



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA PŘÍTOMNOSTI PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ V MLÉČNÝCH POTRAVINOVÝCH VÝROBCÍCH POMOCÍ TECHNIKY PCR

DETECTION OF PROBIOTIC BACTERIA IN MILK DIARY FOOD PRODUCTS USING PCR TECHNIQUE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Vladimíra Krempaská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1745/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Vladimíra Krempaská**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biochemická technologie
Vedoucí práce: **Mgr. Jan Smetana, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Analýza přítomnosti probiotických bakterií v mléčných potravinových výrobcích pomocí techniky PCR

Zadání bakalářské práce:

- 1) literární rešerše
- 2) zvládnutí techniky izolace bakteriální DNA z mléčných potravinových produktů
- 3) kvantifikace a kontrola kvality DNA
- 4) zvládnutí techniky PCR a interpretace jejich výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Vladimíra Krempaská
studentka

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Probiotické baktérie zohrávajú významnú úlohu v zdravom životnom štýle. Konzumentovi napomáhajú udržiavať rovnováhu črevnej mikroflóry a zabraňujú premnoženiu škodlivými baktériami. Dôkladná identifikácia a charakterizácia týchto probiotických kmeňov je nevyhnutná pre mnohé oblasti aplikovaného výskumu a potravinárskeho priemyslu. Na presnú identifikáciu je potrebné využitie molekulárne-biologických metód, vďaka ktorým je možné validovať probiotické výrobky na komerčné účely. V rámci tejto bakalárskej práce bola izolovaná DNA probiotických baktérií z komerčne dostupných mliečnych výrobkov. Na izoláciu bakteriálnej DNA boli použité dve metódy izolácie, kde obe poskytli dostatočne koncentrovanú a kvalitnú DNA pre ďalšiu analýzu pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Vo vybratých vzorkách mliečnych produktov bola dokázaná prítomnosť domény *Bacteria* a pri rodovo-špecifickej amplifikácii taktiež aj prítomnosť rodov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Nakoniec bol vo výrobkoch detegovaný aj výskyt druhu *Lactobacillus acidophilus*.

ABSTRACT

Probiotic bacteria play an important role in a healthy lifestyle. They help the consumer maintain the balance of intestinal microflora and prevent the overgrowth of harmful bacteria. Accurate identification and characterization of these probiotic strains is essential for research and the food industry. For exact identification, the use of molecular biological methods is necessary, thanks to which it is possible to validate probiotic products for commercial use. In this bachelor thesis, the DNA of probiotic bacteria was isolated from available dairy products. Two methods of isolation were used to isolate bacterial DNA, both of them provided sufficiently concentrated and high-quality DNA for further analysis by polymerase chain reaction (PCR). The presence of the *Bacteria* domain, genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were proved. Finally, the presence of *Lactobacillus acidophilus* species was also detected in the products.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Probiotické baktérie, qPCR, *Bacteria*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, mliečne produkty

KEYWORDS

Probiotic bacteria, qPCR, *Bacteria*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, dairy products

BIBLIOGRAFICKÁ CITÁCIA

KREMPASKÁ, Vladimíra. *Analýza prítomnosti probiotických baktérií v mléčných potravinových výrobcích pomocí techniky PCR*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139203>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jan Smetana.

ČESTNÉ PREHLÁSENIE

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

.....
Podpis študenta

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som sa chcela poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce, pánovi Mgr. Janovi Smetanovi, Ph.D. hlavne za jeho odborné vedenie, cenné pripomienky a poskytovanie častých konzultácií v priebehu práce.

OBSAH

1 ÚVOD	5
2 TEORETICKÁ ČASŤ	6
2.1 História objavu probiotických baktérií	6
2.2 Klasifikácia baktérií mliečneho kvasenia a probiotických baktérií	7
2.3 Fermentované mliečne výrobky a zdravie	9
2.4 Charakteristika prebiotík	10
2.5 Metódy identifikácie mikroorganizmov	11
2.5.1 História vývoja molekulárnej biológie	13
2.5.2 Extrakcia DNA	14
2.5.3 Kvantifikácia nukleových kyselín	14
2.5.4 Polymerázová reťazová reakcia	15
2.5.5 Gélová elektroforéza	18
3 CIEĽ PRÁCE	20
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	21
4.1 Použité mliečne výrobky s obsahom probiotických baktérií	21
4.2 Použité pomôcky a prístroje	22
4.3 Použité chemikálie a roztoky	23
4.3.1 Chemikálie a roztoky potrebné na prípravu hrubého lyzátu buniek z mliečnych výrobkov	23
4.3.2 Chemikálie a roztoky potrebné na izoláciu DNA pomocou fenol-chloroformovej extrakcie	24
4.3.3 Chemikálie a roztoky potrebné na izoláciu DNA pomocou izolačného kitu	24
4.3.4 PCR komponenty	24
4.3.5 Chemikálie a roztoky potrebné na prevedenie gélovej elektroforézy	25
4.4 Metódy	26
4.4.1 Príprava bakteriálnych buniek	26
4.4.2 Izolácia bakteriálnej DNA z mliečnych výrobkov	27
4.4.3 Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie DNA	29
4.4.4 Polymerázová reťazová reakcia	29
4.4.5 Gélová elektroforéza PCR produktov	32
5 VÝSLEDKY	33
5.1 Príprava bakteriálnych buniek	33
5.2 Izolácia bakteriálnej DNA z mliečnych výrobkov	34

5.3 Špecifická real-time PCR pre doménu <i>Bacteria</i>	35
5.4 Špecifická real-time PCR pre rod <i>Lactobacillus</i>	38
5.5 Špecifická real-time PCR pre rod <i>Bifidobacterium</i>	42
5.6 Špecifická real-time PCR pre druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	44
6 DISKUSIA.....	46
6.1 Izolácia DNA z čistých bakteriálnych kultúr	46
6.2 Izolácia bakteriálnej DNA z komerčne dostupných mliečnych výrobkov	46
6.3 Spektrofotometrická kvantifikácia nukleových kyselín	47
6.4 Špecifická real-time PCR pre doménu <i>Bacteria</i>	48
6.5 Špecifická real-time PCR pre rod <i>Lactobacillus</i>	48
6.6 Špecifická real-time PCR pre rod <i>Bifidobacterium</i>	49
6.7 Špecifická real-time PCR pre druh <i>Lactobacillus acidophilus</i>	50
7 ZÁVER.....	52
8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	53
9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	62

1 ÚVOD

V potravinárskom priemysle sa ako probiotiká všeobecne využívajú baktérie mliečneho kvasenia, ktoré majú najväčší výskyt v mliečnych potravinových výrobkoch. Sú to teda primárne nepatogénne druhy baktérií, hlavne z rodov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Zdravotné benefity konzumácie mliečnych výrobkov sa začali dostávať do povedomia už začiatkom 19. storočia, ale v tej dobe neboli ešte dostatočné znalosti, čo vlastne spôsobuje tieto prospešné vlastnosti pre konzumenta. Vďaka vedeckému napredovaniu je už známe, že práve probiotické baktérie sú tie elementy, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v rozmanitosti potravy a zdravom životnom štýle. Do jedálneho líčka môžu byť zahrnuté buď pomocou výživových doplnkov alebo na základe pravidelnej konzumácie mliečnych produktov. Majú ďalej veľké uplatnenie pri liečbe tráviaceho ústrojenstva, kde sú vhodnou prevenciou pred gastrointestinálnymi infekciami a akútnymi hnačkami. K ďalším dôležitým zdravotným výhodám patrí antioxidantná aktivita, schopnosť zníženia hladiny cholesterolu alebo cytotoxický účinok proti rakovinotvorným bunkám. Pri ich konzumácii sa dokonca potvrdilo zníženie rizika cukrovky typu 2 a cievnych chorôb. Fermentované produkty sa dokonca odporúčajú na konzumáciu osobám s laktózovou intoleranciou.

V spojitosti s probiotikami sú častokrát spomínané aj prebiotiká, ktorých zdravotné prínosy sú tiež veľmi dôležité. V tomto prípade sa však prebiotiká necharakterizujú ako mikroorganizmy, ale sú to nestráviteľné oligosacharidy, ktoré stimulujú rast probiotických baktérií. Celkovo ich môžeme charakterizovať ako funkčné zložky, prirodzene sa vyskytujúce v rastlinných a živočíšnych produktoch, ktorým sa venuje značná pozornosť vo farmaceutickom a potravinárskom priemysle. Majú taktiež pozitívne uplatnenie v znižovaní rizika rakoviny hrubého, cukrovky 2. typu a obezity.

Ak je na etiketách rôznych mliečnych výrobkov alebo výživových doplnkov výrobcom deklarovaná prítomnosť probiotických baktérií, musí byť ich výskyt zistený pomocou rôznych analytických metód. V praxi sa ich prítomnosť najčastejšie skúma na základe využitia molekulárne-biologických metód, ktoré primárne fungujú na analýze bakteriálnej DNA. K pomerne k najjednoduchšej, najrýchlejšej a najčastejšie používanej analýze patrí polymerázová reťazová reakcia (PCR).

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 História objavu probiotických baktérií

Fermentované mliečne výrobky (FMV) boli hlavnou súčasťou ľudskej stravy už tisícky rokov [1]. Slovo probiotikum je odvodené z latinského slova „*probios*“, čo v preklade znamená „*pre život*“. Tento termín ako prví použili vedci Lilley a Stillwell vo svojej štúdií z roku 1965 [2], čím označili látku vylučovanú jedným mikróbom, ktorá stimulovala rast iného mikroorganizmu. V roku 2001 Organizácia Spojených národov pre výživu a poľnohospodárstvo predefinovala probiotiká ako „*živé mikroorganizmy, ktoré v primeranom množstve poskytujú hostiteľovi zdravotný prínos*“ [3; 4]. Vo viacerých literárnych zdrojoch je uvedené, že FMV boli spontánne objavené v regiónoch s nízkou vlhkosťou a vysokými teplotami (oblasti Strednej Ázie a Blízkeho východu). Sú teda výsledkom prirodzeného fermentačného procesu vo vakoch zo zvieracej kože, ktoré boli používané na prepravu vody a mlieka [5].

Zdravotný účinok konzumácie FMV si vedci začali všimáť už začiatkom 19. storočia, no v tomto období nebolo ešte možné ich efekt na konzumenta dostatočne preskúmať. V tejto súvislosti je často spomínaný vedec a lekár Louis Pasteur, ktorý identifikoval baktérie a kvasinky zodpovedné za fermentačné procesy, ktoré sú aj dnes využívané v potravinárskom priemysle [6]. Tieto objavené mikroby však nespájali so žiadnymi prospešnými zdravotnými účinkami. Zdravotné benefity sa začali objasňovať však neskôr okolo roku 1905 [7], kedy ruský prírodovedec Ilja Iljič Mečnikov spojil svoju štúdiu s dlhým životom bulharských obyvateľov vidieka a s ich pravidelnou konzumáciou FMV. Naznačil, že laktobacily obsiahnuté v týchto matriciach môžu pôsobiť proti hnilobným účinkom gastrointestinálneho metabolizmu, ktoré prispievajú k rôznym ochoreniam a starnutiu. Za tento objav bol ocenený aj Nobelovou cenou za medicínu [8].

Za posledné storočie je probiotickým baktériám venovaná patričná pozornosť. S vývojom techniky bol zaznamenaný aj exponenciálny nárast od roku 2000 v počte klinických štúdií, založených na testovaní bezpečnosti týchto produktov a špecifikácii jednotlivých probiotických kultúr v boji proti rôznym ochoreniam [7]. V roku 2014 Svetová gastroenterologická organizácia definovala 3 široké kategórie probiotík [9]:

1. Tie, ktoré nemajú žiadne potvrdené zdravotné benefity.
2. Ako zdravotné doplnky so špecifickým zdravotným účinkom.
3. Ako probiotické liečivá.

2.2 Klasifikácia baktérií mliečného kvasenia a probiotických baktérií

FMV zahrňujú rozsiahlu skupinu mliečnych produktov, do ktorej patria kyslé a acidofilné mlieka, kefíry, kyslé smotany a aj jogurty [10]. Na trhu však existuje veľa variácií týchto výrobkov, ktoré sú založené na historických postupoch a tradíciách, ako aj na použitom type mlieka. Pri výrobe FMV sa uplatňuje výber vhodných baktérií do zvyčajne tepelne upraveného (kravského) mlieka. Baktérie mliečného kvasenia (BMK) sú hlavnými mikróbmi používanými pri fermentácii mliečnych výrobkov [11].

V mliečnom potravinárskom priemysle sa používajú nepatogénne baktérie rodov *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc*, ktoré sú buď používané ako štartovacie kultúry, alebo ako prirodzene vyskytujúce sa zložky. Jogurty však môžu obsahovať aj pridané probiotické rody ako *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, ktoré sú regulované ako doplnky výživy [11]. Z biologického hľadiska väčšinu týchto kultúr radíme do skupiny grampozitívnych (G^+) a nesporulujúcich baktérií s prísne fermentatívnym metabolizmom, z ktorého kľúčovým metabolitom je kyselina mliečna [6].

Rod Lactobacillus a jeho špecifické kmene s probiotickými vlastnosťami

Rod *Lactobacillus* zahŕňa rôzne G^+ fakultatívne anaeróbne alebo mikro-aerofilné tyčinkovité baktérie, ktoré sú hlavnou súčasťou skupiny BMK. Je to vysoko heterogénny rod, ktorý zahŕňa baktérie so širokým rozsahom biochemických a fyziologických vlastností [12]. Tento rod pozostáva z viac ako 170 rôznych druhov a mnohé z nich majú široké uplatnenie v mliekarenskom priemysle. Veľmi významný je napríklad druh *L. bulgaricus*, ktorý sa uplatňuje hlavne pri výrobe jogurtov. Ďalej známy a veľmi dobre zdokumentovaný probiotický druh je *L. acidophilus*, ktorý má široké komerčné využitie pri výrobe FMV. K ďalším známym druhom využívajúcim sa pre ich probiotické vlastnosti patria *L. helveticus*, *L. johnsonii* a *L. kefirifaciens* [13].



Obr. 1: Ukážka rodu *Lactobacillus* [14]

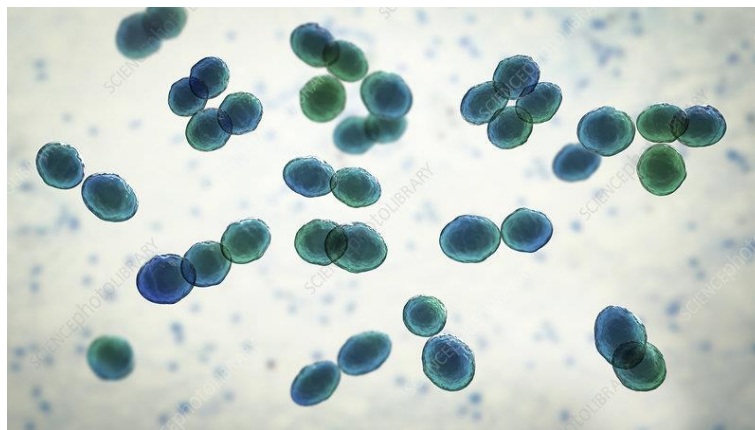
Rod Streptococcus a jeho špecifické kmene s probiotickými vlastnosťami

Rod *Streptococcus* zahŕňa viacero patogénnych druhov, ktoré spôsobujú hnisavé ochorenia, angínu, zubné kazy apod. [15]. U ostatných druhov boli však identifikované probiotické vlastnosti. Všeobecne rod *Streptococcus*, tvorí G⁺ nesporulujúce, fakultatívne anaeróbne kokovité baktérie, ktoré sú usporiadané väčšinou v pároch alebo reťazkách [16].

Radí sa tu druh *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, ktorý je často využívaný ako štartovacia kultúra pri výrobe syrov, jogurtov a ďalších mliečnych výrobkov [17]. Pre tento druh je charakteristická tolerancia vyšších teplôt a nízkeho pH, no je fyziologicky a biochemicky menej univerzálny ako iné baktérie mliečneho kvasenia [18].

Rod Lactococcus a jeho špecifické kmene s probiotickými vlastnosťami

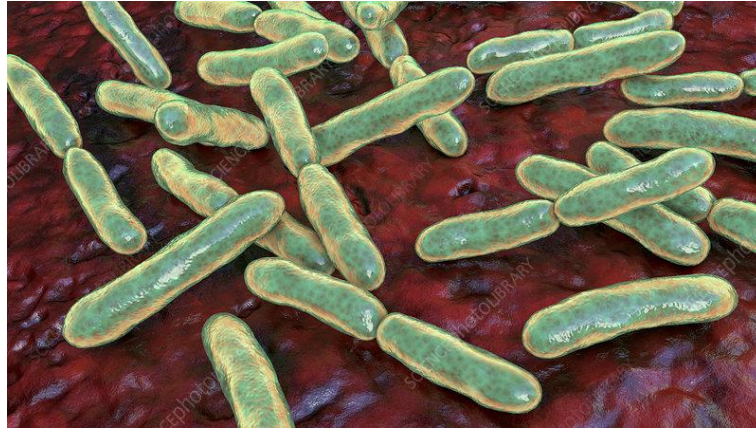
V mliekarenskom priemysle je najčastejšie využívaný druh *Lactococcus lactis*, ktorý sa už po stáročia využíva pri fermentácii mliečnych výrobkov. Výrobkom dodáva charakteristickú chuť a vďaka produkcii kyselín sa vyznačuje aj schopnosťou konzervácie potravín. Táto schopnosť je spôsobená hlavne kvôli schopnosti produkcie bakteriocídneho peptidu nazývaného nizín [11]. Ako ďalší využívaný je druh *Lactococcus thermophilus*, ktorého optimálna teplota sa pohybuje v rozmedzí 40 až 45 °C. Je súčasťou zákvasu pre výrobu jogurtov a syru ementálskeho typu [15].



Obr. 2: Ukážka rodu *Lactococcus* [19]

Rod Bifidobacterium a jeho špecifické kmene s probiotickými vlastnosťami

Tento rod patrí medzi hlavných predstaviteľov črevnej mikroflóry cicavcov a je taktiež známy aj vďaka schopnosti poskytnutia hostiteľovi celý rad zdravotných výhod. Najznámejším a najvyužívanejším zástupcom je *Bifidobacterium longum*, no poznáme aj ďalšie ako napríklad *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis subsp. animalis*, *B. animalis subsp. lactis*, *B. bifidum* a *B. breve* [20].



Obr. 3: Ukážka rodu *Bifidobacterium* [21]

2.3 Fermentované mliečne výrobky a zdravie

Rovnováha črevných mikróbov, inak súhrne nazývaných aj mikrobiota, je pod stálym a neželaným tlakom novodobého životného štýlu. Ten zahŕňa nadmerné používanie liekov, chronický negatívny stres, znečistené prostredie a nesprávnu výživu. Odolnosť zdravej mikroflóry chráni človeka pred zápalovými ochoreniami čriev alebo metabolickými poruchami [22]. V ľudskom čreve sa nachádza približne 10^{14} mikróbov, čo predstavuje 10-násobok počtu eukaryotických buniek. Toto množstvo sa v konečnom dôsledku podieľa na 1,5 – 2 kg celkovej telesnej hmotnosti človeka [23].

Mnohé štúdie preukázali významné schopnosti probiotík z medicínskeho hľadiska, ako je prevencia gastrointestinálnych infekcií, kde sa dokonca môže zlepšiť celkové zdravie čriev. Ďalej sa často spomína antioxidantná aktivita, schopnosť zníženia hladiny cholesterolu, zníženie rizika cukrovky 2. typu, zníženie rizika srdcovo cievnych chorôb, prevencia hnačiek, redukcia hmotnosti alebo cytotoxický účinok na rakovinou tvorné bunky [24].

Probiotické baktérie a ich aplikácia v medicíne

Probiotiká sa považujú za bezpečné a dobre znášané. Ich využitie sa uplatňuje hlavne pri liečbe tráviaceho ústrojenstva, kde aplikujú svoje priaznivé účinky rôznymi mechanizmami. Patrí tu napríklad zníženie intestinálneho pH, zníženie kolonizácie a invázie patogénnych organizmov a úprava imunitnej odpovede hostiteľa [25]. Nie je však presne stanovený údaj o minimálnom počte mikroorganizmov (MO), ktoré by musel konzument prijať, aby pocítil priaznivé účinky. Je ale často deklarované, že probiotikum by malo obsahovať niekoľko miliárd MO, aby sa zvýšila pravdepodobnosť, že dôjde k adekvátnej kolonizácii čriev [26].

Fermentované produkty sa dokonca odporúčajú na konzumáciu osobám s laktózovou intoleranciou, pričom sa často kladie dôraz na zlepšenie absorpcie laktózy. Tieto produkty sa odporúčajú taktiež aj pacientom trpiacim aterosklerózou [24].

Za ďalšie časté ochorenie v zmene funkcie črevného mikrobiómu, spojeného so zápalovými črevnými ochoreniami, patrí napríklad celiakia. Prebiehali mnohé štúdie pri hľadaní najlepšieho mikrobiálneho kandidáta v boji proti celiakii. Viaceré štúdie sa zhodovali v pripisovaní značných pozitívnych výsledkov k rodu *Bifidobacterium*. Pozitíva boli sledované najmä u druhov *B. longum*, *B. bifidum* a *B. lactis*, kde bolo zistené, že tieto kmene sú schopné znížiť priepustnosť epitelu spúšťanú interakciou s lepkom [27].

