

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IDENTIFIKACE VYBRANÝCH DRUHŮ PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ V POTRAVINOVÝCH DOPLŇCÍCH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

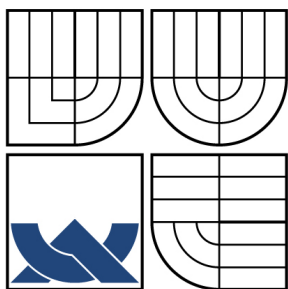
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

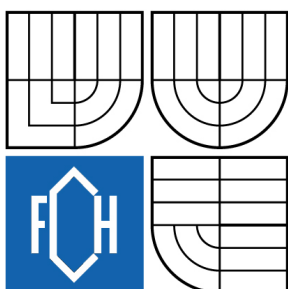
AUTHOR

LUCIA BUBENÍKOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IDENTIFIKACE VYBRANÝCH DRUHŮ PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ V POTRAVINOVÝCH DOPLŇCÍCH

IDENTIFICATION OF SELECTED PROBIOTIC BACTERIA IN FOOD ADDITIVES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

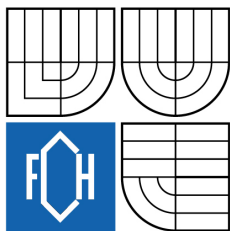
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LUCIA BUBENÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. BOHUSLAV RITTICH, CSc.

BRNO 2009



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0236/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Lucia Bubeníková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí bakalářské práce:	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	
Konzultanti bakalářské práce:		

Název bakalářské práce:

Identifikace vybraných druhů probiotických bakterií v potravinových doplncích

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Vyhodnoťte získané výsledky

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Lucia Bubeníková
Student(ka)

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bifidobakterie a laktobacily jsou grampozitivní bakterie patřící do skupiny bakterií mléčného kvašení. Jsou běžnou součástí mikroflóry trávicího traktu člověka, hrají důležitou roli ve výživě a zdraví, prevenci tvorby a kolonizaci trávicího traktu patogeny a udržování slizniční imunity. V současnosti jsou používány při výrobě funkčních potravinových výrobků a farmaceutických preparátů.

Na detekci a identifikaci bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* se využívá polymerázová řetězová reakce (PCR) se specifickými primery pro daný rod, při které dochází k amplifikaci určitého úseku DNA *in vitro*.

V této práci byla ze tří potravinových doplňků (Pangamin Bifi plus, Biopron Junior a Probiodom) izolována celková DNA metodou fenolové extrakce a pomocí rodově specifické PCR byly amplifikovány produkty o velikosti 523 bp (*Bifidobacterium*) a 250 bp (*Lactobacillus*). Ve všech třech výrobcích byla prokázána přítomnost bakterií obou bakteriálních rodů.

ABSTRACT

Bifidobacteria and lactobacilli are gram-positive bacteria which belong to the lactic acid bacteria group. They are ordinary constituents of gastrointestinal microflora, play a pivotal role in human nutrition and health, prevent pathogen colonization and maintain normal mucosal immunity. In present days they are used in production of functional food products and pharmaceutical additives.

Polymerase chain reaction (PCR) is used to the detection and identification of bacteria which belong to the genus of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. Specific primers for each genus are used in PCR reactions for *in vitro* amplification of definite part of DNA.

In this work, total DNA was isolated from three additives (Pangamin Bifi plus, Biopron Junior and Probiodom) by the method of phenol extraction and amplified using genus-specific PCR primers giving amplicons of 523 bp (*Bifidobacterium*) and 250 bp (*Lactobacillus*). Occurrence of bacteria of both genera was proved in all of the three tested probiotic products.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bifidobakterie, laktobacily, probiotika, probiotické doplňky, rodově specifická PCR

KEYWORDS

Bifidobacterium, *Lactobacillus*, probiotics, probiotic additives, genus-specific PCR

BUBENÍKOVÁ, L. *Identifikace vybraných druhů probiotických bakterií v potravinových doplncích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 35 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

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

Mé upřímné poděkování patří především doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za čas, odborné vedení a cenné rady, které mi věnoval při zpracování této práce ale také doc. RNDr. Aleně Španové za poskytnutí cenných informací a praktických rad.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Rod <i>Bifidobacterium</i>	8
2.1.1	Morfologické a fyziologické vlastnosti rodu <i>Bifidobacterium</i>	8
2.1.2	Výskyt bifidobakterií	9
2.2	Rod <i>Lactobacillus</i>	10
2.2.1	Homofermentativní laktobacily	10
2.2.2	Heterofermentativní laktobacily	11
2.3	Zdraví prospěšné vlastnosti	12
2.3.1	Probiotika	13
2.3.2	Prebiotika	13
2.3.3	Synbiotika	14
2.4	Identifikace mikroorganismů pomocí molekulárně biologických metod	14
2.4.1	Princip polymerázové řetězové reakce	14
2.4.2	Gelová elektroforéza	15
2.4.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	16
3	CÍL PRÁCE	17
4	MATERIÁL A METODY	18
4.1	Použité potravinové doplňky	18
4.2	Chemikálie a roztoky	19
4.2.1	Komponenty pro PCR	19
4.2.2	Roztoky pro lyzi bakteriálních buněk	19
4.2.3	Roztoky pro izolaci a purifikaci DNA	20
4.2.4	Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu	20
4.3	Pomůcky a přístroje	21
4.4	Metody	22
4.4.1	Izolace DNA z tablet	22
4.4.1.1	Příprava a lyze buněk	22
4.4.1.2	Fenolová extrakce DNA	22
4.4.1.3	Srážení DNA ethanolem	22
4.4.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	22
4.4.3	Gelová elektroforéza bakteriální DNA	23
4.4.4	PCR s purifikovanou DNA <i>Lactobacillus</i>	23
4.4.4.1	Příprava PCR směsi	23
4.4.4.2	Provedení PCR reakce	24
4.4.5	PCR s purifikovanou DNA <i>Bifidobacterium</i>	24
4.4.5.1	Příprava PCR směsi	25
4.4.5.2	Provedení PCR reakce	25
4.4.6	Detekce PCR produktu pomocí agarózové gelové elektroforézy	26
5	VÝSLEDKY	27
5.1	Izolace DNA z potravinových doplňků	27
5.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	28
5.3	Rodově specifická PCR <i>Bifidobacterium</i>	28
5.4	Rodově specifická PCR <i>Lactobacillus</i>	29
5.5	Shrnutí výsledků	30

6	DISKUSE	31
6.1	Izolace DNA metodou fenolové extrakce	31
6.2	Stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z potravinových doplňků	31
6.3	Rodově specifická PCR	31
7	ZÁVĚR	32
8	LITERATURA	33
9	SEZNAM POUŽITÝCH SKRATEK	35

1 ÚVOD

Během posledních 20-30 let byla věnována značná pozornost možnostem zlepšení zdravotního stavu člověka modulací střevní mikroflóry. Střevní mikroflóra má velkou metabolickou aktivitu, mění se během života a je významným faktorem, který ovlivňuje zdraví jedince. Význam těchto mikroorganismů byl dlouhou dobu opomíjen a zájem se soustřeďoval téměř výhradně na patogenní mikroorganismy, které jsou příčinou různých poruch trávicího ústrojí [2].

Mikroorganismy gastrointestinálního traktu jsou nejkompexnějším ekosystémem v lidském těle. Množství živých bakterií, které tvoří střevní mikroflóru, se pohybuje v rozmezí 10^{12} až 10^{14} CFU/g (střevního obsahu) a obsahují až 1000 různých rodů a druhů. Tyto bakterie hrají důležitou roli v lidské výživě a zdraví, při prevenci trávicího traktu před kolonizací patogeny a při udržování slizniční imunity [1]. Probiotické bakteriální kultury stimulují růst periferních mikroorganismů, čímž vytlačují potenciálně škodlivé bakterie a posilují přirozenou obranyschopnost organismu. V současnosti jsou mezi probiotika řazeny: laktobacily, bifidobakterie, streptokoky, laktokoky, enterokoky ale i některé kvasinky jako např. *Sacharomyces* [2]. Kvůli příznivému vlivu na zdraví člověka jsou v současnosti přidávány do mléčných výrobků (jogurtů, kysaných mléčných výrobků, sýrů) nebo jsou využívány pro komerční výrobu potravinových doplňků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Rod *Bifidobacterium*

První bifidobakterie byly izolovány ze stolice kojených dětí a popsány v roce 1899 Tissierem, jako *Bacillus bifidus*. Patří do kmene *Actinobacteria* a dosud byly popsány a rozříděny do šesti fylogenetických skupin, které zahrnují skupinu *B. boum*, *B. asteroides*, *B. adolescenti*, *B. pullorum*, *B. longum* a *B. pseudolongum* (Obr. 1) [3].

