



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PROBIOTIKA A PREBIOTIKA V POTRAVINOVÝCH A DALŠÍCH VÝROBCÍCH

PROBIOTICS AND PREBIOTICS IN FOOD AND OTHER PRODUCTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

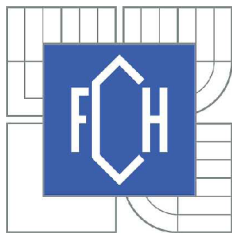
DENISA ROMANOVSKÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. ŠTĚPÁNKA TRACHTOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0899/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Denisa Romanovská	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	

Název bakalářské práce:

Probiotika a prebiotika v potravinových a dalších výrobcích

Zadání bakalářské práce:

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

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

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

Denisa Romanovská
Student(ka)

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

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

ABSTRAKT

V teoretické části práce se pojednává o současném stavu a výzkumu probiotik a prebiotik, jejich využitelnosti pro modulaci mikroflóry hostitele a jejich příznivých účincích na zdraví jedince. Dále je pojednáno o problematice účinnosti probiotických kmenů, která závisí na použité potravinové matici a na řadě dalších faktorů. Experimentální je zaměřena na identifikaci vybraného bakteriálního kmene obsaženého v probiotickém výrobku. Bakteriální DNA byla z výrobku izolována metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických nosičů s následnou analýzou získané DNA metodou polymerázové řetězové reakce (PCR).

ABSTRACT

Theoretical part of this thesis focuses on present state and research of probiotics and prebiotics, their use for microflora modulation of host and their beneficial effects on the health of individuals. Furthermore thesis deals with efficiency of probiotics strains, which depends on the food matrix and other various factors. The experimental part focuses on the identification of chosen bacterial strain, which is contained in probiotics product. It is realized due the isolation of bacterial DNA by phenol extraction and by use of magnetic particles and subsequent analysis of obtained DNA by polymerase chain reaction (PCR).

KLÍČOVÁ SLOVA

probiotika, prebiotika, izolace DNA, PCR, qPCR

KEYWORDS

probiotics, prebiotics, DNA isolation, PCR, qPCR

ROMANOVSKÁ, D. *Probiotika a prebiotika v potravinových a dalších výrobcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D za odborné vedení, trpělivost, cenné připomínky a za čas, který mi věnovala.

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Definice probiotik.....	8
2.2 Legislativní ustanovení a omezení	8
2.3 Druhy probiotických kultur a jejich taxonomické zařazení	9
2.4 Využití probiotických kultur v potravinách a dalších výrobcích	10
2.4.1 Potravinové matrice využitelné pro uchování probiotických bakterií.....	11
2.5 Význam a účinky probiotik na zdraví člověka	13
2.5.1 Crohnova choroba.....	14
2.5.2 Syndrom dráždivého tračníku.....	14
2.5.3 Průjmová onemocnění	15
2.5.4 Další onemocnění trávicího traktu.....	15
2.5.5 Diabetes a kardiovaskulární onemocnění	16
2.5.6 Další onemocnění	16
2.6 Prebiotika.....	16
2.6.1 Definice prebiotik	16
2.6.2 Vlastnosti prebiotik a proces jejich získávání	17
2.6.3 Význam a účinky prebiotik na zdraví člověka	17
2.6.3.1 Modulace imunitního systému	18
2.6.3.2 Prevence vzniku karcinomu.....	19
2.6.3.3 Vliv prebiotik na metabolismus lipidů.....	19
2.6.3.4 Vliv prebiotik na adsorpci minerálních látek	19
2.6.3.5 Vliv prebiotik na regulaci hmotnosti	19
2.7 Metody analýzy probiotik.....	19
2.7.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) jako molekulárně diagnostická metoda 20	
3 CÍL PRÁCE	23
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1 Materiál.....	24
4.1.1 Použitý vzorek probiotického doplňku stravy	24
4.1.2 Použité bakteriální kmeny pro pozitivní kontroly	24
4.1.3 Přístroje a pomůcky	24
4.1.4 Chemikálie.....	25
4.1.5 Roztoky.....	25

4.1.6	Komponenty pro PCR	26
4.1.7	Magnetické nosiče	26
4.2	Metody.....	26
4.2.1	Lyze bakteriálních buněk.....	26
4.2.2	Fenolová extrakce bakteriální DNA	26
4.2.3	Srážení DNA etanolem	27
4.2.4	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických mikročástic.....	27
4.2.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA	28
4.2.6	Gelová elektroforéza bakteriální DNA.....	28
4.2.7	PCR.....	28
4.2.7.1	PCR primery	29
4.2.7.2	PCR programy.....	30
4.2.7.3	Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů.....	30
5	VÝSLEDKY	31
5.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA	31
5.2	Gelová elektroforéza bakteriální DNA.....	32
5.3	Prokázání přítomnosti DNA bakterií domény <i>Bacteria</i> metodou PCR.....	33
5.4	Prokázání přítomnosti DNA bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> metodou PCR.....	34
5.5	Prokázání přítomnosti DNA bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> metodou PCR.....	35
6	DISKUZE	36
6.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	36
6.2	Gelová elektroforéza vzorku bakteriální DNA.....	36
6.3	PCR analýza bakteriální DNA pro doménu <i>Bacteria</i>	36
6.4	PCR analýza bakteriální DNA pro rod <i>Lactobacillus</i>	37
6.5	PCR analýza bakteriální DNA pro rod <i>Bifidobacterium</i>	37
7	ZÁVĚR	38
8	POUŽITÉ LITERÁRNÍ ZDROJE	39
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	43

1 ÚVOD

Mléčné výrobky vzniklé zkvašováním bakteriemi mléčného kvašení, obohacené sacharidy a doplňky stravy s probiotiky se na trhu objevují již mnoho let. Prospěšně působí na zajištění rovnováhy střevní mikroflóry, regulují imunitní systém a posilují střevní bariéru. Probiotika spadají do skupiny funkčních potravin, které mají pozitivní účinek na zdraví hostitele. Kolébkou tohoto druhu potravin je Japonsko, kde jich na konci 20. stol. bylo registrováno kolem 1 700 druhů. V posledních letech významně stoupl zájem společnosti o využití příznivých vlastností probiotik a prebiotik a došlo tak k významnému rozvoji ve výzkumu a to především v Japonsku, USA a některých zemích Evropy. Kromě fermentovaných potravin a mléčných výrobků jsou probiotika dostupná také ve formě doplňků potravy. [1]

V poslední době dochází ke snahám testovat účinky nových probiotických kmenů za účelem jejich využití v potravinářských výrobcích. Aby tyto probiotické kmeny mohly být přidávány do potravinářských výrobků, musí být ověřeny jejich prospěšné účinky na zdraví hostitele. Složení střevní mikroflóry je ovlivněno již v dětství, a to konzumací mateřského mléka nebo náhradní výživy a také tím, kdy se kojenci začne podávat pevná strava. Probiotika vykazují přínosné účinky při zmírnění příznaků alergií, imunitních onemocnění, onemocnění ústní dutiny, gastrointestinálního traktu a urogenitálního traktu, ale také při neurologických a psychiatrických potížích. [2]

Doporučení ohledně konzumace probiotik a prebiotik jsou podloženy výzkumy. Je však nutné další porozumění mechanismu jejich účinku, aplikace nabytých vědomostí z klinických testů do reálného života, vypracování metodiky na eliminaci zkreslujících jevů a také analýza hospodářského přínosu v oblasti veřejného zdraví. Je důležité zdokumentovat zdravotní stav společnosti a důsledky dlouhodobého užívání probiotik a prebiotik. [3]

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Definice probiotik

Koncept specifických mikrobiálních organismů, které mají významný vliv na lidské zdraví, propagoval laureát Nobelovy ceny Ilja Iljič Metchnikoff už na začátku 20. Století. O století později je tento koncept sledován v Intestinal Human Microbiome Project. V minulosti byly různé mikrobiální kmeny gastrointestinálního (GI) traktu studovány, ale překážkou k plnému pochopení jejich významu bránily nedostatečné znalosti o fungování, prospívání a společné existenci mikrobiálních kmenů v hostitelích. V lidském těle převažují mikrobiální buňky ve střevním traktu svým počtem nad buňkami vlastního těla, ale složení infrastruktury mikrobiální komunity je většinou neznámé. [2]

Termín probiotika je odvozen z řeckého výrazu „pro-život“. Definice probiotik byla několikrát pozměněna v důsledku nových poznatků a získaných vědomostí. Jednou z prvních definic těchto mikroorganismů (MO) je definice Lillihho a Stillwella z roku 1965, kteří označují probiotika jako růstové faktory produkované mikroorganismy. Roku 1974 Parker poukázal na interakci MO s hostitelem a s tím související příznivé ovlivnění jeho intestinální mikroflóry. Dnes je všeobecně uznávaná definice Organizace pro výživu a zemědělství a Světové zdravotnické organizace (FAO/WHO,2001), která říká, že „probiotika jsou živé organismy, které při podání v dostatečném množství, přináší zdravotní výhody hostiteli,„ [4] Dle FAO/WHO probiotika používaná v potravinářských výrobcích musí splňovat několik požadavků. Musí být odolné vůči kyselému prostředí v žaludku a vůči žluči a být schopny se množit a kolonizovat trávicí trakt. Měly by být bezpečné pro uživatele a efektivně působit na jeho zdraví, přičemž tuto schopnost by si měly udržet po celou dobu trvanlivosti výrobku. [1]

2.2 Legislativní ustanovení a omezení

V roce 2008 byla Evropským parlamentem zavedena pravidla označování potravin, která ukládala, že na obalu musí být uvedeny informace o produktu zakládající se na důkazech zjištěných a prověřených vědeckou komunitou. [1] Současná regulační klasifikace probiotik však není zcela jasná z hlediska rozdělení probiotik do kategorií (léky, potraviny, doplňky stravy a zdravotní potraviny). [3]

V roce 2011 nahromaděné důkazy o prospěšných účincích probiotik a prebiotik vedly k vydání směrnic Světové gastroenterologické organizace (World Gastroenterology Organisation (WGO)) ohledně použití probiotik a prebiotik. Vydání těchto směrnic potvrdilo prospěšné účinky probiotik a prebiotik a navrhlo jejich využití v klinické praxi. Gastroenterologové považují probiotika za bezpečné pro všechny pacienty a doporučují jejich užívání po čas léčby antibiotiky. Komise pro tvorbu potravinových směrnic (Dietary Guidelines Advisory Committee) doporučila zařazení probiotik a prebiotik do jídelníčku každého jedince. Státy Evropské unie a americká Komise pro tvorbu potravinových směrnic zatím nevydaly žádná oficiální prohlášení ohledně užívání probiotik a prebiotik, nicméně různé zdravotnické organizace jejich konzumaci doporučují pro specifická onemocnění nebo jako součást stravy dětí. [3] Určitá legislativní omezení ohledně schvalování nových

probiotických výrobků však existují. Liší se v závislosti na regionu (USA, EU, Japonsko, Kanada) a tudíž i ve schvalovacím procesu a schvalovacích orgánech. [5]

2.3 Druhy probiotických kultur a jejich taxonomické zařazení

Probiotika jsou potenciálně prospěšné živé mikroorganismy, jejichž pozitivní vliv je doložen důkazy z klinických testů a analýz. Lze očekávat, že některé kmeny mikroorganismů, které nebyly přímo testovány, mohou mít také pozitivní účinky na zdraví, protože náleží do již dobře prozkoumaného druhu mikroorganismů, které již náležitě otestovány byly. Toto tvrzení je podporováno kontrolovanými studiemi s definovanými probiotiky a s fermentovanými mléčnými výrobky a výzkumem zabývajícím se mikroflórou lidského těla. [3]

Hlavními probiotickými mikroorganismy jsou bakterie mléčného kvašení náležející rodům *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*. Bifidobakterie jako první kolonizují trávicí trakt novorozence a stávají se tak dominantními bakteriemi střevní mikroflóry. Počet bifidobakteriálních buněk se snižuje s rostoucím věkem. Do tohoto rodu náleží asi 30 druhů, z toho 10 lidského původu a 17 živočišného. K jejich identifikaci se využívají metody PCR, DNA/RNA hybridizace, DNA sondy a gelová pulzní elektroforéza. Laktobacily se vyskytují přirozeně v gastrointestinálním traktu a v pohlavním ústrojí člověka. Bylo popsáno více než 70 druhů laktobacilů. Nejstudovanější z nich je *Lactobacillus acidophilus*. [2] Nejčastěji využívané a studované probiotické mikroorganismy jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Mikroorganismy nejčastěji využívané jako probiotika [1],[2]

Druhy rodu		Další druhy
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Saccharomyces boulardi</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. essensis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. laterosporus</i>	<i>Propionobacterium freudenreichii</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. reuteri</i>		<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. rhamnosus</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i>		
<i>L. farciminis</i>		
<i>L. plantarum</i>		

2.4 Využití probiotických kultur v potravinách a dalších výrobcích

Je obtížné zjistit, zda vybraný bakteriální kmen, který vykazuje benefiční vlastnosti vůči hostiteli, neztratí své vlastnosti v průběhu zpracování výrobku. Bakteriální kmen, který vykazuje příznivé účinky na hostitele, nemusí mít dobré technologické vlastnosti. Různé metody ochrany buňky jako je mikroenkapsulace nemusí vést k zachování vlastností bakterií.

V současné době jsou zaváděna regulační opatření pro výrobu probiotických výrobků, které mimo jiné udávají minimální počet živých buněk ve výrobku v době konzumace a upravují pravidla pro uznání probiotického kmene jako zdraví prospěšného. Platí, že probiotický kmen musí být testován nejméně ve dvou na sobě nezávislých klinických testech. Tato opatření komplikuje obvykle různé chování probiotických kmenů v závislosti na potravinové matici, ale také zákaz geneticky upravovat tyto kmeny za účelem zlepšení jejich vlastností.

