

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

PROBIOTIKA V POTRAVINOVÝCH VÝROBCÍCH PRO DĚTI

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

PETRA VOZÁROVÁ

BRNO 2015



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

PROBIOTIKA V POTRAVINOVÝCH VÝROBCÍCH PRO DĚTI

PROBIOTICS IN FOOD PRODUCTS FOR CHILDREN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

PETRA VOZÁROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2015



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0915/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Petra Vozárová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Alena Španová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.	

Název bakalářské práce:

Probiotika v potravinových výrobcích pro děti

Zadání bakalářské práce:

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

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.

Petra Vozárová
Student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

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

ABSTRAKT

Napriek vysokej úrovni vedy a medicíny sa ľudia snažia vrátiť k prírode a využiť ju pre svoje zdravie. Napríklad sa snažia využiť probiotiká, čo sú živé kultúry, schopné usídlit' sa v ľudskom čreve a tu vykonávať svoju činnosť.

Teoretická časť bakalárskej práce sa zaoberá probiotickými baktériami, ich vlastnosťami ako aj vlastnosťami, ktoré sú dôležité pre potravinársky priemysel a hlavne sa zameriava na probiotiká využívané v detskej výžive. Experimentálna časť je zameraná na analýzu dvoch potravinových výrobkov pre deti (BioLac Baby a Probacílium+). Z týchto produktov bola vyizolovaná DNA metódou fenolovej extrakcie a pomocou magnetických nosičov. Celková izolovaná DNA z výrobkov bola amplifikovaná rodovo špecifickou PCR.

ABSTRACT

Despite of the high level of science and medicine, people are trying to return to the nature and use it for their lives. For example, they are using probiotics, which are live cultures able to reside in the human intestine and there can start their role.

The teoretical part of this bachelor thesis deals with probiotic bacteria, their properties and those properties which are important in the food industry and the main part focuses on the probiotics used in baby food. The experimental part of the thesis targets on an analysis of two probiotic supplements for children (BioLac Baby and Probacílium+). There was a DNA isolated from these two products by method of phenol extraction and using magnetic media. The whole DNA isolated from these products was amplificated by genus-specific PCR.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Probiotiká, črevná mikroflóra, baktérie mliečneho kvasenia, probiotické výrobky pre deti

KEY WORDS

Probiotics, intestinal microflora, bacteria fermentation of milk, probiotic products for children

VOZÁROVÁ, P. *Probiotika v potravinových výrobcích pro děti*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 45 s. Vedúca bakalárskej práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

PREHLÁSENIE

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

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som chcela poďakovať vedúcej svojej bakalárskej práce, doc. RNDr. Alene Španovej, CSc. za jej cenné rady a odborné vedenie. Ďalej chcem poďakovať MUDr. Jane Peškovej za jej pomoc a konzultácie v priebehu práce na tejto bakalárskej práci. Ďalej by som chcela poďakovať svojej rodine a priateľovi za ich podporu a povzbudenie.

Obsah

ÚVOD	7
I. TEORETICKÁ ČASŤ	8
1. DEFINÍCIA POJMU PROBIOTIKUM	8
2. OSÍDĽOVANIE TRÁVIACEHO TRAKTU OD NARODENIA	9
2.1 MIKROORGANIZMY POUŽÍVANÉ AKO PROBIOTIKÁ	10
2.1.1 Rod <i>Streptococcus</i>	12
2.1.2 Rod <i>Lactobacillus</i>	13
2.1.3 Rod <i>Bifidobacterium</i>	14
2.1.4 Rod <i>Enterococcus</i>	3
2.1.5 Rod <i>Lactococcus</i>	3
2.1.6 Rod <i>Leuconostoc</i>	17
2.1.7 Rod <i>Pediococcus</i>	18
2.2 PROBIOTICKÉ VLASTNOSTI BAKTÉRIÍ	18
2.3 VLASTNOSTI PROBIOTIKA VHODNÉHO PRE POTRAVINÁRSKY PRIEMYSEL	19
3. PROBIOTIKÁ V DETSKEJ VÝŽIVE	21
4. CIEĽ PRÁCE	24
II. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	25
5. MATERIÁL A METÓDY	25
5.1 Použité probiotické potravinové doplnky	25
5.2 DNA kontrolných bakteriálnych kmeňov	25
5.3 Chemikálie	25
5.4 Roztoky	26
5.4.1 Roztoky pre lýzu bakteriálnych buniek	26
5.4.2 Roztoky pre fenolovú extrakciu	27
5.4.3 Roztoky pre separáciu DNA magnetickými nosičmi	27
5.4.4 Komponenty pre PCR	27
5.4.5 Roztoky pre agarózovú gélovú elektroforézu	27
5.5 Pomôcky a prístroje	28
5.6 Metódy	28
5.6.1 Príprava hrubých lyzátov	28
5.6.2 Izolácia DNA fenolovou extrakciou	28
5.6.3 Zrážanie DNA ethanolom	29

5.6.4	Izolácia DNA pomocou magnetických mikročastíc z hrubého lyzátu buniek ...	29
5.6.5	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA	29
5.6.6	Agarózová gélová elektroforéza bakteriálnej DNA	30
5.6.7	Polymerázová reťazová reakcia	30
5.6.8	Detekcia produktov PCR pomocou agarózovej gélovej elektroforézy	31
6	VÝSLEDKY	32
6.1	Izolácia DNA z probiotických produktov	32
6.2	Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie DNA	32
6.3	Polymerázová reťazová reakcia	33
7	DISKUSIA	36
7.1	Izolácia DNA z potravinových doplnkov pre deti	36
7.2	Dôkaz prítomnosti bakteriálnej DNA	36
8	ZÁVER	37
	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	38
	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	43

ÚVOD

Vďaka vede a medicíne dosiahlo ľudstvo obrovský pokrok, ale predsa sa v dnešnej dobe snažíme navrátiť sa k prírode a využiť ju pre svoje zdravie.

Možno to demonštrovať na narastajúcej snahe využitia probiotických kultúr ako doplnkov stravy. Pojem probiotiká zahrňuje živé mikroorganizmy, ktoré sú schopné usídlieť sa v čreve človeka a prejavíť tu svoj vplyv na udržanie zdravej črevnej mikroflóry. Ako probiotické baktérie sú označované baktérie mliečneho kvasenia a niektoré druhy rodu *Bifidobacterium*. Dnes sa nachádza na trhu veľa probiotických doplnkov stravy ale hlavne potraviny obsahujúce probiotické kultúry ako sú napríklad zakysané mliečne výrobky, syry, zmrzlina, čokolády alebo mäsové výrobky, či výrobky rastlinného pôvodu.

V minulosti boli probiotiká hlavne v záujme vedcov a vedeckých pracovníkov, ale v dnešnej dobe sa dostávajú aj do povedomia laickej verejnosti. Dôvodom je skutočnosť, že probiotiká poskytujú veľké množstvo klinicky preukázaných zdraviu prospešných účinkov svojmu hostiteľovi, ako je napríklad udržanie homeostázy organizmu, zachovanie správneho zloženia črevnej mikroflóry a ochrane proti rôznym patogénom.

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1. DEFINÍCIA POJMU PROBIOTIKUM

Slovo probiotikum sa skladá z latinskej predložky „pro“, čo znamená pre a z gréckeho podstatného mena „βίος“, čo znamená život. [1]

V priebehu vývoja vedy a techniky, kedy ľudstvo získalo bližšie informácie o pôsobení probiotík na ľudské zdravie, sa definícia pojmu niekoľkokrát zmenila.

Na začiatku 20.storočia ruský biológ Ilya Ilich Metchnikoff študoval rozdiely v životospráve Bulharských roľníkov, ktorí sa dožívali v priemere 100 rokov. Jedným z najväčších rozdielov bola vysoká konzumácia fermentovaného mlieka. V roku 1908 sformuloval teóriu autointoxikácie, kedy bolo ľudské telo postupne napádané toxínmi patogénnych organizmov v čreve, ktoré boli úspešne utlmené konzumáciou kyslého mlieka s obsahom živých kultúr. [2]

V roku 1965 Lilly a Stillwell definovali probiotiká ako látky produkované jedným mikroorganizmom, ktorý stimuluje rast iného mikroorganizmu. Uviedli tiež, že probiotiká sú opakom antibiotík. V roku 1974 prezentoval Parker svoj pohľad na probiotiká ako organizmy a látky prispievajúce k rovnováhe črevnej mikroflóry. [3]

V súčasnosti existuje veľa rôznych názorov a definícií probiotík, pričom väčšina navrhovaných definícií sa sústreďuje na použitie mikroorganizmov, ktorých účelom je modulácia črevnej mikroflóry hostiteľa. Väčšina týchto teórií sa odlišuje od definície probiotík Lillym a Stillwellom. [3]

Jednou z najnovších formulácií, ktoré prezentuje Schrezenmeir a de Vrese je, že probiotiká sú prípravky, ktoré obsahujú životaschopnú bakteriálnu kultúru v dostatočnom množstve, ktoré pôsobia v mikroflóre hostiteľa (implantáciou alebo kolonizáciou) a majú pozitívny účinok na jeho zdravie. [4]

Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) a FAO (*Food and Agriculture Organisation*) definuje probiotiká ako živé mikroorganizmy, ktoré v prípade podávania v dostatočných dávkach prispievajú k zdraviu hostiteľa. [5]

23.októbra 2013 Medzinárodná vedecká asociácia pre probiotiká a prebiotiká (ISAPP) organizovala stretnutie expertov v oblasti probiotík, aby prediskutovali a bližšie určili špecifické vlastnosti probiotík, nakoľko definícia WHO/FAO nebola v tejto oblasti dostačujúca. [6]

Najstaršia zmienka o konzumácii potravín obsahujúcich bakteriálne kultúry siaha až 3 500 rokov pred Kristom, keď Sumeri rozvinuli výrobu syra. V Biblii je poukázané na dlhovekosť Abraháma vďaka konzumácii mlieka a tvarohu. [7]

Fermentácia mliečnych výrobkov je najstarším spôsobom uchovávaní potravín, ktorá sa prostredníctvom Tatarských, Mongolských a Húnskych nájazdov dostala z Blízkeho východu cez Rusko do Európy. [8]

2. OSÍDLĽOVANIE TRÁVIACEHO TRAKTU OD NARODENIA

Tráviaca sústava človeka predstavuje jeden z najhustejšie osídlených bakteriálnych ekosystémov v prírode. Povrch sliznice poskytuje veľký priestor pre osídľovanie mikroorganizmami. Plocha gastrointestinálneho traktu sa pohybuje medzi 150 až 200 m². Vytvorením záhybov sa plocha čreva môže stonásobiť, tvorbou klkov narastie plocha 7 – 10násobne a najväčší podiel na náraste aktívnej plochy (15 až 40krát) majú mikrokľky. Vďaka tomu je zaistený potrebný priestor pre trávenie, prilnutie mikroorganizmov k povrchu sliznice a na kolonizáciu čriev. [9]

Ľudský plod sa vyvíja približne 10 mesiacov v maternici, v prostredí bez mikroorganizmov. Tráviaci trakt novorodenca je do okamihu narodenia sterilný. Po prechode do vonkajšieho prostredia nastáva prirodzená expozícia novorodenca celej škále mikróbov, čo sa začína už počas pôrodu prechodom cez vagínu a bezprostredne po narodení. [10]