Bifidobakterie mají velmi významnou úlohu v intestinálním traktu kojenců, u nichž tvoří většinu střevní mikroflory. Z fermentovatelných sacharidů produkují kyselinu octovou a kyselinu mléčnou, které inhibují nežádoucí bakterie a stimulují intestinální peristaltiku. Kyselina octová, kterou bifidobakterie produkují ve větším množství než kyselinu mléčnou (v poměru 2:3), má silnější antagonistický účinek na gramnegativní bakterie než kyselina mléčná [4]. Růst bifidobakterií podporují tzv. bifidogení faktory: laktulóza (β -galaktozidofruktóza), N-acetyl-D-glukózamin obsahující sacharidy (bifidus faktor 1), transgalaktozylované oligosacharidy a další [4].

2.1.1 Morfologické a fyziologické vlastnosti rodu *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou nepravidelné, často se větvící grampozitivní, obvykle striktně anaerobní a katalasa negativní tyčinky, které netvoří spory. Jsou nepohyblivé a nesnášejí příliš kyselé prostředí. Rostou jednotlivě, v řetězcích nebo jiném uspořádání. Kolonie jsou na polotuhých médiích hladké, vypuklé s hladkými okraji, smetanově bílé, lesklé, měkké konzistence [4]. Optimální pH pro růst je 6 – 7, při pH 4,5 – 5,0 a nižším nebo 8,0 – 8,5 a vyšším prakticky nerostou [5]. Některé druhy tolerují jistou přítomnost kyslíku v prostředí, ale jen za přítomnosti oxidu uhličitého nebo bifidogenních faktorů. Optimální růst je v rozmezí 37 – 45 °C, hraniční teploty jsou v rozmezí 25 – 28°C (min.) a 43 – 45°C (max.) [4].

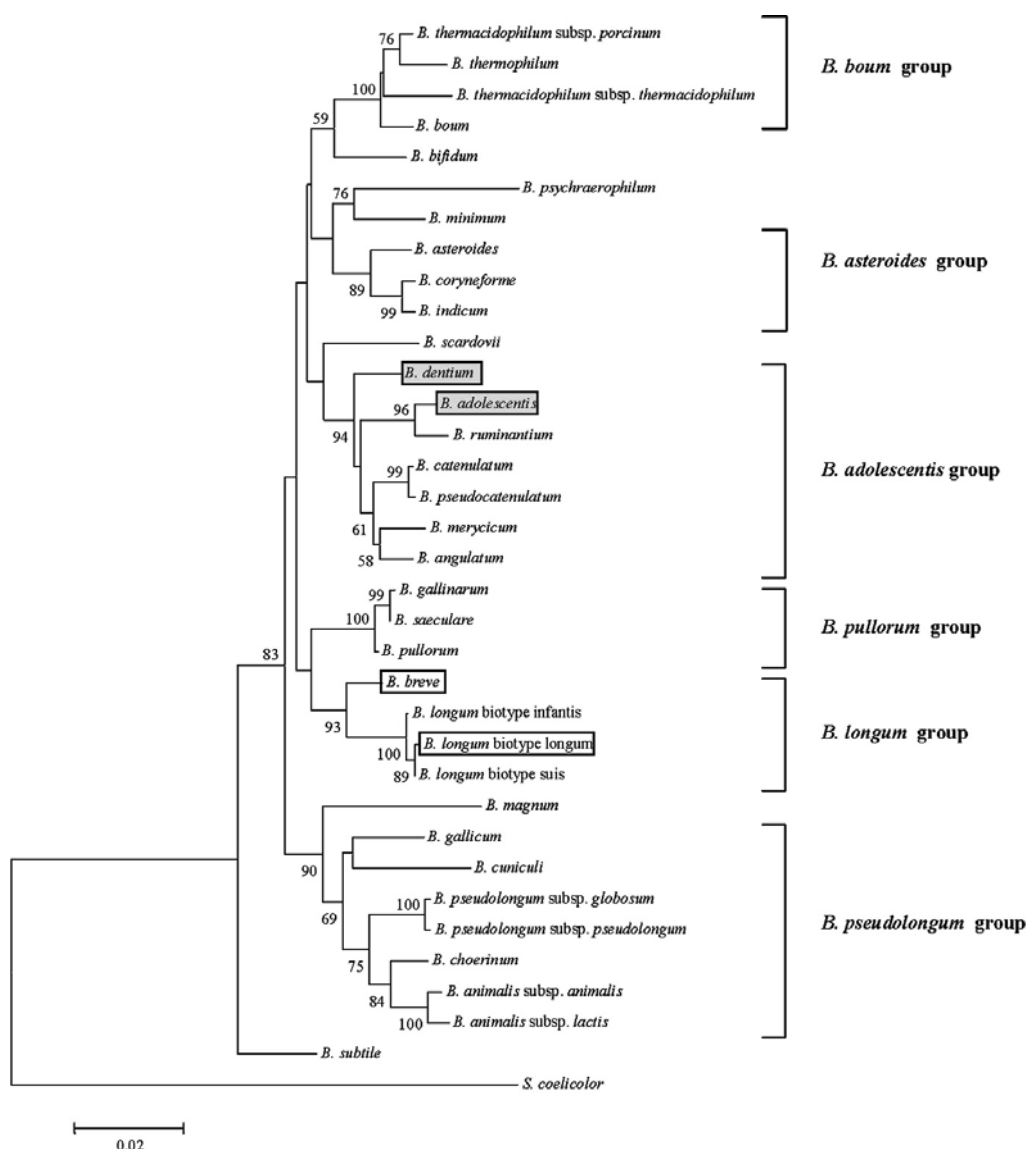
Gastrointestinální trakt (GIT) savců produkuje enzymy hydrolyzující disacharidy (např. sacharóza, laktóza, maltóza) a některé polysacharidy (škrob). Ale převážně postrádají enzymy, které štěpí oligo- a polysacharidy (které obsahují xylózu a arabinózu, stejně jako většina složených polysacharidů) [3]. Některé cukry, které nepodléhají štěpení hostitelskými enzymy, jsou považovány za prebiotické složky a zahrnují fruktooligosacharidy (FOS), galaktooligosacharidy (GOS), glukooligosacharidy, xylooligosacharidy, laktulózu a rafinózu [3].

Klíčovým enzymem hexózového kvašení, který odlišuje bifidobakterie od BMK je fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza (F6PPK), která štěpí fruktózo fosfát na erytrózo-4-fosfát a acetylfosfát [6]. Přítomnost F6PPK se používá jako význačný znak při identifikaci rodu, ale neumožňuje mezidruhové rozdělení [5]. V sacharolytickém metabolismu bifidobakterie produkují teoreticky z 2 molů hexózu 3 moly kyseliny octové a 2 moly L(+) kyseliny mléčné [4]. V praxi mohou nastat od tohoto poměru odchylky způsobené rozštěpením pyruvátu na acetát, kyselinu mravenčí a ethanol. Kromě toho je poměr acetát/laktát snižován v přítomnosti kyslíku [6].

2.1.2 Výskyt bifidobakterií

Většina bifidobakterií osidluje gastrointestinální trakt savců a vyznačuje se probiotickými vlastnostmi. Mimo izolace z GIT byli druhy bifidobakterií izolovány také z ústní dutiny člověka (*Bifidobacterium dentium*), odpadové vody (*Bifidobacterium minimum* a *Bifidobacterium subtile*) nebo ze střev hmyzu (*Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium indicum* a *Bifidobacterium coryneforme*) [3].

Jsou to první bakterie, které osídlují sterilní GIT novorozence v průběhu kojení, ale po odstavení kojení jsou nahrazeny jinými bakteriálními rody jako je např. *Bacteriodes*. Jsou ochranným faktorem proti střevním patogenům a stimulují imunitní systém. Ze 32 popsáných druhů, byly druhy *B. animalis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. bifidum* a *B. infantis* studovány ve větším rozsahu pro jejich působení na lidské zdraví. Jsou využívány jako přídavky do mléčných výrobků a potravinových doplňků [6].



Obr. 1 Fylogenetický strom rodu *Bifidobacterium*

2.2 Rod *Lactobacillus*

Laktobacily byly poprvé popsány v roce 1901 Beijerinckem. Tento rod byl nejprve řazen do skupin založených na fenotypických charakteristikách [7]. Původně byly rozříděny už Orla-Jensenem (1919) do tradičních skupin (termobakterie, streptobakterie a betabakterie), které dnes nemají taxonomickou hodnotu, protože nepředstavují fylogeneticky definované skupiny [4]. Obecně jsou charakterizovány jako grampozitivní, nesporulující a nepohyblivé tyčinky nebo kokobacily [5]. Laktobacily tvoří důležitou složku zdravé gastrointestinální mikroflóry. Produkují enzymy a vitamíny skupiny B, zvyšují stravitelnost bílkovin, sacharidů ale také tuků. Některé kmeny laktobacilů zvyšují biologickou dostupnost vápníku a produkují antimikrobiální látky inhibující významné enteropatogeny (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*) [8]. Podle zkvašování glukózy se laktobacily dělí na obligátně a fakultativně heterofermentativní a obligátně homofermentativní druhy.