Príklady jednotlivých druhov s pozitívnymi zdravotnými účinkami

L. Bulgaricus v ľudskom tráviacom ústrojenstve zohráva viacero pozitívnych úloh, no primárne chráni gastrointestinálny trakt pred patogénmi [18]. Ďalšie štúdie preukázali, že konzumácia mliečnych výrobkov obsahujúcich druh *L. acidophilus* má potenciál pri prevencii alebo kontrole črevných infekcií, zlepšovaní trávenia laktózy pri laktózovej intolerancii (LI), vyrovnávaní hladín cholesterolu a vo vyvíjaní anti-karcinogénnej aktivity [6].

Hromadiace sa dôkazy poukazujú na to, že probiotické baktérie vo FMV sa dajú použiť na zmiernenie klinických príznakov LI (najmä živé kultúry *S. thermophilus*). Príkladom sú napríklad výsledky štúdie Sophie J. Oak a Rajesh Jha, ktoré preukázali celkovo pozitívny vzťah medzi probiotickými baktériami a LI [18].

Druhy rodu *Bifidobacterium* sú taktiež často využívané ako probiotické baktérie, pretože sú známe svojou rozmanitosťou rezistencie na žlčové soli [12]. Majú taktiež dôležité dietetické účinky, ktoré sa využívajú v produkcii mliečnych nápojov [10].

2.4 Charakteristika prebiotík

Ako už bolo spomínané pri charakteristike probiotík, celková gastrointestinálna mikrobiota hrá nesmierne dôležitú úlohu v ľudskom zdraví, a preto sa kladie dôraz na jej správne fungovanie. K ďalšej diétnej stratégii, ktorá je prospešná pre tráviace ústrojenstvo, patrí konzumácia vlákniny a prebiotík, ktoré sú v čreve metabolizované prospešnými nepatogénnymi baktériami [28]. Súčasné prebiotiká sú založené na báze krátkych uhl'ovodíkových reťazcov, ktoré sú pomocou MO spracované na metabolity prospešné pre zdravie hostiteľa [29]. Môžeme ich charakterizovať ako funkčné zložky, ktoré sa prirodzene vyskytujú v niektorých rastlinných a živočíšnych potravinách, a ktorým sa z dôvodu ich pozitívnych účinkov na zdravie venuje značná pozornosť vo farmaceutickom a potravinárskom priemysle [30].

Konzumentovi teda poskytujú zdravotné výhody, medzi ktoré patria prebiotické účinky zahŕňajúce obranu proti patogénom, moduláciu imunity, absorpciu minerálov, zlepšenie funkcie čriev, zlepšenie metabolických účinkov a v neposlednom rade dodávajú aj pocit sýtosti

[29]. Prebiotiká sú v čreve fermentované prospešnými baktériami za vzniku mastných kyselín s krátkym reťazcom. V hrubom čreve spôsobujú mnoho ďalších zdravotných výhod, ako je napríklad znižovanie rizika rakoviny hrubého čreva, cukrovky 2. typu a obezity [30]. Ďalej modulujú črevnú mikrobiotu a dokonca zvyšujú absorpciu vápnika a horčíka. Ich prídanie do mliečnych výrobkov navyše zlepšuje senzorické vlastnosti, ako sú chuť, textúra, zvyšovanie stability pien a emulzií [31]. Hneď, ako sa prebiotikum pridá do matrice produktu, zlepši sa interakcia medzi rôznymi zložkami. Okrem toho prebiotiká môžu ovplyvniť fermentačný proces a vývoj baktérií mliečneho kvasenia, a tak zmeniť profil prchavých zlúčenín [32].

2.5 Metódy identifikácie mikroorganizmov

Presná identifikácia MO je nevyhnutná pre mnohé oblasti aplikovaného výskumu a potravinárskeho priemyslu. V potravinárskom priemysle je identifikácia dôležitá kvôli zisteniu kontaminantov spôsobujúcich kazenie potravín a v prípade zdravotníctva je veľmi dôležité štúdium a charakterizácia patogénnych MO, ktoré sú zodpovedné za rôzne infekčné ochorenia [33]. Taktiež je veľmi dôležité priradenie priaznivých probiotických účinkov charakteristických pre jednotlivé mikrobiálne kmene vo všetkých maticiach určených pre konzumenta. Bez tejto charakterizácie sú probiotické produkty zavádzajúce a môžu častokrát viesť k zmätku spotrebiteľov [34].

V literatúre sa uvádza rôzne delenie analytických metód, ktoré zahŕňajú identifikáciu MO. Najčastejšie sa však tieto metódy všeobecne delia na dve hlavné kategórie. Ako prvé sa uvádzajú klasické fenotypové metódy, ktoré sú primárne založené na pozorovateľných vlastnostiach jednotlivých buniek a do druhej kategórie patria genotypové metódy, ktoré zahŕňajú molekulárne-biologické techniky (viď. Tab. 1).

Tab. 1: *Stručný prehľad metód identifikácie mikroorganizmov [33]*

Fenotypové metódy			Genotypové metódy
Chromogénne média	Mikroskopické metódy	Biochemické metódy	Molekulárne metódy
Tradičné média	SEM	Tradičné metódy	PCR
	TEM	(Wickerhamova karta, Vitek...)	Real-Time qPCR
	Obrátená mikroskopia	Hmotnostná spektrometria	PCR sekvenovanie
	Atd.	Atd.	MALDI-TOF MS
			Atd.

Fenotypové metódy sú založené na pozorovateľných charakteristikách buniek. Zahŕňajú teda súbor všetkých morfológických (informácie o tvare buniek, bičíkoch a inklúzných telieskach), fyziologických (teplota rastu, optimálne pH, koncentrácia solí a potreba kyslíka) a biochemických (enzymatická aktivita, produkcia plynov a metabolizmus) vlastností určitého mikrobiálneho kmeňa [33]. Výhodou týchto metód je ľahké pozorovanie a hodnotenie buniek bez potreby nákladnej technológie. Tieto metódy sú však časovo náročnejšie a nie vždy sú postačujúce na jednoznačnú identifikáciu MO na úrovni rodu alebo druhu [35].

V súvislosti s komplikáciami spojenými s fenotypovými metódami, ako bola hlavne časová náročnosť a nedostatočná identifikácia MO, sa koncom 20. storočia vyvinuli genotypové metódy. Tieto metódy začali zahŕňať aplikáciu techník molekulárnej biológie, vďaka čomu sa výrazne zlepšila schopnosť identifikácie a klasifikácie mikrobiologického obsahu v rôznych matriciach, ako aj celkové zrýchlenie analýz [33]. V súčasnosti poskytuje molekulárna biológia množstvo nástrojov a techník na detekciu, identifikáciu a charakterizáciu baktérií pre celú škálu klinických a výskumných účelov. Tieto metódy sú v praxi založené na reštrikčnej analýze bakteriálnej DNA a amplifikácii špecifických génových sekvencií pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) (viď. Tab. 2) [36].

Ako najvhodnejší prístup sa však častokrát javí metóda „polyfázovej taxonómie“, ktorý ako prvý použila Rita Colwell v roku 1970 [37]. Táto metóda zahŕňa integráciu fenotypových a genotypových údajov a jej hlavná výhoda spočíva v zahrnutí všetkých základných morfológických, fyziologických a biochemických vlastností, spolu s popisom genetického profilu [38]. Vhodnou kombináciou týchto dvoch analytických metód sa dokázu presne špecifikovať jednotlivé bakteriálne kmene. Týmto spôsobom je možné poskytnúť zdravotníckym orgánom presné vyhodnotenie zdravotných prínosov hlavne pri produktoch, ktoré fungujú na báze probiotík [36].

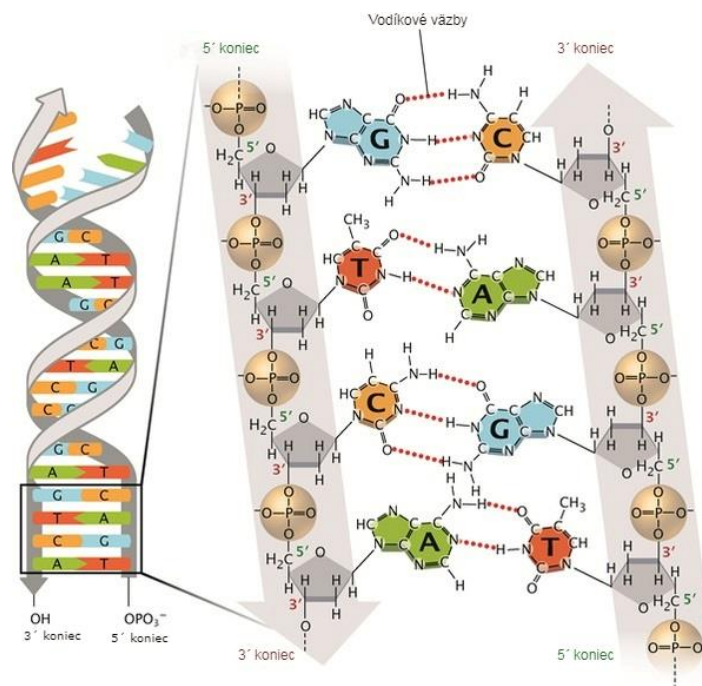
Tab. 2: Skúmanie genetického profilu a analýza DNA [36]

Skúmanie genetického profilu	Techniky založené na analýze DNA
1) Technika hybridizácie DNA-DNA	1) Gélová elektroforéza
2) Restrikčná analýza amplifikovanej ribozomálnej DNA	2) PCR
3) Sekvenovanie 16S a 23S ribozomálnej DNA (rDNA)	3) Polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov
	4) Ribotypizácia

2.5.1 História vývoja molekulárnej biológie

História molekulárnej biológie a genetiky má mnoho významných udalostí, kedy sa vedci pomaly dopátrali k poznaniu ľudského genetického materiálu [39]. Počiatky sa datujú od roku 1865, kedy Gregor Johann Mendel objavil zákony dedičnosti. Tento rok sa udáva ako zlomový v histórii biológie, nakoľko sa biológia začala meniť na exaktnú vedu [40]. Zákony genetiky, ako ich sformuloval Mendel, boli porovnateľné so základnými zákonmi termodynamiky, a preto prilákali aj mnohých fyzikov k biologickému výskumu [40]. Veľmi blízko Mendelovho objavu sa v roku 1869 zapísal do dejín molekulárnej biológie aj švajčiarsky lekár Friedrich Miescher, ktorému sa podarilo izolovať a identifikovať deoxyribonukleovú kyselinu (DNA) ako chemickú látku. Miescher túto dovtedy nepoznanú organickú látku izoloval z jadier bielych krviniek a nazval ju nukleín [41].

Nasledujúce dekády vedcov zaujala táto nová a nepoznaná látka. Značne neskôr v roku 1944 Oswald Avery zistil, že práve DNA nesie genetický materiál a nie bielkoviny ako si dovtedy spoločnosť myslela [42]. Tento objav upútal pozornosť aj Erwina Chargaffova, ktorý v roku 1950 uviedol, že proporcie obsiahnutých dusíkatých báz v DNA sa riadia určitým zákonom [43]. Všetky tieto hromadiace sa štúdie nakoniec doviedli Watsona a Cricka k objavu dvojitej špirály DNA. Výsledok ich objavu bol publikovaný 25. apríla 1953 [44] a sa stal symbolom nielen biológie, ale dokonca aj modernej doby. Watson-Crickov model poskytol vysvetlenie replikácie, špecifickosti a informačného obsahu genetického materiálu. Za tento objav im bola v roku 1962 udelená Nobelová cena za fyziológiu [39].



Obr. 4: Watson-Crickov model molekuly DNA (upravené) [45]

2.5.2 Extrakcia DNA

Extrakcia DNA spolu s PCR patria medzi základné techniky využívané v molekulárnom laboratóriu. Pri extrakcii DNA ide všeobecne o metódu čistenia DNA pomocou rôznych fyzikálnych a chemických metód, kde sa DNA izoluje od bunkových membrán, proteínov a iných bunkových zložiek [46]. Existuje množstvo metód extrakcie DNA, patria tu napríklad tradičné organické metódy (fenol-chloroformová metóda) alebo rôzne komerčné techniky (DNA extrakčné kity) [47].

Postup organickej extrakcie DNA za použitia fenolu ako prvý publikoval Kirby v roku 1953, ktorý ju použil na izoláciu DNA z tkanív cicavcov [48]. Metóda tejto teraz už zaužívanej extrakcie sa dá zhrnúť do niekoľkých základných krokov. V prvom kroku sa pripravuje tzv. hrubý lyzát bakteriálnych buniek, ktorého kroky spočívajú v narúšaní bunkových stien pomocou enzýmov (lyzozým) alebo detergentov (SDS), aby sa uvoľnili molekuly DNA. Následne sa DNA prečisťuje od kontaminantov pomocou enzymatických krokov. Molekuly DNA sa následne extrahujú pomocou fenol-chloroformovej metódy, kde sa do organickej fázy extrahujú bunkové makromolekuly a vo vodnej fáze ostáva cieľová DNA. Táto vodná fáza s DNA sa následne odoberie a opäť sa extrahuje, no tentoraz už za použitia roztoku zmesi chloroform a izoamylalkohol. Konečný krok zahŕňa vyzrážanie DNA pomocou 70% etanolu za prítomnosti octanu sodného pri nízkych teplotách [48; 49].

2.5.3 Kvantifikácia nukleových kyselín

Pre modernú molekulárnu diagnostiku je dôležité presné stanovenie koncentrácie a čistoty nukleových kyselín (NK), ktoré je potrebné na optimálne fungovanie zvolených molekulárne-biologických metód. Stanovenie presnej koncentrácie napomáha zabrániť zbytočnej spotrebe vzorky, zlepšuje reprodukovateľnosť a taktiež aj spoľahlivosť výsledkov. Na kvantifikáciu NK sa bežne využívajú dve optické technológie, kde patrí spektrofotometrické a fluorescenčné stanovenie [50].

Spektrofotometrické stanovenie spočíva v prechode UV svetla vzorkou, kedy sa meria absorbancia pri špecifických vlnových dĺžkach - 230, 260 a 280 nm. NK kvôli konjugovaným dvojitým väzbám vo svojich purínových a pyrimidínových kruhoch majú špecifický absorpčný pík pri 260 nm, kedy teda nastáva aj maximálna absorbancia NK (A₂₆₀). Výsledná intenzita tejto absorbancie je úmerná koncentrácii NK. Kontaminujúce proteíny vo vzorke majú toto maximum pri vlnovej dĺžke 280 nm (A₂₈₀) [50].

Pomer absorbancií (A₂₆₀/A₂₈₀) pri vlnových dĺžkach 260 a 280 nm sa používa na vyhodnocovanie miery čistoty NK po vykonanej extrakcii. Všeobecne akceptovaná hodnota

pomeru pre čistú DNA sa pohybuje okolo hodnoty $\sim 1,8$ a pre RNA má tento pomer hodnotu $\sim 2,0$. Dodatočne sa k vyhodnocovaniu zaráta aj absorbanca pri 230 nm, ktorá je výsledkom ďalších chemických kontaminácií (hlavne kontaminácia fenolom), ktoré mohli nastať počas extrakcie. Hodnoty A260/A230 pre čisté NK sa bežne pohybujú v rozsahu 2,0-2,2 [51].

Druhé, fluorimetrické stanovenie NK, zahŕňa použitie fluorogénnych farbív (napr. etídium bromid), ktoré sa selektívne viažu na DNA, RNA alebo proteín. Po naviazaní farbiva na cieľovú molekulu, farbivá excitujú pri jednotnej vlnovej dĺžke a preto rôzne koncentrácie DNA budú vykazovať rozdielnú intenzitu signálu. Signál je detegovaný analýzou DNA oproti vzorkám so známou koncentráciou DNA na agarózovom géle [50]. Výhody tohto stanovenia spočívajú v tom, že táto metóda je veľmi citlivá (vhodná pre veľmi zriedené vzorky s nízkou koncentráciou DNA) a je presná aj napriek prítomnosti kontaminácií. Nevýhody však spočívajú v dĺžke kvantifikácie a pri tejto metóde nie sú poskytnuté informácie o čistote vzorky [52].

Tab. 3: Vyhodnotenie hodnôt pomerov A260/A280 a A260/A230 [51]

Pomer	Hodnota pomeru	Dôsledok týchto hodnôt
A260/A280	Nízka	<ul style="list-style-type: none"> • Kontaminácia proteínmi. • Veľmi nízka koncentrácia NK ($> 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$).
	Vysoká	<ul style="list-style-type: none"> • Znečistenie RNA. • Nutnosť kontroly spektrálneho profilu.
A260/A230	Nízka	<ul style="list-style-type: none"> • Zvyškový fenol z extrakcie NK alebo iné organické činidlo.
	Vysoká	<ul style="list-style-type: none"> • Meranie blanku na znečistenom podstavci. • Nesprávne zvolený blank (blank by mal mať rovnakú hodnotu pH a iónovú silu ako roztok vzorky).

2.5.4 Polymerázová reťazová reakcia

Za posledných pár dekád existuje len málo objavov, ktoré môžu konkurovať PCR, ktorá bola významnou inováciou v biologickom a genetickom výskume [53]. Bola vynájdená v roku 1983 americkým biochemikom Kary Mullisom, ktorý za ňu získal patent už v roku 1985. Za túto prácu získal spoločne s chemikom Michaelom Smithom v roku 1993 Nobelovu cenu v oblasti molekulárnej genetiky [54].

PCR môžeme považovať za základ takmer všetkého moderného molekulárneho klonovania [55]. Touto metódou je možné rýchlo a selektívne amplifikovať definovanú cieľovú sekvenciu NK, pomocou DNA polymerázy, primerov a nukleotidov [56]. Reakcia je ľahko realizovateľná, lacná, nenáročná a jej jedinou požiadavkou je znalosť nukleotidových sekvencií

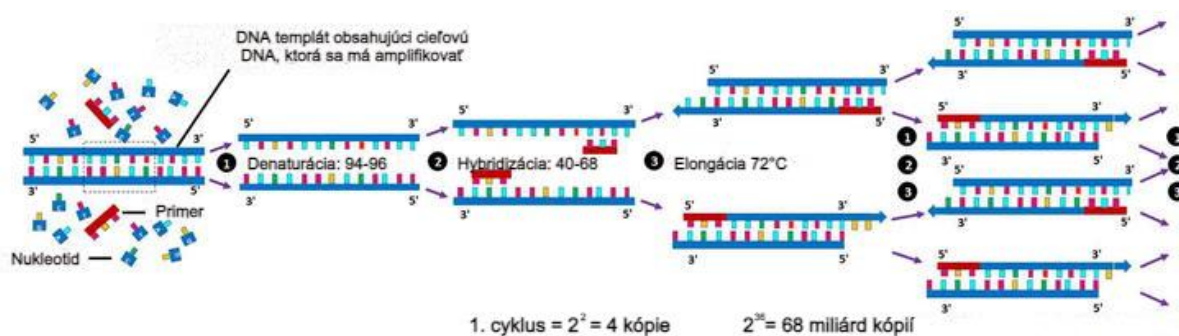
zvoleného cieľa. Okrem svojej jednoduchosti je taktiež veľmi rýchla, flexibilná, no aj citlivá [57]. Táto metóda môže generovať desiatky miliárd kópií konkrétneho fragmentu DNA z extraktu DNA (DNA templátu). Teplátom pre PCR reakciu môže byť v podstate akákoľvek požadovaná sekvencia NK [58].

Opis a priebeh polymerázovej reťazovej reakcie

Primery sú krátke sekvencie nukleotidov, ktoré sú navrhnuté tak, aby hybridizovali s komplementárnymi vláknami špecifickej NK (ich dĺžka je zvyčajne 15 – 40 báz) [56]. Čo sa týka DNA polymeráz, tak v PCR je najčastejšie využívaná termo-stabilná Taq DNA polymeráza. Táto polymeráza je produkovaná z extrémne-termofilnej baktérie *Thermus aquaticus*, žijúcej v horúcich prameňoch. Jej optimálna teplota činnosti sa podľa viacerých zdrojov udáva na 72 °C, čo je taktiež aj teplota elongácie [57].

Priebeh typickej PCR reakcie pozostáva z troch charakteristických krokov, ktorými sú denaturácia, hybridizácia a elongácia. Produkty každého kroku tejto syntézy slúžia ako templát pre nasledujúce kroky, čím sa dosahuje exponenciálna amplifikácia [58]. Stručný opis PCR reakcie v jej typických troch krokoch, podľa znázornenia na Obr. 5:

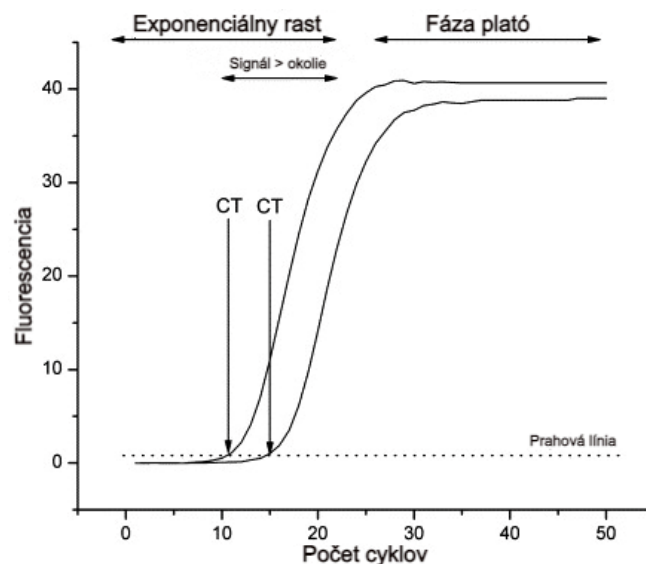
1. Denaturácia zvyčajne prebieha pri teplote 94-96 °C [59]. V tejto fáze dochádza k denaturácii vodíkových väzieb a tým k rozdeleniu dvojláknovej DNA (dsDNA) na dve jednoláknové DNA (ssDNA) [53].
2. V nasledujúcom kroku sa teplota znižuje na 40-68 °C [58], kedy nastáva reformácia vodíkových väzieb, čím dochádza k hybridizácii oligonukleotidového primeru [59].
3. Nakoniec sa teplota opäť zvýši na charakteristickú teplotu elongácie 72 °C, kedy sa aktivuje Taq polymeráza [59]. Pri tejto teplote sa Taq polymeráza viaže na ssDNA a jej voľný 3'-koniec. Nový reťazec denaturovej templátovej DNA sa syntetizuje v smere 5'→3' a počet templátov DNA sa v priebehu jedného cyklu zdvojnásobí [58].



