



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOLEKULÁRNÍ IDENTIFIKACE PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ V MLÉČNÝCH PRODUKTECH Z KOMERČNÍCH JOGURTOVÝCH KULTUR

MOLECULAR IDENTIFICATION OF PROBIOTIC BACTERIA IN MILK PRODUCTS FORM COMMERCIAL
YOGHURT CULTURES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Samuel Horňan

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1565/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Samuel Horňan**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Mgr. Jan Smetana, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Molekulární identifikace probiotických bakterií v mléčných produktech z komerčních jogurtových kultur

Zadání bakalářské práce:

- 1) Optimalizace extrakce DNA z jogurtových lyzátů pomocí vybraných metod izolace DNA (fenol–chloroform vs komerční kit – separační kolony)
- 2) Validace kvantitativních a kvalitativních parametrů DNA pomocí spektrofotometrie (NanoDrop) a gelové elektroforézy
- 3) Provedení PCR reakce a vyhodnocení výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Samuel Horňan
student(ka)

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Baktérie mliečneho kvasenia sú významnou skupinou baktérií s probiotickými účinkami, ktoré nachádzajú uplatnenie v potravinárskom priemysle a farmakológii. Identifikácia a charakteristika významných probiotických kmeňov má zásadný význam pre validáciu probiotických výrobkov na komerčné použitie. Ich identifikácia s využitím molekulárno-biologických metód (najčastejšie s využitím metódy PCR) patrí k štandardným nástrojom v komerčných prevádzkach.

Cieľom tejto bakalárskej práce je literárna rešerš o probiotikách a probiotických kmeňoch ako aj zhrnutie súčasných poznatkov o využití molekulárno-biologických metód pre identifikáciu týchto baktérií s probiotickými vlastnosťami v mliečnych výrobkoch. Experimentálna časť tejto práce overí výskyt probiotických baktérií deklarovaných na vybraných komerčných mliečnych produktoch pomocou metódy polymerázovej reťazovej reakcie (PCR).

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are considered as an important group of bacteria with probiotic effects, which are being widely used in the food industry or pharmacology. Identification and characterization of important probiotic strains play an essential role in the validation of probiotic products for commercial purposes. Their identification using molecular-biology techniques (most commonly PCR method) is one of the standard tools in commercial operations and services.

The aim of this bachelor thesis is a literature review of probiotics and probiotic strains as well as a summary of current knowledge about the use of molecular biology techniques for identification of these bacteria with probiotic properties in dairy products. The experimental part of this work verifies the presence of probiotic bacteria declared on selected commercial dairy products using the polymerase chain reaction (PCR) method.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ

Probiotiká, *Lactobacillus*, izolácia DNA, PCR, jogurtové produkty

KEYWORDS

Probiotics, *Lactobacillus*, isolation of DNA, PCR, yoghurt products

BIBLIOGRAFICKÁ CITÁCIA

HORŇAN, Samuel. *Molekulární identifikace probiotických bakterií v mléčných produktech z komerčních jogurtových kultur*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2020. 40 s. Vedúci bakalárskej práce Mgr. Jan Smetana, Ph.D.

ČESTNÉ PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Ďakujem vedúcemu mojej bakalárskej práce Mgr. Janovi Smetanovi, Ph.D. za odborné vedenie, cenné pripomienky a čas, ktorý mi venoval pri vypracovaní tejto bakalárskej práce. Taktiež by som sa chcel poďakovať Ing. Denise Romanovskej za jej pomoc a rady, ktoré mi ochotne poskytla počas vypracovania tejto bakalárskej práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Charakteristika probiotických mikroorganizmov	8
2.1.1	Rod <i>Lactobacillus</i>	8
2.1.2	Rod <i>Bifidobacterium</i>	8
2.2	Probiotiká.....	9
2.3	Prospešné vlastnosti a účinky probiotík v klinických štúdiách	10
2.3.1	Aplikácia probiotík pri ochorení tráviaceho traktu v súvislosti s antibiotikami	10
2.3.2	Aplikácia probiotík pri zápalových ochoreniach čriev	10
2.3.3	Aplikácia probiotík pri laktózovej intolerancii	11
2.4	Probiotiká v potravinách.....	11
2.4.1	Probiotické mliečne produkty	11
2.4.2	Probiotické nemliečne produkty.....	11
2.5	Prebiotiká.....	12
2.6	Základné metódy identifikácie baktérií	12
2.7	Fenotypické metódy.....	12
2.8	Molekulárno-biologické metódy.....	13
2.8.1	Polymerázová reťazová reakcia	13
2.9	Extrakcia DNA	15
2.9.1	Fenol-chloroformová extrakcia	15
2.9.2	Adsorpcia na pevnej fáze	16
2.10	Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA	16
2.10.1	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA.....	16
2.11	Gélová elektroforéza.....	17
2.11.1	Koncentrácia gélu	17
2.11.2	Agarózový gél.....	17
2.11.3	Polyakrylamidové gély	18
3	CIEĽ PRÁCE	19
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	20
4.1	Použitie jogurtové výrobky obsahujúce probiotické baktérie.....	20
4.2	Použitie pomôcky a prístroje	21
4.3	Použitie chemikálie a roztoky	21
4.3.1	Použitie chemikálie a roztoky pre lýzu bakteriálnych buniek.....	21
4.3.2	Použitie chemikálie a roztoky pre fenol-chloroformovú extrakciu DNA	22
4.3.3	Roztoky a chemikálie pre extrakciu DNA pomocou izolačného kitu	22
4.3.4	Komponenty pre PCR	23
4.3.5	Roztoky a chemikálie pre gélovú elektroforézu.....	23
4.4	Metódy	23
4.4.1	Príprava hrubých lyzátov buniek.....	23
4.4.2	Fenol-chloroformová extrakcia DNA	24
4.4.3	Vyvrážanie DNA etanolom	24
4.4.4	Izolácia DNA pomocou Omni Bacterial DNA Purification kitu	24
4.4.5	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA	25
4.4.6	PCR	26
4.4.7	Gelová elektroforéza produktov PCR	27
5	VÝSLEDKY	29

5.1	Príprava hrubých lyzátov z jogurtových produktov	29
5.2	Kultivácia bakteriálnych buniek v jogurtových výrobkoch	29
5.3	Izolácia DNA	29
5.4	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA	29
5.5	Real-time PCR pre doménu <i>Bacteria</i>	30
5.6	Real-time PCR pre rod <i>Lactobacillus</i>	31
6	DISKUSIA.....	34
6.1	Izolácia DNA	34
6.2	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA	34
6.3	Real-time PCR pre doménu <i>Bacteria</i>	34
6.4	Real-time PCR pre rod <i>Lactobacillus</i>	35
7	ZÁVER.....	36
8	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	37
9	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	40

1 ÚVOD

Črevná mikroflóra alebo mikrobiota je obrovská bakteriálna komunita, ktorá v ľudskom tele hrá veľmi dôležitú úlohu a ovplyvňuje imunitný systém človeka. V ľudskom organizme plní mnoho dôležitých úloh pri zabezpečovaní správnej funkcie tráviaceho traktu. Jej hlavnou úlohou je to, že obsahuje ochrannú bariéru, ktorá chráni tráviaci trakt pred napadnutím cudzích mikróbov. Vo všeobecnosti sa baktérie črevnej mikroflóry rozdeľujú na baktérie, ktoré môžu byť užitočné pri podpore ľudského zdravia, a na baktérie, ktoré môžu zapríčiniť vznik rozličných chorôb, od ľahkých zápalov až po rôzne chronické ochorenia a poruchy tráviaceho traktu. Medzi týmito baktériami musí byť istá rovnováha. [1]

Probiotické baktérie, ktoré sa nachádzajú aj v mliečnych výrobkoch, sú na trhu s potravinami pre spotrebiteľov už niekoľko desiatok rokov. Ich priaznivé účinky na človeka preukázali nespočetné štúdie a klinické testy. [2,3,4] Tieto dosvedčujú pozitívne vlastnosti probiotických baktérií hlavne v spojitosti s tráviacim traktom a imunitným systémom. Ide najmä o zlepšenie a prevenciu proti infekčným chorobám tráviacej sústavy či udržiavanie správnej rovnováhy črevnej mikroflóry. [5]

Ak sa na potravinách a iných potravinových doplnkoch uvádza, že sú obohatené o probiotické baktérie, je potrebné to preukázať vedeckými metódami. Na identifikáciu probiotických baktérií sa najčastejšie používajú molekulárno-biologické metódy, ktoré sú založené na manipulácií, analýze a amplifikácií DNA. Medzi tieto metódy patrí aj polymerázová reťazová reakcia (PCR). [6]

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Charakteristika probiotických mikroorganizmov

Probiotické mikroorganizmy sú definované ako mikroorganizmy, u ktorých bolo zistené, že majú pozitívny dopad na črevnú mikroflóru svojho hostiteľa. U človeka sa tieto mikroorganizmy najčastejšie vyskytujú v gastrointestinálnom trakte. Na dosiahnutie ich priaznivých účinkov musia byť schopné prežitia a následnej kolonizácie v tráviacom trakte. Z hľadiska zastúpenia sú tieto mikroorganizmy najčastejšie bakteriálneho alebo prípadne menej rozšíreného kvasinkového charakteru. Medzi najrozšírenejšie probiotické baktérie patria baktérie z rodu *Lactobacillus* alebo *Bifidobacterium*. [5]

2.1.1 Rod *Lactobacillus*

Do rodu *Lactobacillus* patria rôzne grampozitívne (G^+) fakultatívne anaeróbne baktérie tyčinkovitého tvaru. Prirodzene sa tieto baktérie nachádzajú napr. v ovocí, mlieku, víne a v obilných zrnách. Taktiež sa niektoré známe druhy používajú ako štartovacie kultúry vo fermentovaných mliečnych produktoch alebo v zelenine. [6]

U človeka sa bežne tieto baktérie nachádzajú v gastrointestinálnom trakte a spolu s bifidobaktériami sú jednými z prvých baktérií ktoré kolonizujú črevo novorodenca. Sú hlavnou skupinou baktérií mliečneho kvasenia (LAB), ktoré fermentáciou premieňajú hexóзовé cukry na kyselinu mliečnu. Pri vzniku kyseliny mliečnej vzniká kyslé prostredie, ktoré inhibuje rast škodlivých baktérií, čo napomáha lepšiemu skladovaniu potravín. Laktobacilom bola v minulosti už venovaná mimoriadna pozornosť vzhľadom na ich vlastnosti, ktoré podporujú zdravie človeka. Vďaka zvýšenej tolerancie laktobacilov ku kyselinám, žlči, nízkemu pH a ich schopnosti k adhézií povrchu črevných stien sú schopné prežiť v ľudskom tele. Medzi ich najpoužívanejších zástupcov patrí *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* a *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, ktorý sa prevažne vyskytuje v jogurtoch. [7]