Pri fyziologickom pôrode je matka prvým zdrojom mikrobiálnej kolonizácie. Prirodzený pôrod je zásadný pre dobrý vývin mikroflóry, pre správne metabolické a imunologické regulácie a pre zaistenie rovnováhy vnútorného prostredia. Prvé osídlenie pochádza z vaginálnej a fekálnej mikroflóry matky a prebieha najmä orálnou cestou, keď sa cez ústnu dutinu osídľuje žalúdok a neskôr aj ostatné črevo. Len o niečo neskôr sa na kolonizácii podieľa aj mikroflóra pochádzajúca z pokožky matky, materského mlieka, slín a rúk. [10]

Následne prebieha v tráviacom trakte novorodenca charakteristický reťazec reakcií až do vydifferentcovania „stabilného“ komplexu mikroorganizmov. Tento proces zahŕňa interakcie jednak medzi samotnými mikroorganizmami, ako aj medzi hostiteľom a mikroorganizmami, v závislosti od ponúkaných endogénnych a exogénnych nutrientov. [11]

Prvé baktérie majú vysoký redukčný potenciál a metabolizujú kyslík. Sú to fakultatívne anaeróby, *Enterobacter*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*. Do 48 hodín je tráviaci trakt kolonizovaný aj *Escherichia coli*. V stolici po 4 až 7 hodinách po narodení sa detegovali prvé baktérie. Proces osídľovania tráviaceho traktu je rýchlejší v miestach s nižšou úrovňou hygieny (Guatemala, Pakistan, Nigéria) oproti krajinám s vyššou životnou úrovňou (Švédsko). Okrem životných podmienok ovplyvňuje proces kolonizácie aj spôsob pôrodu, rodinné prostredie, zdravotné a sociálne podmienky, spôsob kŕmenia a lieky, ktoré užíva matka a novorodenec. [11]

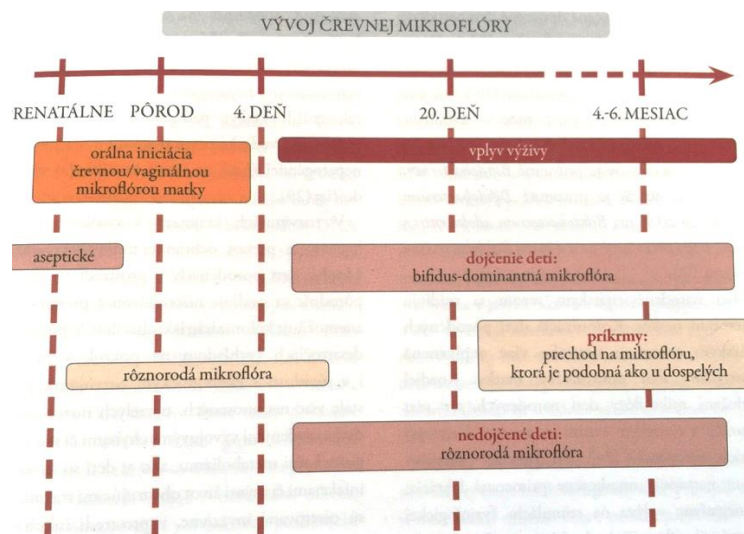
Po spotrebovaní kyslíka sa vytvárajú podmienky pre rast anaeróbných baktérií vrátane laktobacilov a bifidobaktérií. [11]

Nutrične podmienená modulácia črevnej mikroflóry počas novorodeneckého vývoja významne ovplyvňuje vnímavosť na ochorenia čreva a má dlhotrvajúci efekt na kvalitu imunitného systému. Plne dojčené donosené deti narodené prirodzenou cestou sú v prvom týždni života osídlené anaeróbnou flórou, prevažne *Bacteroides*. V prvom mesiaci života dominujú laktobacily a bifidobaktérie. Do 3 dní po pôrode sa stabilizuje kvantitatívne zastúpenie bifidobaktérií tak, že asi u 50 % novorodencov je prítomné *Bifidobacterium breve*, asi u 40 % je prítomné *Bifidobacterium bifidum*, asi 20 % má *Bifidobacterium adolescentis* a *Bifidobacterium infantis* a asi 4 % má *Bifidobacterium gallicum*. U dojčených detí sa

intestinálna mikroflóra skladá výlučne z laktobacilov a bifidobaktérií, ktoré tvoria až 90 % celkového zloženia. Tisíc násobne prevyšujú množstvo enterobaktérií, pričom tento stav pretrváva až do odstavenia materského mlieka. [11]

Deti narodené cisárskym rezom sa anaeróbnymi baktériami osídľujú neskôr, nakoľko je kolonizácia ovplyvnená hlavne prostredím, ako mikroflórou matky. Pri pôrode cisárskym rezom nastupuje oneskorene laktácia, čo negatívne vplýva na stimuláciu fyziologickej črevnej mikroflóry. Nedostatok prebiotík v mlieku vedie k zdravotným problémom vo vyššom veku a preto by sa mali podávať vo forme potravinových doplnkov už od narodenia. [12]

Črevná mikroflóra je stabilná približne v 2. až 3. roku života dieťaťa.



Obr. 1: Vývoj črevnej mikroflóry od narodenia [11]

2.1 MIKROORGANIZMY POUŽÍVANÉ AKO PROBIOTIKÁ

Medzi probiotiká radíme rôzne mikroorganizmy (MO)- baktérie, plesne a kvasinky. Probiotiká sú vo svojej podstate hlavne baktérie, ktoré sú prirodzenou súčasťou tráviaceho traktu organizmu (90%). Môžeme povedať, že probiotiká sú prokaryotického pôvodu, po fyziologickej stránke sú rôznorodé, ale po morfolologickej stránke sú si veľmi podobné. [13]

Tvar bunky je odvodený od tyčínok alebo kokov (guľovité baktérie) a ich veľkosť sa udáva rádovo v niekoľkých μm . Napriek tomu majú veľký špecifický povrch umožňujúci baktériám neustálu premenu látok s okolím. Jedná sa o heterotrofné organizmy, ktoré získavajú živiny premenou rôznych organických látok. Produktom metabolizmu baktérií mliečneho kvasenia je kyselina mliečna, ktorá je prospešná aj pre človeka. Sú hlavne aerotolerantné alebo anaeróbne, netvoriace spóry, acidotolerantné a grampozitívne. Podľa produktov vznikajúcich pri premeně sacharidov probiotické baktérie mliečneho kvasenia delíme na:

1. Homofermentatívne baktérie- fermentovaný sacharid sa premieňa hlavne na kyselinu mliečnu

2. Heterofermentatívne baktérie- fermentovaný sacharid sa premieňa na kyselinu mliečnu, oxid uhličitý (CO₂) alebo za určitých okolností na etanol

Najčastejšie sa ako probiotické kultúry využívajú baktérie mliečneho kvasenia (BMK) a baktérie rodu *Bifidobacterium*, patriace do vývojovej vetvy aktinomycét, ktoré boli v minulosti radené medzi BMK. Do skupiny BMK sú zaradené niektoré druhy rodu *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* a *Lactobacillus*. Všetky rody sú fylogeneticky príbuzné. U niektorých druhov BMK je možné využiť ako identifikačný znak konfiguráciu a optickú otáčavosť fermentáciou vzniknutej kyseliny mliečnej.

BMK sú mikroorganizmy s veľkým potravinárskym a technologickým významom, ktorých zástupcovia sa nachádzajú v zakýsaných výrobkoch, v mlieku, v kvasných potravinách a v produktoch rastlinného a živočíšneho pôvodu. Ich hlavnou úlohou je kysnutie potravín a svojimi produktmi prispievajú k typickej chuti a aróme príslušného fermentovaného produktu. [14]. V Tabuľke 1 sú uvedené mikroorganizmy registrované ako probiotiká, ktoré sú využívané v priemysle.

Tabuľka 1: Mikroorganizmy registrované ako probiotiká a využívané v priemysle [15]

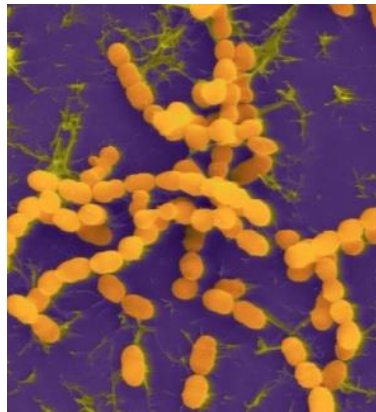
Rod <i>Bifidobacterium</i>	<i>B.adolescentis</i> , <i>B.animalis</i> , <i>B.animalis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>B.breve</i> , <i>B.longum</i> subsp. <i>infantis</i> , <i>B.longum</i> subsp. <i>longum</i>
Rod <i>Lactobacillus</i>	<i>L.acidophilus</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>L.reuteri</i> , <i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L.helveticus</i> , <i>L.fermentum</i> , <i>L.gasseri</i> , <i>L.paracasei</i> , <i>L.salivarius</i> , <i>L.johnsonii</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>L.sakei</i>
Ostatné baktérie mliečneho kvasenia	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E.faecium</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>P.acidilacticici</i> <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>S.macedonicus</i> , <i>S.mitis</i> , <i>S.thermophilus</i> , <i>S.sanguis</i>
Rod <i>Bacillus</i>	<i>B.cereus</i> , <i>B.clausii</i> , <i>B.coagulans</i> , <i>B.licheniformis</i> , <i>B.mesentericus</i> , <i>B.subtilis</i>
Ostatné baktérie	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Echerichia coli</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp. <i>cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp. <i>boulardii</i>

2.1.1 Rod *Streptococcus*

Bunky streptokokov majú guľatý alebo vajcovitý tvar, sú usporiadané do párov, krátkych alebo dlhších reťazcov a obyčajne sú nepohyblivé. Netvorí spóry, sú grampozitívne a fakultatívne anaeróbne mikroorganizmy, ktoré fermentujú sacharidy na kyselinu mliečnu. [16] Na Obrázku 2 sú znázornené bunky rodu *Streptococcus*.

Streptococcus thermophilus

Patrí do termofilnej skupiny baktérií mliečneho kvasenia. Je to grampozitívny mikroorganizmus vajcovitého tvaru s veľkosťou od 0,7 až do 0,9 μm . Tento MO má optimálnu teplotu rastu 40 až 50 $^{\circ}\text{C}$ a vybrané kmene rastú v mlieku bez prístupu vzduchu a vytvárajú bielu zrazeninu. Vzhľadom na svoje fyziologické, ekologické a metabolické vlastnosti sa využíva spolu s druhmi *Lactobacillus* ako štartovacia kultúra pri výrobe jogurtov a iných mliečnych výrobkov (švajčiarsky alebo taliansky syr). *S. thermophilus* nie je schopný metabolizovať galaktózu, čo môže mať za následok zlú textúru a chuť syru. Exopolysacharid vybraných kmeňov má rozhodujúci význam pre konečnú štruktúru jogurtu. [17]



Obr. 2: Bunky rodu *Streptococcus* [39]

2.1.2 Rod *Lactobacillus*

Názov *Lactobacillus* pochádza z latinského slova lac, čo v preklade znamená mlieko, pretože zástupcovia tohto druhu sú schopné fermentovať sacharidy na kyselinu mliečnu. [18]

Sú to grampozitívne, nesporulujúce a nepohyblivé tyčinky. Zahrňujú v sebe fakultatívne anaeróbne a mikroaerofilné baktérie. Radíme ich medzi saprofyty a málokedy sa jedná o patogény. Preferujú prostredie bohaté na sacharidy, napríklad GIT. Laktobacily obývajú gastrointestinálny trakt (GIT) človeka, ústnu dutinu a vagínu. Nájďme ich vo fermentovanom rastlinnom aj živočíšnom materiály. Nachádzajú sa na povrchu neporušených rastlín, ale aj na rozkladajúcich sa častiach rastlín. [18]

Všeobecne sa dá o tomto rode povedať, že sa jedná o najrozsiahljší rod mliečnych baktérií s viac ako 100 druhmi a poddruhmi. Napriek tomu, že väčšina z nich je nepatogénna, u jedincov s oslabenou imunitou môžu byť zdrojom novorodeneckej meningitídy, bakterémií a pľúcnych ochorení. [18] Na Obrázku 3 sú znázornené bunky rodu *Lactobacillus*.

