



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

BEZPEČNOST PROBIOTIK POUŽÍVANÝCH V POTRAVINÁCH

THE SAFETY OF PROBIOTICS USED IN FOODS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Nikola Balažovičová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1089/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Nikola Balažovičová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Alena Španová, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Bezpečnost probiotik používaných v potravinách

Zadání bakalářské práce:

1. Vyhledání a kritické zpracování dostupné literatury k dané problematice
2. V praktické části práce izolovat DNA z probiotického potravinového výrobku a amplifikovat ji v PCR
3. Vyhodnotit získané poznatky formou diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

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

Nikola Balažovičová
student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

V teoretickej časti práce je pozornosť zameraná na definíciu probiotík, na ich zdravotné výhody, na probiotické potraviny, na kritéria bezpečnosti probiotík, vrátane metód identifikácie probiotických baktérií. V praktickej časti práce bola pozornosť zameraná na identifikáciu probiotických baktérií obsiahnutých v mliečnom výrobku Actimel. DNA v kvalite vhodnej pre PCR bola izolovaná pomocou magnetických mikročastíc P(HEMA-co-GMA). Identifikácia bola prevádzaná metódou polymerázovej reťazovej reakcie. Gélovou elektroforézou produktu sa potvrdila prítomnosť bakteriálnej DNA pre doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus casei*. Špecifické produkty PCR o veľkostiach 466 bp (doména *Bacteria*), 250 bp (rod *Lactobacillus*) a 136 bp (druh *Lactobacillus casei*) boli detekované po amplifikácii DNA izolovanej z probiotického mliečneho výrobku.

ABSTRACT

The theoretical part of this thesis focuses on definition of probiotics, their health benefits, probiotic foods, safety criteria for probiotics used in foods, including methods for the identification of probiotic bacteria. Experimental part of work was focused on the identification of probiotic bacteria contained in the milk product Actimel. DNA quality suitable for the PCR was isolated by magnetic microparticles P(HEMA-co-GMA). Identification was estimated using the method of polymerase chain reaction. The presence of DNA of domain *Bacteria*, genus *Lactobacillus* and species *Lactobacillus casei* was confirmed by gel electrophoresis of PCR products. Specific PCR products of the sizes of 466 bp (domain *Bacteria*), 250 bp (genus *Lactobacillus*) and 136 bp (*Lactobacillus casei*) were detected after amplification of DNA isolated from a probiotic milk product.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

probiotiká, bezpečnostné kritériá, probiotické potraviny

KEY WORDS

probiotics, safety criteria, probiotic foods

BALAŽOVIČOVÁ, N. *Bezpečnosť probiotík používaných v potravinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 39s. Vedúci bakalárskej práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc..

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som sa chcela poďakovať svojej vedúcej bakalárskej práce, doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za odborné vedenie, za poskytnutie cenných rád a pripomienok a v neposlednom rade za jej ľudský prístup. Poďakovanie patrí aj mojej rodine za ich podporu počas celej doby štúdia.

OBSAH

1.	ÚVOD	7
2.	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Probiotiká, prebiotiká a synbiotiká	8
2.2	Probioká a ich zdravotné dopady	8
2.3	Baktérie mliečneho kvasenia a ďalšie probiotiká	10
2.3.1	Rod <i>Lactobacillus</i>	10
2.3.2	Rod <i>Bifidobacterium</i>	11
2.3.3	Enterokoky ako probiotiká	12
2.3.4	Sporulujúce probiotiká	13
2.4	Probiotiká v potravinárstve	13
2.5	Probiotiká a ich bezpečnosť	14
2.6	Kritériá pre bezpečnosť probiotík	15
2.7	Metódy identifikácie probiotík	17
2.7.1	Kultivačné metódy a biochemické testy	17
2.7.2	Molekulárne genetické metódy	18
2.7.3	PCR	18
3.	CIEĽ PRÁCE	19
4.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	20
4.1	Materiál	20
4.1.1	Použitý probiotický mliečny výrobok	20
4.2	Zoznam chemikálií a roztoky	20
4.3	Zoznam prístrojov	21
4.4	Metódy	22
4.4.1	Spracovanie mliečneho výrobku	22
4.4.2	Príprava lyzátu buniek	22
4.4.3	Izolácia DNA z lyzátu buniek	22
4.5	Spektrofotometrické meranie koncentrácie DNA	23
4.6	Príprava zmesi pre PCR	23
4.6.1	Špecifické PCR- sekvencie primerov	24
4.7	Podmienky amplifikácie	24
4.8	Detekcia produktov PCR pomocou gélovej elektroforézy	25
5.	VÝSLEDKY	26
5.1	Príprava lyzátu z buniek mliečneho produktu	26
5.2	Izolácia DNA	26
5.3	Stanovenie koncentrácie DNA	27
5.4	PCR špecifická pre doménu <i>Bacteria</i>	28
5.5	PCR špecifická pre rod <i>Lactobacillus</i>	29
5.6	PCR špecifická pre druh <i>Lactobacillus casei</i>	30
5.7	Zhrnutie výsledkov PCR	31

6.	DISKUSIA	32
6.1	Izolácia DNA z mliečneho výrobku a stanovenie jej množstva	32
6.2	PCR špecifická pre doménu <i>Bacteria</i>	32
6.3	PCR špecifická pre rod <i>Lactobacillus</i>	32
6.4	PCR špecifická pre druh <i>Lactobacillus casei</i>	33
7.	ZÁVER.....	34
8.	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	35
9.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	39

1. ÚVOD

Existujúcim probiotikám vo všeobecnosti pripisujeme viacero výhod, ako napr. zlepšenie trávenia, inhibícia patogénov, stimulácia imunitného systému či antikarcinogénna aktivita. Využívajú sa hlavne v potravinárstve a v ďalších oboroch.

Napriek tomu, že tieto probiotické organizmy boli konzumované spolu s potravinami alebo boli v blízkom kontakte s ľuďmi po stáročia, ich nepriaznivé účinky sa doteraz významne nepreukázali. V dnešnej dobe existuje viacero organizácií, ktoré sa zaoberajú bezpečnosťou probiotík.

Bezpečnostné aspekty špecifikácie probiotík zahŕňajú určenie ich pôvodu, nepatogénne a antibiotické vlastnosti.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Probiotiká, prebiotiká a synbiotiká

Probiotiká sú živé mikroorganizmy, ktoré ak sú pravidelne konzumované v dostatočnom množstve vhodným spôsobom a v primeraných dávkach upravujú črevnú bakteriálnu rovnováhu a majú priaznivý vplyv na hostiteľa (Brown a Valiere 2004).

Celý koncept probiotík nie je nový. Boli konzumované ľuďmi vo forme fermentovaných potravín po tisíce rokov (Kopp-Hoolihan 2001). Ich zdravotný význam bol tiež dlho známy. Už Hippokrates a ďalší vedci v rannom veku uvádzali, že fermentované mlieko by mohlo liečiť poruchy zažívacieho ústrojenstva.

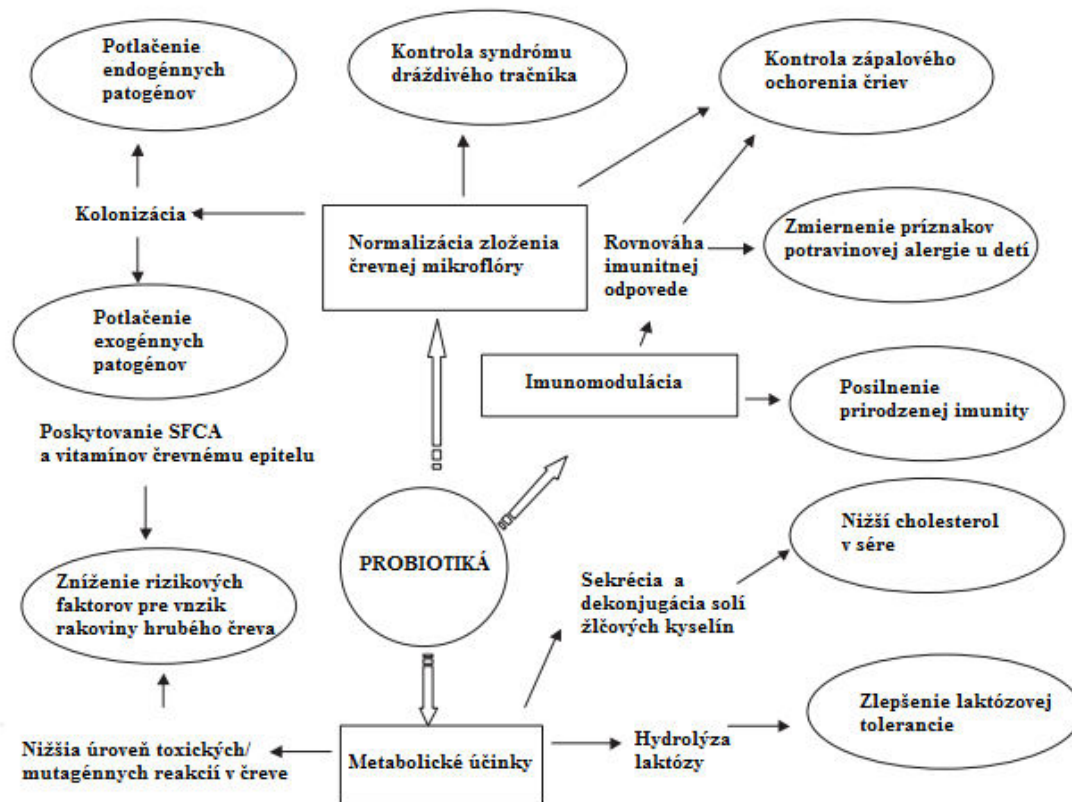
Prebiotiká predstavujú nestráviteľné látky v potravinách, ktoré podporujú rast a aktivitu jedného druhu alebo neobmedzeného počtu črevných probiotických baktérií (Hegazi a Seth 2013). Ovpływujú tak zloženie črevnej mikroflóry a tým priaznivo pôsobia na zdravie hostiteľa. Prebiotiká sú obsiahnuté v materskom mlieku, obilovinách ale aj ovocí a zelenine. Medzi najviac preskúmané prebiotiká zaraďujeme inulin, fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy.