2.1.2 Rod *Bifidobacterium*

Baktérie z rodu *Bifidobacterium* sú charakterizované ako grampozitívne baktérie (G^+), tyčinkovitého tvaru. Sú prísne anaeróbne, hoci niektoré druhy môžu tolerovať nízky obsah kyslíka. Môžu sa vyskytovať buď samostatne v reťazcoch, alebo v prípade cielenej kultivácie v laboratóriu sa vyskytujú v palisádových uporiadaniach. Väčšina objavených bifidobaktérií, bolo izolovaných z gastrointestinálneho traktu zvierat a ľudí, prípadne z potravín. [8]

Rôznorodosť a dobrá rezistencia bifidobaktérií ako aj laktobacilov na žalúdočné kyseliny a žlč im zabezpečuje dobré prežitie v tráviacom trakte človeka. V súvislosti s probiotikami sa najčastejšie z rodu *Bifidobacterium* používajú baktérie z kmeňov: *Bifidobacterium infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis subsp. animalis*, *B. animalis subsp. lactis*, *B. bifidum*, *B. longum* a *B. breve*. [7]

Najrozšírenejšie baktérie z rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a ďalšie baktérie mliečného a nemliečného kvasenia, ktoré sú považované za probiotické mikroorganizmy sú popísané v Tab 1. [9]

Tab. 1: Mikroorganizmy považované za probiotiká [9]

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Ostatné baktérie mliečného kvasenia	Ďalšie baktérie nemliečného kvasenia
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. allinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

2.2 Probiotiká

Probiotiká sa definujú ako živé mikroorganizmy, ktoré pri dostatočnom podávaní majú pozitívny účinok na mikroflóru ľudí alebo zvierat [10].

Probiotiká musia spĺňať tieto základné predpoklady:

1. Musia mať identifikovaný rod, druh a kmeň použitého mikroorganizmu.
2. Musia byť bezpečné pri využití v potravinách.
3. Použité probiotické kmene musia byť schopné prežiť v gastrointestinálnom trakte.
4. Probiotické kmene dokážu produkovať antimikrobiálne látky.
5. Majú schopnosť antagonizovať patogénne baktérie.
6. Ich prospešné vlastnosti musia byť overené klinickými štúdiami. [10]

V probiotických doplnkoch sa najčastejšie využívajú baktérie mliečneho kvasenia z rodov *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* alebo prípadne nepatogénne druhy z rodu *Streptococcus*. [10]

Taktiež sa používa prevažne kombinácia aspoň dvoch rôznych bakteriálnych kmeňov, hoci ani použitie jedného nie je nezvyčajné. Táto nekonzistentnosť sa často pripisuje tomu, že pri použití zmesi viacerých bakteriálnych kmeňov môže dôjsť k lepším a efektívnejším výsledkom. [1]

2.3 Prospešné vlastnosti a účinky probiotík v klinických štúdiách

Prospešné vlastnosti a účinky probiotík na zdravie hostiteľa sú založené na priamom antagonistickom efekte vo vzťahu k špecifickým skupinám mikroorganizmom. Ide napr. o zvýšenie produkcie antimikrobiálnych látok, o zvýšenú stimuláciu imunitnej odozvy organizmom, o adhéziu na črevný povrch epitelov a následnú obranu pred patogénnymi mikroorganizmami. [11]

Výskum a klinické štúdie preukázali, že uvedené pozitívne účinky probiotík závisia predovšetkým od selektivity použitého kmeňa, od ich množstva, od druhu choroby a od hostiteľa. Niektoré mechanizmy, pod ktorými prebiehajú tieto účinky, boli objasnené len do istej miery. Ich súčasťou môže byť napr. úprava a zmena pH v čreve, tvorba receptorových miest, živín a rôznych rastových faktorov, prípadná stimulácia imunomodulačných buniek a produkcia laktázy. [8]

Za účelom zistenia efektivity probiotík pri liečbe špecifických onemocnení spojených najmä s gastrointestinálnym traktom sa uskutočnili mnohé klinické štúdie, ktoré preukázali pozitívne vlastnosti probiotík. Z nich popíšeme tri najrozšírenejšie. [12]

2.3.1 Aplikácia probiotík pri ochorení tráviaceho traktu v súvislosti s antibiotikami

Probiotiká sa aplikujú predovšetkým pri ochoreniach alebo aj ako prevencia pred ochoreniami tráviaceho traktu spôsobenými antibiotikami. Hlavný symptóm, ktorý sprevádza ochorenia tráviaceho traktu, je diarea (hnačka), spôsobená aplikáciou antibiotík. Klinické štúdie dokázali, že pri použití probiotických baktérií z rodu *Lactobacillus*, konkrétne kmeňa *Lactobacillus rhamnosus*, bol tento kmeň schopný prežiť a formovať kolónie v gastrointestinálnom trakte aj počas antibiotickej liečby, čo malo za následok ustúpenie príznakov diarey u väčšiny pacientov. Klinické štúdie jasne ukazujú, že probiotiká majú dôležitú úlohu pri prevencii diarey v súvislosti s užívaním antibiotík pri nedostatku rezistentných baktérií v gastrointestinálnom trakte. [12]

2.3.2 Aplikácia probiotík pri zápalových ochoreniach čriev

V súvislosti so zápalovými ochoreniami čriev, medzi ktoré môže patriť napr. ulcerózna kolitída alebo Crohnova choroba boli vykonané klinické štúdie a testy, pri ktorých pacienti s týmito zápalovými ochoreniami užívali probiotiká. Kombináciou probiotík a vhodnej

špecifickej liečby došlo k efektívnejšej liečbe a k lepším výsledkom. V prípade výlučného užívania probiotík, no bez špecifickej liečby týchto zápalových ochorení, neboli pozorované žiadne zlepšenia. [12]

2.3.3 Aplikácia probiotík pri laktózovej intolerancii

Laktózová intolerancia je choroba, pri ktorej je organizmus neschopný tráviť laktózu z dôvodu nízkej hladiny enzýmu laktázy. K symptómom ochorenia patrí: nadúvanie, nevoľnosť, kŕče v bruchu a diarea. Pri testovaní pacientov s laktózovou intoleranciou sa podávali probiotické produkty, ktoré obsahovali baktérie z rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Pacientom, ktorým sa podávali produkty obohatené o probiotické kmene, mali znížené symptómy laktózovej intolerancie a zlepšené trávenie laktózy. To by nasvedčovalo tomu, že probiotiká môžu znižovať koncentráciu laktózy vo fermentovaných produktoch a zvyšovať aktivitu enzýmu laktázy tým, že vstupujú do tenkého čreva. [13]

2.4 Probiotiká v potravinách

Potraviny obohatené o probiotické kmene sa prvýkrát objavili na trhu koncom 80. rokov v Japonsku. Spočiatku sa označovali ako tzv. funkčné potraviny, pretože okrem zvýšených nutričných hodnôt týchto potravín, boli tieto potraviny prospešné aj pre zdravie spotrebiteľov. To spôsobilo ich rýchle rozšírenie do USA a do Európy. Z legislatívneho hľadiska sa potraviny obohatené o probiotické baktérie delia do viacerých podkategórií, a to na základe hlavnej zložky potraviny. Výsledná kombinácia potraviny s probiotickými kmeňmi však nesmie nijako negatívne ovplyvniť výsledný produkt. [14]

2.4.1 Probiotické mliečne produkty

Medzi najviac rozšírené probiotické produkty medzi spotrebiteľmi patria mliečne produkty a iné fermentované produkty. Sú to predovšetkým pasterizované mlieko, fermentované mlieko, jogurty a syry. Pozitívne účinky a chuť mliečnych produktov sú hlavným dôvodom ich vysokej spotreby v rôznych komunitách. Ďalším dôvodom je fakt, že mlieko je vynikajúce médium na vytváranie fermentovaných produktov. Mlieko pozitívne pôsobí aj na vyrovnanie črevnej mikroflóry, keď napomáha prežiť probiotickým baktériám v gastrointestinálnom trakte človeka. Najobľúbenejším fermentovaným mliečnym produktom je jogurt. Okrem chuti sú spotrebiteľia oboznámení aj o ich pozitívnych účinkoch, že obsahujú štartovacie kultúry, ktoré môžu byť ľahko obohatené probiotickými kmeňmi. [15]

2.4.2 Probiotické nemliečne produkty

Z dôvodu narastajúcich prípadov laktózovej intolerancie alebo z dôvodu prítomnosti rôznych alergénov v mliečnych produktoch sa stále viac dostávajú do popredia probiotické produkty, ktoré neobsahujú mlieko. Ide najmä o ovocie, zeleninu, džúsy, štavy a rôzne výrobky z obilnín. V porovnaní s mliečnymi produktami majú tieto produkty nižšie nutričné hodnoty, avšak sú bohaté na sacharidy, vitamíny, minerály a vlákninu. U ovocia a zeleniny životaschopnosť probiotických baktérií závisí hlavne od použitého probiotického kmeňa, od

prítomnosti kyslíka a od výslednej kyslosti. V praxi sa osvedčilo použitie probiotických kmeňov *L. casei* a *L. rhamnosus*. Obilniny sú zasa známe tým, že obsahujú plno nestráviteľných oligosacharidov, ktoré môžu plniť funkciu substrátov pre probiotické kmene z rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. [15]

2.5 Prebiotiká

Prebiotikum sa definuje ako nestráviteľná zložka potravín, ktorá má pozitívny dopad na zdravie hostiteľa tým, že selektívne podporuje rast a aktivitu jednej baktérie alebo obmedzeného množstva baktérií v gastrointestinálnom trakte. Pozorovaním a testami sa preukázalo, že niektoré zložky prebiotík vyvolávajú špecifickú moduláciu črevnej mikrobioty, čo napomáha väčšej prítomnosti bifidobaktérií a laktobacilov, čím sa znižujú potenciálne škodlivé baktérie. [16]

Tieto hlavné zložky prebiotík sú s výnimkou inulínu prevažne nestráviteľné oligosacharidy, ktoré pozostávajú z 3 až 10 uhlíkových monomérnych jednotiek. Tieto oligosacharidy sa prevažne získavajú buď priamou extrakciou z prírodných zdrojov, alebo enzýmatickou hydrolýzou z polysacharidov. Oligosacharidy sa nachádzajú aj v potravinových prísadách.