V dnešní době je komerčně využíváno několik probiotických kmenů a jejich směsí. Základním požadavkem při jejich produkci a skladování je co největší počet nepoškozených buněk a stabilita probiotické kultury. Z tohoto důvodu se přechází od tekutých zmrazených koncentrátů k přípravkům, které jsou sušeny mrazem nebo rozprašováním (spray-drying). Při sušení rozprašováním je kultura zahřátá na vyšší teplotu a je zvýšeným tlakem rozprašována. Tato metoda je levnější, dochází však k poškození buněk. Oproti tomu při sušení mrazem se poškození buněk zabraňuje přidáním kryoprotektantů (laktóza, sacharóza), a proto je tato technika používanější. Většinu takto připravených kultur je možné přímo aplikovat ve výrobním procesu a je toho často využíváno hlavně při výrobě jogurtů. Kultury jsou zde aplikovány jako vysoce koncentrované zmrazené kultury (obsahují nejméně 10^{10} cfu \cdot g⁻¹ (cfu = kolonie tvořící jednotku (colony forming unit)) nebo kultury sušené mrazem (obsahují nejméně 10^{11} cfu \cdot g⁻¹). [2]

V poslední době převládají snahy přidávat probiotické kultury do různorodých potravinových matic. Nedávné studie provedené v USA prokázaly, že je možné přidávání probiotických kultur do potravinových maticí s vysokou nutriční hodnotou za účelem zmírnění podvýživy dětí v rozvojových zemích. Konkrétně bylo předmětem výzkumu arašídové máslo, do kterého byly přidány probiotické kultury. Bylo zjištěno, že obsah tuku v matici nemá vliv na přežití probiotických bakterií, ale se zvyšující se teplotou množství životaschopných buněk výrazně ubývá. Jako nejvhodnější probiotický kmen byl shledán rod *Bifidobacterium*, jelikož prokázal v dané matici největší životaschopnost. [6] Navazující výzkum potvrdil lepší viabilitu rodu *Bifidobacterium* oproti rodu *Lactobacillus* také v simulovaných gastrointestinálních podmínkách lidského zažívacího traktu. Dále byla zkoumána protektivní vlastnost potravinové matrice arašídového másla a arašídového másla se sníženým obsahem tuku. Obě potraviny byly shledány jako velmi vhodné matrice, které ochránily bakteriální buňky před žaludečními šťávami, enzymy i před žlučí. U plnotučného arašídového másla byla tato protektivní vlastnost přisouzena tuku. U arašídového másla se sníženým obsahem tuku byly tyto protektivní vlastnosti způsobeny vyšším obsahem bílkovin, které byly schopny ochránit bakterie zejména proti kyselým podmínkám v žaludku. [7]

2.4.1 Potravinové matrice využitelné pro uchování probiotických bakterií

Tradiční matricí pro probiotické bakterie jsou mléčné výrobky, zejména jogurty. Na trh se v poslední době dostává celá řada „nových“ probiotických výrobků, které jako potravinovou matici využívají např. čokoládu, cereálie, energetické tyčinky a žvýkačky. Rozšíření sortimentu probiotických výrobků je způsobeno snahou o zpřístupnění probiotických výrobků lidem, kteří trpí intolerancí vůči laktóze a jiným alergenům. Výzkum a produkci nových výrobků komplikuje fakt, že nelze zaručit příznivé účinky probiotického kmenu obsaženého v potravinové matrici na hostitele obecně. Určitý probiotický kmen obsažený v matrici sýru nevykazuje stejné vlastnosti například v matrici čokolády. Přežití buněk v potravinové matrici je ovlivněno pH, přítomností kyslíku nebo konzistencí a strukturou matrice. Nelze také použít ověřené kultury probiotických bakterií obsažené v jogurtech z důvodu jejich nízké viability v odlišné potravinové matrici. [8] Probiotika se přidávají do mléčných výrobků (mléko, sýry) i pro zlepšení a získání nových vlastností (zdravotní benefity, chuť, technologické vlastnosti). Je nutné volit správnou kombinaci probiotických bakterií a v mléčných výrobcích běžně se vyskytujících mléčných bakterií. Nesprávná kombinace mikroorganismů nepříznivě ovlivňuje organoleptické vlastnosti výrobku a dochází ke vzájemné inhibici růstu probiotických a původních mléčných kultur. [9]

Také ovoce a zelenina jsou, z hlediska obsahu vitamínů, minerálů, antioxidantů a vlákniny, vhodným substrátem pro probiotické bakterie. Jejich výhodou je rozmanitost a zejména nulový výskyt alergenů obsažených v mléce. Avšak po přidání probiotických kultur byla zjištěna nepříjemná chuť (kyselá, slaná) a vůně (mléčná). Jako matrice byly testovány banány, džusy (pomerančový, ananasový, brusinkový), olivy, rajčata, kokosové mléko, mrkvová šťáva a další. Obecně lepší viabilita probiotik byla zjištěna v matricích s nižším pH. V průběhu fermentace došlo ještě k jeho snížení v důsledku produkce organických kyselin (octová a mléčná) probiotickými bakteriemi a tím k potlačení výskytu patogenních bakterií.

Z hlediska obsahu látek jsou, stejně jako ovoce a zelenina, ideální matricí pro růst některých druhů probiotických bakterií také obilná zrna. V některých zemích jako je např. Bulharsko, se vyrábí tradiční nápoj z fermentovaného obilí a i v jiných zemích se přidávají obiloviny do mléčných výrobků určených k fermentaci (Tarhana a Kishk). V poslední době proto převažuje snaha o výrobu probiotických obilných výrobků z melasy, která se zdá být velice vhodným substrátem, ale také z ovsa, ze kterého se vyrábí druh jogurtu bez obsahu mléka přidáním kultury *Lactobacillus rhamnosus*. I kukuřice byla shledána příhodným substrátem pro fermentaci, při které vzniká ovocná chuť typická pro Mexickou kuchyni. Kukuřice je také tradičně využívána pro výrobu Ogi, jedná se o západoafrické jídlo ze zkvašené kukuřice, prosa a čiroku. Přírodním zdrojem probiotik je také balkánský alkoholický nápoj Boza. Pro výrobu sójového sýra pomocí kultury *Lactobacillus rhamnosus*, která nevykazuje negativní účinky na sensorické vlastnosti výrobku, je jako substrát používáno sójové mléko. [8] V jiné studii zabývající se obilovinami (konkrétně ječmenem a ječmenným sladem) jako vhodnou potravinovou matricí pro výrobu nápojů, byl potvrzen prokazatelný účinek probiotických bakterií na inhibici růstu gramnegativních bakterií v surovině už v průběhu fermentace. K tomuto efektu došlo díky produkci kyseliny mléčné, což vedlo

k výraznému snížení pH a tím byly vytvořeny nevhodné podmínky pro růst patogenních bakterií. Bylo zjištěno, že různé druhy bakterií mléčného kvašení použité při fermentaci ovlivňují výsledné organoleptické vlastnosti produktu stejně jako volba vhodného substrátu. Nejvhodnějším substrátem byl shledán slad, který byl z hlediska obsahu vhodných sacharidů a dalších látek pro bakterie nejlépe využitelný. Při inokulaci média více druhů bakterií souběžně, docházelo i k vzájemné reakci produktů jejich metabolitů a dalšímu vzájemnému ovlivňování. Z tohoto důvodu je nutný další výzkum, aby byla nalezena správná kombinace substrátu a bakteriálního druhu pro dosažení co nejlepších organoleptických vlastností výsledného produktu. [10]

Výbornou potravinovou maticí pro dopravu probiotických bakterií trávicím traktem hostitele je maso. Jako substrát chrání probiotické bakterie před účinky žluči v trávicím traktu. Obecně je největší pozornost věnována fermentovaným salámům, které nejsou dále tepelně upravovány. Původní směs bakterií, která sloužila k fermentaci, je obohacována kmeny *Lactobacillů* a *Bifidobakterií* za účelem získání lepších chuťových vlastností a zdraví prospěšných výrobků. Problémem je však udržení probiotických bakterií obsažených v substrátu naživu i po fermentaci. Řešením je použití kmenů schopných enkapsulace, ovšem nevýhodou je snížení inhibičních účinků vůči patogenům. Inspirací k vyřešení tohoto problému by mohly být skandinávské fermentované salámy nebo tradiční indiánské fermentované pokrmy z ryb (Ngari, Hentak, Tungtap). [8]

Jako další potravinová matrice byla z hlediska vhodnosti pro probiotické bakterie testována mléčná i tmavá čokoláda. Bylo zjištěno, že kakaové máslo obsažené v čokoládě působí jako ochrana probiotických bakterií v horní části trávicího traktu. Byla prokázána i větší viabilita bakteriálních buněk při průchodu trávicím traktem oproti mléčné matrici. Stabilita životaschopných bakterií byla velmi dobrá i v průběhu skladování. Tmavá čokoláda byla shledána méně vhodnou, a to z hlediska vyššího obsahu polyfenolyckých látek, které působí antimikrobiálně. Probiotické kmeny kolonizovaly střevní sliznici asi po třech týdnech podávání, ale tato změna byla dočasná. Jednalo se o testy pomocí simulátoru SHIME (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem). [11]

Zmrzlina se těší všeobecné popularitě napříč všemi věkovými skupinami, proto se nejnovější vědecké práce z oblasti probiotik, prebiotik a symbiotik zabývají jejím využitím, jako vhodné potravinové matrice pro přípravu probiotických, prebiotických a symbiotických mražených výrobků. Pro úspěšnou produkci je nutné optimalizovat výrobu, aby nebyly ovlivněny sensorické ani organoleptické vlastnosti zmrzlinové matrice. Bohužel bylo zjištěno, že produkty metabolismu probiotických bakterií způsobují neobvyklou chuť, která se v kombinaci s některými ovocnými příchutěmi výrazně zhoršuje. Problémem je též vzduch, který se vyskytuje ve zmrzlině po jejím vyšlehání a pomáhá vytvářet její typickou strukturu a vlastnosti. Většina probiotických bakterií je však anaerobní nebo mikroaerofilní a toto prostředí je pro ně nevyhovující. Nejvhodnějším řešením je proto využití bakteriálních kmenů, které jsou schopny mikroenkapsulace (např. *Lactobacillus casei*). [12] Studie zabývající se výzkumem vlastností probiotických, prebiotických a symbiotických zmrzlinových výrobků, shledala symbiotické výrobky nejvhodnějšími z hlediska

organoleptického (jsou sladší oproti stejnému výrobku bez přidání probiotických kultur a prebiotik) i sensorického. Jako vhodné probiotické kmeny byly testovány *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*, zatímco jako prebiotikum byl zvolen inulin. Inulin se běžně vyskytuje v ovoci a zelenině v podobě rozpustné fermentovatelné vlákniny. Jedná se o nestravitelný sacharid s prokázanými prebiotickými účinky. Přidaný inulin významně ovlivňuje sensorické vlastnosti zmrzliny, tyto změny však nejsou výrazné, když přidaného inulinu není více než 2,5 %. I přes nízký obsah inulinu se projevuje jeho kryoprotektivní efekt, kdy dochází k inhibici růstu krystalků ledu. Důležitým kritériem pro dosažení terapeutického účinku výrobku je inokulace potravinové matrice dostatečným množstvím bakteriálních buněk, aby jejich množství v době konzumace dosahovalo aspoň $10^6 - 10^9$ životaschopných buněk na denní dávku. Vhodnou denní dávkou je porce aspoň 80 g výrobku. Viabilita vybraných kmenů nebyla významně ovlivněna skladovací teplotou zmrzlinové matrice (-20°C). Přidané probiotické kultury ovlivnily chuť i vůni zmrzliny, změna se týkala také barvy výrobku a to obzvláště v případě symbiotické zmrzliny. [13]

Z hlediska obsahu polyfenolických látek, které mají antioxidační účinky v lidském organismu je významný zelený čaj. Jedná se o potravinovou matici, která sama o sobě vykazuje příznivý vliv na lidské zdraví. Zelený čaj byl zkoumán jako vhodná matrice pro probiotické bakterie, které byly přidány s cílem zlepšení zdravotních benefitů pro lidský organismus. Bylo zjištěno, že probiotické bakterie rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* jsou schopny přežít v extraktech ze zelených čajů a bylo pozorováno zvýšení antioxidačních vlastností tohoto extraktu oproti extraktu bez probiotik. [14]

2.5 Význam a účinky probiotik na zdraví člověka

Prospěšné účinky probiotik jsou zkoumány na základě testů *in vitro*. Pro uznání jejich prospěšných vlastností je však nutné provést *in vivo* testy a klinické studie následované dalšími metaanalýzami. Samotná účinnost probiotik je dána jejich interakcí se specifickými mikroorganismy a samotnou sliznicí gastrointestinálního (GI) traktu.