2.2.1 Homofermentativní laktobacily

Homofermentativní bakterie mléčného kvašení (BMK) zkvašují hexózy reakcemi glykolýzy a laktát dehydrogenázy na kyselinu mléčnou (Tabulka 1). Tyto bakterie hrají důležitou úlohu v produkci, uchování a zlepšení potravy, hlavně rostlinného původu. Produkty fermentace cukrů a organických kyselin jsou v tomto procesu esenciální. Rostlinný materiál obsahuje spolu s hexózami (glukóza, fruktóza, manóza, laktóza) značné množství pentóz (xylóza a ribóza). Hexózy a pentózy jsou fermentovány heterofermentativními BMK fosfoketolázovou (nebo aerobně pentóza-fosfátovou) dráhou. Přebytek hexózy je použit na produkci exopolysacharidů (dextran, fruktan) různými skupinami BMK [9].

Tabulka 1: Obligátně homofermentativní laktobacily [4]

Druh, ssp.	Růst (°C)		Prostředí, ve kterém se převážně vyskytuje a jiné charakteristiky
	15	45	
<i>L. delbreckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	-	+	Rostlinný materiál fermentovaný při vyšších teplotách (40 – 53 °C)
<i>L. delbreckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	-	+	Jogurt a sýry
<i>L. delbreckii</i> ssp. <i>lactis</i>	-	+	Kysané mléko, sýry, lisované kvasnice, obilné zápary
<i>L. helveticus</i>	-	+	Kysané mléko, tvrdé sýry, ementálská kultura, max. při 50 – 52 °C
<i>L. acidophilus</i>	-	+	Intestinální trakt lidí a zvířat, ústní dutina lidí
<i>L. salivarius</i>	-	+	Ústní dutina a intestinální trakt lidí a drůbeže
<i>L. farciminis</i>	+	-	Masové produkty, pekárenský kvas, snáší 10 – 12 % NaCl
<i>L. yamanashiensis</i>	+	-	Jablečný mošt a víno, hroznový mošt

2.2.2 Heterofermentativní laktobacily

Fakultativně heterofermentativní laktobacily fermentují hexózy skoro výlučně (> 90 %) na kyselinu mléčnou, při nedostatku glukózy některé druhy produkují kyselinu octovou, ethanol a kyselinu mravenčí. Pentózy fermentují pomocí indukovatelné fosfoketolázy (Tabulka 2) [4]. Heterofermentativní bakterie mléčného kvašení (BMK) jako např. rody *Leuconostoc*, *Oenococcus* a *Lactobacillus* skvašují pentózy fosfoketolázovou cestou [9].

Tabulka 2: Fakultativně heterofermentativní laktobacily

Druh, ssp.	Růst (°C)		Prostředí, ve kterém se převážně vyskytuje a jiné charakteristiky
	15	45	
<i>L. alimentarius</i>	+	-	Marinované rybí produkty, masové produkty, pekárenský kvas, roste při 10 % NaCl, tvoří acetonin
<i>L. bavaricus</i> (<i>L. sake</i>)	+	-	Kysané zelí, fermentované zelné listy, růst mezi 2 – 37 °C
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>	+	+	Mléko, sýry, mléčné produkty, pekárenský kvas, kravský hnůj, siláž, GIT a ústní dutina
<i>L. casei</i> ssp. <i>pseudoplantarum</i>	+	-	Jako výše
<i>L. casei</i> ssp. <i>rahamnosus</i>	+	+	Jako výše
<i>L. casei</i> ssp. <i>tolerans</i>	+	-	Jako výše; přežívá pasterizaci (72 °C, 40 s)
<i>L. curvatus</i>	+	-	Mléko, siláž, kravský hnůj, kysané zelí, masné produkty, pekárenský kvas
<i>L. maltaromaticus</i>	+	-	Izolovaný z mléka se sladovou pachutí
<i>L. plantarum</i>	+	-	Mléčné produkty, siláž, kysané zelí, kysaná zelenina, pekárenský kvas, lidský GIT, ústní dutina, kravský hnůj
<i>L. sake</i> (<i>L. bavaricus</i>)	+	-	Kysané zelí a jiné fermentované vegetabilní potraviny, masné produkty, pekárenský kvas roste při 2 – 4 °C

Obligátně heterofermentativní laktobacily fermentují hexózy na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou (ethanol) a CO₂. Pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou (Tabulka 3) [4]. NAD(P)H, který je produkovaný během růstu z hexóz, je převeden na acetyl-CoA, za vzniku ethanolu. Ethanolová fermentace představuje omezený krok v hexózové fermentaci, proto část NAD(P)H je použita k produkci erytriolu a glycerolu. Fruktóza, pyruvát, citrát a O₂ může být použit k adici jako vnější elektronový akceptor pro reoxidaci NAD(P)H [9].

Tabulka 3: Obligátně heterofermentativní laktobacily

Druh, ssp.	Růst (°C)		Prostředí, ve kterém se převážně vyskytuje a jiné charakteristiky
	15	45	
<i>L. bifermetas</i>	+	-	Izolovaný z holandských sýrů s malými trhlinami
<i>L. brevis</i>	+	-	Mléko, sýry, kysané zelí, pekárenský kvas, siláž, GIT a ústní dutina lidí
<i>L. buchneri</i>	+	-	Mléko, sýry, fermentující vegetabilní materiál, ústní dutina lidí
<i>L. confusus</i> (<i>Weissella confusa</i>)	+	±	Cukrová třtina, mrkvová šťáva, příležitostně v mléku a ve slinách; ze sacharózy produkuje dextran
<i>L. divergens</i>	+	-	Vakuově balené chlazené maso
<i>L. fermentum</i>	-	+	Kvasnice, mléčné produkty, pekárenský kvas, fermentovaný rostlinný materiál, kravský hnůj, GIT a ústní dutina lidí
<i>L. fructivorans</i>	+	-	Kazící se majonéza, salátové dresingy, kazící se dezertní vína a aperitivy; upřednostňuje pH 5,0 – 5,5, neroste při vyšším počátečním pH jako 6,0.
<i>L. halotolerans</i> (<i>Weissella halotolerans</i>)	+	-	Masné produkty, roste za přítomnosti 12 % a velice pomalu při 14 % NaCl
<i>L. kandleri</i>	+	-	Produkce slizu ze sacharózy
<i>L. kefir</i>	+	-	Kefírové zrna a kefir
<i>L. reuteri</i>	-	+	Masné produkty, humánní a animální fekálie
<i>L. sanfranciscensis</i> (syn. <i>L. sanfrancisco</i>)	+	-	Pekárenský kvas
<i>L. viridescens</i> (<i>Weissella viridescens</i>)	+	-	Nepřirozeně zbarvené masové produkty, pasterizované mléko

2.3 Zdraví prospěšné vlastnosti

Probiotické bakterie musí mít schopnost usídlit se v zažívacím traktu člověka musí mít proto schopnost překonat pro nich nepříznivé prostředí v žaludku (žaludeční šťávy) a odolávat působení žlučových kyselin, peristaltice střev a mít nízké povrchové napětí [4].

Probiotika produkují látky, kterými mohou inhibičně působit na G⁺ a G⁻ bakterie. Mezi tyto látky patří organické kyseliny, peroxid vodíku a bakteriociny. Snižují nejen počet živých buněk, ale ovlivňují metabolismus bakterií a produkci toxinů. Některé probiotické kmeny mají schopnost adherovat na střevní epitel a tak kompetitivní inhibicí blokují adhezní místa pro potencionálně patogenní bakterie. Předpokládá se, že probiotické kmeny mohou také využívat živiny, které by jinak byly spotřebovány patogenními mikroorganismy. Některá probiotika mají schopnost degradovat receptory pro toxiny na střevní sliznici. Pro preventivní a terapeutické použití probiotik je důležitá jejich schopnost stimulovat specifickou

i nespecifickou imunitu. Studie ukázaly, že podávání probiotik vede k významnému vzestupu IgA specifických protilátek proti rotavirům v séru pacientů, což naznačuje, že humorální imunita hraje důležitou roli v mechanismu účinku probiotik [2]. Příznivý účinek probiotik na zdravotní stav hostitele může být způsoben též regulací hladiny cholesterolu. Probiotické bakterie přeměňují v tenkém střevě cholesterol na neúčinný koprostanol, tím pomáhají snížit hladinu sérového cholesterolu [10].

2.3.1 Probiotika

Slovo „probiotický“ pochází z řečtiny „pro život“ bylo v posledních letech používáno v několika různých významových směrech. Nyní jsou probiotika definována jako živé mikroorganismy (bakterie mléčného kvašení a jiné bakterie, nebo kvasinky aplikované ve fermentovaných výrobcích), které mají blahodárný účinek na zdraví uživatele, zajištěním rovnováhy jeho střevní mikroflóry [5].