V posledných dvoch desaťročiach sa skúmali dopady prebiotík na zdravie spotrebiteľov. V rámci štúdií probiotických baktérií a prebiotických oligosacharidov vznikol nový koncept kombinujúci probiotiká a prebiotiká pod názvom symbiotiká. [5]

2.6 Základné metódy identifikácie baktérií

V súčasnosti existuje nespočetné množstvo techník a metód, ktorými sa stanovujú jednotlivé druhy neznámych baktérií. Vo všeobecnosti sa rozlišujú dve hlavné metódy: fenotypické a molekulárno-biologické metódy. Fenotypické metódy sú jednoduchšie, no nie sú presné. Molekulárno-biologické metódy si naproti tomu vyžadujú technické vybavenie, ale sú rýchlejšie a presnejšie. [17]

2.7 Fenotypické metódy

Fenotypické metódy sú vo väčšine prípadov založené na kombinácii viacerých jednoduchších techník, ktoré nasledujú za sebou v určitých usporiadaniach. Tieto metódy sú jednoduché a na ich stanovenie sa používajú ľahko dostupné prostriedky. Často sa overujú ľudským okom alebo pod mikroskopom. Na ich identifikáciu je potrebná izolácia čistej vzorky. Ich spoľahlivosť závisí od zistenia a porovnávania jednotlivých morfológických znakov a vlastností mikroorganizmov so znakmi a vlastnosťami, ktoré sú charakteristické pre daný druh. V prípade nejasností sa môžu ešte použiť ďalšie jednoduché testy, ako napr. absorpcia farbív na rozlíšenie grampozitívnych a gramnegatívnych baktérií, ktorá na základe daného sfarbenia potvrdí, o aký typ baktérií sa jedná. [17]

V porovnaní s molekulárno-biologickými metódami však fenotypické metódy nezohľadňujú niektoré dôležité aspekty pri identifikácii selektívnejších kmeňov u niektorých druhov. Ide predovšetkým o presnosť, reprodukovateľnosť a prípadné možné sledovanie metabolického stavu buniek. [8]

2.8 Molekulárno-biologické metódy

Molekulárno-biologické metódy sú novodobé metódy, ktoré sa začali rozvíjať poväčšine koncom minulého storočia. Všeobecne by sa mohli definovať ako metódy, ktoré sa zaoberajú identifikáciou mikroorganizmov na molekulárnej úrovni. Presnejšie sa venujú detekcii špecifických cieľových sekvencií DNA alebo RNA pomocou amplifikačných procesov. Tieto metódy, ktoré sa vyznačujú presnosťou, rýchlosťou a citlivosťou, nachádzajú čoraz väčšie uplatnenie a stále viac nahrádzajú zastaralé fenotypické metódy. Osvedčili sa najmä pri skúmaní mikroorganizmov, u ktorých je nemožné zistiť pôvod na základe vonkajších charakteristík a správania mikroorganizmov, alebo pri ktorých je nemožná, alebo veľmi obtiažna kultivácia *in vitro*. [18] Medzi tieto metódy patrí napr. polymerázová reťazová reakcia, náhodná amplifikácia polymorfnej DNA (RAPD), polymorfizmus dĺžky restriktčných fragmentov (RFLPs) a polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov (AFLPs). [19]

2.8.1 Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázovú reťazovú reakciu objavil v polovici 80. rokov 20. storočia Kary Mullis, ktorý za to obdržal Nobelovu cenu v roku 1994. Tento objav priniesol obrovské výhody pre vedecký vývoj v oblasti molekulárno-biologických metód. Ide predovšetkým o sekvenovanie genómu a expresiu génov v rekombinantných systémoch. Okrem analýzy a identifikácie mikroorganizmov, v súčasnosti nachádza PCR najmä uplatnenie pri diagnostike rôznych chorôb a pri detekcii rôznych patogénov, prípadne pri klonovaní DNA fragmentov. [20]

PCR technika umožňuje priamo množiť určitý zvolený úsek DNA vymedzený väzbou dvoch jednovláknových oligonukleotidov, ktoré sa označujú aj ako primery. Zakladá sa na využívaní vlastností termostabilných DNA-polymeráz izolovaných z termofilných baktérií. Ich teplotné optimum je 72 °C. [21]

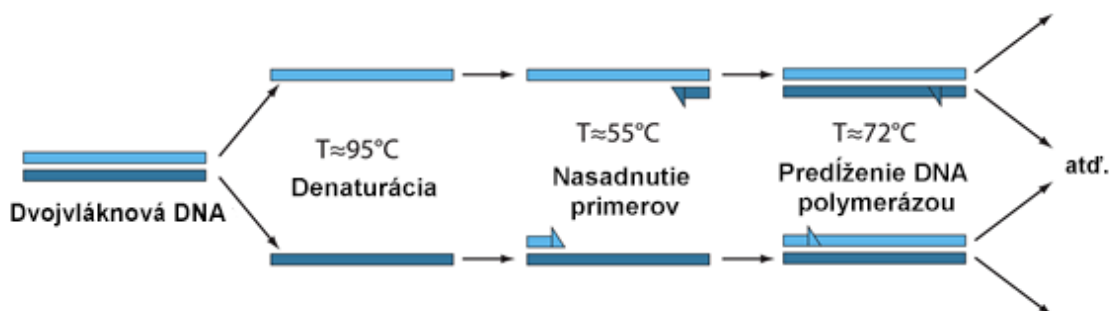
2.8.1.1 Princíp PCR

Na začiatok PCR je potrebné pripraviť reakčnú zmes, ktorá obsahuje templátovú $dsDNA$, primery, dNTPs, reakčný pufor, PCR vodu, DNA-polymerázu a horečnaté ióny. [22] Ďalší postup PCR by sa dal zhrnúť do troch hlavných krokov:

1. Zahriatie na 94 – 95 °C, pri ktorom dochádza k denaturácii $dsDNA$.
2. Ochladenie na 50 – 65 °C, pri ktorom sa umožní nasadenie primerov na miesta výskytu komplementárnej DNA.

3. Zahriatie na 72 °C, pri ktorom dochádza k aktivácii termostabilných polymeráz, ktoré rozpoznávajú voľné 3'-konce a syntetizujú nový reťazec podľa denaturovanej templátovej DNA v smere 5'→3'. [21]

Tento princíp PCR v 3 krokoch je znázornený na Obr. 1: [23]



Obr. 1: Schéma priebehu PCR [23]

Princíp reťazovitosti spočíva v tom, že vyššie uvedené tri kroky sa niekoľkokrát opakujú, pričom s každým týmto cyklom sa počet produktov zdvojnásobí. Celková rýchlosť PCR závisí na dĺžke jednotlivých krokov a na kvalite termocykleru. Po skončení reakcie sa ešte amplikóny (produkty amplifikácie) detegujú gélovou elektroforézou. Následne je možné na géli identifikovať tieto amplikóny o danej dĺžke s porovnaným dĺžkovým štandardom. [21]

Napriek obrovským množstvám výhod má PCR metóda aj určité nevýhody. Najväčšou nevýhodou je, že akákoľvek kontaminácia vzorky môže narušiť, inhibovať alebo poskytnúť nepravdivé výsledky. [22] Taktiež používané DNA-polymerázy nemajú korektorskú aktivitu a nie sú schopné opraviť vlastné chyby, ktoré môžu urobiť behom aplikácie DNA. Tento problém neplatí v prípade, ak chceme zistiť iba dĺžku alebo prítomnosť sekvencie vymedzenej primermi. [21]

2.8.1.2 Real-time PCR

Istým typom PCR je metóda real-time PCR, ktorá umožňuje detekciu a kvantifikáciu PCR produktov v tzv. reálnom čase, t. j. v priebehu celej PCR reakcie, a nie až po jej skončení. Je vhodná pri kvantifikácii väčšieho množstva sekvencií DNA, a preto v porovnaní s obyčajnou PCR má jednoduchšie použitie a hlavne omnoho kraštiu dobu detekcie. U PCR produktov sa využívajú fluorescenčné farbivá, primery, prípadne fluorescenčne značené hybridizačné sondy. Pri vyhodnotení PCR produktov sa sleduje intenzita fluorescenčného signálu, ktorá sa zvyšuje s narastajúcim množstvom PCR produktu. Tá je následne analyzovaná špeciálnym prístrojom, v ktorom zároveň prebieha PCR, čiže amplifikačné úseky DNA sa nemusia stanovovať elektroforeticky. [22]

Touto metódou je možné stanoviť špecifické druhy probiotických baktérií v jogurte s citlivosťou na 10^5 CFU ml⁻¹, čo je dostatočné množstvo na detekciu, keďže tieto produkty obsahujú zvyčajne 10^6 – 10^{12} CFU ml⁻¹ probiotických baktérií. [6]

2.9 Extrakcia DNA

Dôležitý krok u väčšiny molekulárno-biologických metód, ktoré slúžia k identifikácií mikroorganizmov, je extrakcia genómovej DNA. Správna aplikácia molekulárnych metód na akékoľvek vzorky si vyžaduje špeciálny postup extrakcie a čistenia za účelom získania nukleovej kyseliny a odstránenia rozličných kontaminantov, ktoré by mohli inhibovať alebo narušiť proces molekulárnych metód. Aj voľba vhodnej metódy za účelom extrakcie DNA závisí od požadovanej čistoty DNA, od výťažku a časovej náročnosti danej metódy. [24]

Proces extrakcie DNA prebieha v niekoľkých krokoch:

1. Príprava bunkových lyzátov.
2. Odstránenie proteínov a RNA a ďalších kontaminantov.
3. Použitie správnej extrakčnej metódy. [25]

Medzi najpoužívanejšie metódy extrakcie DNA patria:

1. Fenol-chloroformová extrakcia.
2. Adsorpcia na pevnej fáze. [25]

2.9.1 Fenol-chloroformová extrakcia

Fenol-chloroformová extrakcia patrí k štandardným metódam, ktoré sa používajú na extrakciu DNA. Túto metódu ako prvý popísal v roku 1956 Kirby, ktorý ju použil na izoláciu DNA z tkanív cicavcov. Na jeho popise extrakcie sa zakladá fenol-chloroformová metóda, ktorá sa s určitými modifikáciami aplikuje dodnes. [26]