Během prvního roku lidského života dochází k velkým změnám a kolísání v mikrobiální kultuře nacházející se ve střevě. Ke konci prvního roku života dochází k ustálení a vzrůstá vliv mikrobů na fyziologii a imunitu hostitele. [2]

Důležité je působení probiotik proti patogenům v GI traktu. Probiotika stimulují imunitní systém střevní sliznice a pomáhají tak zlepšit vrozené funkce imunitních buněk a navýšit jejich počet. Napomáhají eliminaci patogenních organismů, produkují antimikrobiální látky, mění podmínky prostředí a pomáhají udržovat homeostázu prostředí jak u zdravých jedinců, tak především u jedinců s onemocněním GI traktu. V závislosti na druhu probiotického kmene se liší stimulace tvorby cytokininů, molekul zapojených do komunikace mezi lymfocyty a makrofágy. To může být spojeno s protizánětlivým a protirakovinným účinkem probiotik na hostitelský organismus. Směs probiotických kmenů VSL#3 (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbruneckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* a *Streptococcus thermophilus*) je schopna zvýšit sekreci mucinu a tím ovlivnit bariérní funkci střeva. [1]

Bakteriální kmen by měl být přirozeným obyvatelem intestinálního traktu hostitele a musí být schopen přežít kyselé prostředí žaludku a zásadité prostředí žluči v tenkém střevě, kolonizovat střevní sliznici a uchytit se na ní dostatečně pevně, aby nedošlo k jeho odstranění peristaltickými pohyby střeva. [2] Adhezivní vlastnosti probiotických bakterií souvisí s jejich schopností autoagregace. Probiotické bakterie se vážou na střevní sliznici přímou interakcí s epitelárními buňkami a tvoří tak bariéru, která zabraňuje kolonizaci sliznice patogenní mikroflórou. Antimikrobiální účinek souvisí také s produkcí inhibičních látek, jako jsou např. organické kyseliny (hlavně kyselina mléčná a octová), které významně snižují pH prostředí a činí ho tak nevhodným pro život jiných druhů bakterií (zejména gramnegativních patogenních bakterií). [8] Bylo však prokázáno, že probiotické kmeny se v gastrointestinálním traktu (GIT) zdržují jen několik týdnů, i přesto vykazují příznivý vliv na zdraví hostitele. Než se však probiotický kmen dostane do GIT, měl by být dostatečně odolný, aby přežil výrobní proces, zrání a skladování produktu. Nesmí však negativně ovlivnit kvalitu výrobku ani jeho chuť. Probiotický kmen musí být uznán jako bezpečný pro konzumaci a jeho přítomnost by měla mít prokazatelný účinek na zdraví hostitele.

Některé pozitivní účinky probiotik na zdraví již byly prozkoumány a potvrzeny klinickými testy. Ostatní potenciálně prospěšné účinky probiotik, které byly prokázány při testech na zvířatech, vykazují značný potenciál pro komerční využití, ale tyto kmeny nebyly dosud testovány klinickými testy. Způsob, jakým jsou schopny probiotika příznivě působit na zdravotní stav hostitele je specifický pro každý bakteriální kmen. [2] O efektivnosti a účinnosti probiotik a prebiotik nejlépe vypovídají klinické testy a následné meta-analýzy získaných dat. Data získaná náhodnými kontrolovanými testy jsou hodnotnější, poskytují-li informace o účincích probiotik a prebiotik na více různorodou populaci a s tím souvisejícími aspekty. Moderní klinické testy dodržují standardy klinické praxe. Tyto testy nám lépe osvětlují vztah mezi zdravím jedince a jídlem, které konzumuje, ale nezahrnují běžně pozorované zkreslující jevy. Jsou proto vyžadovány nové testy zaměřující se na prozkoumání těchto jevů. [3]

2.5.1 Crohnova choroba

Při léčbě Crohnovy choroby (CD) (chronické zánětlivé onemocnění střevní sliznice) se uplatnila směs VLS#3 společně s protizánětlivou látkou mesalasinem, v důsledku jejichž působení došlo k potlačení recidivy choroby po operačním zákroku. Podobné účinky byly pozorovány i při užívání *Lactobacillus rhamnosus*. Nicméně při testování dalších kmenů nebylo dosaženo významných zlepšení při léčbě CD. Příčina zřejmě spočívá v nedostatečném pochopení interakcí probiotik se střevní sliznicí. Jsou proto vyžadovány další testy *in vivo*, *in vitro* i klinické testy pro úplné porozumění mechanismu působení probiotik na sliznici poškozenou CD. [1]

2.5.2 Syndrom dráždivého tračníku

Syndrom dráždivého tračníku (irritable bowel syndrome, IBS) je jednou z nejčastěji diagnostikovaných poruch gastrointestinálního traktu. Je charakterizován bolestí břicha, nepravidelným vyprazdňováním a případnou zácpou či průjmem. Faktory vzniku této nemoci

jsou jak psychologické, tak i fyziologické. Jedná se zejména o změnu střevní peristaltiky, nerovnováhu neurotransmiterů neboli nízkomolekulárních chemických látek vznikajících v nervové soustavě a infekci.

Při léčbě tohoto syndromu byly zaznamenány příznivé výsledky při použití bakteriálních kultur *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus acidophilus*. Bylo také zjištěno, že kombinace více probiotických kmenů lépe a rychleji pomáhá odstranit potíže při IBS. Při klinických testech byly porovnávány účinky probiotik a placebo na dvě testované skupiny lidí. Skupina, které byly podávány probiotika vykazovala vůči skupině s placebem zlepšení některých symptomů, jako jsou bolesti břicha a úleva od průjmu nebo zácpy. Oproti tomu frekvence stolice a konzistence se mezi skupinami nelišila.

Směs VSL#3 je s úspěchem využívána při léčbě nemoci dráždivého tračníku, podporuje produkci cytokinu interleukin 10, který inhibuje zánětlivou reakci ve střevě. [1]

2.5.3 Průjmová onemocnění

Při léčbě průjmových onemocnění vyvolaných léčbou antibiotiky bylo dosaženo zlepšení při podání *Saccharomyces boulardii* a *Lactobacillus rhamnosus*. Kmeny *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* vykazovaly příznivý účinek na zmírnění průjmu vyvolaného patogenem *Clostridium difficile*. [1]

Akutní průjmová onemocnění u dětí jsou způsobována zejména rotaviry, které jsou přenášeny fekálně – orální cestou. Rotaviry napadají buňky epitelu střevní stěny a tím rozrušují sliznici a snižují její propustnost. Grandy a kolektiv autorů [15] ve své práci uvádějí, že působením kvasinky *Saccharomyces boulardii* došlo k významnému zkrácení doby trvání průjmového onemocnění (v průměru o jeden den). Jiné probiotické kmeny se neosvědčily. Významným faktorem úspěšné léčby průjmových onemocnění je správné stanovení minimální dávky probiotik, která vykazuje příznivé účinky na zdraví. U pediatrických pacientů s rotavirovým onemocněním bylo jako účinné množství stanoveno $6 \cdot 10^8$ CFU, podávané po dobu 3 dnů. [15] V indické studii, v jejímž průběhu byla podávána mnohem menší dávka, $6 \cdot 10^7$ CFU dvakrát denně, nebylo pozorováno zlepšení průběhu onemocnění. [1] [16]

2.5.4 Další onemocnění trávicího traktu

Pozitivní účinky probiotik byly zaznamenány i při léčbě ulcerózní kolitidy (chronické onemocnění střevní sliznice) a pouchitidy (zánět ileo – pouche (neo – rekta)) při srovnání s léčbou pomocí placebo. [1] U pacientů trpících nekrotizující enterokolitidou (akutní zánětlivé onemocnění diagnostikované u nedonošených dětí) pomáhá podávání probiotických druhů *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium infantis*. V důsledku podávání probiotik došlo u předčasně porozených dětí ke snížení výskytu tohoto onemocnění a úmrtnosti. [2]

Bylo zjištěno, že probiotické bakterie pomáhají zmírnit zánět a omezit populaci *Helicobacter Pylori*. Gram – negativní bakterie *Helicobacter pylori* je příležitostný patogen

vyskytující se v lidském těle, který za vhodných podmínek způsobuje tvorbu žaludečních vředů. [17]

Nedávné studie se věnovaly možnosti využití imunomodulačních vlastností probiotických bakterií pro potlačení či úplné zamezení uchycení parazitů rodu *Plasmodium*, které způsobují onemocnění malárií v lidském organismu. Výsledky ukazují, že podávání probiotik může sloužit jako prevence vzniku tohoto onemocnění. Byla potvrzena zvýšená imunitní odpověď vůči parazitům a zamezení nákazy. [18]

2.5.5 Diabetes a kardiovaskulární onemocnění

Nově objevující se důkazy naznačují, že probiotika a prebiotika svým působením na lidské zdraví mohou zmírnit projevy diabetes mellitus typu 2 a příznivě působí na kardiovaskulární systém například při prevenci infarktu myokardu. Nicméně pro potvrzení těchto závěrů jsou nutné klinické testy a navazující doplňkové testy pro ověření v reálných podmínkách. [3]

2.5.6 Další onemocnění

Probiotika prospěšně působí na pacienty s intolerancí vůči laktóze neboli částečné či úplné neschopnosti trávicího traktu zpracovávat laktózu (mléčný cukr), produkcí α – galaktosidazy. Významně se uplatňuje především kmen *Lactobacillus acidophilus*. [2] Dalším mikroorganismem, který byl za tímto účelem studován je *Streptococcus thermophilus*, v jeho případě jsou však nutné další studie. [1]

Byly prokázány antikarcinogenní účinky probiotik. Některé kmeny např. *L. rhamnosus* GG jsou schopny potlačit aktivitu enzymů přítomných ve stolici, které přeměňují prokarcinogenní látky na karcinogenní. Neméně důležitá je i jejich schopnost imunitní modulace. Probiotika působí na imunitní funkci těla přímo i nepřímo ovlivňováním jednotlivých imunoglobulinů nebo nespecifické imunity.

Neméně důležitá je i léčba dermatitidy u dětí pomocí probiotik. Ta prokázala pozitivní účinek na snížení produkce zánětlivých cytokinů a bylo pozorováno značné zlepšení symptomů dermatitidy. [2] Norská studie prokázala, že při podávání probiotického mléka dětem a těhotným ženám se v pozdějším věku snížil výskyt atopického exému a alergické rýmy. [19]

2.6 Prebiotika

2.6.1 Definice prebiotik

Prebiotika byla Gibsonem a Robertfroidem definována jako „nestravitelné složky potravy, které pozitivně ovlivňují hostitele selektivní stimulací růstu a/nebo aktivity jednoho nebo limitovaného počtu probiotických bakteriálních druhů přítomných ve střevě hostitele“. Všechna dosud popsaná prebiotika jsou sacharidy s krátkým řetězcem a různým stupněm polymerace (2-60 jednotek). Prebiotika nejsou stravitelná enzymatickým systémem lidí ani zvířat.

V roce 2007 byla upravena definice prebiotik z roku 1995 do znění „Prebiotika jsou selektivně fermentované složky, které umožňují určité změny ve složení a/nebo v aktivitě jedné nebo omezeného počtu bakterií obsažených ve střevě, a tím zlepšují zdraví hostitele.“

Nedávný výzkum prebiotických oligosacharidů a probiotických bakterií vedl k vytvoření kombinovaných potravinových výrobků tzv. symbiotik. [1]

2.6.2 Vlastnosti prebiotik a proces jejich získávání

Prebiotika musí splňovat podmínky jejich definice a jejich příznivé vlastnosti musí být prokázány testy *in vitro* a *in vivo*. V posledních letech převládají snahy zařadit prebiotika mezi potraviny s prokázaným příznivým účinkem na zdraví. Většina dnes známých prebiotik je směsí nestravitelných oligosacharidů sestávajících z 3-10 monomerů. Od roku 1980 jsou používány pro úpravu vlastností potravin např. viskozity, bodu tuhnutí, barvy atd. Vykazují jisté výživové a zdravotní účinky jako jsou snížený výskyt zubních kazů, nižší kalorická hodnota a nižší glykemický index.

Prebiotické oligosacharidy se dají získat extrakcí z přírodních zdrojů, hydrolýzou polysacharidů nebo enzymatickou či chemickou syntézou z monosacharidů. Většinou jsou syntetizovány nebo izolovány z polysacharidů z rostlinných zdrojů nebo z řas a následně enzymaticky depolymerizovány za vzniku oligosacharidů jako jsou fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, isimaltooligosacharidy, xylooligosacharidy a další. Tímto procesem, za použití lyáz a hydroláz, se dnes získává největší množství oligosacharidů. Jako příklad lze uvést získávání maltooligosacharidů ze škrobu působením alfa-amylázami nebo získání fruktooligosacharidů hydrolýzou inulinu. Pro syntézu oligosacharidů z monosacharidů jsou lépe využitelné enzymaticky řízené reakce z hlediska jejich stereospecifity a regiospecifity, jako enzymy se využívají například transferázy a syntetasy. [1]

2.6.3 Význam a účinky prebiotik na zdraví člověka

Prebiotika zlepšují funkci střeva a jeho metabolismu, zvyšují expresi a mění složení mastných kyselin s krátkým řetězcem, zvyšují fekální hmotnost, snižují pH tlustého střeva a snižují obsah dusíkatých látek v konečných produktech metabolismu trávení. Zvyšují také sekreci vazebných enzymů a biomarkerů, které se využívají v metabolismu tuků a minerálních látek. V neposlední řadě také ovlivňují funkci imunitního systému. Prebiotika podporují růst bifidobakterií a laktobacilů a oproti tomu inhibují růst patogenních mikroorganismů, jako jsou kmeny rodu *Clostridium*, *Campylobacter*, *Enterobacterium* a *Salmonella*. To všechno vede k eliminaci potíží s nadýmáním, průjmem a nevolností. [20] Nicméně způsob, kterým prebiotika ovlivňují adhezi probiotických bakterií a inhibují růst patogenů, není zcela objasněn. V nedávné studii Dairy Research Institute v Praze bylo zjištěno, že prebiotika nepodporují růst všech probiotických bakterií, ale určitý druh prebiotik zlepšuje adhezivitu jen určité probiotické bakterie. Dokonce i bakterie, které přísluší do stejného rodu (např. *Bifidobacterium*) vykazují opačnou reakci na stejný druh prebiotik (u jedné je adhezivita zvýšena a u druhé naopak). Byla také měřena změna zeta potenciálu na povrchu bakteriálních buněk po přidání prebiotik. [21] Zeta potenciál je elektrický potenciál

mezifázové vrstvy mezi povrchem bakteriální buňky a prostředím, které ji obklopuje. Většina bakterií má při neutrálním pH záporný zeta potenciál, který je dán disociací kyselých skupin (karboxylové, fosfátové) přítomných na buněčném povrchu. Tento potenciál lze měřit elektroforeticky a je silně ovlivněn hodnotou pH a přítomností disociovatelných skupin na povrchu buňky. Při nízkých hodnotách zeta potenciálu dochází ke shlukování částic. [22] Byla pozorována změna tohoto potenciálu v závislosti na druhu použitých prebiotik. Pro určení, která prebiotika jsou vhodná pro zlepšení adhezivity daných probiotických bakterií je nutný další výzkum. [21]