Obr. 5: Schéma PCR reakcie (upravené) [60]

Samotná PCR reakcia však môže byť v mnohých prípadoch nedostatočná, ako napríklad pri identifikácii vo vzorkách s nízkou koncentráciou DNA [61]. Preto sú v praxi známe aj jej viaceré obmeny, z ktorých spomenieme tie najzákladnejšie:

1. Reverzne transkripčná PCR (RT-PCR) je druh reakcie, ktorá ako katalyzátor využíva reverznú transkriptázu na syntetizovanie DNA z cieľových RNA sekvencií (napr. pri vírusoch). RT-PCR sa uskutočňuje ako jednokrokový alebo dvojkrokový test [62].
2. Kvantitatívna PCR v reálnom čase (real-time qPCR) bola vyvinutá už v 80. rokoch minulého storočia a jej princíp je založený na analýze génovej expície pomocou využitia tzv. reporterového farbiva, ktorý sa viaže na výsledný produkt a jeho prítomnosť indikuje fluorescenčným signálom. Medzi často využívané sondy na zafarbenie NK patrí napríklad etídium bromid a kyanínové farbivo SYBR Green [61]. Výhoda tejto techniky spočíva v stanovení počtu kópií danej cieľovej sekvencie vo vzorke. Na rozdiel od klasických PCR termocyklérov, termocykléry pre qPCR sú schopné merať fluorescenciu po každom cykle. Behom každého cyklu PCR je detegovaná intenzita fluorescenčného žiarenia, ktorá odpovedá množstvu amplikónu v reakčnej zmesi [63]. Ďalšou metódou dopĺňujúcou qPCR je vysoko-rozlišovacia analýza kriviek topenia. Ide taktiež o veľmi rýchlu a citlivú metódu pre analýzu PCR produktov. Teplota topenia (T_m), je teplota, pri ktorej je polovica párov báz disociovaná a postupnou denaturáciou amplifikovanej DNA dochádza k zníženiu emisie fluorescencie [63].



Obr. 6: Amplifikačné krivky qPCR (upravené) [63]

Príprava PCR zmesi

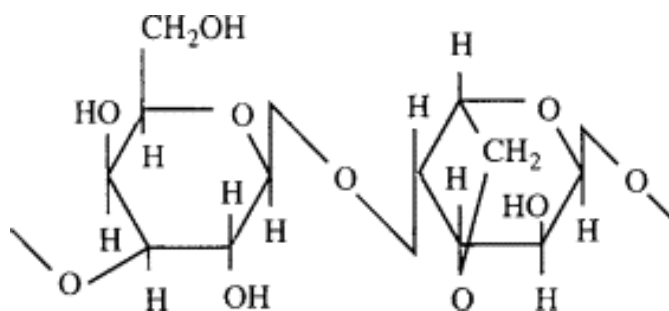
Charakteristický základ PCR zmesi tvoria oligonukleotidové primery, vysokokvalitná Taq polymeráza, tlmivý roztok, deoxynukleotidy a sledovaná matrica DNA. Všetky spomenuté zložky sú rozpustené v ultra-čistej vode pre PCR. Hlavnou funkciou oligonukleotidových primerov a ich základnou vlastnosťou je, že musia byť komplementárne k vláknku templátovej oblasti DNA. Tento počiatočný krok dizajnu primerov je rozhodujúci, pretože ich správne navrhnutie zvyšuje účinnosť amplifikácie PCR [64]. Čo sa týka bližšieho mechanizmu nadväzovania primeru na templát, tak je dôležité, aby 3' koniec primeru bol identický k templátovému vláknku, aby mohlo nastať predĺženie [65].

Samozrejme, zloženie tohto mixu závisí aj na spôsobe využitej PCR metódy. V prípade využitia RT-PCR tieto mixy navyše obsahujú aj chlorid horečnatý ($MgCl_2$) a v prípade qPCR sa aplikujú aj fluorescenčné sondy (SYBR green) [66; 67]. Spôsob použitia a zloženia týchto mixov sa líši od dodávateľa k dodávateľovi, no ich objemy sa zvyčajne zhodujú a pohybujú sa v rozmedzí 10 – 100 μ l [58].

2.5.5 Gélová elektroforéza

Výskum elektroforézy pre molekuly DNA začal v roku 1964, kedy tri výskumné skupiny dokázali, že separácia fragmentov DNA v elektrickom poli podľa molekulovej hmotnosti závisí od gélovej matrice, v ktorej bola separácia uskutočnená. V praxi sa stretávame najčastejšie s dvoma druhmi gélov využívaných pri elektroforéze, a to hlavne s agarózovými a polyakrylamidovými gélmami [68].

Agaróza je prírodný lineárny polymér pozostávajúci z opakovaných L- a D-galaktózových podjednotiek, ktorý je izolovaný z červených morských rias rodov *Gelidium* a *Gracilaria* [69]. Molekuly agarózy majú pri vysokých teplotách štruktúru náhodného zvinutia, no po ochladení tvoria špirálovité zväzky držiace pohromade nekovalentnými väzbami, čo má za následok schopnosť gélovania [70]. Výhodou týchto gélov je, že sa považujú za netoxické, ich nalievanie je rýchle a jednoduché a sú postačujúce na separáciu veľkých a stredne veľkých molekúl NK. Nevýhody spočívajú hlavne vo vysokej cene agarózy a separácii vzoriek s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktoré nedokážu dobre identifikovať [71].



Obr. 6: Štruktúra agarózy [72]

Ďalšími využívanými sú polyakrylamidové gély, ktoré sú chemicky zosieťované polymerizačnou reakciou akrylamidu s činidlom N,N'-metylénbisakrylamid. Táto reakcia sa radí medzi radikálové. Jej iniciátorom je zvyčajne persíran amónny a katalyzátorom N,N,N',N'-tetrametyletyléndiamín (TEMED) [68]. Hlavnými výhodami sú, že ide o chemicky stabilný a zosieťovaný gél, ktorý je dobrý na separáciu vzoriek s nízkou molekulovou hmotnosťou. Nevýhody spočívajú hlavne v náročnosti prípravy a taktiež ide o toxické monoméry (neurotoxíny) [71].

3 CIEĽ PRÁCE

Hlavným cieľom tejto práce je identifikácia bakteriálnej DNA z komerčne dostupných mliečnych výrobkov pomocou molekulárne biologických metód. Súčasťou tejto práce riešenie nasledujúcich bodov:

- Spísanie literárnej rešerše k problematike probiotických baktérií a ich analýze v potravinárskom a farmaceutickom priemysle.
- Zvládnutie techniky izolácie bakteriálnej DNA z mliečnych potravinových produktov.
- Kvantifikácia a kontrola kvality bakteriálnej DNA.
- Zvládnutie techniky PCR a interpretácia jej výsledkov.
- Detekcia jednotlivých rodov a druhov baktérií obsiahnutých vo vybraných mliečnych produktoch.

4 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

4.1 Použité mliečne výrobky s obsahom probiotických baktérií



Obr. 7: Použité mliečne výrobky

(A: Actimel, B: Selský jogurt, C: Acidofilní mléko, D: Activia) [73; 74; 75; 76]

Tab. 4: Použité mliečne výrobky a ich výživové údaje

	Názov produktu	Actimel	Acidofilní mléko z Valaška	Activia	Selský jogurt
	Výrobca	Danone	Mlékárna Valašské Meziříčí, spol. s.r.o.	Danone	Kunín
Výživové údaje na 100 ml výrobku	Energia [kJ]	323	175	288	279
	Tuky [g]	1,6	3,6	3,4	3,8
	Z toho nasýtené mastné kyseliny [g]	1,0	2,4	2,2	2,7
	Sacharidy [g]	10,8	3,9	5,1	4,5
	Z toho cukry [g]	10,8	3,9	5,1	3,4
	Bielkoviny [g]	3,0	3,1	4,5	3,7
	Soľ [g]	0,1	0,1	0,15	0,12
Minerály a vitamíny	Vápnik [mg]	120 (15 % RHP)	-	148 (18 % RHP)	-
	Vitamín B6 [mg]	0,21 (15 % RHP)	-	-	-
	Vitamín D [mg]	1,67 (15 % RHP)	-	-	-

Tab. 4: Použité mliečne výrobky a ich výživové údaje (pokračovanie)

	Názov produktu	Actimel	Acidofilní mléko z Valašska	Activia	Selský jogurt
	Výrobca	Danone	Mlékárna Valašské Meziříčí, spol. s.r.o.	Danone	Kunín
MO	BMK	20,0·10 ⁹	+	4,0·10 ⁹	+
	<i>L. acidophilus</i>	Neuvedené	10 ⁶ /g	Neuvedené	10 ⁶ /g
	<i>L. casei</i>	+	Neuvedené	+	Neuvedené
	<i>Bifidobacterium</i>	+	10 ⁶ /g	+	10 ⁶ /g
	<i>S. thermophilus</i>	Neuvedené	10 ⁶ /g	Neuvedené	Neuvedené

4.2 Použité pomôcky a prístroje

- Analytické váhy OHAUS Pioneer (*Ohaus, New Jersey, USA*)
- Laboratórne váhy OHAUS CS 200 (*Ohaus, New Jersey, USA*)
- Bacterial DNA Kit (*OMNI International, Kannesaw, USA*)
- Centrifúga miniSpin (*Eppendorf, Hamburg, Nemecko*)
- Exikátor (*KIF LAB, Freiburg, Nemecko*)
- Thermo-Shaker TS-100 C (*BioSan, Riga, Lotyšsko*)
- Eppendorfove skúmavky 1,5 ml a 0,5 ml (*Eppendorf, Hamburg, Nemecko*)
- Mikropipety Discovery HTL (*PZ, Varšava, Poľsko*)
- Mikrovlnná rúra PROLINE SM117 700 W
- MiniIncubator Labnet (*Labnet international Inc., New Jersey, USA*)
- Omni DNA Mini kolóny (*OMNI International, Kannesaw, USA*)
- Zberné 2 skúmavky (2 ml) (*OMNI International, Kannesaw, USA*)
- Elektroforetická vanička a celkové zariadenie pre elektroforézu (*OWL Buffer PufferTM, Loughborough, VB*)
- Thermal Cycler Rotor-Gene 600 (*Corbett Research UK Ltd, Cambridge, VB*)
- Transluminátor Azure biosystems C200 (*Dublin, Írsko*)
- Zdroj elektrického napätia pre elektroforézu Enduro 300 V (*Labnet International, Woodbridge, USA*)
- PCR box EuroClone (*LAF Technologies, Austrália*)
- Laboratórne sklo (kadičky, tyčinky, atď.), plastové laboratórne pomôcky a pod.

4.3 Použité chemikálie a roztoky

Všetky postupy prípravy roztokov boli vykonané na základe protokolu pani docentky Aleny Španovej a pána docenta Bohuslava Ritticha [77].

4.3.1 Chemikálie a roztoky potrebné na prípravu hrubého lyzátu buniek z mliečnych výrobkov

- Tris-HCl (*Amaresco, Solon, USA*)
- EDTA (*Serva, Heidelberg, Nemecko*)
- SDS (*Sigma-Aldrich s.r.o., Saint-Louis, USA*)
- NaOH (*Pliva – Lachema a.s., Brno, ČR*)
- Lyzozým (*Reanal Labor, Budapešť, Maďarsko*)
- Proteináza K (*Sigma-Aldrich s.r.o., Saint-Louis, USA*)

Príprava zásobného roztoku 1 M Tris-HCl (pH 7,8)

Bolo rozpustených 121,1 g Tris-HCl v 800 ml destilovanej vody. Za využitia koncentrovanej kyseliny HCl bolo upravené pH roztoku na 7,8 – 8,0 a roztok bol následne doplnený destilovanou vodou na objem 1 liter. Po rozdelení roztoku do alikvotných podielov sa potom sterilizoval 20 minút pri 121 °C.

Príprava roztoku proteinázy K (10 mg/ml)

Bolo rozpustených 10 mg proteinázy K v 1 ml sterilnej destilovanej vody. Roztok sa uchovával pri teplote -20 °C.

Príprava 20% zásobného roztoku SDS

Bolo rozpustených 20 g dodecyl sulfátu sodného (SDS) v 80 ml destilovanej vody za súčasného zahrievania na 68 °C. Pomocou koncentrovanej kyseliny HCl bolo pH roztoku upravené na hodnotu 7,0 a roztok bol následne doplnený destilovanou vodou na objem 100 ml.

Príprava lýzačného roztoku A

- 1 M Tris-HCl (pH 7,8)
- 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Bolo zmiešaných 10 ml Tris-HCl s 1 ml EDTA. Roztok bol doplnený destilovanou vodou na objem 100 ml.

Príprava lýzačného roztoku B

K lýzačnému roztoku A bol pridaný lyzozým, aby celková koncentrácia pripraveného roztoku bola 3,0 mg/ml.

4.3.2 Chemikálie a roztoky potrebné na izoláciu DNA pomocou fenol-chloroformovej extrakcie

- Etanol (*Penta, Chrudim, ČR*)
- $\geq 89,0\%$ Fenol (*Sigma-Aldrich s.r.o., Saint-Louis, USA*)
- Chloroform-izoamylalkohol v pomere 24:1 (*Sigma-Aldrich s.r.o., Saint-Louis, USA*)
- Octan sodný (*Erba Lachema, s.r.o., Brno, ČR*)

Príprava TE pufru

- 1 M Tris-HCl (pH 8,0)
- 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Bolo zmiešaných 1 ml Tris-HCl s 0,2 ml EDTA a roztok bol doplnený destilovanou vodou na objem 100 ml. Takto pripravený roztok bol rozdelený do alikvotných podielov a uschovával sa pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.3 Chemikálie a roztoky potrebné na izoláciu DNA pomocou izolačného kitu

- Etanol (*Penta, Chrudim, ČR*)
- 2-propanol (*Sigma-Aldrich s.r.o., Saint-Louis, USA*)
- BB pufo (OMNI International, Kannesaw, USA)
- CBH pufo (OMNI International, Kannesaw, USA)
- DLB pufo (OMNI International, Kannesaw, USA)
- DW pufo (OMNI International, Kannesaw, USA)
- EB pufo (OMNI International, Kannesaw, USA)

4.3.4 PCR komponenty

- PCR Ultra H₂O (*Top-Bio, s.r.o., Praha, ČR*)
- qPCR 2x SYTO-9 Master-mix (*Top-Bio, s.r.o., Praha, ČR*)
- Primery:
 - F_eub a R_eub (*Generi Biotech, Hradec Králové, ČR*)
 - F_alllact a R_alllact (*Generi Biotech, Hradec Králové, ČR*)
 - Bif 164 a Bif 662 (*Generi Biotech, Hradec Králové, ČR*)
 - F_acidophilus a R_acidophilus (*Generi Biotech, Hradec Králové, ČR*)

4.3.5 Chemikálie a roztoky potrebné na prevedenie gélovej elektroforézy

- EliDNA™ LD Green (*Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o., Brno, ČR*)
- EliDNA™ PS Green (*Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o., Brno, ČR*)
- DNA štandard, FastGene 50bp (*Nippon Genetics Europe, Düren, Nemecko*)
- DNA štandard, FastGene 1Kb (*Nippon Genetics Europe, Düren, Nemecko*)
- FastGene Agaróza (*Nippon Genetics Europe, Düren, Nemecko*)
- Kyselina bóritá (*Penta, Chrudim, ČR*)
- EDTA (*Serva, Heidelberg, Nemecko*)
- Tris-HCl (*Amaresco, Solon, USA*)

Príprava TBE pufu (5× koncentrovaný)

- 54 g Tris-HCl
- 27,5 g kyseliny bóritej
- 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Všetky uvedené komponenty boli rozpustené v 600 ml destilovanej vody, pH roztoku bolo upravené pomocou 1 M NaOH na hodnotu 8,0 a celkový objem bol doplnený na 1 l.

Príprava TBE pufu (0,5× koncentrovaný)

0,5× koncentrovaný TBE pufor sa pripravil z 5× koncentrovaného TBE pufu, ktorý bol zriedený vodou v pomere 1:9.

Príprava agarózového gélu

- 1,0% gél bol pripravený z 1,0 g agarózy, ktorá bola rozpustená v 100 ml 0,5× koncentrovaného TBE pufu.
- 1,8% gél bol pripravený z 1,8 g agarózy, ktorá bola rozpustená v 100 ml 0,5× koncentrovaného TBE pufu.

4.4 Metódy

Všetky použité metódy boli vykonané na základe protokolu pani docentky Aleny Španovej a pána docenta Bohuslava Ritticha, ktoré boli prispôsobené potrebám pracoviska [77].

4.4.1 Príprava bakteriálnych buniek

K práci boli využité bakteriálne kultúry lyofilizovaných druhov *L. plantarum* (CCM 7039), *L. casei* (CCM 7088), *L. acidophilus* (CCM 4833), *L. pentosus* (CCM 4619), *L. delbrueckii* (CCM 7190), *B. animalis* (CCM 4988) a *B. breve* (CCM 7825). Lyofilizované kultúry boli rehydratované a naočkované do tekutého MRS média s cysteínom. Kultúry boli anaeróbne kultivované v anaerostate pri 37 °C po dobu 48 hodín. Po 48 hodinách boli kultúry preočkované do nového média. Po kultivácii nasledovala lýza a extrakcia bakteriálnych buniek.

Lýza a extrakcia bakteriálnych buniek

- Na lýzu bakteriálnych buniek bolo použitých 1 ml bunkovej kultúry, ktorá bola následne centrifugovaná pri 15 000 ot./min po dobu 5 minút v 1,5 ml Eppendorfovej skúmavke.
- Supernatant bol opatrne zliaty a sediment sa nechal dobre odkvapať.
- Sediment sa resuspendoval v 1 ml lýzačného pufru.
- Suspenzia sa centrifugovala pri 15 000 ot./min po dobu 5 minút.
- K sedimentu sa pridalo 500 µl lýzačného roztoku A a dokonale sa resuspendovala.
- Vzorky sa nechali inkubovať 1 hodinu pri laboratórnej teplote a občas sa premiešali.
- Po inkubácii bolo k zmesi pridaných 12,5 µl 20 % SDS a 5 µl proteinázy K.
- Vzorky boli inkubované pri 55 °C do nasledujúceho dňa.

Na extrakciu bakteriálnej DNA pre kultúru *L. plantarum* (CCM 7039) bol použitý postup fenol-chloroformovej extrakcie a aj zrážanie DNA etanolom, ktoré sú uvedené v kapitole 4.4.2. Extrakcia bakteriálnej DNA pre ostatné kultúry prebiehala podľa protokolu z OMNI bacterial DNA kitu, ktorý je taktiež uvedený v kapitole 4.4.2.

Gélová elektroforéza bakteriálnej DNA

- Bol pripravený 1,0% agarózový gél, ktorý bol prevarený v mikrovlnnej rúre do úplného rozpustenia agarózy.
- Po ochladnutí gélu približne na 60 °C bolo k nemu pridaných 5 µl farbiva PS Green.
- Gél bol následne dôkladne premiešaný, naliaty do elektroforetickej vaničky s hrebienkom a gél sa nechal tuhnúť približne 30 minút.

- Po stuhnutí gélu bol z neho odobratý hrebienok a gél sa preliat 0,5× TBE pufrom, približne 5 mm nad gél.
- V mikroskúmavke bolo zmiešaných 15 µl DNA s 5 µl nanášacieho pufru (PS Green).
- Do jamiek gélu bol najprv nanesené 5 µl štandardu (FastGene 1Kb DNA) a po 20 µl vzoriek zmiešaných s farbivom.
- Po nanesení všetkých vzoriek sa elektroforéza nechala vyvíjať 1,5 hodiny pri konštantnom napätí 80 V.
- Po ukončení elektroforézy boli výsledky pozorované v UV transluminátore pri vlnovej dĺžke 302 nm.

4.4.2 Izolácia bakteriálnej DNA z mliečnych výrobkov

Príprava hrubého lyzátu buniek z mliečnych výrobkov

- Najprv sa zhomogenizovali jednotlivé vzorky mliečnych výrobkov v destilovanej vode v pomere 1:1.
- Vzorky sa scentrifugovali pri 14 000 ot./min po dobu 5 minút.
- Supernatant sa opatrne zliat, premyl sa v 1 ml destilovanej vody a opäť bol scentrifugovaný pri 14 000 ot./min po dobu 5 minút.
- Tento postup bol zopakovaný 5x.
- K sedimentu bol potom pridaný 1 ml lýžačného roztoku B, v ktorom bol sediment resuspendovaný.
- Vzorky sa nechali inkubovať 1 hodinu pri laboratórnej teplote a občas sa premiešali.
- Po inkubácii bolo k zmesi pridaných 50 µl 20 % SDS a 5 µl proteínázy K.
- Vzorky boli inkubované pri 55 °C do nasledujúceho dňa.