Kvůli zdraví prospěšnému působení byly probiotické bakterie v průběhu minulých dvou desetiletí přidávány do jogurtů a kysaných mléčných výrobků. Použití probiotických bakteriálních kultur stimuluje růst preferenčních mikroorganismů, které vytlačují potenciálně škodlivé bakterie a posilují přirozené obranné mechanismy [11]. Mezi probiotika jsou v současné době řazeny laktobacily, bifidobakterie, streptokoky, enterokoky a *Saccharomyces*. Nejčastěji používaná probiotika jsou uvedena v Tabulce 4 [2].

Pro zařazení mezi probiotika musí jednotlivé bakteriální kmeny splňovat několik základních požadavků. Bakteriální kmeny musí mít prokazatelně pozitivní vliv na zdraví hostitele a musí být zdravotně nezávadné, izolované ze stejného živočišného druhu, jako je předpokládán příjemce, nesmí být toxické ani patogenní. Forma, ve které je probiotikum do trávicího ústrojí aplikováno, musí obsahovat dostatečné množství životaschopných bakterií, které musí mít schopnost přežít v trávicím ústrojí a být metabolicky aktivní. Bakterie musí být životaschopné během skladování. Důležité jsou i chuťové vlastnosti potraviny nebo potravinového doplňku, ve kterých jsou obsaženy [2].

Tabulka 4: Nejčastěji používaná probiotika

Lactobacilly	Bifidobakterie	G+ koky
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei, spec. rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus termophilus</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. lactis</i>	Kvasinkovité mikroorganismy
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	
<i>L. salivarius</i>	<i>B. breve</i>	
<i>L. lactis</i>		
<i>L. fermentum</i>		<i>Sacharomyces boulardii</i>

2.3.2 Prebiotika

Prebiotika jsou nestravitelné látky obsažené v potravinách, které podporují selektivně růst nebo aktivitu jedné bakterie nebo omezeného množství střevních bakterií a tím pozitivně ovlivňují složení střevní mikroflóry tlustého střeva, čímž mají celkově pozitivní vliv na zdraví

jedince. Procházejí horní částí trávicího ústrojí v nezměněné formě, kde se nehydrolyzují ani nevstřebávají. Slouží selektivně určitým bakteriím tlustého střeva jako substrát, který zvyšuje metabolickou aktivitu těchto bakterií nebo podporuje jejich růst [2]. Nejznámějším a komerčně dostupným prebiotikem je v současnosti inulin, oligofruktosa, která se v tenkém střevě neabsorbuje a nehydrolyzuje, a proto není riziková ani z hlediska zvýšení glykémie. Po přechodu prebiotik do tlustého střeva jsou fermentované jeho mikroflórou.

2.3.3 Synbiotika

Tento termín se používá pro současnou přítomnost prebiotik a probiotik. Jelikož termín sám evokuje pojem synergizmu, měl by být důsledně rezervován pro takové situace, kdy přítomné prebiotikum skutečně selektivně favorizuje přítomné probiotikum. V přísném slova smyslu, produkt, který by obsahoval oligofruktosu a bifidobakterie vyhovuje této definici synbiotika kdežto produkt obsahující oligofruktosu a např. *Lactobacillus casei* nikoliv, neboť *Lactobacillus casei* sám oligofruktosu nemetabolizuje ač je probiotikem [12].

2.4 Identifikace mikroorganismů pomocí molekulárně biologických metod

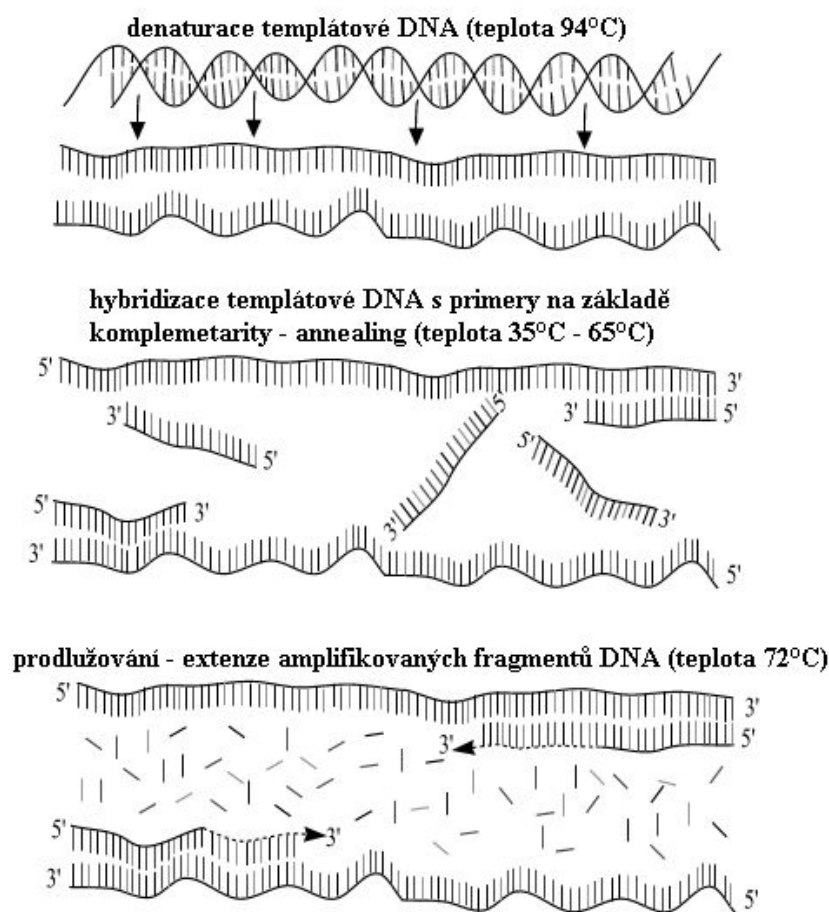
Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction – PCR) patří v současné době k nejvíce používaným molekulárně biologickým metodám se širokým spektrem využití v různých oblastech biologického výzkumu. Uvedená metoda umožnila rozvoj takových vědních disciplín jako je humánní a veterinární medicína, genetika člověka, rostlin a mikroorganismů, archeologie, kriminalistika apod. Autorem metody je Karry Mullis, nositel Nobelovy ceny, přičemž do komerční podoby byla přepracována kolektivem vedeným Henry Erichem. V roce 1985 byla poprvé publikována praktická aplikace metody při amplifikaci β -globinového genu a diagnostiky srpkovité anémie. PCR se stala nepostradatelnou téměř v každé biologické laboratoři, přičemž se neustále vyvíjejí nové varianty PCR a objevují se nové možnosti její aplikace [13].

2.4.1 Princip polymerázové řetězové reakce

Polymerázová řetězová reakce je enzymová metoda sloužící k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*, pro nějž jsou k dispozici oligonukleotidové primery komplementární k 3' a 5'-koncovým sekvencím úseku, jenž má být amplifikován. Tato metoda umožňuje až 10^6 násobné pomnožení během 2-3 hod. Jednotlivé kroky amplifikace zahrnují: denaturaci templátu, připojení primerů (hybridizace) a extensi připojených primerů DNA polymerasou (syntéza komplementárního řetězce) (Obr. 2) [14]. Při prvním reakčním cyklu vznikají delší fragmenty než odpovídá vzdálenosti vymezené zvolenými primery. Ve druhém cyklu již některé nově vzniklé molekuly představují fragmenty DNA požadované délky, jejichž podíl exponenciálně roste v následujících cyklech reakce. Doba zdvojení odpovídá jednomu cyklu reakce (denaturace templátu, připojení a extenze primeru) [14]. Opakování těchto kroků vede k syntéze segmentu s konci definovanými primery, které jsou inkorporovány do nově

vznikajících molekul. Fragmenty této délky tvoří hlavní produkt reakce, ale kromě toho vznikají i delší fragmenty DNA. Jejich podíl se však v průběhu reakce snižuje.

Cílová sekvence je vymezena dvěma oligonukleotidy (primery) a nachází se mezi nimi. Primery jsou chemicky syntetizovány jako sekvence komplementární ke specifickým místům na obou řetězcích molekuly DNA. Řada zdokonalení vedla ke zvýšení analytické citlivosti a specifity této techniky. Prvním bylo využití termostabilní DNA polymerázy (*Taq* polymeráza) izolované z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Enzymatická aktivita *Taq* polymerázy klesne na polovinu asi po 40 min při 90 °C [15]. Proto se PCR provádí obvykle v 30 až 40 cyklech.



Obr. 2 Průběh PCR

2.4.2 Gelová elektroforéza

Elektroforéza je metoda, která využívá pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. Lze ji využít pro separaci jak nízkomolekulárních tak i vysokomolekulárních látek. Látky se v elektrickém poli pohybují konstantní rychlostí úměrnou velikosti jejich nábojů kationty k anodě a anionty ke katodě. Gelovou elektroforézu lze použít i pro dělení makromolekul. Porézní gel umožňuje separaci molekul na principu síťového efektu a zároveň na základě elektroforetické pohyblivosti dělených látek [16]. Elektroforéza v agarózovém či polyakrylamidovém gelu se používá k identifikaci, separaci a purifikaci DNA fragmentů. Touto metodou může být detekován až 1 ng DNA. Pro posouzení velikosti jednotlivých

fragmentů DNA rozdělených pomocí gelové elektroforézy se používají hmotnostní standardy, což jsou směsi fragmentů DNA definovaných velikostí [14].

