

# 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

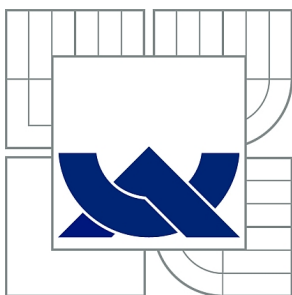
PROBIOTICKÉ BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ V POTRAVINOVÝCH  
VÝROBCÍCH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

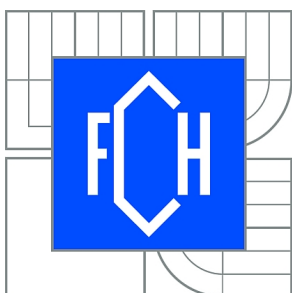
DENISA SÁSKOVÁ

BRNO 2013



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

# PROBIOTICKÉ BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ V POTRAVINOVÝCH VÝROBCÍCH

PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA IN FOOD PRODUCTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

DENISA SÁSKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2013



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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK0743/2012</b>	Akademický rok: <b>2012/2013</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Denisa Sásková</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	<b>doc. RNDr. Alena Španová, CSc.</b>	
Konzultanti:	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	

### Název bakalářské práce:

Probiotické bakterie mléčného kvašení v potravinových výrobcích

### Zadání bakalářské práce:

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

### Termín odevzdání bakalářské práce: 10.5.2013

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

-----  
Denisa Sásková  
Student(ka)

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

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

K identifikaci probiotických mikroorganismů jsou v potravinářství využívány molekulárně genetické metody, které jsou založeny na analýze DNA. Příkladem těchto metod je polymerázová řetězová reakce, při které dochází k amplifikaci specifických úseků DNA pomocí krátkých oligonukleotidových primerů.

Tato bakalářská práce se v teoretické části zabývá probiotickými bakteriemi, jejich vlastnostmi, příznivými účinky na zdraví a možnostech využití v potravinářství a klinických aplikacích. Experimentální část práce je zaměřena na analýzu dvou probiotických potravinových doplňků. Z těchto výrobků byla izolována DNA metodou fenolové extrakce. Pomocí PCR byla prokázána přítomnost DNA probiotických bakterií rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

## **ABSTRACT**

In food industry molecular genetic methods based on DNA analysis are used for identification of probiotic microorganisms. An example of these methods is the polymerase chain reaction, in which specific fragments of DNA are amplified using short oligonucleotide primers.

The theoretical part of this bachelor thesis follows probiotic bacteria, their features, beneficial health effects and use in food and clinical applications. The experimental part of the thesis focuses on an analysis of two probiotic dietary supplements. DNA was isolated from these products by method of phenol extraction. The use of PCR confirmed the presence of DNA of probiotic bacteria of genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

probiotika, bakterie mléčného kvašení, izolace DNA, PCR, doplňky stravy

## **KEYWORDS**

probiotics, lactic acid bacteria, DNA isolation, PCR, dietary supplements

SÁSKOVÁ, D. *Probiotické bakterie mléčného kvašení v potravinových výrobcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 43 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za odborné vedení, cenné připomínky a čas, který mi věnovala. Mé poděkování patří také panu doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za konzultace a rady při tvorbě této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za jejich podporu, trpělivost a povzbuzení.

# OBSAH

ÚVOD .....	7
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>8</b>
<b>1 Definice pojmu probiotikum .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Probiotické bakterie .....</b>	<b>9</b>
2.1 Bakterie mléčného kvašení .....	9
2.2 Probiotické vlastnosti bakterií.....	11
2.2.1 Výběr probiotických kmenů .....	11
<b>3 Využití probiotických bakterií v potravinářství.....</b>	<b>14</b>
3.1 Probiotické mléčné výrobky .....	14
3.1.1 Kysané mléčné výrobky a nápoje .....	14
3.1.2 Zmrzlina a mražené probiotické výrobky.....	15
3.2 Probiotické výrobky neobsahující mléko.....	16
3.2.1 Ovocné a zeleninové výrobky .....	16
3.2.2 Cereální probiotické výrobky .....	16
3.2.3 Probiotické masné výrobky .....	17
3.2.4 Probiotické čokolády .....	18
3.3 Probiotika jako doplňky stravy .....	18
<b>4 Klinické aplikace probiotik .....</b>	<b>19</b>
4.1 Průjmové onemocnění .....	19
4.2 Intolerance laktózy .....	19
4.3 Zánětlivé onemocnění střev a syndrom dráždivého tračníku .....	19
4.4 Kolorektální karcinom .....	20
4.5 Infekce vyvolaná <i>Helicobacter pylori</i> .....	20
4.6 Probiotická imunitní modulace .....	20
4.7 Hypocholesterolemické a antihypertenzní účinky .....	20
<b>5 Identifikace probiotických bakterií pomocí polymerázové řetězové reakce .....</b>	<b>22</b>
5.1 Komponenty PCR .....	23
<b>6 Cíl práce .....</b>	<b>24</b>
<b>II EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>25</b>
<b>7 Materiál a metody .....</b>	<b>25</b>
7.1 Použité probiotické potravinové doplňky .....	25

7.2	DNA kontrolních bakteriálních kmenů.....	25
7.3	Chemikálie .....	26
7.4	Roztoky .....	26
7.4.1	Roztoky pro lyzi bakteriálních buněk.....	26
7.4.2	Roztoky pro fenolovou extrakci .....	27
7.4.3	Komponenty pro PCR .....	27
7.4.4	Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu.....	27
7.5	Pomůcky a přístroje .....	28
7.6	Metody .....	28
7.6.1	Příprava hrubých lyzátů buněk .....	28
7.6.2	Izolace DNA fenolovou extrakcí .....	29
7.6.3	Srážení DNA etanolem .....	29
7.6.4	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA .....	29
7.6.5	Agarosová gelová elektroforéza bakteriální DNA .....	30
7.6.6	Polymerázová řetězová reakce .....	30
7.6.7	Detekce produktů PCR pomocí agarosové gelové elektroforézy .....	32
<b>8</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>33</b>
8.1	Izolace DNA z probiotických potravinových doplňků .....	33
8.2	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA .....	33
8.3	Polymerázová řetězová reakce.....	33
8.3.1	Důkaz přítomnosti bakteriální DNA.....	34
8.3.2	Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> .....	35
8.3.3	Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> .....	36
8.4	Shrnutí výsledků .....	37
<b>9</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>38</b>
9.1	Izolace DNA z potravinových doplňků .....	38
9.2	Polymerázová řetězová reakce.....	38
9.2.1	Důkaz přítomnosti bakteriální DNA.....	38
9.2.2	Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> .....	38
9.2.3	Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> .....	39
<b>10</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>40</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>41</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>43</b>

## ÚVOD

Jako probiotické bakterie jsou všeobecně označovány bakterie mléčného kvašení (BMK) a některé druhy rodu *Bifidobacterium*. Tyto bakterie v posledních desetiletích našly své uplatnění v potravinářském průmyslu při výrobě kysaných mléčných výrobků, sýrů, zmrzliny, masných výrobků a výrobků rostlinného původu či čokolády. V současné době je věnována probiotikům pozornost nejen při výrobě potravin nebo doplňků stravy, ale i z důvodu jejich klinických aplikací. Důvodem je skutečnost, že probiotika poskytují mnoho zdraví prospěšných účinků svému hostiteli, přispívají např. k udržení homeostázy organismu, zachování složení střevní mikroflóry, ochraně proti různým gastrointestinálním patogenům; významné jsou i jejich imunomodulační účinky.

K identifikaci probiotických mikroorganismů (MO) jsou v potravinářství využívány molekulárně genetické metody, které jsou založeny na analýze DNA. Mezi tyto metody patří i polymerázová řetězová reakce, která umožňuje selektivně amplifikovat specifický úsek DNA vymezený krátkými oligonukleotidovými primery.



# I TEORETICKÁ ČÁST

## 1 DEFINICE POJMU PROBIOTIKUM

Výraz „probiotikum” má své kořeny v řeckém jazyku a znamená „pro život”. V průběhu let, kdy bylo získáno více vědeckých poznatků a informací o působení probiotik na zdraví člověka, byl význam slova několikrát předefinován. [1] Koncepci probiotik vytvořil v roce 1908 Ilja Iljič Mečnikov, který zkoumal pozitivní vliv fermentovaných potravinových výrobků na lidské zdraví. [2]

Lilly a Stillwell v roce 1965 definovali probiotika jako látky produkované MO, které stimulují růst jiných MO. Parker předpokládal interakce mezi MO a hostitelským organismem. Dle jeho definice probiotika jsou látky pozitivně ovlivňující střevní mikroflóru hostitele. V roce 1989 Fuller výše uvedenou Parkerovu definici upřesnil a definoval probiotika jako živý mikrobiální potravinový doplněk příznivě ovlivňující hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiální rovnováhy. [1]

Z nejnovějších definic lze uvést například Naiduho formulaci nebo definici Schrezenmeiera a de Vrese, které uvádí Lee. [1] Naidu považuje probiotika za mikrobiální pomocné látky, které příznivě ovlivňují fyziologii hostitele modulací slizniční a systémové imunity a také zlepšují nutriční a mikrobiální rovnováhu střevního traktu. Schrezenmeier a de Vrese popsali probiotika jako přípravky obsahující dostatečné množství MO, které mění mikroflóru hostitele a tím příznivě ovlivňují jeho zdraví.

FAO/WHO [3] a Reid a kolektiv [4] se soustředili na význam probiotik pro zdraví. Uvádí, že probiotika jsou živé MO, které podávány v přiměřeném množství jsou prospěšné pro zdraví hostitele.

## 2 PROBIOTICKÉ BAKTERIE

Jako probiotické bakterie je možné označovat mnoho druhů různých rodů bakterií. Nejčastěji používané druhy patří do heterogenní skupiny bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií. Nicméně v průběhu posledních let i jiné MO, včetně kvasinek, byly popsány jako potenciální probiotika. Příkladem takových MO mohou být bakterie *Escherichia coli* Nissle 1917 nebo kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. [5]

### 2.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) tvoří heterogenní skupinu mikroorganismů, které jsou schopny fermentovat různé živiny za vzniku kyseliny mléčné. Jsou to hlavně grampozitivní, aerotolerantní nebo anaerobní bakterie, nesporulující a acidotolerantní. [6] BMK podle hlavních a vedlejších produktů vznikajících při fermentaci sacharidů se dělí na homofermentativní a heterofermentativní.

- **Homofermentativní** bakterie – fermentovaný sacharid přeměňují téměř výlučně na kyselinu mléčnou.
- **Heterofermentativní** bakterie – fermentovaný sacharid přeměňují na kyselinu mléčnou (>50 %), kyselinu octovou, CO<sub>2</sub> a za určitých okolností aj ethanol. [7]

Třídění BMK dle typu fermentace je uvedené v Tabulce 1.

