1) DNA izolovaná z výrobku pomocí fenolové extrakce, běh č. 9 – Pozitivní kontrola *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM (211/06), běh č. 10 – Negativní kontrola, běh č. 11– DNA standard 100bp

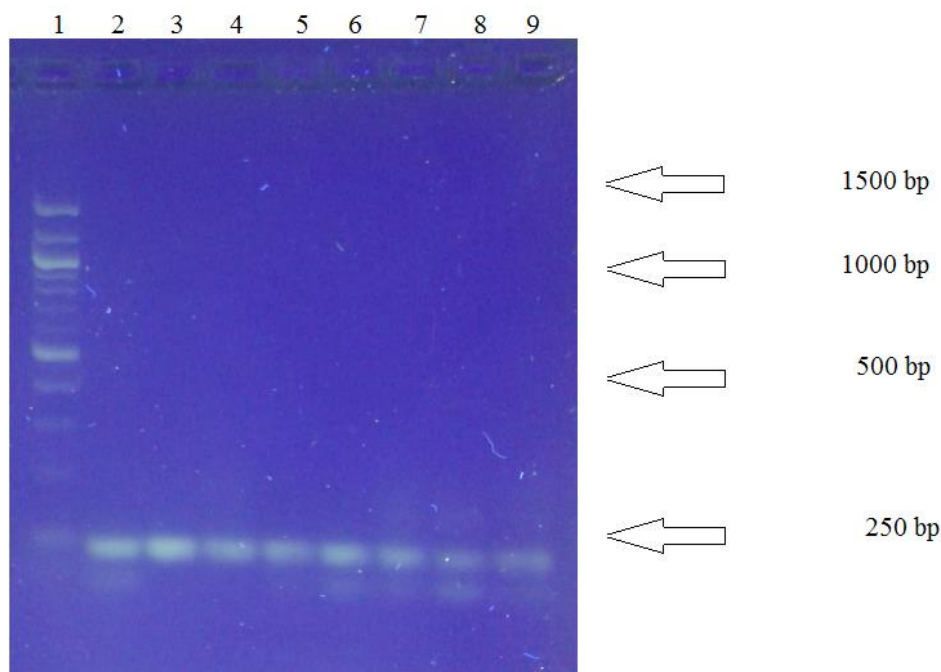
Obrázek 2: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria*

Ve všech vzorcích DNA izolované z mléčných výrobků byl detekován produkt PCR o velikosti 466 bp specifický pro doménu *Bacteria*. Výsledky potvrzují, že všechny výrobky obsahují bakteriální DNA.

Specifický produkt PCR byl detekován také v pozitivní kontrole, což potvrzuje správnost provedení PCR (složení PCR směsi, program PCR). Slabý PCR produkt byl detekován také v negativní kontrole, což ukazuje na kontaminaci při přípravě PCR směsi.

5.3 Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Lactobacillus*

Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Lactobacillus* byl proveden metodou PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* (citace). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA bakteriálního kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky PCR jsou uvedeny na Obrázku 3.



*Schéma nanesení: běh č. 1 – DNA standard 100 bp, běh č. 2 – Activia (1) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů, běh č.3 – Activia (2) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů), běh č. 4 – Jihočeský (1) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů, běh č. 5 – Jihočeský (2) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů, běh č. 6 – Activia (2) DNA izolovaná z výrobku pomocí fenolové extrakce, běh č.7 – Jihočeský (1) DNA izolovaná z výrobku pomocí fenolové extrakce, běh č.8 - Pozitivní kontrola *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 , běh č.9 –Negativní kontrola*

Obrázek 3: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus*

Ve všech vzorcích DNA izolované z mléčných výrobků byl detekován produkt PCR o velikosti 92 bp specifický pro rod *Lactobacillus*. Specifický produkt PCR byl detekován také v pozitivní kontrole, což potvrzuje správnost provedení PCR (složení PCR směsi, program

PCR). Slabý PCR produkt byl detekován také v negativní kontrole, což ukazuje na kontaminaci při přípravě PCR směsi.

5.4 Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Bifidobacterium*

Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Bifidobacterium* byl proveden metodou PCR s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium* (citace). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA bakteriálního kmene *Bifidobacterium brevis* o koncentraci 10 ng/μl. Výsledky PCR jsou uvedeny na Obrázku 4.