2.4.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Spektrofotometrické metody jsou založeny na schopnosti molekul absorbovat elektromagnetické záření určitých vlnových délek. Molekuly mohou excitovat v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie. Při přechodu molekul ze stavu s nižší energií do stavu s vyšší energií, musí absorbovat záření o frekvenci ν , která odpovídá rozdílu energií mezi energetickými hladinami obou kvantových stavů podle Bohrovy frekvenční podmínky:

$$\Delta E = E_p - E_q = h\nu = hc / \lambda$$

Energeticky nejnáročnější jsou přechody mezi elektronovými energetickými hladinami. Běžně jsou způsobeny adsorpcí ultrafialového (190 – 400 nm) a viditelného záření (400 – 800 nm) [17].

3 CÍL PRÁCE

Práce byla zaměřena na průkaz přítomnosti probiotických bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, ve 3 vybraných potravinových doplncích. K jejich identifikaci byly použity rodově specifické polymerázové řetězové reakce.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použité potravinové doplňky

1. PANGAMIN BIFI PLUS

Sušené pivovarské kvasinky obohacené o bakterie mléčného kvašení a pupalkový olej.

Výrobce: Pivovary Staropramen a.s.

Nádražní 84, Praha 5 Smíchov

Pivovar Braník

Datum výroby: 14.10.2003

Datum spotřeby: 14.10.2004

Složení: sušené pivovarské kvasnice *Sacharsomyces cerevisiae*, sušené odtučněné mléko s obsahem bifidobaktrií a laktobacilových kultur, pupalkový olej.

Vitaminy – B1, B2, B6, kyselina pantotenová, pangamová a listová, niacin, biotin, cholin

Minerální látky – Ca, P, K, Mg

Stopové prvky – Fe, Cu, Zn, Mn

Výrobek obsahuje cca 45% bílkovin

2. BIOPRON JUNIOR

Probiotický komplex

5 miliard CFU v denní dávce

Výrobce: VALOSUN a.s.

Kytnerova 405/3

62100 Brno, Česká republika

Datum spotřeby: 12/2009

Složení: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, fruktooligosacharidy, vanilkové aroma, bramborový škrob

www.valosun.com



3. PROBIODOM

Výživový doplněk

2,5 miliard probiotik v 1 gramu, 9 probiotických druhů

Výrobce: Kompava s.r.o.

Piešťanská 1202/44

915 01 Nové Mesto nad Váhom, Slovensko

Datum výroby: 19.3.2008

Datum spotřeby: 19.3.2009

Složení: kapsle – kukuřičný škrob, maltodextrin, inulin, chlorid draselný, rody bakterií, sulfit hořečnatý, fruktooligosacharidy (FOS), enzymy (amyláza), vanilkový prášek, sulfid manganistý, želatinová kapsle, barvivo (oxid titaničitý)

Bakteriální druhy: *Bifidobacterium infantis* – 2 mg, *Bifidobacterium lactis* – 2 mg, *Bifidobacterium longum* – 2 mg, *Enterococcus faecium* – 2 mg, *Lactobacillus acidophilus* – 2 mg, *Lactobacillus casei* – 2 mg, *Lactobacillus plantarum* – 2 mg, *Lactobacillus salivarius* – 2 mg, *Lactobacillus lactis* – 2 mg

www.kompava.sk



4.2 Chemikálie a roztoky

Všechny chemikálie byly v čistotě p. a. Roztoky byly připravovány ze sterilních zásobních roztoků (sterilizace při 121 °C, 20 min). Ředění bylo prováděno sterilní destilovanou vodou.

- Agaróza pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Bromfenolová modř (Sigma, St. Louis, USA)
- DNA standard (Malamité, v.o.s) obsahující fragmenty DNA o velikosti 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 a 100 bp
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Ethidiumbromid (EtBr) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Švédsko)
- Chloroform (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Izoamylalkohol (Amaresco, Ohio, USA)
- Kyselina boritá (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Octan sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Proteináza K (Sigma, St. Louis, USA)
- RNáza A (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Amresco, Solon, USA)

Ostatní chemikálie v čistotě p.a. pocházely z běžně dostupných komerčních zdrojů.

4.2.1 Komponenty pro PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Reakční pufr kompletní pro *Taq* DNA polymerázu 1.1. (10x koncentrovaný); složení: síran amonný, chlorid hořečnatý (množství vyšší než 2,5 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- dNTP směs 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), pH 7,5 (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- *Taq* DNA polymeráza 1.1 (1U/μl) (Top-Bio, Praha, ČR)

4.2.2 Roztoky pro lyzi bakteriálních buněk

- EDTA (Serva, Heidelberg, SNR)
- Hydroxid sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Proteináza K (100 μg/ml vody) (Sigma, St. Louis, USA)
- SDS (Sigma, St. Louis, USA)
- Tris-báze (Amaresco, Solon, USA)

Příprava 0,5 M EDTA (pH 8,0):

- 1861,1 g EDTA rozpuštěno v 800 ml destilované vody
- pomocí NaOH bylo upraveno pH na 8,0
- roztok byl doplněn do objemu 1 l destilovanou H₂O

Příprava zásobního roztoku 1 M Tris-HCl (pH 7,8):

- 12,1 g Tris-báze
- 11 ml 1 M HCl
- 70 ml destilované H₂O
- pomocí HCl bylo upraveno pH na 7,8

Příprava lyzačního roztoku A:

- 10 mM Tris-HCl (pH 7,8)
- 1 mM EDTA (pH 8,0)
- roztok byl připraven sterilně ze zásobních roztoků 1 M Tris-HCl a 0,5 M EDTA

Příprava lyzačního roztoku B:

- lyzační roztok A
- lysozym 3 mg/ ml
- lysozym byl přidán do lyzačního roztoku těsně před použitím

4.2.3 Roztoky pro izolaci a purifikaci DNA

- Ethanol (Paliva-Lachema, Brno, ČR)
- Fenol (Paliva-Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Paliva-Lachema, Brno, ČR)
- Izoamylalkohol (Amaresco, Ohio, USA)
- Octan sodný (Paliva-Lachema, Brno, ČR)

Příprava TE pufru:

- 10 mM Tris-HCl (pH 7,8)
- 1 mM EDTA (pH 8,0)
- roztok byl připraven sterilně ze zásobních roztoků 1 M Tris-HCl a 0,5 M EDTA

Příprava CIZ:

- směs chloroformu a izoamylalkoholu v poměru 24:1

4.2.4 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- Bromfenolová modř (Sigma, St. Luis, USA)
- Ethidium bromid (Sigma, St. Louis, USA)
- Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Švédsko)

- PCR vkladací pufr Yellow load obsahující žluté barvivo – oranž G (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR vkladací pufr obsahující barviva – bromofenolovou modř a xylen kyanol (Top-Bio, Praha, ČR)
- Kyseliny boritá (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- DNA standard (Malamité, v.o.s) obsahující fragmenty DNA o velikosti 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 a 100 bp

Příprava TBE pufru (5× koncentrovaný):

- 54 g Tris-HCl
- 27,5 g H₃BO₃
- 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
- roztok byl doplněn do objemu 1 l sterilní destilovanou vodou, před použitím 10x naředěn

Příprava nanášecího pufru (6x koncentrovaný):

- 0,04 g Bromfenolové modři
- 2,5 g Ficoll 400
- 100 ml destilovaná H₂O

4.3 Pomůcky a přístroje

- Laboratorní váhy (Kern and Sohn, Německo)
- Centrifuga Mini spin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exikátor (KIF LAB Freiburg, Německo)
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10, 20, 200 a 1000 µl (Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 5020 (SENCOR, ČR)
- Očkovací box (Fatran, ČR)
- Termostat Mini incubator (Labnet, USA)
- Termostat FTC 901 (VELP SCIENTIFICA, Milano, Itálie)
- Minicycler PTC 100 (MJ Research, USA)
- Termocykler PTC 200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Mini gel (Hoefer, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Lighting Volt Power Supply, model OSP-300 (Owl Scientific, USA)
- NanoPhotometr (Implen, Německo)
- Digitální fotoaparát (Kodak, Dánsko)
- Běžné laboratorní sklo, umělohmotný laboratorní materiál a pomůcky

4.4 Metody

Všechny uvedené postupy byly prováděny podle učebních textů laboratorního cvičení [18].