Medzi najznámejšie miesta využitia laktobacilov sú mliečne výrobky, mäso a výrobky z neho a marinované rybie produkty. Laktobacily sa do mlieka dostávajú až z prostredia. [18]

Najvýznamnejším druhom je *L.acidophilus*. Využíva sa na výrobu acidofilného mlieka a sušeného acidofilného mlieka na účely kŕmenia. Z farmaceutického hľadiska sa využíva na obnovu prirodzeného zloženia črevnej mikroflóry po aplikácii antibiotík. Tento druh využíva glykogén, ktorý sa uvoľňuje z rozpadajúcich sa epitelov, za vzniku kyseliny mliečnej. [19]

Typickým zástupcom ústnej dutiny je *L.salivarius*. Ďalšími príkladmi mliečnych kultúr používajúcich sa ako probiotiká sú: *L.casei*, *L.rhamnosus*, *L.plantarum*, *L.lactis*, *L.delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L.helveticus*, *L.reuteri*, *L.brevis*, *L.johnsoni*, *L.paracasei* a *L.salivarius*. [18]



Obr. 3: Bunky rodu *Lactobacillus* [40]

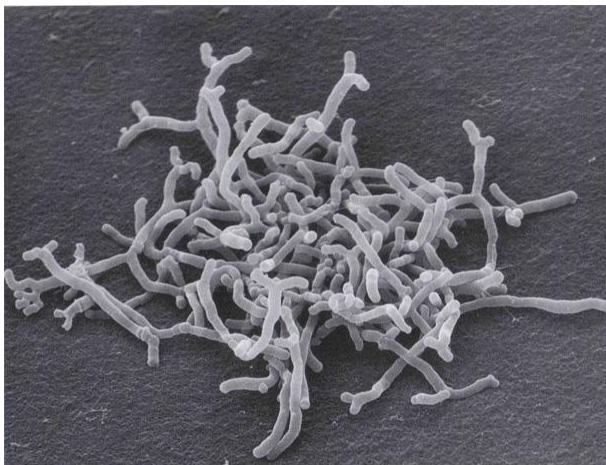
2.1.3 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobaktérie boli vyizolované v roku 1900 Tissierom zo stolice dojčených detí a nazvané ako *Bacillus bifidus*, pretože mali charakteristický tvar písmena Y, boli grampozitívne a počas rastu neprodukovali plyn. Počas nasledujúcich 50 rokov vedci navrhovali nové pomenovanie pre bifidobaktérie. Neskôr boli zaradené do samostatného rodu *Bifidobacterium*. Patria do kmeňa *Actinobacteria*. [20]

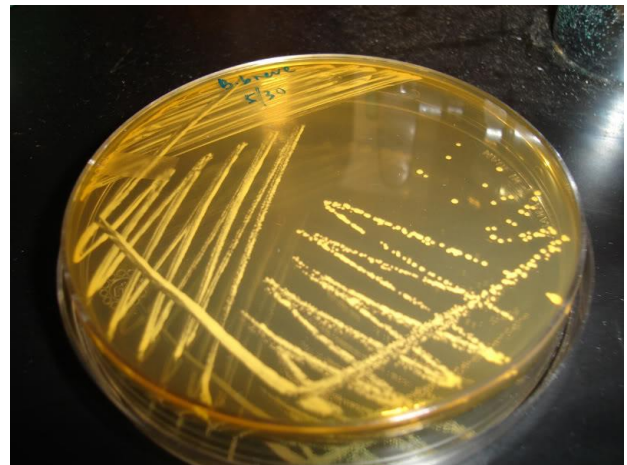
Bifidobaktérie majú významnú úlohu v intestinálnom trakte novorodencov, u ktorých tvorí väčšinu črevnej mikroflóry. Nachádzajú sa v tráviacom trakte dospelého človeka, kde z fermentovaných sacharidov produkujú kyselinu mliečnu a kyselinu octovú, ktoré inhibujú nežiaduce baktérie a zlepšujú peristaltiku čriev. [21]

Z morfológického hľadiska sú nepravidelné, vetviace sa grampozitívne, väčšinou striktné anaeróbne a nepohyblivé. [21] Na Obrázku 4 a na Obrázku 5 sú znázornené bunky rodu *Bifidobacterium*.

Všetky doposiaľ popísané druhy sa dajú rozdeliť do šiestich skupín podľa miesta výskytu: črevá človeka, ústna dutina, strava, trakt zvierat, trakt hmyzu a odpadné vody. Do skupiny ľudských bifidobaktérií zaraďujeme nasledujúce druhy: *B.pseudocatenulatum*, *B.catenulatum*, *B.adolescentis*, *B.longum*, *B.infantis*, *B.breve*, *B.angulatum*, *B.bifidum* a *B.dentium*. Medzi najdôležitejšie probiotické druhy patria *B.longum*, *B.bifidum*, *B.breve* a *B.infantis*. Využívajú sa aj ako prídavky do mliečnych výrobkov a potravinových výrobkov. [22]



Obr. 4: Bunky rodu *Bifidobacterium*



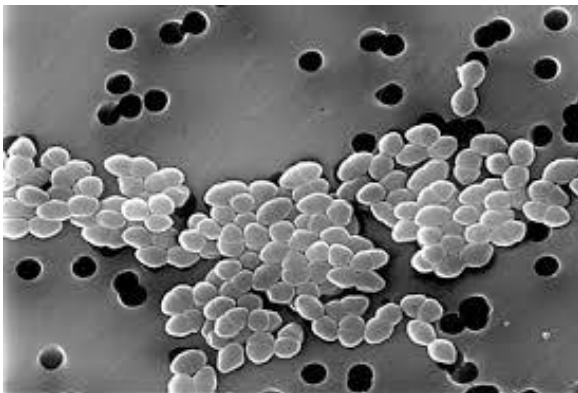
Obr. 5: Bunky rodu *Bifidobacterium*

2.1.4 Rod *Enterococcus*

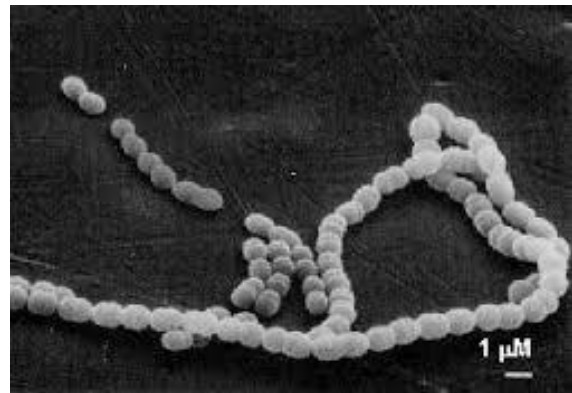
Jedná sa o grampozitívne koky, kultivačne nenáročné. Sú pomerne rezistentné k vonkajšiemu prostrediu. Vyskytujú sa vo dvojiciach alebo v krátkych reťazcoch, pričom nehomolyzujú na krvnom agare. Enterokoky sú fakultatívne anaeróbne, odolné voči vysokému pH (9,6), rastú v hypertonickej roztoku NaCl, prežijú polhodinové zahriatie na 60°C sú schopné rásť aj za prítomnosti 40% žlči. Sú odolné voči soliam, detergentom, ťažkým kovom, ethanolu, azidom a vysychaniu. Bežne sa nachádzajú v čreve, iný výskyt je veľmi vzácny. Patria medzi podmienené patogény. Spôsobujú močové infekcie, gynekologické zápaly, pooperačné komplikácie a urosepsu. Sú značne rezistentné k antibiotikám. Najznámejšími zástupcami sú *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* a *Enterococcus faecium*, ktoré bývajú radené medzi probiotické mikroorganizmy. [23] Na Obrázku 6 a na Obrázku 7 sú znázornené bunky rodu *Enterococcus*.

Enterococcus faecalis

E.faecalis ako fakultatívny anaerób kvasí glukózu bez produkcie plynu na kyselinu mliečnu a neprodukuje katalytickú reakciu s peroxidom vodíka. Na neutrálnom bujone môže fermentáciou tvoriť aj väčšie množstvo kyseliny mravčej, octovej a ethanolu. Katabolizujú glycerol, laktát, malát, arginín a ketokyseliny pričom uvoľňujú do okolia energiu. Okrem spomínaných ochorení, môže *E.faecalis* spôsobiť zápal mozgových blán. [24]



Obr. 6: Bunky rodu *Enterococcus*



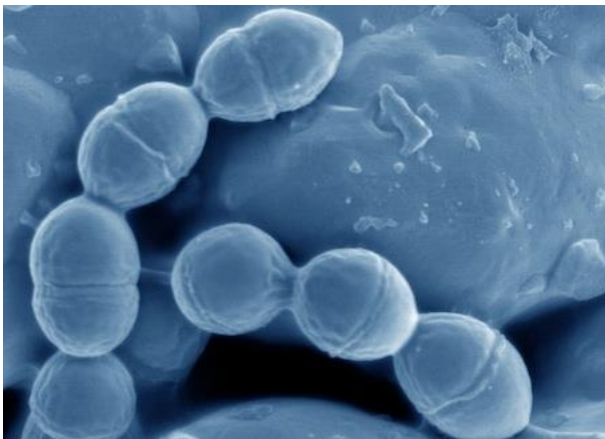
Obr. 7: Bunky rodu *Enterococcus*

2.1.5 Rod *Lactococcus*

Lactococcus je rod mliečnych baktérií, ktorý kvasí glukózu na kyseliny mliečnu, ktorá je ich hlavným a jediným produktom. Sú to grampozitívne koky, ktoré sa nachádzajú buď jednotlivo, v pároch alebo reťazcoch. Rod obsahuje kmene schopné rásť nad alebo pod 7°C. Tieto organizmy sa bežne využívajú v mliekarenskom priemysle pri výrobe fermentovaných mliečnych výrobkov. Môžu sa využívať ako samotná kultúra alebo ako zmiešané kultúry s rodom *Lactobacillus* a *Streptococcus*. Tieto baktérie majú úlohu aj v dochutení konečného produktu. Osobitná pozornosť sa venuje druhu *Lactococcus lactis* subs. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subs. *lactis* a druhu *Lactococcus plantarum*. Využívajú sa ako štartovacie kultúry v priemyselných mliečnych kvaseniach, pričom ich účelom je produkcia mlieka a mliečnych výrobkov rýchlym okyslením, čo spôsobí pokles pH fermentovaného produktu, čo zabráni kazeniu. [25] Na Obrázku 8 a na Obrázku 9 sú znázornené bunky rodu *Lactococcus*.