Fenol-chloroformová extrakcia bakteriálnej DNA

- K 500 µl pripraveného hrubého lyzátu z mliečnych produktov bol pridaný rovnaký objem fenolu a zmes sa opatrným kývavým pohybom premiešavala po dobu 4 minút.
- Zmes bola centrifugovaná pri 15 000 ot./min po dobu 5 minút.
- Oddelená vodná fáza s DNA bola odobratá do novej Eppendorfovej skúmavky.
- Odobratá vodná fáza s DNA bola doplnená TE pufrom na objem 500 µl a následne bolo pridaných 700 µl zmesi chloroform-isoamylalkohol. Zmes bola opäť opatrným kývavým pohybom premiešavaná po dobu 4 minút.
- Zmes bola centrifugovaná pri 15 000 ot./min po dobu 5 minút.
- Vodná fáza s DNA bola odobratá do novej Eppendorfovej skúmavky.

Zrážanie DNA pomocou etanolu

- Bol zistený objem vodnej fázy s DNA a vzorka bola prípadne doplnená TE pufrom na 400 µl.
- K vzorke bolo pridaných 20 µl octanu sodného a zmes sa premiešala.
- Následne bol pridaný 1 ml 96% etanolu vychladeného na -20 °C a zmes bola premiešaná. DNA sa zrážala 60 minút pri -20 °C.
- Po vyzrážaní DNA bola zmes centrifugovaná pri 15 000 ot./min po dobu 15 minút. Supernatant bol po centrifugácii opatrne zliaty a ďalej sa pracovalo len so sedimentom.
- Sediment bol opláchnutý v 70% etanole a zmes sa opäť centrifugovala pri 15 000 ot./min po dobu 10 minút.
- Sediment bol sušený v exikátore do úplného zbavenia zvyškového etanolu.
- Po vysušení bola DNA rozpustená v 50 µl TE pufru a uschovávaná pri 4 °C.

Izolácia bakteriálnej DNA pomocou OMNI Bacterial DNA Purification Kitu

Izolácia DNA prebiehala pomocou protokolu, ktorý bol pribalený k OMNI Bacterial DNA Purification kitu.

- Na izoláciu bol využitý hrubý lyzát z kapitoly 4.4.2.
- 200 µl hrubého lyzátu bolo napipetovaného do 1,5 mikrocentrifugačnej skúmavky.
- Následne bolo k hrubému lyzátu pridaných 220 µl BB pufru a obsah bol dôkladne zvortexovaný a inkubovaný pri 65°C po dobu 10 minút.
- Po tomto časovom úseku bolo k zmesi pridaných 220 µl 100% etanolu a zmes bola dôkladne premiešaná na vortexe.
- Bola vložená Omni DNA Mini kolóna do 2 ml zbernej skúmavky.
- Celý obsah pripravenej vzorky bol prenesený do Omni DNA Mini kolóny aj vrátane zrazenín, ktoré mohli v priebehu vzniknúť.
- Obsah bol centrifugovaný pri 10 000 otáčkach behom 1 minúty.
- Filtrát so zbernou skúmavkou bol odstránený a kolóna bola vložená do novej 2 ml zbernej skúmavky.
- Bolo pridaných 500 µl CBH pufru a vzorka bola centrifugovaná pri 10 000 otáčkach po dobu 1 minúty.
- Filtrát bol odstránený, 2 ml zberná skúmavka bola znovu použitá a do nej bola naspäť vložená kolóna.

- Bolo pridaných 700 μ l DW pufru a vzorka bola centrifugovaná pri 10 000 otáčkach po dobu 1 minúty.
- Filtrát bol odstránený, 2 ml zberná skúmavka bola znovu použitá a do nej bola naspäť vložená kolóna. Krok s pridaním DW pufru sa ešte raz zopakoval.
- Následne bol centrifugovaný čistý filter pri 10 000 otáčkach po dobu 2 minút.
- Filter bol vložený do novej 2 ml zbernej skúmavky.
- Nakoniec bolo pridaných 50 μ l EB pufru vyhriateho na 65 °C a obsah bol scentrifugovaný pri 10 000 otáčkach po dobu 1 minúty, aby vznikol čo najlepší eluát DNA. Tento krok bol zopakovaný dvakrát.
- Eluát DNA bol skladovaný pri -20 °C.

4.4.3 Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie DNA

Koncentrácia a čistota izolovanej DNA bola meraná spektrofotometricky pomocou prístroju NanoDrop 2000. Prístroj meral absorbanciu pri vlnových dĺžkach 230, 260 a 280 nm. Prístroj disponuje softvérom, ktorý sám vyhodnotil koncentráciu vzorky a jej čistoty na základe vyhodnotenia pomerov A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} . Ako referenčná vzorka pre fenol-chloroformovú extrakciu bol použitý 1 μ l TE pufru a pre izoláciu pomocou OMNI Bacterial DNA Purification kitu to bol 1 μ l EB pufru. Všetky vzorky boli nanášané taktiež o takomto objeme.

4.4.4 Polymerázová reťazová reakcia

- Všetky komponenty určené k PCR boli pred použitím premiešané a scentrifugované.
- Z komponentov 1. – 5. potrebných na amplifikáciu DNA (vid'. Tab. 5) bola pripravená zmes (tzv. master mix). Master mix sa pripravuje zmiešaním všetkých komponentov v stanovenom poradí, ktoré sú vynásobené počtom stanovovaných vzoriek.
- Master mix bol pripravený do 1,5 ml Eppendorfovej skúmavky a po dôkladnom scentrifugovaní bol rozpipetovaný do menších 200 μ l Eppendorfových skúmavok po 24 μ l.
- Nakoniec bola do každej Eppendorfovej skúmavky napipetovaná požadovaná matrica DNA.
- Zmiešaním Master mixu a požadovanej DNA sme dostali 25 μ l PCR zmesi.
- Na pozitívne kontroly boli využité purifikované DNA matricových kultúr uvedených v kapitole 4.4.1 a na negatívnu kontrolu bola využitá voda pre PCR. Tieto zložky boli do reakčnej zmesi dodané namiesto matrice DNA z mliečnych výrobkov.

- Všetky komponenty boli premiešané, scentrifugované a vložené do termocykléru s predvoleným nastavením (vid'. Tab. 7).
- Po skončení programu boli PCR zmesi využité k detekcii PCR produktov pomocou gélovej agarózovej elektroforézy alebo boli uschovávané pri – 20 °C.

Tab. 5: Komponenty na prípravu zmesi pre qPCR

Poradie	Komponent	Objem (µl)
1.	qPCR 2x SYTO-9	12,5
2.	Primer 1	1,0
3.	Primer 2	1,0
4.	PCR Ultra H ₂ O	9,5
5.	Matrica DNA	1,0
Celkový objem		25,0

Použité primery

- Pre doménu *Bacteria* boli použité špecifické primery F_Eub a R_Eub.
- Pre rod *Lactobacillus* boli použité špecifické primery F_Allact a R_Allact.
- Pre rod *Bifidobacterium* boli použité špecifické primery Bif 164 a Bif 662.
- Pre druh *Lactobacillus acidophilus* boli použité špecifické primery F_Acidophilus (F_Acid.) a R_Acidophilus (R_Acid).
- Sekvencie všetkých použitých primerov sú uvedené v Tab. 6.

Tab. 6: Použité primery pre PCR

Primery	Sekvencia primeru (5' → 3')	Veľkosť PCR produktu	Zdroj
Doména <i>Bacteria</i>			
F_Eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp	[78]
R_Eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
Rod <i>Lactobacillus</i>			
F_Allact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92 bp	[78]
R_Allact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT		
Rod <i>Bifidobacterium</i>			
Bif 164	GGG TGG TAA TGC CGG ATG	523 bp	[79]
Bif 662	CCA CCG TTA CAC CGG GAA		

Tab. 6: Použité primery pre qPCR (pokračovanie)

Primery	Sekvencia primeru (5' → 3')	Veľkosť PCR produktu	Zdroj
Druh <i>L. acidophilus</i>			
F_Acid.	GAA AGA GCC CAA ACC AAG TGA TT	85 bp	[78]
R_Acid.	CTT CCC AGA TAA TTC AAC TAT CGC TTA		

Amplifikačné programy pre jednotlivé primery

Pred začatím PCR reakcie bol pre každý použitý primer nájdený v literatúre požadovaný amplifikačný program [78; 79]. Všetky použité programy sú uvedené v Tab. 7.

Tab. 7: Amplifikačný program termocykléru [78; 79]

Primery	Krok	Teplota (°C)	Čas (-)	Počet cyklov (-)
F_Eub R_Eub	Počiatočná denaturácia DNA	95	5 min	Prvý krok
	Denaturácia DNA	95	1 min	35
	Hybridizácia primerov	55	30 s	
	Syntéza reťazca DNA	72	30 s	
	Konečné dosyntetizovanie DNA	72	5 min	Posledný krok
F_Allact R_Allact	Počiatočná denaturácia DNA	94	5 min	Prvý krok
	Denaturácia DNA	94	30 s	30
	Hybridizácia primerov	55	30 s	
	Syntéza reťazca DNA	72	1 min	
	Konečné dosyntetizovanie DNA	72	5 min	Posledný krok
Bif 164 Bif 662	Počiatočná denaturácia DNA	95	5 min	Prvý krok
	Denaturácia DNA	95	1 min	30
	Hybridizácia primerov	55	1 min	
	Syntéza reťazca DNA	72	2 min	
	Konečné dosyntetizovanie DNA	72	10 min	Posledný krok

Tab. 7: Amplifikačný program termocykléru (pokračovanie) [78; 79]

Primery	Krok	Teplota (°C)	Čas (-)	Počet cyklov (-)
F_Acid. R_Acid.	Počiatočná denaturácia DNA	94	5 min	Prvý krok
	Denaturácia DNA	94	30 s	30
	Hybridizácia primerov	55	30 s	
	Syntéza reťazca DNA	72	1 min	
	Konečné dosyntetizovanie DNA	72	5 min	Posledný krok

4.4.5 Gélová elektroforéza PCR produktov

- Bol pripravený 1,8% agarózový gél, ktorý bol prevarený v mikrovlnnej rúre do úplného rozpustenia agarózy.
- Po ochladnutí gélu približne na 60 °C bolo k nemu pridaných 5 µl farbiva PS Green.
- Gél bol následne dôkladne premiešaný a naliaty do elektroforetickej vaničky s hrebienkom.
- Gél sa nechal tuhnúť približne 30 minút.
- Po stuhnutí gélu bol z neho odobratý hrebienok a gél sa preliat 0,5× TBE pufrom, približne 5 mm nad gél.

Nanášanie PCR produktov

- Vzorky na elektroforézu boli pripravené z celkového množstva 25 µl PCR produktu, ku ktorému bolo pridaných 5 µl farbiva pre elektroforézu (LD Green).
- Zmes sa nechala odstáť približne 10 minút, aby sa farbivo dostatočne naviazalo na PCR produkt.
- Do jamiek gélu bol najprv nanosené 5 µl štandardu (FastGene 50bp DNA) a 15 µl PCR produktov zmiešaných s farbivom (vrátane negatívnej a pozitívnej kontroly).

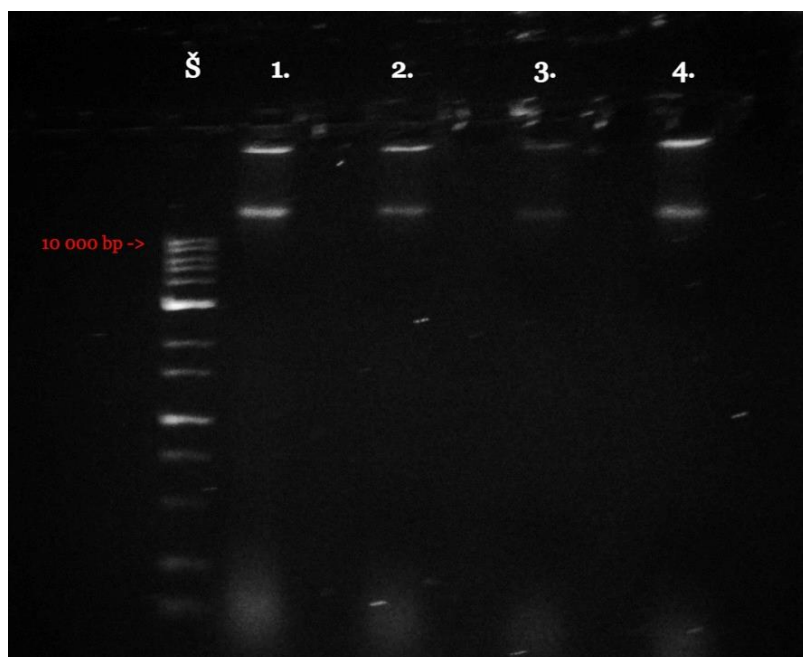
Priebeh elektroforézy

- Po nanosení všetkých vzoriek sa elektroforéza nechala vyvíjať 1,5 hodiny pri konštantnom napätí 80 V.
- Po ukončení elektroforézy boli výsledky pozorované v UV transluminátore pri vlnovej dĺžke 302 nm.

5 VÝSLEDKY

5.1 Príprava bakteriálnych buniek

Bakteriálne kultúry lyofilizovaných druhov *L. plantarum* (CCM 7039), *L. casei* (CCM 7088), *L. acidophilus* (CCM 4833), *L. pentosus* (CCM 4619), *L. delbrueckii* (CCM 7190), *B. animalis* (CCM 4988) a *B. breve* (CCM 7825) boli poskytnuté vedúcim bakalárskej práce. Všetky kultúry boli kultivované za anaeróbných podmienok v MRS médiu s cysteínom po dobu 48 hodín a pri teplote 37 °C. Po 48 hodinách bol vo všetkých skúmavkách sledovaný zákal, ktorý symbolizoval nárast bakteriálnych kultúr. Všetky kultúry boli následne po 48 hodinách preočkované do nových médií, kde kultivácia prebiehala za rovnakých podmienok a bol sledovaný nárast bakteriálnych kultúr. Nakoniec bola izolovaná bakteriálna DNA, ktorá v prípade kultúry *L. plantarum* prebiehala pomocou fenol-chloroformovej extrakcie s následným zrážaním DNA v 70 % etanole. Ostatné kultúry boli izolované pomocou OMNI Bacterial DNA kitu. Takto pripravená bakteriálna DNA pre jednotlivé druhy bola následne podrobená gélovej elektroforéze (vid'. Obr. 8 a 9). V nasledujúcom priebehu práce bola používaná ako pozitívna kontrola pri prevádzaní špecifickej PCR. U všetkých vzoriek bakteriálnych druhov bola zaznamenaná genómová DNA.

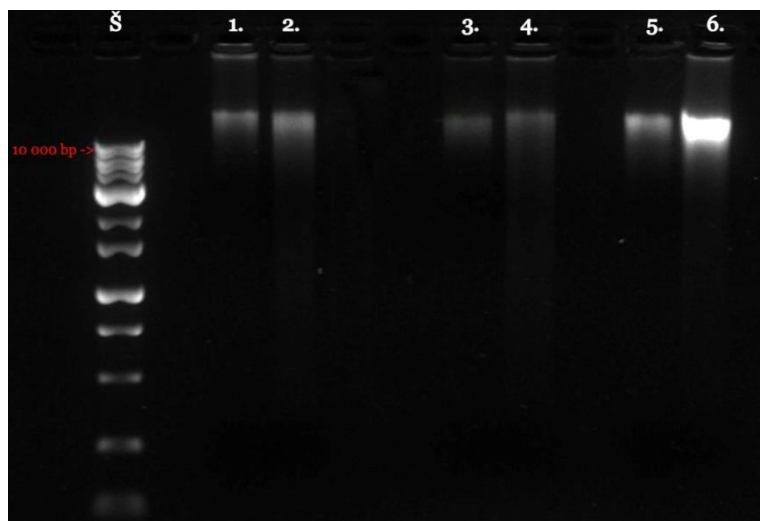


Vysvetlivky:

Š Štandard (1Kb DNA)

1. – 4. *L. plantarum*

Obr. 8: Gélová elektroforéza bakteriálnej DNA (*L. plantarum*)



Vysvetlivky:

Š Štandard (1Kb DNA)

1. *B. animalis*

2. *L. casei*

3. *B. breve*

4. *L. acidophilus*

5. *L. pentosus*

6. *L. delbrueckii*

Obr. 9: Gélová elektroforéza bakteriálnej DNA jednotlivých kultúr

5.2 Izolácia bakteriálnej DNA z mliečnych výrobkov

K práci boli využité štyri mliečne výrobky: Acidofilné mlieko, Actimel, Activia a Selský jogurt. Zo všetkých vzoriek boli najprv pripravené hrubé lyzáty (viď. kapitola 4.4.2), z ktorých bola izolovaná bakteriálna DNA pomocou klasickej fenol-chloroformovej extrakcie a na porovnanie bola prevedená aj izolácia pomocou OMNI Bacterial DNA kitu.

Izolácia bakteriálnej DNA pomocou fenol-chloroformovej extrakcie

Z pripravených hrubých lyzátov jednotlivých mliečnych produktov bolo odobratých zakaždým 500 μ l, ktoré boli následne použité na fenol-chloroformovú extrakciu bakteriálnej DNA. Hneď po extrakcii bolo vykonané etanolové zrážanie DNA. Vzorky boli následne rozpustené v 50 μ l TE pufru a skladované pri 4 °C do nasledujúcej práce.

Izolácia bakteriálnej DNA pomocou OMNI Bacterial DNA kitu

Na porovnanie bola vykonaná aj izolácia bakteriálnej DNA pomocou komerčného OMNI Bacterial DNA kitu. Na prácu bolo použitých 200 μ l pripraveného hrubého lyzátu jednotlivých produktov a postup izolácie prebiehal na základe priloženého protokolu od výrobcu. Vzorky boli rozpustené v 100 μ l EB pufru, ktorý bol súčasťou balenia OMNI Bacterial DNA kitu. Takto pripravené vzorky boli skladované pri – 20°C.

Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA

Koncentrácia a čistota bakteriálnej DNA, izolovanej pomocou klasickej fenol-chloroformovej metódy a komerčnej metódy pomocou OMNI Bacterial DNA kitu, bola spektrofotometricky stanovená v UV oblasti prístrojom NanoDrop 2000. Čistota izolovanej

DNA bola stanovená na základe pomerov absorbanacie pri špecifických vlnových dĺžkach 230, 260 a 280 nm. Výsledky sú uvedené v Tab. 9 a 10.

Tab. 8: Značenie vzoriek

Produkt	Použitá extrakcia	
	Fenol-chloroform	DNA komerčný kit
Acidodilné mlieko	1_Ac	2_Ac
Actimel	1_Act	2_Act
Activia	1_Activ	2_Activ
Selský jogurt	1_SJ	2_SJ

Tab. 9: Spektrofotometrické stanovenie pre fenol-chloroformovú extrakciu

Produkt	A260 [-]	A280 [-]	A260/A280 [-]	A260/A230 [-]	c [ng/μl]
1_Ac	7,937	4,616	1,72	0,58	396,9
1_Act	0,425	0,287	1,48	0,21	21,3
1_Activ	0,785	0,525	1,50	0,73	39,2
1_SJ	0,707	0,435	1,63	0,50	35,3

Tab. 10: Spektrofotometrické stanovenie pre izoláciu Omni Bacterial DNA Purification Kitu

Produkt	A260 [-]	A280 [-]	A260/A280 [-]	A260/A230 [-]	c [ng/μl]
2_Ac	0,214	0,124	1,73	1,82	10,7
2_Act	0,523	0,428	1,22	0,82	26,2
2_Activ	0,275	0,148	1,86	1,11	13,8
2_SJ	0,622	0,403	1,54	1,37	31,1

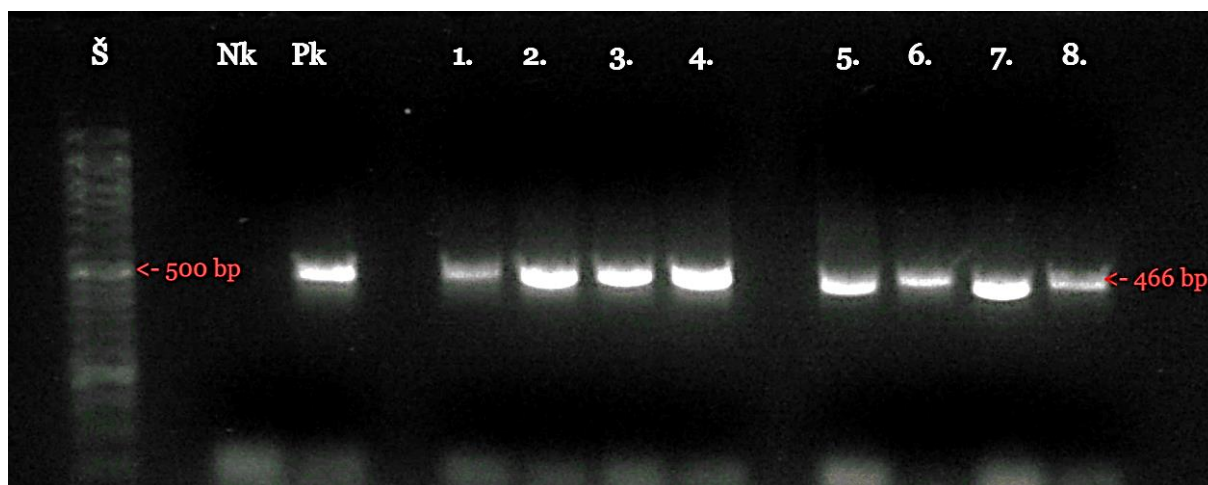
Zriedenie DNA na koncentráciu 10 ng/μl

Koncentrácia matric DNA bola pre všetky vzorky mliečnych výrobkov zriedená približne na koncentráciu 10 ng/μl kvôli účelom qPCR. Riedenie DNA izolovanej pomocou fenol-chloroformovej metódy prebiehala pomocou TE pufru a v prípade komerčného kitu bol na riedenie využitý EB pufr. Takto zriedené vzorky boli využité pre qPCR analýzy.