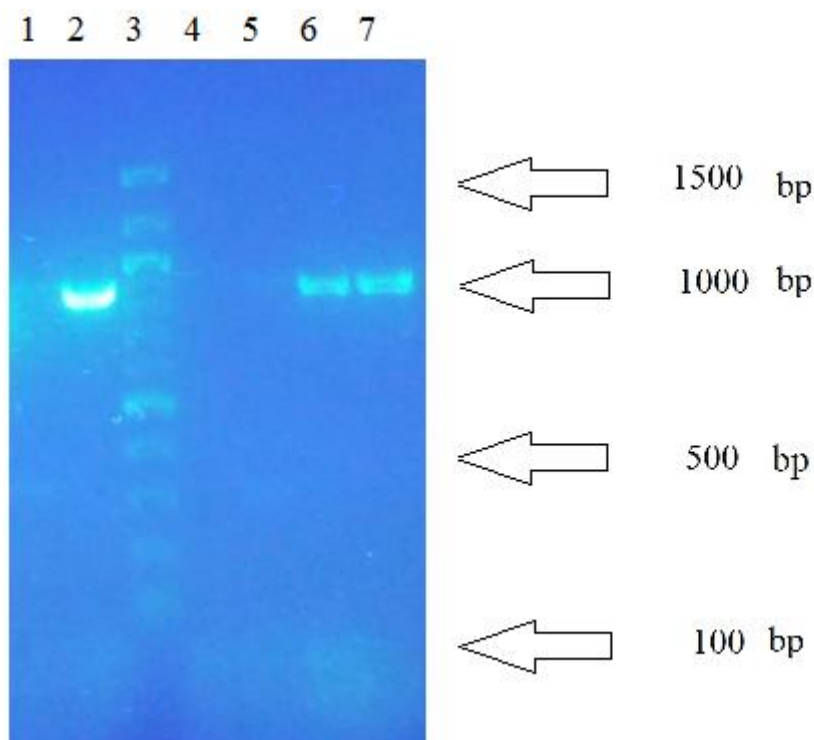


Schéma nanesení: běh č. 1 – Negativní kontrola, běh č. 2 – Pozitivní kontrola *Bifidobacterium brevis*, běh č. 3 – DNA standard 100 bp, běh č. 4 – Jihočeský (1) DNA izolovaná z výrobku pomocí fenolové extrakce, běh č. 5 – Jihočeský (2) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů, běh č. 6 – Activia (2) DNA izolovaná z výrobku pomocí fenolové extrakce, běh č. 7 – Activia (1) DNA izolovaná z výrobku pomocí magnetických nosičů

Obrázek 4: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro doménu *Bifidobacterium*.

Ve všech vzorcích DNA izolované z mléčného výrobku Activia (Danone), jak metodou fenolové extrakce, tak i pomocí magnetických nosičů, byl detekován produkt PCR o velikosti 914 bp specifický pro rod *Bifidobacterium*. Specifický produkt pro rod *Bifidobacterium* nebyl detekován ve vzorku DNA izolované z výrobku Jihočeský (Madeta). Produkt PCR o vysoké intenzitě byl detekován v pozitivní kontrole, což potvrzuje správnost provedení PCR (složení PCR směsi, program PCR).

6 DISKUZE

Cílem práce bylo zjistit přítomnost DNA bakteriálních buněk rodu *Lactobacillus* a rodu *Bifidobacterium* z mléčného produktu Activia bílá od výrobce Danone a Jihočeský tradiční od dodavatele MADETA.

Metodou magnetické separace za použití magnetických nosičů P(GMA) v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl a metodou fenolové extrakce byla izolována DNA z mléčného produktu Activia od výrobce Danone a Jihočeský tradiční od výrobce MADETA. Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace a ověřena čistota izolované DNA v rozmezí vlnových délek 230 – 320 nm. Koncentrace DNA získané metodou fenolové extrakce se pohybovala v rozmezí 27,5 až 67,5 ng/μl. V případě DNA izolované magnetickými nosiči 62,5 až 63,5 ng/μl. Při stanovení čistoty DNA ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) bylo zjištěno značné znečištění bílkovinami, protože se poměr hodnot $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ pohyboval pod hodnotou 1,8. Intaktnost izolované DNA byla potvrzena agarózovou gelovou elektroforézou bakteriální DNA. Výsledky agarózové gelové elektroforézy DNA izolované z mléčných výrobků metodou fenolové extrakce potvrdily přítomnost nukleových kyselin, konkrétně chromozomální a extrachromozomální DNA a RNA. V případě izolace DNA metodou magnetické separace nebyla koncentrace získané DNA dostatečně vysoká, aby mohla být agarózovou gelovou elektroforézou prokázána. Výše uvedené výsledky ukazují, že byla získána DNA v kvalitě a koncentraci vhodné pro provedení PCR.