Kombináciu prebiotík a probiotík predstavujú synbiotiká.

2.2 Probioká a ich zdravotné dopady

Probiotiká môžu byť pridávané do potravín – jogurtov a ďalších fermentovaných mliečnych výrobkov alebo môžu byť užívané aj ako doplnky stravy.

Zdroje probiotík vo forme bežne dostupných potravín majú tú výhodu, že okrem probiotických baktérií poskytujú telu tiež výživu. Avšak vo všeobecnosti obsahujú nižšie množstvo probiotických baktérií v porovnaní s probiotikami v tobolkách. Zdravotné benefity konzumácie probiotík sú zhrnuté na obrázku 1. Najvýznamnejšie sú normalizácia zloženia črevnej mikroflóry, imunomodulácia a metabolické účinky.



Obrázok 1: Zdravotné benefity konzumácie probiotík (upravené podľa Parvez a kol. 2006).

Predpokladaný mechanizmus účinku probiotík spočíva v imunomodulácii a v priamej inhibícii patogénov. Hydrolýza laktózy je jeden z metabolických účinkov probiotík a vedie k zlepšeniu prejavov laktózovej intolerancie. Probiotiká udržiavajú v rovnováhe črevnú mikroflóru a tým zlepšujú trávenie hostiteľa. Majú pozitívny vplyv na rôzne ochorenia vyvolané v gastrointestinálnom trakte a sú schopné skrátiť ich dobu trvania až o niekoľko dní. Probiotiká hrajú významnú úlohu pri zvýšenej hladine cholesterolu. Pôsobením probiotík dochádza k rozkladu solí žľových kyselín a uvoľnený cholesterol sa tak nemôže späť vstrebať (Lee a kol. 2009).

Probiotiká možno v humánnej medicíne veľmi efektívne využívať v prevencii a terapii chorôb tráviaceho traktu, laktózovej intolerancie a zápalových chorôb hrubého čreva. Hnačkové ochorenie je jedným z vedľajších účinkov užívania antibiotík. Zvyšujú náklady na liečbu a dĺžku pobytu v akútnych zdravotníckych zariadeniach. Jednou z možných stratégií, aby sa zabránilo týmto nežiadúcim účinkom je súčasné užívanie probiotických baktérií a kvasiniek (Hickson 2011). Probiotiká znižujú adsorpciu škodlivých mutagénov, ktoré prispievajú ku karcinogéze hrubého čreva. Ďalšie štúdiá preukázali účinok probiotík na rast nádoru. Zvýšenie množstva baktérií mliečneho kvasenia v hrubom čreve znižuje schopnosť mikroflóry produkovať karcinogény (Burns a Rowland 2000).

Probiotiká sa veľmi dobre osvedčili aj pri podávaní u zvierat. Optimalizácia tráviacich procesov probiotikami sa u zvierat prejavuje aj rastovo-stimulačným účinkom, zvýšením hmotnostných prírastkov či potlačením patogénnych organizmov. Bolo preukázané, že používanie probiotík v krmive zvierat môže znížiť riziko prenosu patogénov z potravín na ľudí. V Európskej únii (EU) sú zákony a predpisy ohľadom bezpečnosti používania probiotík v krmive zvierat prísne. Ich výrobcovia musia poskytnúť dôkaz o totožnosti,

bezpečnosti a účinnosti výrobku, ktorý je hodnotený vedeckým výborom odborníkov (European Commission 2003).

Výsledky z výskumov získané u zvierat sa často potvrdzujú aj u ľudí a naopak. Vedci testovali vzorky baktérií *E. faecalis* a *E. faecium* vyizolované z ľudí, kurčiat a prasiat na citlivosť pre 12 mikrobiálnych antibiotík a na prítomnosť génov kódujúcich rezistenciu (Aarestrup a kol. 2000). Zistilo sa, že ľudské a zvieracie vzorky vykazovali rovnaké gény kódujúce rezistenciu. Častá frekvencia podobnosti výsledkov nám indikuje prenos génov rezistencie u enterokokov vyskytujúcich sa medzi ľuďmi, hydinou a ošípanými. Faktom je, že probiotiká, ktoré sa pridávajú do krmív v poľnohospodárstve nemusia byť vždy rovnako bezpečné aj pre ľudí. Taktiež spoločné nažívanie zvierat je úzko spojené s ich majiteľmi, a preto sa tu objavuje možnosť existencie krížovej kontaminácie. Práve pre tieto dôvody by mali byť probiotiká bezpečné pre obe strany, ako aj pre zvieratá tak aj pre ľudí (Rinkinen a kol. 2003).

2.3 Baktérie mliečneho kvasenia a ďalšie probiotiká

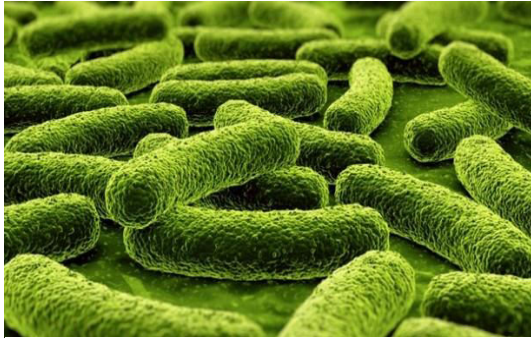
Ako probiotiká sú často využívané baktérie mliečneho kvasenia (BMK). Medzi najvýznamnejšie BMK patria zástupcovia rodov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Ďalšie rody, ktoré patria do skupiny BMK sú: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus* (Roginski 2003). Tvoria skupinu Gram-pozitívnych baktérií zoskupených na základe ich morfológických, metabolických a fyziologických charakteristík. BMK sú vo všeobecnosti nesporeujúce, anaeróbne koky alebo tyčinky, produkujúce kyselinu mliečnu ako hlavný produkt pri fermentácii sacharidov. Klasifikácia baktérií mliečneho kvasenia je zväčša založená na ich morfológii, spôsobe fermentácie glukózy, raste pri rozličných teplotách, konfigurácii vyprodukovanej kyseliny mliečnej, schopnosti rasti v prostredí s vysokou koncentráciou solí a tolerancii na zásady alebo kyseliny. BMK obvykle označujeme ako bezpečné probiotiká, pretože majú dlhú históriu používania a zriedka boli pripisované chorobám.

2.3.1 Rod *Lactobacillus*

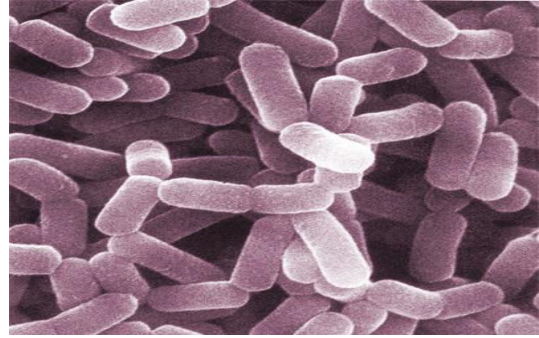
Význačným rodom je rod *Lactobacillus*. V rámci klasifikácie BMK je rod *Lactobacillus* najväčším rodom, ktorý zahŕňa baktérie so širokým spektrom biochemických a fyziologických vlastností. Zástupci tohto rodu sú fakultatívne anaeróbne, heterogénne baktérie tyčinkovitého tvaru. Laktobacily sú v prírode veľmi rozšírené a svoje uplatnenie našli aj v potravinárskom priemysle.

Laktobacily priaznivo vplyvajú na náš organizmus. Majú protizápalový účinok na črevá, zmierňujú zápchu, kontrolujú hnačku a znižujú neznášanlivosť laktózy. *Lactobacillus casei* (obrázok 2) je priaznivá baktéria, ktorá sa prirodzene vyskytuje v ústach a črevách u ľudí. Produkuje kyselinu mliečnu, ktorá pomáha znižovať hladinu pH v tráviacom trakte a tým bráni rastu škodlivých baktérií. Ďalšou významnou probiotickou baktériou je *Lactobacillus rhamnosus* (obrázok 3). Vyznačuje sa pozoruhodnou toleranciou voči žalúdočným kyselinám

(Conway a kol. 1987), pomáha v prevencii infekcie močových ciest a taktiež sa využíva aj ako prírodná konzervačná látka.



Obrázok 2: Morfológia buniek druhu *L. casei* (upravené podľa Mystical Biotech).



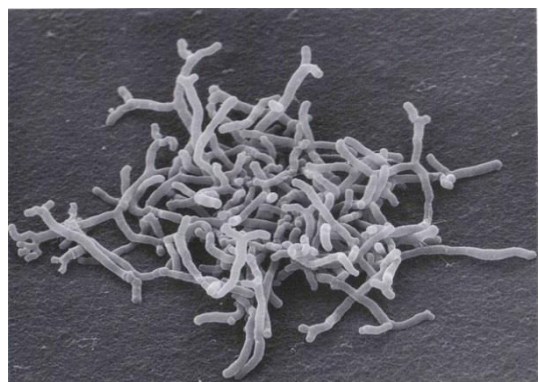
Obrázok 3: Morfológia buniek druhu *L. rhamnosus* (upravené podľa Mystical Biotech).

2.3.2 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobaktérie sú anaeróbne, grampozitívne a nesporulujúce baktérie. Niektoré druhy rodu *Bifidobacterium* sa využívajú ako probiotiká. Bunky probiotického druhu *Bifidobacterium bifidum* (obrázok 4) žijú v hrubom čreve. Ich úlohou je udržať rovnováhu mikroflóry v črevách, posilňovať imunitný systém a pomáhať tráviacemu traktu (Montrose 2005). Organizmu prospešnou a užitočnou baktériou je aj druh *Bifidobacterium longum* (obrázok 5), ktorý sa vyznačuje tým, že znižuje hladinu cholesterolu, zmiernuje príznaky laktózovej intolerancie a pomáha pri prevencii proti rakovine. Výskumníci identifikovali úroveň dávkovania pre probiotikum *Bifidobacterium infantis* (obsiahnutého vo forme kapsule), ktoré po podaní zmiernuje bolesti brucha, nadúvanie, pomáha pri dysfunkcii čriev, vyprázdňovaní a pri prechode plynov črevami (Whorwell a kol. 2006).