5.3 Špecifická real-time PCR pre doménu *Bacteria*

Na overenie prítomnosti domény *Bacteria* vo vzorkách Acidofilného mlieka, Actimelu, Activie a Selského jogurtu bola využitá špecifická kvantitatívna real-time PCR (qPCR). Na prácu boli využité primery F_Eub a R_Eub, kde veľkosť ich PCR produktov bola podľa literatúry očakávaná na 466 bp [78]. Na pozitívnu kontrolu bola použitá kultúra CCM 7039 *L. plantarum*. Detekcia PCR produktov zo vzoriek vybraných mliečnych výrobkov pre izoláciu pomocou fenol-chloroformovej metódy a izoláciu pomocou komerčného kitu sú znázornené na Obr. 10. Štandard o veľkosti 50 bp bol nanášaný o objeme 5 μl a PCR produkty vzoriek, vrátane

pozitívnej a negatívnej kontroly, boli nanášané o objeme 15 μ l. Takmer pre všetky PCR produkty bola zaznamenaná veľmi vysoká intenzita detekcie.



Obr. 10: Gélková elektroforéza PCR produktov špecifických pre doménu Bacteria

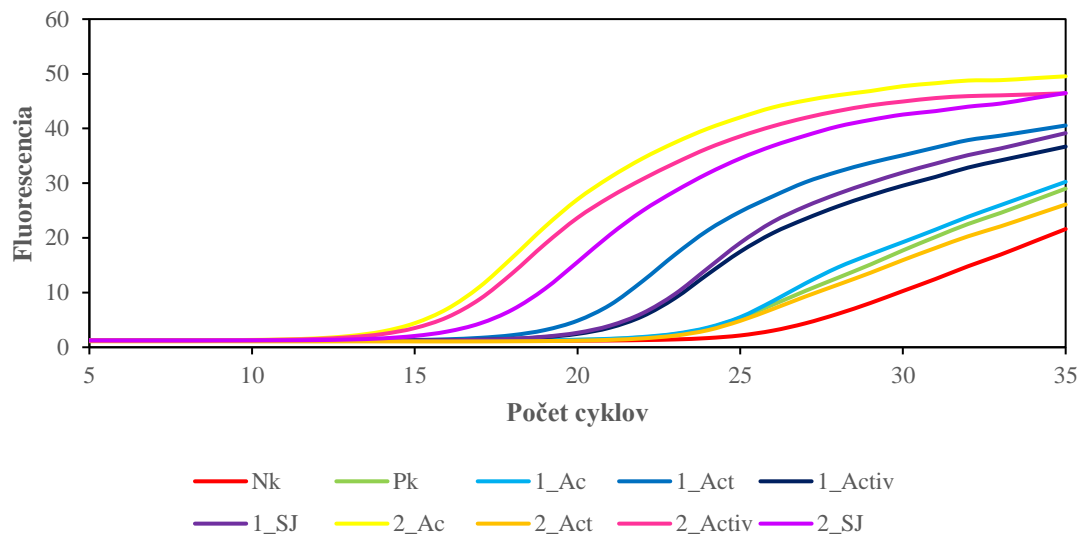
Tab. 11: Detekcia PCR produktov pre doménu Bacteria

Názov	Značka	Detekcia PCR produktu	
Štandard (50bp)	Š		
Poz. kontrola	Pk	+++	
Neg. kontrola	Nk	–	
Fenol-chloroformová extrakcia			
1_Ac	1.	++	+++
1_Act	2.	+++	Veľmi vysoká detekcia PCR produktu
1_Activ	3.	+++	++
1_SJ	4.	+++	Vysoká detekcia PCR produktu
DNA izolačný kit			
2_Ac	5.	+++	+
2_Act	6.	++	Nízka detekcia PCR produktu
2_Activ	7.	+++	–
2_SJ	8.	++	PCR produkt nedetekovaný
			Pk Pozitívna kontrola: <i>L. plantarum</i>
			Nk Negatívna kontrola: voda pre PCR

Analýza amplifikačných kriviek domény Bacteria

Na Obr. 11 sú zaznamenané amplifikačné krivky, ktoré znázorňujú priebeh qPCR reakcie. Najväčšiu amplifikačnú schopnosť vykazovali vzorky, ktoré boli izolované pomocou komerčného kitu (2_Ac, 2_Activ a 2_SJ), ktorých prahový bod (Ct) bol zaznamenaný už v 14. cykle. Ďalej nasledovali vzorky izolované fenol-chloroformovou metódou (1_Act, 1_SJ,

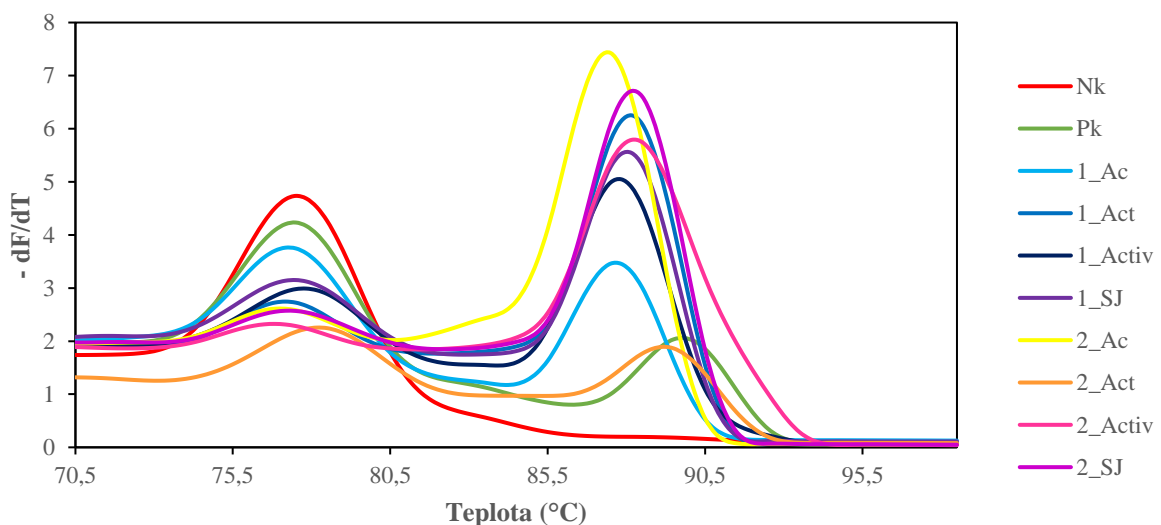
1_Activ) s Ct približne v 20. cykle a nakoniec pozitívna kontrola so vzorkami 1_Ac a 2_Act s Ct až v 24. cykle.



Obr. 11: Amplifikačné krivky produktov pre doménu *Bacteria*

Analýza kriviek topenia domény Bacteria

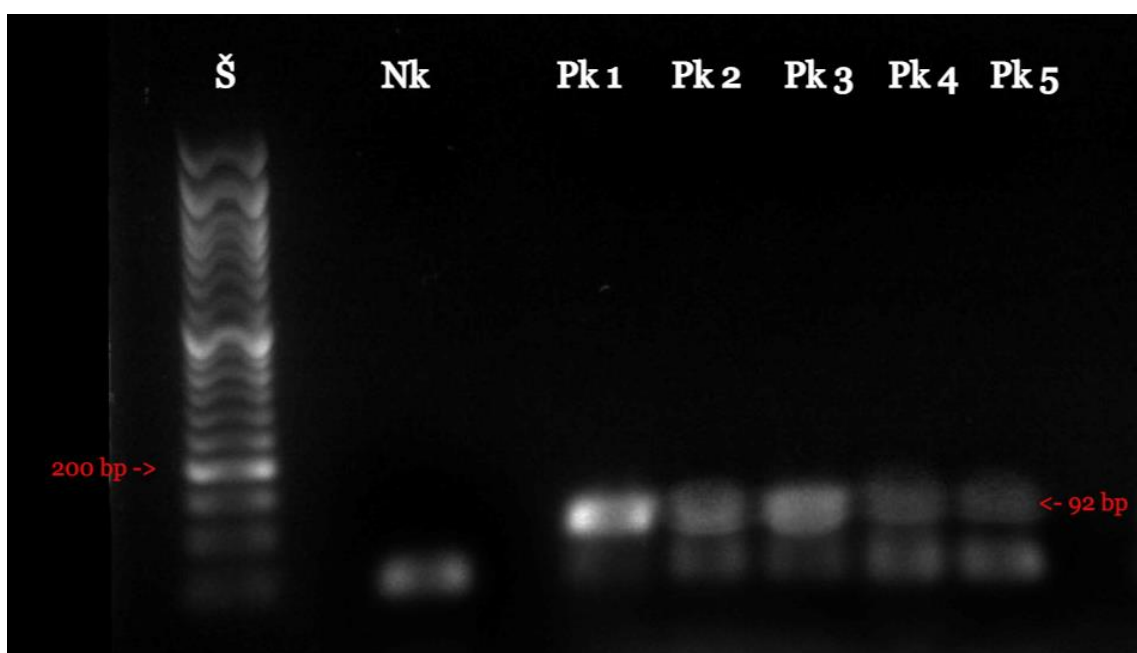
Behom procesu qPCR boli zachytené krivky topenia špecifických PCR produktov, ktoré sú znázornené na Obr. 12. Boli detegované dva píky, kde prvý pík s teplotou topenia 78-78,5 °C znázorňoval vznik dimérov primerov (PD) a druhý detegovaný pík vykazoval vznik špecifických produktov pri vyšších teplotách topenia v rozmedzí 88-90 °C. Len v prípade pozitívnej kontroly a vzorky 1_Ac pík vzniku PD presahoval pík špecifických produktov, čo sa na gélovej elektroforéze prejavilo šmuhami na spodnej časti agarózového gélu.



Obr. 12: Krivky topenia produktov pre doménu *Bacteria*

5.4 Špecifická real-time PCR pre rod *Lactobacillus*

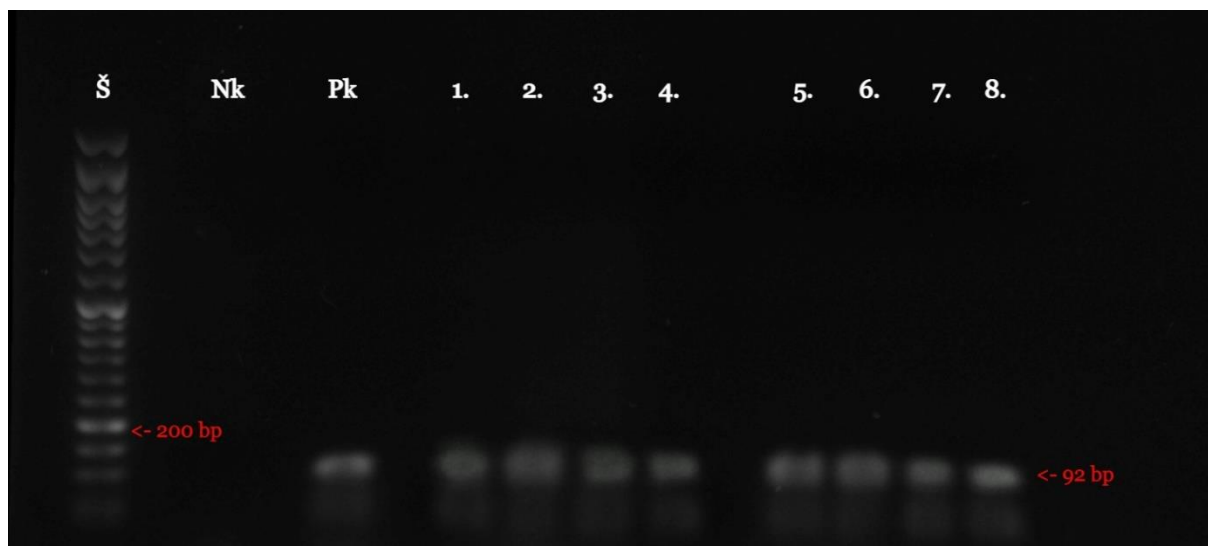
Na overenie prítomnosti rodu *Lactobacillus* vo vzorkách bola využitá rodovo špecifická qPCR. Na prácu boli využité primery F_Allact a R_Allact, kde veľkosť PCR produktov bola podľa literatúry očakávaná na 92 bp [78]. Na Obr. 13 je znázornená gélová elektroforéza PCR produktov jednotlivých druhov rodu *Lactobacillus*, ktoré boli použité ako pozitívne kontroly na overenie priebehu rodovo špecifickej qPCR. Na Obr. 14 je už zachytená gélová elektroforéza PCR produktov zo vzoriek vybraných mliečnych produktov, kde bola použitá na pozitívnu kontrolu kultúra CCM 7039 *L. plantarum*. Vo všetkých vzorkách mliečnych produktov bola potvrdená prítomnosť rodu *Lactobacillus*.



Obr. 13: Gélová elektroforéza PCR produktov pozitívnych kontrol špecifických pre rod *Lactobacillus*

Tab. 12: Detekcia PCR produktov pozitívnych kontrol pre rod *Lactobacillus*

Názov	Značka	Detekcia PCR produktu	Vysvetlivky:
Štandard (50bp)	Š		
Neg. kontrola	Nk	–	
<i>L. casei</i>	Pk 1	+++	+++ Veľmi vysoká detekcia PCR produktu
<i>L. acidophilus</i>	Pk 2	++	++ Vysoká detekcia PCR produktu
<i>L. pentosus</i>	Pk 3	+	+ Nízka detekcia PCR produktu
<i>L. delbrueckii</i>	Pk 4	+	– PCR produkt nedetekovaný
<i>L. plantarum</i>	Pk 5	+	Nk Negatívna kontrola: voda pre PCR



Obr. 14: Gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre rod *Lactobacillus*

Tab. 13: Detekcia PCR produktov pre rod *Lactobacillus*

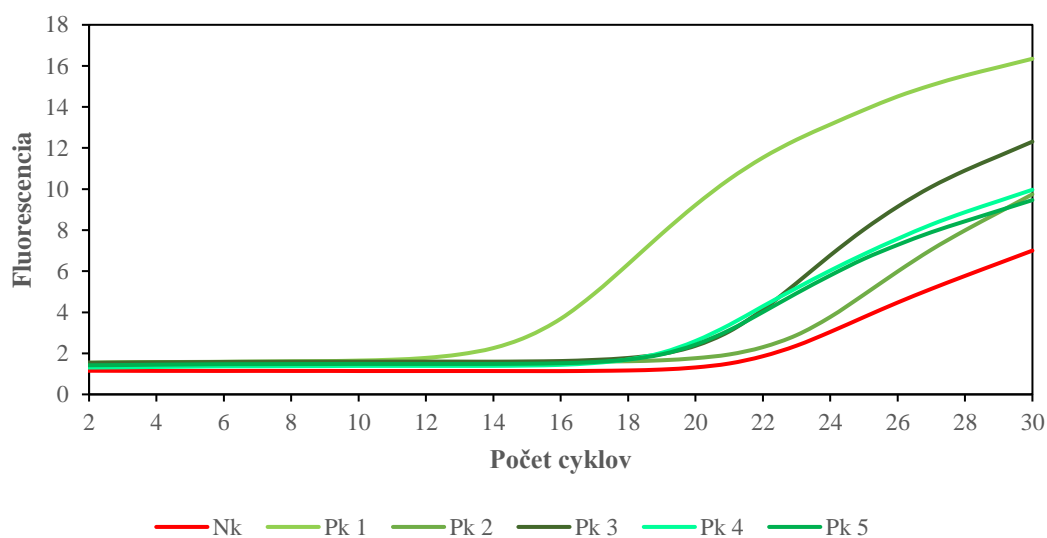
Názov	Značka	Detekcia PCR produktu
Štandard (50bp)	Š	
Poz. kontrola	Pk	++
Neg. kontrola	Nk	–
Fenol-chloroformová extrakcia		
1_Ac	1.	+
1_Act	2.	+
1_Activ	3.	+
1_SJ	4.	+
DNA izolačný kit		
2_Ac	5.	+
2_Act	6.	+
2_Activ	7.	+
2_SJ	8.	+

Vysvetlivky:

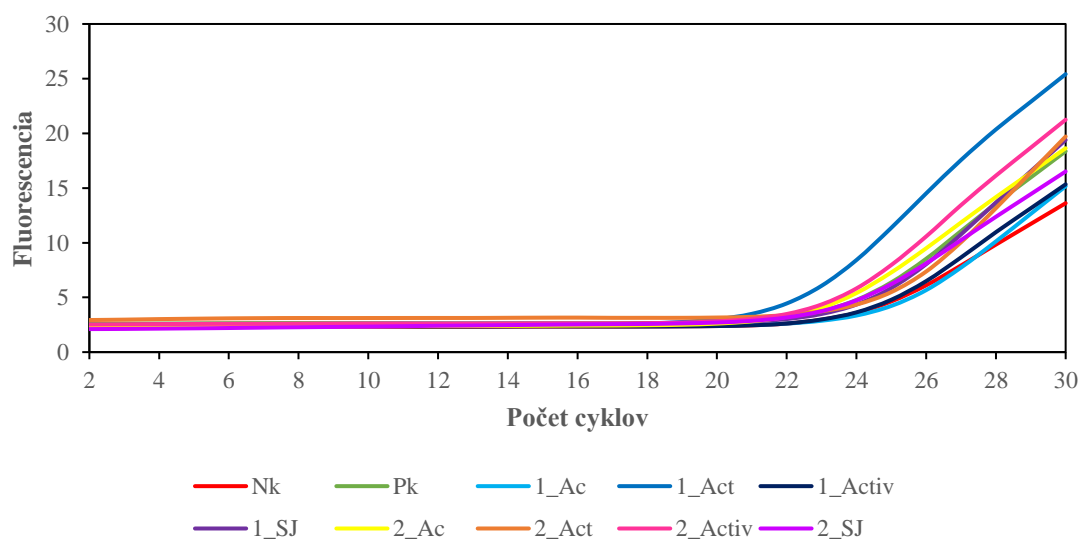
- +++ Veľmi vysoká detekcia PCR produktu
- ++ Vysoká detekcia PCR produktu
- + Nízka detekcia PCR produktu
- PCR produkt nedetekovaný
- Pk Pozitívna kontrola: *L. plantarum*
- Nk Negatívna kontrola: voda pre PCR

Analýza amplifikačných kriviek rodu *Lactobacillus*

Na Obr. 15 sú znázornené amplifikačné krivky pre jednotlivé druhy rodu *Lactobacillus*. Druh Pk 1 vykazuje najlepšiu mieru amplifikovateľosti, pretože jeho Ct začínal už v 13. cykle a dosahoval aj najväčšiu mieru fluorescencie. Ďalej nasledovali vzorky Pk 3, Pk 4 a Pk 5 s Ct približne v 19. cykle. Najneskôr začala amplifikácia vzorky Pk 5, ktorá sa začala až v 21. cykle. Na Obr. 16 sú znázornené amplifikačné krivky jednotlivých mliečnych výrobkov, kde bol Ct zaznamenaný u väčšiny vzoriek pri 23. cykle. Jedine v prípade vzorky 1_Act začala amplifikácia v 21. cykle.