Lactococcus lactis subs. *lactis*

L.lactis subs. *lactis* je prvým geneticky modifikovaným organizmom, ktorý ako živý môže byť použitý na liečenie ľudských chorôb. Bunky majú vajcovitý tvar s dĺžkou 0,5 – 1,5 µm. Je nesporulujúcou baktériou a sú nepohyblivé. Produkuje hlavne L (+) kyselinu mliečnu, ale pri nízkom pH je schopná produkovať aj D (-) kyselinu mliečnu. Pridaním do mlieka využíva enzýmy k tvorbe ATP z laktózy. Produkovaná kyselina mliečna zráža proteíny za vzniku tvarohu. Využíva sa aj pri výrobe nakladanej zeleniny, piva, vína, niektorých druhov chleba, sójového mlieka, kefíru a ďalších. [26]



Obr. 8: Bunky rodu *Lactococcus*



Obr. 9: Bunky rodu *Lactococcus*

2.1.6 Rod *Leuconostoc*

Leuconostoc je rod grampozitívnych baktérií majúcich tvar ovoidných kokov, ktoré tvoria dlhé reťazce. Všetky druhy v rámci tohto rodu sú heterofermentatívne a sú schopné produkovať zo sacharózy dexetrán. Všeobecne sú považované za nepatogénne, odolávajúce kyselinám a rastúce pri teplote 18 až 25°C. Spolu s ďalšími rodmi ako je *Pediococcus* a *Lactobacillus* sú zodpovedné za kvasenie kapusty.

Ďalej sa podieľa na fermentácii kefiru. [27] Na Obrázku 10 sú znázornené bunky rodu *Leuconostoc*.

Leuconostoc carnosum

L.carnosum je anaeróbna baktéria vyskytujúca sa v zle zabalenom mäse. Optimálna teplota pre rast je 2°C. táto baktéria je schopná inhibovať rast iných baktérií, preto sa využíva ako biologicky konzervačný prostriedok. [27]



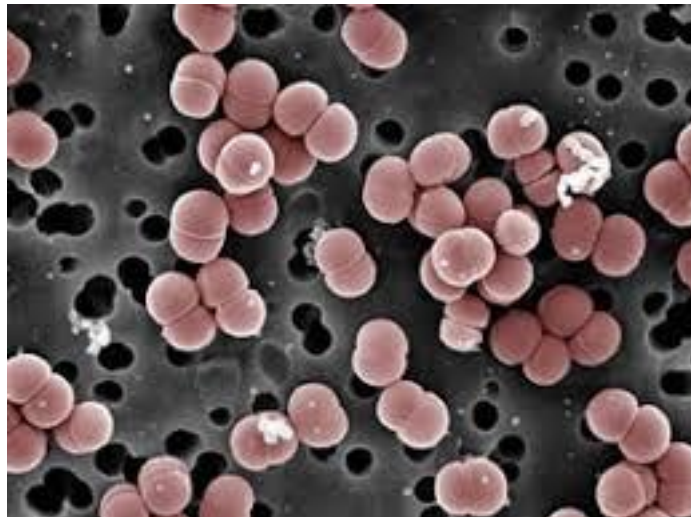
Obr. 10: Bunky rodu *Leuconostoc*

2.1.7 Rod *Pediococcus*

Pediococcus je rod grampozitívnych baktérií mliečného kvasenia, ktoré sa zvyčajne vyskytujú v pároch alebo tetradách. Sú homofermentatívne a spolu s ostatnými baktériami sú zodpovedné za kvasenie kapusty. Sú zodpovedné za kontamináciu piva a vína, ale v niektorých druhoch piva je ich prítomnosť dôležitá. Produkujú diacetyl, ktorý dodáva maslovú alebo karamelovú príchuť niektorým vínam ako je napríklad Chardoannay. Niektoré druhy sa využívajú ako očkovacie kultúry v silážnych jamách. [28]

Pediococcus pentosaceus

P.pentosaceus je nepohyblivá a nesporulujúca baktéria so striktno fermentatívnym metabolizmom, ktorej hlavným produktom je kyselina mliečna. Rastie pri teplote 40°C, v rozmedzí pH 4,5 až 8, v 9 až 10% roztoku NaCl a je schopná využívať maltózu. Môže byť izolovaná z rastlinného materiálu alebo zo syra. Využíva sa ako štartovacia kultúra na fermentáciu klobás, kukurice, zelenej fazule, sójového mlieka a na siláž. [28] Na Obrázku 11 sú znázornené bunky druhu *Pediococcus pentosaceus*.



Obr. 11: Bunky druhu *Pediococcus pentosaceus*

2.2 PROBIOTICKÉ VLASTNOSTI BAKTÉRIÍ

Probiotiká majú veľmi veľa zdraviu prospešných vlastností, napríklad prispievajú k zachovaniu rovnováhy a zloženia črevnej mikroflóry, chránenie hostiteľského organizmu pred infekciou patogénnymi baktériami, napomáhanie obranyschopnosti a zaistenie rovnováhy mikroflóry hostiteľského organizmu. Ovplynenie zdravotného stavu hostiteľa môže prebiehať niekoľkými spôsobmi:

1. Pôsobením priamo v tráviacom trakte rastom alebo spotrebou živín
2. Tvorbou vitamínov alebo ďalších látok potrebných pre hostiteľa

Bolo preukázané, že činnosťou probiotických kultúr v tráviacom trakte sa zlepšuje dostupnosť, množstvo a stráviteľnosť niektorých živín získaných zo stravy. Na to, aby došlo k želanému efektu, musí probiotikum obsahovať určité minimálne množstvo baktérií kolónie tvoriacich jednotiek (CFU) na dávku. Denná dávka 10^6 až 10^9 CFU sa považuje za minimálnu

účinnú dávku pre terapeutické účely. Okrem dávky záleží aj na špecifickom kmeni, ktorý dané probiotikum obsahuje. Vyvážená črevná mikroflóra zabezpečuje zdraviu prospešné funkcie. Jej zloženie sa počas života mení a závisí aj na ďalších faktoroch ako zdravý životný štýl, výživa, konzumácia liekov alebo psychický stav. [12]

Probiotické baktérie sa podieľajú na lepšej tolerancii potravy, stimulujú črevnú motilitu, pôsobia proti patogénnym MO a pozitívne pôsobia aj na iné fyziologické procesy v GIT. Probiotiká majú klinicky preukázaný účinok aj po liečbe antibiotikmi, kedy je črevná mikroflóra oslabená a značne redukovaná. Dôležitou úlohou probiotík je stimulácia imunitného systému dieťaťa, pretože imunitný systém je hlavným zdrojom všetkých ochorení a zdravotných problémov. Ďalšou výhodou týchto baktérií, že premieňajú cholesterol v tenkom čreve na neúčinnú formu. U pacientov s laktózovou intoleranciou zlepšujú stav tým, že laktobacily sú schopné štiepiť mliečny cukor (laktózu). Baktérie črevnej mikroflóry zlepšujú vstrebávanie vápniku a podporujú produkciu vitamínov B a K. Probiotiká sa využívajú aj na liečbu mnohých ochorení. [29]

2.3 VLASTNOSTI PROBIOTIKA VHODNÉHO PRE POTRAVINÁRSKY PRIEMYSEL

Výber mikroorganizmu vhodného ako probiotikum je podmienený množstvom rôznych faktorov. Najdôležitejšie sú tieto vlastnosti:

1. Odolnosť voči pankreatickým enzýmom, kyselinám a žlči- podmienkou je prežitie pri priechode GIT. Aby baktérie prežili v GIT je dôležité, aby boli odolné voči nízkemu pH, žlči (ľahko alkalická) a pankreatickým enzýmom (veľmi alkalické). Tým, že sú voči nim odolné, dorazia do hrubého čreva neporušené a ľahšie kolonizujú črevnú stenu, čím zamedzujú množeniu škodlivých baktérií, ako sú napríklad *Escherichia coli* alebo *Salmonella typhimurium*.
2. Adhézia k črevnej sliznici- umožňuje imunitnú moduláciu, vylúčenie patogénov a urýchlenie hojenia poškodenej sliznice. Adhézia (prilnavosť) k črevnej stene sa deje pomocou adherentých kmeňov probiotických baktérií, ktoré pretrvávajú v trakte dlhšiu dobu a tým vykazujú lepšie metabolické a imunitné účinky. Adhézia umožňuje interakciu so slizničným väzivom, pričom sa tak uľahčuje kontakt probiotika s črevnými bunkami. Uskutočňuje sa pomocou mukopolysacharidov, proteínov a lipoglykánov, ako je napríklad kyselina lipoteichoová. Jej rozsah a intenzitu ovplyvňuje rýchlosť pohybu čreva, množstvo vytváraného mucínu (hlienu) a miesto adhézie.
3. Ľudský pôvod- z dôvodu špecifickej interakcie s hositeľom. Ľudský pôvod je dôležitý pre kontakt s hositeľovými bunkami. Podávané mikroorganizmy nesmú byť zdraviu škodlivé. Je veľmi ťažké posúdiť bezpečnosť nepatogénnych druhov, aj keď sú vo všeobecnosti laktobacily a bifidobaktérie považované za bezpečné.
4. Zdokumentované účinky na ľudské zdravie- skutočné, vedecké poznatky o zdraví prospešných účinkoch. Účinok probiotík spočíva v súťažení patogénov o živiny, adhézii k črevnému epitelu a redukcii pH v tráviacom trakte hositeľa. Mechanizmus

ich účinku môže spočívať aj v tvorbe bakteriocínov, čo sú zlúčeniny peptidickej povahy produkované niektorými baktériami, ktoré vykazujú antibakteriálne vlastnosti.

Probiotiká musia mať prijateľnú stabilitu a nesmú ovplyvňovať chuť výrobku. Ďalšie dôležité vlastnosti sú:

1. Kyslíková tolerancia- obsah kyslíka a jeho prienik cez obal výrobku sa javí ako najvýznamnejší faktor ovplyvňujúci životaschopnosť baktérií vo fermentovaných mliečnych výrobkoch
2. Odolnosť voči kyslému prostrediu- bifidobaktérie majú nižšiu toleranciu voči kyslému prostrediu ako laktobacily, keď sa pridávajú do nápojov a ovocných štiav, ktoré majú pH 2,5 až 3,7
3. Odolnosť voči teplu- baktérie sa najskôr musia adaptovať a až potom môžu byť vystavené teplotnému šoku
4. Schopnosť rastu v mliečnych základoch- prídanie mlieka alebo mliečnych bielkovín k tráviacim šŕavám zvyšuje hodnotu pH a zlepšuje podmienky na prežitie MO

Vzhľadom na to, že sú bifidobaktérie citlivé na kyslík, majú prísnejšie požiadavky na rast a preto sa technologicky ťažšie spracúvajú ako laktobacily. [11] V Tabuľke 2 sú uvedené žiaduce vlastnosti probiotík v komerčných aplikáciách.

Tabuľka 2: Žiaduce vlastnosti probiotík v komerčných aplikáciách [30]

Kritérium	Vlastnosti
Bezpečnostné kritériá	Patogenita a infekčnosť
	Pôvod
	Virulentné faktory (toxicita, metabolická aktivita, vnútorné vlastnosti, rezistencia voči antibiotikám)
Technologické kritériá	Geneticky stabilné kmene
	Životaschopnosť pri spracovaní a skladovaní
	Dobré sensorické vlastnosti
	Veľkovýroba
	Rezistencia voči fágom
Funkčné kritériá	Tolerancia ku žalúdočným kyselinám
	Tolerancia k žlči
	Adhézia k sliznici
Fyziologické kritériá	Imunomodulácia
	Antagonistická aktivita
	Metabolizmus cholesterolu
	Metabolizmus laktózy
	Antimutagénne a antikarcinogénne vlastnosti

3. PROBIOTIKÁ V DETSKEJ VÝŽIVE

Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) a UNICEF odporúčajú dojčenie novorodencov počas prvých šiestich mesiacov života. Najdôležitejšie je začať s dojčením hneď prvú hodinu po pôrode.

V minulosti bolo ľudské mlieko považované za sterilné, ale nedávne štúdie potvrdili, že obsahuje probiotické baktérie, ktoré sa dojčením prenášajú na dieťa. Jedná sa najmä o bifidobaktérie, ktoré pomáhajú udržiavať zdravú črevnú mikroflóru a nadobudnúť potrebný imunitný systém. Klinické testy potvrdili, že viac ako 85 % vzoriek mlieka obsahovalo bifidobaktérie. V Tabuľke 3 sú uvedené hlavné bakteriálne rody, druhy a DNA sekvencie izolované z materského mlieka.