**Tabulka 1:** Rody bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií, jejich fermentační typ a produkty (upraveno dle [8])

Rod	Typ fermentace	Hlavní produkty (molární poměry)	Konfigurace kyseliny mléčné
<i>Lactococcus</i>	homoferm.	laktát	L (+)
<i>Streptococcus</i>	homoferm.	laktát	L (+)
<i>Pediococcus</i>	homoferm.	laktát	DL, L(+)
<i>Lactobacillus</i>	homoferm.	laktát	
<i>Thermobacterium</i>	homoferm.	laktát	D (-), L (+), DL
<i>Streptobacterium</i>	homoferm. heteroferm.*	laktát laktát : acetát 1:1	D (-), L (+), DL
<i>Betabacterium</i>	heteroferm.	laktát: acetát : CO <sub>2</sub> 1:1:1	DL
<i>Leuconostoc</i>	heteroferm.	laktát: acetát : CO <sub>2</sub> 1:1:1	D (-)
<i>Bifidobacterium</i>	heteroferm.	laktát : acetát 2:3	D (+)

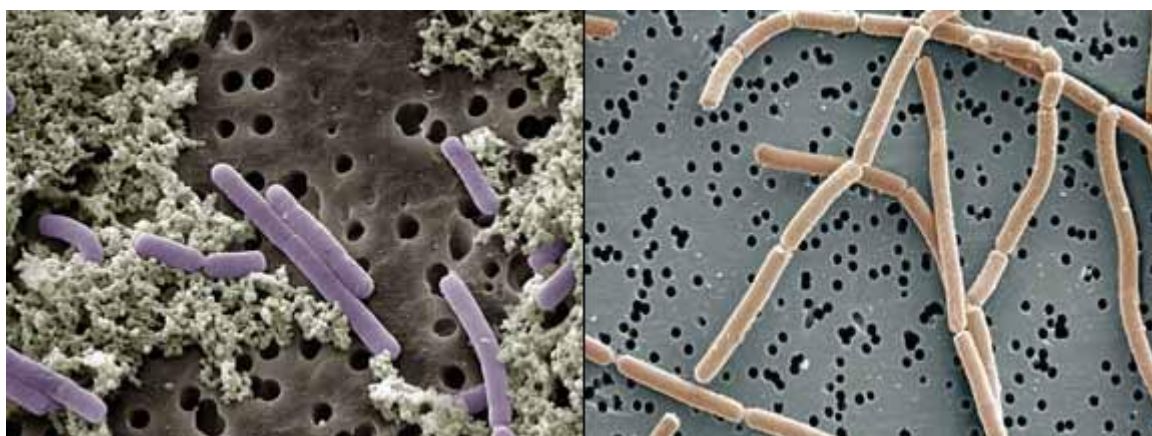
\* při fermentaci pentos

V současné době jsou do skupiny BMK řazeny rody *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*. [9] Mezi BMK bývaly řazeny i bifidobakterie (rod *Bifidobacterium*) patřící do vývojové větve aktinomycet. Jsou to tyčinky uspořádané ve tvaru písmena Y nebo V. Tyto bakterie se vyskytují v zaživacím traktu kojenců, ale i dospělých. [7] Taxonomické zařazení BMK a bifidobakterií je uvedené v Tabulce 2.

Z potravinářsko-mikrobiologického hlediska má skupina BMK nezanedbatelný potravinářsko-technologický význam. Zástupci náležící k této skupině se vyskytují v mléce a fermentovaných mléčných produktech. Nachází se v různých přírodních stanovištích, na intaktních a rozkládajících se rostlinách nebo v zaživacím traktu člověka i zvířat. [7] Na Obrázku 1 jsou uvedeny mikroskopické snímky buněk probiotického druhu *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus delbrüeckii* ssp. *bulgaricus*.

**Tabulka 2:** Taxonomické zařazení probiotických rodů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií (upraveno dle [7])

Rod	Doména	Kmen	Třída	Řád	Čeleď
<i>Lactobacillus</i>	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae
<i>Lactococcus</i>	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae
<i>Enterococcus</i>	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae
<i>Leuconostoc</i>	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae
<i>Streptococcus</i>	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae
<i>Pediococcus</i>	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae
<i>Bifidobacterium</i>	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae



**Obrázek 1:** *Lactobacillus casei* (vlevo),  
*Lactobacillus delbrüeckii* ssp. *bulgaricus* (vpravo) [10]

## 2.2 Probiotické vlastnosti bakterií

Probiotika poskytují řadu zdraví prospěšných účinků především zachováním rovnováhy a složení střevní mikroflóry, napomáháním obranyschopnosti organismu proti patogenům a zajištěním homeostázy hostitele. [11]

Bylo prokázáno, že činností probiotických mikroorganismů v zažívacím traktu se zkvalitňuje dostupnost, množství a stravitelnost některých živin získaných ze stravy. Je známé, že BMK uvolňují různé enzymy a vitaminy do střevního lumenu. Spolupracují tak na trávení a zmírňují příznaky střevní malabsorpce. Produkují kyselinu mléčnou, která snižuje hodnotu pH střevního obsahu a napomáhá inhibovat růst patogenních MO, jako jsou *Salmonella* nebo enteropatogenní kmeny *Escherichia coli*. Bakteriální enzymatická hydrolyza může také zvyšovat biologickou dostupnost proteinů a tuků a zesílit produkci volných aminokyselin, nenasycených mastných kyselin, kyseliny mléčné, kyseliny propionové a máselné. Bylo prokázáno, že použití vhodného kmene BMK v dostatečném množství může zmírnit příznaky intolerance laktózy. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a jiné laktobacily používané ve fermentovaných mléčných výrobcích produkují dostatek bakteriální laktázy do střeva a žaludku hostitele, kde je laktóza degradována. [12]

### 2.2.1 Výběr probiotických kmenů

Výběr mikroorganismu vhodného jako probiotikum je podmíněn mnoha různými faktory. Základní požadavky kladené na probiotické bakterie jsou uvedeny v Tabulce 3.

**Tabulka 3:** Základní požadavky kladené na probiotické bakterie (upraveno dle [5])

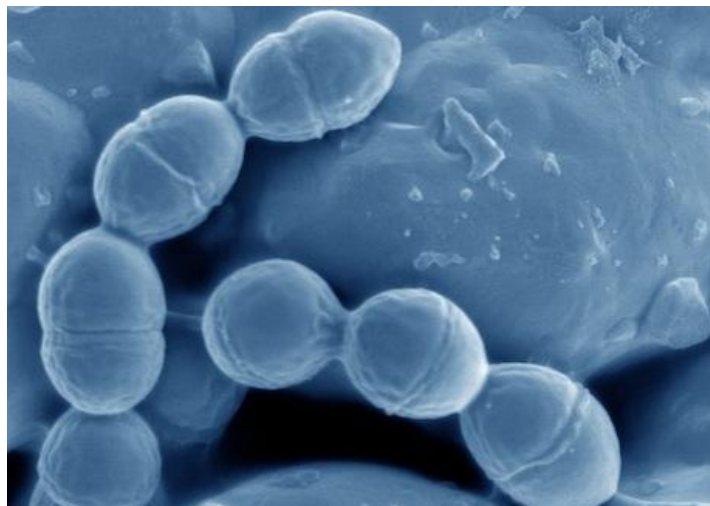
Vlastnost	Výhoda
Odolnost vůči pankreatickým enzymům, kyselinám a žluči	Přežití při průchodu intestinálním traktem
Adheze ke střevní sliznici	Imunitní modulace Vyloučení patogenů Urychlené hojení poškozené sliznice
Lidský původ	Specifické interakce s hostitelem
Dokumentované účinky na zdraví	Skutečné, vědecky prokázané zdravotní účinky
Bezpečnost	Žádná zdravotní rizika pro spotřebitele
Dobré technologické vlastnosti	Stabilita kmene ve výrobku Produkce v dostatečném množství Tolerance vůči kyslíku

Pro přežití během průchodu gastrointestinálním traktem (GIT) je důležitá odolnost bakterií vůči nízkému pH, žluči a pankreatickým enzymům. [5]

Přilnavost (adheze) ke střevní sliznici je důležitá pro imunitní modulace, vyloučení patogenů, urychlení hojení poškozené sliznice. [5] Adherentní kmeny probiotických bakterií přetrvávají delší dobu v zaživacím traktu a tím vykazují lepší metabolické a imunomodulační účinky než neadherentní kmeny. Adheze umožňuje interakci se slizničním povrchem. Tato interakce usnadňuje kontakt probiotika se střevním epitelem, jež zprostředkuje místní a systémové imunitní účinky. [13]

Lidský původ MO se považuje za důležitý pro specifické interakce s hostitelovými buňkami. Podávané MO musí být samozřejmě bezpečné. Tato vlastnost však často není specificky hodnocená. Laktobacily a bifidobakterie jsou považovány za bezpečné na základě jejich historicky dlouhodobého používání. Ačkoli se to může zdát nepravděpodobné, je obtížné posoudit bezpečnost obecně nepatogenních druhů. [5]

Potenciální probiotika musí mít také dobré technologické vlastnosti, aby mohly být kultivovány ve velkém množství, měly přijatelnou stabilitu ve výrobku a v případě použití ve fermentovaných produktech přispívaly k dobré chuti výrobku. Laktobacily jsou často odolné vůči stresům *in vivo* a některé kmeny mají dobré technologické vlastnosti. To může kromě historických důvodů vysvětlit jejich časté použití jako probiotika. Bifidobakterie jsou také běžně používány jako probiotika, i když méně často než laktobacily. Jsou citlivé na kyslík (jsou anaerobní), a mají proto přísnější požadavky na růst. Kvůli tomu jsou technologicky obtížněji použitelné. Ostatní probiotické bakterie, kromě propionových bakterií a enterokoků, obvykle nejsou používány ve fermentovaných výrobcích. Jsou využívány jako doplňky stravy ve formě prášků, kapslí, atd. [5] Na Obrázku 2 je uveden mikroskopický snímek bakteriálních buněk *Lactococcus lactis*, pořízený pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. [14]



**Obrázek 2:** *Lactococcus lactis* [14]

Nejvýznamnější komerčně využívané kmeny probiotických mikroorganismů jsou uvedeny v Tabulce 4.

