



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

IDENTIFIKACE PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ POMOCÍ METODY PCR V POTRAVINOVÝCH FERMENTOVANÝCH VÝROBCÍCH ROSTLINNÉHO PŮVODU

IDENTIFICATION OF PROBIOTIC BACTERIA WITH THE USE OF PCR FROM PLANT FERMENTATION
DIARY PRODUCTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tereza Kuljovská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1572/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Tereza Kuljovská**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Mgr. Jan Smetana, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Identifikace probiotických bakterií pomocí metody PCR v potravinových fermentovaných výrobcích rostlinného původu

Zadání bakalářské práce:

- 1) Zvládnutí techniky extrakce bakteriální DNA z fermentovaných potravin rostlinného původu
- 2) Porovnání dvou metod extrakce DNA (fenolová extrakce a komerční kit) z hlediska kvality a kvantity pro další molekulárně biologické metody
- 3) Validace přítomnosti probiotických bakterií ve fermentovaných rostlinných potravinách pomocí metody PCR

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.

Tereza Kuljovská
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

S probiotiky se setkáváme denně, buď cílenou aplikací potravinových doplňků obsahujících živé kultury bakterií mléčného kvašení, nebo konzumací tradičních fermentovaných produktů včetně mléčných nebo nemléčných výrobků. Tyto kultury mohou výrazně ovlivňovat střevní mikrobiotu, zejména při zažívacích potížích nebo potížích spojených s průjemovými onemocněními nebo infekčními gastritidami.

Tato práce se soustředí na izolaci probiotik z rostlinných fermentovaných produktů, jež jsou vhodné i pro vegetariány nebo vegany, jejichž počet v současné době narůstá. Kromě tradičních pokrmů na bázi mléčného kvašení je zde uvedena i jiná alternativa v podobě nápoje Kombucha. Probiotické bakterie izolované z reálných vzorků byly podrobeny identifikaci na základě metody polymerázové řetězové reakce (PCR), kde byla prokázána přítomnost domény *Bacteria* a při rodově specifické amplifikaci také přítomnost rodu *Lactobacillus*. Výsledkem amplifikace byly jednotlivé fragmenty, které byly vizualizovány prostřednictvím metody agaróзовé gelové elektroforézy.

ABSTRACT

Probiotics are encountered daily, either by targeted application of dietary supplements containing live cultures of lactic acid bacteria or by consuming traditional fermented products including dairy or non-dairy products. These cultures can significantly affect intestinal microbiota, particularly during digestive discomfort or problems associated with diarrheal diseases or infectious gastritis.

This work focuses on the isolation of probiotics from fermented plant-based products that are also suitable for vegetarians and vegans, whose numbers are currently increasing. In addition to traditional lacto-fermented foodstuffs, there is another alternative in the form of Kombucha. Probiotic bacteria isolated from real samples were subjected to polymerase chain reaction (PCR) to identify them. Presence of the *Bacteria* domain was detected, and with more specific amplification, the presence of the genus *Lactobacillus* was detected too, using the specific primers. The amplification resulted in individual fragments were visualized by agarose gel electrophoresis.

KLÍČOVÁ SLOVA

probiotika, fermentované rostlinné produkty, izolace DNA, qPCR

KEYWORDS

probiotics, fermented plant products, DNA isolation, qPCR.

KULJOVSKÁ, Tereza. *Identifikace probiotických bakterií pomocí metody PCR v potravinových fermentovaných výrobcích rostlinného původu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2020. 56 s. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Jan Smetana, 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

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Mgr. Janovi Smetanovi, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lence Fialové a Ing. Denise Romanovské za jejich ochotu, přístup a cenné informace při vypracování této práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Probiotika	8
2.2	Historie probiotik	8
2.3	Narušení střevní mikrobioty – stav dysbiózy	9
2.3.1	Základní probiotické kmeny	9
2.4	Charakterizace rodu <i>Lactobacillus</i>	10
2.4.1	Taxonomické zařazení bakterií rodu <i>Lactobacillus</i>	10
2.4.2	Morfologie a obecná charakteristika rodu <i>Lactobacillus</i>	11
2.4.3	Klinický význam	11
2.5	Charakterizace rodu <i>Bifidobacterium</i>	12
2.5.1	Taxonomické zařazení rodu <i>Bifidobacterium</i>	12
2.5.2	Morfologie a obecná charakteristika rodu <i>Bifidobacterium</i>	12
2.5.3	Klinický význam	13
2.6	Rostlinné fermentované produkty	13
2.6.1	Probiotické výrobky nemléčné povahy	13
2.7	Nápoj Kombucha	14
2.7.1	Původ nápoje	14
2.7.2	Současný trend	14
2.7.3	Složení nápoje	14
2.8	Identifikace probiotik pomocí molekulárních metod	15
2.9	Metoda PCR	15
2.10	Historie PCR	15
2.11	PCR Primery	15
2.12	Proces PCR	15
2.13	RT-PCR	17
2.14	Detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy	18
2.15	Princip fungování gelové elektroforézy	18
2.15.1	Agaróza pro tvorbu gelu	18
3	CÍL PRÁCE	19
4	MATERIÁL A METODY	20
4.1	Použité komerčně dostupné potraviny	20
4.2	Použité připravené produkty vlastní fermentací	20
4.3	Materiál	21
4.3.1	Chemikálie a roztoky	21
4.3.2	Pomůcky a přístroje	22
4.4	Příprava chemikálií	23
4.4.1	Růstová média	23

4.4.2	Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů bakteriálních buněk.....	24
4.4.3	Roztoky pro izolaci bakteriální DNA	24
4.4.4	Roztoky pro agarózovou elektroforézu.....	25
4.5	Metody	25
4.6	Fenol-chloroformová izolace DNA.....	25
4.6.1	Lyze bakteriálních buněk.....	25
4.6.2	Fenolová extrakce bakteriální DNA	26
4.6.3	Srážení DNA ethanolem	26
4.7	Izolace pomocí sady Omni Bacterial DNA Purification Kit.....	27
4.8	Metody společné pro vyizolovanou DNA pomocí fenol-chloroformu i komerčního kitu 28	
4.8.1	Spektrofotometrické stanovení čistoty DNA	28
4.8.2	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase – RT PCR	28
4.8.3	Amplifikační program pro qPCR.....	29
4.8.4	Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy	30
5	VÝSLEDKY	31
5.1	Kultivace bakterií z reálných vzorků.....	31
5.2	Izolace bakteriální DNA metodou fenol-chloroformové extrakce.....	32
5.3	Izolace bakteriální DNA pomocí komerčního kitu Omni Bacterial DNA Purification Kit 32	
5.4	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA z bakteriálních kultur	33
5.5	Porovnání koncentrace a čistoty DNA na základě odlišných způsobu izolace.....	35
5.6	Naředění DNA na koncentraci 10 ng/μl.....	37
5.7	Kvantitativní qPCR specifická pro doménu Bacteria.....	37
5.7.1	Analýza křivek tání pro doménu Bacteria – izolace fenolovou extrakcí	40
5.7.2	Analýza křivek tání pro doménu Bacteria – izolace komerčním kitem.....	41
5.8	Kvantitativní qPCR specifická pro rod Lactobacillus	42
5.8.1	Analýza křivek tání pro rod Lactobacillus – izolace fenolovou extrakcí	45
5.8.2	Analýza křivek tání pro rod Lactobacillus – izolace komerčním kitem	46
6	DISKUZE	47
6.1	Kultivace probiotických bakterií	47
6.2	Izolace DNA fenol-chloroformovou metodou	47
6.3	Izolace bakteriální DNA pomocí komerčního kitu Omni Bacterial DNA Purification Kit 47	
6.4	Kvantitativní qPCR specifická pro doménu Bacteria.....	48
6.5	Kvantitativní qPCR specifická pro rod Lactobacillus.....	48
6.6	Srovnání dvou metod izolace bakteriální DNA	48
7	ZÁVĚR	49
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51

1 ÚVOD

Lidské střevo je jeden z nejsložitějších ekosystémů, složený z 10^{13} - 10^{14} mikroorganismů, které hrají důležitou roli v lidském zdraví. Kromě toho, některé potravinové výrobky obsahují živé bakterie, které procházejí přes náš gastrointestinální trakt a mohou mít příznivé účinky na naše zdraví (známé jako probiotický účinek) [1].

Vlastnosti probiotik určují jejich schopnost přežít průchod horním zažívacím traktem a kolonizovat střevní lumen a tlusté střevo po dobu neurčitou. Probiotika jsou bezpečná pro lidskou spotřebu a zatím nebyly zjištěny žádné zprávy o jejich škodlivosti nebo produkci specifických toxinů určitými kmeny [2, 3].

Nejznámější molekulární metodou dokazující přítomnost probiotických bakteriálních kmenů je polymerázová řetězová reakce (PCR), pomocí které lze identifikovat jednotlivé rody i druhy bakterií, protože jejich stanovení představuje neodmyslitelnou část při jejich dalších potravinářských nebo farmakologických aplikacích. Podstatou této metody je amplifikace určitého úseku DNA, který je ohraničen krátkými sekvencemi oligonukleotidů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotika

Probiotika a prebiotika jsou nástroje sloužící k řízení střevní mikrobioty s cílem zlepšit zdraví hostitele. Zaměřují se na gastrointestinální účinky skrze střevo, ačkoli se zkoumá i jejich přímá aplikace na jiná místa, jako je dutina ústní, vaginální ústrojí nebo kůže.

V posledním desetiletí se výzkum střevních mikrobiomů rychle hromadil a byl doprovázen zvýšeným zájmem o probiotika a prebiotika jako prostředek modulace střevní mikrobioty.

Vybrané druhy rodů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Saccharomyces* mají dlouhou historii bezpečného a účinného použití jako probiotika, ale *Roseburia spp.*, *Akkermansia spp.*, *Propionibacterium spp.* a *Faecalibacterium spp.* vypadají slibně jako probiotika budoucnosti [4].

Probiotika hrají klíčovou roli při řešení dysbiózy způsobené vnějšími faktory, jako jsou antibiotika, jiné látky nebo intervence. Doplnění antibiotik o probiotika je příznivé při snižování škodlivých účinků antibiotik na střevní floru. Tyto mikroorganismy mají také specifické vnitřní mechanismy rezistence na léky, které pomáhají jejich přežití ve vnitřním prostředí. Podle zpráv US Food and Drug Administration jsou druhy patřící do rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* nejčastějšími probiotiky konzumovanými lidmi prostřednictvím komerčních produktů [5].

2.2 Historie probiotik

Probiotikum, slovo odvozené z latiny, znamená „pro život“. Dlouho před uvědomením si probiotických vlastností byly fermentované produkty, jako pivo, chléb, víno, kefir, kumys a sýr, často používány pro výživové a terapeutické účely. Obecně se předpokládá, že fermentované produkty byly pravděpodobně nalezeny, nebo lépe řečeno, objeveny, spontánně. Historie probiotik je spojena s vývojem civilizace, a díky sofistikovaným technikám, jí lze vysledovat až do dávných dob, téměř před 10 000 lety [6].

Na začátku dvacátých let Louis Pasteur identifikoval mikroorganismy odpovědné za proces fermentace, zatímco Ilja Mečnikov spojil zvýšenou dlouhověkost bulharských venkovských obyvatel s pravidelnou konzumací fermentovaných mléčných výrobků jako je jogurt. Navrhl, že laktobacily by mohly působit proti hnilobným procesům gastrointestinálního metabolismu, které přispívaly ke stárnutí. Mečnikov považoval laktobacily za probiotika („probio“ – přispívající k životu, na rozdíl od antibiotik) [7].

V roce 1922 při jedné z prvních studií na člověku, bylo prokázáno, že *Lactobacillus acidophilus* zlepšil zdravotní stav 30 pacientů trpících chronickou zácpou, průjmem nebo ekzémem. Termín probiotický byl poprvé použit v roce 1965, když byly u probiotik akceptovány pozitivní účinky na lidské zdraví [8].

2.3 Narušení střevní mikrobioty – stav dysbiózy

Termín dysbióza souvisí s mnoha různými patologiemi, i když není jasné, zda nerovnováha mikrobioty je příčinou nebo důsledkem nemoci. Nejjasnější korelace mezi dysbiózou a onemocněním byla zjištěna u zánětlivých střevních onemocnění (IBD), kde byl zjištěn nízký podíl kmenu *Firmicutes*, zejména druhu *Faecalibacterium prausnitzii*, u pacientů, kteří vykazovali endoskopickou recidivu 6 měsíců po operaci [9, 10].

IBD, včetně Crohnovy choroby (CD) a ulcerativní kolitidy (UC), se vyznačují abnormální aktivací imunitního systému spojeného se střevem, což má za následek chronický zánět trávicího systému. Zdá se však, že se na IBD podílejí také některé další faktory, jako jsou genetické složky, imunologické poruchy, faktory prostředí, patogeny a mikrobiota. Fekální analýzy ukázaly kvantitativní a kvalitativní snížení zastoupení *Firmicutes phylum*, a to většinou členů klastru IV u pacientů s CD, zatímco u pacientů s UC bylo hlášeno nízké množství celkových laktobacilů, ačkoli mezi nimi nebyla nalezena žádná korelace mezi relativním zastoupením *F.prausnitzii* a závažností CD [11-18].

2.3.1 Základní probiotické kmeny

Lidská mikrobiota se dnes dostává do středu pozornosti a výzkum již ukázal, že změna této mikrobioty může mít dalekosáhlé důsledky. Jednou z možných cest k nápravě dysbiózy je konzumace probiotik. Protože se ukázalo, že probiotické vlastnosti jsou specifické pro kmen, je také velmi důležitá přesná identifikace konkrétních kmenů.

Přínosy pro zdraví byly prokázány zejména pro specifické probiotické kmeny následujících rodů [19]: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Escherichia Coli*.

Tabulka 1 – přehled mikroorganismů s probiotickými účinky (upraveno dle [19])

Rod (lat.genus)	Druh (lat.species)
Bacillus	<i>B. cereus, B. coagulans, B. subtilis</i>
Bifidobacterium	<i>B. bifidum, B.infantis, B.longum</i>
Enterococcus	<i>E. durans, E. faecium</i>
Escherichia	<i>E. coli Nissle 1917</i>
Lactobacillus	<i>L. acidophilus, L. brevis, L. casei, L. plantarum</i>
Lactococcus	<i>L. lactis subsp.lactis</i>
Leuconostoc	<i>L. mesenteroides</i>
Pediococcus	<i>P. acidilactici</i>
Saccharomyces	<i>S. boulardi</i>
Streptococcus	<i>S. thermophilus</i>

2.4 Charakterizace rodu *Lactobacillus*

2.4.1 Taxonomické zařazení bakterií rodu *Lactobacillus*

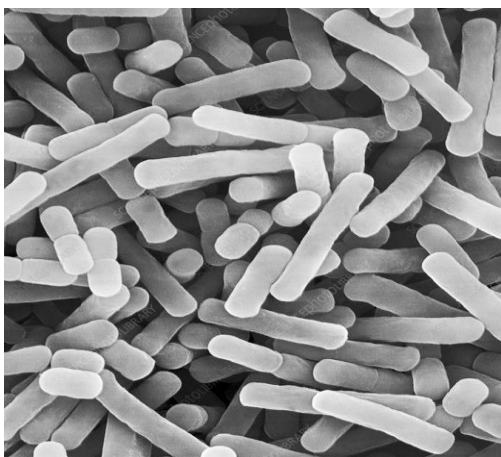
Rod *Lactobacillus* je taxonomicky komplexní a skládá se z více než 170 druhů, které se nedají fenotypicky lehce rozlišit a často tak vyžadují molekulární identifikaci [20].