Materské mlieko je druhovo špecifická biologická tekutina, ktorá obsahuje veľké množstvo pre život potrebných nutrientov ako sú imunokompetentné bunky, imunoglobulíny, polyamíny, oligosacharidy, lysozým, laktoferín, glykoproteíny, karbohydráty, esenciálne mastné kyseliny, proteíny, vitamíny a minerály. Literatúra uvádza, že materské mlieko obsahuje pre dieťa veľa nestráviteľných živín, ktoré sa však podieľajú na tvorbe črevnej mikroflóry. Najlepším príkladom toho sú oligosacharidy obsiahnuté v mlieku (HMOs), ktoré priamo nedodávajú energiu a materiál potrebný na stavbu buniek, ale napomáhajú rastu niektorých črevných baktérií, najmä bifidobaktériám. Okrem bifidobaktérií, prenáša matka na dieťa počas dojčenia aj baktérie patriace do rodu *Lactobacillus*, *Staphylococcus* a *Enterococcus*. Materské mlieko prispieva k zníženiu výskytu a závažnosti rôznych infekcií napríklad produkciou antimikrobiálnych látok, zlepšuje funkciu črevnej bariéry zvyšovaním produkcie mucín a znižuje črevnú priepustnosť. Oligosacharidy, glukóza a galaktóza chránia dieťa pred hnačkovými ochoreniami, respiračnými chorobami a inhibujú patogenitu *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *E.coli* a *Streptococcus pneumoniae*. [31,32]

Tabuľka 3: Hlavné bakteriálne rody, druhy a DNA sekvencie izolované z materského mlieka [31]

Metóda	Hlavné druhy a rody
Bakteriálna izolácia	<i>L.acidophilus</i> , <i>L.fermentum</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>L.gasseri</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>L.lactis</i> , <i>L.salivarius</i> , <i>L.reuteri</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.helveticus</i> , <i>E.faecium</i> , <i>L.faecalis</i> , <i>B.adolescentis</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>B.breve</i> , <i>B.longum</i> , <i>P.pentosaceus</i>
DNA detekcia	<i>L.fermentum</i> , <i>L.gasseri</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>L.lactis</i> , <i>E.faecalis</i> , <i>E.faecium</i> , <i>B.longum</i> , <i>B.adolescentis</i> , <i>B.animalis</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>B.breve</i>

Ak matka z nejakého dôvodu nemôže dieťa koiť, existujú na trhu dojčenské mliečne formuly, ktoré musia spĺňať požiadavky Smernice 91/321/EEC európskeho spoločenstva o výrobe, zložení a distribúcii základných výživových formúl. Vďaka hromadeniu poznatkov došlo ku vzniku upravených, dokonalejších základných mliečnych formúl, ktorých výživná hodnota je skoro na úrovni porovnateľnej s materským mliekom. Dôležité je produkcia tzv. terapeutických mliečnych formúl, ktoré sú svojím zložením určené priamo pre deti so špecifickými zdravotnými problémami ako je napríklad alergia na bielkoviny kravského

mlieka, nízka pôrodná hmotnosť alebo gastroezofágový reflux. Výber formúl závisí od veku dieťaťa a od zdravotného stavu. Vyrábajú sa najmä z kravského mlieka a následne sa upravujú.

Mliečne formuly sa rozdeľujú podľa veku dieťaťa na:

- a) Počiatkové formuly určené pre dojčatá vo veku od 0 do 5. -6. Mesiaca. Jedná sa o humanizované formuly na báze kravských bielkovín. Musia obsahovať výlučne laktózu a nesmie sa do nich pridávať bezlepkový škrob, sezamový a ľanový olej.
- b) Pokračujúce formuly sa môžu nasadiť vtedy, ak dieťa dostáva aspoň jednu nemliečnu zložku výživy (po ukončení 4.mesiaca umelo živých detí a po 6.mesiaci u dojčených detí). Môžu obsahovať aj sacharózu, sú na báze kravského mlieka vo forme fortifikovanej železom, nesmú obsahovať med a lepok.
- c) Junior mlieko, slúži na výživu detí od konca prvého do tretieho roku života. Obsahujú železo, jód, vitamín D a probiotiká. [33]

Najčastejšie sa ako probiotiká v mliečnych formulách využívajú *B.lactis* Bb12, *L.rhamnosus* GG, *L.acidophilus* NCFM a *L.reuteri* DSM 17938.

Lactobacillus rhamnosus GG má pozitívny účinok v prevencii atopického ekzému, redukuje príznaky nekrotizujúcej enterokolitídy a pôsobí preventívne voči patogénom pôsobiacim v črevnej mikroflóre a zlepšuje činnosť imunoglobulínu A. *Lactobacillus acidophilus* NCFM znižuje príznaky nachladnutia a chrípky. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 urýchľuje vyprázdňovanie a zlepšuje účinok liekov na detskú hnačku. *Bifidobacterium animalis* subsp.*lactis* Bb12 zmiernuje príznaky hnačky a podráždenia žalúdka po liečbe antibiotikami u 6-mesačných detí. [34]

Okrem mlieka a mliečnych formúl môže dieťa jesť aj nesladené jogurty, v ktorom sa ako čisté kultúry *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp.*bulgaricus*. Inhibujú enteropatogény ako sú *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* a *Clostridium perfringens*. [33,35]

V období 6-7 mesiacov sa do výživy zavádzajú ovocné a zeleninové šťavy a ovocné dávky. Ovocie a zelenina sú zdravé potraviny, ktoré obsahujú vlákninu, antioxidanty, minerály a vitamíny a neobsahujú alergény. Vedci účinnými kontrolovanými zmenami pozmenili matrice ovocia a zeleniny, čím sa stali ideálne pre probiotické baktérie. Vo vývoji sa využívajú hlavne *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.plantarum*, *L.fermentum*, *L.rhamnosus* a *B.bifidum*. Mrkvová šťava obsahuje *Lactobacillus confusus*. [33,35]

Mäso sa pridáva do výživy po dovŕšení 6- 7 mesiaca života. Musí byť dobre tepelne opracované, nesmú sa podávať párky, salámy a paštéty. Mäso obsahuje bielkoviny, vitamíny a železo, ktoré je dôležité pre tvorbu červených krviniek. Nedostatok týchto živín vedie k poruchám rastu, chudokrvnosti a poruchám vývoja nervového systému. Okrem týchto dôležitých látok obsahuje mäso aj BMK druhov *L.acidophilus*, *L.gallinarum*, *L.johnsonii* a *L.gasseri*. Iné mäsové výrobky môže dieťa jesť až po dovŕšení 5 roku života. [33,35]

V jednom roku života môžu rodičia začať podávať deťom tvrdé syry, ktoré majú vysokú výživovú hodnotu, kde sa ako probiotické baktérie využívajú *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus* a *L.casei*. [33,35]

Postupne by mali byť zavádzané aj ostatné potraviny. Dovŕšením 3.roku života sa strava dieťaťa začína podobáť strave dospelého človeka. Do výživy sa pridajú probiotické potraviny ako sú cereálne výrobky alebo čokoláda.

4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom teoretickej časti práce bolo pojednať o probiotických mikroorganizmoch a ich vlastnostiach, vrátane vlastností probiotika vhodného pre potravinársky priemysel.

Cieľom experimentálnej časti bola izolácia DNA z probiotických výrobkov (BioLac Baby a Probacílium+) s využitím magnetických nosičov a pomocou polymerázovej reťazovej reakcie preukázať prítomnosť bakteriálnej DNA.

II. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5 MATERIÁL A METÓDY

5.1 Použité probiotické potravinové doplnky

- **BioLac Baby**

Doplnok stravy pre deti

Výrobca: Probiotical S.p.A.

Via E Mattai, Novara, Taliansko

Šarža: 14001

Dátum spotreby: 03.2016

Zloženie: *Lactobacillus plantarum* LP01, *Bifidobacterium breve* BR03, kukuričný olej, oxid kremičitý

Deklarované množstvo buniek: 10^8 CFU v dennej dávke (5 kvapiek)

- **Probacilium+**

Doplnok stravy pre deti

Výrobca: Caliaplus, s.r.o.

Československých letcov 53 A

080 06 Lubotice, Slovensko

Krajina pôvodu: Česká republika

Šarža: 72SUNS3

Dátum spotreby: 10.11.2016

Zloženie: *Bacillus coagulans* (*Lactobacillus sporogenes*), maltodextrín (plnidlo), fosforečnan vápenatý E341 (protihrudkujúca látka), stearan horečnatý E470b, transparentná želatínová kapsula

Deklarované množstvo buniek: 6×10^8 CFU v jednej tabletku

5.2 DNA kontrolných bakteriálnych kmeňov

V priebehu práce bola ako pozitívna kontrola použitá DNA z probiotického kmeňa:

- *Lactobacillus gasseri* K7

5.3 Chemikálie

- Agaróza pre elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA štandard Malamité (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- SDS (dodecylsulfát sodný) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- Ethanol 70% (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethanol 96% (Penta, Chrudim, ČR)
- EDTA (ethyléndiamíntetraoctová kyselina) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)

- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Izoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lyzozým (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-báza (Tris-hydroxymethyl-aminomethán) (Serva, Heidelberg, SRN)
- PEG 6000 (polyethylén glykol)

5.4 Roztoky

Roztoky boli pripravované podľa skript Španovej a Ritticha (2010). [36]

5.4.1 Roztoky pre lýzu bakteriálnych buniek

- **0,5 M EDTA (pH 8,0)**
186,1 g EDTA bolo rozpustených v 800 ml destilovanej vody za stáleho miešania na magnetickej miešačke. pH bolo upravené pomocou NaOH na 8,0. Roztok bol doplnený do objemu 1 l destilovanou vodou, rozdelený do alikvotných podielov a sterilizovaný v autokláve 20 minút pri 121 °C.
- **1 M Tris-HCl (pH 7,8)**
12,1 g Tris-bázy bolo rozpustených v 80 ml destilovanej vody. Pomocou koncentrovanej HCl bolo pH upravené na 7,8. Roztok bol doplnený destilovanou vodou do objemu 100 ml a sterilizovaný v autokláve 20 minút pri 121 °C.
- **Lyzačný roztok A**
Roztok bol pripravený zo zásobných roztokov 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0). Bolo zmiešaných 10 ml Tris-HCl (pH 7,8) a 1 ml EDTA (pH 8,0). Roztok bol doplnený destilovanou vodou do objemu 100 ml.
- **Lyzačný roztok B**
K lyzačnému roztoku A bol pridaný lyzozým na výslednú koncentráciu 3,0 mg/ml.
- **20% SDS**
20 g SDS bolo rozpustených v 80 ml sterilnej destilovanej vody pri teplote 68 °C. Roztok bol doplnený do 100 ml destilovanou vodou. Sterilizácia roztoku nebola nutná. Roztok bol uchovaný pri laboratórnej teplote.
- **Proteináza K (1 mg/ml)**
10 mg proteinázy K bolo rozpustených v 10 ml sterilnej destilovanej vody. Roztok bol rozdelený do alikvotných podielov a uchovaný pri teplote -20 °C.