**Tabulka 4:** Komerční kmeny probiotických mikroorganismů (upraveno dle [15])

<b>Mikroorganismus</b>	<b>Kmen</b>	<b>Mikroorganismus</b>	<b>Kmen</b>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC 15703	<i>Lactobacillus casei</i>	Shirota Immunitas®
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Bb-12	<i>Lactobacillus delbrüeckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i>	Lb 12
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Bb-11	<i>Lactobacillus fermentum</i>	RC-14
<i>Bifidobacterium breve</i>		<i>Lactobacillus helveticus</i>	B02
<i>Bifidobacterium essencis</i>		<i>Lactobacillus lactis</i>	L1A
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Shirota Immunitas®	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CRL 431
<i>Bifidobacterium lactis</i>	Bb-02 Lafti™ B94	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GG GR-1 LB21 271
<i>Bifidobacterium longum</i>	BB536 UCC 35624 SBT-2928	<i>Lactobacillus plantarum</i>	299v Lp01
<i>Enterococcus faecium</i>		<i>Lactobacillus reuteri</i>	SD2112/MM2
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA-1/LA-5 NCFM DDS-1 SBT-2062	<i>Lactobacillus salivarius</i>	
		<i>Saccharomyces boulardii</i>	

### 3 VYUŽITÍ PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ

Představa, že jídlo může sloužit jako lék, se objevila již před tisíci lety. Hippokrates, řecký filozof a „otec medicíny“, napsal: „Nechť je jídlo tvým lékem a tvůj lék nechť je tvým jídlem.“ V nedávné době byl znovuzrozen pojem potravin s léčivou hodnotou v podobě funkčních potravin. [15] Potravinu je možno považovat za funkční, pokud se dostatečně prokázalo, že kromě adekvátního nutričního účinku příznivě ovlivňuje jednu nebo více funkcí organismu a to zlepšováním zdravotního stavu a dobrého pocitu nebo snižováním rizika vzniku určitého onemocnění. [16] Funkční potraviny mohou vznikat například začleněním probiotik do potravinových matric. K výrobě jsou používány různé matrice, např. různé druhy sýrů, zmrzlina, mléčné dezerty, máslo, majonéza, práškové výrobky či kapsle a fermentované výrobky rostlinného původu. [15]

#### 3.1 Probiotické mléčné výrobky

Mléčné výrobky hrají důležitou roli ve výživě člověka již tisíce let. [17] V současné době jsou na celém světě vyráběny a spotřebovány stovky tun probiotických mléčných výrobků. Mezi typické příklady komerčních mléčných produktů patří pasterované mléko, jogurt, zmrzlina, kysaná mléka, sýry a kojenecké mléko. [18]

Mléko je vynikajícím přenašečem a ideálním dodavatelem probiotických bakterií, podporuje jejich růst a přežití v GIT. Životaschopnost probiotických kmenů ve fermentovaných mléčných výrobcích je ovlivněna antagonickou interakcí startovacích a probiotických kultur a také produkcí kyselin v těchto kysaných produktech. Kvůli těmto faktorům se na trhu objevily nefermentované probiotické mléčné výrobky jako je sýr a zmrzlina. [15]

##### 3.1.1 Kysané mléčné výrobky a nápoje

Prvními komerčními potravinami obsahujícími probiotika byly mléčné nápoje. Funkční mléčné nápoje mohou být rozděleny do dvou kategorií. První skupinou jsou fortifikované mléčné nápoje, obsahující probiotika, prebiotika, vlákninu, polyfenoly, peptidy, steroly, minerály, vitaminy a rybí tuk. Druhou kategorií tvoří syrovátkové nápoje. [18]

Nejvíce používaný bakteriální kmen při výrobě mléčných výrobků je kmen *Lactobacillus rhamnosus* GG, vhodný pro průmyslové aplikace z důvodu odolnosti proti žluči a kyselinám. Özer and Avnikirmaci jako nejvíce používané probiotické bakterie uvádí druhy *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* a *L. plantarum*. [18]

Jogurt je fermentovaný mléčný výrobek, kysaný tradičně při 42-45 °C. Moderní výroba jogurtu je dobře řízený proces, který v průběhu fermentace využívá jednotlivé složky mléka, sušené mléko, cukr, ovoce, různé příchutě a barvy, emulgátory, stabilizátory a čisté kultury *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Nedávno 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*. [17]

Kefír je oblíbený kysaný, alkoholický, mléčný produkt, původem z Kavkazu. Vyrábí se pomocí tzv. keřírových zrn, které drží pohromadě polysacharidová matrix zvaná keříran. Keřírová zrna vzhledem připomínají květák a obsahují komplexní směs bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), octových bakterií a kvasinek. Kvasinky jsou ve fermentaci keříru důležité z důvodu produkce ethanolu a CO<sub>2</sub>. Obvykle se jedná o laktózu fermentující kvasinky *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus* a *Tortula keříri* a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které laktózu nefermentují. Dominantními BMK v keříru jsou bakterie druhu *L. keříri* představující asi 80 % celkového počtu BMK. Zbýlých 20 % je tvořeno bakteriemi druhu *L. paracasei* ssp. *paracasei*, *L. acidophilus*, *L. delbrüeckii* ssp. *bulgaricus*, *L. plantarum* a *L. keříranofaciens*. [17]

Při fermentaci keříru vzniká kyselina mléčná, kyselina octová, CO<sub>2</sub>, ethanol a aromatické sloučeniny. Tyto látky dávají keříru jeho jedinečné senzorké vlastnosti: perlivost, kyselost, mírnou hořkost a osvěžující chuť. Keřír je bohatý také na vitaminy, minerály a esenciální aminokyseliny. Obsahuje vitaminy B1, B12, kyselinu listovou, vitamin K, biotin, vápník, hořčík, fosfor a z esenciálních aminokyselin např. tryptofan. Konzumace keříru má několik výhod: podporuje gastrointestinální trakt, má antibakteriální, protirakovinné, imunitní a hypocholesterolemické účinky. [17]

### 3.1.2 Sýry

Nositeli probiotik mezi mléčnými výrobky nejsou jenom jogurt a fermentované mléko, ale i další výrobky, například sýry. Sýry mají řadu výhod oproti jogurtům. Jsou vysoce výživné, mají vyšší puřovací kapacitu, nižší obsah vlhkosti a tím pevnější konzistenci, relativně vyšší obsah tuku a také delší dobu trvanlivosti (více než 3 měsíce). [18]

Probiotický sýr byl zaveden do výroby v roce 2006, kdy Danisco začal testovat růst a schopnost přežití probiotických kmenů v sýru. Test ukázal, že pouze méně než 10% bakterií zůstalo v syrovátce při produkci sýru. V současné době existuje více než 200 druhů komerčně prodávaných probiotických sýrů v různých formách: čerstvé, polotvrdé nebo tvrdé. [18] Jordanský měkký probiotický sýr se vyrábí z kozího mléka použitím bakterií druhů *L. acidophilus* a *L. reuteri*. K produkci sýrů čedarského typu se využívají bakterie druhů *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *B. infantis* a *Bifidobacterium* sp. [17] Pro výrobu sýrů s vysokodohřivanou sýřeninou (typ ementálský, parmazán) se používají termofilní BMK *Streptococcus thermophilus*, *L. delbrüeckii* ssp. *bulgaricus*, *L. delbrüeckii* ssp. *lactis* a *L. helveticus*. V souvislosti s termofilními sýrařskými zákysy se uvádí i použití homofermentativního druhu *L. casei*, který se ale podle optimální teploty růstu 30 °C neřadí mezi termofilní bakterie. [7]

### 3.1.3 Zmrzlina a mražené probiotické výrobky

Zmrzlina je mražený mléčný výrobek, který je velmi široce konzumován v různých částech světa. Rostoucí zájem spotřebitelů o zdraví prospěšné produkty vedl k zavedení nového typu zmrzlin na trh. Nové produkty byly vyvinuty začleněním probiotických kultur do zmrzliny. [19] Nízká skladovací teplota a složení zmrzliny (mléčné proteiny, tuk, laktóza a další sloučeniny) vedou k delší životnosti probiotických kultur v mražených mléčných produktech. Hodnota pH (5,5 až 6,5) zmrzliny rovněž napomáhá k lepšímu přežití probiotických bakterií. [15] Obecně platí, že nejpoužívanějšími BMK při výrobě



probiotických zmrzlin jsou druhy *L. reuteri*, *L. rhamnosus* a *L. gasseri* a *Bifidobacterium* sp., nicméně velmi málo informací bylo zveřejněno ohledně přežívání těchto bakterií během skladování. [19]

### 3.2 Probiotické výrobky neobsahující mléko

Jak již bylo zmíněno, hlavními nosiči probiotických bakterií jsou mléčné výrobky. Mléčné produkty mají ale i své nevýhody, jako je přítomnost alergenů, vysoký obsah laktózy a cholesterolu nebo zvýšené požadavky na skladování. Pro eliminaci těchto omezení byla snaha najít nová probiotika využitelná v nemléčných substrátech. Navíc, nárůst počtu vegetariánů ve vyspělých zemích vedl ke zvýšené poptávce po vegetariánských probiotických výrobcích. Proto se v minulých dvou desetiletích dostaly do obchodů nové probiotické bezmléčné produkty: ovocné a zeleninové výrobky, nemléčné nápoje, čokolády, obilné a masné výrobky. [17]

#### 3.2.1 Ovocné a zeleninové výrobky

Ovoce a zelenina jsou považovány za zdravé potraviny, protože jsou bohaté na minerály, vitaminy, vlákninu a antioxidanty. Na rozdíl od mléčných výrobků neobsahují alergeny, laktózu a cholesterol, které nepříznivě ovlivňují zdraví některých skupin populace. Nedávné pokroky v technologiích umožnily provádět kontrolované změny v ovocných a zeleninových maticích. Těmito změnami se ovoce a zelenina staly ideální maticí pro probiotické bakterie. Byly vyvinuty nové, zdraví prospěšné ovocné a zeleninové výrobky, jako jsou ovocné a zeleninové šťávy, sušené ovoce, kysané zeleniny či vegetariánské dezerty. [17]

Široký sortiment probiotických druhů bakterií, zejména z rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* jako *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* a *B. bifidum*, byl použitý ve vývoji mnoha ovocných a zeleninových produktů, hlavně šťáv. V průmyslové výrobě byly do těchto výrobků probiotické bakterie začleněny přímo nebo ve formě lyzátů. Tímto postupem byly bakterie vystaveny přímé expozici kyselého prostředí šťáv i dalším nepříznivým podmínkám a ztratily životaschopnost. Proto, na překonání těchto problémů, bylo doporučeno použití speciálního inokulačního systému, který umožňuje přidávat probiotika až do konečného produktu. [17] Další výzvou při vývoji probiotických šťáv byl vliv probiotických bakterií na sensorické vlastnosti, chuť a aroma šťáv. V šťávách s *L. plantarum* byly zjištěny nežádoucí kyselé a slané příchutě, nepříjemná vůně, mléčné aroma. Bylo zjištěno, že tyto vedlejší příchutě způsobené probiotiky mohou být maskovány přidáním 10% tropických šťáv, především ananasové, mangové nebo marakujové. [17]

#### 3.2.2 Cereální probiotické výrobky

Ačkoli nutriční hodnota cereálií je ve srovnání s mlékem a masem nižší, obilná zrna jsou pro velké skupiny lidí na celém světě stále považována za jeden z nejdůležitějších potravinových zdrojů bílkovin, sacharidů, vitaminů, minerálů a vlákniny. Navíc obilná zrna jsou dobrým zdrojem nestravitelných sacharidů, které kromě toho, že vykazují některé zdraví prospěšné účinky, působí také jako prebiotika stimulující růst laktobacilů a bifidobakterií v tlustém střevě. [17]

Cereálie jsou obvykle konzumovány v čerstvém nebo fermentovaném stavu. [17] Fermentace obilovin s probiotickými MO může vést k poklesu nestravitelných cukrů (poly- a oligosacharidy), zvýšení dostupnosti vitaminů skupiny B a také kvůli rozkladu fyátů (solí kyseliny fytové) ke zvýšení zastoupení minerálů (např. mangan, železo, zinek a vápník) v zrnech. [15]