- Doména: Bacteria
- Kmen: Firmicutes
- Třída: Bacilli
- Řád: Lactobacillales
- Čeleď: Lactobacillaceae
- Rod: *Lactobacillus*

2.4.2 Morfologie a obecná charakteristika rodu *Lactobacillus*

Lactobacillus je nejstarším objeveným rodem bakterií a je také nejrozšířenějším probiotikem. Patří mezi bakterie mléčného kvašení (BMK), což jsou grampozitivní, nesporetvorné, nemotilní, fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní bacily, nesoucí katalytické a negativně oxidační vlastnosti. Kromě fenotypové identifikace a biochemických reakcí se nejčastěji provádí molekulární metoda, a to amplifikace a sekvenování úseku 16S rRNA pro identifikaci této skupiny bakterií.

V současné době nabývají na důležitosti identifikační techniky jako je gelová elektroforéza v pulzním poli (PFGE), náhodně amplifikovaná polymorfnní DNA (RAPD) a amplifikovaná restrikční analýza ribozomální DNA (ARDRA), protože tato bakterie poskytuje kmenově specifické prospěšné vlastnosti [21, 22].



Obrázek 1 - Morfologie rodu *Lactobacillus* [23]

2.4.3 Klinický význam

Druhy rodu *Lactobacillus* podávané v kombinaci s jinými probiotiky prospívají při léčení syndromu dráždivého tračníku (IBS), ačkoli je rozsah účinnosti pořád nejistý [24]. Probiotika pomáhají léčit IBS návratem homeostázy, kdy se ve střevní mikrobiotě vyskytují neobvykle vysoké hladiny oportunních bakterií [1].

Rod *Lactobacillus* se také uplatňuje jako probiotikum podávané v případech infekce bakterií *Helicobacter Pylori* způsobující vředy. *Helicobacter pylori* je spojen s rakovinou a rezistence vůči antibiotikům brání úspěchu současných eradikačních postupů založených na antibiotikách. Jestliže se podávají probiotika laktobacilů spolu s léčbou jakožto adjuvans, jejich účinnost se podstatně zvýší a vedlejší účinky se mohou zmírnit [25].

Rodu *Lactobacillus* se také využívá při léčení urogenitálních a vaginálních infekcí, jako je bakteriální vaginóza. Laktobacily produkují kyselinu mléčnou, peroxid vodíku a bakteriociny. Kyselina mléčná snižuje vaginální pH na přibližně 4,5 nebo méně, a brání tak přežití jiných bakterií. Peroxid vodíku a také obnovuje bakteriální mikrobiotu a normální vaginální pH [26].

U dětí jsou kmeny laktobacilů, jako je *Lactobacillus rhamnosus*, spojeny se zmírněním atopického ekzému, známého také jako dermatitida, v důsledku protizánětlivých účinků cytokinů vylučovaných touto probiotickou bakterií [1].

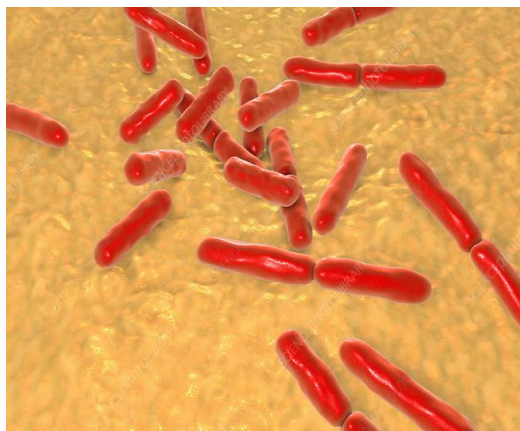
2.5 Charakterizace rodu *Bifidobacterium*

2.5.1 Taxonomické zařazení rodu *Bifidobacterium*

- Doména: Bacteria
- Kmen: Actinobacteria
- Třída: Actinobacteria
- Rad: Actinobacteridae
- Čeleď: Bifidobacteriales
- Rod: Bifidobacteriaceae

2.5.2 Morfologie a obecná charakteristika rodu *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou anaerobní, nesporulující, grampozitivní tyčinky představující všudypřítomné obyvatelé lidského orogastrointestinálního traktu a vaginy. Rod se skládá z více než 50 druhů, přičemž pouze 10 druhů se vyskytuje u lidí [27, 28].



Obrázek 2 - *Bifidobacterium bifidum* [29]

2.5.3 *Klinický význam*

Bifidobakterie jsou gram-pozitivní prokaryotické bakterie, které přirozeně kolonizují lidský gastrointestinální trakt (GIT) a vaginu. Ačkoli nejsou numericky dominantní ve složité střevní mikroflóře, jsou považovány za komenzály podporující zdravý GIT [30].

Přestože bifidobakterie představují pouze 3-6 % fekální mikroflóry, jejich přítomnost je spojena s příznivými účinky na zdraví, jako je prevence průjmu, zmírnění intolerance laktózy nebo imunomodulace [6].

U vybraných druhů rodu *Bifidobacterium* se předpokládá, že přinášejí zdravotní výhody hostiteli, včetně konkurenčního vyloučení patogenů, modulace imunitního systému a degradace sacharidů pocházejících ze stravy. Na základě těchto účinků se bifidobakterie často přidávají k probiotickým přípravkům v kombinaci s jinými bakteriemi mléčného kvašení [31-37].

Druhy *Bifidobacterium* patří také mezi rané kolonizátory kojených dětí. Bylo dokázáno, že bifidobakterie mají jedinečné vlastnosti pro novorozence v různých ohledech. Nestravitelné cukry v mateřském mléku, známé jako oligosacharidy lidského mléka (HMO), chrání kojence a fungují jako prebiotika při růstu bifidobakterií [38-41].

2.6 Rostlinné fermentované produkty

Fermentace zeleniny je známá již od starověku. Fermentovaná zelenina představuje vhodné médium pro distribuci probiotik. Ukazuje se však, že nízká inkubační teplota rostlinné fermentace je problémem při zavádění tradičních probiotických bakterií *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium*. Probiotika jako *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus Casei* a *Lactobacillus plantarum* jsou lépe přizpůsobena zelenině během kvašení. Nicméně když je teplota upravena na 37 °C probiotické bakterie v substrátech na bázi rostlin rostou poměrně rychle [42, 43].

2.6.1 *Probiotické výrobky nemléčné povahy*

Mléčné výrobky jsou pro člověka hlavními zdroji probiotických bakterií, protože tyto produkty poskytují vhodné prostředí pro jejich růst a životaschopnost. S rozšiřující se vegetariánskou ideologií ve vyspělých zemích však existuje i poptávka po vegetariánských probiotických produktech. Vegetariáni a spotřebitelé s intolerancí laktózy projevují velký zájem o tyto nemléčné probiotické výrobky. Podle *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) of the U.S. National Institutes of Health*, asi 75% populace trpí nesnášenlivostí laktózy. Vývoj probiotických potravinářských výrobků bez laktózy je velmi náročný, protože musí splňovat očekávání spotřebitele s ohledem na zdravotní přínosy [44, 45].

2.7 Nápoj Kombucha

2.7.1 Původ nápoje

Uvádí se, že Kombucha má původ v severovýchodní Číně, přičemž první zmínka o jejím použití pochází z roku 220 před Kristem. Dále se šířila do Japonska, Ruska a východní Evropy jako léčivo prostřednictvím obchodních cest. [46, 47].

Ve Spojených státech si Kombucha zpočátku získala popularitu během epidemie HIV/AIDS koncem osmdesátých a začátkem devadesátých let, protože se doufalo, že nápoj může zvýšit počet T-buněk a podporovat tak oslabené imunitní systémy. S větším uvědoměním si probiotických vlastností a možných zdravotních výhod fermentovaných potravin se tento lék na začátku 21. století obnovil jako zdravotnický produkt a na mnohých místech byly brzy k dispozici soupravy na jeho domácí a komerční vaření [48].

2.7.2 Současný trend

Kombucha, fermentovaný čaj vyrobený z ko-kultivací kvasinek a bakterií, si v posledních letech získala celosvětovou popularitu díky svým potenciálním přínosům pro lidské zdraví. V důsledku toho se mnoho studií pokusilo charakterizovat jak její biochemické vlastnosti, tak mikrobiální složení [49]. Aktuální povědomí o potravinách směřem k minimálně zpracovaným výrobkům bez přidaných látek, vysoké výživové hodnoty a se zdravotními výhodami, se zvyšuje s informovaností spotřebitele. V této souvislosti tradiční čaj Kombucha nedávno zaujal vědce a spotřebitele z důvodů probiotických vlastností. V průmyslové výrobě je nutno zohlednit také mikrobiotu, vedlejší produkty a fyzikálně-chemické vlastnosti [50].

2.7.3 Složení nápoje

Čaj Kombucha se získává ze symbiotické kultury octových bakterií (AAB; *Komagataeibacter*, *Gluconobacter* a druhy rodu *Acetobacter*) bakterií mléčného kvašení (LAB; *Lactobacillus*, *Lactococcus*) a kvasinek (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Brettanomyces buxellensis*) ve sladkém médiu, obvykle v černém čaji. Jeho fermentační proces také vede k tvorbě plovoucího biofilmu na povrchu růstového média v důsledku aktivity určitých kmenů AAB. Hlavními přítomnými kyselinami jsou kyselina octová, glukonová, vinná, jablečná a v menší míře kyselina citronová. Všechny tyto kyseliny jsou zodpovědné za charakteristickou kyselou chuť [50-54].

2.8 Identifikace probiotik pomocí molekulárních metod

2.9 Metoda PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda široce používaná v molekulární biologii pro přípravu mnoha kopií specifického segmentu DNA. S použitím PCR jsou kopie sekvencí DNA exponenciálně amplifikovány, aby se vytvořily tisíce až miliony dalších kopií daného segmentu DNA. PCR je nyní běžnou a často nepostradatelnou technikou používanou v lékařském laboratorním a klinickém laboratorním výzkumu pro širokou škálu aplikací, včetně biomedicínského výzkumu a forenzní kriminalistiky [55, 56].

K dispozici jsou jak primery rodově specifické pro rod *Lactobacillus*, tak primery druhově specifické. Primery rodově specifické (stejně tak i druhově specifické) byly navrženy na základě rozdílů v nukleotidové sekvenci mezerníkové oblasti mezi geny kódujícími 16S a 23S-rRNA a v sekvenci genu pro 16S rRNA. Častou metodou pro identifikaci bakterií z reálných vzorků je i druhově-specifická PCR, případně PCR v kombinaci s denaturační gradientovou elektroforézou (PCR-DGGE) [57-60].

2.10 Historie PCR

PCR byla vyvinuta Karym Mullisem v roce 1983, zatímco byl zaměstnancem Cetus Corporation. Kary Banks Mullis je americký biochemik narozený v roce 1944. Jako uznání svého vynálezu techniky polymerázové řetězové reakce (PCR) sdílel Nobelovu cenu za chemii v roce 1993 s Michaelem Smithem. Podobný proces poprvé popsali Kjell Kleppe a laureát Nobelovy ceny za rok 1968, Har Gobind Khorana. Tento proces umožňuje amplifikaci specifických sekvencí DNA. [56, 61-64].

2.11 PCR Primery

PCR primery jsou krátké oligodeoxyribonukleotidy nebo oligomery, které jsou navrženy tak, aby byly komplementární s koncovou sekvencí cílového amplikonu. Primery se většinou skládají z 15-25 nukleotidů a mají vyvážený obsah G/C a A/T páru (přibližně 50 - 60%), protože každý ze dvou primerů je komplementární k různým částem cílové sekvence amplikonu [65].

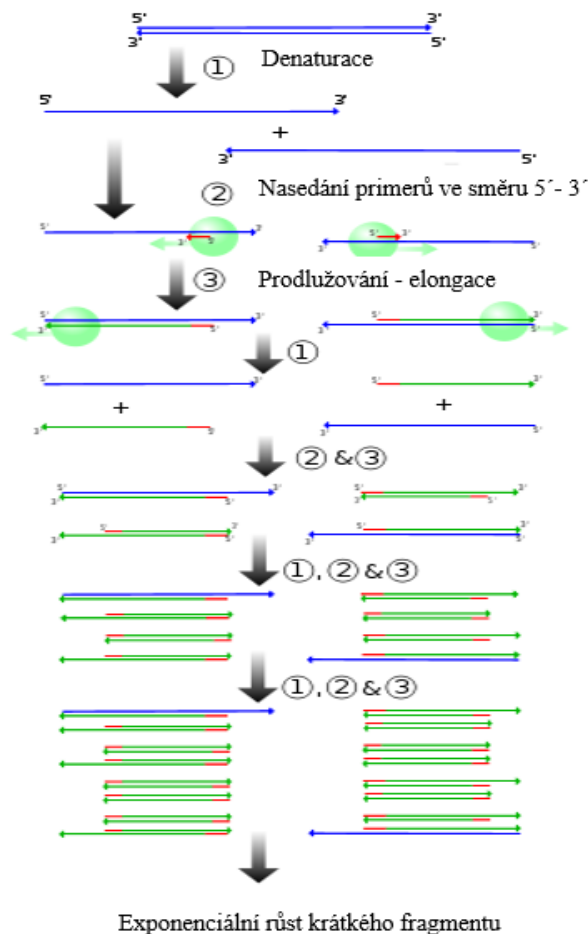
2.12 Proces PCR

Typicky, PCR sestává ze série 20-40 opakovaných teplotních změn, nazvaných teplotní cykly, každý cyklus obvykle sestává ze dvou nebo tří oddělených teplotních kroků. Cyklické syntéze často předchází delší denaturace DNA při velmi vysoké teplotě (> 90 ° C), následuje jí dlouhá závěrečná elongace pro prodloužení konečného produktu, nebo inkubace při nízké teplotě pro krátké skladování. Použité teploty a doba jejich aplikace v každém cyklu závisí na různých parametrech, včetně enzymu použitého pro syntézu DNA, koncentraci dvojmocných iontů a dNTP v reakci a teplotě tání (T_m) primerů [66].

Jednotlivé kroky společné pro většinu metod PCR jsou následující:

- **Iniciace** (10 min, 96 °C) – predehřítí reakční směsi na 94-98 °C. Krok je potřebný při použití konkrétních DNA polymeráz, které jsou extrémně termostabilní a tímto krokem jsou aktivované.
- **Denaturace** (30 s, 96 °C) – počáteční krok cyklu. Reakční směs je zahřátá na vysokou teplotu, při které disociují dvě vlákna dvoušroubovice DNA.
- **Nasedání** (30 s, 60 °C) – nasedání primerů.
- **Polymerace** (1 min, 72 °C) – DNA polymeráza syntetizuje novou DNA v směru 5' – 3': nasedá na primery a dále syntetizuje dle templátové DNA. Kroky 2a – 2c se cyklicky opakují 20 – 40-krát.
- **Elongace** (10 min, 72 °C) – čas a teplota, při které má DNA polymeráza možnost dosyntetizovat případné nedosyntetizované jednovláknové úseky DNA.
- **Ukončení** (4 °C) – reakční směs se na konci PCR reakce schladí a při 4 °C může být krátkou dobu skladovaná [67].

Abychom zkontrolovali, zda PCR úspěšně vytvořila předpokládanou cílovou oblast DNA (také někdy označovanou jako amplimer nebo amplikon), pro separaci produktů PCR lze použít elektroforézu na agarózovém gelu. Velikost (y) PCR produktů se stanoví porovnáním s DNA standardem, markerem molekulové hmotnosti, který obsahuje DNA fragmenty o známé velikosti na gelu vedle produktů PCR [68].