Modulace střevní mikroflóry začíná již po narození. U kojených dětí, oproti dětem, které jsou krmeny náhradní výživou, převažují bifidobakterie. U dětí jejichž stravu tvořila náhradní výživa, byla zastoupena celá řada bakteriálních kmenů (bifidobakterie, bakteroidy, laktobacily, klostridie a streptokoci), ale žádný nepřevládal. Lze proto usuzovat, že oligosacharidy přítomné ve mléce jsou selektivně stimulační pro růst bifidobakterií. [20]

V roce 2003 Palframan, Gibson a Rastall představili tzv. prebiotický index (PI) (1), který udává efektivitu účinku prebiotik na zvýšení populace bifidobakterií a laktobacilů a omezení růstu patogenních organismů (*bakteroidy* a *klostridie*).

$$PI = \left(\frac{\text{Bif}}{\text{Total}} \right) + \left(\frac{\text{Lac}}{\text{Total}} \right) - \left(\frac{\text{Bac}}{\text{Total}} \right) - \left(\frac{\text{Clos}}{\text{Total}} \right) \quad (1)$$

Bif, Lac, Bac a Clos jsou počty bakterií jednotlivých rodů. Total je celkový počet bakterií. Kladná hodnota PI indikuje pozitivní účinek prebiotik na stimulaci mikroflóry, záporné číslo ukazuje, že prebiotika neměla žádný příznivý účinek. Výpočet PI však nezahrnuje množství zkonsumovaných prebiotik a je použitelný pouze u experimentů *in vitro*. Při testech *in vivo* lze počty jednotlivých bakteriálních rodů vyvodit pouze z fekálií. V roce 2007 byla Robertfroidem navržena upravená rovnice (2) pro testy *in vivo* vztažené na 1 g zkonsumovaných prebiotik.

$$PI = \frac{\left[\left(\frac{\text{CFU}}{\text{g}_{\text{fekálie}}} \right)_{\text{konec}} - \left(\frac{\text{CFU}}{\text{g}_{\text{fekálie}}} \right)_{\text{start}} \right]}{\text{dávka prebiotik}} \quad (2)$$

Dávka prebiotik udává množství gramů denně požitých prebiotik. Avšak na základě této rovnice nebyl nalezen vztah mezi množstvím zkonsumovaných prebiotik a jejich účinkem. [1]

2.6.3.1 Modulace imunitního systému

Bylo zjištěno, že prebiotika příznivě ovlivňují imunitní systém střevní sliznice, ale není dosud znám mechanismus rozpoznání prebiotik a následné imunitní reakce. Předpokládá se interakce prebiotik s vrozenými receptory umístěnými v plazmatické membráně makrofágů a dendritických buněk. Například inulin byl testován na potlačení zánětlivých procesů při onemocnění distální kolitidou a nápravu poškození střevní sliznice. Imunitní systém může být

také modulován nepřímo a to změnou zastoupení bakterií ve střevní mikroflóře, tyto bakterie pak stimulují imunitní buňky nebo tvorbu mucinu. Fermentují také prebiotickou vlákninu na mastné kyseliny, které způsobují změny v imunitním systému. [1]

2.6.3.2 *Prevence vniku karcinomu*

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které vznikají fermentací prebiotik, působí přímo nebo nepřímo proti šíření zánětu ve střevě, karcinogenezi, kolonizaci patogeny a ovlivňují enzymatickou aktivitu. Především butyrát (sůl kyseliny máselné) byl zkoumán z hlediska prevence vzniku karcinomu a jako látka inhibující množení rakovinných buněk premaligního a maligního typu. [1]

2.6.3.3 *Vliv prebiotik na metabolismus lipidů*

Prebiotika, především inulin, mají pozitivní vliv na metabolismus tuků v játrech. Ve většině klinických studií bylo prokázáno snížení LDL-cholesterolu (Low Density Lipoprotein), celkového cholesterolu a triacylglycerolu v krevním séru. [1]

2.6.3.4 *Vliv prebiotik na adsorpci minerálních látek*

Adolescentům je doporučována konzumace prebiotik inulinového typu v době dospívání, protože napomáhají absorpci vápníku a tím jsou lépe mineralizovány kosti. Zatím jsou testy spíše ve fázi testování na zvířatech. Jsou zkoumány především účinky kyseliny máselné, které napomáhá vstřebávání vápníku a hořčíku. Na zvířatech trpících chudokrevností je testován vliv prebiotik na regulaci transportérů železa. [1]

2.6.3.5 *Vliv prebiotik na regulaci hmotnosti*

Několik studií se zaměřuje na výzkum vlivu nestravitelných cukrů na regulaci tělesné váhy a s tím spojených metabolických poruch. Při výzkumech byl pozorován vliv prebiotik inulinového typu na snížení hmotnosti. Bylo zjištěno, že při každodenní konzumaci došlo ke snížení celkového obsahu tuku v těle, snížení celkové hmotnosti a snížení příjmu energie o 10 %. Snížení energetického příjmu je zřejmě způsobeno zvýšenou sekrecí hormonů indikujících sytost. Většina studií je však v počátečním stádiu. Je prováděno především testování na zvířatech a klinické studie zatím nejsou k dispozici. [1]

2.7 *Metody analýzy probiotik*

Analýza probiotických kmenů je realizována nejčastěji pomocí molekulárně diagnostických technik. Nejběžnější technikou je polymerázová řetězová reakce, která splňuje nároky na citlivost a přesnost stanovení.

2.7.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) jako molekulárně diagnostická metoda

Metoda PCR analýzy byla objevena v 80. letech 20. století. Našla, pro svoji vysokou citlivost, široké uplatnění nejen v identifikaci prebiotických bakterií a dalších MO, ale také při diagnostických vyšetřeních a při analýze GMO (Genetically Modified Organism).

Podstatou této metody je cyklicky se opakující syntéza vybraného úseku DNA. Primery (syntetické oligonukleotidy) se naváží na komplementární úseky denaturovaného DNA řetězce a dochází k syntéze nového řetězce DNA za katalýzy DNA–polymerázy. Tento proces je závislý na teplotě a opakuje se několikrát (až 35×) v cyklech sestávajících ze tří kroků. Za teploty 94°C dochází k tepelné denaturaci DNA, následným snížením teploty asi na 50 – 65°C se vytvoří vhodné podmínky na navázání primerů a samotná katalyzovaná syntéza nových řetězců DNA probíhá za teploty 65 – 75°C (Obrázek 1). Tento děj probíhá v termocykleru, kde se nastavuje program v závislosti na specifitě reakce. Výsledkem procesu je až 10^9 amplikonů (kopií) daného úseku DNA o definovaném počtu bází (bp). Takto naamplifikovaná DNA je nanášena na agarózový nebo polyakrylamidový gel. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 2. Většinou se však DNA–polymeráza, směs dNTP, PCR pufr s Mg^{2+} ionty, dodává společně ve formě směsného roztoku označovaného jako tzv. Master mix apod. [23]

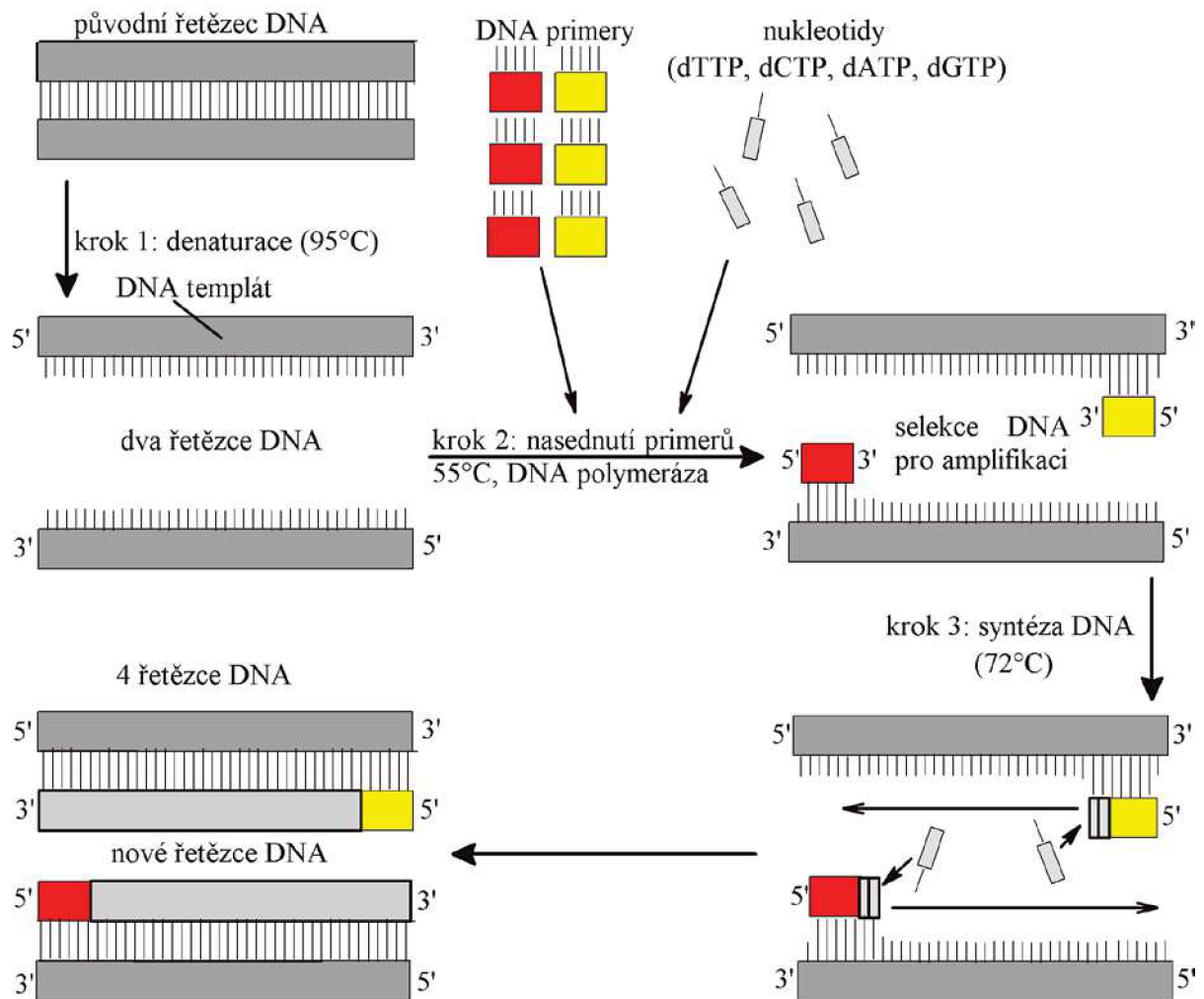
Tabulka 2: Složení reakční směsi pro PCR [23]

Matrice DNA (templát)	makromolekula DNA pro syntézu nových řetězců DNA
Oligonukleotidové primery	komplementární k templátu DNA, sekvenčně specifické, nesmí být vůči sobě komplementární, obsahují 18 – 30 nukleotidů
DNA–polymeráza	termostabilní izolovaná např. z <i>Thermus aquaticus</i> , syntetizuje novou DNA ve směru od 5' konce k 3'
3' deoxynukleosid –5'– trifostáty (dNTP)	stavební jednotky pro stavbu nové DNA
Ionty Mg^{2+}	nezbytné pro aktivitu DNA polymerázy, množství nutno optimalizovat pro každou kombinaci primerů a templátu
Pufr pro PCR	optimální prostředí pro DNA – polymerázu, obsahuje Tris – HCl, KCl a $MgCl_2$
Voda pro PCR	slouží k doředění objemu na vhodný objem, vhodná je voda o odporu 18 mΩ nebo voda pro injekce ČSL 4

Lze rozlišit dva základní druhy PCR analýzy, End-point PCR a real-time PCR neboli kvantitativní PCR (qPCR). V případě End-point PCR je k získání výsledků třeba produkty PCR nanést na gel a separovat elektroforeticky při stálém napětí. Dojde k odseparování DNA dle velikosti jejich řetězce. Na gel je nanesen i vhodný standard pro ověření zda se ve vzorku nachází požadovaná DNA o určeném počtu bp. [24]

Minimální kontaminace může způsobit falešně pozitivní výsledky, proto je nutno dodržet přísně sterilní podmínky. V případě reálných vzorků se může jednat i o kontaminaci

inhibitory PCR, jde např o Ca^{2+} ionty v mléčných výrobcích. [23] Falešně negativní výsledek můžeme obdržet v případě, kdy amplifikace nemohla být uskutečněna.