Bylo zjištěno, že ovesné substráty jsou slibné pro růst druhů *L. reuteri*, *L. acidophilus* a *B. bifidum*. Kromě toho oves a ječmen jsou bohaté na  $\beta$ -glukany, o kterých se předpokládá, že mají hypocholesterolemické účinky. Boza je kyselý, nízkoalkoholický nápoj populární na Balkáně. Jedná se o fermentovaný nápoj, vyráběný z kukuřice, pšenice a dalších obilovin. Todorov a kolektiv (r. 2008) studovali mikroflóru bozy a ověřili přítomnost několika druhů BMK s probiotickými vlastnostmi. Rovněž bylo prokázáno, že sladové, pšeničné a ječmenné výtěžky zvyšují toleranci k žluči a životaschopnost bakterií *L. acidophilus*, *L. reuteri* a *L. plantarum*. Sója patří mezi vysoce výživné luskoviny, avšak nepříjemná chuť bobů a přítomnost oligosacharidů (např. stachiózy a rafinózy) mohou vést k nadýmání. Fermentace sóji BMK, kromě zlepšení chuti sójových produktů, může redukovat nadýmání, protože BMK jsou schopny hydrolyzovat vazby  $\alpha$ -1,6-galaktózy a uvolnit tak  $\alpha$ -D-galaktózu, která je již lépe stravitelná. Bylo testováno přežívání probiotik v sójovém mléce a bylo zjištěno, že tento substrát je účinný pro růst MO jako *L. casei*, *L. acidophilus*, *B. infantis* a *B. longum*. Fermentací sójového mléka pomocí BMK se může zvýšit antioxidační aktivita sójového mléka, což se využívá při výrobě probiotického sójového jogurtu. [15]

### 3.2.3 Probiotické masné výrobky

Jedním z nejvíce studovaných a zpracovaných probiotických masných výrobků jsou suché, fermentované salámy. Kvůli vysoké nutriční hodnotě a dalším vlastnostem je tento typ masného výrobku výborným nosičem probiotik pro člověka. Protože se jedná o fermentovaný, tepelně neopracovaný výrobek, využití probiotických bakterií obvykle nezmění jeho senzorické vlastnosti a také nedojde ke snížení životaschopnosti bakterií. Tyto fermentované produkty jsou vyráběny pomocí startovacích kultur BMK. V současné době se jako startovací kultury pro masový průmysl běžně používají bakteriální kmeny *L. gasseri* JCM1131, *L. casei* LC-01, *L. rhamnosus* FERM P-15120, *L. paracasei* ssp. *paracasei* FERM P-15121, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 a druhy *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *Pediococcus acidilactici* a *P. pentosaceus*. [17]

Použití kmenů probiotických bakterií dominantních pro maso umožňuje zajistit přítomnost vyššího počtu živých buněk v okamžiku spotřeby, což je nezbytným předpokladem pro zajištění příznivých účinků na hostitele. Dále bylo prokázáno, že aplikace probiotických startovacích kultur ve srovnání s tradičními kulturami poskytuje větší bezpečnost, lepší chuť a zdraví prospěšné účinky produktu. Pro fermentaci masa a zvýšení bezpečnosti výrobků jsou vhodné BMK druhů *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. johnsonii* a *L. gasseri*. [17]

### 3.2.4 Probiotické čokolády

Čokoláda je jedním z nejoblíbenějších produktů na celém světě díky své lahodné chuti, vysokému obsahu energie, rychlé metabolizaci a dobré stravitelnosti. Je již dlouho známo, že čokoláda ve své původní podobě zvyšuje mentální aktivitu, zlepšuje náladu, chuť k jídlu a prospívá zdraví srdce. Nicméně vysoký obsah cukru obsažený v běžných značkách čokolády vyvolal znepokojení, že její konzumace přispívá v západních průmyslových zemích k současné epidemii obezity, vzniku osteoporózy u starších žen a vzniku diabetu. Jeden z nejdůležitějších trendů ve výrobě čokolád vznikl na základě poptávky spotřebitelů po funkční či zdraví prospěšné čokoládě. Nové čokolády by měly podporovat zdraví, ale také odstranit nebo předejít onemocněním, jako jsou srdečné choroby, osteoporóza, rakovina, diabetes, atd. [17]

Čokoláda jako taková je funkční potravina, protože obsahuje dostatek polyfenolických antioxidantů a flavonoidů, které jsou prospěšné pro zdraví. V dnešní době výrobci funkčních potravin posilují a zvyšují zdraví prospěšné účinky čokolády začleněním probiotických bakterií do výrobků. Probiotické a symbiotické čokoládové krémy (pěny) byly doplněny kmenem *L. paracasei* ssp. *paracasei* LBC 82, samostatně nebo v kombinaci s prebiotickou složkou – inulinem. Bylo zjištěno, že během zpracování a skladování po dobu trvanlivosti krémů se růst a životnost bakterií *L. paracasei* neměnily. Proto byla čokoládová pěna uvedena na trh jako vynikající nosič probiotik. Ve výrobě probiotických čokoládových výrobků jsou využívány také bakteriální kmeny *L. rhamnosus* IMC 501, *L. helveticus* CNCM I-1722 a *B. longum* CNCMI-3470. [17]

### 3.3 Probiotika jako doplňky stravy

Trh probiotik ve formě doplňků stravy je mnohem rozmanitější a aktivnější než trh probiotik obsažených v mléčných výrobcích. Doplnky stravy se prodávají v mnoha různých podobách, např. ve formě kapslí, tablet nebo kapalin. V těchto výrobcích je zastoupeno široké spektrum probiotických bakterií, např. bakterií rodů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*; méně často bakterií rodů *Enterococcus*, *Bacillus*, nepatogenního druhu *Escherichia coli* a kvasinek. Nejvíce oblíbené formy doplňků stravy jsou kapsle a lyofilizované prášky. Každý probiotický přípravek musí obsahovat určitý minimální počet bakteriálních jednotek tvořících kolonie (KTJ). Dávky používané v terapeutických a preventivních studiích se značně liší, ale minimálně  $10^9$  až  $10^{10}$  KTJ je potřebné k dosažení pozitivního účinku probiotik na zdraví. [20]

## 4 KLINICKÉ APLIKACE PROBIOTIK

Existuje několik experimentálních důkazů podporujících potenciální klinické aplikace probiotik v prevenci a léčbě onemocnění zažívacího a urogenitálního traktu a dýchacích cest. Mezi doposud identifikované přínosy probiotických bakterií patří zachování normální střevní mikroflóry, ochrana proti gastrointestinálním patogenům, posílení imunitního systému, snížení intolerance laktózy, snížení hladiny sérového cholesterolu a krevního tlaku, protikarcinogenní aktivita, zlepšení využití živin a zkvalitnění nutriční hodnoty potravin. [11]

V terapeutických aplikacích byla probiotika použita na léčení urogenitálních onemocnění (kandidóza, vaginitída), zánětlivých onemocnění střeva a syndromu dráždivého tračníku, hypercholesterolémie, na ochranu před průjmem, proti rakovině tlustého střeva a močového měchýře, k prevenci osteoporózy, alergických a atopických onemocnění. [11]

### 4.1 Průjmové onemocnění

Mezi nejznámější oblasti použití probiotik patří prevence a léčba akutních virových a bakteriálních průjmů. Bylo prokázáno, že určité druhy BMK, *L. casei*, *L. reuteri*, *B. bifidum* a *S. thermophilus*, pomáhají předcházet nebo zmírňovat průjmové onemocnění působením na imunitní systém. Zabraňují infekci soutěžením s patogenními viry nebo bakteriemi o vazebná místa na epiteliálních střevních buňkách. Jsou přínosem při léčbě průjmu, cestovatelského průjmu a průjmových onemocnění u malých dětí způsobené rotaviry. [12]

### 4.2 Intolerance laktózy

Intolerance laktózy nebo přesněji porucha trávení laktózy je způsobená sníženou produkcí laktázy. Spotřeba laktózy vede k osmotickému zatížení tenkého střeva s následnou sekrecí tekutin, což způsobí únik stolice. Bylo zjištěno, že osoby s laktózovou intolerancí snášejí fermentované mléčné výrobky ve srovnání s mlékem mnohem lépe. To je vysvětleno tvorbou  $\beta$ -galaktosidázy bakteriemi mléčného kvašení. Kromě toho více viskózní kysané výrobky zapříčiňují delší gastrocékální tranzitní dobu bakterií, což také přispívá k lepšímu trávení laktózy. Tento prospěšný účinek je obvykle připsán výrobkům fermentovaným s využitím *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *S. thermophilus*. [5]

### 4.3 Zánětlivé onemocnění střev a syndrom dráždivého tračníku

Probiotika vykazují přímý účinek při léčbě zánětlivých a funkčních střevních poruch. [12] Mezi zánětlivé onemocnění střev patří Crohnova choroba (CD) a ulcerózní kolitida (UC). Jsou to nemoci ovlivňující zejména tlusté střevo (CD a UC) a/nebo distální části tenkého střeva (CD). Etiologie těchto onemocnění není zcela známa, ale důležitou roli hrají pravděpodobně genetická predispozice a složení střevní mikroflóry. [5]

BMK zlepšují pohyblivost střev a zabraňují zácpě pravděpodobně snížením pH střevního obsahu. Bylo pozorováno snížení počtu relapsů a prodloužení období remise u vybraných probiotik. Zajímavé je, že ne pouze BMK *L. salivarius* UCC118 a *L. rhamnosus* GG, ale také *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* a *E. coli* Nissle 1917 byly účinné při zmírňování symptomů zánětlivých onemocnění střev. [5]

Mezi nejčastější funkční střevní onemocnění patří syndrom dráždivého tračníku. Klinickými testy bylo prokázáno, že kmeny *Lactobacillus plantarum* 299v a *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 jsou schopny snižovat bolesti břicha, nadýmání a zácpu. [12]

#### **4.4 Kolorektální karcinom**

Bylo zjištěno, že strava s vysokým obsahem masa a tuku nebo s nízkým obsahem vlákniny působí změnu ve složení střevní mikroflóry. Roste počet bakteroidů a klostridií a snižuje se počet laktobacilů a bifidobakterií. Tato změna složení mikroflóry je spojena se zvýšenou aktivitou fekálních enzymů,  $\beta$ -glukuronidázy, azoreduktázy, ureázy, nitroreduktázy a reduktázy glykocholové kyseliny. Tyto enzymy způsobují přeměnu prokarcinogenů na karcinogeny a zvyšují tak riziko vzniku kolorektálního karcinomu. Bylo pozorováno, že konzumace vybraných laktobacilů snižuje tyto enzymové aktivity. Zda to snižuje i skutečné riziko vzniku kolorektálního karcinomu, nebylo zatím jednoznačně prokázáno. Epidemiologické studie ale naznačují, že pravidelná konzumace fermentovaných mléčných výrobků je spojena s nižším rizikem vzniku některých typů rakoviny. [5]

#### **4.5 Infekce vyvolaná *Helicobacter pylori***

Existují předběžné důkazy, že probiotické bakterie mohou inhibovat kolonizaci žaludeční sliznice a aktivitu *Helicobacter pylori*, který způsobuje gastritidu, žaludeční vředy a žaludeční rakovinu. V roce 1998 Aiba a kolektiv zjistili, že *L. salivarius* je schopen produkovat tak vysoké množství kyseliny mléčné, že inhibuje růst *H. pylori in vitro*. Bylo zjištěno, že čím více kyseliny mléčné *Lactobacillus* vytvoří, tím více poklesne ureázová aktivita *H. pylori*. Inhibice infekce *H. pylori* byla prokázána také u lidí konzumující *L. johnsonii*. [12]