Obrázek 3 – Průběh polymerázové řetězové reakce (upraveno dle [69])

2.13 Real-time PCR

Pro kvantifikaci nukleových kyselin (DNA, RNA) se ve všech oblastech molekulární biologie s oblibou využívá PCR v reálném čase (real-time PCR, qPCR). Název metody vychází ze skutečnosti, že amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí je sledována v reálném čase. Jedná se o kvantitativní metodu na rozdíl od konvenční PCR, což znamená, že umožňuje stanovení přesných množství (relativních nebo absolutních) amplifikované DNA ve vzorcích [70]. RT-PCR se provádí v termocykléru, který má schopnost osvětlit každý vzorek paprskem světla alespoň jedné vlnové délky a detekovat fluorescenci emitovanou excitovaným fluoroforem. Termocycler je také schopen rychle zahřívát a chladit vzorky, a tak využívat fyzikálně-chemické vlastnosti nukleových kyselin a DNA polymerázy. Proces PCR obvykle sestává z řady teplotních změn, které se opakují 25-50krát.

2.14 Detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy

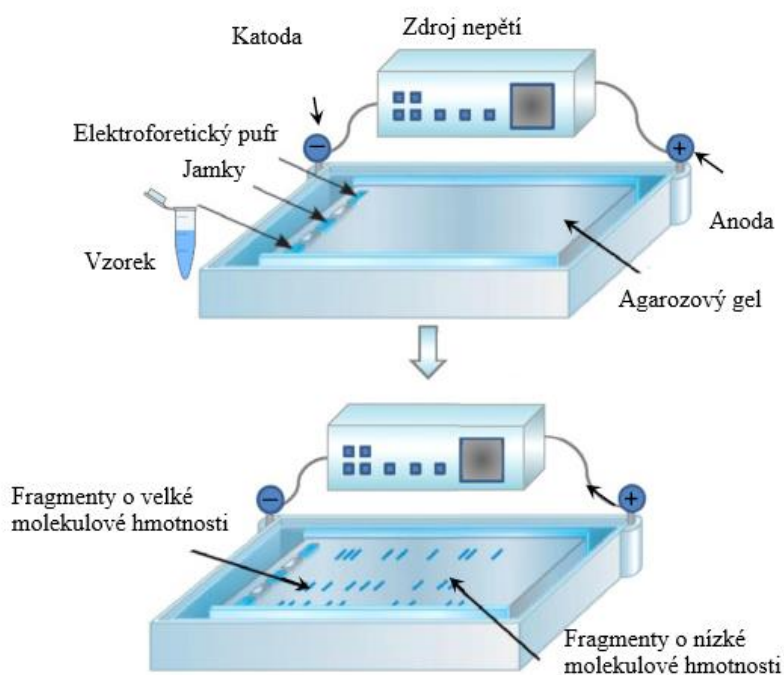
2.15 Princip fungování gelové elektroforézy

Elektroforéza je proces, který umožňuje separaci molekul podle velikosti. Pomocí elektrického pole mohou být molekuly (jako DNA) schopny pohybovat se přes gel připravený z agarózy nebo polyakrylamidu. Elektrické pole sestává z negativního náboje na jednom konci, který protlačuje molekuly gelem, a kladného náboje na druhém konci, který protahuje molekuly gelem. Jednotlivé vzorky, obsahující molekuly, jež mají být separovány, jsou v kapalné formě nanášeny do jamek v gelovém materiálu.

Gel je umístěn do elektroforetické komory, která je poté připojena ke zdroji napětí. Když je aplikován elektrický proud, větší molekuly se pohybují gelem pomaleji, zatímco menší molekuly se pohybují rychleji. Molekuly různé velikosti vytvářejí na gelu odlišné pruhy (bandy) [71].

2.15.1 Agaróza pro přípravu gelu

Agarózový gel je trojrozměrná matrice tvořená spirálovitými molekulami agarózy v superkoloidních svazcích, které jsou agregovány do trojrozměrných struktur s kanály a póry, kterými mohou procházet biomolekuly. 3-D struktura je držena pohromadě vodíkovými vazbami, a proto může být převedena zahřátím zpět do kapalného stavu. Teplota tání se liší od teploty gelovatění, v závislosti na zdrojích. Agarózový gel má teplotu gelovatění 35–42 °C a teplotou tání 85–95 °C [71].



Obrázek 4 – Schéma gelové agarózové elektroforézy (upraveno dle [72])

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem v teoretické části práce byl popis a charakterizace některých vybraných rodů probiotik, jejich využití a aplikace zejména při onemocněních zažívacího ústrojí. Jelikož v současné době pozorujeme rostoucí trend spojený s konzumací vegetariánských anebo veganských výrobků, v experimentální části jsem se zaměřila na ověření přítomnosti probiotik v těchto rostlinných produktech. Důraz byl kladen především na izolaci laktobacilů, které jsou často používané a snadno aplikovatelné při celé řady nemocí. Právě náhrada probiotik z dostupných produktů by mohla vyřešit problém spojený s vyššími finančními náklady při konzumaci komerčních probiotických doplňků. V práci byly splněny následující úkoly:

- Výběr vhodných produktů s vysokou pravděpodobností výskytu laktobacilů
- Kultivace bakterií z těchto produktů
- Izolace genomové DNA pomocí fenol-chloroformové metody
- Příprava směsi pro PCR a amplifikace bakteriální DNA
- Ověření přítomnosti specifického produktu PCR pomocí gelové elektroforézy.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použité komerčně dostupné potraviny

Andaco Premium kysané zelí 1 kg

Složení:

- kysané zelí (bílé hlávkové zelí, jedlá sůl, koření),
- slaný nálev (pitná voda, jedlá sůl, konzervant E 211)

Výrobce: ANDACO s.r.o.
Nitrianska 99
920 01 Hlohovec
Slovenská republika



Tesco okurky kvašené ve slaném kořeněném nálevu 700 g

Složení:

- okurky, pitná voda, jedlá sůl (max. 3 %), koření
- bez přídavku konzervantů

Výrobce: TESCO STORES ČR, a.s.
Vršovická 1527/68b
100 00 Praha 10



4.2 Použité připravené produkty vlastní fermentací

Nápoj Kombucha

Pomůcky a doplňky:

- černý čaj porcovaný Lipton (2g) v množství 4 ks
- cukr třtinový 100 g
- Kombucha násada (1 ks fungus)
- skleněná nádoba o objemu 1000 ml
- papírový ubrousek
- gumička na utěsnění
- voda



Postup přípravy:

- Sáčky čaje byly vloženy do čisté, sterilní skleněné nádoby a zality vroucí vodou.
- Macerace probíhala 8 minut a následně byly sáčky odstraněny.
- Ve vodě byla rozpuštěna sacharóza ve formě třtinového cukru podporujícího fermentaci.
- Po důkladném rozmíchání a rozpuštění sacharózy byla sklenice zavřena a směs se chladila po dobu 20-30 min, dokud nebyla dosažena teplota 30°C.
- Následně byl na hladinu opatrně vložen fungus houby Kombucha a sklenice byla urychleně zakryta pomocí hrubých papírových ubrousků a utěsněna těsnicí gumičkou.
- Fermentace probíhala po dobu 7 dnů a následně po důkladném promíchání byl asepticky odebrán vzorek pro experiment.

4.3 Materiál

4.3.1 Chemikálie a roztoky

- Agaróza pro elektroforézu (Top-Bio, Praha, ČR)
- BB pufr (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- CBH pufr (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- DNA standard (100 bp, Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Destilovaná voda (FCH VUT Brno, ČR)
- DLB pufr (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- Dodecylsulfát sodný – SDS (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)
- DW pufr (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- EB pufr (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina – EDTA (Penta, Chrudim, ČR)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)

- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Interkalační barvivo Gel-Red (Top-Bio, Praha, ČR)
- Izoamylalkohol (Lachema, ČR)
- Kyselina chlorovodíková
- Lysozym (Serva, Heidelberg, Brno, SRN)
- Lysozym (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- Lactobacillus MRS broth (Himedia®, India)
- Nanášecí pufr (Top-Bio, Praha, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Primery (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Proteáza (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- RNáza A (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- SYTO-9 qPCR 2x Master mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan – TRIS BASE (Serva, Heidelberg, SRN)
- Voda pro PCR (Top-Bio, Praha, ČR)

4.3.2 Pomůcky a přístroje

- Centrifuga miniSpin plus 14 500 ot/min. (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Detekční systém pro dokumentaci gelu (Azure biosystems C200, Dublin, Irsko)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exsikátor (KIF LAB Freiburg, Německo)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikropipety Finnpiette (Thermo Scientific – Finnpiette)

- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- MiniIncubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- Nanodrop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- Omni DNA mini kolonky (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- Thermal Cycler Rotor-Gene 6000 (Corbett Research UK Ltd, Cambridge, United Kingdom)
- Thermo-Shaker (TS-100C BioSan, Riga, Latvia)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- 2 ml sběrné zkumavky (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- Běžné laboratorní sklo, materiály z plastu apod.

4.4 Příprava chemikálií

Chemikálie a použité metody byly provedeny dle skript *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie* [73].

4.4.1 Růstová média

- **MRS médium (de Man, Rogosa, Sharp)**

Na přípravu tekutého MRS média určeného pro kultivaci bakterií z reálných vzorků bylo naváženo 5,5 g práškového MRS Lactobacillus Broth, které bylo následně rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Po promíchání média v Erlenmayerově baňce, byla směs umístěna do autoklávu a vysterilována. Po vychlazení bylo médium sterilně dávkováno do zkumavek určených ke kultivaci. Zkumavky byly utěsněny parafilmem a uchovány k dalšímu použití.

Pro přípravu agarových ploten bylo do stejně připraveného tekutého média navíc přidáno 1,5 g bakteriologického agaru. Po vysterilování bylo médium urychleně nalito na plastové Petriho misky. Agarové plotny byly uchovány v chladu až do následujícího použití.

4.4.2 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů bakteriálních buněk

- **1 M Tris-HCl (pH 7,8; 8,0)**

121,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody, pH roztoku bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 7,8 (8,0). Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1 litr, následně byl rozdělen do alikvotních podílů a poté byl sterilizován 20 min při 121 °C.

- **0,5 M EDTA**

186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody, pH bylo upraveno přidáním asi 20 g NaOH. Nejprve bylo přidáno 15 g NaOH, poté byl hydroxid sodný postupně přidáván po jednotlivých pecičkách za stálé kontroly pH roztoku. EDTA byla rozpuštěna při hodnotě pH 8,0. Rozpuštění probíhalo za stálého míchání na magnetické míchačce. Roztok byl následně doplněn destilovanou vodou na objem 1 litr, rozdělen do alikvotních podílů a poté sterilizován 20 minut při 121 °C.

- **Lyzační roztok A**

Roztok byl připraven ze zásobních roztoků 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0). 10 ml 0,1 M Tris-HCl bylo smícháno s 1 ml 0,5 M EDTA. Roztok byl doplněn sterilní destilovanou vodou na objem 100 ml.

- **Lyzační roztok s lysozymem**

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

- **Roztok proteinázy K (10mg/ml)**

Proteináza K byla rozpuštěna v 1 ml sterilní destilované vody. Roztok byl rozdělen do alikvotních podílů a uchován při teplotě -20 °C.

- **Roztok dodecylsulfátu sodného (20 %)**

20 g dodecylsulfátu sodného (SDS) bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody při současném zahřívání na 68 °C, pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,0 koncentrovanou HCl. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml a rozdělen do alikvotních podílů a ponechán při laboratorní teplotě.

4.4.3 Roztoky pro izolaci bakteriální DNA

- **Směs chloroform-isoamylalkohol**

Chloroform a isoamylalkohol byly smíchány v poměru 24:1.

- **Fenol (pH 7,8)**

Nasyčený roztok fenolu v TE pufru, pH 7,8.

- **Octan sodný (3 M)**

40,81 g CH₃COONa . 3 H₂O bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody.

- **TE pufr**

Byl smíchán 1 ml 1 M Tris-HCl s 0,2 ml 0,5 M EDTA. Roztok byl doplněn sterilní destilovanou vodou na objem 100 ml, autoklávován při teplotě 121 °C po dobu 20 minut a rozdělen do alikvotních podílů.

4.4.4 Roztoky pro agarózovou elektroforézu

- **0,5 x TBE pufr**

54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA a doplněno destilovanou vodou na objem 1000 ml. Před použitím byl roztok TBE 10 x zředěn na požadovanou koncentraci pomocí destilované vody.

- **Agarózový gel pro elektroforézu**

Navážka 1,2-1,8 g agarózy byla rozpuštěna v 100 ml 0,5 x koncentrovaného roztoku TBE.

- **Nanášecí pufr**

Roztok nanášecího pufru byl smíchán s reálnými vzorky (5 µl Gel-Red a 15µ vzorky s DNA). Obdobně se postupovalo s produkty PCR, kdy byl nanášecí pufr smíchán se vzorky v poměru 1:3.

- **DNA standard**

Pro tyto účely byl použit DNA standard 100 bp (Malamité, Moravské Prusy, ČR), který obsahoval fragmenty o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 párů bází.

4.5 Metody

4.6 Fenol-chloroformová izolace DNA

4.6.1 Lyze bakteriálních buněk

- 1 ml buněčné kultury v 1,5 ml Eppendorfových zkumavkách byl centrifugován při 15 000 ot./min po dobu 3 minut.
- Supernatant byl opatrně slit a sediment byl ponechán k dokonalému okapání.

- Sediment obsahující pelet buněk byl resuspendován v 1 ml lyzačního pufru A. Nejdříve bylo přidáno pouze 100 μ l pufru, suspenze byla promíchána a poté bylo přidáno zbývajících 900 μ l pufru. Suspenze byla opět promíchána.
- Suspenze byla následně centrifugována při 15 000 ot./min po dobu 3 minut.
- K sedimentu bylo přidáno 500 μ l lyzačního pufru B a směs byla opět promíchána.
- Vzorky byly ponechány k inkubaci po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě.
- Po hodině bylo k suspenzi přidáno 12,5 μ l 20 % roztoku SDS a 5 μ l proteinázy K (100 μ g/ml) a směs byla důkladně promíchána.
- Vzorky byly inkubovány při 55 °C do projasnění roztoku asi 1 hodinu. Občas byly promíchány.

4.6.2 Fenolová extrakce bakteriální DNA

- K 500 μ l lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu.
- Směs byla kývavým pohybem promíchávána po dobu 4 minut a následně byla centrifugována při 15 000 ot./min po dobu 3 minut.
- Pomocí špičky byla odebrána vodní fáze obsahující DNA do čisté zkumavky.
- Vodní fáze s DNA byla doplněna TE pufrém na objem 500 μ l a poté byla do roztoku přidána směs chloroform-izoamylalkohol (24:1).
- Směs byla promíchávána po dobu 4 minut kývavým pohybem.
- Následně byla směs centrifugována při 15 000 ot. /min po dobu 3 minut.
- Horní fáze s DNA byla odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky.

4.6.3 Srážení DNA ethanolem

- Pomocí automatické pipety byl změřen objem vzorku DNA ve zkumavce a celkový objem byl doplněn TE pufrém na 400 μ l.
- Ke vzorku DNA bylo přidáno 20 μ l 3 M octanu sodného a roztok byl promíchán.
- Následně byl k směsi přidán 1 ml 96 % ethanolu vychlazeného na -20 °C a směs byla opět promíchána.
- Směs byla centrifugována při 15 000 ot./min po dobu 15 minut. Opatrně byl odlit supernatant a sediment byl ponechán v exsikátoru asi 10 minut, aby došlo k dokonalému vysušení.
- DNA byla rozpuštěna v TE pufru a uchována při teplotě 4 °C.