Obrázok 4: Morfológia buniek *B. bifidum* (upravené podľa Mystical biotech).



Obrázok 5: Morfológia buniek *B. longum* (upravené podľa Mystical Biotech).

2.3.3 Enterokoky ako probiotiká

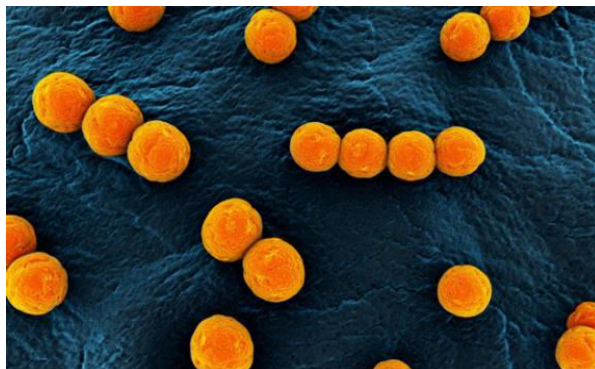
Enterokoky tvoria prirodzenú mikroflóru v gastrointestinálnom trakte. Pomenovanie *Enterococcus* vychádza z poznania pôvodného stanovišťa rodu – intestinálny trakt u ľudí aj zvierat. Z tohto dôvodu ju často môžeme nájsť aj v mikroflóre stolice.

Najznámejšie druhy z rodu *Enterococcus* sú *Enterococcus faecium* (spôsobuje nosokominálne infekcie; morfológia buniek je uvedená na obrázku 6) a *Enterococcus faecalis* (najčastejší ľudský patogén). Všetky ostatné druhy enterokokov tvoria približne 5 % enterokokových infekcií.

Nepatogénne enterokoky majú využitie aj v biotechnológiách vďaka ich probiotickým vlastnostiam. Enterokoky v bryndzi počas zrania produkujú bakteriocíny - enterocíny, ktoré sa podieľajú na potlačení potencionálne patogénnych mikroorganizmov. Prítomnosť a rast enterokokov vo fermentovaných potravinách, hlavne v syroch, má za následok organolepticky jedinečný produkt. Táto jedinečnosť prispieva k miestnej kuchyni a dedičstvu regiónu (Franz a kol. 2003).

Pozornosť bola venovaná enterokokom zo slovenskej bryndze. Z bryndze sa odobralo 310 enterokokových izolátov (178 *Enterococcus faecium*, 68 *E. durans*, 49 *E. faecalis*, 8 *E. italicus*, 3 *E. gallinarum*, 3 *E. casseliflavus*, and 1 *E. hirae*), ktoré boli vyhodnotené na citlivosť voči 9 antibiotikám a chemoterapeutikám (vankomycin, teicoplanin, ampicilin, streptomycin, gentamycin, erythromycin, rifampicin, nitrofurantoin, a ciprofloxacín). Všetky izoláty enterokokov z bryndze boli citlivé na ampicilin, streptomycin, gentamycin a vankomycin. Gény rezistance na vankomycin vanA a VanB neboli detegované (Belicová a kol. 2007).

Pasterizáciou-tepelným opracovaním sa ničia nie len škodlivé mikroorganizmy ale aj prospešné probiotické kmene baktérií mliečneho kvasenia. Napriek týmto probiotickým stratám sa nepasterizované a termizované výrobky objavujú v obchodoch kvôli ich dlhodobejšej trvanlivosti. Podľa kritérií európskej únie by bola bryndza uznaná ako tradičný slovenský výrobok ak by si zachovala svoje pôvodne vlastnosti. Výroba bryndze teda pozostáva bez akéhokoľvek fyzikálneho alebo chemického zásahu. V tradičnej bryndzi vyrobenej zo surového nepasterizovaného mlieka je oveľa viac mliečnych baktérií ako v jogurtoch a acidofilnom mlieku (FarmiNews 2009).



Obrázok 6: Morfológia buniek rodu *Enterococcus faecium* (upravené podľa Mystical Biotech).

2.3.4 Sporulujúce probiotiká

Rod *Bacillus* patrí medzi sporulujúce všadeprítomné baktérie. Významným probiotikom z tejto skupiny je *Bacillus clausii*, jedným z najpreskúmanejších probiotík z hľadiska rezistencie voči antibiotikám a horizontálnej neprenositelnosti rezistencie na patogénne mikroorganizmy. Tieto mikroorganizmy nie sú schopné kolonizovať ľudské črevo ale majú schopnosť byť dočasne prítomné v gastrointestinálnom trakte vďaka konzumácii potravy.

Vedci naočkovali vnútrožalúdočne dve skupiny myší, dávkou v rozsahu 10^9 spór buď *B. clausii* alebo *B. subtilis*. Následne im po 4, 24 a 72 hodinách boli odobraté vzorky z rôznych miest čreva, lymfatických orgánov a krvi (Spinosa a kol. 2000). Spóry sledovaného kmeňa *Bacillus* v intestinálnom trakte boli prítomné vo vzorkách, ktoré sa odobrali po 4 hodinách, ich prítomnosť sa exponenciálne znižovala. Vo vzorke GIT, odobranej po 72 hodinách od naočkovania sa objavovala už iba desatina z celkového množstva naočkovaných spór.

Sporulujúce baktérie sú schopné rásť a byť metabolicky aktívne, iba keď sú vo vegetatívnom štádiu, a k sporulácii sa uchýľujú iba v prípade nedostatku živín, alebo keď sú vystavené pôsobeniu iných nepriaznivých podmienok. Na rozdiel od ostatných probiotických baktérií, sporulujúce baktérie v probiotických produktoch sú prítomné vo forme spór a nekonzumujú sa ako vegetatívne bunky. Modulácia imunitnej funkcie sa považuje za predpokladaný mechanizmus účinku probiotických baktérií, vrátane baktérií vytvárajúcich spóry. Bolo zistené, že u pacienta, ktorý bol predtým liečený a mal narušenú imunitu, sa objavili kultúry pozitívne pre rod *Bacillus* (Oggioni a kol. 1998). Antibiotická rezistencia *B. clausii* na väčšinu antibiotík je chromozomálne zakódovaná a nie je spojená s mobilnými genetickými elementmi (Girlich a kol. 2007).

2.4 Probiotiká v potravinárstve

V potravinárskom priemysle sú v hojnom zastúpení využívané baktérie mliečneho kvasenia. Niektoré z nich sa používajú ako štartovacie kultúry pri riadených fermentáciách pri výrobe syrov, jogurtov, kefírov, kapusty, nakladanej zeleniny, piva či iných fermentovaných potravín, práve pre ich antibakteriálne a antifugálne vlastnosti (Delavenne a kol. 2013). Odolnosť proti chmeľu je nevyhnutným predpokladom pre schopnosť baktérií mliečneho kvasenia na rast v pive, čím spôsobujú jeho znehodnotenie a kontamináciu.

Na Slovensku a v Českej republike sú najznámejšou skupinou probiotických potravín fermentované mliečne produkty (jogurt, zakysanka, acidofilné mlieko, kefir, bifidové mlieko a ďalšie), obsahujúce buď len probiotiká alebo probiotiká kombinované s prebiotikami. Radia sa do skupiny funkčných potravín. Pod pojmom funkčné potraviny rozumieme potraviny, ktoré sú obohatené o účinnú látku, ktorá má pozitívny vplyv na zdravie (Gibson a Williams 2000). Ich úlohou je vytvoriť v tele podmienky na optimálne fungovanie orgánov a prispieť k posilneniu obranyschopnosti. Príklady fermentovaných potravín obsahujúcich baktérie mliečneho kvasenia sú uvedené v tabuľke 1:

Tabuľka 1: Niektoré typy fermentovaných potravín s obsahom baktérií mliečného kvasenia, (upravené podľa Asmahan Azhari Ali, 2010).

Typ fermentovaných potravín	Baktérie mliečného kvasenia
<ul style="list-style-type: none"> • Tvrdý syr bez očiek • Syr s očkami • Taliansky a švajčiarsky syr • Mäso a maslo • Jogurt • Fermentované, probiotické mlieko • Kefír <li style="padding-left: 20px;">Fermentované potraviny : • Klobásky (Európa) • Klobásky (USA) • Rybie produkty Fermentovaná zelenina : • Kyslá kapusta • Nakladaná zelenina • Olivy • Fermentovaná sójová omáčka • Fermentované cereálie • Kvások • Víno 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i>, <i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> • <i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i>, <i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>, <i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>, <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> • <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>, <i>Lb. helveticus</i>, <i>Lb. casei</i>, <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgarius</i>, <i>S. thermophilus</i> • <i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i>, <i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>, <i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>, <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> • <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgarius</i>, <i>S. thermophilus</i> • <i>Lb. casei</i>, <i>Lb. acidophilus</i>, <i>Lb. rhamnosus</i>, <i>Lb. johnsonii</i>, <i>B. lactis</i>, <i>B. bifidum</i>, <i>B. breve</i> • <i>Lb. kefir</i>, <i>Lb. kefiranofacies</i>, <i>Lb. brevis</i> • <i>Lb. sakei</i>, <i>Lb. curvatus</i> • <i>P. acidilactici</i>, <i>P. pentosaceus</i> • <i>Lb. alimentarius</i>, <i>C. piscicola</i> • <i>Leuc. mesenteroides</i>, <i>Lb. plantarum</i>, <i>Lb. acidilactici</i> • <i>Leuc. mesenteroides</i>, <i>P. cerevisiae</i>, <i>Lb. brevis</i>, <i>Lb. plantarum</i> • <i>Leuc. mesenteroides</i>, <i>Lb. pentosus</i>, <i>Lb. plantarum</i>, <i>Lb. acidilactici</i>, <i>P. pentosaceus</i>, <i>Lb. plantarum</i>, <i>Lb. fermentum</i> • <i>T. halophilus</i> • <i>Lb. sanfransiscensis</i>, <i>Lb. farciminis</i>, <i>Lb. fermentum</i>, <i>Lb. brevis</i>, <i>Lb. plantarum</i>, <i>Lb. amylovorus</i>, <i>Lb. reuteri</i>, <i>Lb. pouris</i>, <i>Lb. panis</i>, <i>Lb. alimentaris</i>, <i>W. cibaria</i> • <i>O. oeni</i>

2.5 Probiotiká a ich bezpečnosť

Organizácie "International Dairy Federation and the European Food and Feed Cultures Association" spoločne vytvorili odkazový inventár mikroorganizmov s dokumentovanou históriou ich bezpečného používania v potravinovom priemysle. Pre probiotiká, ktoré spĺňajú bezpečnostné podmienky bolo pridelené označenie QPS (Kvalifikovaný predpoklad bezpečnosti). Schéma pre udelenie statusu QPS zahŕňa identifikáciu mikróba na požadovanej taxonomickej úrovni a stupeň oboznámenosti tj. praktické skúsenosti z používania konkrétneho mikroorganizmu pre určité účely za dlhšiu dobu. V USA je všeobecne látkam, ktorých bezpečné používanie vyplýva z historickej skúsenosti, udeľovaný status GRAS (Generally regarded as safe). Jednotlivé predloženia členskými štátmi o tvrdeniach vo vzťahu k určitej živine alebo zložke v súčasnej dobe posudzuje a schvaľuje Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (EFSA- European Food Safety Agency).