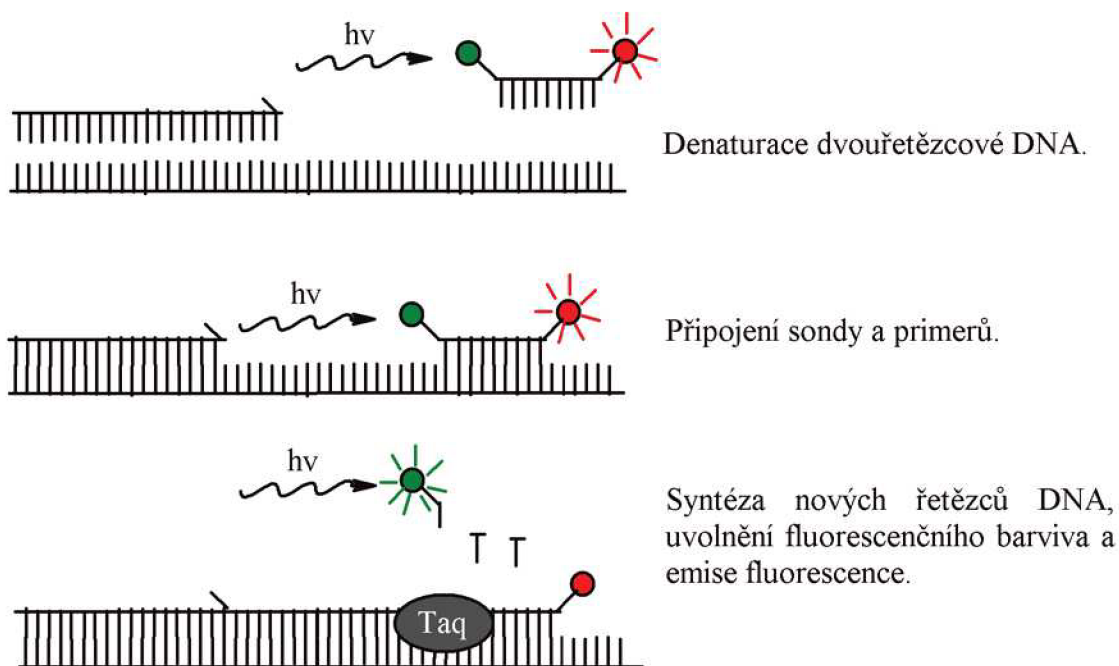
Obrázek 1: Amplifikace DNA metodou PCR (upraveno dle [25])

Real-time PCR vyžaduje přidání další složky, fluorescenčního barviva nebo fluorescenčně značené sondy (tzv. probe). Jedná se o jednořetězcovou DNA, která je složena asi z 30 bází. Ta je komplementární k části templátu DNA, která se nachází mezi primery. Na 5' – konec je chemicky navázán fluorochrom (fluorescenční barvivo), jehož fluorescenční signál je měřen každý amplifikační cyklus. Na 3' – konci je přítomen zhášec, neboli molekula, která pohlcuje fluorescenční záření, dokud je sonda navázána na templátu DNA. V průběhu amplifikace je sonda odbourána DNA – polymerázou a jednotlivé nukleotidy sondy jsou uvolněny (Obrázek 2). Záření fluorochromu přestane být pohlcováno zhášečem a emise fluorescence narůstá. Intenzita signálu je vždy úměrná množství DNA, která je v danou chvíli amplifikována.

Metoda qPCR umožňuje stanovení přesné koncentrace vzorku DNA pomocí interpolace kalibrační křivky standardů o známé koncentraci DNA. V tom spočívá hlavní rozdíl oproti End-point PCR, která je využitelná jen pro kvalitativní analýzu. Při použití metody real-time

PCR nejsou problémy s falešně pozitivními či negativními výsledky, „probe“ slouží jako vnitřní kontrola.

Levnější a méně přesnou variantou provedení qPCR je použití interkalačního barviva, které se váže na jakýkoli nově syntetizovaný řetězec DNA a takto navázané emituje fluorescenční záření. Intenzita fluorescenčního záření po navázání do dvouřetězce dsDNA je asi $1000 \times$ silnější než je tomu v případě nenavázané formy barviva. Intenzita emitované záření je detekována, přičemž interference je přímo úměrná množství naamplifikované DNA. [24] [26]



Obrázek 2: Real-time PCR s fluorescenčně značenou sondou (upraveno dle [26])

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat stručný přehled probiotických bakterií a probiotik, které se vyskytují nebo jsou přidávány do potravinářských i jiných výrobků. Jejich prospěšné účinky na zdraví hostitele a v neposlední řadě popis metodiky izolace bakteriální DNA z výrobku.

V experimentální části bakalářské práce byla provedena izolace veškeré bakteriální DNA v kvalitě vhodné pro PCR z vybraného probiotického doplňku stravy. Následně byla prokázána přítomnost probiotických bakteriálních kmenů ve výrobku, které byly deklarovány výrobcem na obalu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro provedená měření byly použity upravené postupy dle skript Španové a Ritticha (2010). [23]

4.1 Materiál

4.1.1 Použitý vzorek probiotického doplňku stravy

- Linex[®] Forte
Doplněk stravy
Tobolky
Výrobce: Lek Pharmaceuticals d.d.
1526 Ljubljana, Slovinsko
E-mail: info@lek.si
Dovozce: Sandoz s.r.o., Praha
E-mail: office.cz@sandoz.com
Šarže: EMO0889
Datum spotřeby: 07/2016
Složení (1 tobolka): 1×10^9 kolonií bakterií *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) a 1×10^9 kolonií bakterií *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (BB-12) ve formě lyofilizátu.
Pomocné látky: dextrosa, mikrokrytalická celulóza (E460), bramborový škrob, stearan hořečnatý (E470b), inulin, oligosacharidy.

4.1.2 Použité bakteriální kmeny pro pozitivní kontroly

Bakteriální DNA byla poskytnuta vedoucí práce Ing. Štěpánkou Trachtovou, Ph.D. Tato DNA byla izolována ze sbírkových kmenů získaných ze Sbírký mlékařských mikroorganismů v Táboře (Culture Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora (CCDM)) a Kolekce průmyslových organismů v Polsku (Centre of Industrial Microorganisms Collection (LOCK)). DNA byla izolována metodou fenolové extrakce a vyředěna na koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

- *Lactobacillus casei*
- *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* (CCDM 211/06)
- *Lactobacillus paracasei* (LOCK 0919)
- *Bifidobacterium brevis*

4.1.3 Přístroje a pomůcky

- Minicentrifuga SPECTRAFUGE MINI
- Centrifuga miniSpin plus $14\,500 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- NanoPhotometer (Implen, München, Německo)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New jersey, USA)

- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, New jersey, USA)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- MiniInkubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer PufferTM, Loughborough, UK)
- Zdrojelektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Transilluminátor TVR- 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermocycler MinicyclerTM (BIO-RAD Lab., USA)
- Inkubační box UVC/T-AR, DNA/RNA, UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)
- Exsikátor
- Laboratorní sklo
- Špičky z umělé hmoty
- Další laboratorní pomůcky (špachtle, lžička, buničina...)

4.1.4 Chemikálie

- Agarosa pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Nanášecí pufr Yeallow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA standard (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid ($5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Fluorescenční barvivo GoldView (Ecoli, Bratislava, SR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Polyethylen glykol (PEG 6000) (FLUKA BioChemika, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-báze (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) (Serva, Heidelberg, SRN)

4.1.5 Roztoky

- Lyzační pufr (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0 a $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ lysozymu)
- Tris-HCl (1M, Tris-báze ($121 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), destilovaná voda, koncentrovaná HCl pro úpravu pH)
- TE pufr (1M Tris-HCl (pH 7,8), 0,5M EDTA (pH 8) a destilovaná voda)

- CIZ (směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1)
- 0,5 × TBE pufr (Tris-base ($54 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), kyselina boritá ($27,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), destilovaná voda (980 ml) a 0,5 M EDTA (20 ml))

4.1.6 Komponenty pro PCR

- PPP Master mix (směs DNA-polymerasy, směs dNTP, PCR pufr s Mg^+ ionty) (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery specifické pro doménu *Bacteria* [27]
- Primery specifické pro rod *Lactobacillus* [27]
- Primery specifické pro rod *Bifidobacteria* (Pbi F1, Pbi R2) [28]

4.1.7 Magnetické nosiče

Pro izolaci DNA byly použity magnetické nosiče F-kol B 100 ox ($2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), které byly připraveny Ing. Danielem Horákem CSc. Na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze.

Vlastnosti těchto částic jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Vlastnosti magnetických polymerních nosičů

polymer	Fe [%hm]	průměr nosiče [μm]	PDI	Dn	Dw	-COOH [$\text{mM} \cdot \text{g}^{-1}$]
PGMA	5,36	0,70	1,16	0,70	0,81	0,67

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

4.2 Metody

4.2.1 Lyze bakteriálních buněk

- 1 tobolka výrobku byla sterilně odebrána a její obsah byl důkladně resuspendován ve 2 ml lyzačního pufru s lysozymem ($3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).
- Vzorek byl rozdělen do dvou Eppendorfových zkumavek (1,5 ml). Do každé byl napipetován objem 1 ml vzorku.
- Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě.
- K suspenzi vzorku bylo přidáno 100 μl 10% SDS a 50 μl proteinasy K ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).
- Vzorky byly inkubovány 1 hodinu v inkubátoru při teplotě 55°C .
- Vzorky byly uchovány v mrazáku při -20°C , aby nedošlo k degradaci DNA.

4.2.2 Fenolová extrakce bakteriální DNA

- K 500 μl lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu (předestilovaný, pH 7,8) a směs byla kývavým pohybem míchána 4 minuty. Po té byla směs centrifugována při $14\,500 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 5 minut.

- Byla odebrána vodní fáze s DNA do Eppendorfovy zkumavky a byla doplněna TE pufrem na objem 500 μl . Poté bylo přidáno 700 μl roztoku CIZ a směs byla promíchávána 4 minuty kývavým pohybem.
- Po centrifugaci směsi při 14 500 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 5 minut byla odebrána vodní fáze do čisté Eppendorfovy zkumavky.
- Extrakce byla provedena pro oba vzorky hrubého lyzátu buněk.

4.2.3 Srážení DNA etanolem

- Objem vzorku byl upraven TE pufrem na 400 μl , bylo přidáno 20 μl 3 M octanu sodného a roztok byl promíchán.
- Ke vzorku byl přidán 1 ml vychlazeného 96% ethanolu ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), směs byla promíchána a inkubována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut.
- Směs byla centrifugována při 14 500 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 15 minut. Po odlití supernatantu byl sediment vysušen v exsikátoru (15 minut) a byl rozpuštěn v 200 μl TE pufru. DNA byla uchovávána při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.4 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických mikročastic

- Separační směs použitá pro izolaci celkové DNA z hrubého lyzátu buněk pomocí magnetických mikročastic F-kol B 100ox byla namíchána v přesném pořadí dle Tabulky 4.

Tabulka 4: Separační směs

Krok	Složka	Objem [μl]
1	NaCl (5 M)	400
2	DNA (lyzát buněk)	100
3	PEG 6000 (40%)	400
4	Magnetický nosič ($2\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	100
celkem		1 000

- Výsledná koncentrace PEG 6000 je 16 % hm, NaCl 2 M.
- Směs všech složek v Eppendorfově zkumavce byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byla krátce stočena na minicentrifuze a umístěna do magnetického separátoru. Magnetické částice byly separovány 5 minut při laboratorní teplotě.
- Po odebrání supernatantu bylo do zkumavky přidáno 1 000 μl 70% ethanolu, vzorek byl promíchán a magnetické částice byly separovány pomocí magnetického separátoru. Ethanol byl odebrán a DNA navázaná na magnetické nosiče byla znovu několikrát promyta etanolem (70%, 500 μl).
- Zbýlý ethanol byl odpařen v exsikátoru a získaná DNA adsorbovaná na magnetické nosiče byla eluována do 50 μl TE pufru.
- Druhý den byly magnetické částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát obsahující DNA byl odebrán do čistých Eppendorfových zkumavek.

4.2.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA

- Pomocí přístroje NanoPhotometer byla proměřena absorbance izolované DNA v TE pufru proti čistému TE pufru. Bylo použito víčko lid 10, které je optimální pro koncentraci DNA ve vzorku 14 – 700 ng·μl⁻¹. Objem roztoku DNA použitého k měření byl 3 μl vzorku a optická dráha byla 1 nm.
- Absorbance byla proměřena pro vlnové délky 230 nm (minimum absorbance pro DNA), 260 nm (maximum absorbance pro DNA), 280 nm (maximum absorbance pro proteiny) a 320 nm .
- Z hodnoty absorbance pro 260 nm byla stanovena koncentrace DNA ve vzorku.
- Z hodnoty $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ byla určena čistota vzorku DNA. Ta by měla ideálně spadat do rozmezí 1,8–2,0.