#### **4.6 Probiotická imunitní modulace**

V současnosti je podrobně zkoumána imunitní funkce probiotik. Většina výsledků z *in vitro* systémů získaných na zvířecích a lidských modelech naznačuje, že probiotika jsou schopna posílit specifickou i nespecifickou imunitní odpověď organismu. [12]

Probiotické bakterie zprostředkují hostiteli složitý účinek v důsledku změny mikroflóry střevního lumenu, epiteliální a slizniční bariéry a ovlivněním mukózního imunitního systému. Těchto reakcí se účastní mnoho různých typů buněk, včetně epiteliálních a dendritických buněk, monocytů/makrofágů, B a T buněk a NK buněk. [21]

#### **4.7 Hypcholesterolemické a antihypertenzní účinky**

Cholesterol je látka zabezpečující funkci mnoha životně důležitých pochodů. Příliš vysoká hladina cholesterolu v krvi ale může způsobit ucpávání arterií a zvýšit riziko srdečních onemocnění a mozkových příhod. Různé studie se snaží prokázat hypocholesterolemický efekt fermentovaných výrobků a probiotik, zejména vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení. Účinkem probiotických bakterií dochází k rozkladu solí žlučových kyselin. Rozložené žlučové kyseliny neabsorbují lipidy tak snadno jako jejich konjugované ekvivalenty, což vede ke snížení hladiny cholesterolu. [22]

Klinické testy dokumentují antihypertenzní účinek probiotik nebo fermentovaných výrobků obsahující probiotické bakterie. U starších pacientů, kteří konzumovali fermentované mléko se startovací kulturou *L. helveticus*, bylo zjištěno snížení systolického a diastolického krevního tlaku. [12]

Existuje celá řada výrobků různých mezinárodních potravinářských společností, které využívají funkční potravinový potenciál mléčných bílkovin - hypotenzních a syrovátkových peptidů. Tyto produkty se vyskytují na trhu buď ve formě fermentovaných mléčných nápojů nebo hydrolyzátů mléčných bílkovin. [22]

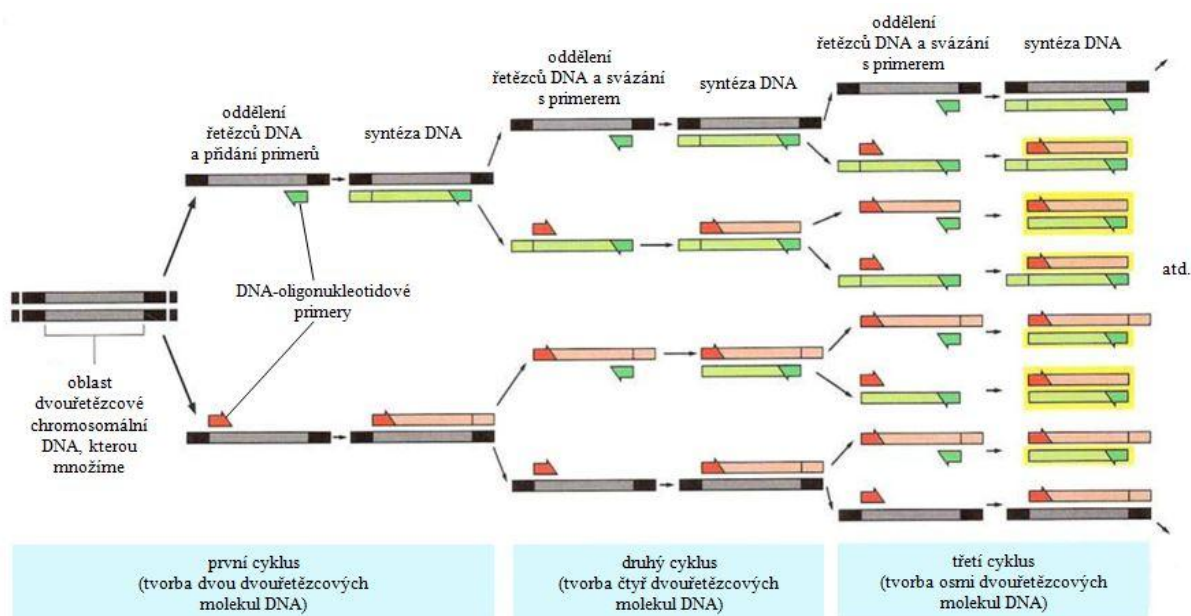
## 5 IDENTIFIKACE PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ POMOCÍ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE

Polymerázová řetězová reakce (PCR) a postupy na ní založené jsou ve výzkumných laboratořích nejvíce používanou molekulárně diagnostickou metodou. Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3' prostřednictvím DNA-polymerázy (Obrázek 3). Amplifikovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením (hybridizací) dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů a archeí, např. *Taq* DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus* odolávající teplotám, které jsou potřeba pro denaturaci DNA. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů.

PCR je proces, při němž v závislosti na teplotě reakční směsi ve více cyklech (30 až 40) se pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu:

- denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94 °C),
- připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (50 - 65 °C),
- syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (65 - 75°C)

Výsledným produktem PCR jsou amplikony – úseky DNA definované délkou o velikosti desítky až tisíce bp. Jejich přítomnost se v reakční směsi prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase. [23]



Obrázek 3: Princip polymerázové řetězové reakce (upraveno dle [25])

## 5.1 Komponenty PCR

Reakční směs (obvykle v množství 25 – 100  $\mu$ l) se skládá z následujících složek:

- **Matrice DNA (DNA templát)** – makromolekula DNA, podle které se komplementárně syntetizují nové řetězce DNA. Obsahuje cílová místa pro primery. Typická množství bakteriální a plasmidové DNA, přidávané do reakce, jsou 10 a 1 ng a 10 pg.
- **Oligonukleotidové primery** – bývají synteticky připravené a jsou komplementární k templátové DNA, která má být amplifikována. Typické primery jsou sekvenčně specifické, mají 18-30 nukleotidů a obsahují 40-60 % GC bází. Teplota tání primerů bývá v rozmezí 55-80 °C. Primery by neměly být mezi sebou komplementární, zejména ne na 3'-konci, kde párování dvou nebo tří bází může vést ke vzniku dimerů primerů, zejména při nadbytku primerů. Potřebná koncentrace každého primeru pro jednu reakci je 0,1-0,5  $\mu$ M.
- **DNA-polymeráza** – termostabilní DNA polymeráza, která syntetizuje novou DNA ve směru 5'→3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci DNA od 3' konce primeru.
- **2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dNTP)** – (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – stavební kameny pro syntézu nové DNA. Optimální koncentrace je 200  $\mu$ M, toleranční rozpětí je 20-400  $\mu$ M. Vysoké koncentrace dNTP (od 4mM a výše) působí inhibičně, protože vyvazují hořčičnaté ionty ( $Mg^{2+}$ ).
- **$Mg^{2+}$  ionty** – jsou nezbytné pro aktivitu DNA-polymerázy. Koncentrace  $Mg^{2+}$  musí být optimalizována pro každou kombinaci primerů a DNA templátu. Obvykle se používá koncentrace 1,5 mM  $Mg^{2+}$ . Toleranční rozpětí je 0,5-8,0 mM. Vyšší koncentrace iontů snižuje specifitu PCR. U primerů bohatých na G a C báze je vhodnější použití vyšší koncentrace  $Mg^{2+}$ .
- **Pufir pro PCR** – vytváří optimální prostředí pro DNA-polymerázu. Standardní reakční pufir obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3-8,8), 50 mM KCl a 1,5 mM  $MgCl_2$ . Případně může ještě obsahovat acetamid, albumin, želatinu nebo Tween 20.
- **Voda pro PCR** – používá se na doplnění směsi pro PCR na požadovaný objem. Nejvhodnější je voda o odporu 18 m $\Omega$  nebo voda pro injekce ČSL 4. [23]



## **6 CÍL PRÁCE**

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat přehled literatury o probiotických bakteriích, jejich účincích a využití v potravinových výrobcích a v klinických aplikacích.

Cílem experimentální části bakalářské práce byla izolace DNA v kvalitě vhodné pro polymerázovou řetězovou reakci ze dvou probiotických potravinových doplňků a pomocí PCR prokázat přítomnost probiotických bakterií deklarovaných výrobcem.

## II EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 7 MATERIÁL A METODY

#### 7.1 Použité probiotické potravinové doplňky

- **Biopron® FORTE**

Doplňěk stravy

Výrobce: VALOSUN a.s.

Kytnerova 403/5

621 00 Brno, Česká republika

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

Šarže: 31146

Datum spotřeby: 12/2013

Složení: *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, fruktooligosacharidy, inulin. Přídavné látky: želatina, oxid titaničitý (barvivo).

Deklarované množství buněk:  $10 \times 10^9$  CFU v denní dávce (2 kapsle)

- **APO - Lactobacillus ATB**

Doplňěk stravy

Výrobce: Profarma - Product s.r.o.

Liberecká 20

460 01 Jablonec nad Nisou

Šarže: LOT 5355

Datum spotřeby: 31.07.2014

Složení: *Lactobacillus (Lactobacillus casei (28 %), Lactobacillus rhamnosus (20 %), Lactobacillus acidophilus (15 %), Lactobacillus plantarum (10 %), Bifidobacterium breve (10 %), Lactococcus lactis ssp. lactis (5 %), Streptococcus thermophilus (5 %), Bifidobacterium longum (3 %), Bifidobacterium bifidum (2 %), Lactobacillus fermentum (2 %))*, Vaccinum macrocarpon – brusinkový extrakt (100 mg), fruktooligosacharidy, stearan hořečnatý, kyselina askorbová (vitamín C). Kapsle je složena se želatiny rostlinného původu a vody.

Deklarované množství buněk:  $12 \times 10^9$  v jedné kapsli

#### 7.2 DNA kontrolních bakteriálních kmenů

V průběhu práce jako pozitivní kontrola byla použita DNA z probiotických kmenů:

- *Clostridium tyrobutyricum* S5
- *Lactobacillus gasseri* K7
- *Bifidobacterium breve* CCM 3763

### 7.3 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- 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)
- Hydroxid sodný (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)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- RNáza A (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Serva, Heidelberg, SRN)

### 7.4 Roztoky

Roztoky byly připravovány podle skript Španové a Ritticha (2010). [23]

#### 7.4.1 Roztoky pro lyzi bakteriálních buněk

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

186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody za stálého míchání na magnetické míchačce. Pomocí NaOH bylo upraveno pH na 8,0. Roztok byl doplněn do objemu 1 l destilovanou vodou, rozdělen do alikvotních podílů a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C.

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

12,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 80 ml destilované H<sub>2</sub>O. pH roztoku bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 7,8. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do objemu 100 ml a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C.

- **Lyzační roztok A**

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

- **Lyzační roztok B**

K lyzačnímu roztoku A byl přidán lysozym na výslednou koncentraci 3,0 mg/ml.