Na uskutočnenie tejto metódy je na začiatku potrebný bunkový lyzát s pridanou proteázou K. Je možné odstrániť aj RNA nukleové kyseliny pridaním RNázy. Po následnom zmiešaní fenolu a chloroformu s bunkovým lyzátom a po odstredení dôjde k vzniku rozhrania organickej fázy a vodnej fázy. DNA zostáva vo vodnej fáze, pričom bunkové makromolekuly sa rozdelia v organickej fáze. Vodná fáza sa potom opatrne presunie do inej nádoby, no bez narušenia tohto rozhrania. Pri izolácii DNA môže byť vodná fáza opakovane extrahovaná zmesou fenolu a chloroformu, pričom sa vytvorí jasnejšie a priesvitnejšie rozhranie. Nakoniec sa DNA vo vodnej fáze extrahuje roztokom zmesi chloroformu a izoamylalkoholu, až kým sa neodstráni zbytkový fenol. DNA sa vyzráža pomocou etanolu alebo izopropanolu za prítomnosti octanu sodného. [25]

Vyizolovaná DNA má obvykle vysokú koncentráciu a výťažnosť, a preto patrí k spoľahlivým metódam pri izolácii DNA. Metóda fenol-chloroformovej extrakcie je však časovo náročná a vyžaduje aj istú odbornosť a skúsenosti, keďže kvantita a kvalita výťažku závisí od rýchlosti a precíznosti práce. Z hľadiska toxicity sa táto metóda zaraďuje medzi rizikovejšie metódy, keďže fenol a chloroform sú toxické látky. [27]

2.9.2 Adsorpcia na pevnej fáze

Adsorpcia na pevnej fáze je metóda extrakcie DNA založená na selektívnej adsorpcii DNA na pozitívne nabitom sklenenom vlákne alebo na kremičitej membráne za prítomnosti vysokých koncentrácií chaotropických solí. Bunkový lyzát je aplikovaný na membránový filter, kde dochádza k selektívnemu viazaniu molekúl DNA, zatiaľ čo bunkové proteíny a iné zlúčeniny prechádzajú filtrom. Na uľahčenie a zrýchlenie filtrácie sa často používa odstredovanie, prípadne vákuum. Metóda sa používa prevažne iba s amplifikačnými metódami, pri ktorých sa vyizoluje iba malé množstvo DNA. Táto metóda tiež nevyžaduje zrážanie a rehydratáciu DNA na odstránenie solí a iných kontaminujúcich látok. Koncentrácia finálnej eluovanej DNA býva väčšinou ešte upravovaná pridaním rôzneho množstva eluátu – pufru alebo roztoku. [25]

Na adsorpcii na pevnej fáze je založená väčšina komerčných kitov, ktoré slúžia na izoláciu DNA. Vo všeobecnosti patrí medzi rýchle a pohodlné metódy, pričom celkový postup môže byť rôzne optimalizovaný, no jej najväčšou nevýhodou je cena. [21]

2.10 Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA

Pre správnu manipuláciu s nukleovými kyselinami treba poznať ich presnú koncentráciu vo vzorke. DNA sa stanovuje najčastejšie spektrofotometricky prípadne fluorimetricky. U spektrofotometrických meraniach sa meria intenzita absorpcie žiarenia v látke o jednotkovej hrúbke a nazýva sa absorbancia (A). Táto veličina je bezrozmerné číslo a rovná sa zápornému dekadickému logaritmu hodnoty transmitancie. [28]

2.10.1 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA

Pri spektrofotometrickom meraní koncentrácie sa zaznamenáva priebeh spektra v rozmedzí 220 – 320 nm. Maximum absorbancie pre nukleové kyseliny DNA a RNA je pri 260 nm, u proteínov je pri 280 nm. Čistota vzorky sa vyjadruje pomerom hodnôt absorbancií A_{260}/A_{280} . [29]

Pri meraní čistoty DNA platia tieto pomery absorbancií (A):

$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm})$ (1,8 – 2,0) – čistá DNA

$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm})$ (<1,8) – DNA je obsahuje proteíny

$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm})$ (>2,0) – DNA je znečistená RNA [29]

V prípade použitia fenol-chloroformovej metódy pri extrakcii DNA je potrebné tiež zaznamenať absorbanciu pri 230 nm, pretože v tejto hodnote sa fenol absorbuje najintenzívnejšie. Aby sa mohlo povedať, že vzorka neobsahuje stopy fenolu, musí platiť pomer absorbancií $A_{230\text{nm}} \ll A_{260\text{nm}}$. [29]

2.11 Gélová elektroforéza

Gélová elektroforéza patrí medzi štandardné metódy, ktoré sa používajú na separáciu, identifikáciu proteínov a nukleových kyselín. Je založená na migrácii molekúl v závislosti na ich veľkosti. Menšie molekuly migrujú rýchlejšie cez gélovú maticu, pretože ľahšie prechádzajú pórami v géli. To všetko prebieha pod vplyvom elektrického poľa a v závislosti od ich náboja. Molekuly DNA majú záporný náboj, preto v elektrickom poli putujú od zápornej elektródy ku kladnej. Pri použití gélovej elektroforézy na detekciu produktov PCR sa tieto produkty nanášajú do jamiek v géli spoločne s nanášacím pufrom. Tento nanášací pufo, ktorý je založený na báze glycerolu alebo sacharózy, zvyšuje hustotu roztoku DNA za účelom lepšieho usadenia vzoriek v jamkách a tiež zabraňuje rozpusteniu vzoriek po zaliatí pufrom. So vzorkami sa zároveň nanášajú aj určité fragmenty DNA s presne definovanou veľkosťou, na základe ktorých je možné stanoviť veľkosti ostatných produktov PCR. [30] Následnou vizualizáciou vzoriek DNA sa napokon získajú kvalitatívne aj kvantitatívne informácie o vzorkách.

V súčasnosti sa na gélovú elektroforézu najčastejšie používajú gély na báze agarózy alebo polyakrylamidu. [25]

2.11.1 Koncentrácia gélu

Koncentrácia použitého gélu závisí od veľkosti fragmentov, ktoré sa majú rozlíšiť. Všeobecne platí, že čím je nižšia koncentrácia gélu, tým rýchlejšie migrujú jednotlivé fragmenty DNA. Na oddelenie veľkých fragmentov DNA sa používa nízka koncentrácia gélu a opačne. Koncentrácia daného gélu sa vyjadruje ako percento daného gélu v pomere k objemu tlmivého roztoku. [30]

2.11.2 Agarózový gél

Agaróza je prírodný lineárny polymér extrahovaný z morských rias, ktorý vplyvom vodíkovej väzby pri zahrievaní a následnom ochladení vytvára gélovú maticu. Pre jeho netoxické vlastnosti patrí medzi najviac obľúbené médium na separáciu stredne veľkých a veľkých nukleových kyselín so širokým rozsahom oddeľovania. Hlavnou nevýhodou tohto gélu je, že v porovnaní s inými gélmami má nižšiu rozlišovaciu schopnosť. Používaná koncentrácia agarózy vo vzťahu k rozsahu veľkostí DNA je uvedená v Tab. 2 [30]

Tab. 2: Koncentrácia agarózového gélu vzhľadom k rozsahu veľkosti DNA [30]

Koncentrácia agarózy	Rozsah veľkostí DNA (bp)
0,2	5000 – 40000
0,4	5000 – 30000
0,6	3000 – 10000
0,8	1000 – 7000
1,0	500 – 5000

1,5	300 – 3000
2,0	200 – 1500
3,0	100 – 1000

2.11.3 Polyakrylamidové gély

Polyakrylamidové gély sú chemicky zosieťované gély, ktoré vznikajú polymerizáciou akrylamidu. V porovnaní s agarózovými géľmi majú väčšiu rozlišovaciu schopnosť a dokážu spracovať väčšie množstvá DNA bez výraznejšej straty. Taktiež získaná DNA z polyakrylamidových gélov je mimoriadne čistá. Hlavnou nevýhodou polyakrylamidových gélov však je, že nepolymerizovaný akrylamid patrí medzi neurotoxické látky a ich príprava si obvykle vyžaduje väčšiu náročnosť a manipuláciu. [30]

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo izolovať DNA z baktérií mliečneho kvasenia z jogurtových vzoriek pomocou dvoch vybraných metód izolácie DNA (fenol-chloroform a OMNI Bacterial DNA komerčný kit).

Ďalším cieľom bolo zhodnotiť kvalitatívne a kvantitatívne parametry vyizolovanej DNA pomocou spektrofotometrie (NanoDrop). Nakoniec sa dokázala prítomnosť bakteriálnej DNA a baktérií z rodu *Lactobacillus* pomocou PCR.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité jogurtové výrobky obsahujúce probiotické baktérie

ACTIVIA – biely jogurt s bifidokultúrou

Výrobca: DANONE a.s.

Vinohradská 2828/151

130 00 Praha 3, Česká republika

Dátum spotreby: 19.06.2020

Zloženie (100g): mlieko, mliečne bielkoviny, kultúry a Bifidus ActiRegularis®

Nasýtené mastné kyseliny	2,2 g
Sacharidy	5,1 g
Bielkoviny	4,5 g
Soľ	0,15 g
Vápnik	148 mg



Selský jogurt – biely jogurt s bifidovou a acidofilnou kultúrou

Výrobca: Mlékárna Kunín a.s.

742 53 Kunín 291, Česká republika

Dátum spotreby: 20.06.2020

Zloženie (100g): mlieko, mliečna bielkovina, jogurtová kultúra, kultúra *Bifidobacterium*
a *Lactobacillus acidophilus* (10^6 /g)

Nasýtené mastné kyseliny	2,3 g
Sacharidy	4,2 g
Bielkoviny	3,8 g
Soľ	0,10 g
Vápnik	120 mg



Selský jogurt (HOLLANDIA) – biely jogurt s kultúrou BiFi

Výrobca: Hollandia Karlovy Vary, s.r.o.,

Pražská 673

431 51 Klášterec nad Ohří, Česká republika

Dátum spotreby: 22.06.2020

Zloženie (100g): mlieko, mliečna bielekovina, jogurtová kultúra, kultúra *Bifidobacterium* a

Lactobacillus acidophilus ($10^6/g$)

Nasýtené mastné kyseliny2,7 g
Sacharidy4,5 g
Bielkoviny3,7 g
Soľ0,12 g



Všetky uvedené výrobky boli použité pred uvedeným dátumom spotreby.