Taxonómia mnohých probiotických mikroorganizmov sa výrazne zmenila s vývojom genetických metód, čo spôsobilo zmätky v riadnej identifikácii probiotických kmeňov. Pretrvávajúce nesprávne alebo neexistujúce názvy na etiketách výrobkov či nepresné

názvoslovie, ktoré nemá žiadnu vedeckú platnosť, dezinformuje spotrebiteľa a takisto ohrozuje bezpečnosť výrobku. Pre mnohých spotrebiteľov je termín probiotikum relatívne nový a tak je oprávnený požiadavok, aby sa z príslušného označenia produktu dozvedel informácie o jeho obsahu.

Aby bolo splnené kritérium živých probiotík pri podávaní jedla, je treba, aby aj ku koncu expiračnej doby produkt obsahoval požadované množstvo buniek. Vzhľadom k úbytku živých buniek pri skladovaní produktu by mal výrobca garantovať množstvo zodpovedajúce koncu expiračnej doby a nie množstvo nastavené pri výrobe (Donohue a Guimonde 2011).

Napriek tomu, že tieto organizmy boli konzumované spolu s potravinami alebo boli v blízkom kontakte s ľuďmi po stáročia, ich nepriaznivé účinky sa doteraz výrazne nepreukázali. Existuje mnoho otázok súvisiacich s infekciami a patogenitou vyvolaných probiotickými mikroorganizmami. V prvom rade je dôležitá identifikácia týchto potencionálnych vlastností u konkrétnych kmeňov mikroorganizmov. V niektorých štúdiách sa zistilo, že klinické izoláty a komerčné probiotické kmene vykazujú podobné vlastnosti, čo indikuje fakt, že nie len bakteriálne faktory ale aj faktory spojené s hosťiteľom majú opodstatnenie pri určovaní ich bezpečnosti. Nedávne výskumy potvrdili, že zloženie mikroflóry a imunitný stav hosťiteľa sú zapojené do rozhodovania o bezpečnosti špecifických kmeňov probiotík (Gronbach a kol. 2010). V tejto súvislosti je preto potrebné jasne identifikovať možné riziká spojené s každým probiotickým kmeňom, pretože rôzne kmene môžu mať rôznu charakteristiku. Dosť závažný problém predstavuje aj podávanie probiotík u predčasne narodených detí alebo pri chorobách s oslabeným imunitným systémom ako je HIV (Human Immunodeficiency Virus – vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti).

2.6 Kritériá pre bezpečnosť probiotík

Normy stanovené programom pre bezpečnosť probiotík, ktoré uvádza Salminen a kol. 1998, sú zhrnuté v nasledujúcich desiatich bodoch:

1. Výrobcovia potravín sú v konečnom dôsledku zodpovední za bezpečnosť dodávaných potravín. Potraviny, ktoré obsahujú probiotiká, by mali byť rovnako bezpečné ako iné potraviny.

Aby boli probiotiká účinné musia spĺňať viaceré kritériá. Musia byť nepatogénne, netoxické a zároveň priaznivo pôsobiť na hosťiteľa. V tráviacom trakte musia byť schopné prežiť, metabolizovať, priľnúť sa k epitelovým bunkám, rýchlo sa množiť a dočasne kolonizovať. Tiež musia obsahovať veľké množstvo životaschopných buniek, nakoľko behom skladovania dochádza k úbytku živých buniek.

Probiotiká sú živé mikroorganizmy a vzhľadom k úbytku živých buniek pri skladovaní produktu by mal výrobca garantovať množstvo zodpovedajúce koncu expiračnej doby a nie množstvo nastavené pri výrobe.

2. Ak sú probiotické potraviny označované za nové, sú predmetom schvaľovania v súlade so smernicou EU pre probiotické potraviny.

Jednotlivé predloženia členskými štátmi o tvrdeniach vo vzťahu k určitej živine alebo zložke posudzuje a schvaľuje EFSA- European Food Safety Agency – (Európsky úrad pre bezpečnosť potravín).

EFSA informuje o existujúcich a vznikajúcich potravinových rizikách. Toto poradenstvo je podkladom pre právne predpisy, pravidlá a tvorbu politík v EÚ, čím pomáha chrániť spotrebiteľov pred rizikami v potravinovom reťazci. Činnosť úradu EFSA zahŕňa zhromažďovanie vedeckých údajov a poznatkov, poskytovanie nezávislého aktuálneho odborného poradenstva v oblasti či posilňovanie dôvery v systém bezpečnosti potravín v EÚ poskytovaním spoľahlivého poradenstva (EFSA 2007).

3. Pokiaľ má probiotický kmeň dlhú históriu bezpečného používania, je označovaný ako bezpečný.

Probiotiká označujeme ako bezpečné probiotiká, pretože majú dlhú históriu používania a zriedka boli pripisované chorobám. Zvyčajne v podobe infekcie u ľudí, ktorí mali na to predispozíciu. Posledné štúdiá vykonávané s probiotickými kmeňmi *Escherichia coli* ukázali, že faktory súvisiace s hositeľom môžu hrať hlavnú rolu v bezpečnosti probiotických kmeňov (Gronbach a kol. 2010).

4. Najlepším testom pre bezpečnosť potravín je dobre zdokumentovaná história ľudskej spotreby. Pokiaľ kmeň patrí k druhom, ktoré sa nevyznačujú patogenitou a majú za sebou dlhú históriu bezpečného užívania, označujeme ich ako bezpečné probiotické potraviny.

V USA je všeobecne látkam, ktorých bezpečné používanie vyplýva z historickej skúsenosti, udeľovaný status GRAS - Generally regarded as safe (Všeobecne považovaný za bezpečný). Podľa zákona je každá látka, ktorá je zámerné pridávaná do potravín označovaná ako prídavná látka, a tak je predmetom kontroly a schválenia FDA - Food and Drug Administration (Úrad pre kontrolu potravín a liečiv). Látky skúmajú a uznávajú kvalifikovaní odborníci, ktorí musia dostatočne preukázať ich bezpečnosť za podmienok konkrétneho zamýšľaného použitia danej látky predtým ako sa začnú predávať.

5. Pokiaľ kmeň patrí medzi druhy, ktoré sú označované ako nepatogénne a nemajú za sebou dlhú históriu bezpečného užívania, môžu byť pokladané za bezpečné probiotiká. Avšak malo by sa s nimi a s potravinami, ktoré ich obsahujú zaobchádzať ako s novými probiotickými potravinami a tak by sa mali aj označovať.

Dôkazy o bezpečnosti a účinnosti probiotických organizmov sú avšak do značnej miery založené na relatívne malom alebo nedostatočnom výskume. Niektoré sú označené za bezpečné len na základe komenzálneho vzťahu nevykazujúceho nepriaznivé účinky. Tvrdenia o vplyve probiotik na zdravie konzumentov sú v Európe regulované. Jedným z cieľov tohto nariadenia je zaistenie, aby u látok, ktoré sú predmetom tvrdenia, bolo skutočne vedecky preukázané, že majú pozitívny výživový alebo fyziologický účinok.

6. Ak nové probiotické druhy patria do rodov, u ktorých nebola preukázaná patogenita pre iné druhy, budú označované ako nové probiotické potraviny.

Dané probiotické mikroorganizmy budú hodnotené a skúmané podľa prísnych kritérií organizácií pre bezpečnosť probiotík používaných v potravinách.

7. Podľa najnovšieho taxonomického zaradenia musia byť probiotické kmene detailne popísané, vrátane DNA- DNA hybridizácie a stanovenia sekvencie génu pre rRNA. Táto úvaha sa vzťahuje na mutanty probiotických kmeňov.

Podľa organizácie FAO-WHO (The Food and Agriculture Organization- World health organization) je sekvencia génu kódujúceho 16S rRNA považovaná za najlepší nástroj pre rutinné stanovenie probiotík (Vanckerckhoven a kol. 2008). Z hľadiska fylogenetických a taxonomických štúdií vlastností baktérií je použitie tohto genetického markeru prevádzané ako najbežnejšie z viacerých dôvodov. Je prítomný takmer vo všetkých baktériách; funkcia génu 16S rRNA sa v priebehu času nemení, z čoho vyplýva, že náhodné zmeny v sekvenciách sa využívajú v evolúcii; 16S rRNA je dostatočne veľká (1500 bp) pre informačné účely (Janda a Abbott 2007).

8. Kmene , ktoré nesú gény rezistencie na antibiotiká (gény, ktoré inaktivujú antibiotiká), by nemali byť uvádzané na trh .

Jedným z hlavných cieľov posudzovania bezpečnosti probiotických potravín je preto stanovenie vlastností kmeňov nesúcich gény rezistencie na antibiotiká. Vzhľadom k tomu, že probiotiká by mali prošpešne pôsobiť na zdravotný stav hostiteľa, nemôžu byť kmeňe nesúce túto rezistenciu považované za bezpečné a tým ani uvádzané na trh.

9. Kmene, ktoré nie sú taxomonicky popísané ako je uvedené v bode 7, nemôžu byť označované ako probiotiká (viď bod 7).

10. Kmene musia byť uložené v medzinárodnej zbierke kultúr mikroorganizmov.

Probiotické kmene by mali byť uložené v medzinárodne uznávaných zbierkach kultúr pre sprístupnenie a poskytnutie informácií o danom mikroorganizme zo strany výrobcov, vedcov a regulačných orgánov.