- **20% SDS**

20 g SDS bylo rozpuštěno v 80 ml sterilní destilované vody při teplotě 68 °C. Roztok byl doplněn do 100 ml destilovanou vodou. Sterilizace roztoku nebyla nutná. Byl uchován při laboratorní teplotě.

- **Proteináza K (1 mg/ml)**

10 mg proteinázy K bylo rozpuštěno v 10 ml sterilní destilované vody. Roztok byl rozdělen do alikvotů a uchováván při teplotě -20 °C.

#### **7.4.2 Roztoky pro fenolovou extrakci**

- **Fenol**

Destilovaný fenol nasycený v TE pufru, pH 7,8.

- **CIZ**

Směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1.

- **3 M octan sodný (pH 5,2)**

V 800 ml destilované vody bylo rozpuštěno 408,1 g trihydrátu octanu sodného. pH roztoku bylo upraveno ledovou kyselinou octovou na hodnotu 5,2. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 1 000 ml a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C. Poté byl rozdělen do alikvotních podílů a uchován při teplotě 4 °C.

- **TE pufr**

Roztok byl připraven sterilně ze zásobních roztoků 1M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5M EDTA (pH 8,0). Byl smíchán 1 ml Tris-HCl (pH 7,8), 200 µl EDTA (pH 8,0) a 98,8 ml destilované vody.

#### **7.4.3 Komponenty pro PCR**

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)

- 10×PCR Blue Buffer (PCR reakční pufr kompletní, obsahující MgCl<sub>2</sub>) (Top-Bio, Praha, ČR)

- Směs dNTP (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)

- Primery (10 pmol/µl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)

- Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/µl) (Top-Bio, Praha, ČR)

#### **7.4.4 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu**

- **0,5 × TBE pufr**

54 g Tris-base a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněno destilovanou vodou do 1000 ml. Před použitím byl TBE pufr 10x naředěn na výslednou koncentraci.

- **Barvicí lázeň**  
100 µl roztoku ethidiumbromidu (5 mg/ml) bylo zředěno 500 ml destilované vody.
- **DNA standard**  
100 bp žebříček (Malamité, Moravské Prusy, ČR), obsahuje fragmenty DNA o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp.
- **Nanášecí pufr Yellow load** (6x koncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR)
- **Fluorescenční barvivo GoldView** (Ecoli, Bratislava, SR)

## 7.5 Pomůcky a přístroje

- Centrifuga MINI Spin 13 400 min<sup>-1</sup> (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Digitální fotoaparát Nikon Coolpix S620
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 2320 (SENCOR, ČR)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, New Jersey, USA)
- NanoPhotometer (Implen, München, Německo)
- Hybridizační pec Micro Hybridization Incubator 2000 (Sci Gene, Sunnyvale, USA)
- Thermocycler PTC – 200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Transilluminator TVR-3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy – Cast, model B1 (Owl Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Běžné laboratorní sklo, umělohmotný materiál a běžné laboratorní pomůcky

## 7.6 Metody

Uvedené postupy byly prováděny podle skript Španové a Ritticha (2010) [23], částečně modifikované dle doporučení doc. RNDr. Aleny Španové, CSc.

### 7.6.1 Příprava hrubých lyzátů buněk

- Z každého výrobku byly sterilně odebrány 3 kapsle. Kapsle byly otřeny ethanolem a rozebrány. K prášku z kapslí byl přidán lyzační roztok B s lysozymem (5 ml na 1 g prášku). Vzorokly byly důkladně resuspendovány a inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 1 hod.
- Následně bylo k 500 µl vzorku každé kapsle přidáno 25 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K (100 µg/ml). Vše bylo důkladně promícháno a ponecháno k inkubaci po dobu 1 hod při 55 °C.
- Hrubé lyzáty buněk byly uchovány při -20 °C, aby se předešlo možné degradaci DNA.

### 7.6.2 Izolace DNA fenolovou extrakcí

- K 500  $\mu\text{l}$  hrubého lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu. Směs byla kývavým pohybem opatrně promíchávána po dobu 4 minut.
- Vzorky byly centrifugovány při 13 400 ot/min po dobu 3 minut.
- Po centrifugaci byla odebrána vodná fáze do čisté Eppendorfovy zkumavky.
- K vodní fázi s DNA bylo přidáno 700  $\mu\text{l}$  směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1) a směs byla promíchána kývavým pohybem po dobu 4 minut.
- Vzorky byly centrifugovány při 13 400 ot/min po dobu 3 minut.
- Nakonec byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky.

### 7.6.3 Srážení DNA etanolem

- Ke vzorku DNA (přibližně 200  $\mu\text{l}$ ) byla přidána 1/20 objemu 3 M octanu sodného a vzorek byl promíchán.
- Následně bylo přidáno 800  $\mu\text{l}$  96% ethanolu, směs byla promíchána a DNA byla srážena při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 15 minut.
- Směs byla centrifugována při 13 400 otáčkách po dobu 15 minut a po centrifugaci byl supernatant opatrně slit.
- Sediment DNA byl vysušen v exikátoru po dobu asi 20 min.
- DNA izolovaná z kapslí výrobku APO- Lactobacillus ATB byla rozpuštěna v 100  $\mu\text{l}$  TE pufru, DNA z výrobku Biopron<sup>®</sup> FORTE byla rozpuštěna v 50  $\mu\text{l}$  TE pufru.
- Takto připravená DNA byla použita pro spektrofotometrické měření a pro rodově specifickou PCR.

### 7.6.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

- Koncentrace izolované DNA byla měřena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoPhotometer. Jako referenční vzorek byl použit TE pufr.
- V závislosti na očekávané koncentraci DNA bylo vybráno víčko (lid) s odpovídajícími parametry pro NanoPhotometer jak je uvedeno v Tabulce 5.
- Byla měřena absorbance v rozmezí vlnových délek 220 - 320 nm. Z hodnoty absorbance  $A_{260}$  byla stanovena koncentrace DNA, z poměru hodnot  $A_{260}/A_{280}$  byla určena čistota DNA.

*Tabulka 5: Parametry pro NanoPhotometer*

Označení víčka	lid 10	lid 50
Optická dráha (nm)	1	0,2
Objem vzorku ( $\mu\text{l}$ )	3 - 5	0,7 - 4
Měřitelný rozsah DNA (ng/ $\mu\text{l}$ )	14 - 700	250 - 400

### 7.6.5 Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA

- Do Erlenmayerovy baňky byl připraven 0,8 % agarózový gel z 0,4 g agarózy a 50 ml 0,5× TBE pufru. Směs byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě a po vychladnutí asi na 60 °C nalita do vaničky s hřebínkem, kde byla ponechána 30 minut ke ztuhnutí. Po ztuhnutí gelu byl odstraněn hřebínek.
- Na polyethylenové podložce bylo smícháno 15 µl DNA s 3 µl nanášecího pufru. Směs byla nanesena do komůrky gelu.
- Vanička s gelem byla vložena do elektroforetické vany a převrstvena 0,5× TBE pufrem.
- Elektroforéza probíhala při napětí 60 V cca 1 hodinu.
- Po skončení elektroforézy byl gel barven v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml) po dobu 30 minut. Obarvený gel byl pozorován na transiluminátoru v UV světle.

### 7.6.6 Polymerázová řetězová reakce

- Všechny komponenty PCR reakce byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány.
- Bylo připraveno 25 µl směsi pro PCR s DNA matricí ze všech vzorků. Směs pro PCR byla namíchána v boxu vyzářeném UV lampou. Komponenty pro PCR byly smíchány v pořadí uvedeném v Tabulce 6 do 200 µl Eppendorfových zkumavek.
- Byla připravena negativní kontrola, kdy místo 1 µl DNA matrice byl k 24 µl PCR směsi přidán 1 µl vody pro PCR.
- Byla připravena pozitivní kontrola, která obsahovala DNA matrici (10 ng/µl) bakteriálního kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5, *Lactobacillus gasseri* K7, *Bifidobacterium breve* CCM 3763.
- Vzorky obsahující všechny složky PCR směsi byly po promíchání a krátké centrifugaci umístěny do termocykleru, na kterém byl nastaven specifický amplifikační program dle Tabulky 7.
- Po skončení PCR reakce byly vzorky použity pro detekci produktů PCR pomocí gelové elektroforézy na 1,8% agarózovém gelu.

**Tabulka 6:** Složení směsi pro PCR

Pořadí	Komponenta	Objem [µl] pro PCR		
		<i>Bacteria</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>
1.	Voda pro PCR	16,5	16,5	16,5
2.	10× reakční pufr kompletní	2,5	2,5	2,5
3.	Směs dNTP (10 mM)	1,0	1,0	1,0
4.	primery (10 pmol/µl)	1,0	1,0	1,0
5.	primery (10 pmol/µl)	1,0	1,0	1,0
6.	<i>Taq</i> DNA-polymeráza (1U/ µl)	2,0	2,0	2,0
7.	Matrice DNA (10 ng/µl)	1,0	1,0	1,0

**Tabulka 7: Seznam amplifikačních programů**

Doména <i>Bacteria</i> program EUBACTER			Rod <i>Lactobacillus</i> program LBC ROD			Rod <i>Bifidobacterium</i> program BIFI 914		
94 °C	5 min	30 cyklů	94 °C	5 min	30 cyklů	94 °C	5 min	40 cyklů
94 °C	30 s		94 °C	30 s		94 °C	1 min	
55 °C	30 s		55 °C	30 s		50 °C	1 min	
72 °C	1 min		72 °C	1 min		72 °C	2 min	
72 °C	5 min		72 °C	5 min		72 °C	10 min	

### PCR pro doménu *Bacteria*

Pro doménu *Bacteria* byla použita PCR s primery F eub a R eub. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 8.

**Tabulka 8: Specifické primery pro doménu *Bacteria* [26]**

Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR
F eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp
R eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	

### PCR specifická pro rod *Lactobacillus*

PCR byla provedena s primery LbLMA 1 a R 16-1 specifických pro rod *Lactobacillus*. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 9.

**Tabulka 9: Specifické primery pro rod *Lactobacillus* [23]**

Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR
LbLMA1-	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250 bp
R16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA	

### PCR specifická pro rod *Bifidobacterium*

Pro rod *Bifidobacterium* byla provedena PCR s primery Pbi F1 a Pbi R2. Jejich sekvence je uvedena v Tabulce č. 10.

**Tabulka 10: Specifické primery pro rod *Bifidobacterium* [23]**

Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR
Pbi F1	CCGGAATAGCTCC	914
Pbi R2	GACCATGCACCACCTGTGAA	



### 7.6.7 Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy

- Do Erlenmayerovy baňky byl připraven 1,8 % agarózový gel z 1,8 g agarózy a 100 ml 0,5× TBE pufru. Směs byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě, po vychladnutí asi na 60 °C bylo ke směsi přidáno 5 µl fluorescenčního barviva GoldView.
- Směs byla nalita do vaničky s hřebínkem, kde byla ponechána 30 minut ztuhnout. Po ztuhnutí gelu byl odstraněn hřebínek.
- Produkty PCR byly promíchány a krátce centrifugovány. Ke každému produktu PCR bylo přidáno 5 µl nanášecího pufru.
- Do komůrky gelu bylo nanášeno vždy 15 µl směsi produktu PCR a nanášecího pufru. Do jedné z komůrek bylo nanášeno 5 µl DNA standardu (100 bp žebříček).
- Vanička s gelem byla vložena do elektroforetické vany a převrstvena 0,5x TBE pufrem.
- Elektroforéza probíhala při napětí 80 V cca 2 - 2,5 hodiny.
- Po skončení elektroforézy byl gel pozorován na transiluminátoru v UV světle.