Obr. 15: Amplifikačné krivky produktov pozitívnych kontrol rodu *Lactobacillus*

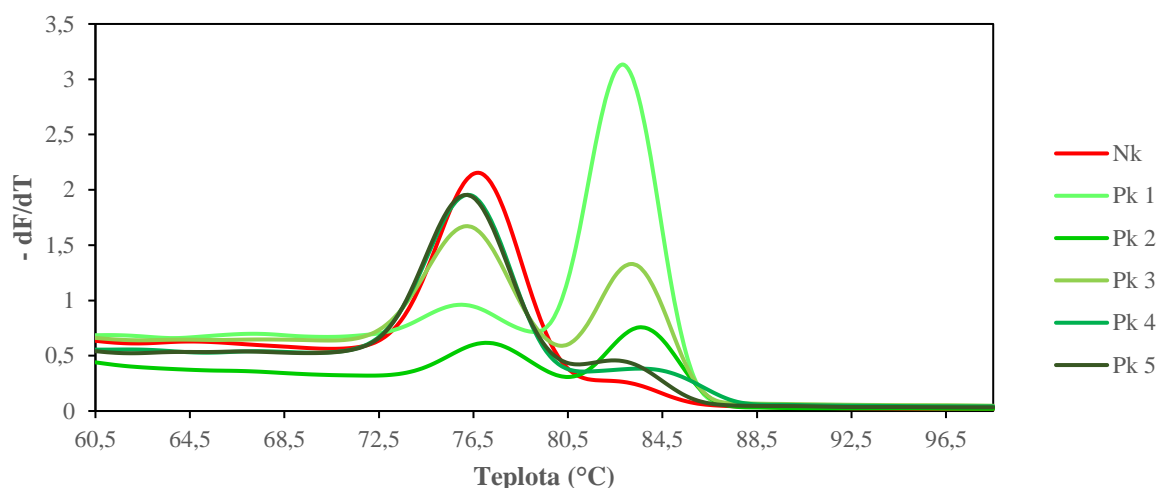


Obr. 16: Amplifikačné krivky produktov pre rod *Lactobacillus*

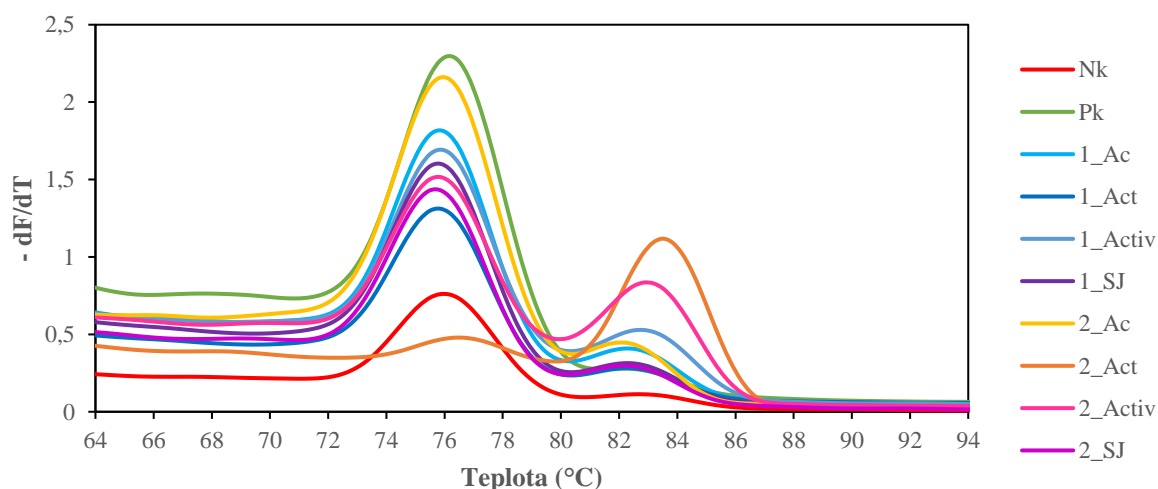
Analyza kriviek topenia rodu *Lactobacillus*

Na Obr. 17 sú znázornené krivky topenia pre jednotlivé pozitívne kontroly, z ktorých je zrejmé, že pri teplote cca 76,5 °C bol detegovaný vznik PD a špecifické produkty boli zaznamenané pri teplotách v rozmedzí 83,0-85 °C. Takmer u všetkých vzoriek presahoval pík PD nad píkوم špecifických produktov, čo sa prejavilo vznikom šmuhy na gélovej elektroforéze (viď. Obr. 13 a 14). Len v prípade vzorky Pk 1 dominoval špecifický produkt, čo sa odzrkadlilo aj na vizualizácii, kde šmuha symbolizujúca PD nie je až také zreteľná. Tento jav je pozorovateľný aj pri negatívnej kontrole.

Na Obr. 18 sú znázornené krivky topenia mliečnych produktov, kde prvý pík deteguje PD pri 76 °C a druhý zaznamenáva špecifické produkty v rozmedzí 82,5-84 °C. V tomto prípade všade dominovali PD, čo sa odzrkadlilo aj na gélovej elektroforéze. Detekcia PCR produktov bola veľmi nízka so zachytenými šmuhami dimérov.



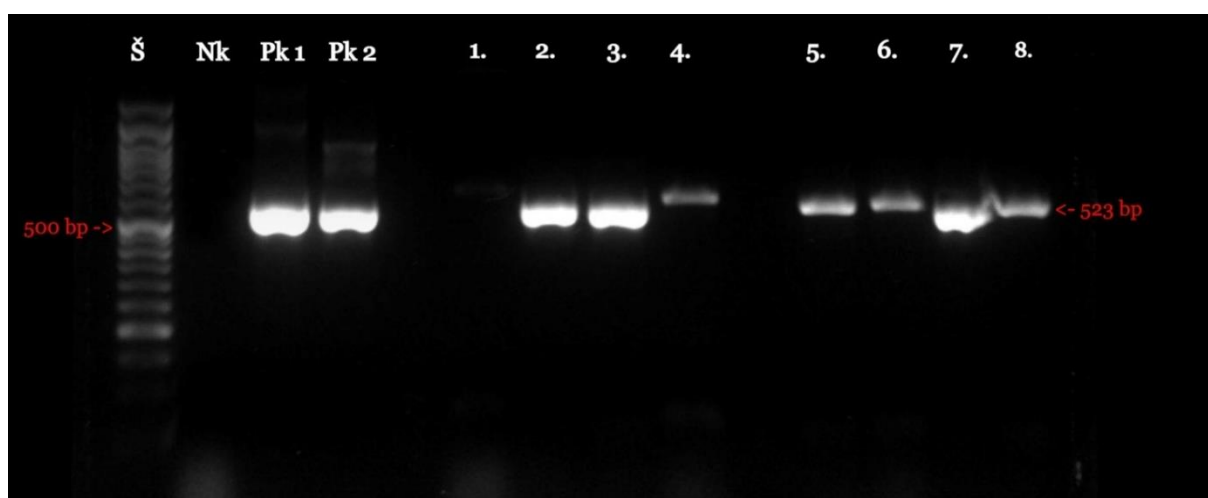
Obr. 17: Krivky topenia produktov pozitívnych kontrol rodu *Lactobacillus*



Obr. 18: Krivky topenia produktov pre rod *Lactobacillus*

5.5 Špecifická real-time PCR pre rod *Bifidobacterium*

Na overenie prítomnosti rodu *Bifidobacterium* vo vzorkách bola využitá rodovo špecifická qPCR s primermi Bif 164 a Bif 662, kde veľkosť PCR produktov bola podľa literatúry očakávaná na 523 bp [80]. Na pozitívnu kontrolu bola použitá kultúra CCM 4988 *B. animalis* a CCM 7825 *B. breve*. Detekcia PCR produktov pomocou gélovej elektroforézy pre obe extrakčné metódy DNA je znázornená na Obr. 19. Veľmi vysoká detekcia PCR produktu bola zaznamenaná pri oboch pozitívnych kontrolách a aj pri vzorkách 1_Act, 1_Activ a 2_Activ. Menej intenzívna bola detekcia PCR produktov vzoriek 1_SJ, 2_Ac, 2_Act a 2_SJ. Len v prípade vzorky 1_Ac nebol detegovaný produkt.



Obr. 19: Gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre rod *Bifidobacterium*

Tab. 14: Detekcia PCR produktov pre rod *Bifidobacterium*

Názov	Značka	Detekcia PCR produktu
Štandard (50bp)	Š	
Poz. kontrola	Pk 1, 2	+++
Neg. kontrola	Nk	–
Fenol-chloroformová extrakcia		
1_Ac	1.	–
1_Act	2.	+++
1_Activ	3.	+++
1_SJ	4.	++
DNA izolačný kit		
2_Ac	5.	++
2_Act	6.	++
2_Activ	7.	+++
2_SJ	8.	++

Vysvetlivky:

+++ Veľmi vysoká detekcia PCR produktu

++ Vysoká detekcia PCR produktu

+ Nízka detekcia PCR produktu

– PCR produkt nedetekovaný

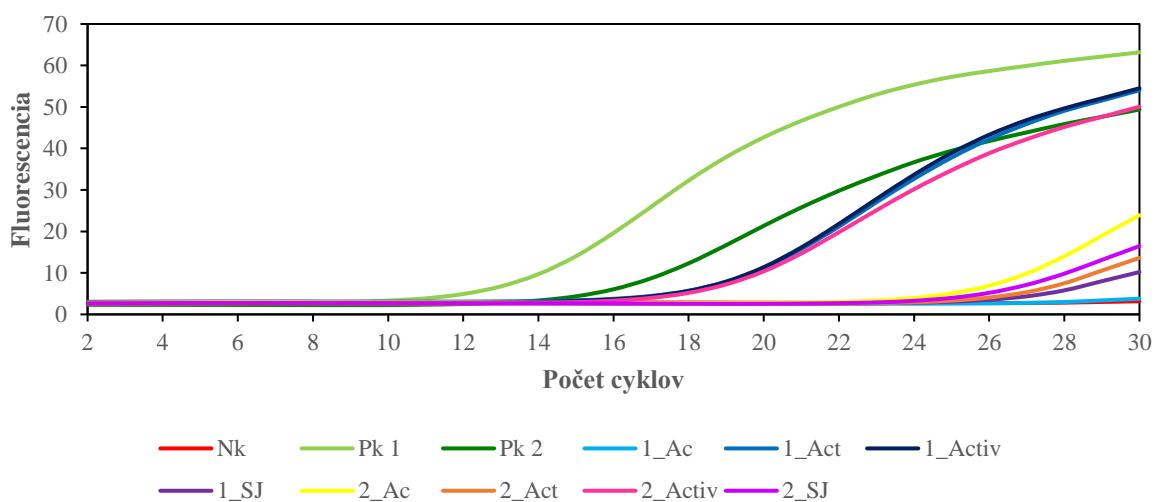
Pk 1 Pozitívna kontrola: *B. animalis*

Pk 2 Pozitívna kontrola: *B. breve*

Nk Negatívna kontrola: voda pre PCR

Analýza amplifikačných kriviek rodu *Bifidobacterium*

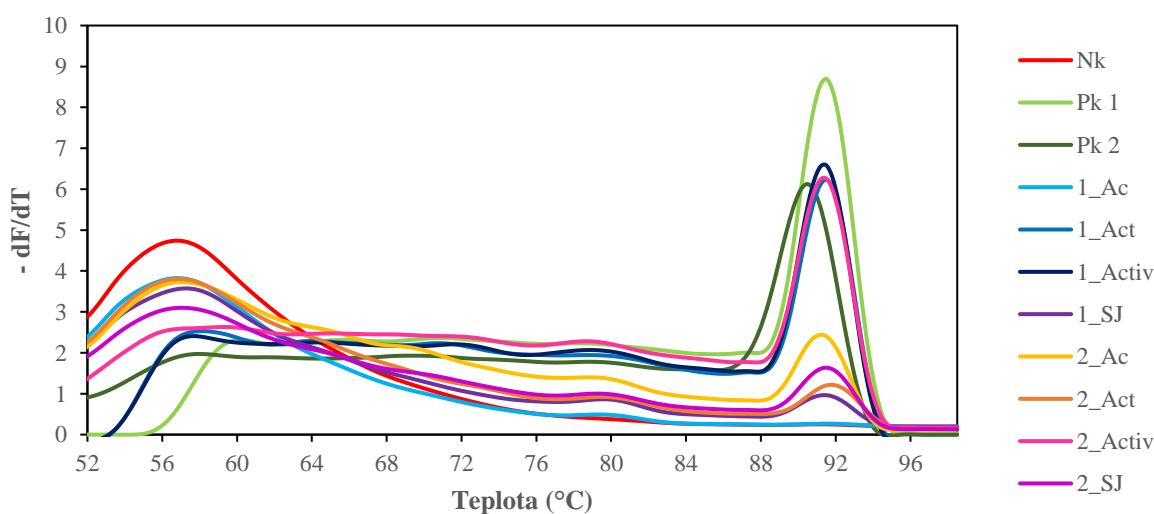
Positívna kontrola Pk 1 vykazovala vysokú mieru amplifikovateľnosti s Ct v 11. cykle a taktiež aj s vysokou fluorescenčnou odozvou. O niečo neskôr, približne v 15. cykle, bola zaznamenaná aj druhá pozitívna kontrola Pk 2. Vzorky 1_Act, 1_Activ a 2_Activ sa začali amplifikovať v 17. cykle, vzorky 1_SJ a 2_Ac až v 26. cykle, a nakoniec bol sledovaný mierny nárast u vzoriek 1_SJ a 2_Act v 26. cykle.



Obr. 20: Amplifikačné krivky produktov pre rod *Bifidobacterium*

Analýza kriviek topenia rodu *Bifidobacterium*

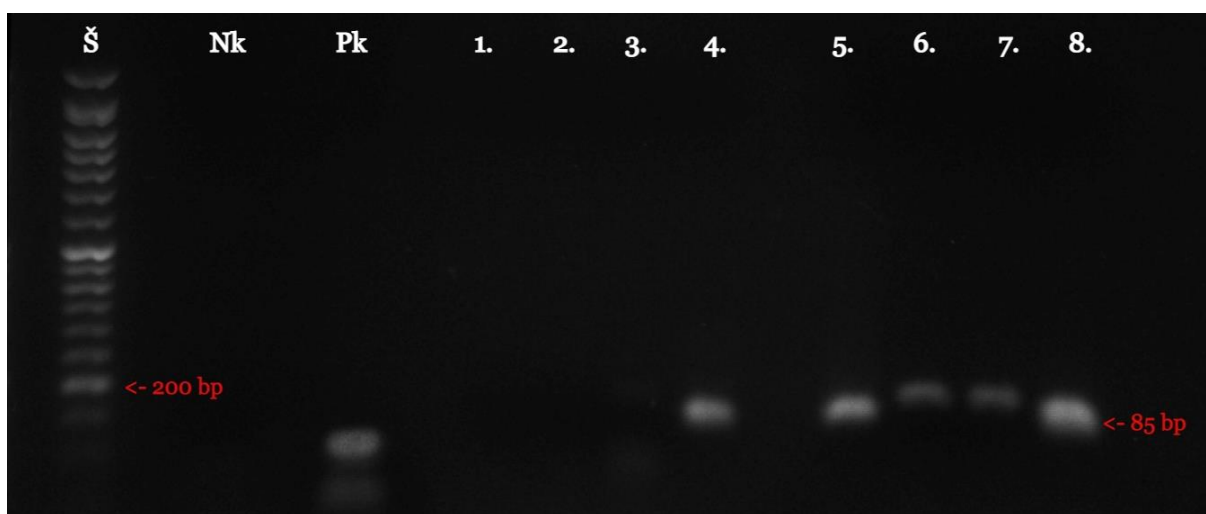
V tomto prípade už nebol zaznamenaný markantný vznik PD ako tomu bolo pri doméne *Bacteria* a rode *Lactobacillus*. Teplota topenia primerov pre pozitívne kontroly a jednotlivé vzorky bola zaznamenaná v rozmedzí 56-58 °C. Špecifické produkty spolu s Pk 1 zaznamenávali jednotnú teplotu topenia 92 °C, len v prípade pozitívnej kontroly Pk 2 bola zaznamenaná pri 91 °C.



Obr. 21: Krivky topenia produktov pre rod *Bifidobacterium*

5.6 Špecifická real-time PCR pre druh *Lactobacillus acidophilus*

Na druhovo špecifickú qPCR boli využité primery F_Acidophilus a R_Acidophilus, kde veľkosť PCR produktov bola očakávaná na 85 bp [78]. Na pozitívnu kontrolu bola použitá kultúra CCM 4833 *L. acidophilus*. Detekcia PCR produktov pomocou gélovej elektroforézy je znázornená na Obr. 23. Pre všetky vzorky izolované pomocou DNA kitu bola zaznamenaná detekcia PCR s najvyššou intenzitou pri vzorkách 2_Ac a 2_SJ. V prípade izolácie pomocou fenol-chloroformovej metódy bol PCR produkt detegovaný len pri vzorke 1_SJ a ostatné vzorky neboli detegované.



Obr. 22: Gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *L. acidophilus*

Tab. 15: Detekcia PCR produktov pre druh

L. acidophilus

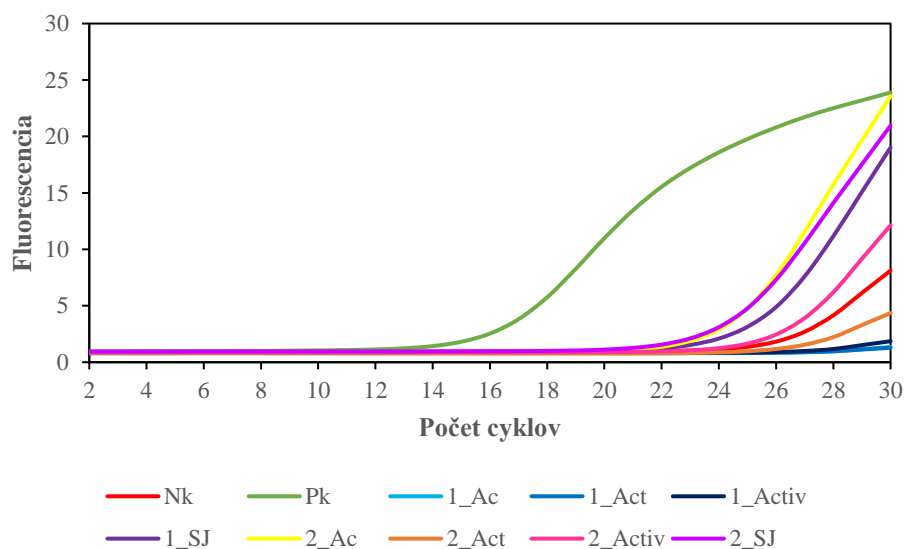
Názov	Značka	Detekcia PCR produktu
Štandard (50bp)	Š	
Poz. kontrola	Pk	++
Neg. kontrola	Nk	–
Fenol-chloroformová extrakcia		
1_Ac	1.	–
1_Act	2.	–
1_Activ	3.	–
1_SJ	4.	++
DNA izolačný kit		
2_Ac	5.	++
2_Act	6.	+
2_Activ	7.	+
2_SJ	8.	++

Vysvetlivky:

- +++ Veľmi vysoká detekcia PCR produktu
- ++ Vysoká detekcia PCR produktu
- + Nízka detekcia PCR produktu
- PCR produkt nedetekovaný
- Pk Pozitívna kontrola: *L. acidophilus*
- Nk Negatívna kontrola: voda pre PCR

*Analýza amplifikačných kriviek druhu *L. acidophilus**

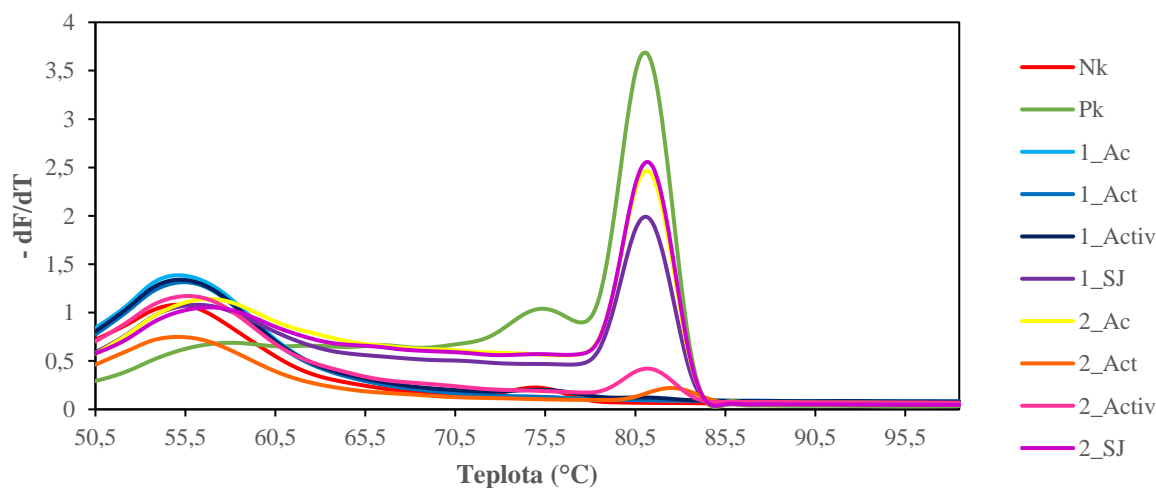
Použitá pozitívna kontrola vykazovala veľmi dobrú schopnosť amplifikácie už v 14. cykle (viď. Obr. 24). Ďalej nasledovali vzorky 2_Ac, 1_SJ a 2_SJ v 22. cykle, vzorka 2_Activ v 25. cykle a nakoniec vzorka 2_Act s Ct v 26. cykle.



Obr. 23: *Amplifikačné krivky produktov druhu *L. acidophilus**

*Analýza kriviek topenia druhu *L. acidophilus**

Pri teplote cca 58 °C bol detegovaný vznik PD a špecifické produkty boli zaznamenané pri teplote približne 81,5 °C. Aj napriek tomu, že na Obr. 25 boli zaznamenané krivky topenia PD, tieto vedľajšie produkty sa nám neobjavili na gélovej elektroforéze (viď. Obr. 23).