5.4.2 Roztoky pre fenolovú extrakciu

- **Fenol**
Destilovaný fenol (pH 7,8) nasýtený v TE pufri.
- **3 M octan sodný (pH 5,2)**
V 800 ml destilovanej vody bolo rozpustených 408,1 g trihydrátu octanu sodného. Pomocou ľadovej kyseliny octovej bolo pH upravené na 5,2. Roztok bol doplnený destilovanou vodou do 1 000 ml a sterilizovaný 20 minút v autokláve pri 121 °C. Roztok bol rozdelený do alikvótnych podielov a uchovaný pri teplote -4 °C.
- **TE pufor**
Roztok bol sterilne pripravený zo zásobných roztokov 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0). Bolo zmiešaných 1 ml Tris-HCl (pH 7,8), 200 µl EDTA (pH 8,0) a 98,8 ml destilovanej vody.

5.4.3 Roztoky pre separáciu DNA magnetickými nosičmi

- Magnetické nosiče Fkol 77 ox P(HEMA-co-GMA) (2 mg/ml)
Vlastnosti magnetických častíc sú uvedené v Tabuľke 4.
Častice boli syntetizované na ÚMGAU ČR, Praha, Ing. D.Nováková, CSc.

Tabuľka 4: Vlastnosti magnetických častíc

Častica	Polymér	Fe (%)	Dn	Dw	PDI	-COOH (mM/g)
Fkol 77 ox	P(HEMA-co-GMA)	10,02	2,23	2,42	1,81	0,76

5.4.4 Komponenty pre PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- 10xPCR Blue Buffer (Top-Bio, Praha, ČR)
- Zmes dNTP (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery (10 pmol/µl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/µl) (Top-Bio, Praha, ČR)

5.4.5 Roztoky pre agarózovú gélovú elektroforézu

- **0,5 x TBE pufor**
54 g Tris-bázy a 27,5 g kyseliny boritej bolo rozpustených v 600 ml destilovanej vody. Bolo pridaných 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a roztok bol doplnený do 1 000 ml. TBE pufor bol pred použitím 10x nariedený na výslednú koncentráciu.
- **Nanášací pufor Yellow load** (6x koncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR)
- **Fluorescenčné farbivo GoldView** (Ecoli, Bratislava, SR)

5.5 Pomôcky a prístroje

- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, New Jersey, USA)
- Centrifúga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Hybridizačná pec Micro Hybridization Incubator 2000 (Sci Gene, Sunnyvale, USA)
- Laboratórne váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Poľsko)
- Mikrovlnná rúra SMW 2320 (SENCOR, ČR)
- NanoPhotometer (Implen, Munchen, Nemecko)
- Thermocycler PTC – 200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Transluminátor TVR-3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zariadenie pre elektroforézu Easy-Cast, model B1 (Owl Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napätie pre elektroforézu Enduro 300V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Laboratórne sklo, umelohmotný materiál a ostatné laboratórne pomôcky

5.6 Metódy

Uvedené postupy boli robené podľa skript Španovej a Ritticha (2010). Niektoré postupy boli čiastočne pozmenené podľa odporúčaní doc. RNDr. Aleny Španovej, CSc.

5.6.1 Príprava hrubých lyzátov

- Z výrobku boli sterilne odobraté 2 kapsule, ktoré boli utreté ethanolom a rozobrané. Z výrobku bol dvakrát odpipetovaný 1 ml. K prášku a ku kvapkám bol pridaný lyzačný roztok B s lyzozýmom (3 ml na 1 g prášku). Vzorky boli rozsuspendované a inkubované pri laboratórnej teplote 1 hod.
- Následne bolo k 500 µl vzorky prášku pridaných 25 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K (100 µg/ml). K 500 µl vzorky kvapiek bolo pridaných 25 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K (100 µg/ml).
- Hrubé lyzáty buniek boli uchovávané pri teplote -20 °C, aby sa predišlo nožnej degradácii DNA.

5.6.2 Izolácia DNA fenolovou extrakciou

- K 500 µl hrubého lyzátu buniek bol pridaný rovnaký objem fenolu. Zmes bola kývavým pohybom opatrne premiešavaná po dobu 4 minút. Čas bol meraný.
- Vzorky boli centrifugované pri 13 400 ot/min po dobu 3 minút.
- Následne bola odobraná vodná fáza do čistej Eppendorfovej skúmavky.
- K vodnej fázy s DNA bolo pridaných 700 µl zmesi chloroform-isoamylalkohol (24:1) a zmes bola kývavým pohybom opatrne premiešavaná po dobu 4 minút. Čas bol meraný.
- Vzorky boli centrifugované pri 13 400 ot/min po dobu 3 minút.
- Nakoniec bola odobraná vodná fáza s DNA do čistej Eppendorfovej skúmavky.

5.6.3 Zrážanie DNA ethanolom

- K 200 µl vzorky DNA bolo pridaných 10 µl 3 M octanu sodného a vzorka bola premiešaná.
- Následne bolo pridaných 800 µl 96% ethanolu, zmes bola premiešaná a DNA bola zrážaná po dobu 15 minút pri teplote -20 °C.
- Zmes bola centrifugovaná pri 13 400 ot/min po dobu 15 minút a po centrifugácii bol supernatant opatrne odliaty.
- Sediment DNA bol vysušený v exikátore po dobu 20 minút.
- Izolovaná DNA bola rozpustená v 50 µl TE pufru.
- Takto pripravená DNA bola použitá pre spektrofotometrické meranie a PCR.

5.6.4 Izolácia DNA pomocou magnetických mikročastíc z hrubého lyzátu buniek

- Do Eppendorfových skúmaviek bola namiešaná separačná zmes podľa Tabuľky 5, pričom bolo dodržané presné poradie jednotlivých komponent.
- Po zmiešaní všetkých komponent sa zmes 15 minút inkubovala pri laboratórnej teplote.
- Následne bola zmes umiestnená do magnetického separátora, pričom boli magnetické častice separované po dobu 15 minút pri laboratórnej teplote.
- Supernatant bol odobratý do čistej Eppendorfovej skúmavky. K supernatantu bolo pridaných 500 µl 70% ethanolu.
- Vzorka bola premiešaná a magnetické častice boli separované po dobu 2 minút v magnetickom separátore.
- Ethanol bol odobraný a zvyšný ethanol bol odparený pri laboratórnej teplote.
- Izolovaná DNA naviazaná na magnetické častice bola eluovaná do 100 µl TE pufru pri laboratórnej teplote po dobu 30 minút.
- Častice boli separované po dobu 2 minút pomocou magnetického separátora a eluát obsahujúci DNA bol odobraný do čistých Eppendorfových skúmaviek. Takto pripravená DNA bola použitá pre spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA.

Tabuľka 5: Zloženie zmesi pre izoláciu DNA pomocou magnetických mikročastíc

Poradie	Komponenty	Objem (µl)
1.	Sterilná voda	100
2.	5 M NaCl	400
3.	DNA (lyzáť buniek)	100
4.	40% PEG 6000	200
5.	Magnetický nosič	100

5.6.5 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA

- Koncentrácia izolovanej DNA bola meraná spektrofotometricky prístrojom NanoPhotometer, pričom ako referenčná vzorka bol použitý TE pufor.
- V závislosti na očakávanej koncentrácii DNA bolo vybraté viečko (lid) s odpovedajúcimi parametrami pre NanoPhotometer.

- Bola meraná absorbanca v rozmedzí vlnových dĺžok 220 – 320 nm. Z hodnoty absorbancie A_{260} bola stanovená koncentrácia DNA a z pomeru A_{260}/A_{280} bola určená čistota DNA.

5.6.6 Agarózová gélová elektroforéza bakteriálnej DNA

- Do Erlenmeyerovej banky bol pripravený 0,8% agarózový gél z 0,4 g agarózy a 50 ml 0,5x TBE pufru. Zmes bola dôkladne rozvarená v mikrovlnnej rúre a po vychladnutí asi na 60 °C bolo pridaných 2,5 μ l fluorescenčného farbiva GoldView.
- Zmes bola naliata do vaničky s hrebeňom, kde 30 minút tuhla. Po stuhnutí bol hrebeň opatrne vytiahnutý.
- Na polyetylénovej podložke bolo zmiešaných 15 μ l DNA a 3 μ l nanášaného pufru. Zmes bola nanosená do komory gélu.
- Vanička s gélom bola vložená do elektroforetickej vane a prevrstvená 0,5x TBE pufrom.
- Elektroforéza prebiehala pri 60V asi 1 hodinu.
- Zafarbený gél bol pozorovaný na transluminátore v UV svetle.

5.6.7 Polymerázová reťazová reakcia

- Pred použitím boli všetky komponenty rozmrazené, premiešané a scentrifugované.
- Bolo pripravených 25 μ l zmesi pre PCR s matricou DNA zo všetkých vzoriek. Zmes pre PCR bola pripravená v boxe, ktorý bol vyžiarený UV lampou. Komponenty pre PCR boli zmiešané v poradí uvedenom v Tabuľke do 200 μ l Eppenderfových skúmaviek.
- Bola pripravená negatívna kontrola, kde namiesto 1 μ l DNA matrice bolo k 24 μ l PCR zmesi pridaný 1 μ l vody pre PCR.
- Bola pripravená pozitívna kontrola, kde obsahovala DNA matricu (10 ng/ μ l) bakteriálneho kmeňa *Lactobacillus gasser* K7.
- Vzorky obsahujúce všetky komponenty boli premiešané a po krátkej centrifugácii boli umiestnené do termocykleru, na ktorom bol nastavený špecifický amplifikačný program podľa Tabuľky 6.
- Po skončení PCR reakcie boli vzorky použité pre detekciu produktov PCR pomocou gélovej elektroforézy na 1,8% agarózovom géli.

Tabuľka 6: Zloženie zmesi pre PCR

Poradie	Komponenty	Objem (μ l) pre PCR
		<i>Bacteria</i>
1.	Voda pre PCR	19,0
2.	10x reakčný pufr kompletný	2,5
3.	Zmes dNTP (10 mM)	0,5
4.	primery (10 pmol/ μ l)	0,5
5.	primery (10 pmol/ μ l)	0,5
6.	<i>Taq</i> DNA-polymeráza (1U/ μ l)	1,0
7.	Matrica DNA (10 ng/ μ l)	1,0

Tabuľka 7: Zoznam amplifikačných programov

Doména <i>Bacteria</i> program EUBACTER		
94 °C	5 min	30 cyklov
94 °C	30 s	
55 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

PCR pre doménu *Bacteria*

Pre doménu *Bacteria* bola použitá PCR s primery F eub a R eub. Sekvencia primerov je uvedená v Tabuľke.

Tabuľka 8: Špecifické primery pre doménu *Bacteria* [36]

Primery	Sekvencia primerov (5' - 3')	Veľkosť produktov PCR
F eub	TCC TAC GGG AGG GAG GAG T	466 bp
R eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	

5.6.8 Detekcia produktov PCR pomocou agarózovej gélovej elektroforézy

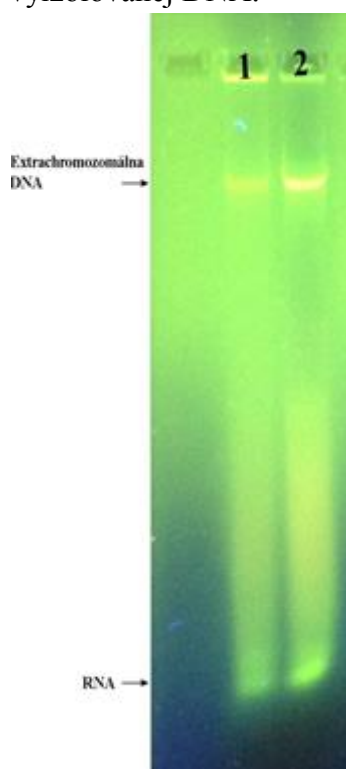
- Do Erlenmeyerovej banky bol pripravený 0,8% agarózový gél z 0,4 g agarózy a 50 ml 0,5x TBE pufru. Zmes bola dôkladne rozvarená v mikrovlnnej rúre, po vychladnutí na 60 °C bolo k zmesi pridaných 2,5 µl fluorescenčného farbiva GoldView.
- Zmes bola naliata do vaničky s hrebeňom, kde bola ponechaná 30 minút na stuhnutie. Po stuhnutí bol hrebeň opatrne odobratý.
- Produkty PCR boli premiešané a krátko scentrifugované. Ku každému produktu PCR bolo pridaných 5 µl nanášacieho pufru.
- Do komory gélu bolo nanosených vždy 20 µl zmesi produktu PCR a nanášaného pufru. Do jednej komory bolo nanosených 5 µl štandardu (100 bp rebríček).
- Vanička s gélom bola vložená do elektroforetickej vane a prevrstvená 0,5x TBE pufrom.
- Elektroforéza prebiehala pri napätí 80V asi 2,5 hodiny.
- Po skončení elektroforézy bol gél pozorovaný na transluminátore v UV svetle.