4.7 Izolace pomocí sady Omni Bacterial DNA Purification Kit

- Z tekutého MRS media byl odebrán 1 ml buněčných kultur.
- Směs obsahující kultury byla centrifugována po dobu 10 minut při 4000 g.
- Supernatant byl nasát a odstraněn.
- K sedimentu bylo přidáno 200 μ l TE pufru, pelet byl rozptýlen do pufru pomocí vortexování a důkladně promíchán.
- Následně bylo do zkumavky přidáno 10 μ l lysozymu a zkumavka byla umístěna do inkubátoru předehřátého na 37 °C.
- Obsah zkumavky byl přemístěn do čisté 1,5 ml zkumavky a do roztoku bylo přidáno 25 μ l roztoku proteázy a 100 μ l DLB pufru. Směs byla vortexována po dobu 10 sekund.
- Po důkladném promíchání byla zkumavka inkubována v při 55 °C 1 hod.
- Po inkubaci bylo do směsi přidáno 5 μ l RNázy A. Zkumavka byla míchána směrem nahoru a dolů, aby došlo k úplnému promíchání.
- Opět byla zahájena inkubace při laboratorní teplotě po dobu 5 minut.
- Pak byl obsah zkumavky zcentrifugován při 10 000 g po dobu 2 minut.
- Supernatant byl přemístěn do nové 1,5 ml mikrozkušavky bez porušení peletu.
- K supernatantu bylo pak přidáno 220 μ l BB pufru a směs byla z vortexována.
- Po promíchání byla směs inkubována při 65 °C po dobu 10 minut.
- Po inkubaci bylo do zkumavky přidáno 220 μ l 100 % ethanolu a směs byla míchána 20 sekund při maximální rychlosti.
- Do sběrné zkumavky o objemu 2 ml byla vložena kolonka Omni DNA Mini Column.
- Vzorek byl následně do této kolonky nalit včetně jakýchkoliv precipitátů.
- Zkumavka se vzorkem byla centrifugována po dobu 1 min při 10 000 g.
- Filtrát byl odstraněn a kolonka byla vložena do čisté sběrné zkumavky.
- Do zkumavky byl přidán roztok CBH pufru o objemu 500 μ l.
- Směs byla podrobena centrifugaci při 10 000 g po dobu jedné minuty.
- Filtrát byl znovu odstraněn a kolonka byla vložena do čisté zkumavky, do které bylo napipetováno 700 μ l DW pufru.
- Směs byla centrifugována při 10 000 g 1 minutu.
- Po odstranění filtrátu byla kolonka vložena do další čisté zkumavky a 3 předešlé kroky byly zopakovány včetně přemytí DW puftrem.
- Pak byla provedena centrifugace s využitím maximálních otáček po dobu 2 minut až do vysušení kolonky.

- Kolonka byla následně vložena do čisté Eppendorfovy zkumavky a na kolonku bylo napipetováno 100 μ l předeřátého EB pufru.
- Po 5 minutách stání při pokojové teplotě byla zkumavka zcentrifugována po dobu 1 minuty při 10 000 g a DNA byla eluována do roztoku EB pufru.

4.8 Metody společné pro DNA izolovanou pomocí fenol-chloroformu i komerčního kitu

4.8.1 Spektrofotometrické stanovení čistoty DNA

- Koncentrace a čistota DNA izolované z probiotických bakterií byla ověřena na přístroji Nanodrop 2000.
- Nukleová kyselina byla zředěna pomocí TE pufru a následně byly jednotlivé vzorky kápnuty pomocí mikropipety na spektrofotometrickou kyvetu.
- Po uzavření prostoru byla změřena absorbance v rozsahu vlnových délek 220-330 nm.
- Absorbance A_{260} zprostředkovala informaci o koncentraci DNA a poměr hodnot absorbancí A_{260}/A_{280} zprostředkoval informaci o čistotě příslušné nukleové kyseliny.

4.8.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase – RT PCR

- Vzorky obsahující izolovanou DNA byly zředěny na koncentraci 10 ng/ μ l.
- Všechny komponenty PCR reakce byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce zcentrifugovány.
- PCR směs byla smíchána v boxu, který byl vysterilován pomocí UV záření.
- Jednotlivé reakční komponenty byly pipetovány v tomto pořadí:

Tabulka 2 – množství reakčních komponent pro PCR

Komponenta	Objem (μ l)
Voda pro PCR	9,5
SYTO-9 qPCR 2x Master Mix	12,5
Primer 1 (10 pmol/ μ l)	1,0
Primer 2 (10 pmol/ μ l)	1,0
Matrice DNA	1,0
Celkem	25,0

- Master Mix připraven tímto způsobem byl pipetován do speciální Eppendorfovy zkumavky pro qPCR o objemu 200 μ l.
- Do zkumavky bylo vždy přidáno 24 μ l Master Mixu a 1 μ l templátové DNA o koncentraci 10 ng/ μ l. Celkový objem tedy činil 25 μ l.
- Byla připravena negativní kontrola, kdy místo 1 μ l DNA matrice byl k 24 μ l PCR směsi přidán 1 μ l vody pro PCR.
- Pozitivní kontrola byla připravena z druhu *Lactobacillus Casei* pocházejícího ze sbírkového kmene CCM 7089.
- Kvantitativní PCR byla provedena za použití specifických primerů uvedených v Tabulce 3.

Tabulka 3 – použité primery pro qPCR pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*

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

4.8.3 Amplifikační program pro qPCR

- Po smíchání komponent s templátovou DNA byla provedena amplifikace s využitím konkrétního teplotního profilu pro dané primery.
- Vybraný teplotní profil pro doménu *Bacteria* i rod *Lactobacillus* je uveden v Tabulce 4.

Tabulka 4 – Teplotní programy

Specifita	Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců	Dosyntetizování DNA
Doména <i>Bacteria</i>	95 °C / 5 min	95 °C / 30 s	55 °C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 5 min
		30 opakování			
Rod <i>Lactobacillus</i>	95 °C / 5 min	95 °C / 30 s	55 °C / 30 s	72 °C / 1 min	72 °C / 5 min
		30 opakování			

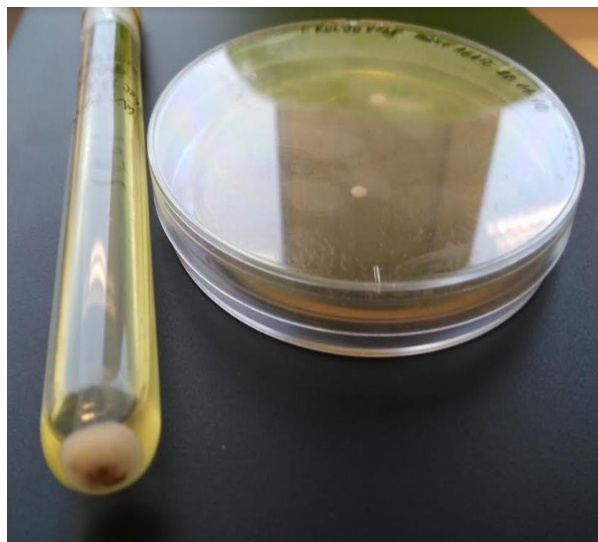
4.8.4 Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy

- Metodou agarózové gelové elektroforézy byly detekovány produkty qPCR pro doménu *Bacteria* i rod *Lactobacillus*.
- Pro doménu *Bacteria* byl připraven 1,5 % agarózový gel, pro rod *Lactobacillus* 1,8 % gel.
- Gel byl připraven rozpuštěním 1,5 / 1,8 g agarózy ve 0,5 × TBE pufru v Erlenmeyerově baňce a jejím následným rozvařením v mikrovlnné troubě.
- Po vychladnutí na teplotu přibližně 50-60 °C byla do suspenze přidáno interkalační barvivo o objemu 10 µl a suspenze agarózy byla po promíchání opatrně nalita do předpřipravené formy, do které byl následně vložen hřebínek.
- Tuhnutí gelu probíhalo cca 25-30 minut.
- Poté byl opatrně vyjmut hřebínek z připraveného gelu a do jamek byly pipetovány produkty PCR smíchané se 6 × koncentrovaným nanášecím pufrům (25 µl vzorku, 5 µl nanášecího pufru).
- Do každé jamky bylo pipetováno 15 µl vzorku PCR produktu, do jedné jamky bylo pipetováno 5 µl DNA standardu Malamité (100 bp) a do jiných jamek také pozitivní i negativní kontrola o objemu 15 µl.
- Vanička obsahující gel byla následně vložena do elektroforetické vany a byla přelita roztokem 0,5 × TBE pufru asi 1 cm nad výšku gelu.
- Po připojení ke zdroji bylo zkontrolováno správné zapojení k anodě / katodě a byla spuštěna elektroforéza, která trvala 1,5 hod při konstantním napětí 70 V.
- V čase ukončení byl vypnut zdroj napětí a konektory byly vyjmuty, roztok TBE pufru byl vylit a gel byl vyfotografován pod UV světlem na přístroji Azure™ c 200.

5 VÝSLEDKY

5.1 Kultivace bakterií z reálných vzorků

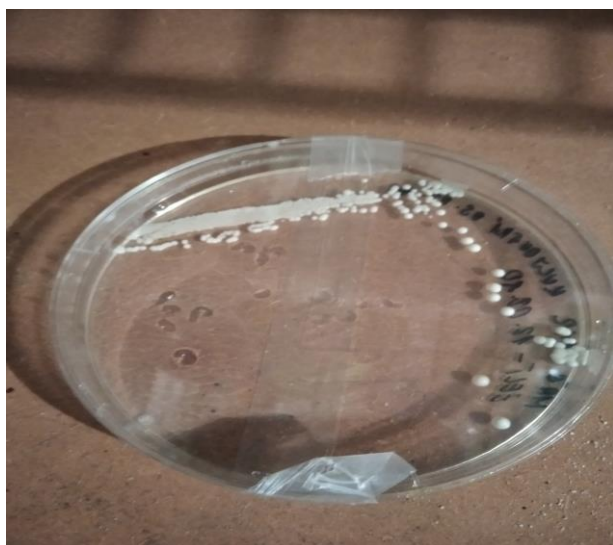
Kultury pocházející z reálných vzorků byly kultivovány v tekutém MRS mediu po dobu 24-48 hodin při teplotě 37 °C až do vzniku patrného bílého zákalu. Následně byly tyto kultury pomocí křížového roztěru kultivovány na bakteriologickém agaru.



Obrázek 4 - Sedimentované kolonie rodu Lactobacillus z houby Kombucha v tekutém MRS mediu



Obrázek 5 – Křížový roztěr kolonií laktobacilů z houby Kombucha na MRS agaru



Obrázek 6 - Křížový roztěr kolonií laktobacilů na MRS agaru z kysaného zelí Andaco Premium



Obrázek 7 - Křížový roztěr kolonií laktobacilů na MRS agaru z okurků TESCO

5.2 Izolace bakteriální DNA metodou fenol-chloroformové extrakce

Z čistých kultur v tekutém médiu bylo po důkladném promíchání odebráno alikvotní množství k fenolové extrakci. Po extrakci proběhlo ethanolové srážení a vzorky rozpuštěné v TE pufru byly umístěny do lednice přibližně na 24 hodin.

5.3 Izolace bakteriální DNA pomocí komerčního kitu Omni Bacterial DNA Purification Kit

Pro účely izolace bakteriální DNA pomocí komerčního kitu byly použity buňky narostlé v tekutém MRS médiu obdobně jako u fenol-chloroformové extrakce. Izolace byla provedena s pomocí protokolu určeného pro bakteriální izolaci dodaného výrobcem.

5.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA z bakteriálních kultur

Čistota a koncentrace izolované DNA byla ověřena pomocí spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Z poměru absorbancí byla stanovena čistota bakteriální DNA. Výsledky spektrofotometrického stanovení jsou uvedeny v Tabulce 3 pro fenolovou extrakci a v Tabulce 4 pro izolaci pomocí Omni Bacterial DNA Purification Kit.

Tabulka 5 – spektrofotometrické stanovení vyizolované bakteriální DNA pomocí metody fenol-chloroformu

Vzorek	DNA č.	A ₂₆₀ nm [-]	A ₂₈₀ nm [-]	A ₂₆₀ nm/280nm [-]	c DNA [ng/μl]
Kombucha	1	23,143	11,451	2,02	1157,2
	2	47,290	21,681	2,18	2364,5
	3	55,379	26,291	2,11	2769,0
	1.1	7,783	4,200	1,85	389,1
	2.1	7,330	4,191	1,75	366,5
	3.1	7,093	4,100	1,73	354,7
Zelí	1	58,702	27,160	2,16	2935,1
	2	9,410	4,630	2,03	470,5
	3	32,462	15,327	2,12	1623,1
	1.1	7,528	4,141	1,82	376,4
	2.1	7,235	4,052	1,79	361,7
	3.1	5,664	3,226	1,76	283,2
Okurek	1	1,880	1,201	1,57	94,0
	2	0,437	0,262	1,67	21,9
	3	0,761	0,403	1,89	38,0
	4	2,207	1,425	1,55	110,4
	5	3,068	1,901	1,61	153,4
	6	1,703	1,122	1,52	85,2
	7	1,981	1,24	1,60	99,1
	1.1	2,388	1,538	1,55	119,4
	2.1	2,368	1,523	1,56	118,4
	3.1	0,797	0,515	1,55	39,8
	4.1	0,782	0,510	1,53	39,1
	5.1	4,311	2,140	2,01	215,6
	6.1	2,056	1,172	1,75	102,8
	7.1	3,898	2,107	1,85	194,9

Tabulka 6 – spektrofotometrické stanovení vyizolované bakteriální DNA pomocí komerčního kitu

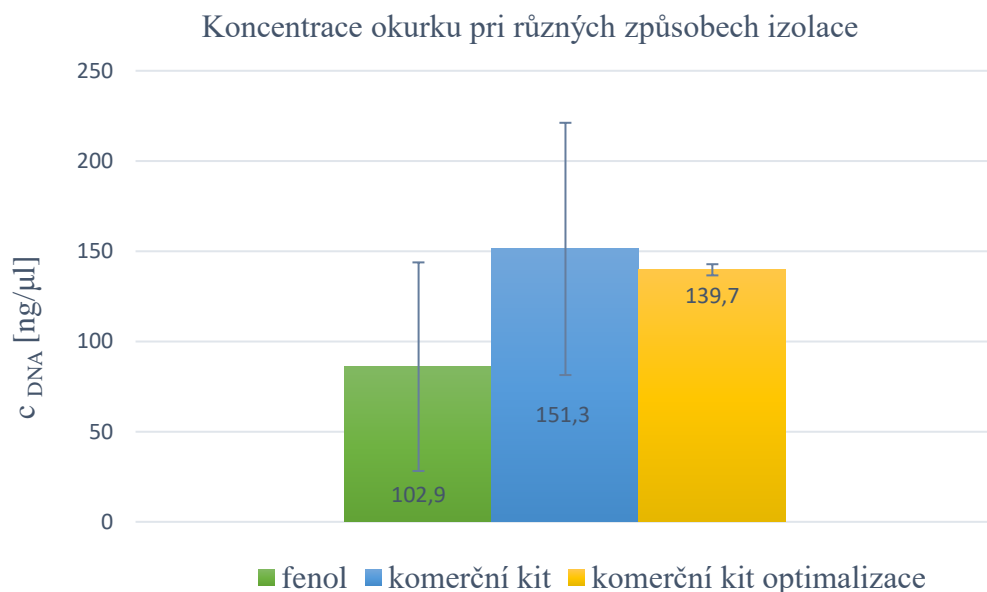
Vzorek	DNA č.	A _{260 nm} [-]	A _{280 nm} [-]	A _{260 nm/280nm} [-]	c DNA [ng/μl]
Kombucha	1	0,056	0,033	1,7	2,8
	1.1	0,037	0,020	1,87	1,9
	2	0,155	0,088	1,77	7,8
	2.1	0,225	0,124	1,81	11,3
	3 HL	1,261	0,626	2,02	63,1
	3.1 HL	1,303	0,698	2,18	66,8
Zelí	1	0,098	0,061	1,60	4,9
	1.1	0,084	0,047	1,81	4,2
	2	0,113	0,059	1,91	5,6
	2.1	0,147	0,102	1,44	7,3
	3 HL	2,54	1,168	2,17	127,0
	3.1 HL	2,62	1,175	2,09	136,6
Okurek	1	1,842	1,035	1,78	92,1
	1.1	1,434	0,804	1,78	71,7
	2	4,543	2,457	1,85	227,1
	2.1	4,283	2,316	1,85	214,2
	3 HL	2,731	1,459	1,87	136,6
	3.1 HL	2,716	1,468	1,91	142,8