4.2.6 Gelová elektroforéza bakteriální DNA

- Byl připraven 0,8% agarosový gel navážením 0,4 g agarosy a jejím rozpuštěním v 50 ml 0,5 × TBE pufru. Suspenze byla rozvařena v mikrovlnné troubě.
- Po vychladnutí na teplotu cca 60 °C byla suspenze promíchána a nalita do připravené formy.
- Gel byl ponechán 1,5 hodiny tuhnout a následně byl vyjmut hřebínek a do vzniklých komůrek byly nanášeny vzorky. Vzorky byly připraveny smícháním 15 μl vzorku DNA s 3 μl nanášecího pufru (6 × koncentrovaný, akridinová oranž).
- Byly naneseny dva vzorky DNA získané pomocí fenolové extrakce a dva získané pomocí magnetických nosičů.
- Stejným způsobem byla nanesena pozitivní kontrola bakteriální DNA kmene *Lactobacillus casei*.
- Gel byl vložen do elektroforetické vaničky a byl převrstven 0,5 × TBE puftrem do výšky asi 1 cm nad gel. Elektroforéza probíhala po dobu 1,5 hodiny při konstantním napětí 80 V.
- Po skončení elektroforézy byl gel umístěn do lázně s ethidiumbromidem (20 minut) a poté byl přemístěn na transiluminátor a byl vyhodnocen v UV světle při vlnové délce 305 nm.

4.2.7 PCR

- Všechny komponenty PCR byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce zcentrifugovány.
- Byla připravena směs pro PCR o celkovém objemu 25 μl.
- Pořadí, objemy a koncentrace komponent pro PCR byly použity v souladu s doporučením výrobce použitého PPP Master Mixu a jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Příprava směsi pro PCR

Krok	Komponenta	Objem [μl]
1	Voda pro PCR	9,5
2	PPP Master mix	12,5
3	Primer 1 ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	1,0
4	Primer 2 ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	1,0
5	Matrice DNA	1,0
Celkem		25,0

- Jako DNA matrice byla použita purifikovaná DNA jednotlivých vzorků, zředěná na koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Byly použity dva vzorky DNA izolované pomocí magnetických nosičů a dva vzorky izolované pomocí fenolové extrakce. Do reakční směsi byla DNA přidávána jako poslední.
- Analogicky byla připravena negativní kontrola (kontrola kontaminace komponent), matrice DNA byla nahrazena stejným množstvím vody pro PCR.
- Stejným postupem byla připravena pozitivní kontrola (kontrola preciznosti práce), v pátém kroku byla DNA matrice nahrazena stejným množstvím DNA izolované z čistých bakteriálních kultur o koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. V případě PCR specifické pro doménu *Bacteria* se jednalo o kulturu *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06, v PCR specifické pro rod *Lactobacillus* o kulturu *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919 a v PCR specifické pro rod *Bifidobacterium* o kulturu *Bifidobacterium brevis*.

4.2.7.1 PCR primery

- Pro přípravu PCR směsi byly použity primery specifické pro doménu *Bacteria* (F_eub, R_eub) [27], pro rod *Lactobacillus* (F_all lact, R_all lact) [27] a pro rod *Bifidobacterium* (Pbi F1, Pbi R2). [28]
- Sekvence primerů specifických pro doménu *Bacteria* jsou uvedeny v Tabulce 6, pro rod *Lactobacillus* v Tabulce 7 a pro rod *Bifidobacterium* v Tabulce 8.

Tabulka 6: Specifické primery pro doménu *Bacteria* [27]

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

Tabulka 7: Specifické primery pro rod *Lactobacillus* [27]

Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR
F_alllact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92 bp
R_alllact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT	

Tabulka 8: Specifické primery pro rod *Bifidobacterium* [28]

Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR
Pbi F1	CCG GAA TAG CTC C	914 bp
Pbi R2	GAC CAT GCA CCA CCT GTG AA	

4.2.7.2 PCR programy

- Byla provedena amplifikace izolované DNA při různých teplotních programech v závislosti na použitých primerech
- Teplotní program pro doménu *Bacteria* je uveden v Tabulce 9, pro rod *Lactobacillus* v Tabulce 10 a pro rod *Bifidobacteria* v Tabulce 11.

Tabulka 9: Teplotní program pro doménu *Bacteria* [27]

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
95 °C/5 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
30 cyklů				

Tabulka 10: Teplotní program pro rod *Lactobacillus* [27]

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
95 °C/5 min	94 °C/30 s	58 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
30 cyklů				

Tabulka 11: Teplotní program pro rod *Bifidobacterium* [28]

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
94 °C/5 min	94 °C/1 min	50 °C/1 min	72 °C/2 min	72 °C/5 min
30 cyklů				

4.2.7.3 Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů

- Byl připraven 1,6% agarosový gel pro PCR produkty amplifikované pomocí primerů specifických pro doménu *Bacteria* [27], 1,5% pro PCR produkty specifické pro rod *Lactobacillus* [27] a 2% pro PCR produkty specifické pro rod *Bifidobacterium* [28]. A to navážením 0,8 g (resp. 0,75 g; 1 g) agarosy a jejím rozpuštěním v 50 ml 0,5 × TBE pufru. Suspenze byla rozvařena v mikrovlnné troubě.
- Po vychladnutí na teplotu cca 60 °C byla suspenze promíchána (bylo přidáno fluorescenční barvivo GoldView (5 µl barviva/100 ml) a nalita do připravené formy.
- Gel byl ponechán 1 hodinu tuhnout a následně byl vyjmut hřebínek a do vzniklých komůrek byly nanášeny vzorky obsahující nanášecí pufr (6 × koncentrovaný).
- Byly naneseny dva vzorky DNA získané pomocí fenolové extrakce a dva získané pomocí magnetických nosičů, do jedné z komůrek byl nanesen standard (100 bp) o objemu 5 µl (dle doporučení výrobce).
- Gel byl vložen do elektroforetické vaničky a byl převrstven 0,5 × TBE pufrům do výšky asi 1 cm nad gel. Elektroforéza probíhala po dobu 1,5 hodiny při konstantním napětí 80 V.
- Po skončení elektroforézy byl gel přemístěn na transiluminátor a byl vyhodnocen v UV světle při vlnové délce 305 nm. Popřípadě byl gel dobarven v lázni s ethidiumbromidem.

5 VÝSLEDKY

5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA

- Spektrofotometricky na přístroji NanoPhotometer (Implen) byla v rozmezí vlnových délek 220 – 320 nm proměřena absorbance vzorků DNA izolovaných z výrobku Linex[®] Forte. Výsledky stanovení jsou uvedeny v Tabulce 12 a v Tabulce 13.

Tabulka 12: Spektrofotometrické stanovení DNA izolované metodou fenolové extrakce

	Vzorek 1	Vzorek 2
Koncentrace [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	409	388
$A_{230 \text{ nm}}$	0,534	0,668
$A_{260 \text{ nm}}$	0,825	0,840
$A_{280 \text{ nm}}$	0,394	0,441
$A_{320 \text{ nm}}$	0,007	0,065
$A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$	2,114	2,061
$A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$	1,552	1,285

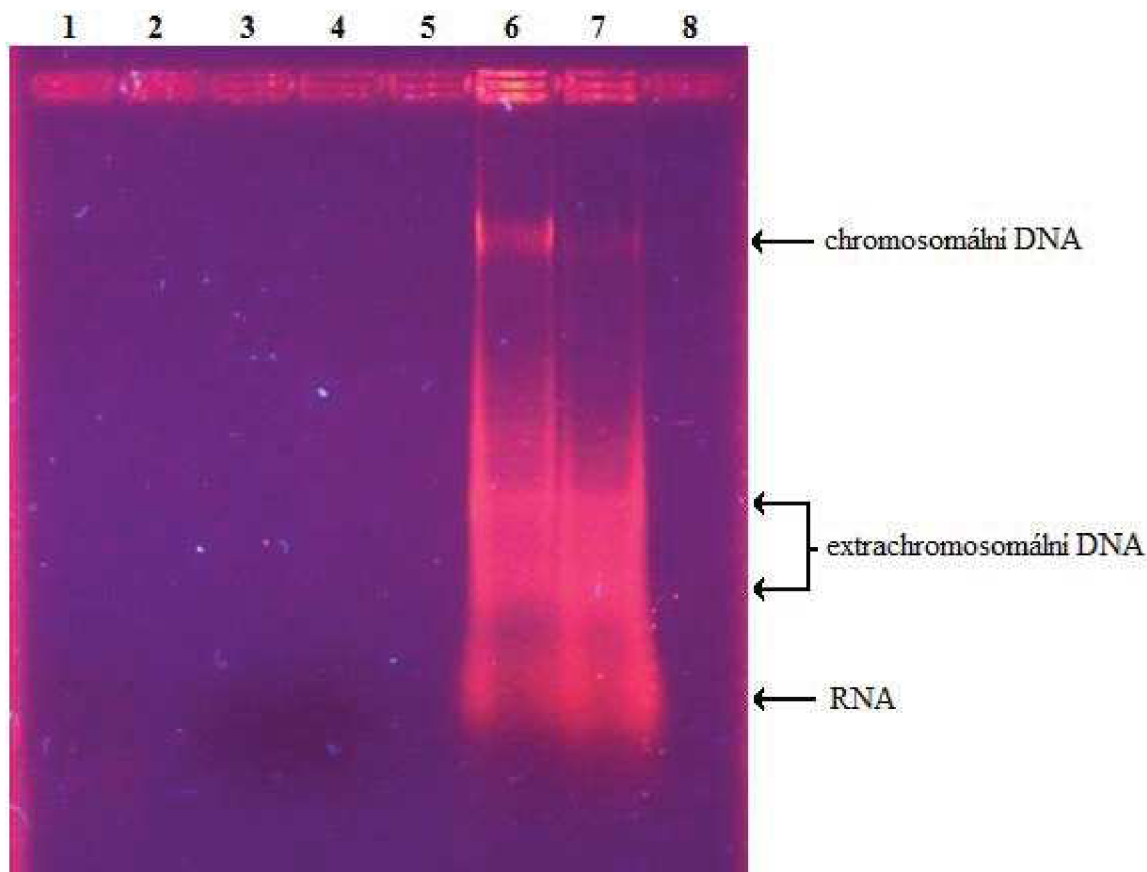
Tabulka 13: Spektrofotometrické stanovení DNA izolované magnetickými nosiči F-kol B 100 ox

	Vzorek 1	Vzorek 2
Koncentrace [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	44,5	20,5
$A_{230 \text{ nm}}$	0,142	0,056
$A_{260 \text{ nm}}$	0,120	0,054
$A_{280 \text{ nm}}$	0,089	0,040
$A_{320 \text{ nm}}$	0,031	0,013
$A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$	1,534	1,519
$A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$	0,802	0,953

Spektrofotometricky byla prokázána přítomnost DNA a byla změřena její koncentrace.

5.2 Gelová elektroforéza bakteriální DNA

- Přítomnost bakteriální DNA byla ověřena agarosovou gelovou elektroforézou (Obrázek 3). Schéma nanesení DNA izolované z výrobku Linex[®] Forte a z kultury *Lactobacillus casei* je uvedeno v Tabulce 14.



Obrázek 3: Agarosová gelová elektroforéza bakteriální DNA

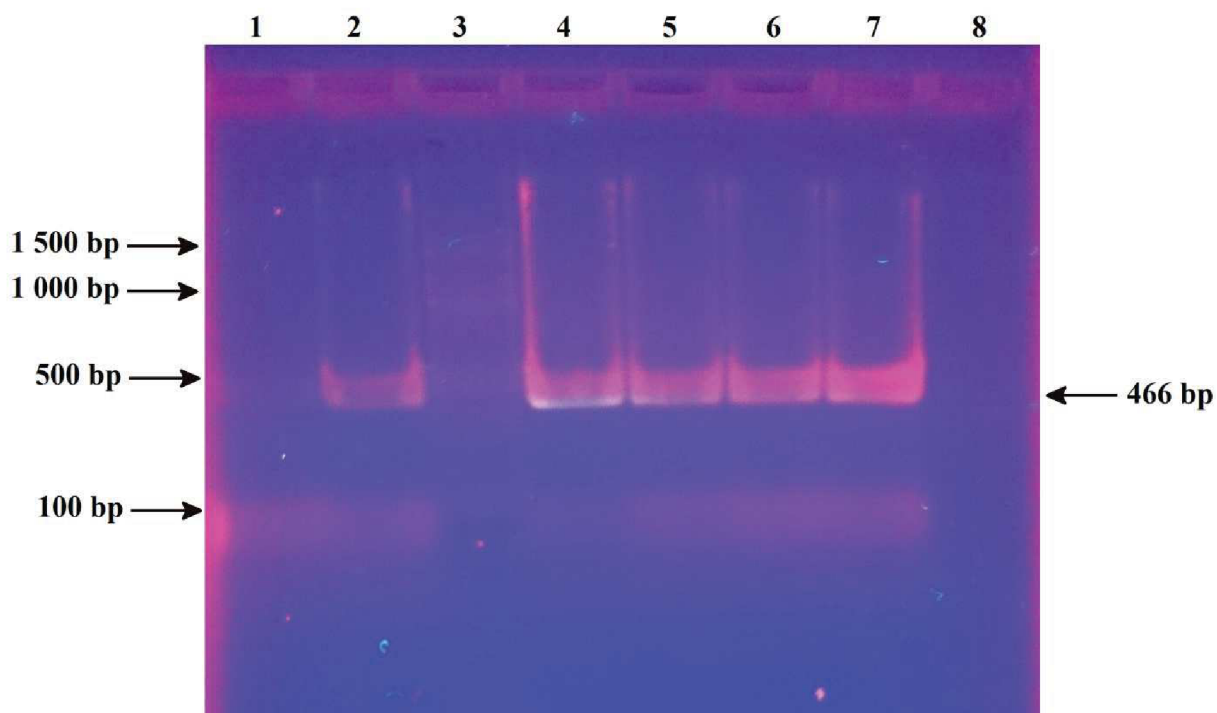
Tabulka 14: Schéma nanesení vzorků na gel

Běh 1	pozitivní kontrola (DNA <i>Lactobacillus casei</i> , 10 ng·μl ⁻¹)
Běh 3	DNA izolovaná magnetickými nosiči
Běh 4	DNA izolovaná magnetickými nosiči
Běh 6	DNA izolovaná fenolovou extrakcí
Běh 7	DNA izolovaná fenolovou extrakcí

Agarosovou gelovou elektroforézou byla prokázána přítomnost chromosomální a extrachromosomální DNA a RNA ve vzorcích izolované DNA.