4.4.1 Izolace DNA z tablet

4.4.1.1 Příprava a lyze buněk

- Tablety byly sterilně odebrány a rozdrceny
- K 1 g výrobku byl přidán 1 ml (3 ml) lyzačního roztoku (10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 ml EDTA (pH 8,0), lyzozym 3 mg/ml), ve kterém se vzorek rozsuspendoval
- Po 1 hodině inkubace při laboratorní teplotě bylo ke vzorku přidáno 50 μ l 20 % SDS a 5 μ l proteinázy K (1 mg/ml)
- Vzorky byly inkubovány při 55 °C do druhého dne (18 hod)
- Z připravených hrubých lyzátů byla DNA izolována metodou fenolové extrakce

4.4.1.2 Fenolová extrakce DNA

- K lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu (předestilovaného, pH upraveno na 7,8). Směs byla promíchávána kývavým pohybem po dobu 4 minut
- Vzorky byly centrifugovány při 13400 otáčkách po dobu 3 minut
- Pomocí špičky s ustříženým hrotem byly odebrány vodní fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky
- K vodní fázi s DNA bylo přidáno 700 μ l CIZ směsi (chloroform-izoamylalkohol, 24:1) a kývavým pohybem byla směs promíchávána 4 minuty
- Vzorky byly centrifugovány při 13400 otáčkách 3 minuty
- Vodní fáze s DNA byla odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky

4.4.1.3 Srážení DNA ethanolem

- Ke vzorku DNA byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného a směs byla promíchána
- Byl přidán 1 ml 96 % ethanolu a obsah byl promíchán
- DNA byla vysrážena při -20 °C po dobu 30 minut
- Vzorky byly centrifugovány při 13400 otáčkách 15 minut. Opatrně byl slit supernatant a dále se pracovalo se sedimentem
- Sediment DNA byl vysušen v exsikátoru a následně byl rozpuštěn v 200 μ l TE pufru

4.4.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

- Spektrofotometrické stanovení bylo prováděno na přístroji NanoPhotometer™ Implen
- Podle tabulky přiložené k přístroji byl zvolen faktor a objem pipetovaného vzorku, podle předpokládané koncentrace – faktor 50, objem vzorku 4 μ l
- Byla změřena absorbance vzorku (A_{230} , A_{260} , A_{280} , A_{320} nm a poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) a vypočtena koncentrace DNA
- Jako slepý vzorek byl použit TE pufr

Poměr absorbancí čisté DNA se pohyboval v rozmezí 1,8 – 2,0. Obsahuje-li vzorek proteiny je poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,8$ v případě obsahu RNA je poměr $\geq 2,0$.

4.4.3 Gelová elektroforéza bakteriální DNA

- Připravil se 0,8 % agarózový gel (0,3 g agarózy, 50 ml 0,5x TBE pufru), suspenze byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě, nalita do misky s hřebínkem a nechala se zatuhnout
- Na polyethylenovém proužku bylo smícháno 15 μl DNA s 3 μl nanášecího pufru. Směs byla nanesena do komůrky gelu
- Vanička s gelem byla opatrně převrstvena 250 ml 0,5x TBE pufru a byl zapnut zdroj napětí (60 V/ 1 hod.)
- Po skončení elektroforézy byl gel barven ethidium bromidem (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) po dobu 0,5 - 1 hod.
- Gel byl opláchnut v destilované vodě umístěn na transiluminátor, kde byl pozorován v UV světle a vyfotografován

4.4.4 PCR s purifikovanou DNA *Lactobacillus*

Pro zařazení do rodu *Lactobacillus* byla použita rodově specifická PCR. Pro amplifikaci PCR produktu o velikosti 250 bp byly použity primery LbLMA1 a R16 – 1 [18]. Sekvence primerů je uvedena v Tabulce 5.

Tabulka 5: Primery specifické pro rod *Lactobacillus*

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost produktu (bp)
LbLMA1	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250
R16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA	

4.4.4.1 Příprava PCR směsi

- Jednotlivé komponenty PCR směsi byly přidávány v pořadí uvedeném v Tabulce 6
- Jako DNA matrice byla použita purifikovaná DNA izolovaná z analyzovaných vzorků
- Byla připravena negativní kontrola (místo DNA matrice byla do PCR směsi přidána PCR voda) a pozitivní kontrola (jako DNA matrice byla použita purifikovaná DNA bakterií rodu *Lactobacillus*)

Tabulka 6: Komponenty pro přípravu PCR směsi

Komponenta	Množství (μl)
voda pro PCR	19,0
10x reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10 mM)	0,5
primer LbLMA1 (10pmol/ μl)	0,5
primer R16-1 (10pmol/ μl)	0,5
DNA polymeráza Top Bio 1.1 (1U/ μl)	1,0
DNA matrice (10 ng/ μl)	1,0
Celkem	25,0

Pro urychlení práce se může připravit master mix, který obsahuje jednotlivé složky (bez DNA) v množství vynásobeném počtem vzorků (včetně negativní a pozitivní kontroly). Z takto připravené směsi se odpipetuje do jednotlivých Eppendorfových zkumavek 24 μl směsi a přidá se 1 μl DNA matrice.

4.4.4.2 Provedení PCR reakce

- Vzorky obsahující všechny složky PCR směsi byly promíchány a krátce centrifugovány
- Vzorky byly umístěny do cyklátoru a byl nastaven program pro průběh PCR při detekci bakterií rodu *Lactobacillus* (LBC ROD) dle Tabulky 7
- Kroky 2 – 4 byly opakovány 30krát

Tabulka 7: Program PCR pro detekci bakterií rodu *Lactobacillus*

Krok	Teplota (°C)	Čas
1. počáteční denaturace	95	5 min
2. denaturace	95	30 s
3. připojení primerů	55	30 s
4. syntéza DNA	72	1 min
5. poslední cyklus	72	10 min

Po skončení PCR byl přístroj nastaven na 10 °C. To umožnilo v přístroji uchovávat vzorky s PCR produktem do druhého dne bez použití chladničky.

4.4.5 PCR s purifikovanou DNA *Bifidobacterium*

Pro zařazení bakterií do rodu *Bifidobacterium* byla použita rodově specifická PCR. Pro amplifikaci PCR produktu o velikosti 523 bp byly použity primery Bif164 a Bif662 (jejichž cílovou molekulou je oblast 16S rDNA) [19]. Sekvence primerů je uvedena v Tabulce 8.

Tabulka 8: Primery specifické pro rod *Bifidobacterium*

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost produktu (bp)
Bif164	CAT CCG GCA TTA CCA CCC	523
Bif662	CCA CCG TTA CAC CGG GAA	

4.4.5.1 Příprava PCR směsi

- Byla připravena PCR směs, do které byly jednotlivé komponenty přidávány v pořadí v jakém jsou uvedeny v Tabulce 9
- Jako DNA matrice byla použita DNA izolovaná z analyzovaných vzorků
- Byla připravena negativní kontrola (místo DNA matrice byla do PCR směsi přidána PCR voda) a pozitivní kontrola (purifikovaná DNA bakterií rodu *Bifidobacterium*)

Tabulka 9: Komponenty pro přípravu PCR směsi

Komponenta	Množství (μl)
voda pro PCR	19,0
10x reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10 mM)	0,5
primer Bif164 (10pmol/ μl)	0,5
primer Bif662 (10pmol/ μl)	0,5
DNA polymeráza Top Bio 1.1 (1U/ μl)	1,0
DNA matrice (10 ng/ μl)	1,0
Celkem	25,0

4.4.5.2 Provedení PCR reakce

- Vzorky obsahující všechny složky PCR směsi byly promíchány a krátce centrifugovány
- Vzorky byly umístěny do cyklátoru a byl nastaven program pro průběh PCR při detekci rodu *Bifidobacterium* dle Tabulky 10
- Kroky 2 – 4 byly opakovány 30krát

Tabulka 10: Program PCR pro detekci rodu *Bifidobacterium*

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)
1. počáteční denaturace	94	5
2. denaturace	95	1
3. připojení primerů	55	1
4. syntéza DNA	72	2
5. poslední cyklus	72	5

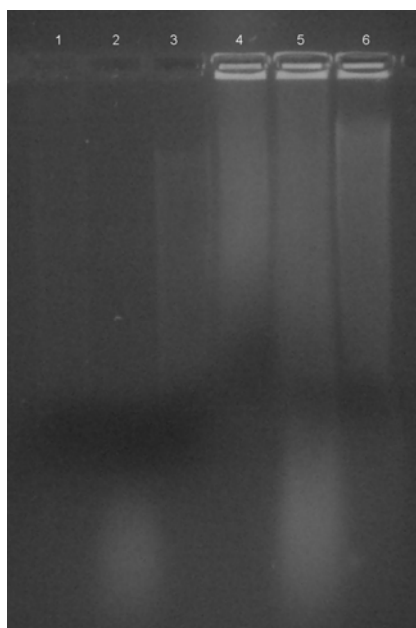
4.4.6 Detekce PCR produktu pomocí agarózové gelové elektroforézy

- Byl připraven 1,8 % agarózový gel (0,9 g agarózy, 50 ml 0,5x TBE pufru)
- K PCR produktu (25 μ l) bylo přidáno 5 μ l vkladacího pufru a směs byly nanášena do komůrky
- Do další komůrky byl nanášen DNA standard (100 bp žebříček) (5 μ l)
- Elektroforéza probíhala 1,5 – 2 hod při 60 V
- Gel byl barven v roztoku ethidium bromidu (1 μ g/ ml) po dobu 1 hodiny
- Gel byl opláchnut v destilované vodě umístěn na transiluminátor, kde byl pozorován v UV světle a fotografován

5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace DNA z potravinových doplňků

Ze třech různých potravinových doplňků (1-3), ze kterých jeden byl po expirační době, byla izolována DNA pomocí fenolové extrakce. K detekci bakteriální DNA byla použita agarózová gelová elektroforéza. Výsledky elektroforézy jsou uvedeny na Obr. 3. Vedle fenolové extrakce byla DNA izolována i z hrubých lyzátů buněk. Na gelu byl detekován smír (šmouha), což svědčí o degradaci izolované DNA.