5.5 Porovnání koncentrace a čistoty DNA na základě odlišných způsobu izolace

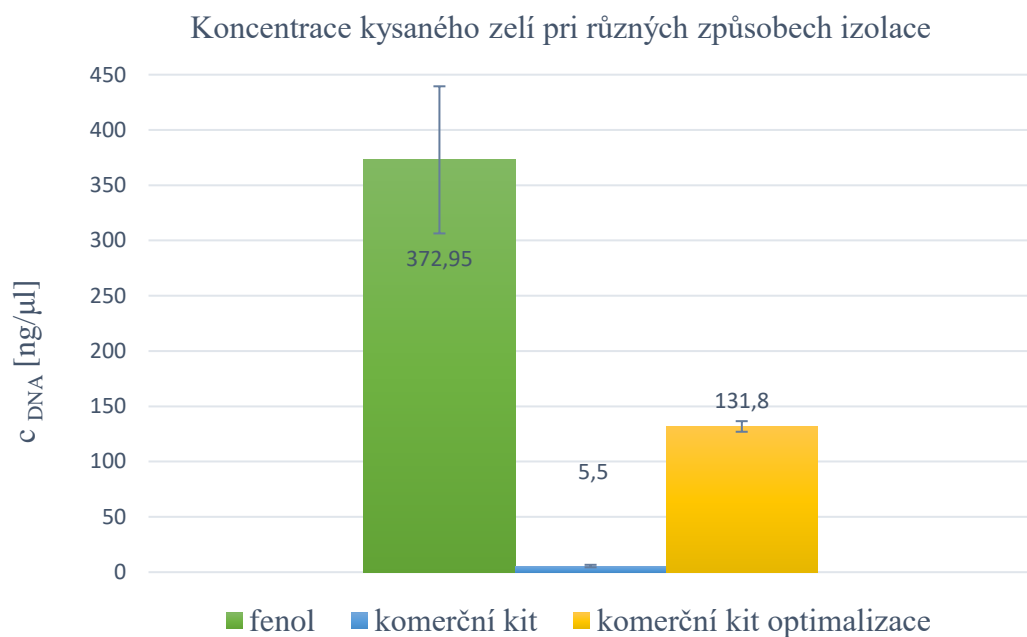
Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla proměřena na Nanodropu 2000 pro oba způsoby izolace a výsledky byly srovnány. Pro lepší vizualizaci příslušných koncentrací byly sestrojeny v programu MS EXCEL sloupcové grafy znázorňující množství vyizolované DNA pro jednotlivé vzorky. Bylo zjištěno, že při izolaci bakteriální DNA okurku byly koncentrace vyšší při použití komerčního kitu Omni Bacterial DNA Purification Kit. Optimalizace značí, že byly nejprve izolovány hrubé lyzáty buněk a teprve pak bylo postupováno dle protokolu od bodu 13. V případě izolace bakteriální DNA zelí i houby Kombucha byla optimalizace mnohem efektivnější než samostatní izolace zahrnující všechny body protokolu, avšak pro tyto vzorky byla mnohem větší výtěžnost DNA při použití metody fenol-chloroformu. Není však zřejmé, jestli izolace DNA fenol-chloroformovou metodou nezahrnula i izolaci DNA jiných mikroorganismů (např. kvasinek) či rostlinnou DNA.

POZN: hodnoty koncentrace zkrslující grafické znázornění byly ze souboru hodnot vyřazeny

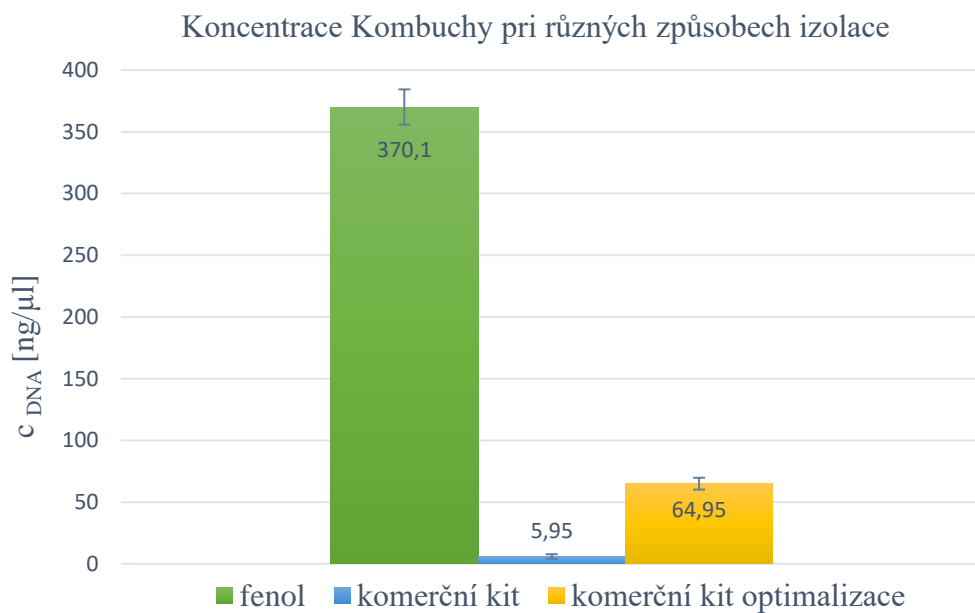
Graf 1 – porovnání koncentrace DNA izolované metodou fenol-chloroformu, komerčním kitem a optimalizací pro vzorek okurku



Graf 2 - porovnání koncentrace DNA izolované metodou fenol-chloroformu, komerčním kitem a optimalizací pro vzorek kysaného zelí Andaco Premium



Graf 3 - porovnání koncentrace DNA izolované metodou fenol-chloroformu, komerčním kitem a optimalizací pro vzorek houby Kombucha

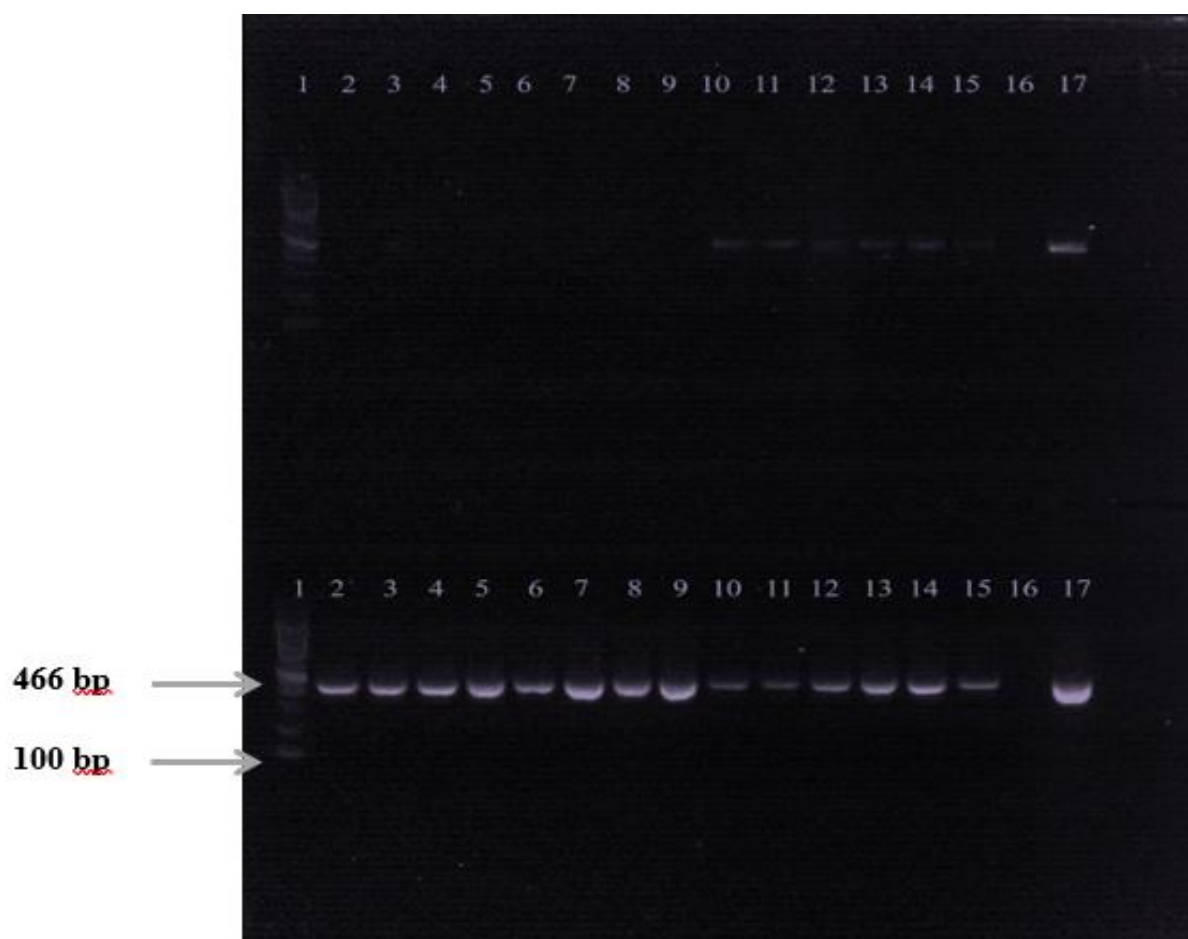


5.6 Naředění DNA na koncentraci 10 ng/μl

Pro účely polymerázové řetězové reakce bylo nutno naředit vzorky DNA na požadovanou koncentraci 10 ng/μl. Ředění probíhalo tak, že koncentrace vzorku obsahující DNA byla vždy rovna objemu 10 μl a na zředění byl použit roztok TE pufru podle příslušné koncentrace. (Př.: jestliže koncentrace vzorku byla 100 ng/ μl, pak byla od této hodnoty odečtena 10 a zbylý objem představoval množství TE pufru, v tomto případě 90 μl.) Následně byly takto naředěné vzorky použity na amplifikaci.

5.7 Kvantitativní qPCR specifická pro doménu *Bacteria*

Pomocí qPCR byla ověřena přítomnost bakteriální DNA. Pro reakci byly vybrány specifické primery R_eub a F_eub specifické pro doménu *Bacteria*, s očekávanou velikostí amplikonu 466 bp. Tyto primery umožnily ověření přítomnosti bakterií ve vzorcích zelí, okurku i houby Kombucha. RT-PCR byla provedena jak pro DNA izolovanou pomocí fenolové extrakce, tak pro DNA izolovanou komerčním kitem Omni Bacterial DNA Purification Kit. Produkty PCR byly detekovány pomocí gelové elektroforézy na Obrázku 8 a 9.

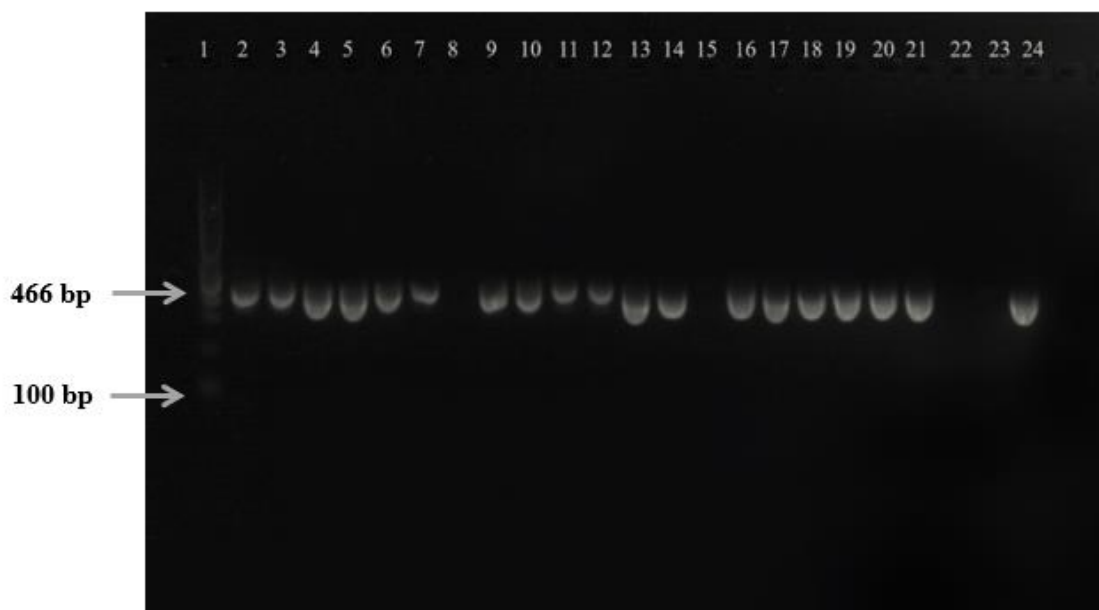


Obrázek 8 – Agarózová gelová elektroforéza produktů specifických pro doménu *Bacteria* připravených metodou fenolové extrakce

Tabulka 7 – výsledky gelové agaróзовé elektroforézy pro doménu *Bacteria* pomocí izolace DNA fenolovou extrakcí

- - PCR produkt nebyl detekován
- + PCR produkt byl slabě detekován
- ++ PCR produkt byl detekován silněji
- +++ PCR produkt vykazoval velkou intenzitu
- x mezeřa
- NK – negativní kontrola (bez DNA matrice)
- PK – pozitivní kontrola (10 ng/μl: *Lactobacillus Casei*)

První Řada	Vzorek DNA	Produkt PCR	Druhá Řada	Vzorek DNA	Produkt PCR
1	DNA standard 100 bp	-	1	DNA standard 100 bp	-
2	Kombucha 1	-	2	Okurek TESCO 1	+++
3	Kombucha 2	-	3	Okurek TESCO 2	+++
4	Kombucha 3	-	4	Okurek TESCO 3	+++
5	Kombucha 1.1	-	5	Okurek TESCO 4	+++
6	Kombucha 2.1	-	6	Okurek TESCO 5	+++
7	Kombucha 3.1	-	7	Okurek TESCO 6	+++
8	x	x	8	Okurek TESCO 7	+++
9	x	x	9	Okurek TESCO 1.1	+++
10	Zelí Andaco Premium 1	+	10	Okurek TESCO 2.1	++
11	Zelí Andaco Premium 2	+	11	Okurek TESCO 3.1	++
12	Zelí Andaco Premium 3	+	12	Okurek TESCO 4.1	++
13	Zelí Andaco Premium 1.1	+	13	Okurek TESCO 5.1	+++
14	Zelí Andaco Premium 2.1	+	14	Okurek TESCO 6.1	+++
15	Zelí Andaco Premium 3.1	+	15	Okurek TESCO 7.1	++
16	NK	-	16	NK	-
17	PK	++	17	PK	+++