6 VÝSLEDKY

6.1 Izolácia DNA z probiotických produktov

Hrubé lyzáty buniek z probiotických kvapiek a probiotických tabliet boli pripravené podľa kapitoly 5.5.1. Z výrobku, ktorý obsahovali tabletky, boli použité dve kapsule. Z výrobku, ktorý obsahoval kvapky, bol odpipetovaný 1 ml dva krát. Vzorky lyzátov buniek boli uchovávané pri -20 °C, aby sa predošlo nožnej degradácii DNA.

Izolácia DNA z hrubých lyzátov bola spravená metódou fenolovej extrakcie uvedenej v kapitole 5.5.2 a metódou izolácie DNA pomocou magnetických častíc Fkol 77 ox, ktorej postup je uvedený v kapitole 5.5.4. Prítomnosť a relatívna intaktnosť DNA bola overená pomocou agarózovej gélovej elektroforézy podľa postupu uvedeného v kapitole 5.5.6. Na obrázku možno vidieť prítomnosť vyizolovanej DNA.



Obr. 12 Agarózová gélová elektroforéza s izolovanou DNA

→Z kvapiek výrobku BioLac Baby bola izolovaná DNA metódou fenolovej extrakcie. Izolovaná DNA je v kvalite vhodnej pre PCR. Po amplifikácii DNA boli preukázané špecifické produkty PCR pre doménu *Bacteria*, ktoré boli rôznej intenzity.

6.2 Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie DNA

U vzoriek s DNA izolovanej fenolovou extrakciou a pomocou magnetických častíc bola spektrofotometricky zmeraná absorbancia v rozmedzí vlnových dĺžok 220-320 nm a bola stanovená koncentrácia a čistota DNA podľa postupu uvedeného v kapitole 5.5.5. U výrobku

BioLac Baby a u výrobku Probacílium+ boli prvé dve vzorky izolované fenolovou extrakciou a ďalšie dve vzorky boli izolované pomocou magnetických častíc. Výsledky spektrofotometrického stanovenia sú uvedené v Tabuľke 9.

Tabuľka 9: Spektrofotometrické stanovenie DNA izolovanej fenolovou extrakciou a magnetickými nosičmi v dvoch opakovaníach

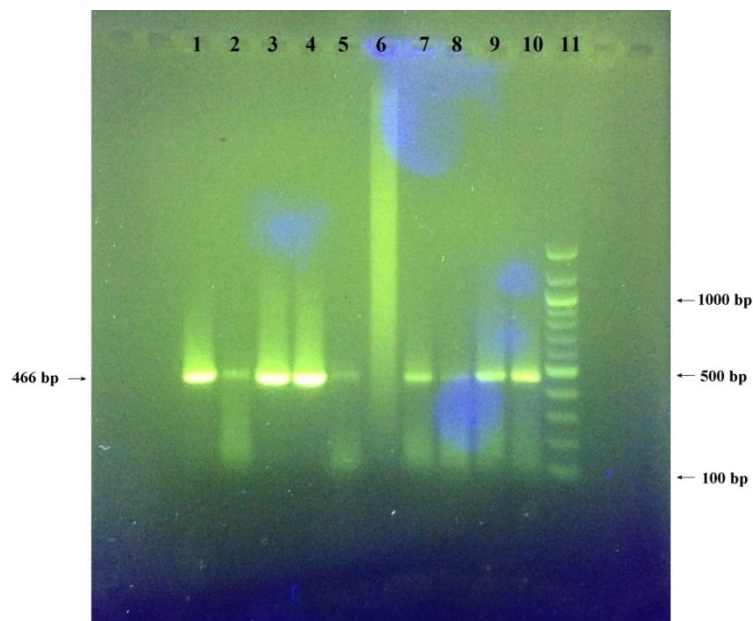
Výrobok	Metóda izolácie DNA	A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}	A _{260nm/A280nm}	c [ng/μl]
BioLac Baby	Fenolová extrakcia	0,482	0,551	0,352	0,022	1,603	264
		0,418	0,690	0,378	0,005	1,836	343
	Magnetické nosiče	0,120	0,120	0,090	0,035	1,545	42,5
		0,012	0,032	0,026	0,003	1,261	7,25
Probacílium+	Fenolová extrakcia	1,177	0,639	0,616	0,088	1,044	276
		1,108	0,474	0,517	0,039	0,910	218
	Magnetické nosiče	-	0,019	0,016	0,007	1,333	3
		-	0,019	0,015	0,006	1,444	3,25

→Z kvapiek výrobku BioLac Baby bola izolovaná DNA metódou fenolovej extrakcie o koncentrácii 264 až 343 ng/μl a pomocou magnetických častíc bola izolovaná DNA o koncentrácii 7,25 až 42,5 ng/μl. Z kapsúl výrobku Probacílium+ bola izolovaná DNA metódou fenolovej extrakcie o koncentrácii 218 až 276 ng/μl a pomocou magnetických častíc bola izolovaná DNA o koncentrácii 3 až 3,25 ng/μl. Z pomeru A_{260nm}/A_{280nm} vyplýva, že DNA bola znečistená proteínmi.

6.3 Polymerázová reťazová reakcia

Po zmeraní koncentrácie DNA boli vzorky s vyššou koncentráciou DNA nariadené na koncentráciu 10 ng/μl. Vzorky, ktorých koncentrácia bola 3, 3,25 a 7,25 ng/μl nariadené neboli. Vzorky boli pripravené na použitie pre amplifikáciu v PCR.

Prítomnosť bakteriálnej DNA bola overená metódou PCR s primérmí špecifickými pre doménu *Bacteria* podľa postupu uvedeného v kapitole 3.5.7. Výsledky PCR pre fenolovú extrakciu, pozitívnu a negatívnu kontrolu a magnetické častice sú uvedené na Obrázku. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA bakteriálneho kmeňa *Lactobacillus gasseri* K7 (10 mg/μl).



Obr. 13: Agarózová gelová elektroforéza produktov PCR špecifického pre doménu *Bacteria*.

Tabuľka 10: Detekcia produktov PCR

Beh	Metóda DNA izolácie	Výrobok	Vzorka DNA	Detekcia produktu PCR
1			Pozitívna kontrola	silná
2			Negatívna kontrola	slabá
3	Fenolová extrakcia	BioLac Baby	1	silná
4			2	silná
5		Probacilium+	3	slabá
6			4	nedetegovaný
7	Magnetické častice	BioLac Baby	1	zreteľná
8			2	slabá
9		Probacilium+	3	zreteľná
10			4	zreteľná
11			DNA štandard	

→Bola izolovaná DNA v kvalite vhodnej pre PCR. Pre amplifikáciu DNA boli preukázané špecifické produkty PCR pre doménu *Bacteria*. Produkty PCR boli v rôznej intenzite. Pozitívna kontrola poukázala na silnú detekciu produktu PCR a negatívna kontrola bola slabo detegovaná, čo mohlo byť spôsobené zlým namiešaním zmesi pre PCR. U výrobku BioLac Baby bola DNA izolovaná metódou fenolovej extrakcie silne detegovaná a u výrobku Probacilium+ bola DNA izolovaná metódou fenolovej extrakcie v piatom behu slabo detegovaná a v šiestom behu nebola detegovaná. U výrobku BioLac Baby bola DNA izolovaná pomocou magnetických častíc v siedmom behu zreteľne detegovaná a v ôsmom

behu slabo detegovaná. U výrobku Probacílium+ bola izolovaná DNA pomocou magnetických častíc v deviatom a desiatom behu zreteľne detegovaná.

7 DISKUSIA

7.1 Izolácia DNA z potravinových doplnkov pre deti

Z dvoch potravinových výrobkov pre deti (BioLac Baby a Probacílium+) bola izolovaná DNA metódou fenolovej extrakcie s následným zrážaním ethanolom a pomocou magnetických častíc Fkol 77 ox P(HEMA-co-GMA). Podľa spravenej agarózovej gélovej elektroforézy bola dokázaná prítomnosť DNA. [36]

Amplifikačné metódy sú najčastejšie využívanými metódami identifikácie baktérií a sú založené na analýze nukleotidovej sekvencie kódujúcej 16S rRNA alebo oblasti medzi génmi pre 16S rRNA a 23S rRNA. [37]

Na zistenie koncentrácie a čistoty nukleových kyselín bola zmeraná absorbanca na NanoPhotometre v rozmedzí vlnových dĺžok 230-320 nm. Čistota DNA bola stanovená z pomeru absorbancií $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ a mal by sa pohybovať medzi 1,8 až 2,0. Ak je tento pomer menší ako 1,8, vzorka obsahuje proteíny. Ak je tento pomer väčší ako 2,0, vzorka obsahuje RNA. [38] Tento pomer izolovanej DNA metódou fenolovej extrakcie sa pohyboval v rozmedzí 0,910 až 1,836 a pomer izolovanej DNA pomocou magnetických častíc sa pohyboval v rozmedzí 1,261 až 1,545. Z výsledkov merania vyplýva, že vzorky obsahovali určité množstvo proteínov. Pre amplifikáciu v PCR boli vzorky nariedené na 10 ng/μl, preto boli nariedené aj proteíny, ktoré by inak mohli interferovať v PCR. [36]

Koncentrácia DNA bola stanovená z hodnoty $A_{260\text{nm}}$. Koncentrácia izolovanej DNA metódou fenolovej extrakcie sa u výrobku BioLac Baby pohybovala v rozmedzí 264 až 343 ng/μl a u výrobku Probacílium+ sa pohybovala v rozmedzí 218 až 276 ng/μl. Koncentrácia izolovanej DNA pomocou magnetických častíc sa u výrobku BioLac Baby pohybovala v rozmedzí 7,25 až 42,5 ng/μl a u výrobku Probacílium+ sa pohybovala v rozmedzí 3 až 3,25 ng/μl.

Z výsledkov vyplýva, že koncentrácia DNA má veľké rozmedzie, ale bola vyizolovaná v koncentrácii a čistote vyhovujúcej PCR.

7.2 Dôkaz prítomnosti bakteriálnej DNA

DNA bola izolovaná v kvalite vhodnej pre PCR a prítomnosť bakteriálnej DNA bola preukázaná v potravinových doplnkoch pre deti pomocou PCR pre doménu *Bacteria* so špecifickými primérmí F-eub a R-eub podľa programu EUBACTER. Po amplifikácii boli agarózovou gélovou elektroforézou na 0,8% agarózovom géli detekované špecifické produkty PCR, ktoré mali rôznu intenzitu a mali veľkosť 466 bp. Rôzna intenzita produktov PCR sa dá vysvetliť rôznym množstvom DNA v použitej zmesi PCR.