## 8 VÝSLEDKY

### 8.1 Izolace DNA z probiotických potravinových doplňků

Hrubé lyzáty buněk byly připraveny z obou probiotických výrobků dle kapitoly 7.6.1. Z každého výrobku byly použity tři kapsle. Z každé kapsle byl připraven hrubý lyzát buněk. Vzorky lyzátů buněk byly uchovávány při -20 °C, aby se předešlo možné degradaci DNA.

Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk byla provedena metodou fenolové extrakce podle postupu uvedeného v kapitole 7.6.2. Přítomnost a relativní intaktnost DNA byla ověřena pomocí agaróзовé gelové elektroforézy podle postupu uvedeného v kapitole 7.6.5.

→ Byla izolovaná DNA v částečně degradované formě.

### 8.2 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

U všech vzorků s DNA izolované fenolovou extrakcí byla spektrofotometricky změřena absorbance v rozmezí vlnových délek 220-320 nm a stanovena koncentrace a čistota DNA dle postupu uvedeného v kapitole 7.6.4. Výsledky spektrofotometrického stanovení jsou uvedeny v Tabulce 11.

*Tabulka 11: Spektrofotometrické stanovení bakteriální DNA*

Výrobek	DNA č.	A <sub>230nm</sub>	A <sub>260nm</sub>	A <sub>280nm</sub>	A <sub>320nm</sub>	A <sub>260nm/280nm</sub>	c [ng/μl]	Objem vzorku [μl]	DNA [μg]
Biopron <sup>®</sup> FORTE	1	0,43	0,63	0,43	0,00	1,46	1563	50	78,15
	2	0,35	0,49	0,34	0,00	1,46	1217	50	60,85
	3	0,22	0,20	0,14	0,00	1,41	503	50	25,15
APO - Lactobacillus ATB	1	1,22	1,51	0,91	0,07	1,71	717	100	71,70
	2	1,01	1,15	0,72	0,09	1,67	532	100	53,20
	3	1,17	1,25	0,805	0,08	1,64	582	100	58,20

→ Z kapslí výrobku Biopron<sup>®</sup> FORTE byla izolována DNA o koncentraci 503 až 1563 ng/μl. Z kapslí výrobku APO - Lactobacillus ATB byla izolována DNA o koncentraci 532 až 717 ng/μl.

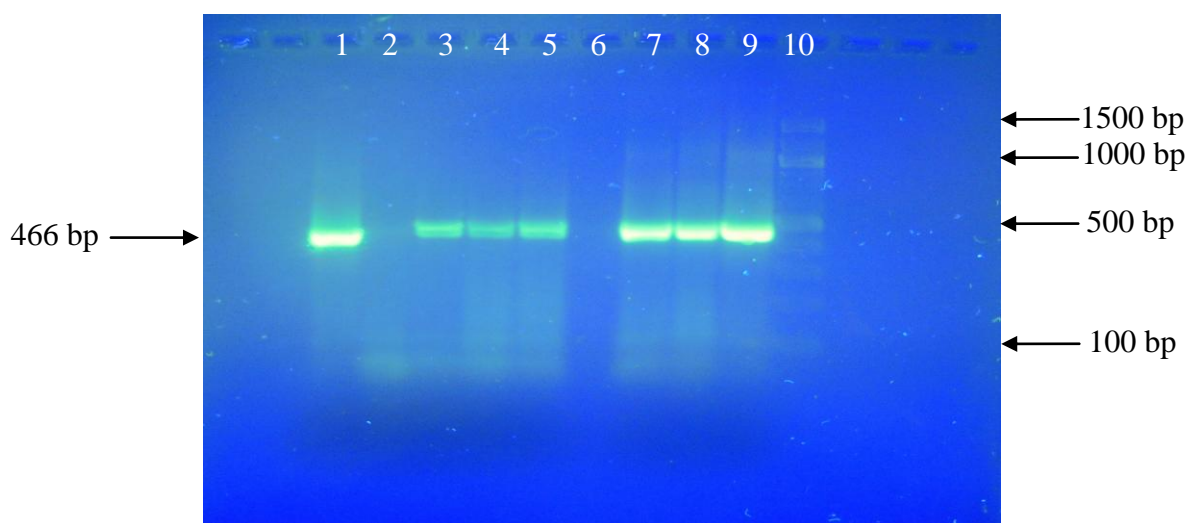
### 8.3 Polymerázová řetězová reakce

Po změření koncentrace byly vzorky DNA naředěné na koncentrace 10 ng/μl. Tím byly vzorky připravené na použití pro amplifikaci v PCR.

### 8.3.1 Důkaz přítomnosti bakteriální DNA

Přítomnost bakteriální DNA byla ověřena metodou PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* dle postupu uvedeného v kapitole 7.6.6. Byl amplifikován specifický produkt PCR – úsek o délce 466 bp. Výsledky PCR jsou uvedeny na Obrázku 4. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA bakteriálního kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (10 ng/μl).

**Obrázek 4:** Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria* (466 bp). Amplifikován byl 1 μl DNA izolované z probiotických preparátů ve třech opakováních.



Běh	Výrobek	DNA	Detekce produktu PCR
1		Pozitivní kontrola	+++
2		Negativní kontrola	–
3	<b>Biopron FORTE</b>	1	++
4		2	++
5		3	++
6			+
7	<b>APO - Lactobacillus ATB</b>	1	+++
8		2	+++
9		3	+++
10		DNA standard	

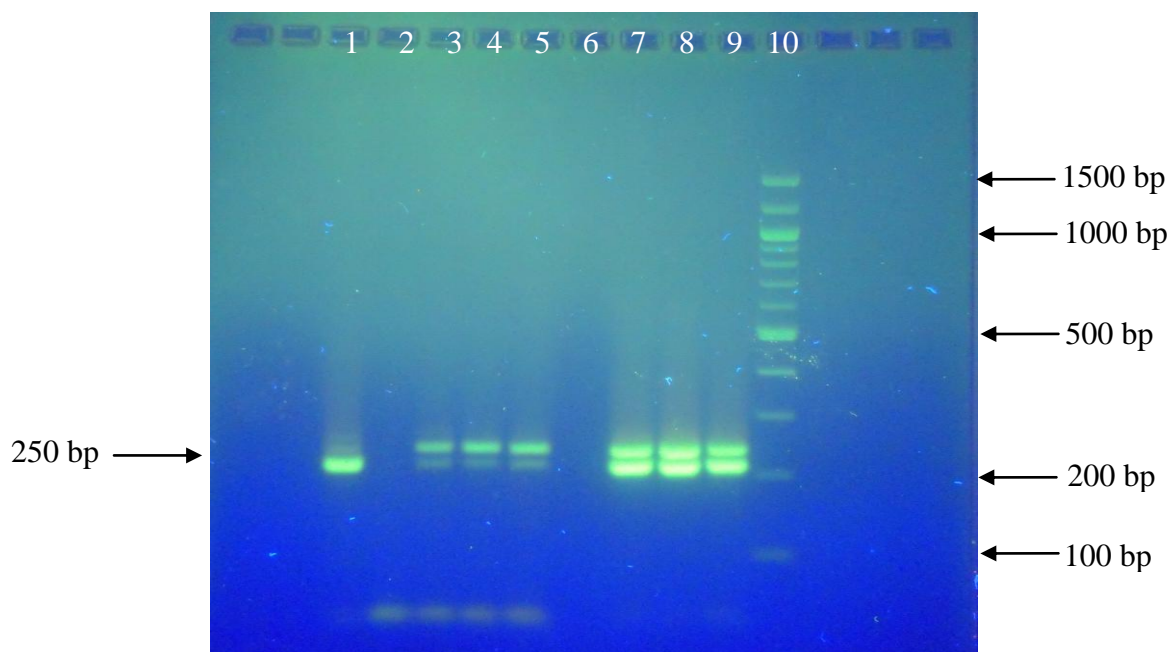
Detekce produktu PCR  
 +++ silná  
 ++ zřetelná  
 + slabá  
 – nedetegován

→ Byla izolována DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Po amplifikaci všech DNA byly prokázány specifické produkty PCR pro doménu *Bacteria*. Produkty PCR byly různé intenzity.

### 8.3.2 Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Lactobacillus*

Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Lactobacillus* byl proveden metodou PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*. Postup práce je uveden v kapitole 7.6.6. Byl amplifikován specifický úsek o délce asi 250 bp v závislosti na druhu. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA bakteriálního kmene *Lactobacillus gasseri* K7 (10 ng/μl). Výsledky PCR jsou uvedeny na Obrázku 5.

**Obrázek 5:** Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* (asi 250 bp). Amplifikován byl 1 μl DNA izolované z probiotických preparátů ve třech opakováních.



Běh	Výrobek	DNA	Detekce produktu PCR
1		Pozitivní kontrola	+++
2		Negativní kontrola	–
3	Biopron FORTE	1	++
4		2	++
5		3	++
6			
7	APO - Lactobacillus ATB	1	+++
8		2	+++
9		3	+++
10		DNA standard	

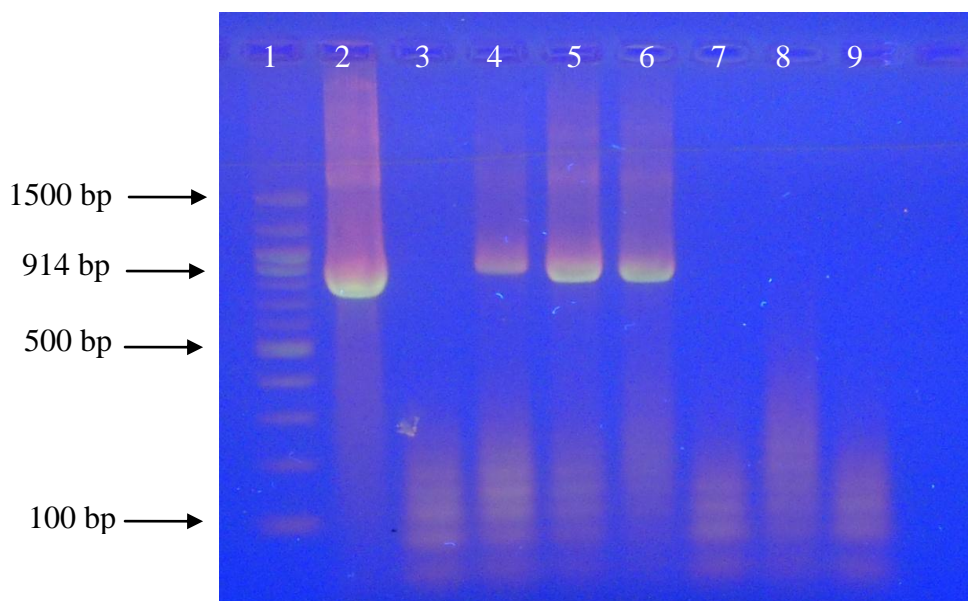
Detekce PCR produktu  
 +++ silná  
 ++ zřetelná  
 + slabá  
 – nedetegován

→ Po amplifikaci všech DNA byly ve všech vzorcích prokázány specifické produkty PCR pro rod *Lactobacillus*. Produkty PCR byly různé intenzity. Částečně se odlišovaly svou velikostí v závislosti na druhu.