Obr. 24: *Krivky topenia produktov pre druh *L. acidophilus**

6 DISKUSIA

6.1 Izolácia DNA z čistých bakteriálnych kultúr

Z bakteriálnej kultúry druhu *L. plantarum* (CCM 7039) bol pripravený lyzát buniek, z ktorého bola izolovaná DNA pomocou fenol-chloroformovej extrakcie. Tá bola následne vyzrážaná etanolom a behom práce bola používaná ako pozitívna kontrola pri prevádzaní qPCR pre doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*. Z ostatných kultúr *L. casei* (CCM 7088), *L. acidophilus* (CCM 4833), *L. pentosus* (CCM 4619), *L. delbrueckii* (CCM 7190), *B. animalis* (CCM 4988) a *B. breve* (CCM 7825) boli tiež pripravené lyzáty buniek, z ktorých bola DNA izolovaná pomocou OMNI Bacterial DNA kitu, kvôli vyšším požiadavkám na čistotu izolovanej bakteriálnej DNA. Po izolácii DNA zo všetkých bakteriálnych kultúr, boli jednotlivé vzorky podrobené gélovej elektroforéze, kde bola potvrdená prítomnosť genómovej DNA (vid'. Obr. 8 a 9). Izolovaná DNA z kultúr *B. animalis* a *B. breve* bola použitá ako pozitívna kontrola pre špecifickú qPCR rodu *Bifidobacterium* a druh *L. acidophilus* bol použitý ako pozitívna kontrola pri rodovo špecifickej qPCR.

6.2 Izolácia bakteriálnej DNA z komerčne dostupných mliečnych výrobkov

K analýze boli využité štyri mliečne výrobky: Acidofilné mlieko, Activia, Actimel a Selský jogurt. Tieto výrobky boli zvolené hlavne na základe deklarovaného obsahu BMK od výrobcov. Priamo z výrobkov bol pripravený hrubý lyzát buniek, z ktorého bola následne izolovaná DNA pomocou klasickej fenol-chloroformovej metódy a OMNI Bacterial DNA kitu.

Najprv bola prevádzaná fenol-chloroformová metóda, ktorá je považovaná za klasickú metódu využívanú v molekulárne-biologických laboratóriách. Ide o veľmi presnú a citlivú metódu. Jej nevýhoda však spočíva hlavne v časovej náročnosti, ako aj v používaní toxických chemikálií [48]. Po fenol-chloroformovej extrakcii bola DNA následne vyzrážaná pomocou etanolu a rozpustená v 50 μ l TE pufru. Takto pripravená bakteriálna DNA zo vzoriek bola priamo použitá na prevedenie PCR reakcie.

Na porovnanie bola bakteriálna DNA izolovaná aj pomocou komerčného OMNI Bacterial DNA kitu. Výhoda tejto izolácie spočívala hlavne v rýchlejšom prevedení, ktoré prebiehalo približne 1 hodinu. Jediná zaznamenaná komplikácia sa vyskytla pri izolácii z mliečnych výrobkov, ktoré obsahovali väčšie množstvo tukov (hlavne Acidofilné mlieko a Activia). Preto v istých krokoch uvedených v kapitole 4.4.2. boli prevedené mierne modifikácie protokolu, ako napríklad dlhšia doba centrifugácie pri vyšších otáčkach. Bakteriálna DNA izolovaná touto metódou bola rozpustená v 100 μ l EB pufru.

6.3 Spektrofotometrická kvantifikácia nukleových kyselín

Po izolácii pomocou oboch vyššie spomenutých metód bola v nasledujúcom kroku zistená koncentrácia a čistota izolovanej bakteriálnej DNA v jednotlivých vzorkách. Na túto kontrolu bola použitá spektrofotometrická metóda v UV oblasti pomocou prístroja NanoDrop 2000. Koncentrácia izolovanej DNA sa pohybovala v rozmedzí 10,7 – 396,9 ng/μl. Nakoľko DNA izolovaná pomocou fenol-chloroformovej metódy bola rozpustená v 50 μl TE pufru a DNA izolovaná pomocou komerčného kitu bola rozpustená v 100 μl EB pufru, tak aj keď koncentrácia DNA vo vzorkách pri fenol-chloroformovej metóde je vyššia (vid'. Tab, 9 a 10), nie je tomu úplne tak. Nakoľko bola DNA pri izolácii pomocou kitu dvojnásobne zriedená, tak predpokladáme, že ak by bol aj pri tejto metóde použitý rovnaký objem pufru, tak by výsledky koncentrácií boli porovnateľné, ba aj o niečo vyššie. Jediná výrazná odchýlka je zaznamenaná pri DNA izolovanej z Acidofilného mlieka pomocou fenol-chloroformovej metódy (vzorka 1_Ac), kde koncentrácia DNA bola spektrofotometricky stanovená na hodnotu 396,9 ng/μl. Táto odchýlka nastala pravdepodobne kvôli tomu, že na izoláciu bol využitý starší lyzát bakteriálnych buniek, kde mohla byť DNA už značne degradovaná a fragmentovaná. Nanodrop však nie je schopný rozoznať fragmentovanú DNA, čo mohlo viesť k falošným výsledkom vysokej koncentrácie bakteriálnej DNA vo vzorke. Preto by sme v ďalšej práci odporúčali pracovať primárne už len s čerstvo pripravenými lyzátmi. Celkovo však izolovaná DNA vo všetkých výrobkoch pomocou oboch metód poskytovala dostatočnú koncentráciu, pretože na qPCR bola použitá koncentrácia o veľkosti 10 ng/μl.

Na základe pomerov absorbancií A260/A280 a A260/A230 bola vyhodnotená miera čistoty izolovanej DNA. Pomer A260/A280 bol u všetkých produktov o niečo nižší ako je udávaná hodnota 1,8~2,0; čo znamená, že vzorky boli mierne kontaminované proteínmi alebo zvyškovými organickými rozpúšťadlami [51]. Najnižšiu kontamináciu a relatívne najčistejšiu DNA poskytovali vzorky 2_Activ (1,86), 2_Ac (1,73) a 1_Ac (1,72). O niečo vyššia kontaminácia, ktorá je však stále tolerovateľná, bola zaznamenaná pri vzorkách 1_SJ (1,63), 2_SJ (1,54), 1_Activ (1,50) a 1_Act (1,48). A nakoniec najvyššiu mieru kontaminácie udávala vzorka 2_Act (1,22). Výraznejšie rozdiely pri porovnávaní metód nám poskytol pomer A260/A230, ktorý sa má pohybovať v rozsahu 2,0~2,2 [52]. Hoci pri oboch metódach izolácie sú tieto pomery nižšie ako udáva literatúra, čo značí značnú kontamináciu organickými rozpúšťadlami, výrazne nižšie hodnoty boli zaznamenané pri izolácii pomocou fenol-chloroformovej metódy. Z tohto môžeme vyvodit' záver, že DNA izolovaná pomocou OMNI Bacterial DNA kitu poskytla o niečo čistejšiu a menej kontaminovanú DNA. Nakoľko však

kontrola čistoty pomocou spektrofotometrického stanovenia nie je veľmi presná pri nízkych koncentráciách, tieto výsledky boli brané hlavne orientačne [51; 52].

6.4 Špecifická real-time PCR pre doménu *Bacteria*

Na vyhodnotenie výsledkov bola využitá qPCR, ktorá je používaná na monitorovanie priebehu reakcie PCR v reálnom čase. V našom prípade nám táto metóda poskytla prehľad o dôležitých princípoch, ako sú účinnosť priebehu PCR, analýza amplifikačných kriviek a kriviek topenia [81]. Pomocou grafov amplifikačných kriviek sme zistili, v akom cykle začala prebiehať exponenciálna fáza, ktorá odzrkadľuje zdvojnásobenie počtu amplikónov po každom cykle a v akom cykle došlo k spotrebe primerov. Grafy obsahujúce krivky topenia nám poskytli ďalšie informácie o priebehu qPCR a hlavne detegovali vznik PD a špecifických produktov.

Na zistenie prítomnosti domény *Bacteria* vo vzorkách bola využitá špecifická qPCR s primermi F_Eub a R_Eub. Výsledky qPCR boli vizualizované na 1,8% agarózovom géle a všetky detegované amplifikované produkty PCR boli o veľkosti 466 bp [78] (viď. Obr. 10), ako bolo uvádzané v literatúre. Ďalšia analýza kriviek topenia nám poskytla informáciu o vzniku vedľajších produktov PD, ale aj o vzniku špecifických produktov. Pri prvej sade píkov boli detegované PD o $T_m \cong 78 \text{ }^\circ\text{C}$, ktoré boli taktiež zaznamenané na agarózovom géle, a pri druhej sade boli zaznamenané špecifické produkty o $T_m \cong 88,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Na pozitívnu kontrolu bola využitá kultúra *L. plantarum*, u ktorej bol taktiež dokázaný amplifikovaný PCR produkt o veľkosti 466 bp. Pri pozitívnej kontrole bola však odpozorovaná vyššia $T_m \cong 90 \text{ }^\circ\text{C}$ ako u ostatných vzoriek, čo značí, že druh *L. plantarum* obsahuje DNA bohatšiu na cytozín a guanín [82]. Na porovnanie viditeľne najnižšiu $T_m \cong 87,5 \text{ }^\circ\text{C}$ mali amplifikované PCR produkty zo vzoriek Acidofilného mlieka (1_Ac a 2_Ac), čo znamená, že bakteriálna DNA obsiahnutá v týchto produktoch má viac zastúpené nukleotidy adenín a tymín [82]. Pri negatívnej kontrole neboli zaznamenané žiadne amplifikované produkty PCR, len vznik PD, ktoré boli zachytené na krivkách topenia a taktiež aj na spodnej časti agarózového gélu.

6.5 Špecifická real-time PCR pre rod *Lactobacillus*

Nakoľko sú mliečne výrobky všeobecne bohaté na baktérie rodu *Lactobacillus*, overili sme si ich prítomnosť taktiež podľa rodovo špecifickej qPCR za využitia primerov F_Alllact a R_Alllact. Po vizualizácii výsledkov na 1,8% agarózovom géle boli detegované amplifikované PCR produkty o veľkosti 92 bp [78] (viď. Obr. 13 a 14), čo dokazovalo prítomnosť rodu *Lactobacillus* u všetkých vzoriek. Zaznamenaná intenzita týchto produktov na agarózovom géle však bola oveľa menšia ako v prípade qPCR pre doménu *Bacteria*. Z kriviek topenia bol

taktiež zaznamenaný vznik PD o $T_m \cong 76,5 \text{ }^\circ\text{C}$ a pre špecifické produkty sa táto hodnota pohybovala okolo $T_m \cong 83,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Na pozitívnu kontrolu bol opäť použitý druh *L. plantarum*. Pri negatívnej kontrole neboli zaznamenané žiadne amplifikované produkty PCR, len vznik PD, ktoré boli zachytené na krivkách topenia a taktiež aj na spodnej časti agarózového gélu.

Nakoľko bol častokrát zaznamenaný problém vzniku PD, bola overená účinnosť primerov F_Alllact a R_Alllact. Bola na to využitá bakteriálna DNA vybraných kultúr rodu *Lactobacillus* izolovaná pomocou OMNI Bacterial DNA kitu, aby sa zabránilo inhibičným účinkom organických látok na priebeh PCR reakcie, ktoré by mohli nastať práve za využitia klasickej fenol-chloroformovej metódy [83]. Vyskytol sa tu taktiež rovnaký problém, ako v prípade analýzy jednotlivých vzoriek, kedy pík PD presahoval pík špecifického produktu. Nestalo sa tak jedine v prípade vzorky Pk 1 (viď. Obr. 17). Vznik PD je však častým problémom mimocielovej amplifikácie počas priebehu PCR reakcie. Aby sa tomu predišlo, bolo by potrebné v budúcej práci navrhnuť nové pomery komponentov reakčnej zmesi, pravdepodobne s menším obsahom primerov, aby sa eliminoval vznik PD [84].

6.6 Špecifická real-time PCR pre rod *Bifidobacterium*

Výrobcovia vybraných mliečnych produktov deklarovali prítomnosť rodu *Bifidobacterium*, ktorá bola overená rodovo špecifickou qPCR s primermi Bif 164 a Bif 662. V prípade výrobkov Acidofilného mlieka a Selského jogurtu bolo uvedené množstvo $10^6/\text{g}$ bifidobaktérií vo výrobku, čím bol splnený minimálny obsah (10^6 CFU/g) podľa kritérií stanovených v norme ČSN EN 15785 [85].

Na pozitívnu kontrolu boli využité dva druhy bifidobaktérií a to *B. animalis* a *B. breve*. Prítomnosť rodu *Bifidobacterium* bola zaznamenaná u všetkých vzoriek okrem vzorky 1_Ac na 1,8% agarózovom géle o veľkosti PCR produktov približne 523 bp [86] (viď. Obr. 19) a taktiež na krivkách topenia (viď. Obr. 21). Najvyššiu intenzitu detekcie PCR produktov na agarózovom géle vykazovali obe pozitívne kontroly (Pk 1 a Pk 2) a vzorky 1_Act, 1_Activ a 2_Activ. O niečo menšia intenzita signálu bola zaznamenaná pri vzorkách 1_SJ, 2_Ac, 2_Act a 2_Sj. Jedine v prípade vzoriek Activie pre obe metódy izolácie bakteriálnej DNA vykazovali PCR produkty zhodnú intenzitu, čo nebolo odpozorované u ostatných vzoriek. Tento výsledok bol pre nás prekvapivý, nakoľko sme očakávali najviac amplifikovaných produktov v prípade výrobkov Acidofilného mlieka a Selského jogurtu, nakoľko tieto výrobky mali stanovené presné množstvo bifidobaktérií. V prípade Activie a Actimelu nebolo výrobcami uvedené presné množstvo bifidobaktérií, ale bola uvedená len ich prítomnosť.

Jedinú výnimku pri tejto identifikácii tvorí vzorka 1_Ac, ktorá na základe spektrofotometrického stanovenia vykazovala najlepšiu čistotu, ale nepodarilo sa nám ju dokázať. Tento problém však mohol nastať kvôli tomu, že bakteriálna DNA bola izolovaná zo staršieho hrubého lyzátu, kedy už mohla byť DNA značne degradovaná, ako už bolo spomínané v kapitole 6.3.

Na krivkách topenia bol opäť zaznamenaný vznik PD o $T_m = 56-58$ °C a pre špecifické produkty a pozitívnu kontrolu *B. animalis* bola $T_m = 92,0$ °C. Len v prípade pozitívnej kontroly *B. breve* bolo zaznamenaná nižšia $T_m = 91,0$ °C. Pri negatívnej kontrole neboli zaznamenané žiadne amplikované produkty PCR, len vznik PD, ktoré boli zachytené na krivkách topenia a taktiež aj v nízkej intenzite na spodnej časti agarózového gélu (rovnako ako aj v prípade vzoriek).

6.7 Špecifická real-time PCR pre druh *Lactobacillus acidophilus*

Nakoniec bola sledovaná prítomnosť druhu *L. acidophilus* pomocou druhovo špecifickej qPCR s primermi F_Acidophilus a F_Acidophilus, kde veľkosť výsledných PCR produktov bola očakávaná na 85 bp [78] (viď. Obr. 22). Prítomnosť druhu *L. acidophilus* bola zaznamenaná na 1,8% agarózovom géle a krivkách topenia pri všetkých vzorkách, kde bola použitá extrakcia pomocou DNA extrakčného kitu. V prípade izolácie pomocou fenol-chloroformovej metódy bola prítomnosť druhu *L. acidophilus* potvrdená len pri vzorke 1_SJ. V tomto prípade išlo opäť o prekvapujúce výsledky, pretože len výrobcovia produktov Acidofilného mlieka a Selského jogurtu deklarovali presným množstvom $10^6/g$ druhu *L. acidophilus* vo výrobku. Týmto bola opäť splnená minimálna požiadavka obsahu 10^6 CFU/g podľa normy ČSN ISO 20128 [87] pre mliečne výrobky s obsahom probiotického druhu *L. acidophilus*. V prípade Actimelu a Activie nebola táto prítomnosť opäť presne uvedená výrobcom.

PCR produkty vzoriek izolovaných pomocou fenol-chloroformovej metódy (1_Ac, 1_Act a 1_Activ) neboli detegované na krivkách topenia a ani na agarózovom géle. Podľa literatúry tento problém mohlo spôsobiť viacero faktorov. Najpravdepodobnejšie však je, že vzorky nemuseli byť amplifikované hlavne kvôli prítomnosti organických látok, ktoré v priebehu PCR reakcie pôsobia ako inhibítory reakcie [83]. Prípadné chyby mohli nastať aj kvôli nesprávne zvolenému teplotnému programu. V budúcej práci by sme museli navrhnúť prípadne časovo kratšiu denaturáciu alebo naopak dlhšiu dobu hybridizácie primerov (prípadne s nižšou teplotou). Eventuálne riešenie by mohlo ešte byť celkové zvýšenie počtu cyklov (napr. z 30 cyklov na 35), čo sme usúdili na základe amplifikačných kriviek z Obr. 23 [88]. V kontexte

konkrétnych vzoriek vidíme, že amplifikácia vzoriek 2_Act, 1_SJ a 2_SJ začala približne v 22. cykle a na gélovej elektroforéze práve tieto vzorky vykazovali najvyššiu intenzitu odozvy. Vzorky 2_Act a 2_Activ sa začali amplifikovať približne až v 25.-26. cykle, čo sa práve odzrkadlilo aj na gélovej elektroforéze, kde tieto vzorky vykazovali veľmi slabú odozvu.

Krivky topenia opäť potvrdili prítomnosť vzniku PD o $T_m = 56,0$ °C a pre špecifické produkty, spolu s pozitívnou kontrolou, bola $T_m = 81,5$ °C. Pri negatívnej kontrole neboli zaznamenané žiadne amplifikované produkty PCR (vid'. Obr. 24).

7 ZÁVER

Táto bakalárska práca sa zaoberala analýzou prítomnosti probiotických baktérií v mliečnych potravinových výrobkoch pomocou techniky PCR. V teoretickej časti bola značná pozornosť venovaná klasifikácii probiotických baktérií a ich prospešných účinkom na zdravie konzumenta, ktoré boli podložené aktuálnymi vedeckými štúdiami. Následne boli rozoberané aj základné molekulárne-biologické metódy identifikácie mikroorganizmov, ktoré sú v priemysle a aplikovanom výskume využívané pre jednoznačnú taxonomickú definíciu mikrobiálneho obsahu v mliečnych produktoch. Celkovo sú probiotické mikroorganizmy významnou súčasťou zdravého životného štýlu a preto je ich celková identifikácia pomocou molekulárne-biologických metód v potravinárskom a farmaceutickom priemysle dôležitá. V potravinárstve je vďaka presnej identifikácii mikrobiálneho obsahu, okrem zisťovania mikrobiálnych kontaminantov, možné priradiť zdraviu prospešné vlastnosti charakteristické pre jednotlivé MO, či už mliečnym produktom alebo iným doplnkom stravy. V našom prípade nás preto najviac zaujímala špecifická qPCR pre rod *Bifidobacterium* a druh *L. Acidophilus*, nakoľko podľa literatúry práve tieto mikroorganizmy vykazovali veľa zdraviu prospešných účinkov. *L. acidophilus* vykazuje hlavne potenciál pri prevencii gastrointestinálnych ochorení a zlepšovaní trávenia pri laktózovej intolerancii. A rôzne druhy rodu *Bifidobacterium* sú známe hlavne vďaka schopnosti rezistencie na žlčové soli a vykazujú dôležité dietetické účinky.

V praktickej časti práce bola z vybraných mliečnych výrobkov izolovaná bakteriálna DNA pomocou klasickej fenol-chloroformovej metódy a taktiež aj pomocou OMNI Bacterial DNA kitu. Spektrofotometrickým stanovením bola zistená celková čistota a koncentrácia izolovanej bakteriálnej DNA. Z týchto nameraných výsledkov bolo možné vyvodiť záver, že izolácia pomocou OMNI Bacterial DNA kitu poskytla čistejšiu a menej kontaminovanú DNA, v ktorej nepôsobili organické látky ako inhibítory reakcie PCR. Obe metódy izolácie však poskytli dostatočne koncentrovanú DNA, ktorá mohla byť následne podrobená kvantitatívnej real-time PCR za využitia špecifických primerov pre doménu *Bacteria*, rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, a taktiež aj pre druh *Lactobacillus acidophilus*.

Vo zvolených mliečnych produktoch bola potvrdená celková prítomnosť domény *Bacteria* a rodu *Lactobacillus* pre obe využité izolačné metódy DNA. Rozdiely však boli pozorované v prípade analýzy PCR špecifickejšej pre rod *Bifidobacterium* a druh *L. acidophilus*, kde boli detegované PCR produkty hlavne pri izolácii pomocou OMNI Bacterial DNA kitu. Všetky amplifikované PCR produkty boli detegované na agarózovom géle a pomocou kriviek topenia.