4.2 Použité pomôcky a prístroje

- Centrifúga miniSpin plus $14\ 500\ \text{min}^{-1}$ (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Laboratórne váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, New Jersey, USA)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Poľsko)
- Eppendorfové skúmavky (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Omni DNA Mini kolóny (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- Zberné skúmavky (2 ml) (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- Mikrovlnná rúra PROLINE SM117
- MiniIncubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- Nanodrop 2000c UV-vis spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- DNA/RNA UV-Dekontaminačný box (UVC/T-AR)
- Exikátor (KIF LAB Freiburg, Nemecko)
- Termo-Shaker (TS-100C BioSan, Riga, Latvia)
- Zariadenie pre elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napätia pre elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Rotor-Gene 6000 (Corbett Research UK Ltd, Cambridge, United Kingdom)
- Detekčný systém na dokumentáciu gélov (Azure biosystems C200, Dublin, USA)
- Bežné laboratórne sklo, umelohmotný materiál a iné laboratórne pomôcky

4.3 Použité chemikálie a roztoky

4.3.1 Použité chemikálie a roztoky pre lýzu bakteriálnych buniek

- EDTA (Serva, Heidelberg, SNR)
- Tris-báza (Amaresco, Solon, USA)
- Hydroxid sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Lyzozým (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Proteináza K (100 $\mu\text{g/ml}$ vody) (Sigma, St. Louis, USA)
- SDS (Sigma, St. Louis, USA)

Príprava 0,5 M EDTA (pH 8,0):

Bolo rozpustených 1861,1 g EDTA v 800 ml destilovanej vody. Pomocou NaOH bol roztok upravený na koncové pH 8,0. Roztok bol doplnený na objem 1 l destilovanou vodou a sterilizovaný v autokláve 20 min pri 121 °C.

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

Bolo rozpustených 12,1 g Tris-báze v 80 ml destilovanej vody. Pomocou koncentrovanej HCl bolo pH roztoku upravené na 7,8. Roztok bol doplnený destilovanou vodou na objem 100 ml a sterilizovaný v autokláve 20 min pri 121 °C.

Príprava lýzačného roztoku A:

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

Bolo zmiešaných 10 ml Tris-HCl (pH 7,8) a 1 ml EDTA (pH 8,0) a roztok bol doplnený destilovanou vodou do objemu 100 ml.

Príprava lýzačného roztoku B:

K lýzačnému roztoku A bol pridaný lyzozým, aby jeho výsledná koncentrácia bola 3 mg/ml.

4.3.2 Použité chemikálie a roztoky pre fenol-chloroformovú extrakciu DNA

- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Izoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Etanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)

Príprava TE pufru:

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

Roztok bol pripravený sterilne zo zásobných roztokov 1 M Tris-HCl a 0,5 M EDTA.

Príprava CIZ zmesi:

- Bol zmiešaný chloroform a izoamylalkohol v pomere 24:1

4.3.3 Roztoky a chemikálie pre extrakciu DNA pomocou izolačného kitu

- Lactobacillus MRS broth (Himedia®, India)
- Etanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Izopropanol (Penta, Chrudim, ČR)
- BB pufo (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- DLB pufo (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- CBH pufo (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- DW pufo (Omni Bacterial DNA Purification Kit)

- EB pufor (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- Proteázový roztok (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- RNáza A (Omni Bacterial DNA Purification Kit)

4.3.4 Komponenty pre PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- qPCR 2× SYTO-9 Master-mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Kralové, ČR)

4.3.5 Roztoky a chemikálie pre gélovú elektroforézu

- Agaróza pre elektroforézu (Top-Bio, Praha, ČR)
- Fluorescenčné farbivo GelRed™ (Top-Bio, Praha, ČR)
- Nanášací pufor (Top-Bio, Praha, ČR)
- DNA štandard rebríček (Malamité, Moravské Prusy, ČR) (Obsahuje fragmenty: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp)

Príprava TBE pufu (5 x koncentrovaný)

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

Všetky uvedené látky boli zmiešané a doplnené destilovanou vodou na objem 1000 ml. Pred použitím bol ešte roztok 10 x zriedený na koncentráciu 0,5 M TBE.

4.4 Metódy

Všetky použité metódy s výnimkou extrakcie DNA z komerčného kitu boli vykonané podľa skrípt Španovej a Ritticha (2010). [29]

Metóda extrakcie DNA z komerčného kitu bola spravená podľa manuálu, ktorý je určený pre daný komerčný kit.

4.4.1 Príprava hrubých lyzátov buniek

- Jednotlivé vzorky jogurtových kultúr boli napipetované o celkovom objeme 1 ml do Eppendorfových skúmaviek (1,5 ml).
- Vzorky boli následne centrifugované pri 14 500 ot/min po dobu 5 minút. Supernatant bol potom opatrne odliaty, sediment bol resuspendovaný a premývaný 1 ml lýzačným roztokom A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5mM EDTA, pH 8,0). Potom bol znovu centrifugovaný za rovnakých podmienok.
- Premývanie každej vzorky sa opakovalo 5x.
- Do sedimentu bolo pridaných 500 μl lýzačného roztoku B (10 mM Tris- HCl, pH 7,8; 5mM EDTA, pH 8,0; 3mg/ml lyzozymu) a dokonale bol resuspendovaný. Vzorky boli následne inkubované 1 hodinu pri laborátornej teplote.

- Po 1 hodine bolo pridaných 25 μl 10% SDS a 5 μl proteinázy K (100 $\mu\text{l}/\text{ml}$) a vzorky boli inkubované pri teplote 55 $^{\circ}\text{C}$ do ďalšieho dňa.
- V prípade dlhšieho skladovania boli hrubé lyzáty buniek ďalej uchovávané pri teplote 20 $^{\circ}\text{C}$, aby sa zamedzilo prípadnej degradácii DNA.

4.4.2 Fenol-chloroformová extrakcia DNA

- K hrubému lyzátu buniek bolo pridaných 500 μl fenolu (predestilovaného, pH upravené na hodnotu 7,8) a zmes sa opatrne kývavým pohybom premiešavala 4 minúty. Zmes bola potom centrifugovaná 5 min pri 14 500 ot/min.
- Pomocou špičky bola odobraná vodná fáza do čistej Eppendorfovej skúmavky a bola doplnená TE pufrom na objem 500 μl .
- Bolo pridaných 700 μl zmesi chloroform-izoamylalkohol (24:1) a zmes sa znova opatrne premiešavala kývavým pohybom 4 minúty. Zmes bola potom centrifugovaná 5 min pri 14 500 ot/min.
- Po centrifugovaní bola vodná fáza odobraná do čistej Eppendorfovej skúmavky.

4.4.3 Vyvrážanie DNA etanolom

- K vzorkám DNA bolo pridaných 1/20 objemu 3M octanu sodného a 1 ml etanolu (96%) a celý obsah bol premiešaný.
- DNA sa následne vyvrážala pri -20 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 60 min.
- Vzorky boli potom centrifugované po dobu 15 min pri 14 500 ot/min. Po odstredení bol odliaty supernatant a ďalej sa pracovalo so sedimentom.
- Sediment vzoriek, ktorý obsahoval DNA, bol sušený v exikátore po dobu 15 min, a potom bol doplnený TE pufrom na objem 100 μl .
- Vyizolovaná DNA vzoriek bola uchovávaná pri teplote -20 $^{\circ}\text{C}$.

4.4.4 Izolácia DNA pomocou Omni Bacterial DNA Purification kitu (Omni International)

- Bolo pripravené MRS médium určené na kultiváciu baktérií z jogurtových výrobkov. Bolo navážených 5,5 g MRS Lactobacillus Broth média, ktoré bolo následne rozpustené v 100 ml destilovanej vody. Zmes bola potom umiestnená do autoklávu a vysterylizovaná.
- Po vychladnutí bolo médium sterilne presunuté do skúmaviek určených na kultiváciu. Do tohto média bolo pridaných 1 ml kultúry z jogurtových vzoriek výrobkov. Kultivácia baktérií z jogurtových výrobkov prebiehala 48-72 hodín.
- Po ukončení kultivácie bolo z tekutého MRS média odobratých 1 ml bunkových kultúr určených na extrakciu DNA. Táto zmes bola centrifugovaná 10 minút pri 4000 x g.
- Po centrifugovaní bol supernatant odobraný pomocou špičky do novej Eppendorfovej skúmavky.
- Následne bolo pridaných 200 μl TE pufu, 10 μl lyzozýmu a celá zmes bola vortexovaná a následne umiestnená do inkubátoru na 10 minút pri teplote 37 $^{\circ}\text{C}$.

- Bolo pridaných 25 μ l proteázového roztoku a 100 μ l DLB pufru a zmes bola vortexovaná niekoľko sekúnd a inkubovaná v termo-sheakeri pri teplote 55 °C na 1 hodinu.
- Po inkubácii bolo pridaných 5 μ l RNázy A a Eppendorfové skúmavky boli niekoľkokrát prevrátené, aby sa celá zmes premiešala.
- Zmes sa potom ešte inkubovala 5 minút pri laboratórnej teplote. Nato bola zmes centrifugovaná na 2 minúty pri 10 000 x g. Supernatant bol potom premiestnený do nových Eppendorfových skúmaviek.
- Bolo pridaných 220 μ l BB pufru a zmes bola vortexovaná po dobu niekoľkých sekúnd a následne inkubovaná 10 minút pri 65 °C. Po inkubácii bolo pridaných 220 μ l 96 % etanolu a zmes bola krátko vortexovaná.
- Následne bola vložená Omni DNA Mini kolóna do zbernej skúmavky (2 ml). Celý obsah zmesi bol presunutý do Omni DNA Mini kolóny. Zmes bola potom centrifugovaná pri 10 000 x g po dobu 1 minúty.
- Filtrát v zbernej skúmavke bol odstránený a do Omni DNA Mini kolóny bola umiestnená nová zberná skúmavka (2 ml).
- Do Omni DNA Mini kolóny bolo pridaných 500 μ l CBH pufru a zmes bola centrifugovaná pri 10 000 x g po dobu 1 minúty.
- Filtrát v zbernej skúmavke bol znovu odstránený a do Omni DNA Mini kolóny bola umiestnená nová zberná skúmavka (2 ml).
- Do Omni DNA Mini kolóny bolo pridaných 700 μ l DW pufru a zmes bola centrifugovaná pri 10 000 x g po dobu 1 minúty.
- Po odstránení filtrátu v zbernej skúmavke bol predošlý krok znovu zopakovaný.
- Za účelom odstránenia stôp etanolu bola ešte centrifugovaná prázdna Omni DNA Mini kolóna pri 10 000 x g po dobu 2 minút.
- Do Omni DNA Mini kolóny bola vložená nová prázdna Eppendorfova skúmavka.
- Následne bolo do Omni DNA Mini kolóny pridaných 100 μ l EB pufru zahriatých na 65 °C a celá sa nechala odstáť po dobu 5 minút pri laboratórnej teplote.
- Nakoniec bola Omni DNA Mini kolóna v Eppendorfovej skúmavke centrifugovaná pri 10 000 x g a DNA bola vyeluovaná do EB pufru.
- Vyeluovaná DNA bola skladovaná pri teplote -20 °C.