5.3 Prokázání přítomnosti DNA bakterií domény *Bacteria* metodou PCR

Přítomnost bakteriální DNA domény *Bacteria* byla dokázána pomocí primerů specifických pro tuto doménu. [27] Velikost specifických produktů PCR byla 466 bp (base pair). Výsledný gel je uveden na Obrázku 4. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v Tabulce 15.



Obrázek 4: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro doménu *Bacteria* [27]

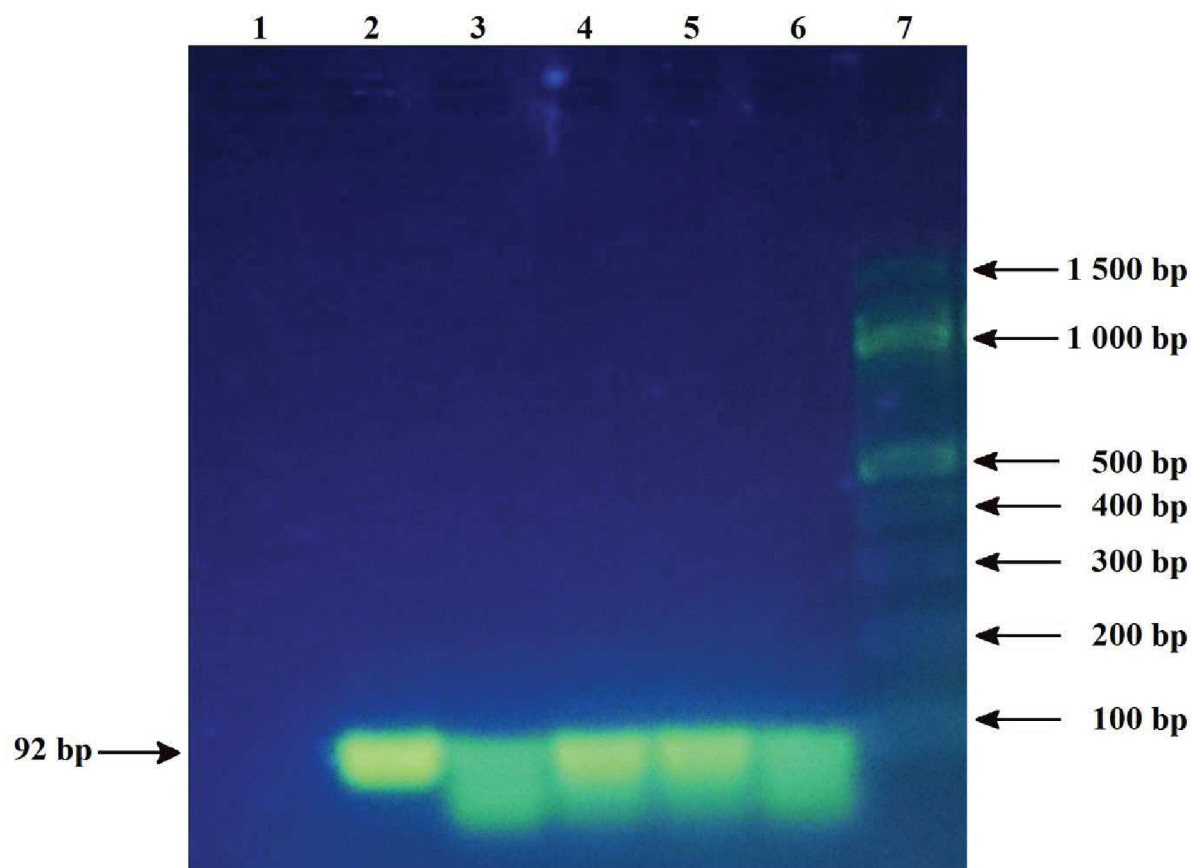
Tabulka 15: Schéma nanesení vzorků na agarózový gel PCR specifické pro doménu *Bacteria*

Běh 1	negativní kontrola
Běh 2	pozitivní kontrola (DNA <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211/06, 10 ng·μl ⁻¹)
Běh 3	DNA standard 100 bp
Běh 4	DNA izolovaná fenolovou extrakcí
Běh 5	DNA izolovaná fenolovou extrakcí
Běh 6	DNA izolovaná magnetickými nosiči
Běh 7	DNA izolovaná magnetickými nosiči

Ve všech vzorcích byla pomocí PCR specifické pro doménu *Bacteria* [27] prokázána přítomnost bakteriální DNA.

5.4 Prokázání přítomnosti DNA bakterií rodu *Lactobacillus* metodou PCR

Přítomnost bakteriální DNA rodu *Lactobacillus* byla ověřena pomocí primerů specifických pro tento rod. [27] Byly amplifikovány úseky DNA o délce 92 bp. Snímek agarózového gelu s nanesenými produkty PCR je uveden na Obrázku 5. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v Tabulce 16.



Obrázek 5: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus* [27]

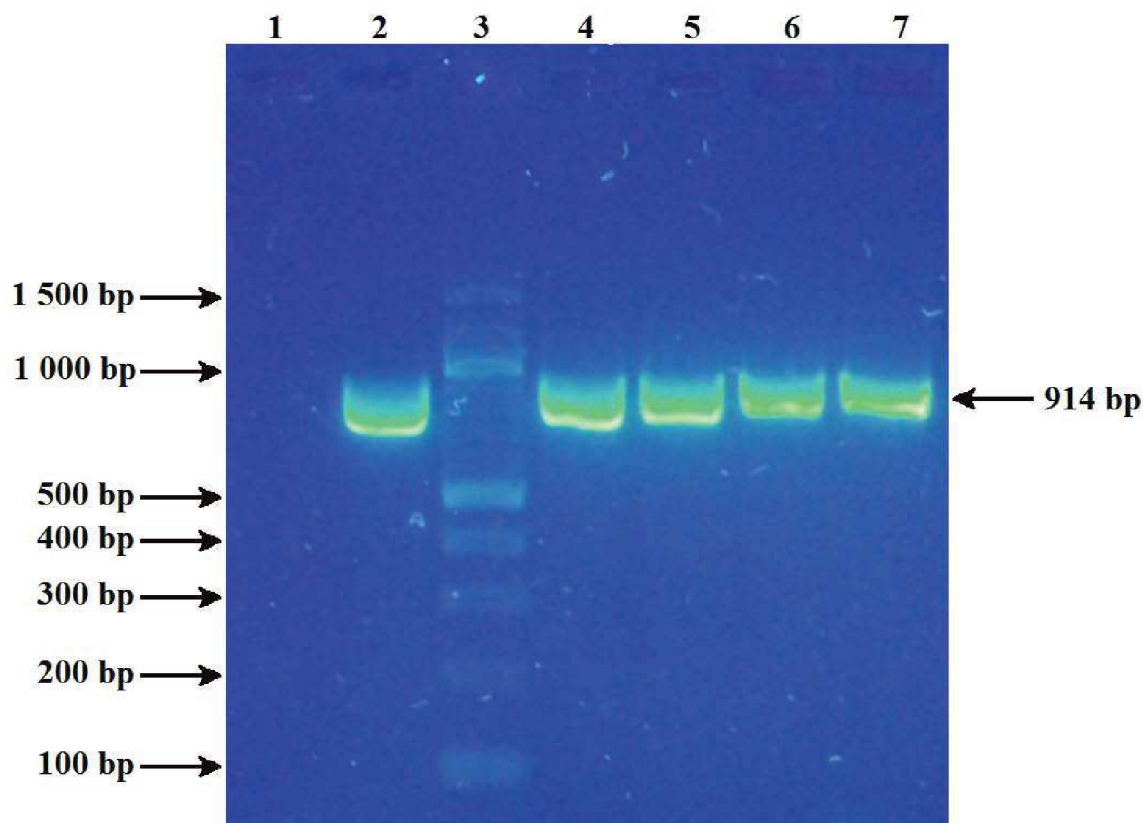
Tabulka 16: Schéma nanesení vzorků na agarózový gel PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus*

Běh 1	negativní kontrola
Běh 2	pozitivní kontrola (DNA <i>Lactobacillus paracasei</i> LOCK 0919, 10 ng·μl ⁻¹)
Běh 3	DNA standard 100 bp
Běh 4	DNA izolovaná fenolovou extrakcí
Běh 5	DNA izolovaná fenolovou extrakcí
Běh 6	DNA izolovaná magnetickými nosiči
Běh 7	DNA izolovaná magnetickými nosiči

Agarósovou gelovou elektroforézou byla prokázána přítomnost PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus* [27] ve všech vzorcích nanesené DNA.

5.5 Prokázání přítomnosti DNA bakterií rodu *Bifidobacterium* metodou PCR

- Přítomnost bakteriální DNA rodu *Bifidobacterium* byla dokázána pomocí primerů specifických pro tento rod [28]. Byly amplifikovány úseky DNA o délce 914 bp. Produkt PCR analýzy byl nanesen na agarosový gel (1,5%) (Obrázek 6). Schéma nanesení vzorků je uvedeno v Tabulce 17.



Obrázek 6: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro rod *Bifidobacterium* [28]

Tabulka 17: Schéma nanesení vzorků na agarosový gel PCR specifické pro rod *Bifidobacterium*

Běh 1	negativní kontrola
Běh 2	pozitivní kontrola (<i>Bifidobacterium brevis</i> , 10 ng·μl ⁻¹)
Běh 3	DNA standard 100 bp
Běh 4	DNA izolovaná fenolovou extrakcí
Běh 5	DNA izolovaná fenolovou extrakcí
Běh 6	DNA izolovaná magnetickými nosiči
Běh 7	DNA izolovaná magnetickými nosiči

Agarosovou gelovou elektroforézou prokázána přítomnost PCR produktů specifických pro rod *Bifidobacterium* [28] ve všech vzorcích nanesené DNA.

6 DISKUZE

6.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Pomocí přístroje NanoPhotometer byla změřena absorbance všech vzorků izolované DNA v rozmezí vlnových délek 220 – 310 nm. Poměr absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ je pro DNA izolovanou fenolovou extrakcí roven 2,114 pro vzorek 1 a 2,061 pro vzorek 2. Tyto hodnoty neleží v rozmezí 1,8 – 2,0, které značí vzorek DNA neznečištěný proteiny nebo RNA. Hodnoty 2,114 a 2,061 indikují znečištění RNA, což je v souladu s postupem přípravy vzorku, kdy RNA nebyla při přípravě hrubého lyzátu odstraněna. Vzorek nebyl znečištěn fenolem, protože je splněna podmínka $A_{230\text{ nm}} < A_{260\text{ nm}}$. Koncentrace DNA ve vzorku 1 byla stanovena na $409\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a ve vzorku 2 na $388\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Znečištění vzorků bylo dle výsledků měření minimální a bylo zejména způsobeno pomocnými látkami obsaženými v tobolkách, které nešly běžnými technikami extrakce odstranit.

Poměr absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ je pro DNA izolovanou magnetickými nosiči roven 1,534 pro vzorek 1 a 1,519 pro vzorek 2. Tyto hodnoty neleží v rozmezí 1,8–2,0, které značí vzorek DNA neznečištěný proteiny nebo RNA. Hodnoty 1,534 a 1,519 indikují znečištění proteiny. [23] Koncentrace DNA ve vzorku 1 byla stanovena na $44,5\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a ve vzorku 2 na $20,5\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Znečištění zřejmě bylo způsobeno pomocnými látkami obsaženými v tobolkách, které při separaci obalily magnetické částice a bylo obtížné je odstranit. Rozdíly v koncentracích DNA izolované magnetickými nosiči jsou zřejmě způsobeny rozdílem v napipetovaném množství těchto nosičů.

6.2 Gelová elektroforéza vzorku bakteriální DNA

Bakteriální DNA získaná fenolovou extrakcí a separací magnetickými nosiči z tobolky výrobku Linex[®] Forte, byla nanesena na agarosový gel. Byla analyzována přítomnost a intaktnost získané DNA. Vzorky DNA izolované fenolovou extrakcí byly na agarosovém gelu velmi zřetelné (běhy 6 a 7). Byla detekována chromosomální DNA, extrachromosomální DNA a RNA (Obrázek 2). Přítomnost RNA odpovídá výsledku spektrofotometrického stanovení. [23] Různá intenzita pásů viditelných na agarosovém gelu je způsobena různou koncentrací DNA ve vzorcích, které jsou nanášeny. Vzorky DNA vyizolované magnetickými nosiči nebyly na agarosovém gelu zřetelné (běhy 3 a 4). To bylo způsobeno nedostatečnou koncentrací DNA ve vzorku pro analýzu gelovou elektroforézou. Koncentrace bakteriální DNA, která byla použita jako pozitivní kontrola (běh 1) byla také pro detekci agarosovou gelovou elektroforézou nedostatečná, nicméně v oblasti detekce RNA je slabě viditelná.