Zbierka kultúr by mala zhromažďovať a uchovávať novoizolované a medecínsky významné kmene; identifikovať a charakterizovať ich biologické vlastnosti pomocou molekulárno-biologických metód; poskytovať kultúry mikroorganizmov na požiadanie pre vedecké, vdelávacie a iné inštitúcie; vydávať katalóg uchovávaných kultúr.

2.7 Metódy identifikácie probiotík

2.7.1 Kultivačné metódy a biochemické testy

Pre rozlíšenie bakteriálnych izolátov z hľadiska ich fyziologických vlastností sa využívajú testy, ktoré sú založené na vlastnostiach fermentácie baktérií. Kit API 50 CH je štandardizovaný systém, v ktorom sú zahrnuté biochemické testy, pomocou ktorých vieme

identifikovať probiotické baktérie na základe fermentačného profilovania (Brolazo a kol. 2011). Na identifikáciu druhov a rozlišovanie medzi kmeňmi využívame kombináciu fenotypových a molekulárnych techník.

2.7.2 Molekulárne genetické metódy

Úzko príbuzné kmene môžeme navzájom od seba odlíšiť pomocou rôznych typov molekulárnych techník ako je DNA analýza prostredníctvom pulznej gélovej elektroforézy, náhodná amplifikácia polymorfnej DNA, ribotypizácia, analýza reštrikčných fragmentov a profilovanie plazmidov, DNA-DNA-hybridizace, sekvenovanie.

2.7.3 PCR

Výrazné uplatnenie našla PCR. Polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction - PCR) je molekulárna diagnostická technika, založená na cyklicky sa opakujúcej syntéze určitého úseku DNA. Po naviazaní primerov (krátke oligonukleotidy) na komplementárne úseky na vlákne DNA sa začne syntéza nového úseku DNA, ktorá je katalyzovaná DNA- polymerázou. PCR je proces, pri ktorom sa striedajú 3 kroky v závislosti od teploty (Španová a Rittich 2010).

Probiotické baktérie vieme identifikovať na základe rozdielov v nukleotidových sekvenciách v oblasti 16S rRNA. Gén kódujúci 16S rRNA môže byť sekvenovaný priamo po amplifikácii v PCR s využitím univerzálnych 16S primerov. Verejne dostupné databázy ako NCBI poskytujú veľké množstvá čiastočných sekvencií génu pre 16S rRNA (Pot a Tsakalidou, 2009). Primery odvodené z génu kódujúceho 16S RNA pre doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *L. casei* sú uvedené v nasledujúcich bodoch :

1. Doména *Bacteria* (Haarman a Knol 2006).
 - F_eub TCCTACGGGAGGCAGCAGT
 - R_eub GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
2. Rod *Lactobacillus* (Dubernet a kol. 2000).
 - LbLMA 1rev CTCAAAACACTAAACAAAGTTT
 - R16-1 CTTGTACACACCGCCCGTCA
3. Druh *Lactobacillus casei* (Grillová 2013).
 - Cas/ParFW TGCACCGAGATTCAACATGG
 - UniverRV TTCGCCACTGGTGTCTTCC

3. CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce v teoretickej časti bolo vyhľadanie a kritické spracovanie literatúry k danej problematike. V praktickej časti bolo cieľom z probiotického potravinového výrobku Actimel izolovať DNA v kvalite vhodnej pre PCR a amplifikovať ju v PCR. Pre amplifikáciu použiť primery špecifické pre doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a probiotický druh *L. casei*. Na záver vyhodnotiť získané poznatky formou diskusie.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Materiál

4.1.1 Použitý probiotický mliečny výrobok

- ACTIMEL

Ochutený mliečny jogurtový nápoj obohatený o živé kultúry.

Dodávateľ : Danone a.s.

Výrobok (100 ml) obsahuje 10 miliárd živých kultúr a vitamíny.

Zloženie :

- mlieko
- cukor : sacharóza a glukóza
- jogurtové kultúry: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophiles* a *L. casei* Danone®
- vitamíny : B6 a D
- minerálne látky: vápnik



www.danone.cz

- DNA *L. casei* (10ng/μl) - kontrolná DNA od doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

4.2 Zoznam chemikálií a roztoky

Chemikálie a roztoky použité v práci boli pripravené podľa doc. Španovej a doc. Ritticha (Španová a Rittich, 2010).

Chemikálie

Agaróza pre elektroforézu DNA (Top-Bio, Praha, ČR)

DNA štandard 100 bp ladder (MALAMITÉ, v.o.s., Moravské Prusy, ČR)

Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)

Ethanol (Penta, Chrudim, ČR)

Ethidium bromid (Sigma, St. Louis, USA)

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)

Lyzozým (Serva, Heidelberg, SRN)

Proteináza K (100 μg/ml) (Serva, Heidelberg, SRN)

Tris base (Penta, Chrudim, ČR)

PEG 6000 (Penta, Chrudim, ČR) PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)

Komponenty pre PCR

PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)

Primery (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)

Reakčný pufr (10 x koncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR)

Zmes dNTP (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)

Taq DNA polymeráza 1.1 (Top-Bio, Praha, ČR)

Roztoky pre agarózovú gélovú elektroforézu

- 5 x TBE pufr

Rozpustiť 54 g Tris-base a 27,5 g kyseliny boritej v 600 ml destilovanej vody. Pridať 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a pH upraviť na 8,0 pomocou 1 N NaOH. Doplniť destilovanou vodou do 1000 ml. Pred použitím sa roztok nariedi 10 x destilovanou vodou - získa sa 0,5 x TBE pufr.

- Agarózový gél 1,5 %

Rozvariť v mikrovlnke 1,5 g agarózy v 100 ml 0,5 koncentrovaného TBE pufru.

- Ethidium bromid (0,5 µg/ml)

100 µl roztoku EtBr (2,5 mg/ml) rozriediť v 500 ml sterilnej destilovanej vode.

Roztoky pre izoláciu DNA pomocou magnetických nosičov

Magnetické mikročastice P(HEMA-co-GEMA) (syntetizoval Ing. Daniel Horák CSc., Ústav makromolekulárnej chemie AV ČR, Praha, ČR)

- 0,5 M NaCl

Rozpustiť 58,4 g NaCl v 150 ml destilovanej vody a doplniť destilovanou vodou do 200 ml. Sterilizovať v autokláve (121 °C/15 minút).

- 40 % PEG 6000

Rozpustiť 40 g PEG 6000 v 60 ml destilovanej vode a doplniť destilovanou vodou do 100 ml. Uchovávať pri 4 °C.

- 1 x TE pufr

Zmiešať 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 200 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplniť destilovanou vodou do 100 ml.

4.3 Zoznam prístrojov

Centrifúga (Eppendorf AG, Hamburg, SRN)

Centrifúga mini Spin 14 500 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, SRN)

Laboratórne váhy (Kern & Sohn, SRN)

Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Nórsko)

Mikropipety (Discover HTL, Varšava, Poľsko)

Mikrovlnná trúba SMW 5020 (Sencor, ČR)

Minicycler PTC 150 (MJ Research, Watertown, USA)

NanoPhotometrTM (Implen, SRN)

Termocycler (MJ Research 200, Watertown, USA)

Termostat – Mini incubator (Labnet international, Inc., USA)

Transluminátor – TVR 3121 (Spectroline, Paramount, USA)

Zariadenie pre elektroforézu Easy-cast, model B1 (Owl Scientific, USA)
Zdroj elektrického napätia Enduro Power supplies, model E0303 (Labnet international, Inc., USA)

4.4 Metódy

4.4.1 Spracovanie mliečneho výrobku

Z tekutého mliečneho výrobku Actimel boli odobrané 4×1 ml vzorky do štyroch 1,5 ml mikroskúmaviiek. Vzorky boli následne centrifugované pri 14 000 ot/min po dobu 5 minút. Po centrifugácii bol supernatant odobraný a sediment sa rozsuspendoval a premyl 1 ml sterilnej vody a opäť bol centrifugovaný za rovnakých podmienok. Premytie sa opakovalo 5krát.

4.4.2 Príprava lyzátu buniek

K sedimentu buniek z premytého mliečneho výrobku sa pridal 1 ml lyzačného roztoku (10 mM Tris HCL, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0; lyzozým 3mg/ml), v ktorom bol sediment rozsuspendovaný. Vzorka bola inkubovaná po dobu 1 hodiny pri laboratórnej teplote. K zmesi sa pridal 50 µl 20 % SDS a 5 µl proteínázy K (100 µg/ml). Vzorky boli inkubované pri teplote 55 °C do druhého dňa.

4.4.3 Izolácia DNA z lyzátu buniek

K izolácii DNA boli použité magnetické mikročastice P(HEMA-co-GMA) s karboxylovými skupinami. Pri príprave separačnej zmesi potrebnej k izolácii DNA sa postupovalo podľa nasledujúcich krokov uvedených v tabuľke 2:

Tabuľka 2: Zloženie separačnej zmesi

Krok	Zložka	Podiel (hm)
1	NaCl (5 M)	400
2	hrubý lyzát buniek	100
3	PEG 6000 (40%)	400
4	P(HEMA-co-GMA) (2 mg/ml)	100
Celkom		1000

Po zmiešaní komponentov sa zmes inkubovala po dobu 15 minút pri laboratórnej teplote. Zmes bola umiestnená do magnetického separátora (so zasunutým magnetickým pásom) a magnetické častice sa separovali 15 minút pri laboratórnej teplote. Po uplynutí doby sa supernatant opatrne odobral. Z magnetického separátora sa opatrne vybral magnetický pás a následne bolo do mikroskúmaviiek s časticami pridaných 100 µl 70% etanolu. Vzorka sa premiešala a do separátora bol vložený magnetický pás. Po 2 minútach bol etanol opatrne

odobraný. Mikroskúmvky boli vybraté zo separátora a zvyšný etanol sa nechal odpariť. DNA adsorbovaná na magnetických časticiach bola eluovaná pri laboratórnej teplote do 50 μ l TE pufru pri pH 7,8. Po 30 minútach boli častice odseparované pomocou magnetického separátora a eluát obsahujúci DNA sa odobral do čistých mikroskúmviek.