4.4.5 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA

- Na prístroji NanoDrop 2000 bola u oboch metód zmeraná absorbanca vyizolovanej DNA pre vlnové dĺžky 230 nm (minimum absorbancie pre DNA), 260 nm (maximum absorbancie pre DNA) a 280 nm (maximum absorbancie pre proteíny).
- U metódy fenol-chloroformovej extrakcie DNA bola zmeraná hodnota absorbancie vyizolovanej DNA v TE pufru oproti čistému TE pufru.
- U metódy extrakcie DNA pomocou Omni Bacterial DNA Purification kitu bola zmeraná hodnota absorbancie vyizolovanej DNA v EB pufru oproti čistému EB pufru.
- Objem použitého roztoku obsahujúcu DNA k meraniu bol 3 μ l.
- Z hodnoty absorbancie pre 260 nm bola stanovená koncentrácia DNA vo vzorke a z pomeru hodnôt A260 nm/A280 nm bola určená čistota vzorky DNA.

4.4.6 PCR

- Pred použitím boli všetky komponenty určené k PCR krátko premiešané a zcentrifugované.
- Z komponentov bola pripravená zmes vrátane pozitívnej aj negatívnej kontroly určená k PCR o celkovom objeme 25 μ l
- U pozitívnej kontroly pre doménu *Bacteria* rod *Lactobacillus* bol použitý kmeň *Lactobacillus casei*.
- V prípade negatívnej kontroly bolo použitých namiesto 1,0 μ l matrice DNA voda pre PCR.
- Jednotlivé poradie a zloženie komponentov je uvedené v Tab. 3.

Tab. 3: Poradie a objemy komponentov určených na prípravu zmesi pre real-time PCR

Poradie	Komponenty	Objem [μ l]
1.	Voda pre PCR	9,5
2.	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
3.	Primer 1 (10 pmol/ μ l)	1,0
4.	Primer 2 (10 pmol/ μ l)	1,0
5.	Matrica DNA (10 ng/ μ l)	1,0
Celkom:		25,0

4.4.6.1 Použité primery

- Pre doménu *Bacteria* boli použité primery F_eub a R_eub.
- Pre rod *Lactobacillus* boli použité primery F_allact a R_allact.
- Všetky použité sekvencie primerov pre doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus* sú popísané v Tab. 4 [31]

Tab. 4: Sekvencie použitých primerov pre doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus* [31]

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

4.4.6.2 Priebeh amplifikácie DNA

- Pred uskutočnením Real-time PCR boli zvolené na počítači teplotné programy v závislosti od použitých primerov.

Zloženie jednotlivých teplotných krokov pre doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus* sa uvádza v Tab. 5:

Tab. 5: Teplotné programy a ich kroky pre doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*

Doména <i>Bacteria</i>			
Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95 °C	5 min	30
Denaturácia	95 °C	30 s	
Pripojenie primerov	55 °C	30 s	
Syntéza DNA	72 °C	30 s	
Dosyntetizovanie DNA	72 °C	10 min	
Rod <i>Lactobacillus</i>			
Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95 °C	5 min	40
Denaturácia	94 °C	30 s	
Pripojenie primerov	58 °C	30 s	
Syntéza DNA	72 °C	30 s	
Dosyntetizovanie DNA	72 °C	10 min	

4.4.7 Gelová elektroforéza produktov PCR

Bola uskutočnená gélová elektroforéza, pomocou ktorej boli na géli detegované produkty PCR.

4.4.7.1 Príprava gélu

- Bol pripravený 1,5 % agarózový gél, na ktorý bolo použitých 1,5 g agarózy rozpustených v 100 ml 0,5 x TBE pufru.
- Zmes bola rozvarená v mikrovlnnej rúre a po ochladení na teplotu približne 60 °C bolo pridaných 5 µl fluorescenčného farbiva.
- Zmes bola následne naliata do elektroforetickej vaničky, kde bol následne pridaný hriebienok.
- Gél sa nechal tuhnúť pri laboratórnej teplote približne 30 minút.

4.4.7.2 Nanášanie vzoriek

- Do Eppendorfových skúmaviek (200 µl), v ktorých sa nachádzal PCR produkt (25 µl), bolo pridaných 5 µl nanášacieho pufru a zmes sa nechala odstáť približne 10 minút.
- Po vychladnutí gélu bol vytiahnutý hriebienok a do jamiek bolo nanesených 15 µl vzorky zmiešanej s nanášacím pufrom vrátane pozitívnej a negatívnej kontroly.
- Do jednej jamky bol taktiež nanesený DNA štandard s objemom 5 µl.

4.4.7.3 Priebeh a vyhodnotenie vzoriek

- Po umiestnení gélu do elektroforetickej vaničky bol celý gél prevrstvený 0,5 x TBE pufrom, ktorý bol doplnený do výšky cca 0,5 cm nad gél.
- Elektroforéza prebiehala 1,5 hodiny pri napätí 70 V.
- Po dokončení elektroforézy bol gél vytiahnutý z vaničky a umiestnený na detekčný prístroj, na ktorom boli zdokumentované výsledky.

5 VÝSLEDKY

5.1 Príprava hrubých lyzátov z jogurtových produktov

Z troch vzoriek jogurtov (Activia, Selský jogurt a Selský jogurt [Hollandia]) bolo pripravených šesť vzoriek hrubých lyzátov podľa kapitoly 4.4.1. Tie boli následne použité na extrakciu DNA pomocou fenol-chloroformu.

5.2 Kultivácia bakteriálnych buniek v jogurtových výrobkoch

Boli nakultivované baktérie z každých vzoriek jogurtov v MRS Broth médiu za účelom následnej izolácie DNA pomocou OMNI Bacterial DNA kitu. Celková doba kultivácie prebiehala 72 hodín.

5.3 Izolácia DNA

Pomocou fenol-chloroformovej extrakcie bola vyizolovaná DNA z hrubých lyzátov pripravených z jogurtových produktov, ktoré sú popísané v kapitole 4.4.2.

U extrakcie DNA pomocou OMNI Bacterial DNA kitu, ktorá je popísaná v kapitole 4.4.4, boli použité nakultivované baktérie z MRS Broth média.

5.4 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA

Na prístroji NanoDrop 2000 bola u všetkých vzoriek spektrofotometricky zmeraná absorbancia v rozmedzí vlnových dĺžok 220-330 nm podľa postupu v kapitole 4.4.5.

Výsledky sú uvedené v Tab. 6 a Tab. 7:

Tab. 6: Namerané hodnoty absorbancie a koncentrácie vyizolovanej DNA pomocou fenol-chloroformovej

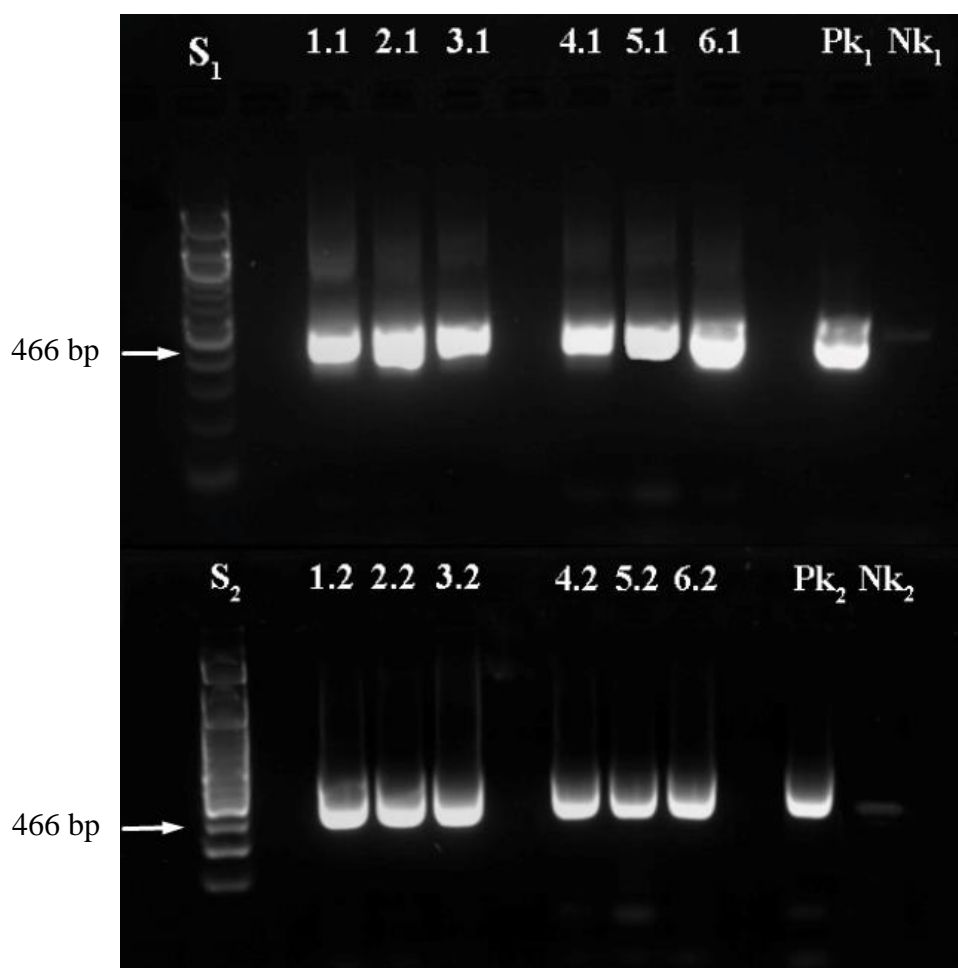
Fenol-chloroformová extrakcia DNA						
Názov	č.	A₂₃₀	A₂₆₀	A₂₈₀	A_{260/280}	c [ng/μl]
Activia	1.	13,800	3,726	2,471	1,51	186,3
	2.	3,131	1,691	1,173	1,44	84,5
Selský jogurt	1.	3,571	1,214	0,851	1,43	60,7
	2.	6,073	2,733	1,889	1,45	136,7
Selský jogurt (Hollandia)	1.	12,773	4,726	3,223	1,47	236,3
	2.	11,534	6,113	3,893	1,57	305,7

Tab. 7: Namerané hodnoty absorbancie a koncentrácie vyizolovanej DNA cez OMNI Bacterial DNA kit

OMNI Bacterial DNA kit					
Názov	č.	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	c [ng/μl]
Activia	1.	0,504	0,259	1,95	25,2
	2.	0,271	0,153	1,78	13,6
Selský jogurt	1.	0,053	0,034	1,55	2,6
	2.	0,312	0,192	1,62	15,6
Selský jogurt (Hollandia)	1.	0,062	0,044	1,42	3,1
	2.	0,280	0,171	1,64	14,0

5.5 Real-time PCR pre doménu *Bacteria*

Pomocou real-time PCR s využitím primerov F_eub a R_eub pre doménu *Bacteria* bola v jogurtových produktoch dokázaná prítomnosť bakteriálnej DNA. Veľkosť amplifikovaných produktov PCR bola 466 bp. U pozitívnej kontroly boli použité bakteriálne kmene *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*. Detegované produkty PCR pomocou gélovej elektroforézy sú znázornené na Obr. 2 a popísané v Tab. 8.