### 8.3.3 Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Bifidobacterium*

Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Bifidobacterium* byl proveden metodou PCR s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium* dle postupu uvedeného v kapitole 7.6.6. Výsledky PCR jsou uvedeny na Obrázku 6. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA bakterie *Bifidobacterium breve* CCM 3763 (10 ng/μl).

**Obrázek 6:** Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Bifidobacterium* (914 bp). Amplifikován byl 1 μl DNA izolované z probiotických preparátů ve třech opakováních.



Běh	Výrobek	DNA	Detekce produktu PCR
1		DNA standard	
2		Pozitivní kontrola	+++
3		Negativní kontrola	–
4	APO - Lactobacillus s ATB	1	+
5		2	++
6		3	++
7	Biopron FORTE	1	–
8		2	–
9		3	–

Detekce PCR produktu

+++ silná

++ zřetelná

+ slabá

– nedetegován

→ Produkty PCR specifické pro rod *Bifidobacterium* byly detegovány po amplifikaci DNA z probiotického potravinového doplňku APO - Lactobacillus ATB. Produkty byly různé intenzity. Po amplifikaci DNA z výrobku Biopron FORTE nebyly produkty PCR detegovány.

## 8.4 Shrnutí výsledků

V Tabulce 12 jsou srovnány výsledky detekce přítomnosti probiotických rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* v potravinových doplňcích s údaji deklarovanými výrobcem.

**Tabulka 12:** Srovnání složení deklarovaného výrobcem s detekcí metodami PCR

<b>Výrobek</b>	<b>Rod</b>	<b>Deklarované výrobcem</b>	<b>Detekce metodou PCR</b>
<b>Biopron FORTE</b>	<i>Lactobacillus</i>	+	+
	<i>Bifidobacterium</i>	–	–
<b>APO - Lactobacillus ATB</b>	<i>Lactobacillus</i>	+	+
	<i>Bifidobacterium</i>	+	+

+ Přítomnost bakterií detegována

– Přítomnost bakterií nedetegována

→ Přítomnost probiotických bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* byla v analyzovaných potravinových doplňcích detegována v souladu s údaji deklarovanými výrobcem.

## 9 DISKUZE

### 9.1 Izolace DNA z potravinových doplňků

DNA ze dvou probiotických potravinových doplňků (Biopron FORTE a APO - Lactobacillus ATB) byla izolována metodou fenolové extrakce s následným vysrážením ethanolem. Jedná se o metodu izolace DNA v kvalitě vhodné pro molekulárně genetické aplikace. [23] Podle provedené gelové elektroforézy bylo zjištěno, že izolovaná DNA byla částečně degradovaná. Částečná degradace DNA nemusí být na závadu. Pro použití v metodě PCR DNA však nesmí obsahovat inhibitory PCR. [23]

Pro zjištění koncentrace a čistoty bakteriální DNA byla změřená absorbance na NanoPhotometru v rozmezí vlnových délek 230 – 320 nm. Čistota DNA byla stanovena z poměru absorbancí  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ . Tento poměr DNA se pohyboval v rozmezí hodnot od 1,41 do 1,71, přičemž DNA izolovaná z výrobku Biopron FORTE byla více znečištěná než DNA izolovaná z výrobku APO - Lactobacillus ATB. Hodnota  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,8$  značí silné znečištění DNA bílkovinami [23]. Koncentrace DNA byla stanovena z hodnoty  $A_{260\text{nm}}$  a pohybovala se u výrobku Biopron FORTE v rozmezí od 503 do 1563 ng/μl a v případě výrobku APO - Lactobacillus ATB v rozmezí od 532 do 717 ng/μl. Množství probiotik je důležité pro dosažení pozitivního účinku na zdraví. [20] Velké rozmezí koncentrací DNA z jednoho výrobku mohlo být způsobeno například nerovnoměrným rozložením probiotických bakterií do jednotlivých kapslí při výrobě potravinových doplňků. Po změření koncentrace byla DNA naředěna na 10 ng/μl a dále použita k amplifikaci v polymerázové řetězové reakci. Ředěním DNA se ředily i přítomné inhibitory PCR. [23]

### 9.2 Polymerázová řetězová reakce

#### 9.2.1 Důkaz přítomnosti bakteriální DNA

DNA byla izolována v kvalitě vhodné pro PCR. To bylo ověřeno jejím použitím v PCR jako matrice. Stejně výsledky byly dosaženy i jinými autory. [27] Přítomnost bakteriální DNA byla prokázána ve všech vzorcích potravinových doplňků pomocí PCR pro doménu *Bacteria* se specifickými primery F-eub a R-eub podle programu EUBACTER. Po amplifikaci byly agarózovou gelovou elektroforézou na 1,8 % agarózovém gelu detegovány specifické produkty PCR o velikosti 466 bp. Produkty PCR byly různě intenzivní. To lze vysvětlit různým množstvím DNA v směsích PCR.

#### 9.2.2 Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Lactobacillus*

Přítomnost DNA bakterií rodu *Lactobacillus* byla prokázána pomocí rodově specifické PCR se specifickými primery LbLMA1-rev a R16-1 podle programu LBC ROD. Po amplifikaci byly gelovou elektroforézou na 1,8 % agarózovém gelu detegovány produkty PCR, které se částečně liší svou velikostí v závislosti na druhu. [28] Tím se potvrdilo, že analyzované vzorky probiotických doplňků stravy obsahují různé druhy zástupců rodu *Lactobacillus*.

### **9.2.3 Důkaz přítomnosti DNA bakterií rodu *Bifidobacterium***

Amplifikace DNA rodově specifickou PCR pro rod *Bifidobacterium* byla provedena s využitím rodově specifických primerů Pbi F1 a Pbi R2 podle programu BIFI 914. [29] Produkty PCR o velikosti 914 bp byly detegovány agarózovou gelovou elektroforézou na 1,8 % agarózovém gelu. Přítomnost DNA bakterií rodu *Bifidobacterium* byla prokázána pouze u výrobku APO - Lactobacillus ATB. Výrobek Biopron FORTE neobsahoval bakterie rodu *Bifidobacterium* a podle očekávání nebyl detegován žádný produkt PCR. Deklarovaná přítomnost bakterií byla tímto u obou probiotických doplňků stravy ověřena.



## 10 ZÁVĚR

Teoretická část bakalářské práce se zabývá probiotickými bakteriemi, jejich vlastnostmi a prospěšnými účinky na člověka. Pojednává také o možnostech využití probiotik v potravinářství a v klinických aplikacích.

V experimentální části bakalářské práce byla analyzována DNA ve dvou probiotických potravinových doplňcích (Biopron FORTE a APO - Lactobacillus ATB). Izolace DNA v kvalitě vhodné pro polymerázovou řetězovou reakci byla provedena metodou fenolové extrakce. Pomocí primerů pro doménu *Bacteria* byla ve výrobcích prokázána přítomnost bakteriální DNA. Pomocí rodově specifických primerů byla prokázána přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* ve výrobku APO - Lactobacillus ATB a přítomnost DNA bakterií rodu *Lactobacillus* ve výrobku Biopron FORTE. Získané údaje jsou v souladu s údaji deklarovanými výrobcí.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] LEE, Y. K., SALMINEN, S. *Handbook of probiotics and prebiotics*. 2. vyd. John Wiley and Sons, 2009. 596 s. ISBN 978-0-470-13544-0.
- [2] TURRONI, F., et al. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, 149, 37–44.
- [3] 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
- [4] REID, G., et al. New Scientific Paradigms for Probiotics and Prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2003, 37, 105–118.
- [5] OUWEHAND, A., et al. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 82, 279–289.
- [6] KLAENHAMMER, T., et al. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, 29, 393–409.
- [7] GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [8] KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1983, 49, 209–224.
- [9] STILES, M., HOLZAPFEL, W., et al. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 1997, 36, 1–29.
- [10] The microscopy facility: Research. [online]. [cit. 2013-04-06]. Dostupné z URL: <<http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>>
- [11] RANADHEERA, R., et al. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.*, 2010, 43, 1–7.
- [12] PARVEZ, S., et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.*, 2006, 100, 1171–1185. .
- [13] SAARELA, M., et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.*, 2000, 84, 197–215.
- [14] HEINTZ, J. *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [online]. [cit. 2013-04-06]. Dostupný z URL: <[http://textbookofbacteriology.net/featured\\_microbe.html](http://textbookofbacteriology.net/featured_microbe.html)>
- [15] SOCCOL, C., et al. The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.*, 2010, 48, 413–434.
- [16] ROBERFROID, M. What is Beneficial for Health? The Concept of Functional Food. *Food Chem. Toxicol.*, 1999, 37, 1039–1041.
- [17] AWAISHEH, S. Probiotic Food Products Classes, Types, and Processing. In RIGOBELLO, E. (ed.). *Probiotics*. 1. vyd. Rijeka: InTech, 2012, s. 551–582.
- [18] SONG, D. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. In RIGOBELLO, E. (ed.). *Probiotics*. 1. vyd. Rijeka: InTech, 2012, s. 3–36.
- [19] SALEM, M., et al. Production of probiotic ice cream. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, 14/55, 267–271.

- [20] CZINN, A., et al. Probiotics in Foods and Supplements. In MICHAEL, S., SHERMAN, P. (ed.). *Probiotics in Pediatric Medicine*. Totowa: Humana Press, 2009, s. 299–306. ISBN 978-1-60327-288-9.
- [21] CHIANG, S., et al. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 93, 903–916.
- [22] BAEK, Y., LEE, B. Probiotics and Prebiotics as Bioactive Components in Dairy Products. In PARK, Y. (ed.). *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. 1. vyd. Wiley-Blackwell, 2009, s. 287–310. ISBN 978-0-8138-1982-2/2009.
- [23] ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: VUT v Brně, Fakulta chemická, 2010. 86 s. ISBN 978-80.214-4004-3.
- [24] ŠMARDA, J., et al. *Metody molekulární biologie*. 1st ed. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 p. ISBN 80-210-3841-1.
- [25] ALBERTS, B. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2003. 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
- [26] HAARMAN, M., KNOL, J. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal *Lactobacillus* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72, 2359–2365.
- [27] ZOVČÁKOVÁ, M. *Identifikace probiotických bakterií ve farmakách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 66 s. Vedúci diplomovej práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
- [28] DUBERNET, S., et al. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, 214, 271–275.
- [29] ROY, D., SIROIS, S. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, 191, 17–24.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BMK	bakterie mléčného kvašení
MO	mikroorganismy
GIT	gastrointestinální trakt
PCR	polymerázová řetězová reakce
bp	pár bází (base pair)
dNTP	2'-deoxynukleosid-5'-trifosfát
EDTA	ethylendiamintetraocová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)
DNA	deoxyribonukleová kyselina