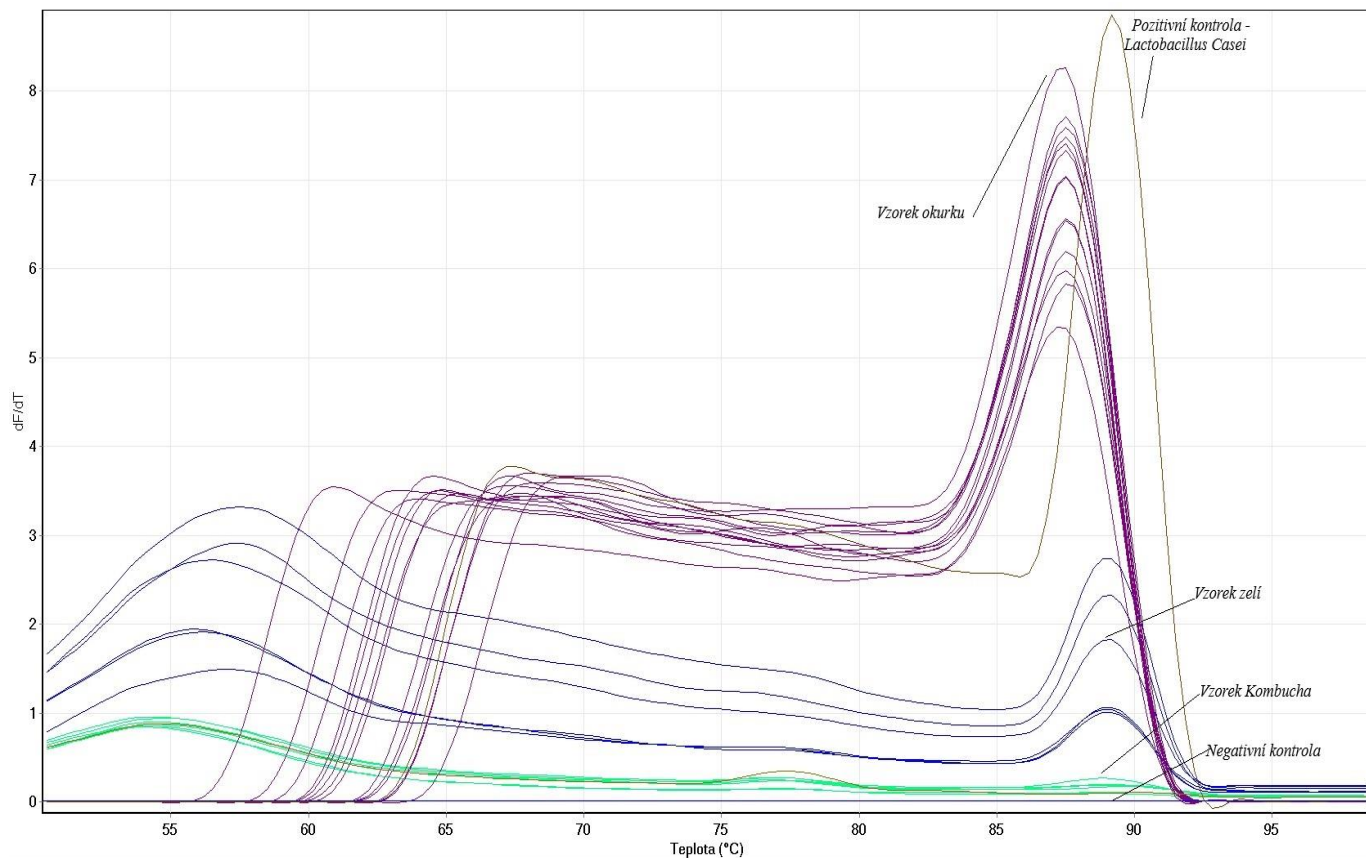
Obrázek 9 - Agarózová gelová elektroforéza produktů specifických pro doménu Bacteria připravených pomocí kitu Omni Bacterial DNA Purification Kit

Tabulka 8 - výsledky gelové agarózové elektroforézy pro doménu Bacteria pomocí izolace DNA pomocí komerčního kitu Omni Bacterial DNA Purification Kit

Běh č.	Vzorek DNA	Produkt PCR	Běh č.	Vzorek DNA	Produkt PCR
1	DNA standard 100 bp	-	13	Kombucha 2	++
2	Zelí Andaco Premium HL 1	++	14	Kombucha 2.1	++
3	Zelí Andaco Premium HL 1.1	++	15	x	x
4	Zelí Andaco Premium 1	++	16	Okurek TESCO HL 1	+++
5	Zelí Andaco Premium 1.1	++	17	Okurek TESCO HL 1.1	+++
6	Zelí Andaco Premium 2	++	18	Okurek TESCO 1	+++
7	Zelí Andaco Premium 2.1	++	19	Okurek TESCO 1.1	+++
8	x	x	20	Okurek TESCO 2	+++
9	Kombucha HL 1	++	21	Okurek TESCO 2.1	+++
10	Kombucha HL 1.1	++	22	x	-
11	Kombucha 1	++	23	NK	-
12	Kombucha 1.1	++	24	PK	+++

5.7.1 Analýza křivek tání pro doménu *Bacteria* – izolace fenolovou extrakcí

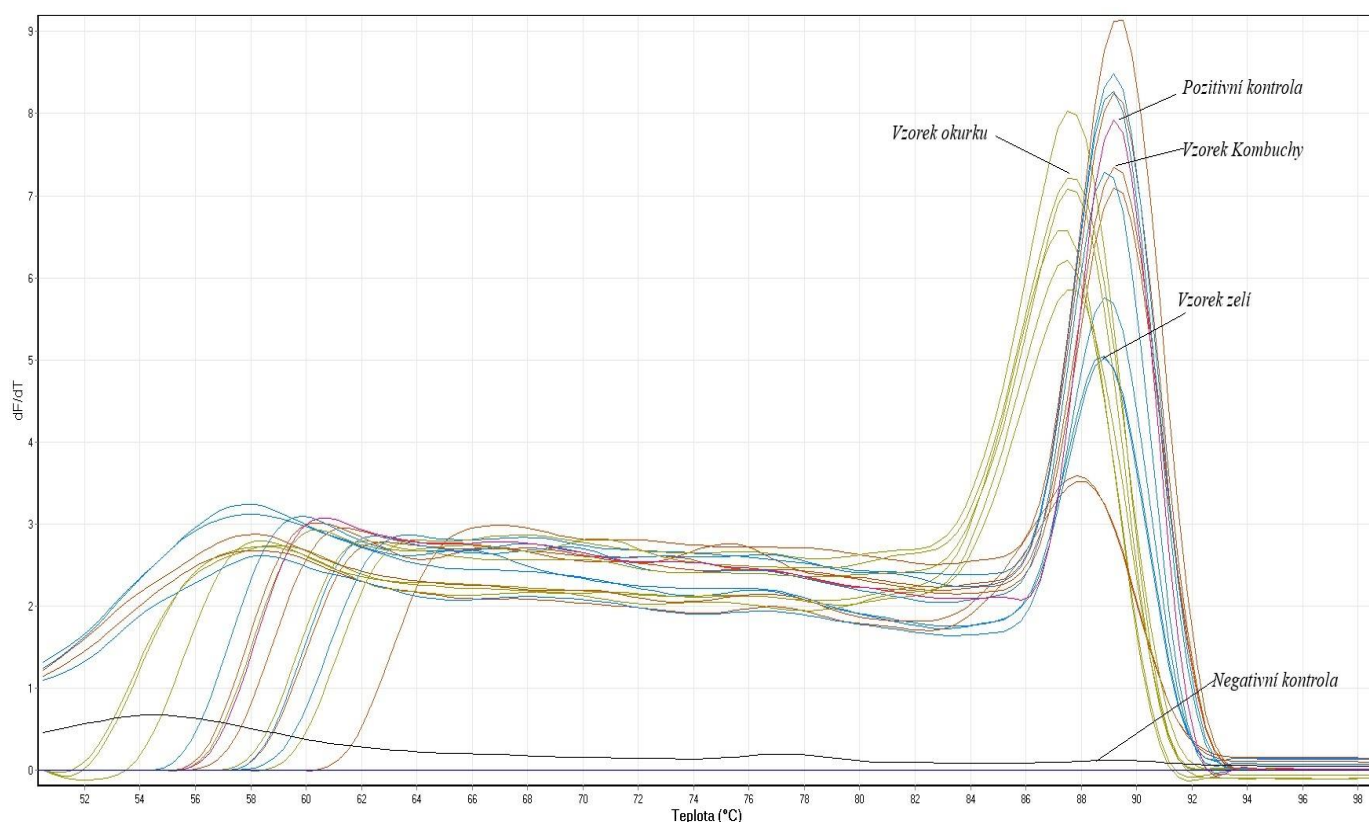
Během RT-PCR procesu byly zhotoveny programem RotorGene 6000 křivky tání jednotlivých specifických produktů. S využitím primerů F_eub a R_eub se podařilo naamplifikovat konkrétní úsek bakteriální DNA. U vzorků okurku i zelí je patrné, že se úsek amplifikoval, avšak u vzorků houby Kombucha je amplifikace nepatrná až zanedbatelná, čemuž odpovídá i detekce pomocí metody gelové elektroforézy (viz výše – Obrázek 6).



Obrázek 10 – křivky tání pro doménu *Bacteria* vyhotovené z DNA vyizolované pomocí metody fenol-chloroformu; fialové křivky příslouchají vzorkům okurku, modré křivky vzorkům zelí, zelené křivky vzorkům houby Kombucha, pozitivní kontrola je vyznačena tmavo-modře, negativní kontrola šedě

5.7.2 Analýza křivek tání pro doménu *Bacteria* – izolace komerčním kitem

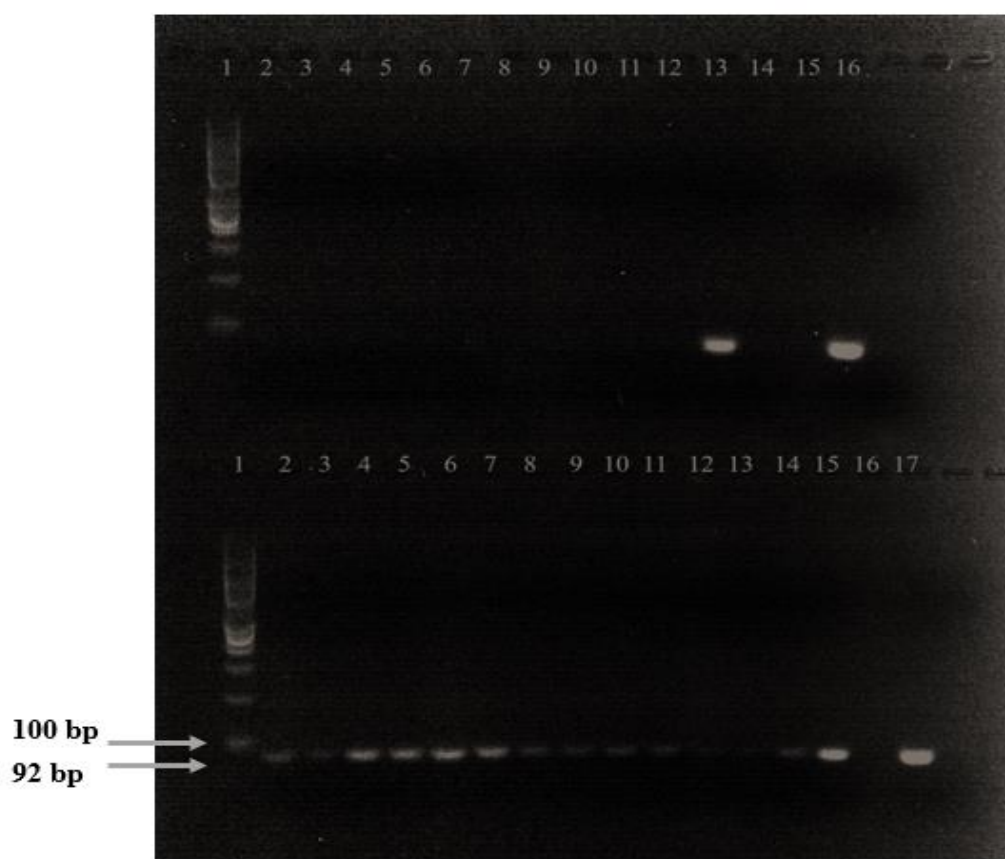
RT-PCR aplikována na vzorky vyizolované pomocí kitu Omni Bacterial DNA Purification Kit poskytla lepší výsledek. Byly naamplifikovány všechny vzorky okurku, zelí i Kombuchy. Reakce probíhala analogicky jako v prvním případě pro DNA izolovanou fenolovou extrakcí. Byly použity stejné primery F_eub a R_eub. Výsledky namerené na RotoruGene 6000 odpovídají detekci pomocí metody gelové elektroforézy. (Viz. Obrázek 9)



Obrázek 11 – křivky tání pro doménu *Bacteria* vyhotovené z DNA izolované pomocí komerčního kitu Omni Bacterial DNA Purification Kit; zelené křivky přísluší vzorkům okurku, modré křivky vzorkům zelí, hnědé křivky vzorkům houby Kombucha, pozitivní kontrola je vyznačena růžově, negativní kontrola šedě

5.8 Kvantitativní qPCR specifická pro rod *Lactobacillus*

Při rodově specifické RT-PCR byla ověřena přítomnost probiotického rodu *Lactobacillus*. Pro reakci byly vybrány specifické primery R_allact a F_allact o velikosti 92 bp. Tyto primery umožnily ověření přítomnosti rodu *Lactobacillus* ve vzorcích zelí, okurku i houby Kombucha. RT-PCR byla provedena jak pro DNA vyizolovanou pomocí fenolové extrakce, tak pro DNA vyizolovanou z komerčního kitu Omni Bacterial DNA Purification Kit. Produkty PCR byly detekovány pomocí gelové elektroforézy a pořízená fotografie je uvedena na Obrázku 11 a 12.