Obr. 3 Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované fenolovou extrakcí a z hrubých lyzátů buněk

Běh	Vzorek	Objem vzorku [μl]	Objem nanášecího pufru [μl]	Detekce DNA
1	purifikovaná DNA (Pangamin Bifi plus)	15	3	(+)
2	purifikovaná DNA (Biopron Junior)	15	3	(+)
3	purifikovaná DNA (Probiodom)	15	3	+
4	hrubý lyzát (Pangamin Bifi plus)	15	3	++
5	hrubý lyzát (Biopron Junior)	15	3	++
6	hrubý lyzát (Probiodom)	15	3	++
(+)	detekován PCR produkt o velmi slabé intenzitě,			
+	detekován PCR produkt o slabé intenzitě,			
++	detekován PCR produkt o střední intenzitě.			

5.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Pro stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA byl použit přístroj NanoPhotometer™ Implen. Hodnota absorbance $A_{260\text{nm}}$ sloužila k výpočtu koncentrace DNA a poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ k určení čistoty izolované DNA. Výsledky měření jsou shrnuty v Tabulce 11.

Tabulka 11: Hodnoty koncentrace DNA izolované z jednotlivých výrobků a absorbance při různých vlnových délkách

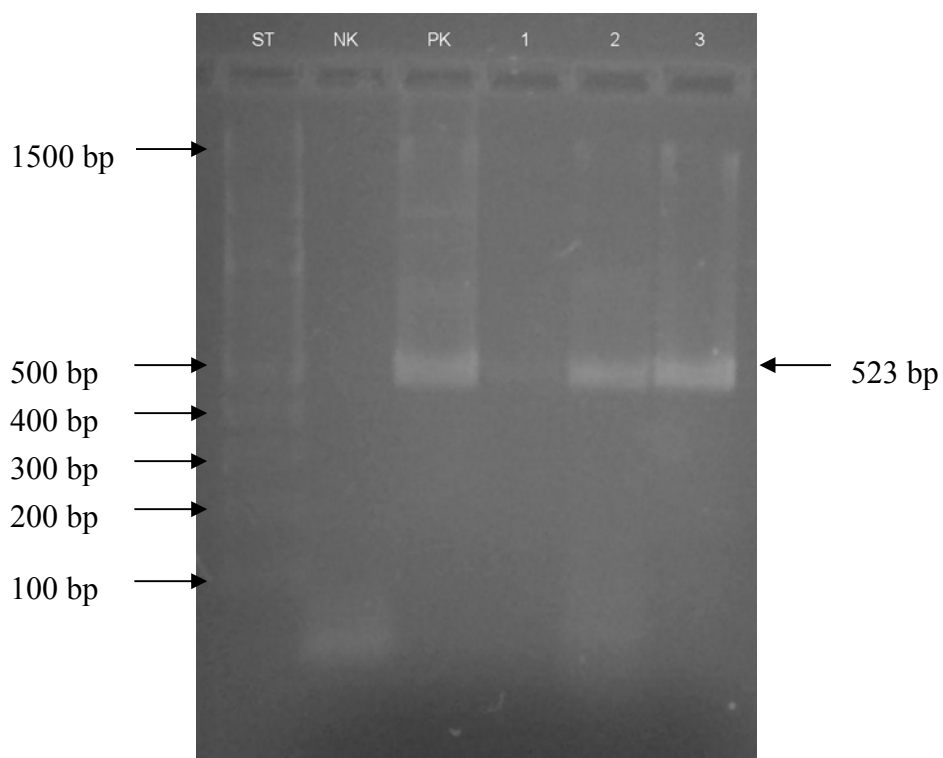
Veličina	Vzorek		
	1 Pangamin Bifi plus	2 Biopron Junior	3 Probiodom
koncentrace (ng/ μl)	2270	75,0	47,5
$A_{230\text{nm}}$	0,575	0,016	0,009
$A_{260\text{nm}}$	0,938	0,032	0,022
$A_{280\text{nm}}$	0,485	0,020	0,013
$A_{320\text{nm}}$	0,030	0,002	0,003
$A_{260\text{nm}}/A_{180\text{nm}}$	1,99	1,67	1,90

5.3 Rodově specifická PCR *Bifidobacterium*

Rodově specifická PCR pro amplifikaci produktu o velikosti 523 bp byla provedena pomocí primerů Bif164 a Bif662 [19]. Výsledky agaróзовé gelové elektroforézy PCR produktů jsou uvedeny a znázorněny na Obr. 4.

Vzorek		Objem PCR směsi (μl) nanášené na gel	Detekce PCR produktu
ST	standard		100 bp žebříček
NK	negativní kontrola	25	-
PK	pozitivní kontrola	25	+++
1	Pangamin Bifi plus	25	+
2	Biopron Junior	25	++
3	Probiodom	25	+++

- PCR produkt nebyl detekován
- + detekován PCR produkt o slabé intenzitě,
- ++ detekován PCR produkt o střední intenzitě,
- +++ detekován PCR produkt o silné intenzitě.



Obr. 4 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (523 bp). DNA byla amplifikována pomocí primerů specifických pro rod *Bifidobacterium*

5.4 Rodově specifická PCR *Lactobacillus*

Rodově specifická PCR pro detekci bakterií rodu *Lactobacillus* byla provedena pomocí primerů LbLMA1 a R16 – 1 [20]. Výsledky agarózové gelové elektroforézy PCR produktů (asi 250 bp) jsou uvedeny na Obr. 5.

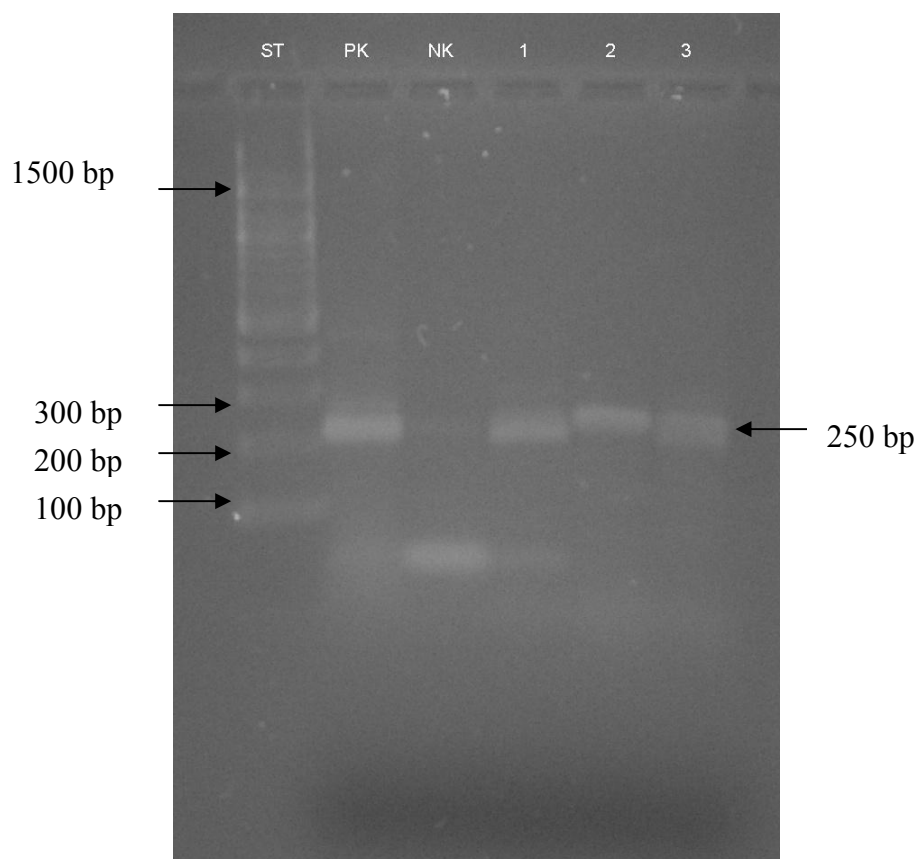
Vzorek		Objem PCR směsi (μl) nanášené na gel	Detekce PCR produktu
ST	standard		100 bp žebříček
PK	pozitivní kontrola	25	+++
NK	negativní kontrola	25	(-)*
1	Pangamin Bifi plus	25	+++
2	Biopron Junior	25	++
3	Probiodom	25	++

* zřejmě došlo k částečnému přelití PCR produktu z pozitivní kontroly, při opakování byla negativní kontrola bez jakéhokoliv PCR produktu

- PCR produkt nebyl detekován,

++ detekován PCR produkt o střední intenzitě,

+++ detekován PCR produkt o silné intenzitě



Obr. 5 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů. DNA byla amplifikována pomocí primerů specifických pro rod *Lactobacillus*

5.5 Shrnutí výsledků

Na základě amplifikace DNA rodově specifickými primery PCR produktů byla ve výrobcích Pangamin Bifí plus, Biopron Junior a Probiodom zjištěna přítomnost specifických PCR produktů a tak potvrzena deklarovaná přítomnost bakterií rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 12.