4.5 Spektrofotometrické meranie koncentrácie DNA

Koncentrácia DNA po izolácii z hrubého lyzátu buniek z mliečneho produktu bola stanovená spektrofotometricky. Pomocou prístroja Nanophotometer boli odčítané hodnoty absorbancií pri vlnových dĺžkach 260nm (absorpčné maximum nukleových kyselín) a 280 nm (absorpčné maximum proteínov). Ako referenčná vzorka bol použitý TE pufr. Čistota DNA bola stanovená pomerom absorbancií 260/280 nm a 260/230 nm.

4.6 Príprava zmesi pre PCR

Pred prípravou zmesi boli všetky komponenty PCR premiešané a scentrifugované. Pripravila sa zmes komponentov, tzv. Master mix. Master mix sa pripravil zmiešaním jednotlivých reakčných komponentov vynásobeným počtom vzoriek a kontrol. Komponenty pre jednotlivé PCR boli zmiešané v nasledujúcom poradí a množstve (tabuľka 3):

Tabuľka 3: Komponenty zmesi pre PCR.

Por.	Komponenty	doména <i>Bacteria</i>	rod <i>Lactobacillus</i>	druh <i>L. casei</i>
		1.primer-F_eub, 2.primer-R_eub	1.primer-LbLMA1rev, 2.primer-R16-1	1.primer-Cas/ParFW, 2.primer-UniverRV
		Objem (μ l)	Objem (μ l)	Objem (μ l)
1.	Voda pre PCR	19,5	19	19
2.	Reakčný pufr kompletný 10x	2,5	2,5	2,5
3.	Zmes dNTP (10 mM)	0,5	0,5	0,5
4.	1. Primer (10 pmol/ μ l)	0,5	0,5	0,5
5.	2. Primer (10 pmol/ μ l)	0,5	0,5	0,5
6.	DNA polymeráza 1.1 (1U/ μ l)	0,5	1,0	1,0
7.	DNA matrica(10ng/ μ l)	1,0	1,0	1,0
Celkom		25,0	25,0	25,0

Počas prípravy Master mixu bola po každom pridaní zložky zmes precízne premiešaná. Pripravený Master mix sa napipetoval do PCR skúmviek o objeme 24 μ l. Následne bola ako posledná pridaná DNA o objeme 1 μ l. Výsledný objem zmesi pre PCR bol 25 μ l. Ako DNA matrica sa použila purifikovaná DNA (10 ng/ μ l) . Negatívna kontrola sa pripravila zmiešaním 24 μ l reakčnej zmesi pre PCR a 1 μ l vody pre PCR, ktorá nahradila DNA matricu. Pri pozitívnej kontrole bola použitá DNA izolovaná z typového kmeňa *L. casei* o koncentrácii 10 ng/ μ l.

4.6.1 Špecifické PCR- sekvencie primerov

Doména *Bacteria*, rod *Lactobacillus*, a druh *Lactobacillus casei* sa dajú identifikovať amplifikovanými produktami PCR pomocou špecifických primerov.

Primery pre amplifikáciu sekvencie 5' - 3':

Doména *Bacteria* (Haarman a Knol, 2006).

- F_eub TCCTACGGGAGGCAGCAGT
- R_eub GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT

Veľkosť produktu PCR - 466bp. Postupovalo sa podľa predlohy Sásková, 2015

Rod *Lactobacillus* (Dubernet a kol., 2000)

- LbLMA 1rev CTCAAAACATAAACAAGTTT
- R16-1 CTTGTACACACCGCCCGTCA

Veľkosť produktu PCR - asi 250 bp. Postupovalo sa podľa predlohy Sásková, 2015

Druh *Lactobacillus casei* (Grillová, 2013)

- Cas/ParFW TGCACCGAGATTCAACATGG
- UniverRV TTCGCCACTGGTGTCTTCC

Veľkosť produktu PCR – 136 bp. Postupovalo sa podľa predlohy Sásková, 2015.

4.7 Podmienky amplifikácie

Všetky PCR prebiehali v 30 cykloch podľa podmienok uvedených v tabuľke 4:

Tabuľka 4: Podmienky amplifikácie v jednotlivých PCR.

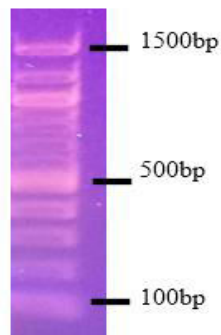
	Kroky	doména <i>Bacteria</i> ,	Rod <i>Lactobacillus</i> , druh <i>Lactobacillus casei</i>
1.	denaturácia DNA pred prvým cyklom	94 °C/5 min	94 °C/5 min
2.	denaturácia DNA	94 °C/30 s	94 °C/1 min
3.	hybridizácia primerov	55 °C/30 s	55 °C/1 min
4.	syntéza DNA	72 °C/1 min	72 °C/2 min
5.	dosyntetizovanie reťazca	72 °C/5 min	72 °C/10 min
	celkový počet krokov	30	30

4.8 Detekcia produktov PCR pomocou gélovej elektroforézy

Po ukončení PCR sa amplikóny analyzovali pomocou agarózovej gélovej elektroforézy.

- pripravil sa 1,5 % agarózový gél (1,5 g agarózy, 100 ml 0,5×TBE pufru), ktorý tuhol po dobu 30 minút
- pri detekcii PCR produktu boli použitý veľkostný štandard – rebrík , nanesený na gél v množstve 5 μ l (obsahoval fragmenty DNA o veľkosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp (viď obrázok 1).
- na gél sa naniesli vzorky s objemom 30 μ l (25 μ l amplikónov zmiešaných s 5 μ l nanášacieho pufru)
- gél bol umiestnený do vaničky a prevrstvený 0,5×TBE pufrom
- vanička s gélom sa pripojila na zdroj napätia (80V / 1 hod a 40 min)

Po dokončení elektroforézy bol gél premiestnený do kúpeľa s etídiumbromidom (0,5 μ g/ml) po dobu 30 minút. Gél bol následne premiestnený na transiluminátor a vyfotografovaný.



Obrázok 7: DNA štandard (rebríček 100 bp) po gélovej elektroforéze na agare.

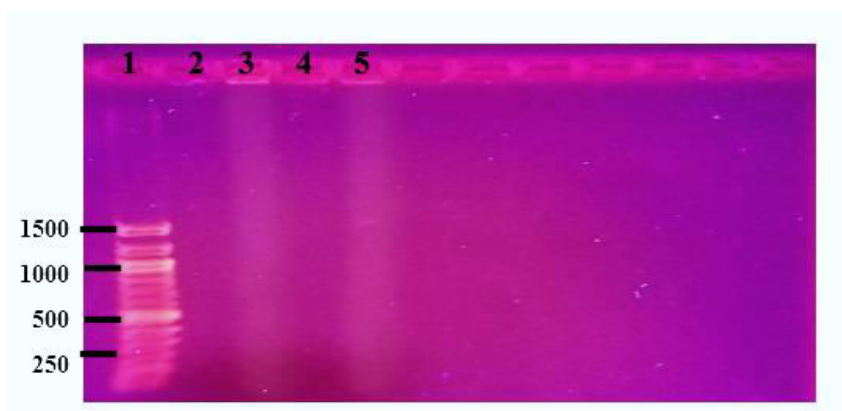
5. VÝSLEDKY

5.1 Príprava lyzátu z buniek mliečného produktu

Bunky boli nasedimentované, premyté a lyzované. Spracovanie mliečného výrobku a príprava lyzátu z buniek mliečného výrobku je popísaná v kapitole 4.4.1 a 4.4.2.

5.2 Izolácia DNA

Nasledovala izolácia DNA z hrubého lyzátu buniek mliečného výrobku Actimel v opakovaní (Actimel 1 až Actimel 4) pomocou magnetických nosičov podľa postupu 4.4.3. Po vyzolovaní DNA sa jej prítomnosť overila nanesením na gél a následnou elektroforézou sa potvrdila jej prítomnosť. Výsledky gélovej elektroforézy sú uvedené na obrázku 8.



Beh	DNA	Množstvo DNA (ng)/ gél	Detekcia DNA	Degradácia DNA
1	rebríček			
2	Actimel 1	1380	—	+
3	Actimel 2	1808	široký pás	+
4	Actimel 3	1706	—	+
5	Actimel 4	1964	široký pás	+

— nedetekovaná DNA , + degradovaná DNA

Obrázok 8: Agarózová gélová elektroforéza (1 %) DNA izolovaná z výrobku. Na gél bolo nanesených 20 μ l DNA. DNA z Actimel 1 a Actimel 3 neboli detekované.

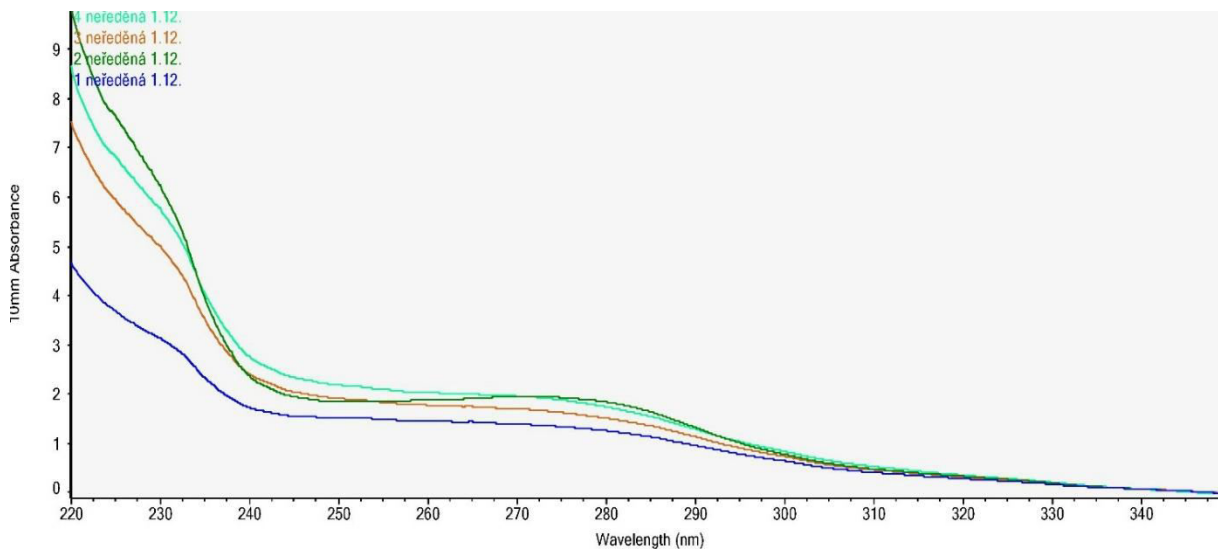
DNA bola výrazne degradovaná.