Obrázek 12 – Agarózová gelová elektroforéza produktů specifických pro rod *Lactobacillus* připravených pomocí metody fenol-chloroformu

Tabulka 9 – výsledky garóзовé gelové elektroforézy pro rod *Lactobacillus* izolovaný metodou fenolové extrakce

První Řada	Vzorek DNA	Produkt PCR	Druhá Řada	Vzorek DNA	Produkt PCR
1	DNA standard 100 bp	-	1	DNA standard 100 bp	+
2	Zelí Andaco Premium 1	-	2	Okurek TESCO 1	+
3	Zelí Andaco Premium 1.1	-	3	Okurek TESCO 2	++
4	Zelí Andaco Premium 2	-	4	Okurek TESCO 3	++
5	Zelí Andaco Premium 2.1	-	5	Okurek TESCO 4	++
6	Zelí Andaco Premium 3	-	6	Okurek TESCO 5	++
7	Zelí Andaco Premium 3.1	-	7	Okurek TESCO 6	+
8	x	x	8	Okurek TESCO 7	+
9	x	x	9	Okurek TESCO 1.1	+
10	Kombucha 1	-	10	Okurek TESCO 2.1	+
11	Kombucha 2	-	11	Okurek TESCO 3.1	+
12	Kombucha 3	-	12	Okurek TESCO 4.1	+
13	Kombucha 1.1	+++	13	Okurek TESCO 5.1	+
14	Kombucha 2.1	-	14	Okurek TESCO 6.1	+
15	Kombucha 3.1	-	15	Okurek TESCO 7.1	++
16	NK	-	16	NK	-
17	PK	+++	17	PK	+++



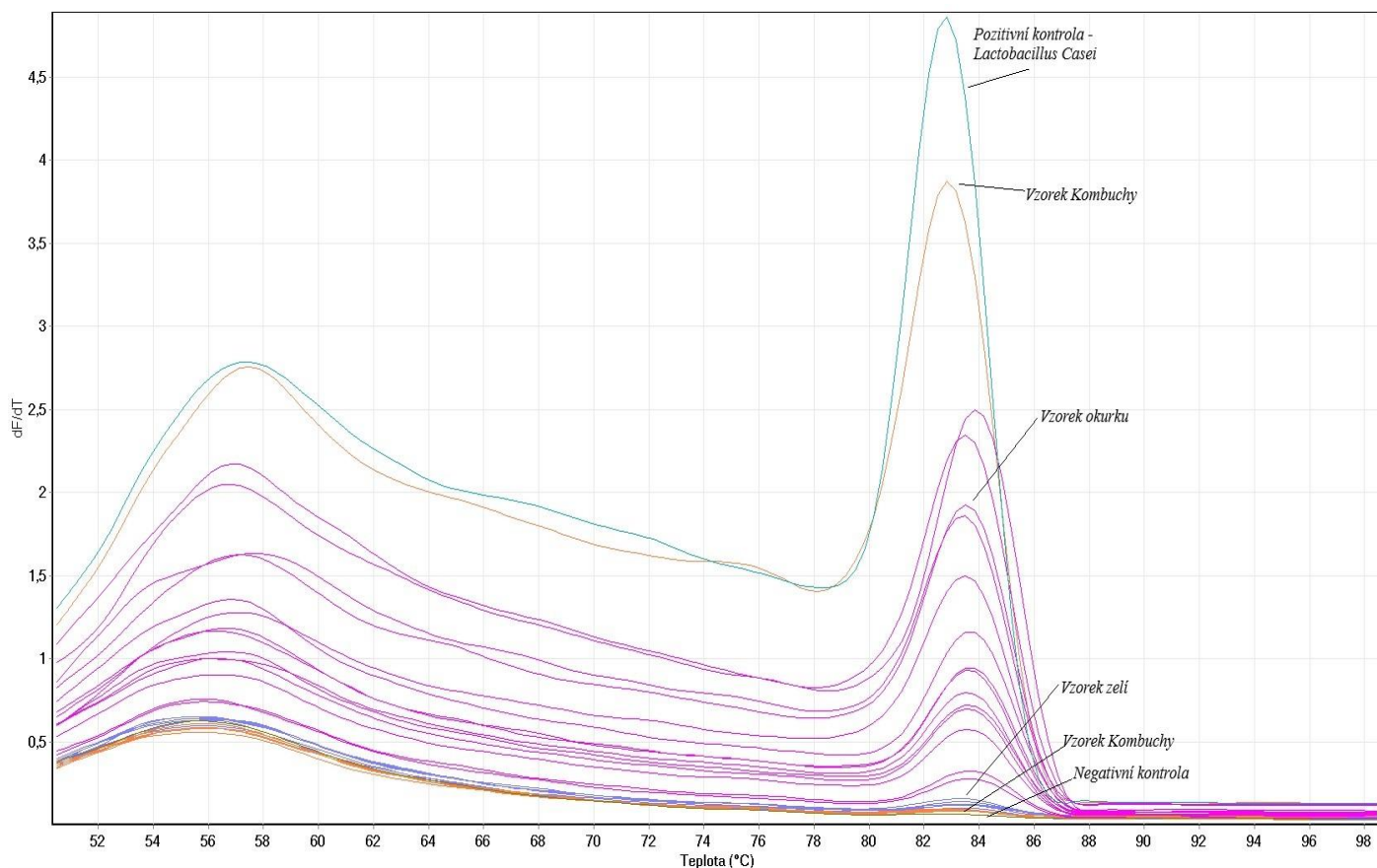
Obrázek 13 - Agarózová gelová elektroforéza produktů specifických pro rod *Lactobacillus* připravených pomocí komerčního kitu *Omni Bacterial DNA Purification Kit*

Tabulka 10 – výsledky agarózové gelové elektroforézy pro rod *Lactobacillus* vyizolovaný komerčním kitem *Omni Bacterial DNA Purification Kit*

Běh č.	Vzorek DNA	Produkt PCR	Běh č.	Vzorek DNA	Produkt PCR
1	DNA standard 100 bp	-	13	Kombucha 2	++
2	Zelí Andaco Premium HL 1	++	14	Kombucha 2.1	++
3	Zelí Andaco Premium HL 1.1	++	15	x	x
4	Zelí Andaco Premium 1	++	16	Okurek TESCO HL 1	+++
5	Zelí Andaco Premium 1.1	++	17	Okurek TESCO HL 1.1	+++
6	Zelí Andaco Premium 2	++	18	Okurek TESCO 1	+++
7	Zelí Andaco Premium 2.1	++	19	Okurek TESCO 1.1	+++
8	x	x	20	Okurek TESCO 2	+++
9	Kombucha HL 1	++	21	Okurek TESCO 2.1	+++
10	Kombucha HL 1.1	++	22	x	-
11	Kombucha 1	++	23	NK	-
12	Kombucha 1.1	++	24	PK	+++

5.8.1 Analýza křivek tání pro rod *Lactobacillus* – izolace fenolovou extrakcí

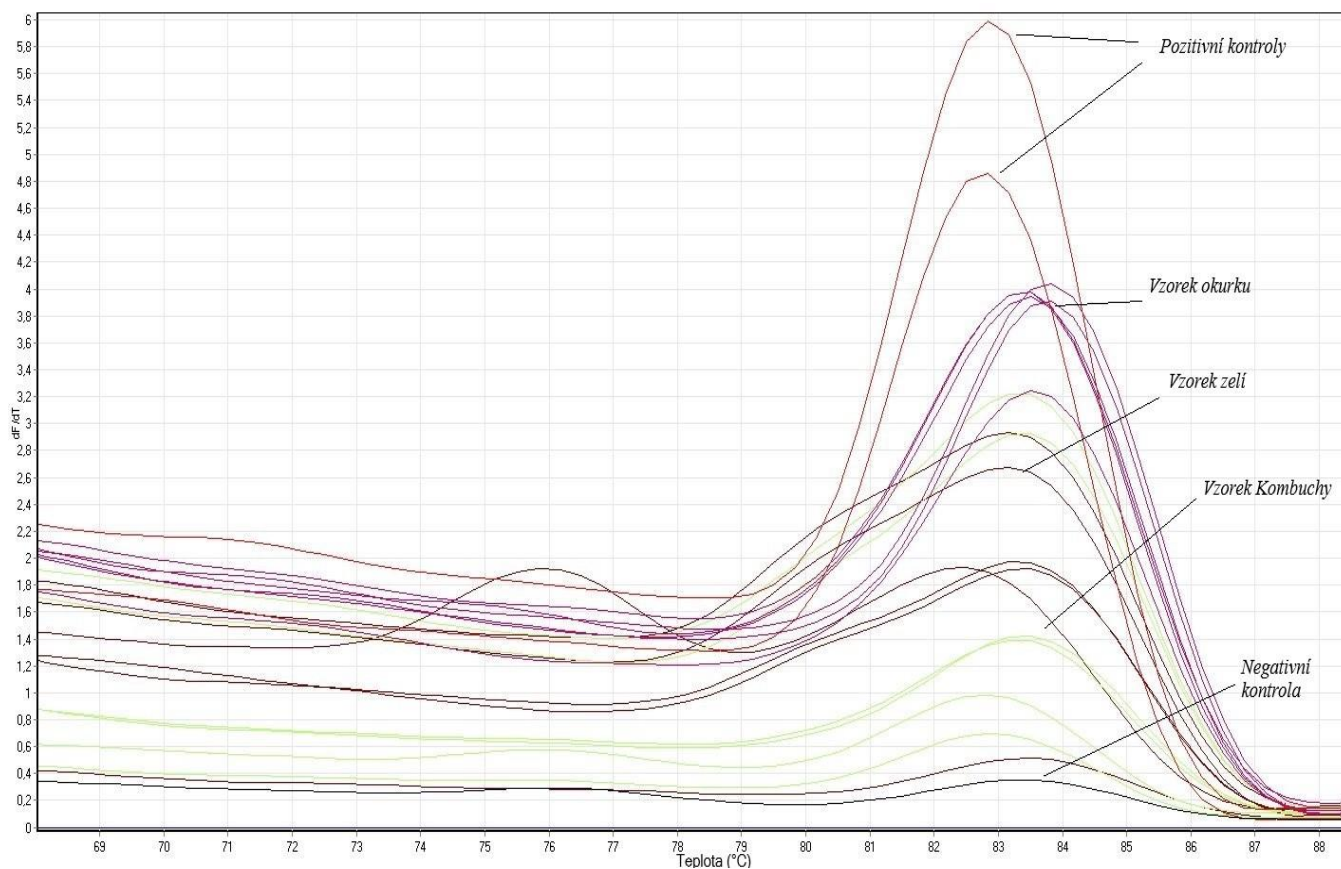
Křivky tání pro rod *Lactobacillus* jsou znázorněny na Obrázku 12. Fenolovou extrakcí vyizolovaná DNA byla amplifikována dobře u vzorků okurku, částečně u vzorků zelí. U houby Kombucha byla amplifikace téměř zanedbatelná, kromě jednoho vzorku vyznačeného v Obrázku 12. Je možné, že tento vzorek byl kontaminován při procesu míchání Master Mixu s bakteriální DNA jiných vzorků.



Obrázek 14 – křivky tání pro rod *Lactobacillus* vyhotovené z DNA vyizolované pomocí fenolové extrakce; růžové křivky příslouchají vzorkům okurku, modré křivky vzorkům zelí, oranžové křivky vzorkům houby Kombucha, pozitivní kontrola je vyznačena zeleně, negativní kontrola šedě

5.8.2 Analýza křivek tání pro rod *Lactobacillus* – izolace komerčním kitem

Amplifikace úseku bakteriální DNA s využitím primerů F_alllact a R_alllact proběhla lépe než u DNA vyizolované fenolovou extrakcí. Nejslabší koncentraci vykazovaly opět vzorky Kombuchy. Jelikož jsou křivky tání z reálných vzorků posunuty k vyšší teplotě, je možné konstatovat, že se jednalo o jiný druh než u pozitivní kontroly *Lactobacillus Casei*.



Obrázek 15 – křivky tání pro rod *Lactobacillus* vyhotovené z DNA vyizolované pomocí komerčního kitu *Omni Bacterial DNA Purification Kit*; fialové křivky příslouchají vzorkům okurku, modré křivky vzorkům Kombuchy, hnědé křivky vzorkům zelí, pozitivní kontrola je vyznačena červeně, negativní kontrola šedě

6 DISKUZE

6.1 Kultivace probiotických bakterií

Kultivaci probiotických bakterií bylo nutno provést vzhledem k tomu, že DNA vyizolovaná z nálevů reálných vzorků neměla dostatečnou čistotu a kvalita této DNA nebyla postačující k další práci. Jako kultivační médium bylo zvoleno MRS médium (de Man, Rogosa a Sharp) uvedeno v literatuře jako spolehlivé kultivační médiím pro rod *Lactobacillus*.

Ze vzorku zelí i houby Kombucha byly kultivovány laktobacily po dobu 48 hodin až do zřetelného bílého zákalu. Tyto čisté kultury byly skladovány v aseptických podmínkách v lednici a následně používány k experimentům. Čistota byla potvrzena i roztěrem na agarové plotny. Kultury byly srovnány s pozitivní kontrolou, kterou byl probiotický druh *Lactobacillus Rhamnosus* CCM 4798, jehož výsev na agarovou plotnu byl proveden paralelně s kultivací bakterií z reálných vzorků. Tvar, velikost i barva kolonií reálných vzorků odpovídala přesně těmto vlastnostem pozitivní kontroly [73].

6.2 Izolace DNA fenol-chloroformovou metodou

Z čistých kultur obsahujících probiotické bakterie byly připraveny hrubé lyzáty buněk. Následná izolace bakteriální DNA byla provedena metodou fenol-chloroformové extrakce, která nachází své uplatnění v oblasti molekulární biologie a ačkoli je starší, je velmi citlivou a přesnou metodou [74]. Pročistění DNA bylo realizováno pomocí ethanolového srážení.

Po rozpuštění nukleových kyselin v roztoku TE byla stanovena koncentrace a čistota DNA na přístroji Nano Drop 2000. Koncentrace DNA se pohybovala v rozmezí 470,5 – 2935,1 ng/μl. Na základě poměrů absorbancí A_{260}/A_{280} byla zjištěna míra kontaminace proteiny. Jelikož hodnoty u vzorků zelí a vzorků Kombuchy nepoklesli pod hodnotu poměrů nižší než 1,7 je možno konstatovat, že vzorky nebyly kontaminovány proteiny. V případě kvašených okurků byla hodnota nižší, což značí znečištění proteiny [73].

6.3 Izolace bakteriální DNA pomocí komerčního kitu Omni Bacterial DNA Purification Kit

Jiná metoda použita přímo na izolaci bakteriální DNA byla aplikována na všechny vzorky rostlinných fermentovaných produktů stejně jako v prvním případě. Je možné konstatovat, že izolace komerčním kitem poskytla čistější DNA, což bylo určeno opět spektrofotometrickým stanovením. Poměry absorbancí A_{260}/A_{280} až na dvě výjimky nepoklesly pod hodnotu 1,7; DNA byla tedy ve vhodné kvalitě pro molekulární metody a nevykazovala větší kontaminaci. Jelikož byla souprava určena přímo pro bakteriální izolaci, výsledky jsou přesnější než v případě fenolové extrakce, kde mohlo dojít i k vyizolování jiných mikroorganismů či rostlinné DNA. Nižší je však výtěžek DNA, který ale postačoval i pro metodu PCR a nebránil správné amplifikaci.

6.4 Kvantitativní qPCR specifická pro doménu *Bacteria*

Přítomnost bakteriální DNA byla ověřena metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria* a to F_eub a R_eub o délce 466 bp [75]. V případě vzorků, u kterých byla provedena izolace DNA fenol-chloroformovou metodou se amplifikovali správně vzorky okurků a v menší míře také vzorky zelí, u houby Kombucha byla amplifikace jen částečná a nedokonalá.

6.5 Kvantitativní qPCR specifická pro rod *Lactobacillus*

Pomocí PCR v reálném čase byl amplifikován úsek DNA odpovídající použitým primerům F_alllact a R_alllact o délce 92 bp. Byla tedy potvrzena přítomnost rodu *Lactobacillus* dle Haarmanové (*Lactobacillus spp.*) ve všech vzorcích [75]. Amplifikace byla různá, avšak obecně lepší výsledky poskytovala PCR pro DNA izolovanou komerčním kitem Omni Bacterial DNA Purification Kit. Ve srovnání s pozitivní kontrolou, již byl druh *Lactobacillus Casei*, je možné konstatovat, že vzorky obsahovaly kromě tohoto druhu i jiné druhy laktobacilů, což vyplývá z různých teplot tání specifických produktů. Produkty PCR detekované pomocí agarózové gelové elektroforézy měly délku 92 bp. DNA izolovaná pomocí komerčního kitu se amplifikovala správně, a proto byly vizualizovány fragmenty u všech vzorků. Naopak, u DNA izolované fenolovou extrakcí byla přítomnost rodu *Lactobacillus* prokázána pouze u jednoho vzorku houby Kombucha a u všech vzorků okurku.