Obr. 2: Gélová elektroforéza amplifikovaných produktov PCR pre doménu *Bacteria*

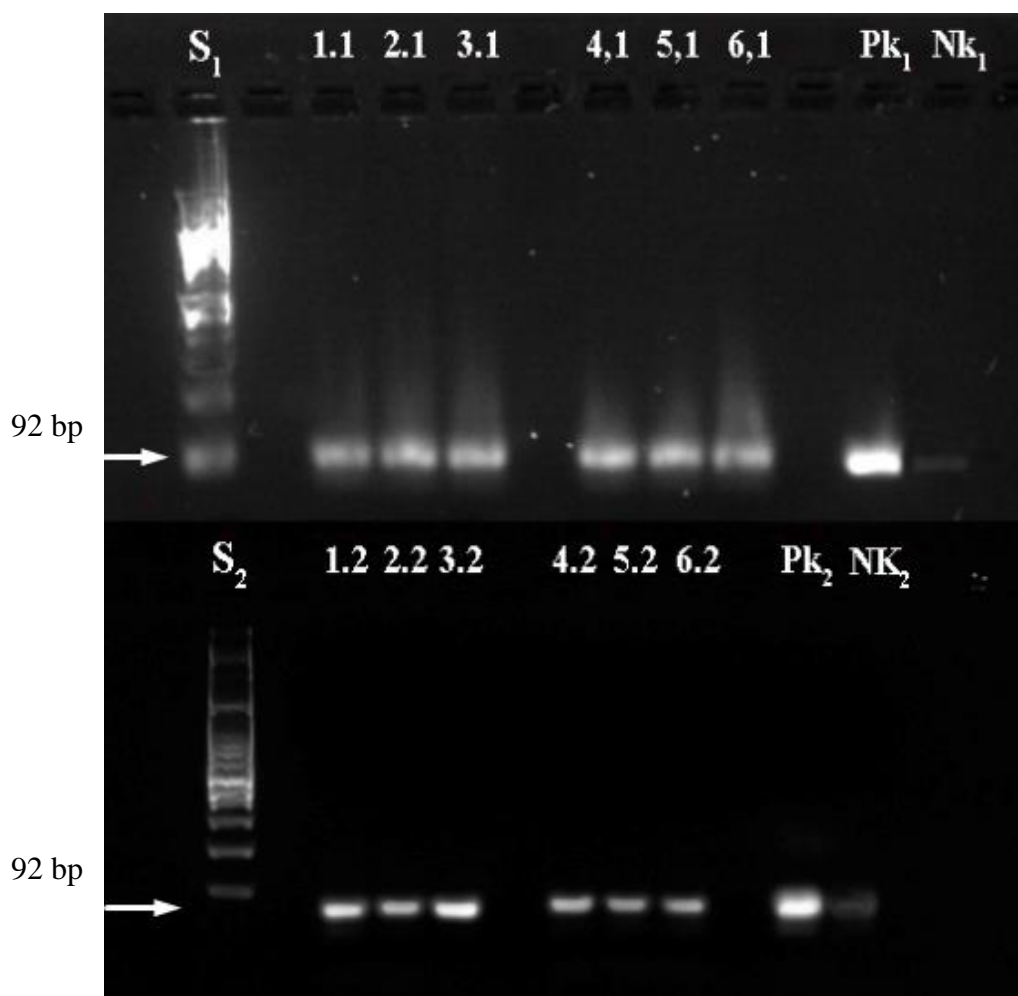
Tab. 8: Detekcia PCR produktov pomocou gélovej elektroforézy pre doménu *Bacteria*

Názov	Značka	Použitý objem [μ l]	Detekcia produktu
DNA Štandard	S ₁	5	
	S ₂	5	
Pozitívna kontrola	Pk ₁	15	++
	Pk ₂	15	++
Negatívna kontrola	Nk ₁	15	-
	Nk ₂	15	-
OMNI Bacterial DNA Kit			
Activia	1.1	15	++
	1.2	15	++
Selský jogurt	2.1	15	++
	2.2	15	++
Selský jogurt (Hollandia)	3.1	15	++
	3.2	15	++
Fenol-chloroformová metóda			
Activia	4.1	15	++
	4.2	15	++
Selský jogurt	5.1	15	++
	5.2	15	++
Selský jogurt (Hollandia)	6.1	15	++
	6.2	15	++

- ++ Vysoká detekcia PCR produktu
- + Nízka detekcia PCR produktu
- Negatívna detekcia PCR produktu

5.6 Real-time PCR pre rod *Lactobacillus*

S využitím primerov F_alllact a R_alllact boli amplifikované produkty PCR, ktoré dokazujú prítomnosť baktérií z rodu *Lactobacillus* v jogurtových produktoch. Veľkosť amplifikovaných produktov PCR je 92 bp. U pozitívnej kontroly boli použité kmene *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*. Detegované produkty PCR pomocou gélovej elektroforézy sú znázornené na Obr. 3 a popísané v Tab 9.



Obr. 3: Gélová elektroforéza amplifikovaných produktov PCR pre rod *Lactobacillus*

Tab. 9: Detekcia PCR produktov pre rod *Lactobacillus*

Názov	Značka	Použitý objem [μl]	Detekcia produktu
DNA Štandard	S ₁	5	
	S ₂	5	
Pozitívna kontrola	Pk ₁	15	++
	Pk ₂	15	++
Negatívna kontrola	Nk ₁	15	-
	Nk ₂	15	-
OMNI Bacterial DNA Kit			
Activia	1.1	15	+
	1.2	15	++
Selský jogurt	2.1	15	+
	2.2	15	++
Selský jogurt (Hollandia)	3.1	15	+
	3.2	15	++

Fenol-chloroformová metóda			
Activia	4.1	15	+
	4.2	15	+
Selský jogurt	5.1	15	+
	5.2	15	+
Selský jogurt (Hollandia)	6.1	15	+
	6.2	15	+

- ++ Vysoká detekcia PCR produktu
- + Nízka detekcia PCR produktu
- Negatívna detekcia PCR produktu

6 DISKUSIA

6.1 Izolácia DNA

Pri fenol-chloroformovej metóde, boli použité hrubé lyzáty pripravené priamo z jogurtových vzoriek. Pri použití tejto metódy mohla byť vyizolovaná DNA ihneď použitá na real-time PCR a na identifikáciu baktérií bez akejkol'vek potrebnej kultivácie. [6]

Pri použití OMNI Bacterial DNA kitu z dôvodu vysokého obsahu tuku a proteínov nebolo možné ani po viacerých opakovaníach vyextrahovať DNA z hrubých lyzátoov pripravených priamo z jogurtových produktov, preto bola zvolená metóda kultivácie baktérií v médiu a tie boli použité na následnú izoláciu pomocou OMNI Bacterial DNA kitu podľa odporúčania v jeho manuáli.

6.2 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA

Na prístroji Nanodrop bola zmeraná absorbanca v rozmedzí vlnových dĺžok 220-330 nm. Na základe pomeru hodnôt absorbancií pri vlnových dĺžkach 260 a 280 nm bola zhodnotená čistota DNA. Tento pomer by sa mal nachádzať v rozmedzí 1,8 – 2,0. Pri fenol-chloroformovej extrakcii sa tento pomer absorbancií pohyboval v rozmedzí 1,43 – 1,57. U extrakcie pomocou DNA OMNI Bacterial DNA kitu sa pomer absorbancií vzoriek pohyboval v rozmedzí 1,42 – 1,95. S výnimkou 1 vzorky u kitu boli u oboch metód namerané hodnoty absorbanca menšie ako 1,8, čo je znakom značnej kontaminácie vzoriek proteínmi. U fenol-chloroformovej extrakcie bolo tiež zistené, že vzorky obsahovali stopy fenolu, pretože neplatil pomer absorbancií $A_{230\text{nm}} \ll A_{260\text{nm}}$. Taktiež na základe porovnaní zmeraných hodnôt absorbancií u oboch metód izolácie DNA možno konštatovať, že DNA vyizolovaná pomocou DNA OMNI Bacterial DNA kitu bola čistejšia, keďže tieto hodnoty absorbanca sa približovali k hodnote 1,8. [29]

Koncentrácia vzoriek bola zistená na základe zmeraných hodnôt absorbanca pri vlnovej dĺžke 260 nm. [29] U fenol-chloroformovej extrakcie sa tieto hodnoty pohybovali v rozmedzí 60,7 – 305,7 ng/μl. U extrakcie DNA pomocou OMNI Bacterial DNA kitu sa tieto hodnoty pohybovali v rozmedzí 2,6 – 25,2 ng/μl. Na základe porovnania koncentrácie u oboch metód možno konštatovať, že výťažnosť fenol-chloroformovej extrakcie je niekoľkonásobne väčšia než u DNA OMNI Bacterial DNA kitu. [27] Taktiež môžeme tvrdiť, že obe metódy poskytujú DNA s dostatočnou koncentráciou na PCR. Vzorky vyizolovanej DNA, ktoré mali väčšiu koncentráciu ako 10 ng/μl, boli nariadené na toto množstvo. [29]

6.3 Real-time PCR pre doménu *Bacteria*

Vyizolovaná DNA z oboch metód bola použitá ako matrica v real-time PCR. Pri následnej príprave zmesi pre real-time PCR boli použité primery F_eub a R_eub, ktoré patria pod doménu

Bacteria. Pomocou elektroforézy na 1,5 % agarózovom géli boli vo všetkých vzorkách detegované úseky o veľkosti 466 bp, ktoré dokazujú prítomnosť bakteriálnej DNA pre dómenu *Bacteria*. Detekcia produktov PCR o vysokej intenzite dokazujú veľké množstvo prítomnej bakteriálnej DNA. Negatívna kontrola nebola amplifikovaná, preto nebola detegovaná na géli. [31]

6.4 Real-time PCR pre rod *Lactobacillus*

Na dôkaz prítomnosti baktérií z rodu *Lactobacillus* boli použité primery F_alllact a R_alllact. Pomocou elektroforézy na 1,5 % agarózovom géli boli vo všetkých vzorkách detegované amplifikované produkty PCR. Tieto produkty PCR mali veľkosť 92 bp, čo dokazuje prítomnosť baktérií z rodu *Lactobacillus*. [31] Negatívna kontrola nebola amplifikovaná. Ako pozitívna kontrola bol použitý kmeň *Lactobacillus rhamnosus*. Pri porovnaní intenzity detegovaných úsekov u oboch metód s pozitívnou kontrolou, si môžeme všimnúť, že amplifikované PCR produkty zo vzoriek u fenol-chloroformovej extrakcií majú o niečo nižšiu intenzitu, čo je s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobené stopami fenolu, ktoré pôsobili ako inhibitory v PCR. [29] U všetkých troch jogurtových produktov boli dokázané baktérie z rodu *Lactobacillus*, tak ako to deklaruje výrobca.