Pomocí PCR za využití primerů specifických pro doménu *Bacteria* [28] byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA ve vybraném výrobku Activia bílá od výrobce Danone a Jihočeský tradiční od výrobce MADETA, jak v DNA izolované fenolovou extrakcí, tak i metodou magnetické separace za použití magnetických nosičů Fkol B100ox v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl.

Pomocí PCR za využití primerů specifických pro doménu *Lactobacillus* (citace) byla v testovaných mléčných produktech prokázána přítomnost probiotických bakterií rodu *Lactobacillus*. Pomocí PCR byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA *Lactobacillus* a byla prokázána ve všech vzorcích testovaných mléčných výrobků.

Přítomnost bakteriální DNA *Bifidobacterium* byla ověřena pomocí PCR za použití primerů specifických pro rod *Bifidobacterium* (citace). DNA *Bifidobacterium* byla prokázána pouze v mléčném výrobku Activia (Danone). Ve výrobku Jihočeský (Madeta) nebyla použitou metodou přítomnost bakteriální DNA *Bifidobacterium* prokázána.

S ohledem na údaje o obsahu bakteriálních kultur v testovaných vzorcích deklarovaných výrobcí, lze říci, že získané výsledky odpovídají těmto uvedeným údajům. Ve výrobku Activia bílá (Danone) byla prokázána bakteriální DNA a DNA rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Přičemž výrobce deklaruje přítomnost jogurtové kultury *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* a *Streptococcus salivarius thermophilus* a kultury *Bifidus ActiRegularis DN-173 010*. Získané výsledky jsou tedy ve shodě s těmito údaji. V případě jogurtu Jihočeský od firmy Madeta výrobce zmiňuje pouze přítomnost jogurtové kultury. Lze

tedy předpokládat obsah bakterií jogurtové kultury *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*. Přítomnost bakterií rodu *Bifidobacterium* nebyla uvedena, což odpovídá námi získaným výsledkům, kdy bakteriální DNA *Bifidobacterium* nebyla ve vzorcích izolované DNA pomocí metody PCR prokázána.

7 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo seznámit se s problematikou probiotik. V teoretické části bakalářské práce se pojednává o probiotikách, jakožto aktivních formech. Jsou zmíněny základní vlastnosti a požadavky na probiotické bakterie. Zároveň je věnována pozornost jejich vlivu na lidský organismus. Čím prospívají lidskému tělu a jak jejich množství můžeme v lidském organismu zvýšit. Práce pojednává také o možnostech využití probiotik v potravinářství.

V experimentální části bakalářské práce byla izolována DNA čisté bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 a *Bifidobacterium brevis* metodou fenolové extrakce. Z mléčné výrobky Activia bílá od výrobce Danone a jogurtu Jihočeský od firmy Madeta byla úspěšně izolována bakteriální DNA metodou magnetické separace i fenolové extrakce. Pomocí PCR byla v obou výrobcích prokázána přítomnost bakteriální DNA a DNA *Lactobacillus*. Ve výrobku Activia bílá byla zároveň potvrzena přítomnost bakteriální DNA *Bifidobacterium*. Získané výsledky byly v souladu s údaji o obsahu bakteriální kultur uvedených výrobců.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] FAO/WHO Joint Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, October 2001
- [2] PEDERSEN N.D., PhDr. Mark. *Probiotika*. Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=CnUTX1SgICk>
- [3] REID, G., J. JASS, M. T. SEBULSKY a J. K. MCCORMICK. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003, vol. 16, issue 4, s. 658-672. DOI: 10.1128/cmr.16.4.658-672.2003.
- [4] SANDERS, M. E., T. TOMPKINS, J. T. HEIMBACH, S. KOLIDA, Weight of evidence needed to substantiate a health effect for probiotics and prebiotics: Microbial Assemblages, Probiotics and Prebiotics. *European Journal of Nutrition*. 2004, vol. 44, issue 5, s. 419-442. DOI: 10.1002/9781118897263.ch16.
- [5] TANNOK, G.W. Probiotics and prebiotics: Scientific aspect. *Caister Academic Press, Norfolk, UK*. 2005, č. 230.
- [6] YAMAZAKI, S. a N. ISHIBASHI. Probiotics and safety. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001, 465–470
- [7] DE VRESE, M., A. STEGELMAN, B. RICHTER, S. FENSELAU, C. LAUE a J. SCHREZENMEIR. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *American Journal Clinical Nutrition*. 2001, 421–429.
- [8] KONINGS, W. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Current Opinion in Microbiology*. 2000, vol. 3, issue 3, s. 276-282. DOI: 10.1016/s1369-5274(00)00089-8.
- [9] ALMEIDA, M.H.B., S.S. ZOELLNER, A.G. CRUZ, M.R.L. MOURA, L.M.J. CARVALHO a A.S. SANT'ANA. Potentially probiotic açai yoghurt. *O International Journal of Dairy Technology*. 2008, 178-182.
- [10] CHAPMAN, C.M., G.R. GIBSON a I. ROWLAND. • Health benefits of probiotics: Are mixtures more effective than single strains?. *European Journal of Nutrition*. 2011, 1–17.
- [11] WEESE, J.S. a H. MARTIN. Assessment of commercial probiotic bacterial contents and label accuracy. *The Canadian Veterinary Journal*. 2011, 43-46.