8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] KOK, Car a Robert HUTKINS. Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. *Nutrition Reviews* [online]. 2018, **76**(1), 4-15 [cit. 2021-10-2]. ISSN 0029-6643. Dostupné z: doi:10.1093/nutrit/nuy056
- [2] LILLY, Daniel a Rosalie STILLWELL. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science* [online]. 1965, **147**(3659), 747-748 [cit. 2021-11-24]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.147.3659.747
- [3] MCFARLAND, L. V. From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2015, **60**(2), 85-90 [cit. 2021-11-22]. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1093/cid/civ054
- [4] GASBARRINI, Giovanni, Fiorenza BONVICINI a Annagiulia GRAMENZI. Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology* [online]. 2016, **50**(2), 116-119 [cit. 2021-9-2]. ISSN 0192-0790. Dostupné z: doi:10.1097/MCG.0000000000000697
- [5] OZEN, M. a E.C. DINLEYICI. The history of probiotics: the untold story. *Beneficial Microbes* [online]. 2015, **6**(2), 159-165 [cit. 2021-10-2]. ISSN 1876-2883. Dostupné z: doi:10.3920/BM2014.0103
- [6] BULL, Matthew, Sue PLUMMER, Julian MARCHESI a Eshwar MAHENTHIRALINGAM. The life history of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic: a tale of revisionary taxonomy, misidentification and commercial success. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2013, **349**(2), 77-87 [cit. 2021-11-22]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/1574-6968.12293
- [7] MCFARLAND, L. V. From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2015, **60**(2), 85-90 [cit. 2021-11-24]. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1093/cid/civ054
- [8] SWAPNA, T., A. NINAWA a Sabu ABDULHAMEED. Probiotics. SUGATHAN, Shiburaj, N. S. PRADEEP a Sabu ABDULHAMEED, ed., Shiburaj SUGATHAN, N. PRADEEP, Sabu ABDULHAMEED. *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2017, s. 383-406 [cit. 2021-11-07]. ISBN 978-981-10-4282-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-4284-3_16
- [9] HILL, Colin, Francisco GUARNER, Gregor REID et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* [online]. 2014, **11**(8), 506-514 [cit. 2021-11-24]. ISSN 1759-5045. Dostupné z: doi:10.1038/nrgastro.2014.66
- [10] KAČÁNIOVÁ, Miroslava, Simona KUNOVÁ, Ludmila NAGYOVÁ, Elena HORSKÁ a Peter HAŠČÍK. Identifikácia mikroorganizmov vyizolovaných z *mliečnych* výrobkov za pomoci hmotnostnej **spektrometrie** MALDI TOF MS Biotyper a ich antibiotická

rezistencia: vedecká monografia. Vydání: první. Ostrava: Key Publishing s.r.o., 2018. Vědecká monografie. ISBN isbn978-80-7418-298-3.

- [11] SAVAIANO, Dennis a Robert HUTKINS. Yogurt, cultured fermented milk, and health: *a systematic* review. *Nutrition Reviews* [online]. 2021, 79(5), 599-614 [cit. 2021-6-2]. ISSN 0029-6643. Dostupné z: doi:10.1093/nutrit/nuaa013
- [12] FIJAN, Sabina. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2014, 11(5), 4745-4767 [cit. 2021-10-2]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph110504745
- [13] GOLDSTEIN, Ellie, Kerin TYRRELL a Diane CITRON. Lactobacillus Species: Taxonomic Complexity and *Controversial Susceptibilities*. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2015, 60(2), 98-107 [cit. 2022-04-06]. ISSN 1537-6591. Dostupné z: doi:10.1093/cid/civ072
- [14] KON, Kateryna. Lactococcus bacteria, illustration. In: Science Photo Library [online]. [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: <https://www.sciencephoto.com/media/1116597/view>
- [15] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v *nakl. Academia 1.* vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008. ISBN 978-80-2001-703-1.
- [16] HARNETT, J., G. DAVEY, A. PATRICK, C. CADDICK a L. PEARCE. Lactic Acid Bacteria | Streptococcus thermophilus. *Encyclopedia of Dairy Sciences* [online]. Elsevier, 2011, s. 143-148 [cit. 2021-11-22]. ISBN 9780123744074. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00268-5
- [17] HUTKINS, R. a Y.J. GOH. STREPTOCOCCUS | Streptococcus thermophilus. *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, s. 554-559 [cit. 2021-11-24]. ISBN 9780123847331. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00325-6
- [18] OAK, Sophia a Rajesh JHA. The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2019, 59(11), 1675-1683 [cit. 2021-10-2]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2018.1425977
- [19] KON, Kateryna. Lactococcus bacteria, illustration. In: Science Photo Library [online]. [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: <https://www.sciencephoto.com/media/1116597/view>
- [20] LUGLI, Gabriele, Christian MILANI, Sabrina DURANTI et al. Tracking the Taxonomy of the Genus *Bifidobacterium* Based on a Phylogenomic Approach. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2018, 84(4) [cit. 2021-11-22]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02249-17
- [21] KON, Kateryna. Bifidobacterium bacteria, illustration. In: Science Photo Library [online]. [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: <https://www.sciencephoto.com/media/1121108/view>

- [22] SOMMER, Felix, Jacqueline ANDERSON, Richa BHARTI, Jeroen RAES a Philip ROSENSTIEL. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2017, 15(10), 630-638 [cit. 2021-11-25]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro.2017.58
- [23] TOJO, Rafael. Intestinal microbiota in *health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis*. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2014, 20(41) [cit. 2021-11-25]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v20.i41.15163
- [24] SHIBY, V. a H. MISHRA. Fermented Milks and Milk Products as Functional Foods— A **Review**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2013, 53(5), 482-496 [cit. 2021-10-2]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2010.547398
- [25] KIM, Seon-Kyun, Robin GUEVARRA, You-Tae KIM, Joongi KWON, Hyeri KIM, Jae CHO, Hyeun KIM a Ju-Hoon LEE. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2019, 29(9), 1335-1340 [cit. 2021-10-2]. ISSN 1017-7825. Dostupné z: doi:10.4014/jmb.1906.06064
- [26] WILLIAMS, Nancy Toedter. Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy* [online]. 2010, 67(6), 449-458 [cit. 2021-11-24]. ISSN 1079-2082. Dostupné z: doi:10.2146/ajhp090168
- [27] VALITUTTI, , CUCCHIARA a FASANO. Celiac Disease and the Microbiome. *Nutrients* [online]. 2019, 11(10) [cit. 2021-11-24]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11102403
- [28] HOLSCHER, Hannah D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* [online]. 2017, 8(2), 172-184 [cit. 2021-10-2]. ISSN 1949-0976. Dostupné z: doi:10.1080/19490976.2017.1290756
- [29] SANDERS, Mary, Daniel MERENSTEIN, Gregor REID, Glenn GIBSON a Robert RASTALL. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* [online]. 2019, 16(10), 605-616 [cit. 2021-11-24]. ISSN 1759-5045. Dostupné z: doi:10.1038/s41575-019-0173-3
- [30] FARIAS, David, Fábio DE ARAÚJO, Iramaia NERI-NUMA a Glaucia PASTORE. Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2019, 93, 23-35 [cit. 2021-10-20]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2019.09.004
- [31] AL-SHERAJI, Sadeq, Amin ISMAIL, Mohd MANAP, Shuhaimi MUSTAFA, Rokiah YUSOF a Fouad HASSAN. Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods* [online]. 2013, 5(4), 1542-1553 [cit. 2021-11-24]. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2013.08.009
- [32] COSTA, Marília, Tatiana PIMENTEL, Jonas GUIMARAES et al. Impact of prebiotics on the rheological characteristics and volatile compounds of Greek yogurt. *LWT*

- [online]. 2019, 105, 371-376 [cit. 2021-10-2]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2019.02.007
- [33] FRANCO-DUARTE, Ricardo, Lucia ČERNÁKOVÁ, Snehal KADAM et al. *Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present*. Microorganisms [online]. 2019, 7(5) [cit. 2022-01-24]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms7050130
- [34] BUSZEWSKI, Bogusław, Agnieszka ROGOWSKA, Paweł POMASTOWSKI, Michał ZŁOCH a Viorica RAILEAN-PLUGARU. Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* [online]. 2017, 100(6), 1607-1623 [cit. 2022-04-13]. ISSN 1060-3271. Dostupné z: doi:10.5740/jaoacint.17-0207
- [35] BOCHNER, Barry R. Global phenotypic characterization of *bacteria*. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2009, 33(1), 191-205 [cit. 2022-04-15]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00149.x
- [36] DONELLI, Gianfranco, Claudia VUOTTO a Paola MASTROMARINO. Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. *Microbial Ecology in Health & Disease* [online]. 2013, 24(0) [cit. 2022-01-24]. ISSN 1651-2235. Dostupné z: doi:10.3402/mehd.v24i0.20105
- [37] COLWELL, R. R. Polyphasic Taxonomy of the Genus *Vibrio*: Numerical Taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and Related *Vibrio* Species. *Journal of Bacteriology* [online]. 1970, 104(1), 410-433 [cit. 2022-04-13]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.104.1.410-433.1970
- [38] UILENBERG, GERRIT a WILL GOFF. Polyphasic Taxonomy. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2006, 1081(1), 492-497 [cit. 2022-04-15]. ISSN 00778923. Dostupné z: doi:10.1196/annals.1373.073
- [39] PORTIN, PETTER. The birth and development of the DNA theory of inheritance: sixty years since the discovery of the structure of DNA. *Journal of Genetics* [online]. 2014, 93(1), 293-302 [cit. 2022-04-15]. ISSN 0022-1333. Dostupné z: doi:10.1007/s12041-014-0337-4
- [40] KELLENBERGER, Eduard. The evolution of molecular biology. *EMBO reports* [online]. 2004, 5(6), 546-549 [cit. 2022-04-15]. ISSN 1469-221X. Dostupné z: doi:10.1038/sj.embor.7400180
- [41] DAHM, Ralf. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics* [online]. 2008, 122(6), 565-581 [cit. 2022-01-25]. ISSN 0340-6717. Dostupné z: doi:10.1007/s00439-007-0433-0
- [42] COBB, Matthew. Oswald Avery, DNA, and the transformation of biology. *Current Biology* [online]. 2014, 24(2), 55-60 [cit. 2022-04-15]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2013.11.060

- [43] CHARGAFF, ERWIN, STEPHEN ZAMENHOF a CHARLOTTE GREEN. Human Desoxyribose Nucleic Acid: Composition of Human Desoxyribose Nucleic Acid. *Nature* [online]. 1950, 165(4202), 756-757 [cit. 2022-04-15]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/165756b0
- [44] WATSON, J. a F. CRICK. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* [online]. 1953, 171(4356), 737-738 [cit. 2022-04-15]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/171737a0
- [45] PRAY, Leslie. Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. In: *Nature Education* 1(1):100 [online]. 2008 [cit. 2022-04-16]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/discovery-of-dna-structure-and-function-watson-397/>
- [46] GUPTA, Nalini. DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology* [online]. 2019, 36(2) [cit. 2022-01-25]. ISSN 0970-9371. Dostupné z: doi:10.4103/JOC.JOC_110_18
- [47] ELKINS, Kelly M. DNA Extraction. *Forensic DNA Biology* [online]. Elsevier, 2013, s. 39-52 [cit. 2022-01-25]. ISBN 9780123945853. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394585-3.00004-3
- [48] GREEN, Michael a Joseph SAMBROOK. Isolation of *High-Molecular-Weight* DNA Using Organic Solvents. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2017, 2017(4) [cit. 2022-04-02]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot093450
- [49] MAYJONADE, Baptiste, Jérôme GOUZY, Cécile DONNADIEU, Nicolas POUILLY, William MARANDE, Caroline CALLOT, Nicolas LANGLADE a Stéphane MUÑOS. Extraction of high-molecular-weight genomic DNA for long-read sequencing of single molecules. *BioTechniques* [online]. 2016, 61(4), 203-205 [cit. 2022-01-25]. ISSN 0736-6205. Dostupné z: doi:10.2144/000114460
- [50] SHEN, Chang-Hui. Detection and Analysis of Nucleic Acids. *Diagnostic Molecular Biology* [online]. Elsevier, 2019, s. 167-185 [cit. 2022-04-15]. ISBN 9780128028230. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802823-0.00007-9
- [51] MATLOCK, Brian. Assessment of Nucleic Acid Purity. In: *ThermoFisher Scientific* [online]. Wilmington, USA, 2015 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
- [52] RNA/DNA Quantification: Detection technologies used for RNA/DNA quantification. In: *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-quantitation.html>

- [53] ZHU, Hanliang, Haoqing ZHANG, Ying XU, Soňa LAŠŠÁKOVÁ, Marie KORABEČNÁ a Pavel NEUŽIL. PCR past, present and future. *BioTechniques* [online]. 2020, **69**(4), 317-325 [cit. 2021-11-22]. ISSN 0736-6205. Dostupné z: doi:10.2144/btn-2020-0057
- [54] GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. *Polymerase Chain Reaction. Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2013, 133(3), 1-4 [cit. 2022-01-24]. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2013.1
- [55] PCR – the polymerase chain reaction. *Analytical Methods* [online]. 2014, 6(2), 333-336 [cit. 2022-01-24]. ISSN 1759-9660. Dostupné z: doi:10.1039/C3AY90101G
- [56] WALKER-DANIELS, Jennifer. *Current PCR Methods. Materials and Methods* [online]. 2012, 2 [cit. 2021-10-26]. ISSN 2329-5139. Dostupné z: doi:10.13070/mm.en.2.119
- [57] GREEN, Michael a Joseph SAMBROOK. *Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2019, 2019(6) [cit. 2021-11-23]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top095109
- [58] KADRI, Karim. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications*. L. NAGPAL, Madan, Oana-Maria BOLDURA, Cornel BALȚă a Shymaa ENANY, ed., Madan L. NAGPAL, Oana-Maria BOLDURA, Cornel BALȚă, Shymaa ENANY. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science* [online]. IntechOpen, 2020 [cit. 2021-11-23]. ISBN 978-1-78984-089-6. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.86491
- [59] MÜLHARDT, Cornel a E.W. BEESE. *The Polymerase Chain Reaction. Molecular Biology and Genomics* [online]. Elsevier, 2007, s. 65-94 [cit. 2021-11-26]. ISBN 9780120885466. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012088546-6/50006-3
- [60] SHAHZAD, Shaheen, Mohammad AFZAL, Shomaila SIKANDAR a Imran AFZAL. *Polymerase Chain Reaction*. JAMAL, Farrukh, ed., Farrukh JAMAL. *Genetic Engineering - A Glimpse of Techniques and Applications* [online]. IntechOpen, 2020 [cit. 2022-01-31]. ISBN 978-1-78985-179-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.81924
- [61] RUIJTER, Jan, Michael PFAFFL, Sheng ZHAO et al. Evaluation of *qPCR curve analysis methods* for reliable biomarker discovery: Bias, resolution, precision, and implications. *Methods* [online]. **2013**, 59(1), 32-46 [cit. 2022-01-25]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2012.08.011
- [62] REJALI, Nick, Aisha ZUITER, John QUACKENBUSH a Carl WITTWER. Reverse transcriptase kinetics for one-step RT-PCR. *Analytical Biochemistry* [online]. 2020, 601 [cit. 2022-01-25]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2020.113768
- [63] KUBISTA, Mikael, José ANDRADE, Martin BENGTSSON et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2006, 27(2-3), 95-125 [cit. 2022-01-25]. ISSN 00982997. Dostupné z: doi:10.1016/j.mam.2005.12.007
- [64] LI, Kelvin a Anushka BROWNLEY. *Primer Design for RT-PCR*. KING, Nicola, ed., Nicola KING. *RT-PCR Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, s. 271-

- 299 [cit. 2021-12-9]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-60761-628-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-629-0_18
- [65] DENG, Jie, Yang LI, *Wenqiang SHI, Rui LIU*, Cuiping MA a Chao SHI. Primer design strategy for denaturation *bubble-mediated strand exchange* amplification. *Analytical Biochemistry* [online]. 2020, 593 [cit. 2021-12-9]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2020.113593
- [66] RODRÍGUEZ, Alicia, Mar RODRÍGUEZ, *Juan CÓRDOBA a María ANDRADE*. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. BASU, *Chhandak*, ed., Chhandak **BASU**. PCR Primer Design [online]. New York, NY: Springer New York, 2015, s. 31-56 [cit. 2021-11-9]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-2364-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2365-6_3
- [67] JIMÉNEZ, Karen a Diego *FORERO*. *Effect of master mixes* on the measurement of telomere *length* by qPCR. *Molecular Biology Reports* [online]. 2018, 45(4), 633-638 [cit. 2021-11-9]. ISSN 0301-4851. Dostupné z: doi:10.1007/s11033-018-4175-y
- [68] STELLWAGEN, Nancy C. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2009, 30(1), 188-195 [cit. 2022-01-26]. ISSN 01730835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200900052
- [69] LEE, Pei, John COSTUMBRADO, *Chih-Yuan HSU a Yong KIM*. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (62) [cit. 2022-01-26]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/3923
- [70] REAM, Jennifer, L. LEWIS a Karen LEWIS. Rapid agarose gel electrophoretic mobility shift assay for quantitating protein: RNA interactions. *Analytical Biochemistry* [online]. 2016, 511, 36-41 [cit. 2022-01-26]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2016.07.027
- [71] MAGDELDIN, Sameh, ed. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* [online]. *InTech*, 2012 [cit. 2022-01-26]. ISBN 978-953-51-0458-2. Dostupné z: doi:10.5772/2205
- [72] GUSTAVSSON, Per-Erik a Per-OlofLars *SON*. *Monolithic Polysaccharide Materials. Monolithic Materials - Preparation, Properties and Applications* [online]. Elsevier, 2003, s. 121-141 [cit. 2022-04-09]. *Journal of Chromatography Library*. ISBN 9780444508799. Dostupné z: doi:10.1016/S0301-4770(03)80022-2
- [73] Actimel. In: Danone [online]. 2021 [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: <https://danone.cz/web/products/actimel/>
- [74] Selský jogurt bílý. In: Mlékárna Kunín [online]. 2020 [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: <https://www.mlekarna-kunin.cz/vyroby/selsky-jogurt-bily/>
- [75] Acidofilní mléko plnotučné. In: Mlékárna Valašské Meziříčí [online]. 2022 [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: <https://www.mlekarna-valmez.cz/ke-stazeni>

- [76] Activia. In: Activia [online]. Danone, 2019 [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: <https://www.activia.cz/cz/nase-vyrobky/bila/classic-pot-bila/activia-bila/>
- [77] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [78] HAARMAN, Monique a Jan KNOL. *Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula*. Applied and Environmental Microbiology [online]. 2006, 72(4), 2359-2365 [cit. 2022-04-02]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006
- [79] KOK, R, A DE WAAL, F SCHUT, G WELLING, G WEENK a K HELINGWERF. Specific detection and analysis of a probiotic Bifidobacterium strain in infant feces. Applied and Environmental Microbiology [online]. 1996, 62(10), 3668-3672 [cit. 2022-04-16]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.62.10.3668-3672.1996
- [80] HAARMAN, Monique a Jan KNOL. *Quantitative Real-Time PCR Assays To Identify and Quantify Fecal Bifidobacterium Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula*. Applied and Environmental Microbiology [online]. 2005, 71(5), 2318-2324 [cit. 2022-04-10]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.71.5.2318-2324.2005
- [81] HARSHITHA, Ravikumar a Duraipandian ARUNRAJ. *Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification*. Biochemistry and Molecular Biology Education [online]. 2021, 49(5), 800-812 [cit. 2022-04-27]. ISSN 1470-8175. Dostupné z: doi:10.1002/bmb.21552
- [82] KHANDELWAL, Garima, Jayaram BHYRAVABHOTLA a Sudhindra GADAGKAR. *A Phenomenological Model for Predicting Melting Temperatures of DNA Sequences*. PLoS ONE [online]. 2010, 5(8) [cit. 2022-05-01]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0012433
- [83] SCHRADER, C., A. SCHIELKE, L. ELLERBROEK a R. JOHNE. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. Journal of Applied Microbiology [online]. 2012, 113(5), 1014-1026 [cit. 2022-05-01]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- [84] DOBOSY, Joseph, Scott ROSE, Kristin BELTZ, Susan RUPP, Kristy POWERS, Mark BEHLKE a Joseph WALDER. RNase H-dependent PCR (rhPCR): improved specificity and single nucleotide polymorphism detection using blocked cleavable primers. BMC Biotechnology [online]. 2011, 11(1) [cit. 2022-05-01]. ISSN 1472-6750. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6750-11-80
- [85] ČSN EN 15785 (467046). *Krmiva: Izolace a stanovení počtu bakterií rodu Bifidobacterium*. 04/2010. Praha: Český normalizační institut, 2010.
- [86] JUNICK, Jana a Michael BLAUT. *Quantification of Human Fecal Bifidobacterium Species by Use of Quantitative Real-Time PCR Analysis Targeting the groEL Gene*.

Applied and Environmental Microbiology [online]. 2012, 78(8), 2613-2622 [cit. 2022-04-10]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.07749-11

- [87] ČSN ISO 20128 (560642). *Mléčné výrobky: Stanovení počtu presumptivního Lactobacillus acidophilus na selektivní živné půdě - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 37 °C*. 01/2007. Praha: Český normalizační institut, 2007.
- [88] LORENZ, Todd C. Polymerase *Chain Reaction: Basic Protocol Plus* Troubleshooting and Optimization Strategies. Journal of Visualized Experiments [online]. 2012, (63) [cit. 2022-05-10]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/3998

9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

BMK	Baktérie mliečneho kvasenia
bp	Páry báz (base pair)
Ct	Prahový bod
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ESI	Elektrosprejová ionizácia
FMV	Fermentované mliečne výrobky
G⁺	Grampozitívne baktérie
G⁻	Gramnegatívne baktérie
GC	Plynová chromatografia
LC	Kvapalinová chromatografia
LI	Laktózová intolerancia
MALDI-TOF	Matricou asistovaná laserová desorpcia/ionizácia
MO	Mikroorganizmy
NK	Nukleové kyseliny
PCR	Polymerázová reťazová reakcia
PD	Diméry primerov (primer dimers)
qPCR	Kvantitatívna (real-time) PCR
RHP	Referenčná hodnota príjmu
RNA	Ribonukleová kyselina
RT-PCR	Reverzne transkripčná PCR
SEM	Rastrovací elektrónová mikroskopia
TEM	Transmisná elektrónová mikroskopia
T_m	Teplota topenia (melting temperature)