Tabulka 12: Přítomnost bifidobakterií a laktobacilů ve zkoumaných výrobcích

Výrobek	Přítomnost bifidobakterií	Přítomnost laktobacilů
Pangamin Bifí plus	+	+
Biopron Junior	+	+
Probiodom	+	+

+ přítomnost bakterií byla detekována

6 DISKUSE

6.1 Izolace DNA metodou fenolové extrakce

Ze třech různých potravinových doplňků (Pangamin Bifi plus, Biopron Junior a Probiodom) byly připraveny hrubé lyzáty buněk, ze kterých byla metodou fenolové extrakce izolována DNA. Přítomnost bakteriální DNA produktu byla prokázána gelovou elektroforézou na 0,8 % agarózovém gelu.

6.2 Stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z potravinových doplňků

Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena za využití spektrofotometrie v UV oblasti – byla měřena absorbance při vlnových délkách 230 – 320 nm. Zkoumané vzorky DNA byly proměřeny na přístroji NanoPhotometerTM Implen, který umožňuje stanovit koncentraci v ng/ μ l. Poměr absorbancí čisté DNA se pohyboval v rozmezí 1,8 – 2,0 obsahuje-li vzorek proteiny byla tato hodnota < 1,8. U všech tří vzorků byla koncentrace purifikované DNA dostačující pro gelovou elektroforézu, která se prováděla na 0,8 % agarózovém gelu. Poměr hodnot absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byl v čistotě vhodné pro PCR.

6.3 Rodově specifická PCR

I když izolovaná DNA byla částečně degradovaná, byla amplifikovatelná v PCR. Pro identifikaci bakterií rodu *Bifidobacterium* byla použita rodově specifická PCR s rodově specifickými primery Bif164 a Bif662 [19]. Byl amplifikován PCR produkt o velikosti 523 bp. DNA izolovaná ze všech výrobků se amplifikovala v rodově specifické PCR *Bifidobacterium* za vzniku PCR produktů různé intenzity.

Pro zařazení do rodu *Lactobacillus* byly použity primery LbLMA1 a R16 – 1 [20]. Byl amplifikován PCR produktu o velikosti 250 bp. DNA izolovaná ze všech výrobků se amplifikovala v rodově specifické PCR *Lactobacillus* za vzniku PCR produktů různé intenzity.

Závěrem lze konstatovat, že na základě amplifikace DNA s rodově specifickými primery byla ve výrobcích Pangamin Bifi plus, Biopron Junior a Probiodom potvrzena deklarovaná přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

7 ZÁVĚR

Práce pojednává o bakteriích rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, jejich výskytu a pozitivním vlivu na gastrointestinální trakt člověka. Uvedené bakterie hrají důležitou roli ve výživě a zdraví lidí, chrání trávicí trakt před patogenními mikroorganismy a napomáhají udržování slizniční imunity. Uvedené bakterie se využívají v potravinářském a farmaceutickém průmyslu při výrobě potravinových doplňků a probiotických preparátů.

Cílem práce bylo pomocí polymerázové řetězové reakce s rodově specifickými primery prokázat přítomnost bakterií rodů *Bifidobacteriu* a *Lactobacillus* ve třech vybraných potravinových doplncích (Pangamin Bifi plus, Biopron Junior a Probiodom).

Z výrobků byla izolována DNA. Pro amplifikaci DNA byly použity rodově specifické primery Bif164 a Bif662 (rod *Bifidobacterium*) a rodově specifické primery LbLMA1 a R16 – 1 (rod *Lactobacillus*). Pomocí rodově specifických PCR byly amplifikovány produkty o velikosti 523 bp (*Bifidobacterium*) a 250 bp (*Lactobacillus*). Ve výrobcích Pangamin Bifi plus, Biopron Junior a Probiodom byla detekována přítomnost bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*.

8 LITERATURA

- [1] Candela M., Perna F., Carnevali P., Vitali B., Ciatì R., Gionchetti P., Rizzello F., Campieri M., Brigidi P.: Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, vol. 125, s. 286-292.
- [2] Nevoral, J. Prebiotika, probiotika a synbiotika. *Pediatric pro Praxi* [online]. 2005, č. 2 [cit. 2009-03-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.pediatricpropraxi.cz/artkey/ped-200502-0002.php>>.
- [3] Ventura M., O'Connell-Motherway M., Leahy S., Moreno-Munoz J.A., Fitzgerald G.F., van Sinderen D.: From bacterial genome to function; case bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, vol. 120, s. 2-12.
- [4] Görner F., Valík Ľ. *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. 1. vyd. Bratislava Radlinského 9: MALÉ CENTRUM, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [5] Gomes A.M.P., Malcata F. X.: *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. 1999, vol. 10, s. 139-157.
- [6] Doleys Y., Lacroix C.: Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal*. 2005, vol. 15, s. 973-988.
- [7] Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Guéguen M.: Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, vol. 126, s. 278-285.
- [8] Ťrgeová E., Marecová M.: Probiotické kmene mikroorganizmov a ich účinok na hostiteľský organizmus [online]. [cit. 2009-03-08]. Dostupný z WWW: <http://unix.ucm.sk/FPV/dokumenty/nb/nb_iii-2_2003/14_Urgeova.pdf>.
- [9] Zaunmüller T., Eichert M., Richter H., Uden G.: Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, vol. 72, s. 421-429.
- [10] Kohout P.: Probiotika a jejich užití v klinické praxi. *Lékařské listy*. 25.3.2008, s. 29.
- [11] Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G, Fondén R., Saarela M.: Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*. 2002, vol. 12, s. 173-182.

- [12] Petr P., Kalová H. *Nutraceutika* : vybrané kapitoly z nutraceutické teorie a praxe. [s.l.] : Vysoká škola evropských a regionálních studií, 2006. 47 s. ISBN 80-86708-17-9
- [13] Bauerová M., Turčáni M., Omelka R.: *Polymerázová reťazová reakcia*. Vysokoškolský učebný text. FPV UKF v Nitre, 2004. Dostupný z WWW: <<http://www.kbg.fpv.ukf.sk/publikacie/PCRmaterial.pdf>>.
- [14] Ruml T., Rumlová M., Pačes V. *Genové inženýrství*. 1. vyd: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8
- [15] *Přehled a charakteristika vybraných amplifikačních systémů* [online]. Dostupný z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/~vpeska/old/bc/vp/vp2.html>>.
- [16] Káš J., Kodíček M., Valentová O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. ISBN 80-7080-586-2
- [17] Spektrofotometre ve viditelné oblasti spektra [online]. VŠCHT Praha. Čeština. Dostupný z WWW: <http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf>.
- [18] Španová A., Rittich B.: Praktikum z molekulární biotechnologie. VUT v Brně, CHF, 2008.
- [19] Kok R.G., DeWaal A., Schut F., Welling G.W., Weenk G., Hellingwerf K.J.: Specific detection and analysis of a probiotic Bifidobacterium strain in infant faces. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, vol. 62, s. 3668-3672
- [20] Dubernet S., Desmasures N., Guéguen M.: A PCR-based Metod for identification of lactobacilli at genus level. *FEMS Microbiology Letters*. 2002 vol. 214, s. 271-275.

9 SEZNAM POUŽITÝCH SKRATEK

BMK	bakterie mléčného kvašení
bp	pár bází (base pair)
CFU	kolonie tvořící jednotku (colony forming unit)
CIZ	chloroform-izoamylalkohol
dATP	2'-deoxyadenosin 5'-trifosfát
dCTP	2'-deoxycytidin 5'-trifosfát
dGTP	2'-deoxyguanosin 5'-trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
dTTP	2'-deoxythymidin 5'-trifosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FOS	fruktooligosacharidy
F6PPK	fruktosa-6-fosfát fosfoketolasa
GOS	galaktooligosacharidy
GIT	gastrointestinální trakt
NK	negativní kontrola
PCR	polymerázová řetězová reakce
PK	pozitivní kontrola
SDS	dodecylsulfát sodný
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA
UV	ultrafialové světlo