8 ZÁVER

Teoretická časť bakalárskej práce sa zaoberá vývojom jednotlivých názorov na probiotiká, kultúrami používanými ako probiotiká, ich vlastnosťami a pozitívnymi účinkami na človeka. Popisuje osídľovanie gastrointestinálneho traktu od narodenia a baktérie tráviaceho traktu v spojitosti s prirodzenou mikroflórou a vplyv probiotík na jej kvalitu. Práca bližšie charakterizuje jednotlivé baktérie mliečneho kvasenia a ich vlastnosti, ktoré sú dôležité pre potravinársky priemysel a komerčné využitie. Rozsiahla časť práce je venovaná výžive detí od narodenia a probiotikám, ktoré sa využívajú v detskej výžive. Okrem prirodzených probiotík ako je materské mlieko, existujú rôzne formuly na báze materského mlieka alebo rôzne potravinové doplnky pre deti, ktoré majú preukázateľný účinok na ich zdravie.

V experimentálnej časti bakalárskej práce bola izolovaná DNA z dvoch potravinových výrobkoch pre deti (BioLac Baby a Probacílium+). Izolácia DNA v kvalite vhodnej pre polymerázovú reťazovú reakciu bola pripravená metódou fenolovanej extrakcie s následným zrážaním ethanolom. Pomocou primérov špecifických pre doménu *Bacteria* bola vo výrobkoch preukázaná prítomnosť bakteriálnej DNA.

ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome: World Health Organization, 2006, viii, 50 p. ISBN 92-510-5513-0.
- [2] GORDON, Siamon. Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. *European Journal of Immunology*. 2008, vol. 38, issue 12, s. 3257-3264. DOI: 10.1002/eji.200838855. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200838855>
- [3] RUSCH, Volker. *PROBIOTICS AND DEFINITIONS: A SHORT OVERVIEW* [online]. 2002 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: http://www.old-herborn-university.de/publications/books/OHUni_book_15_article_1.pdf
- [4] *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome: World Health Organization, 2006, viii, 50 p. ISBN 92-510-5513-0.
- [5] BUTEL, M.-J. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2014, vol. 44, issue 1, s. 1-8. DOI: 10.1016/j.medmal.2013.10.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0399077X13003077>
- [6] HILL, Colin, Francisco GUARNER, Gregor REID, Glenn R. GIBSON, Daniel J. MERENSTEIN, Bruno POT, Lorenzo MORELLI, Roberto Berni CANANI, Harry J. FLINT, Seppo SALMINEN, Philip C. CALDER a Mary Ellen SANDERS. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology*. 2014-6-10, vol. 11, issue 8, s. 506-514. DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrgastro.2014.66> [] *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome: World Health Organization, 2006, viii, 50 p. ISBN 92-510-5513-0.
- [7] HSIEH, Michael H. a James VERSALOVIC. The Human Microbiome and Probiotics: Implications for Pediatrics. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*. 2008, vol. 38, issue 10, s.309-327. DOI:10.1016/j.cppeds.2008.09.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153854420800093X>
- [8] VASILJEVIC, T. a N.P. SHAH. Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*. 2008, vol. 18, issue 7, s. 714-728. DOI: 10.1016/j.idairyj.2008.03.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694608000447>
- [9] ZBOŘIL, Vladimír. *Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti*. 1. vyd. Praha: Grada, 2005, 153 s. ISBN 80-247-0584-2
- [10] CHASSARD, Christophe, Tomas DE WOUTERS a Christophe LACROIX. Probiotics tailored to the infant: a window of opportunity. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, vol. 26, s.141-147. DOI:10.1016/j.copbio.2013.12.012.
- [11] HRUBIŠKO, Martin. *Probiotiká ako súčasť imunitného systému človeka*. Bratislava: Bonus, 2012. ISBN 978-80-96-97337-8.
- [12] SÝKORA, Josef, SCHWARZ, Jan, SIALA, Konrád. Probiotika a dětský věk. *Pediatric pro praxi*. 2006, roč. 2006, č. 5, s. 264-270.

- [13] KLAENHAMMER, T., et al. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005,29, 393–409 [] *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome: World Health Organization, 2006, viii, 50 p. ISBN 92-510-5513-0.
- [14] GÖRNER, F., VALÍK, L. Aplikovaná mikrobiológia požívateľín. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, TYPOSET, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [15] FOLIGNÉ, Benoit, Catherine DANIEL a Bruno POT. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*. 2013, vol. 16, issue 3, s. 284-292. DOI: 10.1016/j.mib.2013.06.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527413000829>
- [16] FACKLAM, R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002-10-01, vol. 15, issue 4, s. 613-630. DOI: 10.1128/CMR.15.4.613-630.2002. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.15.4.613-630.2002>
- [17] HAAKENSEN, M., C. M. DOBSON, J. E. HILL a B. ZIOLA. Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) Back 1978 (Approved Lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2009-03-01, vol. 59, issue 3, s. 615-621. DOI: 10.1099/ijs.0.65779-0. Dostupné z: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.65779-0>
- [18] BREUER, Uta. *Lactobacillus* Molecular Biology. From Genomics to Probiotics. *Biotechnology Journal*. 2009, vol. 4, issue 5, s. 769-769. DOI: 10.1002/biot.200900113. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200900113>
- [19] ANJUM, Nazia, Shabana MAQSOOD, Tariq MASUD, Asif AHMAD, Asma SOHAIL a Abdul MOMIN. *Lactobacillus acidophilus*: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014-02-05, vol. 54, issue 9, s. 1241-1251. DOI: 10.1080/10408398.2011.621169. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.621169>
- [20] SIEZEN, Roland J. a Greer WILSON. Probiotics genomics. *Microbial Biotechnology*. 2010, vol. 3, issue 1, s. 1-9. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2009.00159.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-7915.2009.00159.x>
- [21] MAYO, Baltasar a Douwe van SINDEREN. *Bifidobacteria: genomics and molecular aspects*. Norfolk, UK: Caister Academic, 2010, xii, 259 p., 2 p. of plates. ISBN 19-044-5568-9.
- [22] BAFFONI, Loredana, Verena STENICO, Erwin STRAHSBURGER, Francesca GAGGIÀ, Diana DI GIOIA, Monica MODESTO, Paola MATTARELLI a Bruno BIAVATI. Identification of species belonging to the *Bifidobacterium* genus by PCR-RFLP analysis of a *hsp60* gene fragment. *BMC Microbiology*. 2013, vol. 13, issue 1, s. 149-. DOI: 10.1186/1471-2180-13-149. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/13/149>

- [23] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
- [24] AMYES, Sebastian G.B. Enterococci and streptococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007, vol. 29, S43-S52. DOI: 10.1016/S0924-8579(07)72177-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857907721775>
- [25] JAY, James M. *Modern food microbiology*. 6th ed. Gaithersburg, Md: Aspen Publishers, 2000, xvi, 679 p. ISBN 08-342-1671-X.
- [26] MADIGAN, Michael T, John M MARTINKO a Thomas D BROCK. *Brock biology of microorganisms*. 11th ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2006, p. ISBN 01-314-4329-1.
- [27] KULWICHIT, Wanla, Sumanee NILGATE, Tanittha CHATSUWAN, Sunisa KRAJIW, Chudaachhara UNHASUTA a Anan CHONGTHALEONG. Accuracies of Leuconostoc phenotypic identification: a comparison of API systems and conventional phenotypic assays. *BMC Infectious Diseases*. 2007, vol. 7, issue 1. DOI: 10.1186/1471-2334-7-69. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/7/69>
- [28] HAAKENSEN, M., C. M. DOBSON, J. E. HILL a B. ZIOLA. Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) Back 1978 (Approved Lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2009-03-01, vol. 59, issue 3, DOI: 10.1099/ijs.0.65779-0. Dostupné z: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.65779-0>
- [29] TLÁSKAL, Petr. Historie a současnost počáteční dětské výživy. *Pediatric pro praxi*. 2008, roč. 2008, č. 9(2), s. 86-92.
- [30] TRIPATHI, M.K. a S.K. GIRI. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 2014, vol. 9, s. 225-241. DOI: 10.1016/j.jff.2014.04.030. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464614001716>
- [31] FERNÁNDEZ, Leónides, Susana LANGA, Virginia MARTÍN, Antonio MALDONADO, Esther JIMÉNEZ, Rocío MARTÍN a Juan M. RODRÍGUEZ. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*. 2013, vol. 69, issue 1, s. 1-10. DOI: 10.1016/j.phrs.2012.09.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104366181200165X>
- [32] CHIU, Yi-Heng, Jaw-Ji TSAI, Shiao-Lin LIN, Chanita CHOTIROSVAKIN a Meei-Yn LIN. Characterisation of bifidobacteria with immunomodulatory properties isolated from human breast milk. *Journal of Functional Foods*. 2014, vol. 7, s. 700-708. DOI:10.1016/j.jff.2013.12.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464613003095>
- [33] KOVÁCS, László. *Pediatrics*. Bratislava: ARETE s.r.o., 2014. ISBN 9788097062422.

[34] KENT, Robert M. a Sinéad B. DOHERTY. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *Food Research International*. 2014, vol. 64, s. 567576.

DOI:10.1016/j.foodres.2014.07.029.

Dostupné

z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996914005067>

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

[36] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.

[37] LISBY G. PCR in Bioanalysis. Vol. 92. Humana Press, 1998. ISBN 978-1-59259-575-4. Application of Nucleic Acid Amplification in Clinical Microbiology, pp. 1 – 29.

[38] BROWN T. A. Klonování genů a analýza DNA: úvod. 1. české vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.

[39] Obr. 2: *Corbis* [online]. Text v angličtině.

Dostupné z:

<http://www.corbisimages.com/stock-photo/rights-managed/42-23598263/streptococcus-thermophilus-grampositive?popup=1>

[40] Obr. 3: *Microbewiki* [online]. Text v angličtině.

Dostupné z: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus_brevis

[41] Obr. 4: *Enviromental information* [online]. Text v angličtině.

Dostupné z: <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/en/node/9638>

[42] Obr. 5: *PhotoBucket* [online]. Text v angličtině.

Dostupné z: <http://s141.photobucket.com/user/kskerr/media/Plate.jpg.html>

[43] Obr. 6: *Wikipedia* [online]. Text v angličtině.

Dostupné z:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c1/Vancomycin-Resistant_Enterococcus_01.jpg

[44] Obr. 7: *Copper competence center* [online]. Text v angličtině.

Dostupné z: <http://www.ikp.unibe.ch/lab1/>

[45] Obr. 8: *Todar's online textbook of bacteriology* [online]. Text v angličtině.

Dostupné z: http://textbookofbacteriology.net/featured_microbe.html

[46] Obr. 9: *Miniatlas VŠCHT* [online]. Text v češtině.

Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/lac-2.htm>

[47] Obr.10: *SCIMAT 2013* [online]. Text v angličtine.

Dostupné z: <http://www.magma.ca/~scimat/science/Leuconostoc.htm>

[48] Obr.11: *Institute of Tropics and Subtropics* [online]. Text v angličtine a češtine.

Dostupné z: <http://parasites.czu.cz/food/parasite.php?idParasite=43>

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ATP	adenozíntrifosfát
BMK	baktérie mliečneho kvasenia
bp	base paire
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxynukleosid-5'-trifosfát
EDTA	ethyléndiamíntetraoctová kyselina
FAO	Food and Agriculture Organization
GIT	gastrointestinálny trakt
MO	mikroorganizmy
PCR	polymerázová reťazová reakcia
SDS	dodecylsulfát sodný
WHO	World Health Organization