5.3 Stanovenie koncentrácie DNA

Stanovenie bolo prevedené spektrofotometrickým meraním DNA podľa postupu 4.5. Vo všetkých vzorkách DNA izolovaných z hrubého lyzátu buniek pomocou magnetických častíc, v štyroch opakovaníach bola spektrofotometricky zmeraná absorbanca v rozmedzí vlnových dĺžok 220 až 340 nm (graf 1). Následne bola stanovená koncentrácia a čistota DNA podľa postupu v kapitole 3.5. Výsledky spektrofotometrického stanovenia sú uvedené v tabuľke 5:

Tabuľka 5: Koncentrácie neriedenej DNA.

Neriedená DNA	c (ng/μl)	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260/280nm}	A _{260/230nm}
Actimel 1	69,0	1,379	1,187	1,16	0,45
Actimel 2	90,4	1,809	1,772	1,02	0,29
Actimel 3	85,3	1,705	1,442	1,18	0,34
Actimel 4	98,2	1,963	1,672	1,17	0,34

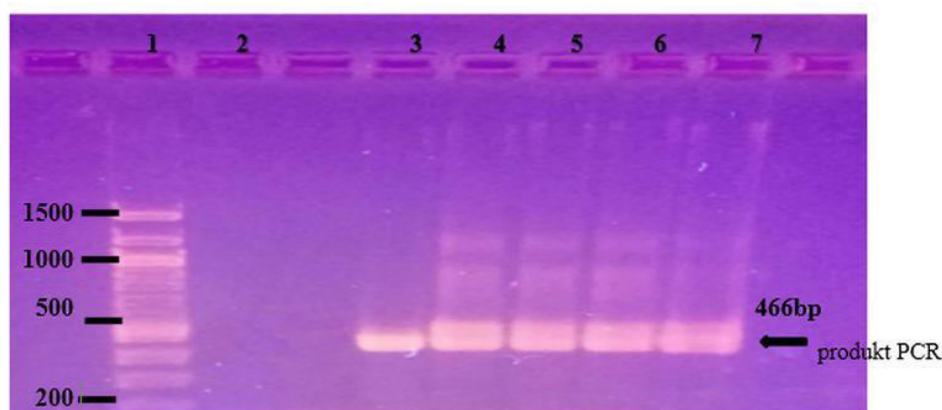


Graf 1: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke u DNA izolovaných z Actimelu v 4 opakovaníach (Actimel 1- Actimel 4).

Neriedená DNA izolovaná z Actimelu je približne rovnakej kvality. Bola izolovaná v rozmedzí koncentrácie 69 ng/μl až 98 ng/ μl. DNA je znečistená proteínami – A₂₆₀/A₂₈₀ v rozmedzí 1,02 až 1,16.

5.4 PCR špecifická pre doménu *Bacteria*

Zmes pre PCR bola pripravená podľa postupu v kapitole 4.6 a prevedená podľa postupu opísaného v kapitole 4.7. Produkty PCR boli detekované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy (1,5% agaróza) (4.8). Detekciou PCR produktov sa overila prítomnosť bakteriálnej DNA. Boli použité priméry špecifické pre doménu *Bacteria* – F_eub a R_eub. Výsledky gélovej elektroforézy sú uvedené na obrázku 9.



Beh	DNA	Množstvo DNA/ PCR zmes (ng)	Detekcia PCR produktu	Nešpecifické produkty PCR
1	rebríček			
2	negatívna kontrola	0	-	
3	pozitívna kontrola <i>L. casei</i>	10	++	
4	Actimel 1	69	+++	+
5	Actimel 2	90	+++	+
6	Actimel 3	85	+++	+
7	Actimel 4	98	+++	+

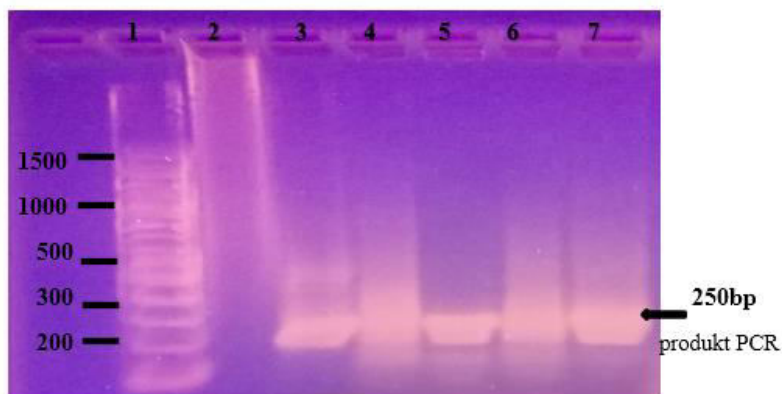
+,++,+++ produkty PCR s rôznou intenzitou - nedetekované produkty PCR

Obrázok 9: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR špecifických pre doménu *Bacteria* (466bp).

DNA sa amplifikovala vo všetkých vzorkách DNA izolovaných z Actimelu. Boli detekované produkty PCR špecifické pre doménu *Bacteria*. Bola preukázaná prítomnosť bakteriálnej DNA. Vedľa špecifických produktov PCR boli detekované aj nešpecifické produkty.

5.5 PCR špecifická pre rod *Lactobacillus*

Zmes pre PCR bola pripravená podľa postupu v kapitole 4.6 a prevedená podľa postupu opísaného v kapitole 4.7 a 4.8. Pomocou agarózovej gélovej elektroforézy (1,5% agaróza) PCR produktov, sa overila prítomnosť baktérie rodu *Lactobacillus*. Boli použité priméry špecifické pre rod *Lactobacillus* - LbL MA 1 rev a R16-1. Výsledky gélovej elektroforézy sú uvedené na obrázku 10:



Beh	DNA	MnožstvoDNA (ng)/ PCR zmes	Detekcia produktu PCR
1	rebríček		
2	negatívna kontrola	0	-
3	pozitívna kontrola <i>L. casei</i>	10	+++
4	Actimel 1	69	+++
5	Actimel 2	90	+++
6	Actimel 3	85	+++
7	Actimel 4	98	+++

+, ++, +++ produkty PCR s rôznou intenzitou - nedetekované produkty PCR

Obrázok 10: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR špecifických pre rod *Lactobacillus* (250bp).

DNA sa amplifikovala vo všetkých vzorkách DNA izolovaných z Actimelu. Boli detekované produkty PCR špecifické pre rod *Lactobacillus*. Bola preukázaná prítomnosť DNA rodu *Lactobacillus*.

5.6 PCR špecifická pre druh *Lactobacillus casei*

Zmes pre PCR bola pripravená podľa postupu v kapitole 4.6 a prevedená podľa postupu opísaného v kapitole 4.7 a 4.8. Prostredníctvom agarózovej gélovej elektroforézy (1,5 % agaróza) PCR produktov, sa overila prítomnosť DNA druhu *Lactobacillus casei*. Boli použité priméry špecifické pre druh *Lactobacillus casei* - Cas/ParFW, UniverRV. Výsledky gélovej elektroforézy sú uvedené na obrázku 11.



Beh	DNA	Množstvo DNA (ng)/ PCR zmes	Detekcia produktu PCR
1	rebríček		
2	negatívna kontrola	0	-
3	pozitívna kontrola <i>L. casei</i>	10	++
4	Actimel 1	69	+
5	Actimel 2	90	+
6	Actimel 3	85	+
7	Actimel 4	98	+

+, ++, +++ produkty PCR s rôznou intenzitou - nedetekované produkty PCR

Obrázok 11: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR špecifických pre druh *Lactobacillus casei* (136 bp).

DNA sa amplifikovala vo všetkých vzorkách DNA izolovaných z Actimelu. Boli detekované produkty PCR špecifické pre druh *L. casei*. Bola preukázaná prítomnosť DNA druhu *Lactobacillus casei*.

5.7 Zhrnutie výsledkov PCR

Zhrnutie výsledkov prevedených PCR špecifických pre doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus casei* je uvedené v tabuľke 6.

Tabuľka 6: Zhrnutie výsledkov špecifických PCR.

PCR špecifické pre :	Preukázanie špecifického amplikonu	Prítomnosť baktérií
doména <i>Bacteria</i>	+	+
rod <i>Lactobacillus</i>	+	+
druh <i>Lactobacillus casei</i>	+	+

Dôkazy o prítomnosti špecifických amplikónoch znamená potvrdenie prítomnosti baktérií. Výsledky PCR sú v súlade s údajmi deklarovanými výrobcom.

6. DISKUSIA

Cieľom experimentálnej časti práce bola izolácia DNA z probiotického potravinového výrobku a amplifikovať ju v PCR. Metóda polymerázovej reťazovej reakcie je vhodná metóda pre rýchlu a presnú identifikáciu DNA probiotických mikroorganizmov v potravinových výrobkoch.

DNA bola izolovaná z tekutého mliečneho výrobku Actimel, ktorý obsahuje 10 miliárd živých buniek na 100 ml. Pomocou špecifických primerov boli prevedené špecifické PCR, kde sa overovala prítomnosť DNA pre doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus casei*. DNA sa amplifikovala vo všetkých vzorkách DNA izolovaných z Actimelu (Actimel 1, Actimel 2, Actimel 3 a Actimel 4). Výsledky špecifických PCR sú v súlade s údajmi deklarovanými výrobcom.