6.6 Srovnání dvou metod izolace bakteriální DNA

Z výše uvedených výsledků lze konstatovat, že DNA izolována metodou fenolové extrakce převyšovala kvantitou nad kvalitou nukleových kyselin. Ačkoli byly koncentrace všech vzorků vyšší při fenol-chloroformové izolaci, je také patrné, že byly mnohem kontaminovanější, než v případě izolace komerčním kitem Omni Bacterial DNA Purification Kit. Detekce PCR produktů pomocí gelové agarózové elektroforézy umožnila sledovat rozdíly mezi dvěma izolacemi. Zatímco u fenolové extrakce jsou amplikony slabě viditelné až nerozlišitelné, v případě izolace DNA komerčním kitem se podařilo zachytit všechny PCR produkty pocházející z reálných vzorků jak u domény *Bacteria*, stejně tak u rodu *Lactobacillus*. Mnohem efektivnější i spolehlivější byla tedy izolace pomocí soupravy určené pro bakterie.

7 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce je kladen důraz především na pozitivní účinky probiotik pro člověka a zisk těchto mikroorganismů z potravin se zaměřením na nemléčné kvašené produkty. Jelikož se populace setkává s čím dál většími potížemi spojenými s gastrointestinálním traktem, je nutné vzít v potaz konzumaci probiotik a nejlépe z rostlinných nebo mléčně kvašených produktů, jež jsou levné, nenáročné na přípravu a mnohokrát účinnější než komerční potravinové doplňky obsahující probiotika.

Praktická část se soustředí na izolaci DNA probiotických bakterií ze třech komerčních produktů a její následní identifikaci pomocí metody RT-PCR za použití specifických primerů. Izolace byla provedená dvojím způsobem, a to:

- Izolace metodou fenol-chloroformu
- Izolace komerčním kitem Omni Bacterial DNA Purification Kit

Výsledky obou izolací byly vzájemně srovnány a odvodily se následující závěry. Izolace komerční soupravou byla účinnější v rámci kvality a čistoty výsledné DNA, izolace fenolovou extrakcí poskytla vyšší kvantitu DNA, avšak není zřejmé, jestli se jednalo o požadovanou bakteriální DNA nebo jiné např. kvasinkové nukleové kyseliny. Čistota byla tedy nižší než u izolace komerční soupravou.

Identifikace bakterií byla realizována formou molekulární metody RT-PCR, která v reálném čase zaznamenávala průběh amplifikace. Byly provedeny qPCR pro všechny vzorky vyizolované DNA s využitím specifických primerů pro doménu *Bacteria* i rod *Lactobacillus*. Úsek DNA o přesném poradí bází byl amplifikován a vyhodnocen. DNA izolovaná fenolovou extrakcí byla amplifikovatelná hůře a specifický produkt byl přítomen primárně u okurku a částečně u zelí. U houby Kombucha se produkt neamplifikoval. Naopak, při použití DNA izolované komerční soupravou se amplifikovali všechny vzorky a byly zřetelně viditelné i na agarózovém gelu.

Je tedy možné konstatovat, že probiotika z reálných vzorků se lépe izolují specifickými soupravami určenými výhradně pro bakterie než fenolovou extrakcí určenou obecně pro izolaci nukleových kyselin jakéhokoliv biologického materiálu.

POUŽITÉ ZKRATKY

bp – base pair (pár bází)

CCM – Czech Collection of Microorganisms (Česká sbírka mikroorganismů)

CD - Crohn's disease (Crohnova choroba)

GIT – Gastrointestinal tract (gastrointestinální trakt)

HMO - Human milk oligosaccharides (oligosacharidy lidského mléka)

IBD - Inflammatory bowel diseases (zánětlivé střevní onemocnění)

IBS - Irritable bowel syndrome (syndrom dráždivého střeva)

PCR – Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

RT PCR – Real Time PCR (PCR v reálném čase)

UC - Ulcerative colitis (ulcerativní kolitida)

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MARTÍN R., MIGUEL S., ULMER J., KECHAOU N., LANGELLA P., BERMÚDEZ-HUMARÁN LG. *Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease*. *Microb Cell Fact* 2013;12:71-77
- [2] SARRAZIN P., MUSTAFA A., CHOUNARD P., RAGHAVAN G., SOTOCINAL S. Performance of dairy cows fed roasted sunflower seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2004;84:1179-85
- [3] JAHREIS G., FRITSCHÉ J., MÖCKEL P., SCHÖNE F., MÖLLER U., STEINHART H. The potential anticarcinogenic conjugated linoleic acid, cis-9,trans-11 C18:2, in milk of different species: Cow, goat, ewe, sow, mare, woman. *Nutrition Research* 1999;19:1541-9.
- [4] SANDERS M.E., MERENSTEIN D.J., REID G., GIBSON G.R., RASTALL R.A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2019;16:605-16.
- [5] DAS D.J., SHANKAR A., JOHNSON J.B., THOMAS S. Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*. *Nutrition* 2020;69:110567.
- [6] OZEN M., DINLEYICI E.C. The history of probiotics: the untold story. *Beneficial microbes* 2015;6:159-65.
- [7] GASBARRINI G., BONVICINI F., GRAMENZI A. Probiotics History. *Journal of clinical gastroenterology* 2016;50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015:S116-s9.
- [8] McFARLAND L.V. From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases* 2015;60:S85-S90.
- [9] SOKOL H., PIGNEUR B., WATTERLOT L., LAKHDARI O., BERMÚDEZ-HUMARÁN L.G., GRATADOUX J-J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:16731-6.
- [10] MIQUEL S., MARTIN R., ROSSI O., BERMUDEZ-HUMARAN L.G., CHATEL J.M., SOKOL H., et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Current opinion in microbiology* 2013;16:255-61.
- [11] HAMPE J., FRANKE A., ROSENSTIEL P., TILL A., TEUBER M., HUSE K., et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature genetics* 2007;39:207-11.
- [12] HUGOT J.P., CHAMAILLARD M., ZOUALI H., LESAGE S., CEZARD J.P., BELAICHE J., et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.

- [13] BAMIAS G., NYCE M.R., DE LA RUE S.A., COMINELLI F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Annals of internal medicine* 2005;143:895-904.
- [14] DANESE S., SANS M., FIOCCHI C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity reviews* 2004;3:394-400.
- [15] SHANAHAN F. Host-flora interactions in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 2004;10 Suppl 1:S16-24.
- [16] TANNOCK G.W. A special fondness for lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:3189-94.
- [17] SOKOL H., LAY C., SEKSIK P., TANNOCK G.W. Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? *Inflammatory bowel diseases* 2008;14:858-67.
- [18] JIA W., WHITEHEAD R.N., GRIFFITHS L., DAWSON C., WARING R.H., RAMSDEN D.B., et al. Is the abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* relevant to Crohn's disease? *FEMS microbiology letters* 2010;310:138-44.
- [19] FIJAN S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health* 2014;11:4745-67.
- [20] GOLDSTEIN E.J.C., TYRRELL K.L., CITRON D.M. Lactobacillus Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases* 2015;60:S98-S107.
- [21] CARMEN COLLADO M., HERNÁNDEZ M. Identification and differentiation of Lactobacillus, Streptococcus and Bifidobacterium species in fermented milk products with bifidobacteria. *Microbiological Research* 2007;162:86-92.
- [22] COUDEYRAS S., MARCHANDIN H., FAJON C., FORESTIER C. Taxonomic and Strain-Specific Identification of the Probiotic Strain Lactobacillus rhamnosus 35 within the Lactobacillus casei Group. *Applied and Environmental Microbiology* 2008;74:2679.
- [23] KUNKEL D. In: Lactobacillus bulgaricus yb, SEM, editor.: *Science Photo Library*.
- [24] FORD A.C., QUIGLEY E.M.M., LACY B.E., LEMBO A.J., SAITO Y.A., SCHILLER L.R., et al. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1547-62.
- [25] RUGGIERO P. Use of probiotics in the fight against Helicobacter pylori. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014;5:384-91.
- [26] CRIBBY S., TAYLOR M., REID G. Vaginal microbiota and the use of probiotics. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008;2008:256490- 256490.

- [27] SAAVEDRA J.M. Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* 2007;22:351-65.
- [28] LEWIS Z.T., TOTTEN S.M., SMILOWITZ J.T., POPOVIC M., PARKER E., LEMAY D.G., et al. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome* 2015;3:13-13.
- [29] KON K.. Bifidobacterium bacteria, illustration. *Science Photo Library*.
- [30] SCHELL M.A., KARMIRANTZOU M., SNEL B., VILANOVA D., BERGER B., PESSI G., et al. The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:14422-7.
- [31] COLLADO M.C., GUEIMONDE M., HERNANDEZ M., SANZ Y., SALMINEN S. Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of food protection* 2005;68:2672-8.
- [32] SERAFINI F., STRATI F., RUAS-MADIEDO P., TURRONI F., FORONI E., DURANTI S., et al. Evaluation of adhesion properties and antibacterial activities of the infant gut commensal Bifidobacterium bifidum PRL2010. *Anaerobe* 2013;21:9-17.
- [33] ROUND J.L., MAZMANIAN S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:313-23.
- [34] Nicola S, Amoruso A, Deidda F, Pane M, Allesina S, Mogna L, et al. Searching for the Perfect Homeostasis: Five Strains of Bifidobacterium longum From Centenarians Have a Similar Behavior in the Production of Cytokines. *Journal of clinical gastroenterology* 2016;50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015:S126-s30.
- [35] POKUSAEVA K., FITZGERALD G.F., VAN SINDEREN D. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & nutrition* 2011;6:285-306.
- [36] EL-SOUD N.H., SAID R.N., MOSALLAM D.S., BARAKAT N.A., SABRY M.A. Bifidobacterium lactis in Treatment of Children with Acute Diarrhea. A Randomized Double Blind Controlled Trial. *Open access Macedonian journal of medical sciences* 2015;3:403-7.
- [37] SINGHI S.C., KUMAR S. Probiotics in critically ill children. *F1000Research* 2016;5.
- [38] YATSUNENKO T., REY F.E., MANARY M.J., TREHAN I., DOMINGUEZ-BELLO M.G., CONTRERAS M., et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012;486:222-7.
- [39] FUKUDA S., TOH H., HASE K., OSHIMA K., NAKANISHI Y., YOSHIMURA K., et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 2011;469:543-7.

[40] CHICHLAWSKI M., DE LARTIGUE G., GERMAN J.B., RAYBOULD H.E., MILLS D.A. Bifidobacteria isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2012;55:321-7.

[41] HICKEY R.M. The role of oligosaccharides from human milk and other sources in prevention of pathogen adhesion. *International Dairy Journal* 2012;22:141-6.

[42] CHAMPAGNE C.P. Some Technological Challenges in the Addition of Probiotic Bacteria to Foods. In: Charalampopoulos D, Rastall RA, editors. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. New York, NY: Springer New York; 2009. p. 761-804.

[43] SAVARD T., GARDNER N., CHAMPAGNE C.P. Growth of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* cultures in a vegetable juice medium, and their stability during storage in a fermented vegetable juice. *Sciences des Aliments* 2003;23:273-83.

[44] CHARALAMPOPOULOS D., WANG R., PANDIELLA S.S., WEBB C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 2002;79:131-41.

[45] GRANATO D., BRANCO G.F., NAZZARO F., CRUZ A.G., FARIA J.A.F. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2010;9:292-302.

[46] JAYABALAN R., MALBAŠA R.V., LONČAR E.S., VITAS J.S., SATHISHKUMAR M. A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2014;13:538-50.

[47] DUFRESNE C., FARNWORTH E. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International* 2000;33:409-21.

[48] PETRUZZELLO M. Kombucha. [online] cit. [22.4.2020]

Dostupné z: <https://www.britannica.com/topic/kombucha>

[49] CHAKRAVORTY S., BHATTACHARYA S., CHATZINOTAS A., CHAKRABORTY W., BHATTACHARYA D., GACHHUI R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International journal of food microbiology* 2016;220:63-72.

[50] JAYABALAN R., MARIMUTHU S., SWAMINATHAN K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food chemistry* 2007;102:392-8.

[51] DE ROOS J., DE VUYST L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current opinion in biotechnology* 2018;49:115-9.

[52] MARSH A.J., HILL C., ROSS R.P., COTTER P.D. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology* 2014;38:113-24.

- [53] COTON M., PAWTOWSKI A., TAMINIAU B., BURGAUD G., DENIEL F., COULLOUMME-LABARTHE L., et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology* 2017;93.
- [54] WATAWANA M.I., JAYAWARDENA N., GUNAWARDHANA C.B., WAISUNDARA V.Y. Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with kombucha 'tea fungus'. *International Journal of Food Science & Technology* 2016;51:490-8.
- [55] SAIKI R., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K., HORN G., ERLICH H., et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, NY)* 1985;230:1350-4.
- [56] SAIKI R., GELFAND D., STOFFEL S., SCHARF S., HIGUCHI R., HORN G., et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, NY)* 1988;239:487-91.
- [57] DUBERNET S., DESMASURES N., GUEGUEN M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS microbiology letters* 2002;214:271-5.
- [58] TILSALA-TIMISJARVI A., ALATOSSAVA T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International journal of food microbiology* 1997;35:49-56.
- [59] COEURET V., DUBERNET S., BERNARDEAU M., GUEGUEN M., VERNOUX J.P. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait* 2003;83:269-306.
- [60] TEMMERMAN R., SCHEIRLINCK I., HUYS G., SWINGS J. Culture-Independent Analysis of Probiotic Products by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 2003;69:220-6.
- [61] BARTLETT J.M., STIRLING D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2003;226:3-6.
- [62] MULLIS K.B., ERLICH H.A., ARNHEIM N., HORN G.T., SAIKI R.K., SCHARF S.J. Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. United States 1989.
- [63] KLEPPE K., OHTSUKA E., KLEPPE R., MOLINEUX I., KHORANA H.G. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of molecular biology* 1971;56:341-61.
- [64] SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, NY)* 1988;239:487-91.

- [65] BERMINGHAM N., LUETTICH K. Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology* 2003;9:159-64.
- [66] RYCHLIK W., SPENCER W.J., RHOADS R.E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research* 1990;18:6409-12.
- [67] AU - LORENZ T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *JoVE* 2012:e3998.
- [68] OU C-Y., SCHOCHETMAN G., JONES W.K. Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Infectious Diseases* 1988;158:1154-7.
- [69] MADPRIME. Diagram of PCR reaction to demonstrate how amplification leads to the exponential growth of a short product flanked by the primers. *Wikipedia* 2007.
- [70] ČEPIN U. Real-Time PCR (qPCR) technology Basis. 2017.
- [71] SAMBROOK J., RUSSEL D. Molecular Cloning - A Laboratory Manual 3rd ed.: *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 2001.
- [72] DRABIK A., BODZOŃ-KUŁAKOWSKA A., SILBERRING J. 7 - Gel Electrophoresis. In: Ciborowski P, Silberring J, editors. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)*. Boston: Elsevier; 2016. p. 115-43.
- [73] ŠPANOVÁ A., RITTICH B. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. *Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova* 464/118, 612 00 Brno 2010.
- [74] GREEN M., SAMBROOK J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Laboratory Press* 2012.
- [75] HAARMAN M., KNOL J. Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2359-65.