7 ZÁVER

V teoretickej časti tejto práce bola vypracovaná literárna rešerš o najpoužívanejších probiotických kmeňov, medzi ktoré patria baktérie z rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Zároveň boli popísané prospešné vlastnosti prebiotík s ohľadom na zdravie spotrebiteľov. Tiež boli zhodnotené vlastnosti probiotík, ktoré boli overené rôznymi klinickými štúdiami.

V praktickej časti tejto práce bola pomocou fenol-chloroformovej metódy a OMNI Bacterial DNA kitu izolovaná DNA z komerčných jogurtových produktov, u ktorých boli následne pomocou spektrofotometrie zhodnotené kvalitatívne a kvantitatívne parametry vyizolovanej DNA. Nakoniec bola s vyizolovanou DNA urobená real-time PCR s využitím selektívnych primerov pre doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*. Amplifikované produkty PCR, u ktorých bola preukázaná prítomnosť tak bakteriálnej DNA, ako aj baktérií z rodu *Lactobacillus*, ako to bolo deklarované na obale všetkých troch komerčných jogurtových produktov, boli detegované pomocou elektroforézy na agarózovom géli.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] Ronald Ross Watson; Victor R. Preedy. *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*. Elsevier Science. ISBN 978-0-12-802371-6
- [2] ARNOLD, James N., Raymond A. DWEK, Pauline M. RUDD a Robert B. SIM, 2006. Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease. *Immunology Letters*. 106(2), 103-110. DOI: 10.1016/j.imlet.2006.05.007. ISSN 01652478. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247806001465>
- [3] DELZENNE, Nathalie M, Nadine KOK, Pauline M. RUDD a Robert B. SIM, 2001. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73(2), 456s-458s. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.456s. ISSN 0002-9165. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/73/2/456s/4737578>
- [4] ROBERFROID, Marcel, Nadine KOK, Pauline M. RUDD a Robert B. SIM, 2007. Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*. 137(3), 830S-837S. DOI: 10.1093/jn/137.3.830S. ISSN 0022-3166. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jn/article/137/3/830S/4664774>
- [5] SAAD, N., C. DELATTRE, M. URDACI, J.M. SCHMITTER a P. BRESSOLLIER, 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*. 50(1), 1-16. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.014. ISSN 00236438. Dostupné tiež z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643812002319>
- [6] HERBEL, S.R., B. LAUZAT, M. VON NICKISCH-ROSENEGK, M. KUHN, J. MURUGAIYAN, L.H. WIELER a S. GUENTHER, 2013. Species-specific quantification of probiotic lactobacilli in yoghurt by quantitative real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 115(6), 1402-1410. DOI: 10.1111/jam.12341. ISSN 13645072. Dostupné tiež z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12341>
- [7] FIJAN, Sabina, 2014. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 11(5), 4745-4767 DOI: 10.3390/ijerph110504745. ISSN 1660-4601. Dostupné tiež z: <http://www.mdpi.com/1660-4601/11/5/4745>
- [8] LEE, Yuan Kun a Seppo SALMINEN, 2008. *HANDBOOK OF PROBIOTICS AND PREBIOTICS: Second Edition*. ISBN 8126549424.
- [9] HOLZAPFEL, Wilhelm H, Petra HABERER, Rolf GEISEN, Johanna BJÖRKROTH a Ulrich SCHILLINGER, 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition: An Overview of Recent Literature. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73(2), 365s-373s. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.365s. ISSN 0002-9165. Dostupné tiež z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/73/2/365s/4737564>
- [10] BORCHERS, Andrea T., Carlo SELMI, Frederick J. MEYERS, Carl L. KEEN a M. Eric GERSHWIN, 2009. Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*. 44(1), 26-46. DOI: 10.1007/s00535-008-2296-0. ISSN 0944-1174. Dostupné tiež z: <http://link.springer.com/10.1007/s00535-008-2296-0>
- [11] AFRC, R. FULLER, 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66(5), 365-378. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x. ISSN 00218847. Dostupné tiež z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>

- [12] RONDANELLI, Mariangela, Milena Anna FALIVA, Simone PERNA, Attilio GIACOSA, Gabriella PERONI a Anna Maria CASTELLAZZI, 2017. Using probiotics in clinical practice: Where are we now? A review of existing meta-analyses. *Gut Microbes*. 8(6), 521-543. DOI: 10.1080/19490976.2017.1345414. ISSN 1949-0976. Dostupné tiež z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19490976.2017.1345414>
- [13] OAK, Sophia J. a Rajesh JHA, 2018. The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 59(11), 1675-1683. DOI: 10.1080/10408398.2018.1425977. ISSN 1040-8398. Dostupné tiež z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2018.1425977>
- [14] STANTON, Catherine, Gillian GARDINER, Hillary MEEHAN, Kevin COLLINS, Gerald FITZGERALD, P Brendan LYNCH a R Paul ROSS, 2001. Market potential for probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73(2), 476s-483s. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.476s. ISSN 0002-9165. Dostupné tiež z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/73/2/476s/4737582>
- [15] S., Saddam, 2012. Probiotic Food Products Classes, Types, and Processing. *Probiotics*. InTech, 2012-10-03. DOI: 10.5772/51267. ISBN 978-953-51-0776-7. Dostupné tiež z: <http://www.intechopen.com/books/probiotics/probiotic-food-products-classes-types-and-processing>
- [16] Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health, 2017. *Nutrients*. 9(9). DOI: 10.3390/nu9091021. ISSN 2072-6643. Dostupné tiež z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/9/1021>
- [17] Aguilera-Arreola MG. Identification and Typing Methods for the Study of Bacterial Infections: a Brief Review and Mycobacterial as Case of Study. *Arch Clin Microbiol*. 2015, 7:1
- [18] CEUPPENS, Siele, Dan LI, Mieke UYTENDAELE, Pierre RENAULT, Paul ROSS, Marc Van RANST, Luca COCOLIN a John DONAGHY, 2014. Molecular Methods in Food Safety Microbiology: Interpretation and Implications of Nucleic Acid Detection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13(4), 551-577. DOI: 10.1111/1541-4337.12072. ISSN 15414337. Dostupné tiež z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12072>
- [19] OLUBUKOLA, O. Babalola, 2003. Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African Journal of Biotechnology*. 2(12), 710-713. DOI: 10.5897/AJB2003.000-1127. ISSN 1684-5315. Dostupné také z: <http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/23247B711420>
- [20] VALONES, Marcela Agne Alves, Rafael Lima GUIMARÃES a Lucas André Cavalcanti BRANDÃO, 2009. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40(1). DOI: 10.1590/S1517-83822009000100001. ISSN 1517-8382.
- [21] RACLAVSKÝ, Vladislav, 1998. *Úvod do základných metod molekulárnej genetiky*. Olomouc. ISBN 80-706-7892-5.
- [22] BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renata KARPÍŠKOVÁ and Petra MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. 80 pp. ISBN 978-80-7305-676-6.
- [23] On-chip Device for Isothermal, Chemical Cycling Polymerase Chain Reaction (ccPCR), In: *Stanford Microfluidics Laboratory* [online]. [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <https://microfluidics.stanford.edu/Projects/Archive/OnChipPCR.html>

- [24]PINTO, Angela Di, VitoTony FORTE, Maria Corsignano GUASTADISEGNI, Carmela MARTINO, Francesco Paolo SCHENA a Giuseppina TANTILLO, 2007. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control*. 18(1), 76-80. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.08.011. ISSN 09567135. Dostupné tiež z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713505001878>
- [25]GRODY, Wayne, Robert NAKAMURA, Frederick KIECHLE a Charles STROM, 2009. *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*. Academic Press. ISBN 9780123694287.
- [26]GREEN, Michael R. a Joseph SAMBROOK, 2017. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2017(4). DOI: 10.1101/pdb.prot093450. ISSN 1940-3402. Dostupné tiež z: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.prot093450>
- [27]BURSOVÁ, Šárka, Renáta KARPÍŠKOVÁ, Marta DUŠKOVÁ a Lenka NECIDOVÁ, 2014. *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie*. Revidované vydání. 2. ISBN 978-80-7305-683-4.
- [28]NAVRÁTIL, Milan, Lenka UVÍROVÁ, Petr NÁDVORNÍK, Marie KUBALÁKOVÁ a Jana KLUKÁČKOVÁ, 2004. *Základní praktická cvičení z molekulární biologie*. Olomouc.
- [29]ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH, 2010. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [30]MAGDELDIN, Sameh, 2012. *Gel Electrophoresis: Principles and Basics*. BoD – Books on Demand. ISBN 978-953-51-0458-2.
- [31]HAARMAN, Monique a Jan KNOL, 2006. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(4), 2359-2365. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006. ISSN 0099-2240.

9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

PCR	polymerázová reťazová reakcia
A	absorbancia
bp	(base pair) počet bází
CFU	(colony forming units) jednotky tvoriace kolóniu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxynukleotid trifosfát
dsDNA	dvojláknová DNA
EDTA	kyselina etyléndiamínotetraoctová
G⁺	grampozitívne baktérie
LAB	baktérie mliečneho kvasenia
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
TE	Tris/EDTA pufor