6.3 PCR analýza bakteriální DNA pro doménu *Bacteria*

DNA získaná fenolovou extrakcí a pomocí magnetických nosičů byla vyředěna na koncentraci $10\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a amplifikována pomocí primerů specifických pro doménu *Bacteria*. [27] PCR produkt byl nanesen na agarosový gel a vyhodnocen elektroforeticky. Jako pozitivní kontrola byla použita amplifikovaná DNA *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06. Všechny vzorky izolované DNA mají jasně viditelné pásy v oblasti pro

466 bp stejně jako kontrolní vzorek (pozitivní kontrola). Tím je prokázáno, že vzorky bakteriální DNA pocházejí z kultur náležejících pod doménu *Bacteria*. Stejnou metodou byla prokázána přítomnost DNA této domény ve vzorku i jinými autory. [27] Na gelu byly detekovány pásy v oblasti 100 bp, jedná se o tzv. dimery primerů. Dimery vznikly zřejmě z důvodu nízké koncentrace amplifikované DNA na počátku amplifikačního procesu. Výsledné pásy jsou stejně intenzivní, to lze zdůvodnit téměř stejnou koncentrací vzorků DNA pro PCR analýzu, z důvodu vyředění všech vzorků DNA na stejnou koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

6.4 PCR analýza bakteriální DNA pro rod *Lactobacillus*

DNA izolovaná magnetickými nosiči i fenolovou extrakcí z tobolky výrobku Linex[®] Forte zředěná na koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ byla amplifikována pomocí PCR primerů F_all lact a R_all lact. [27] Produkty PCR byly vyhodnoceny elektroforeticky na 2% agarosovém gelu. Jako pozitivní kontrola byla použita amplifikovaná DNA *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919. Všechny vzorky izolované DNA mají jasně viditelné pásy v oblasti pro 92 bp stejně jako kontrolní vzorek (pozitivní kontrola) DNA kultury *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919. Tím je prokázáno, že vzorky bakteriální DNA pocházejí z kultur náležejících k rodu *Lactobacillus*. Podobnou metodou byla prokázána přítomnost DNA rodu *Lactobacillus* ve vzorku i jinými autory. [27] Negativní kontrola nevykazuje žádnou kontaminaci v průběhu práce a nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek. Výsledné pásy jsou stejně intenzivní z důvodu téměř stejné koncentrace vzorků DNA pro PCR analýzu. Pásy jsou však rozmazané, což značí příliš vysokou koncentraci DNA a s tím spojené přetížení elektroforetického zařízení.

6.5 PCR analýza bakteriální DNA pro rod *Bifidobacterium*

DNA izolovaná magnetickými nosiči i fenolovou extrakcí z tobolky výrobku Linex[®] Forte byla zředěná na koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a amplifikována pomocí PCR primerů Pbi F1 a Pbi R2. [28] Produkty PCR byly vyhodnoceny elektroforeticky na 1,5% agarosovém gelu. Jako pozitivní kontrola byla použita amplifikovaná DNA *Bifidobacterium brevis*. Všechny produkty PCR mají jasně viditelné pásy v oblasti pro 914 bp stejně jako pozitivní kontrola připravená amplifikací DNA izolované z kultury *Bifidobacterium brevis*. Tím je prokázáno, že izolované vzorky DNA obsahují bakteriální DNA pocházející z kultur náležejících k rodu *Bifidobacterium*. Podobnou metodou byla prokázána přítomnost DNA rodu *Bifidobacterium* ve vzorku i jinými autory. [28] Nebyl potvrzen falešně pozitivní výsledek, protože na gelu není viditelný pás v běhu, kde byla nanášena negativní kontrola. Všechny pásy jsou stejně intenzivní, to lze zdůvodnit téměř stejnou koncentrací vzorků DNA pro PCR analýzu. Všechny pásy vykazují „chvostování“ z důvodu příliš vysoké koncentrace DNA v nanášeném vzorku a s tím spojeného přetížení elektroforetického zařízení.

7 ZÁVĚR

Teoretická část práce se zabývá využitím probiotických bakteriálních kmenů a prebiotické vlákniny k modulaci gastrointestinálního traktu hostitele a ke zlepšení jeho celkového zdravotního stavu. Zabývá se také vlastnostmi vybraných probiotických bakterií a jejich vhodnými kombinacemi v probiotických výrobcích, včetně kombinací s prebiotiky (symbiotika). Je pojednáno také o využití probiotik a prebiotik v potravinářských aplikacích. V neposlední řadě jsou zmíněny metody izolace bakteriální DNA.

V experimentální části byla analyzována bakteriální DNA získána z komerčního potravinového doplňku stravy Linex[®] Forte. Byla zjišťována přítomnost probiotických bakterií deklarovaných výrobcem. Byla provedena lyze bakteriálních buněk obsažených v tobolce Linex[®] Forte. Z hrubého lyzátu buněk byla izolována bakteriální DNA metodou fenolové extrakce a vzorek byl následně přečištěn ethanolem a analyzován spektrofotometricky a pomocí agarosové gelové elektroforézy. Detekce gelu UV světlem odhalila přítomnost nukleových kyselin ve vzorku ve vysoké koncentraci, což potvrdilo výsledky spektrofotometrického měření. Z hrubého lyzátu buněk vzorku potravinového doplňku Linex[®] Forte byla izolována DNA pomocí magnetických nosičů a DNA byla následně analyzována metodou PCR na přítomnost DNA domény *Bacteria*, jejíž přítomnost byla potvrzena. Dále byla metodou PCR prokázána přítomnost DNA rodů *Bifidobacteria* a *Lactobacillus* ve vzorku, což souhlasí s údaji deklarovanými výrobcem. Výsledky potvrzují, že metoda PCR v kombinaci s izolací DNA fenolovou extrakcí i magnetickými nosiči je vhodná pro analýzu mikrobiologického složení komplexních probiotických výrobků, u nichž lze předpokládat obsah možných inhibitorů PCR.

8 POUŽITÉ LITERÁRNÍ ZDROJE

- [1] SAAD, N., C. DELATTRE, M. URDACI, J.M. SCHMITTER, P. BRESSOLLIER a Sueli RODRIGUES. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*. 2013, **50**(1): 1-16. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.014. ISSN 00236438.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643812002319>
- [2] KAILASAPATHY, Kasipathy. Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits : a review. *Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits : a review*. 2013, (21): 1-17.
- [3] SANDERS, Mary Ellen, Irene LENOIR-WIJNKOOP, Seppo SALMINEN, Daniel J. MERENSTEIN & company. Probiotics and prebiotics: prospects for public health and nutritional recommendations. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014, **1309**(1): 19-29. DOI: 10.1111/nyas.12377. ISSN 00778923.
Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/nyas.12377>
- [4] LEE, Y a Seppo SALMINEN. *Handbook of probiotics and prebiotics*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2009, p. ISBN 978-047-0135-440.
- [5] KUMAR, Himanshu, Seppo SALMINEN a Hans VERHAGEN. Novel probiotics and prebiotics: road to the market. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2015, (32): 99-103 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.11.021. ISSN 09581669.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166914002092>
- [6] KLU, Yaa Asantewaa Kafui, Robert D. PHILLIPS a Jinru CHEN. Survival of four commercial probiotic mixtures in full fat and reduced fat peanut butter. *Food Microbiology*. 2014, **44**: 34-40. DOI: 10.1016/j.fm.2014.04.018. ISSN 07400020.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002014000938>
- [7] KLU, Yaa Asantewaa Kafui a Jinru CHEN. Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. *LWT - Food Science and Technology*. 2015, **62**(2): 983-988. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.02.018.
Dostupné také z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.018>
- [8] RIVERA-ESPINOZA, Yadira a Yoja GALLARDO-NAVARRO. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* [online]. 2010, **27**(1): 1-11 [cit. 2015-03-05]. DOI: 10.1016/j.fm.2008.06.008. ISSN 07400020.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002008001111>

- [9] KHAN, Shahnawaz Umer. Probiotics in dairy foods: a review. *Nutrition & Food Science* [online]. 2014, **44**(1): 71-88 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1108/nfs-04-2013-0051. ISSN 0034-6659. Dostupné také z: <http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/1505340904/1395FB8A5EF2487CPQ/1?accountid=17115>
- [10] RATHORE, Sorbhi, Ivan SALMERÓN a Severino S. PANDIELLA Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiology*. 2012, **30**(1): 239-244. DOI: 10.1016/j.fm.2011.09.001. ISSN 07400020. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002011002218>
- [11] POSSEMIERS, S., M. MARZORATI, W. VERSTRAETE a T. VAN DE WIELE Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, **141**(1-2): 97-103. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.008. ISSN 01681605. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510001200>
- [12] CRUZ, Adriano G., Adriane E.C. ANTUNES, Ana Lúcia O.P. SOUSA, José A.F. FARIA a Susana M.I. SAAD Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*. 2009, **42**(9): 1233-1239. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.03.020. ISSN 09639969. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996909000908>
- [13] DI CRISCIO, T., A. FRATIANNI, R. MIGNOGNA, L. CINQUANTA, R. COPPOLA, E. SORRENTINO a G. PANFILI Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *Journal of Dairy Science*. 2010, **93**(10): 4555-4564. DOI: 10.3168/jds.2010-3355. ISSN 00220302. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030210004868>
- [14] LACEY, A.M. López de, E. PÉREZ-SANTÍN, M.E. LÓPEZ-CABALLERO a P. MONTERO Survival and metabolic activity of probiotic bacteria in green tea. *LWT - Food Science and Technology*. 2014, **55**(1): 314-322. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.08.021. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0023643813003071>
- [15] GRANDY, Giuseppe, Marcos MEDINA, Richard SORIA, Carlos G TERÁN a Magdalena ARAYA. Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children. *BMC Infectious Diseases*. 2010, **10**(1): 253-. DOI: 10.1186/1471-2334-10-253. ISSN 1471-2334. Dostupné také z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/253>

- [16] VANDENPLAS, Yvan, Geert HUYS a Georges DAUBE. Probiotics: an update. *Jornal de Pediatria* [online]. 2015, **91**(1): 6-21 [cit. 2015-04-26]. DOI: 10.1016/j.jpmed.2014.08.005. ISSN 00217557.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021755714001478>
- [17] FELLE, Christian P., Irene CORTHESEY-THEULAZ, Jose-Luis Blanco RIVERO & company. Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *European Journal of Gastroenterology*. 2001, **13**(1): 25-29. DOI: 10.1097/00042737-200101000-00005. ISSN 0594-691x. Dostupné také z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>
- [18] NGWA, Che Julius a Gabriele PRADEL. Coming soon: probiotics-based malaria vaccines. *Trends in Parasitology* [online]. 2015, **31**(1): 2-4 [cit. 2015-04-26]. DOI: 10.1016/j.pt.2014.11.006. ISSN 14714922.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492214002025>
- [19] OSBORN, David A a John K. SINN Prebiotics in infants for prevention of allergy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 3. 2013, (006474). DOI: 10.1002/14651858.CD006474.pub3.
Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD006474.pub3>
- [20] GIBSON, Glenn R., Karen P. SCOTT, Robert A. RASTALL & company. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science* [online]. 2010, **7**(1): 1-19 [cit. 2014-12-18]. DOI: 10.1616/1476-2137.15880. ISSN 1476-2137. Dostupné také z: <http://www.atypon-link.com/IFIS/doi/abs/10.1616/1476-2137.15880>
- [21] KADLEC, Robert a Martin JAKUBEC. The effect of prebiotics on adherence of probiotics. *Journal of Dairy Science* [online]. 2014, **97**(4): 1983-1990 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.3168/jds.2013-7448. ISSN 00220302.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214000824>
- [22] WILSON, W. William, Mary Margaret WADE, Steven C. HOLMAN a Franklin R. CHAMPLIN. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods*. 2001, **43**(3): 153-164. DOI: 10.1016/S0167-7012(00)00224-4. ISSN 01677012. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701200002244>
- [23] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.

- [24] GIOVANNINI, Tiziana a Luigi CONCILIO. PCR Detection of Genetically Modified Organisms: A Review. *Starch - Stärke*. 2002, **54**(8): 321-327. DOI: 10.3403/30293865. Dostupné také z: [http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1002/1521-379X\(200208\)54:8%3C321::AID-STAR2222321%3E3.0.CO;2-J/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1002/1521-379X(200208)54:8%3C321::AID-STAR2222321%3E3.0.CO;2-J/abstract)
- [25] Faculty.unlv.edu. *University of Nevada, Las Vegas: Faculty Websites* [online]. 2010 [cit. 2015-04-01]. Dostupné také z: https://faculty.unlv.edu/wmojica/PCR_LAB2.htm
- [26] TRACHTOVÁ, Š. *Praktikum z molekulární biotechnologie: Teoretické podklady – úloha č. 4*, VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ, FAKULTA CHEMICKÁ, ÚCHBPT. 2014 – 2015.
- [27] HAARMAN, M. a J. KNOL Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, **72**(4): 2359-2365. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006>
- [28] ROY, Denis a Stéphane SIROIS. Molecular differentiation of Bifidobacterium species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the ldh gene. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, **191**(1): 17-24. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09313.x. ISSN 03781097. Dostupné také z: <http://femsle.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09313.x>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

MO	mikroorganismy
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organisation)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
WGO	Světová gastroenterologická organizace (World Gastroenterology Organisation)
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
GI	gastrointestinální
GIT	gastrointestinální trakt
CD	Crohnova choroba
IBS	syndrom dráždivého tračníku (irritable bowel syndrome)
CFU	kolonie tvořící jednotku (colony-forming unit)
SDS	dodecylsulfát sodný
PEG	polyethylen glykol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
bp	pár bází (base pair)
GMO	geneticky modifikovaný organismus (Genetically Modified Organism).
SHIME	Simulátor lidského střevního mikrobiálního ekosystému (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem)
LDL	nízkodenzitní lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
CCDM	Sbírka mlékařských mikroorganismů v Táboře (Culture Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora)
LOCK	Kolekce průmyslových organismů Polsko (Centre of Industrial Microorganisms Collection)