[12] CHAPMAN, C.M., G.R. GIBSON a I. ROWLAND. Health benefits of probiotics: Are mixtures more effective than single strains?. *European Journal of Nutrition*. 2011, 1-17.

[13] MOMBELLI, B., GISMONDO, M.R..The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000, vol. 16, issue 4, s. 531-536. DOI: 10.1016/s0924-8579(00)00322-8.

[14] TANNIS, A. O Probiotic rescue: How you can use probiotics to fight cholesterol, cancer superbugs, digestive complaints and more. *John Wiley & Sons, Canada*

[15] GUARNER, F. a J.R. MALAGELADA. Bacterial flora of the digestive tract. *Gastroenterology and Hepatology*. 2003, 1–5.

[16] EJTAHED, H.S., J. MOHTADI-NIA, A. HOMAYOUNI-RAD, M. NIAFAR, M. ASGHARI-JAFARABADI, V.MOFID a A. AKBARIAN-MOGHARI. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus.*Journal of Dairy Science*. 2011, vol. 94, issue 7, s. 3288-3294. DOI: 10.3168/jds.2010-4128.

[17] SONGISEPP, E., T. KULLISAAR, P. HÜTT, P. ELIAS, T. BRILENE, M. ZILMER a M. MIKELSAAR. A New Probiotic Cheese with Antioxidative and Antimicrobial Activity. *Journal of Dairy Science*. 2004, vol. 87, issue 7, s. 2017-2023. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(04)70019-3.

[18] SANDERS, M. E. Summary of Probiotic Activities of *Bifidobacterium lactis* HN019. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2006, vol. 40, issue 9, s. 776-783. DOI: 10.1097/01.mcg.0000225576.73385.f0.

[19] OUWEHAND, A.C. Antiallergic effects of probiotics. *Journal of Nutrition*. 2007, 794–797

[20] DIBAISE, J.K. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clinic Proceedings*. 2008, 460–469.

[21] SOCCOL, C., et al. The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.*, 2010, 48, 413–434.

[22] PAVELKA, A. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. 1. vyd. Praha: Litera, 1996, 105 s. ISBN 80-857-6309-5.

[23] AWAISHEH, S. Probiotic Food Products Classes, Types, and Processing. In RIGOBELLO, E. (ed.). *Probiotics*. 1. vyd. Rijeka: InTech, 2012, s. 551–582.

[24] GILL, H.S., K.J. RUTHERFURD a M.L. CROSS. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *Journal of Clinical Immunology*. 2001, 264–271.

[25] TAKEDA, K., T. SUZUKI, S.-I. SHIMADA, K. SHIDA, M. NANNO a K. OKUMURA. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clinical and Experimental Immunology*. 2006, vol. 146, issue 1, s. 109-115. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03165.x.

[26] MUSSATTO, Solange I., Ismael M. MANCILHA a Joanne SLAVIN. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2007, vol. 68, issue 3, s. 125-147. DOI: 10.1007/978-94-017-1079-4_8.