6.1 Izolácia DNA z mliečneho výrobku a stanovenie jej množstva

Z mliečneho tekutého výrobku Actimel boli pripravené lyzáty buniek a z nich bola izolovaná DNA pomocou magnetických mikročastíc P(HEMA-co-GMA) (Španová a kol. 2006). Výsledná koncentrácia zložiek PEG 6000 16% (hm), NaCl – 2M. Po vyizolovaní DNA sa overila jej prítomnosť vo vzorkách Actimelu (Actimel 1-Actimel 4) nanesením na gél a následnou elektroforézou. Z obrázku 8 je vidieť, že vzorky DNA Actimel 1 a Actimel 3 boli výrazne degradované, takže neboli na géli vizualizované. Degradovaná bola i DNA Actimel 2 a Actimel 4, ktorá tvorila na gély široké pásy. Po gélovej elektroforéze sa merala jej absorbancia. Z hodnôt absorbancie A_{260} bola stanovená koncentrácia DNA. U všetkých štyroch vyizolovaných vzorkách (Actimel 1 - Actimel 4) bola koncentrácia v rozmedzí 69,0 až 98,2 ng/ μ l. Čistota DNA bola stanovená pomerom absorbancií 260/280nm (hodnoty 1,02 až 1,18). DNA bola znečistená proteínami. Toto znečistenie nemusí ovplyvňovať PCR (Sambrook a Russel 2001). DNA bola ďalej použitá pre druhovo špecifické PCR.

6.2 PCR špecifická pre doménu *Bacteria*

V PCR pre doménu *Bacteria* boli detekované produkty o veľkosti 466 bp. Prítomnosť bakteriálnej DNA sa preukázala u všetkých vzorkách Actimelu (Actimel 1- Actimel 4). Produkty PCR a ich veľkosť boli podľa predpokladov a v zhode s údajmi publikovanými v literatúre (Haarman a Knol 2006).

Vedľa špecifických produktov PCR boli detekované aj nešpecifické produkty. Dôvodom mohla byť vyššia koncentrácia DNA, ktorá bola pridávaná do zmesi pre PCR.

6.3 PCR špecifická pre rod *Lactobacillus*

Gélová elektroforéza produktov PCR preukázala prítomnosť DNA rodu *Lactobacillus* vo všetkých vzorkách Actimelu (Actimel 1- Actimel 4). Produkty PCR o veľkosti 250 bp boli podľa predpokladov a v zhode s údajmi publikovanými v literatúre (Dubernet a kol. 2000).

Z obrázku 10 je zreteľne vidieť, že PCR bola pretiažená, nakoľko sa použilo väčšie množstvo DNA na PCR zmes.

6.4 PCR špecifická pre druh *Lactobacillus casei*

Prítomnosť DNA druhu *Lactobacillus casei* bola potvrdená gélovou elektroforézou produktov PCR po amplifikácii všetkých vyizolovaných DNA z Actimelu (Actimel 1-4). Produkty špecifickej PCR o veľkosti 136 bp boli podľa predpokladov a v zhode s údajmi publikovanými v diplomovej práci (Grillová 2013). Produkty DNA boli slabšej intenzity. Môže to odrážať menšie množstvo cieľovej DNA *L. casei* v analyzovaných vzorkách.

7. ZÁVER

V mliečnom probiotickom výrobku Actimel bola preukázaná prítomnosť baktérií probiotického druhu *L.casei*, rodu *Lactobacillus* a domény *Bacteria*. Získané výsledky sú v súlade s údajmi deklarovanými výrobcom.

8. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- Aarestrup, F. M., Agerso, Y., Gerner–Smidt, P., Madsen, M., & Jensen, L. B. (2000). Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology And Infectious Disease*, 37(2), 127-137. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(00\)00130-9](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(00)00130-9).
- Azhari Ali, A. (2010-12-1). Beneficial Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Human Health: A Review. *Research Journal Of Microbiology*, 5(12), 1213-1221. Dostupné z <https://doi.org/10.3923/jm.2010.1213.1221>.
- Belicová, A., Križková, L., Krajčovič, J., Jurkovič, D., Sojka, M., Ebringer, L., & Dušínský, R. (2007). Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* species isolated from slovak bryndza cheese. *Folia Microbiologica*, 52(2), 115-119. DOI : <https://doi.org/10.1007/BF02932149>.
- Brown AC, Valiere A. (2004). Probiotics and Medical Nutrition Therapy. *Nutrition in clinical care : an official publication of Tufts University*, 7(2), 56-68.
- Burns, A. J., Rowland, I. R.. (2000). Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol*. 1(1): 13–24.
- Conway, P. L., Gorbach, S. L., & Goldin, B. R. (1987). Survival of Lactic Acid Bacteria in the Human Stomach and Adhesion to Intestinal Cells. *Journal Of Dairy Science*, 70(1), 1-12. Dostupné z [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)79974-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)79974-3)
- Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Mounier, J., Barbier, G., & Le Blay, G. (2013). Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control*, 30(1), 206-213. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.043>
- Dubernet, S., Desmasures, N. and Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *Fems Microbiology Letters*, 214(2), 271-275. Dostupné z <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11358.x>
- EFSA. (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. *Efsa Journal*, 5(12), 587-.
- European commission, 2003. Opinion of the scientific committee on animal nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. Dostupné z https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed_additives_rules_scan-old_report_out108.pdf

FarmiNews. Edukafarm. *Probiotické vlastnosti slovesnej bryndze*. 1/2009. Dostupné z <http://www.edukafarm.cz/data/soubory/casopisy/5/018-019.pdf>

Franz C.M.A.P, Stiles M.E., Schleifer K.H., Holzapfel W.H. (2003). Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol*, 88: 105-122.

Gibson, G. R., & Williams, C. M. (2000). *Functional foods: concept to product*. Cambridge, England: Woodhead Pub.

Girlich, D., Leclercq, R., Naas, T., & Nordmann, P. (2007). Molecular and Biochemical Characterization of the Chromosome-Encoded Class A-Lactamase BCL-1 from *Bacillus clausii*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 51(11). Dostupné z <https://doi.org/10.1128/AAC.00537-07>.

Goossens, H., D'Haene, V., Huys, G., Vancanneyt, K., Swings, J. (2006). Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Int J Infect Dis*. 3: 197-202.

Green, M. R., & Sambrook, J. (c2012). *Molecular cloning: a laboratory manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Grillová, L. (2012). *Vyhledání genů kódujících probiotické a další vlastnosti vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

Gronbach, K., Eberle, U., Muller, M., Olschlager, T. A., Dobrindt, U., Leithauser, F., et al. (2010). Safety of Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 Depends on Intestinal Microbiota and Adaptive Immunity of the Host. *Infection And Immunity*, 78(7), 3036-3046. Dostupné z <https://doi.org/10.1128/IAI.00218-10>.

Haarman, M., & Knol, J. (2006). Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied And Environmental Microbiology*, 72(4), 2359-2365. Dostupné z <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006>.

Hegazi, R. A., & Seth, A. (2013). The Role of Prebiotics in Gastrointestinal and Liver Diseases. *Bioactive Food As Dietary Interventions For Liver And Gastrointestinal Disease*, 569. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397154-8.00021-X>.

Hickson, M. (2011). Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and Clostridium difficile infection. *Therapeutic Advances In Gastroenterology*, 4(3), 185-197. Dostupné z <https://doi.org/10.1177/1756283X11399115>.

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal Of Clinical Microbiology*, 45(9). Dostupné z <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>.

Kopp-Hoolihan, L. (2001). Prophylactic and Therapeutic Uses of Probiotics. *Journal Of The American Dietetic Association*, 101(2), 229-241. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(01\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(01)00060-8).

Lee, J. Y., Farha, O. K., Roberts, J., Scheidt, K. A., Nguyen, S. B. T., & Hupp, J. T. (2009). Metal-organic framework materials as catalysts. *Chemical Society Reviews*, 38(5), 1450. Dostupné z <https://doi.org/10.1039/b807080f>.

Ljungh, A., & Wadström, T. (c2009). *Lactobacillus molecular biology: from genomics to probiotics*. Norfolk, UK: Caister Academic.

Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., & Gould, G. W. (2000). *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers.

Montrose, D.C., Floch M., Martin H. (2005). Probiotics Used in Human Studies. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 39(6), 469-484.

Oggioni MR, Pozzi G, Valensin PE, Galieni P, Bigazzi C. (1998). Recurrent Septicemia in an Immunocompromised Patient Due to Probiotic Strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1):325-326. Dostupné z <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0842>.

Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. -Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal Of Applied Microbiology*, 100(6), 1171-1185. Dostupné z <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>.

Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., & Ouwehand, A. C. (2003). Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Veterinary Microbiology*, 92(1-2), 111-119. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00356-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00356-5)

Roginski, H. (2002). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. ISBN: 978-0-12-227235-6

Salminen, S. Demonstration of safety of probiotics - a review. *International Journal Of Food Microbiology*, 44(1-2), 93-106. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00128-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00128-7).

Sásková, D. (2015). *Identifikace a charakterizace vybraných vlastností některých kmenů bakterií mléčného kvašení*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

Spinosa, M. R., Braccini, T., Ricca, E., De Felice, M., Morelli, L., Pozzi, G., & Oggioni, M. R. (2000). On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Research In Microbiology*, 151(5), 361-368. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00159-5](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00159-5).

Španová, A., & Rittich, B. (2010). *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.

Vankerckhoven, V., Huys, g., Vancanneyt M., 2008. Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: Recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends food Sci Technol*, 19: 102-114.

Whorwell, P. J., Altringer, L., Morel, J., Bond, Y., Charbonneau, D., O'Mahony, L., et al. (2006). *The American Journal Of Gastroenterology*, 101(7). Dostupné z <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00734.x>

Internetové zdroje :

<http://www.mysticalbiotech.in/>

9. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

bp	pár báz
BMK	baktérie mliečneho kvasenia
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EDTA	etyléndiamintetraoctová kyselina
EFSA	Európsky úrad pre bezpečnosť potravín
FDA	Úrad pre kontrolu potravín a liečiv
FAO	Organizácia pre výživu a poľnohospodárstvo v USA
GRAS	všeobecne považovaný za bezpečný
HCl	kyselina chlorovodíková
HIV	vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
TBE	Tris-borát-EDTA
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PEG	polyetylén glykol
QPS	kvalifikovaný predpoklad bezpečnosti
rRNA	ribozomálna ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
TE	Tris-EDTA
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia