



## **Středoškolská technika 2023**

**Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT**

### **Stanovení mikroorganismů v potravinových matricích polymerázovou řetězovou reakcí**

**Sabina Spurná**

Střední průmyslová škola chemická  
Vranovská 65, Brno

#### **Anotace**

Tato středoškolská odborná práce se zabývala stanovením probiotických mikroorganismů v běžně dostupné potravíně, kterou bylo keřírové mléko. Teoretická část práce informuje o obsahu probiotických mikroorganismů v potravinách s jejich stručnou charakteristikou. V praktické části byla provedena izolace DNA mikroorganismů probiotických kultur keřírového mléka pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Ověření izolace a namnožení určitého úseku DNA bylo prováděno elektroforézou na agarovém gelu, která patří do základních zobrazovací a separační techniky fragmentů DNA. Výsledkem práce bylo zjištění obsahu probiotických kultur ve vybrané potravíně.

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

## Stanovení mikroorganismů v potravinových matricích polymerázovou řetězovou reakcí



Sabina Spurná  
Jihomoravský kraj  
Brno 2023

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství**

## **Stanovení mikroorganismů v potravinových matricích polymerázovou řetězovou reakcí**

### **Determination of microorganisms in food matrices by polymerase chain reaction**

Sabina Spurná

Střední Průmyslová škola chemická Brno

Vranovská 65, 614 00 Brno

Jihomoravský kraj

Vedoucí práce Mgr. Jan Smetana, Ph.D., konzultant práce Mgr. Hana Holubová

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 30.1. 2023 .....

### **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat Střední průmyslové škole chemické za možnost vypracování mnou vybrané středoškolské odborné činnosti. Dále Ing. Buriánkovi za možné konzultace a vstřícné jednání. Samozřejmě JCMM za finanční podporu.

A mé vřelé díky vedoucímu práce Mgr. Janu Smetanovi, Ph.D. a mé konzultantce Mgr. Haně Holubové za dozor a podporu.

## **Anotace**

Tato středoškolská odborná práce se zabývala stanovením probiotických mikroorganismů v běžně dostupné potravíně, kterou bylo kefirové mléko. Teoretická část práce informuje o obsahu probiotických mikroorganismů v potravinách s jejich stručnou charakteristikou. V praktické části byla provedena izolace DNA mikroorganismů probiotických kultur kefirového mléka pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Ověření izolace a namnožení určitého úseku DNA bylo prováděno elektroforézou na agarovém gelu, která patří do základních zobrazovací a separační techniky fragmentů DNA. Výsledkem práce bylo zjištění obsahu probiotických kultur ve vybrané potravíně.

## **Annotation**

This high school thesis dealt with the determination of probiotic microorganisms in a commonly available food, which was kefir milk. The theoretical part of the thesis informs about the content of probiotic microorganisms in food with their brief characteristics. In the practical part, DNA isolation of probiotic microorganisms from kefir milk cultures was carried out for polymerase chain reaction (PCR). The isolation and multiplication of a particular DNA fragment was verified by agar gel electrophoresis, which belongs to the basic imaging and separation techniques of DNA fragments. As a result of the work, the content of probiotic cultures in the selected food was determined.

**Klíčová slova**

Probiotické kultury, PCR, keřirové mléko

**Key words**

Probiotic cultures, PCR, kefir milk

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>9</b>
<b>2 Teoretická část</b>	<b>10</b>
2. 1 Probiotika	10
2. 2 Bakterie mléčného kvašení	10
2. 2. 3 Rod Lactobacillus	11
2. 2. 4 Rod Bifidobacterium	11
2. 3 Fermentované mléčné výrobky	12
2. 3. 1 Technologická výroba fermentovaných mléčných výrobků	12
2. 4 Metody molekulární biologie	15
2. 4. 1 Izolace DNA	15
2. 4. 2 PCR	16
2. 4. 3 Provedení PCR	16
2. 4. 4 Agarózová gelová elektroforéza	17
<b>3 Praktická část</b>	<b>19</b>
3. 1 Vzorek	19
3. 2 Materiál	19
3. 2. 1 Chemikálie	19
3. 2. 2 Pomůcky	20
3. 3 Metodika práce	21
3. 3. 1 Příprava hrubého lyzátu 1 a 2 z kefíru	21
3. 3. 2 Příprava hrubého lyzátu 3, 4, 5 a 6 z kefíru	21
3. 3. 3 Izolace DNA	21
3. 3. 4 Gelová elektroforéza genomové DNA izolované z kefíru	23
3. 3. 5 PCR metoda	23
Tabulka 3 Specifických primerů	24
3. 3. 6 Gelová elektroforéza PCR produktů	24
<b>4 Výsledky</b>	<b>26</b>
4. 1 Gelová elektroforéza genomové DNA	26
4. 2 Gelová elektroforéza PCR produktů se specifickou doménou	27
<b>5 Diskuse</b>	<b>29</b>
5. 1 PCR specifická pro doménu Bacteria	29
5. 2 PCR specifická pro rod Lactobacillus	29
<b>6 Závěr</b>	<b>30</b>





# 1 Úvod

Moje středoškolská odborná činnost se zabývá stanovením mikroorganismů v potravinových matricích polymerázovou řetězovou reakcí. Jako potravinovou matici jsem zvolila keřirové mléko, kvůli snadnému zacházení s touto potravinovou maticí a mému častému styku s touto potravinou.

Potraviny mohou obsahovat živé bakterie, které pak prochází přes náš trávicí trakt. Bakterie mohou být pro člověka jak škodlivé, tak i prospěšné. Škodlivé bakterie jsou ty, které mohou způsobovat onemocnění z potravin, nebo kažení potravin, a proto se snažíme zabránit jejich výskytu v potravinách. Bakterie nám prospěšné jsou ty, které pomáhají udržet stálou střevní mikroflóru v trávicím traktu.

Přítomnost těchto žádoucích i nežádoucích bakterií lze dokázat pomocí amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí a následnou agarózovou gelovou elektroforézou.

Cílem mé práce je průkaz obsahu probiotických kultur mikroorganismů v potravinové matici pomocí polymerázové řetězové reakce, kterou jsem dále identifikovala gelovou elektroforézou.

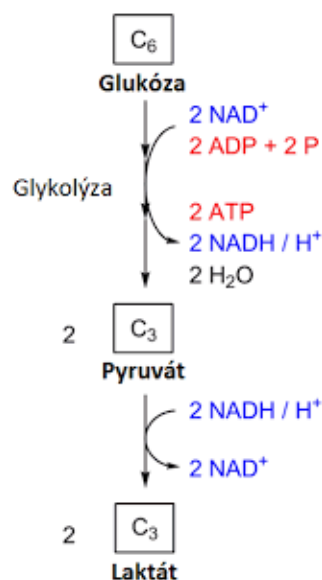
## 2 Teoretická část

### 2.1 Probiotika

Probiotika jsou živé mikroorganismy, ve většině případů se jedná o bakterie. Probiotické mikroorganismy jsou přidány do potravin, které při konzumaci v přiměřené míře mají pozitivní vliv na naše zdraví. Konzumací těchto potravin se zvyšuje počet bakterií s příznivým účinkem na střevní mikroflóru. Výzkum prokázal, že podáním laktobacilů, dochází až k stonásobnému nárůstu počtu bakterií laktobacilů a streptokoků, které jsou již přítomny ve střevní mikroflóře. Tento pozitivní účinek zajišťuje fyziologickou bariéru střevního epitelu, která nás chrání před infekcemi. [1]

### 2.2 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) patří mezi nejprostudovanější probiotika. Jsou to přirozeně se vyskytující mikroorganismy v trávicím traktu a fermentovaných potravinách (fermentované mléko, jogurty, kefíry, sýry). Tyto bakterie jsou schopné fermentace mléčného cukru za vzniku kyseliny mléčné. Kyselina mléčná okyselí své prostředí a zabrání množení nežádoucích mikroorganismů způsobující kažení potravin. [2]

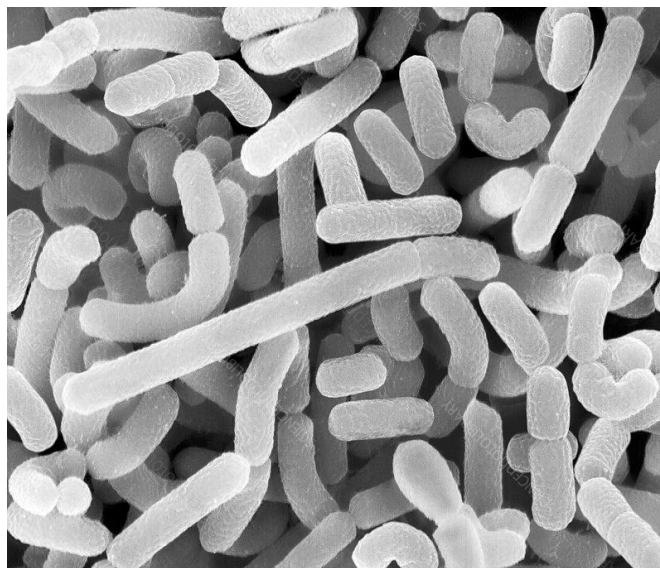


Obrázek 1 schéma mléčného kvašení [19]

Bakterie mléčného kvašení se dělí do dvou skupin, podle produktů fermentace. Dělí se na heterofermentativní a homofermentativní. Heterofermentativní bakterie při zkvašování mléčného cukru (laktózy) vytváří kyselinu mléčnou s oxidem uhličitým a ethanolem. Bakterie homofermentativní při procesu zkvašování laktózy produkují pouze kyselinu mléčnou.

### 2. 2. 3 Rod *Lactobacillus*

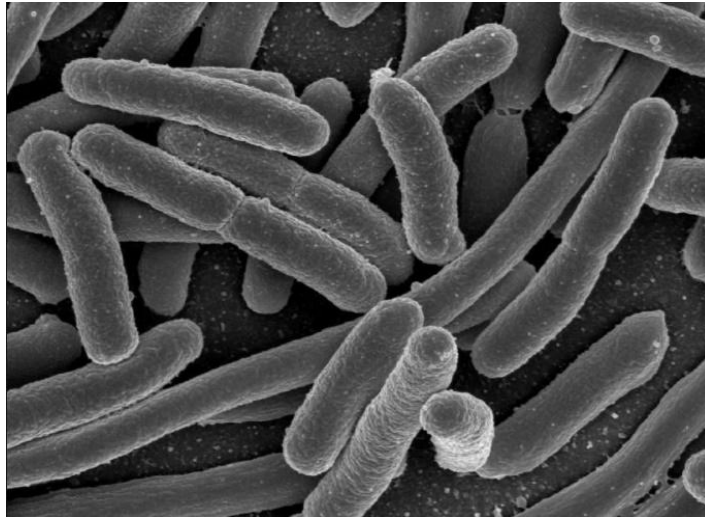
Rod *Lactobacillus* náleží do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacili*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae* [3]. Laktobacily jsou grampozitivní, anaerobní, nesporulující tyčinky nebo koky [4]. Přirozeně se vyskytují v mléce, obilninách a dalších rostlinách. Jejich přirozenou schopností je zkvašování laktózy na kyselinu mléčnou. Ta následně zpomaluje rozmnožování bakterií způsobující kažení. Díky této metabolické vlastnosti se tradičně používají ke konzervaci potravin. [5]



Obrázek 2 *Lactobacillus acidophilus* [8]

### 2. 2. 4 Rod *Bifidobacterium*

*Bifidobacterium* je rod řadící se do domény *Bacteria*, kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinomycetia*, řádu *Bifidobacteriales* a čeledi *Bifidobacteriaceae* [6]. Bifidobakterie jsou grampozitivní, často striktně anaerobní, nesporulující tyčinky, občas tvořící řetízky nebo nepravidelné tvary. Vyznačují se podobně, jako rod *Lactobacillus* probiotickými vlastnostmi. Najdeme je v ústech a v intestinálním traktu teplokrevných zvířat. [7]



*Obrázek 3 Bifidobacterium infantis [9]*

## **2. 3 Fermentované mléčné výrobky**

Fermentovaná mléka jsou produkty vyrobené z mléka různé tučnosti a sušiny. Fermentaci zajišťují speciální kultury mikroorganismů. Na světě rozlišujeme více než 400 názvů fermentovaných mlék. Různé typy fermentovaných mlék mohou být klasifikovány podle použitých mikroorganismů, metod fermentace nebo dalšího zpracování. [22]

Fermentací mléka lze prodloužit trvanlivost výrobku biologickou konzervací. Během fermentace probíhá částečné zkvašování laktosy na kyselinu mléčnou. Současně mohou vznikat další látky, podle výběru mikroorganismu (například: karbonylové sloučeniny, aminokyseliny, ethanol, polysacharidy, oxid uhličitý, ...). Všechny látky s dalšími faktory jsou zodpovědné za nutriční, sensorické a případně dietetické vlastnosti fermentovaných mlék. Vzniklá kyselina mléčná, která snižuje pH výrobku na 3,8 - 4,6. Zamezuje tím růstu nežádoucích mikroorganismů, ale vytváří vhodné prostředí pro růst kvasinek a plísní. Plísně a kvasinky způsobují mikrobiální vady fermentovaných mlék, pokud nastanou podmínky umožňující kontaminaci výrobku. [22]

### **2. 3. 1 Technologická výroba fermentovaných mléčných výrobků**

Technologická výroba fermentovaných mlék začíná výběrem mléka. Pro výrobu je vhodné mléko s nízkým obsahem CPM (celkový počet mikroorganismů). Důležitým faktorem je druhové zastoupení, které může mít negativní vliv na chuť, vůni a konzistenci. Mléko

nesmí obsahovat inhibiční látky, které negativně ovlivňují růst kyslíkových kultur (bakteriofágy, antibiotika, zbytky čistících a dezinfekčních prostředků). [22]

Dalším krokem je standardizace tuku a tukuprosté sušiny. Standardizace obsahu tuku zahrnuje úpravu obsahu tuku, přidáním smetany nebo odtučněného mléka, tak aby měl výrobek požadovaný obsah tuků. U fermentovaných mlék je nejobvyklejší rozmezí 0,5 - 3,5 %. [22]

Tukuprostá sušina je obsažena 8,2 %. Zvýšený obsah tukuprosté sušiny, především kaseinu a bílkovin syrovátky, vede ke zvýšení pevnosti koagulátu a ke snížení oddělování syrovátky. Nejobvyklejší způsoby standardizace obsahu mléčné a tukuprosté sušiny je odpařování na odparkách, přidavkem sušeného odtučněného mléka nebo přidavkem mléčného koncentrátu.

Nepřidávají se pouze složky mléčné sušiny, ale i sacharidy, umělá sladidla a stabilizátory. Jejich funkcí je upravovat chuť a konzistenci. [22]

Deaerace hlídá obsah vzduchu v mléce používaném pro výrobu fermentovaných výrobků. Musí být co nejnižší, zvláště při použití striktně anaerobních mikroorganismů (rod *Bifidobacterium*). Deaerace má pozitivní vliv na růst mikroorganismů a zlepšuje další krok postupu, kterým je homogenizace. Snižuje riziko napalování a odstraňuje nežádoucí těkavé látky. Deaerační zařízení bývá součástí linky základního ošetření mléka. [22]

Homogenizace mléka zabraňuje oddělení mléčného tuku, zajišťuje rovnoměrné rozprostření mléčného tuku ve výrobku, zlepšuje stabilitu a konzistenci fermentovaných mlék. Homogenizace probíhá při tlaku 20 - 25 MPa a teplotě 65 - 70 °C. [22]

Tepelné ošetření mléka probíhá před zaočkováním kyslíkové kultury. Zlepšuje vlastnosti mléka, jako substrátu pro mikroorganismy, zajišťuje dostatečnou pevnost koagulátu a minimalizuje oddělení syrovátky ve finálním výrobku. Tepelný záhřev trvá 5 min při teplotě 90 - 95 °C. [22]

Po pasterizaci se mléko chladí na teplotu zakysání, kterou udává typ mikroflóry použité pro fermentaci. [22]

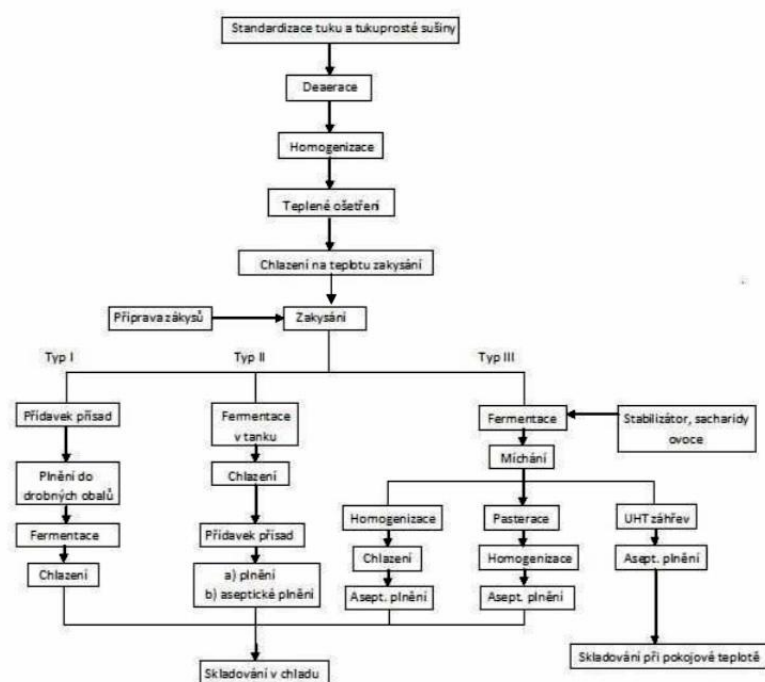
Zakysání je krok očkování specifické kultury mikroorganismů.

Fermentace a chlazení probíhá různými způsoby, podle typu výrobku. Fermentace a chlazení typu I (*Set Type*) je výrobek s nerozmíchaným koagulátem. Do zaočkovaného mléka se kyslíkovou kulturou se přidávají aditiva (aroma, příchutě). Upravená směs se plní do spotřebitelských obalů, které se přemisťují do chladících skříní nebo zracích místností. Tam proběhne fermentace přímo v obalech za udržované požadované teploty. Zrací boxy

mohou fungovat jako inkubátory s následným chlazením, nebo pouze jako inkubátory a chlazení probíhá v chladicích komorách. [22]

Fermentace a chlazení typu II (*Stirred Type*) je proces, při kterém vzniká koagulát ve fermentačním tanku. Koagulát se rozruší před nebo během procesu chlazení a balení. Chlazení lze provádět i ve víceúčelovém tanku cirkulací vody v meziplášti, nebo speciálními agregáty, které jsou zabudovány přímo ve zracím tanku nebo ve výměnících tepla, kam se koagulát dále přečerpává. [22]

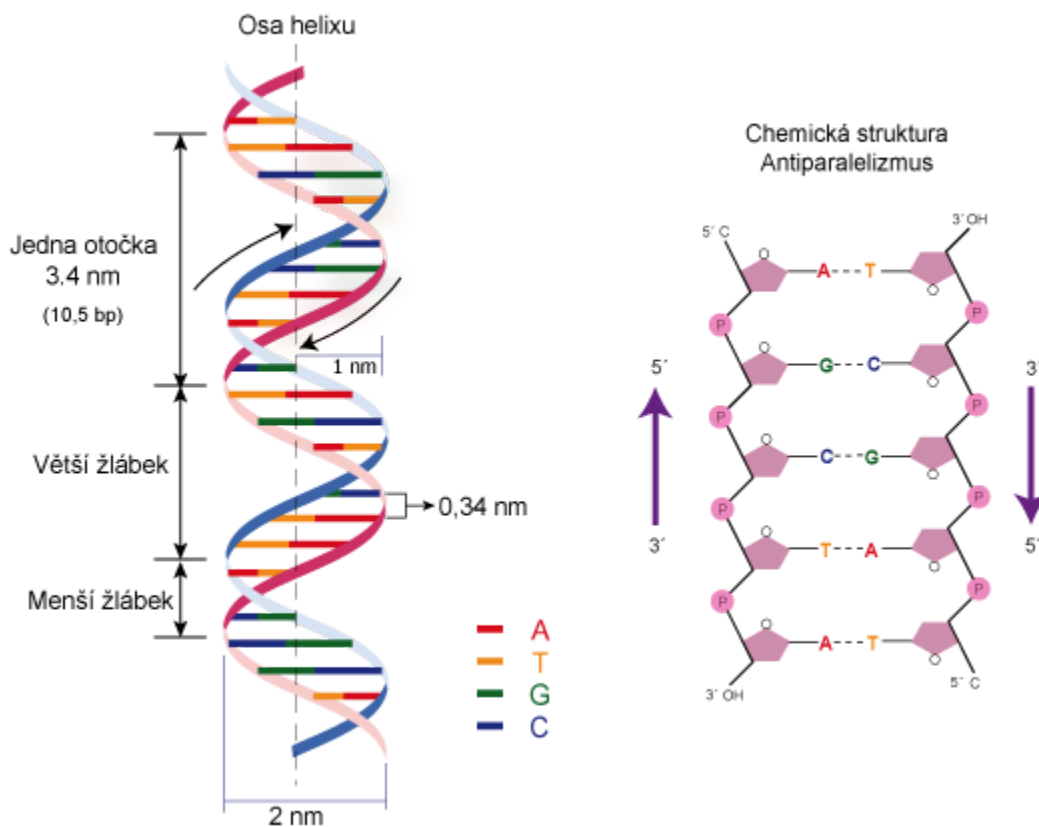
Fermentace a chlazení typu III (*drink Type*) tyto výrobky mají nízkou viskozitu a jsou určeny k přímému pití. Fermentace probíhá ve fermentačním tanku. Následujícím krokem je tepelné ošetření, které se dělá podle typu výrobku. Tepelné ošetření může být pasterací nebo UHT záhřevem. Tepelně ošetřené výrobky neobsahují žádné živé mikroorganismy kvasových kultur, tím se liší od tepelně neošetřených výrobků. Tyto výrobky můžeme asepticky balené skladovat při pokojové teplotě. [22]



Obrázek 4 Schéma výroby fermentovaných mléčných nápojů [20]

## 2. 4 Metody molekulární biologie

DNA v sobě uchovává genetickou informaci. Určuje vzhled, povahu a vlastnosti organismů. Dvoušroubovice DNA je složena z řad nukleotidů, které jsou tvořeny dusíkatou bází, cukernou složkou a fosfátem. Dusíkaté báze mohou být purinové (adenin a guanin) nebo pyrimidinové (cytosin a thymin). Cukr se k bázi váže N-glykosidovou vazbou za vzniku nukleosidu. Přidáním fosfátu k nukleosidu vzniká nukleotid. Nukleotidy jsou propojeny fosfodiesterovou vazbou, která je tvořena mezi uhlíkem C5' jednoho nukleotidu a C3' druhého nukleotidu.



Obrázek 5 Schematický diagram DNA [23]

### 2. 4. 1 Izolace DNA

V dnešní době lze DNA izolovat mnoha způsoby. Izolace DNA má velký význam ve vědě. Kvalitně izolovanou DNA, PCR metoda amplifikuje na dostatečné množství k použití



v dalších metodách. Namnožení a zjištění sekvence nukleové kyseliny lze využívat například v potravinářství k identifikaci a kvantifikaci mikroorganismů. Má ovšem velké využití i v dalších odvětvích biologie.

První krok čištění nukleové kyseliny je její uvolnění do roztoku. To způsobí lyze buněk neboli porušení cytoplazmatické membrány s buněčnou stěnou. Dosáhnout lyze lze různými způsoby, záleží na struktuře materiálu. U strukturovanějších materiálů, například u tkání a rostlin se využívají hrubší fyzikální metody, které mohou zahrnovat drcení a mletí. U buněk tkáňových kultur se používají chemické metody. Využívají různé detergenty a enzymy. K dosažení maximálního účinku lze použít kombinaci těchto metod. [10]

Klasickou metodou získání DNA z lyzátu je fenol-chloroformová extrakce. Ta probíhá přidáním směsi fenolu a chloroformu k lyzátu, ze kterého směs vytáhne proteiny. Centrifugací se následně oddělí vodná fáze od organické. Horní fáze tvoří vodný roztok s DNA a pod vodnou fází se nachází směs proteinů, fenolu a chloroformu. DNA se z vodné fáze oddělí ethanolovým srážením. [11]

Novou metodou, která je v dnešní době nejpoužívanější, je kolonková izolace DNA. Lyzát se nanese na speciální kolonku, na kterou se naváže DNA. Ostatní látky zůstávají v roztoku, který oddělíme centrifugací. DNA se nakonec vyplaví do vhodného elučního pufu. [12]

#### **2. 4. 2 PCR**

Polymerázová řetězová reakce neboli PCR je metoda k namnožení určité sekvence DNA pro molekulární vyšetření, která je vymezena dvěma oligonukleotidovými primery [13]. Jedná se o fragmenty DNA o 20 až 25 nukleotidech. Syntézu provádí DNA polymeráza, která má výhodu velké termostability. Tento enzym je aktivní i při teplotách blízkých se 100 °C. Optimální teplotou DNA polymerázy je 72 °C. [14]

#### **2. 4. 3 Provedení PCR**

Polymerázová řetězová reakce probíhá v termocykleru, který zajišťuje tři cyklicky se opakující kroky. Tyto kroky se od sebe liší teplotou a dobou trvání. Jedná se o denaturaci, hybridizaci a elongaci.

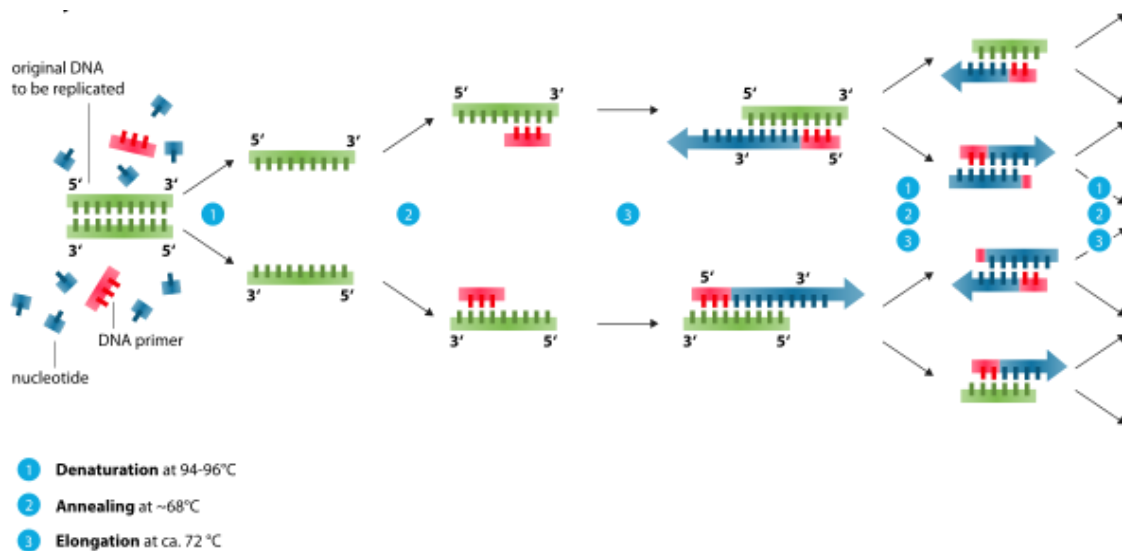
Denaturace je krok, při kterém se zahřívá dvouřetězcová DNA na teplotu kolem 95 °C po dobu 30 s. Zvýšenou teplotou se uvolňují vodíkové vazby mezi bázemi

komplementárních nukleotidů. Vzniknou tak dva jednovláknové řetězce DNA, na kterou v dalším kroku mohou nasedat primery.

Při hybridizaci dochází k poklesu teploty na 50 až 60 °C, což umožní navázání komplementárních primerů na specifická místa DNA.

Posledním krokem je elongace, ve které dochází k syntéze DNA ve směru 5'konec až 3'konec. Elongace probíhá díky DNA polymeráze, která nasedne na primery a začne připojovat volné nukleotidy k vláknu DNA. Optimální teplota DNA polymerázy je 75 °C. [15]

Tento cyklus se obvykle opakuje 30x. Na začátek reakce se zařazuje počáteční denaturace, která trvá několik minut, a na závěr polymerační reakci, která zajistí dosyntetizování řetězců. [16]



Obrázek 6 Polymerázová řetězová reakce [23]

#### 2. 4. 4 Agarózová gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza slouží k analýze a separaci nukleových kyselin podle velikosti. Je založena na pohybu záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli. Vzorek DNA se nanese do jamek na kraji agarózového gelu, který je umístěn do elektrického pole. Jamky se záporně nabitými molekulami DNA jsou umístěny u záporně nabitých elektrod, aby byly přitahovány kladně nabitou elektrodou. Díky struktuře gelu jsou molekuly schopny pohybu.

Aby DNA mohla být detekována, je nutné vzorky obarvit fluoreskující látkou, jež se zbarví při působení ultrafialového světla. Na obarvení se používá například GelRed, SYBR Gold nebo SYBR green. [17] Elektroforéza trvá déle než hodinu. Po ukončení

se jednotlivé fragmenty DNA porovnávají s DNA žebříkem, který má výrobce přesně definovaný podle velikosti jednotlivých fragmentů. [18]

## 3 Praktická část

V praktické části jsem se věnovala stanovení mléčných kultur mikroorganismů v mnou zvolené potravinové matrici, kterou bylo kefirové mléko. Kefirové mléko nízkotučné je běžně dostupný výrobek, který lze zakoupit v obchodní síti. Na etiketě mnou zvolené potravinové matrice by měly být uvedeny probiotické kultury, kterými jsem se ve své práci zabývala. Mým úkolem bylo ověřit přítomnost těchto uvedených mikroorganismů ve vzorku polymerázovou řetězovou reakcí se speciálními primery pro zjišťované rody bakterií mléčných kultur.

### 3.1 Vzorek

#### Výrobce:

Mlékárna Valašské Meziříčí, spol. s.r.o.

Zámecká 2/57, 757 01 Valašské Meziříčí, Česká Republika



#### Výživové údaje na 100 g výrobku:

Energie 165 kJ/ 39 kcal

Tuky / z toho nasycené mastné kyseliny 1,1 g / 0,7 g

Bílkoviny 3,2 g

Sacharidy / z toho cukry 4,1 g / 4,1 g

#### Složení:

Mléko, mléčné kultury, probiotické kultury

Obrázek 7 Kefirové mléko [26]

#### Kultury:

*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus thermophilus*

### 3.2 Materiál

#### 3.2.1 Chemikálie

- demineralizovaná voda
- GelRed

- lysozym
- proteáza
- BB pufr
- DLB pufr
- ethanol
- CBH pufr
- DW pufr
- agaróza
- TBE pufr
- EB pufr

### **3. 2. 2 Pomůcky**

- Centrifuga mini Spin
- Vortex
- Eppendorfovy zkumavky
- Laboratorní váhy
- Mikropipety
- Mikrovlnná trouba
- Kolony
- Minicentrifuga
- Thermo-Shaker
- Zařízení pro elektroforézu Owl EasyCast, model B1
- Zdroj napětí pro elektroforézu Enduro 300 V
- Kádinka
- Válec
- Pipeta

## **3. 3 Metodika práce**

### **3. 3. 1 Příprava hrubého lyzátu 1 a 2 z kefíru**

Do kádinky jsem odpipetovala 50 ml kefíru s 50 ml demivody. Vzorek jsem zhomogenizovala a napipetovala ho do dvou Eppendorfových zkumavek. Zkumavky jsem označila a homogenizovala je na vortexu.

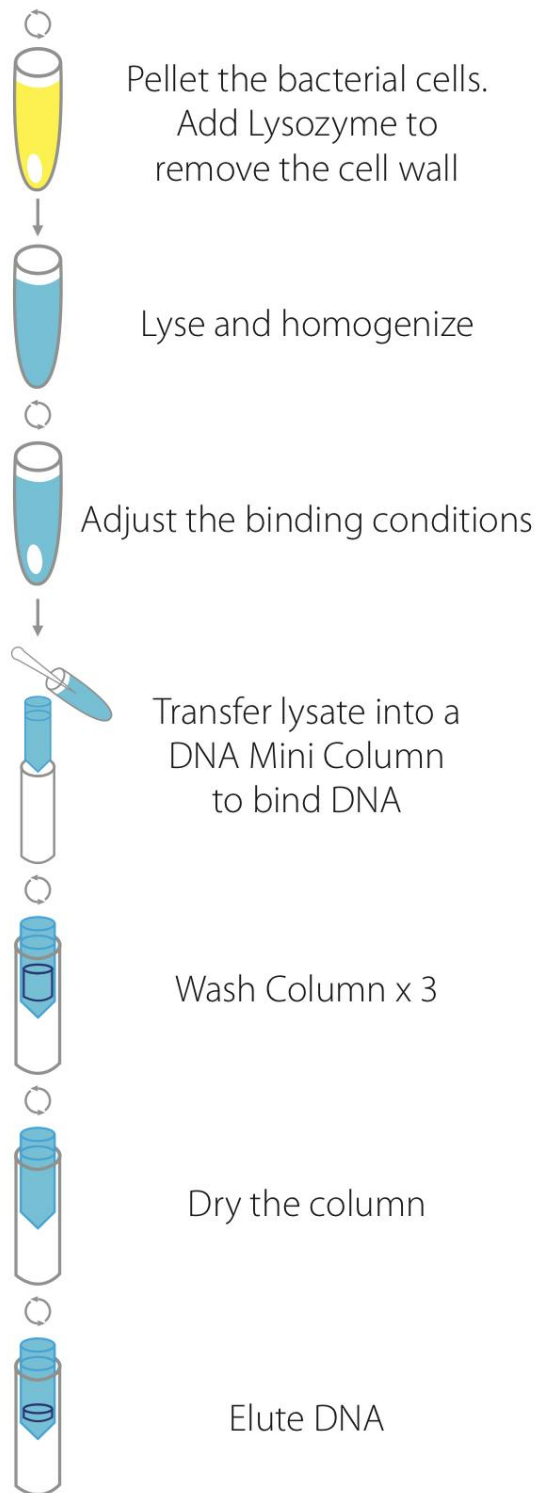
### **3. 3. 2 Příprava hrubého lyzátu 3, 4, 5 a 6 z kefíru**

Do připravené kádinky jsem napipetovala 50 ml kefíru, který jsem zředila 150 ml demineralizované vody. Vzorek jsem pipetovala do čtyř Eppendorfových zkumavek, které jsem odlišila od prvních lyzátů. Vzorky jsem homogenizovala na vortexu.

### **3. 3. 3 Izolace DNA**

K hrubým lyzátům jsem napipetovala 10  $\mu$ l lysozymu. Lyzáty s enzymem jsem nechala inkubovat při 37 °C po dobu 10 minut. Po inkubaci jsem do směsi přidala 25  $\mu$ l proteázy. Směs jsem nechala inkubovat při 55 °C po dobu 2 hodin. Po ukončení inkubace jsem napipetovala do vzorku 220  $\mu$ l ethanolu. Vzorky s ethanolem jsem nechala inkubovat při 65 °C po dobu 10 minut. Ke směsi jsem přidala 220  $\mu$ l BB pufru. Směs jsem homogenizovala na vortexu. Vzorky jsem přenesla do kolon na zachycení DNA. Kolony se vzorkem jsem stočila na centrifuze. Vodnou fází jsem vylila. Kolonu jsem promyla 500  $\mu$ l CBH pufru. Kolony jsem stočila na centrifuze. Následně jsem kolony promyla 700  $\mu$ l DW pufru za následného stočení na centrifuze a vylití vodné fáze. Krok s přidáním BB pufru jsem zopakovala s následujícím přidáním CBH pufru. Následně jsem přidala 100  $\mu$ l EB pufru. Vzorky jsem stočila a zopakovala přidáním EB pufru s centrifugací. S eluovanou DNA jsem pracovala v chladících boxech a uchovávala ji v ledničce.

## ILLUSTRATED PROTOCOLS



*Obrázek 8 Izolace DNA Omni Bacterial DNA Purification Kit [21]*

### 3. 3. 4 Gelová elektroforéza genomové DNA izolované z kefíru

Na gelovou elektroforézu jsem si připravila 1% agarózový gel smícháním 100 ml TBE pufru a 1 g agarózy. Směs jsem přivedla k varu v mikrovlnné troubě, aby došlo k plnému rozpuštění agarózy. Směs jsem nechala zchladnout na 50 - 60 °C a následně do ní přidala 3 µl interkalačního barviva Gel-Red. Směs jsem promíchala a opatrně ji nalila do připravené vaničky s hřebínkem. Gel jsem nechala tuhnout při pokojové teplotě. Po ztuhnutí jsem hřebínek opatrně vyjmula. Vaničku s gelem jsem přelila TBE pufrem. K 20 µl genomové DNA jsem napipetovala 5 µl barvy GelRed. DNA jsem pipetovala do jamek po hřebínku, které se nachází u negativně nabitě části vaničky. Elektroforetickou vaničku jsem připojila ke zdroji. Po 1,5 hodině jsem gel s výsledky opatrně vložila do detekčního zařízení Azure biosystem C200. Pod UV zářením jsem viděla výsledky, které jsem zdokumentovala.

### 3. 3. 5 PCR metoda

Komponenty PCR reakce jsem před použitím rozmrazila a centrifugovala. PCR směs jsem namíchla v laminátovém boxu, který jsem předtím vysterilizovala UV záření. Pořadí a složení komponentů, které jsem používala jsou uvedeny níže v tabulce číslo 1. Master mix jsem připravila do Eppendorfovy zkumavky určené pro PCR. Do zkumavky bylo jsem pipetovala 24 µl Master Mixu s 1µl DNA matrice. Připravila jsem si Pozitivní a negativní kontrolu. Negativní kontrolu jsem připravila z 24 µl Master Mixu a 1µl vody pro PCR. Pozitivní kontrolu jsem připravila z druhu *Lactobacillus plantarum*. Amplifikaci DNA jsem provedla v zařízení Termocykler GeneQ, ve kterém jsem nastavila teplotní program podle užitých primerů (viz. tabulka Tabulka 2 a 3).

Tabulka 1 Komponenty a pořadí PCR Master Mixu

Pořadí	Komponenty	Objem [µl]
1.	Voda pro PCR	9,5
2.	qPCR 2x SYTO-9 Master mix	12,5
3.	Primer 1 (10 pmol/µl)	1,0
4.	Primer 2 (10 pmol/µl)	1,0
5.	Matrice DNA	1,0
Celkem		25,0



Tabulka 2 Teplotní program v Termocykléru

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	5 min	-
Denaturace	95 °C	30 s	30
Hybridizace	55 °C	30 s	30
Elongace	72 °C	30 s	30
Dosyntetizování	72 °C	10 min	-

Tabulka 3 Specifických primerů

Specifita	Primery	Sekvence primeru 5' až 3'	Velikost produktu PCR [bp]
Doména Bacteria	F_eub	TCC TAC GGG AGG ACGT	466
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	
Rod <i>Lactobacillus</i>	F_allact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92
	R_allact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT	

### 3. 3. 6 Gelová elektroforéza PCR produktů

Připravila jsem si 2% agarózový gel smícháním 100 ml TBE pufru s 2 g agarózy. Směs jsem zahřála na bod varu, aby směs byla homogenní. Homogenní směs jsem nechala zchladnout na 50 - 60 °C. Do zchlazené směsi jsem přidala 3 µl interkalačního barviva Gel-Red. Směs jsem krouživým pohybem zamíchala a opatrně nalila do připravené vaničky s hřebínkem. Gel jsem nechala tuhnout při laboratorních podmínkách. Po ztuhnutí jsem vyjmula hřebínek a přelila gel vrstvou TBE pufru. Ke vzorkům z PCR jsem napipetovala 5 µl barvy. Připravené vzorky jsem pipetovala do jamek na okraji gelu. Elektroforetickou vaničku jsem připojila ke zdroji a nechal 1,5 h probíhat elektroforézu. Po skončení jsem gel opatrně vyjmula a vložila jej do detekčního zařízení Azure biosystem C200, ve kterém jsem pod UV zářením viděla výsledky, které jsem následně dokumentovala.

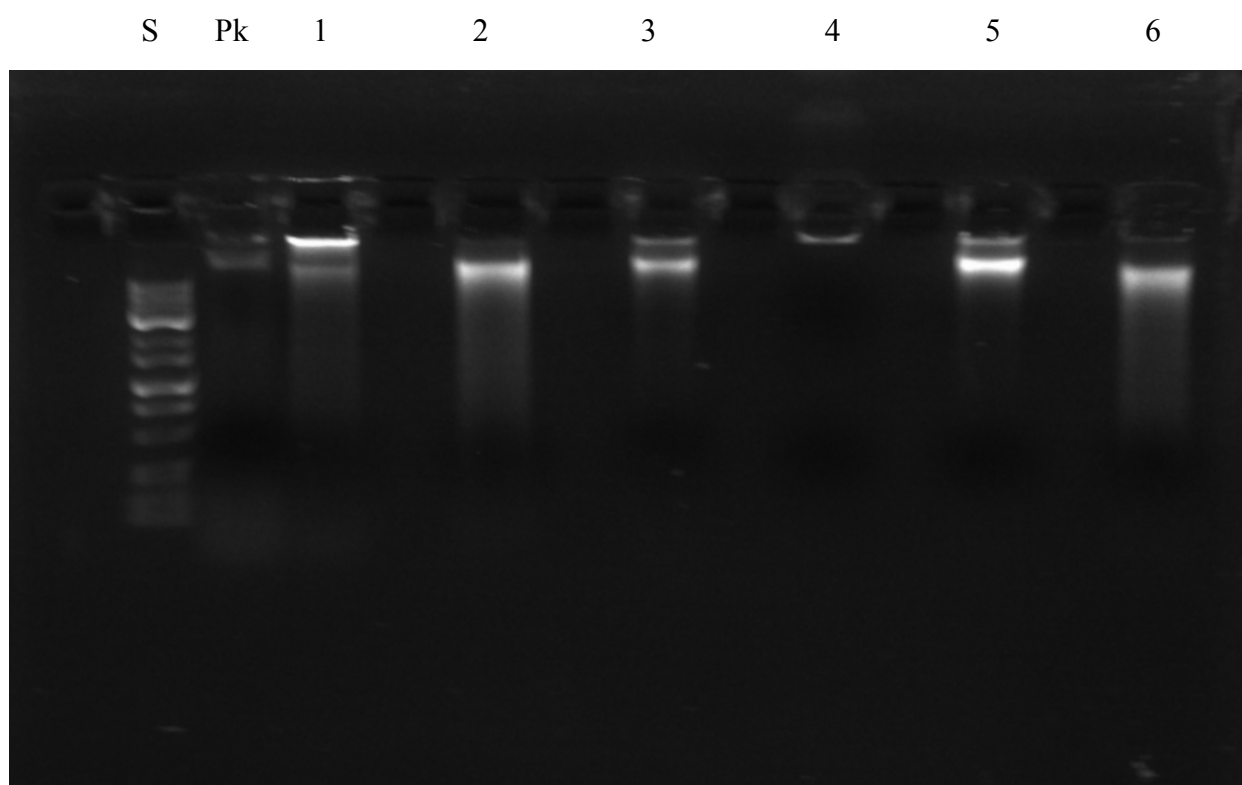


*Obrázek 9 Gel se vzorky DNA*

## 4 Výsledky

### 4.1 Gelová elektroforéza genomové DNA

Provedením gelové elektroforézy byla potvrzena přítomnost genomové DNA. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus plantarum* CCM 739. Vzorky genomové DNA jsou označeny čísly od 1 do 6. Z toho vzorek 1 a 2 jsou v poměru 1:1 kefirové mléko ku demineralizované vodě. Vzorky 3 až 6 jsou v poměru 1:3 kefirové mléko ku demineralizované vodě.



Obrázek 10 Gelová elektroforéza izolované DNA sadou Omni Bacterial DNA Purification Kit

Tabulka 4 Zaznamenané výsledky gelové elektroforézy genomové DNA

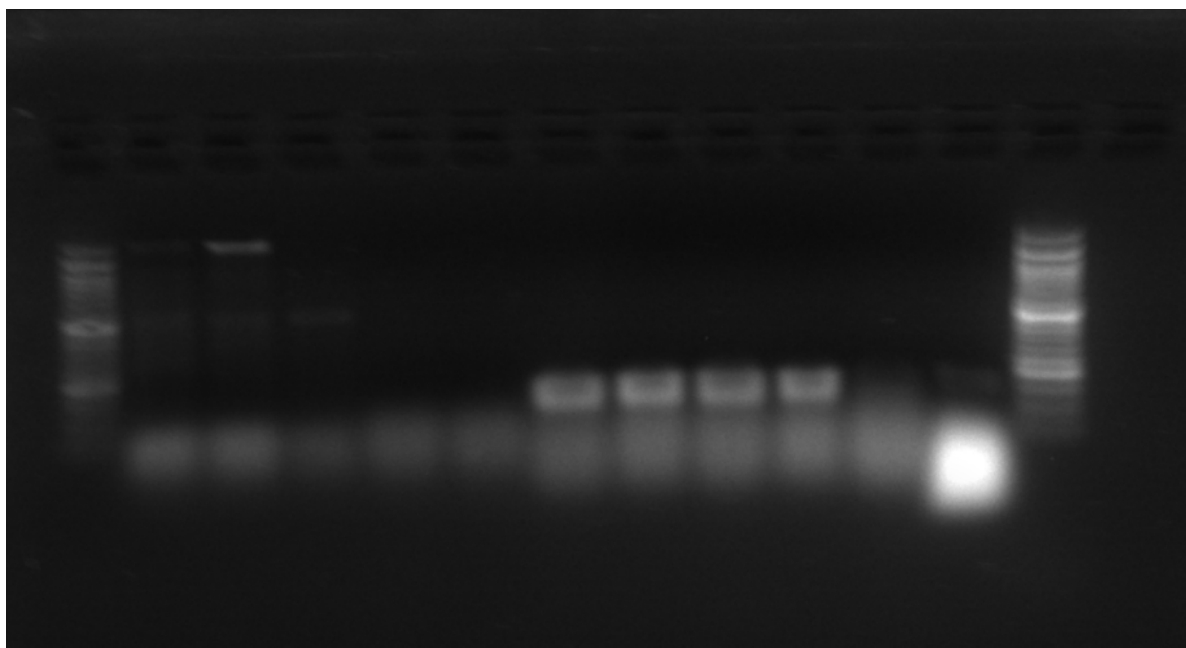
Název	Značka	Detekce produktu
Pozitivní kontrola	Pk	+
Standart	S	+
Kefirové mléko	1	+

Kefírové mléko	2	+
Kefírové mléko	3	+
Kefírové mléko	4	+
Kefírové mléko	5	+
Kefírové mléko	6	+

## 4. 2 Gelová elektroforéza PCR produktů se specifickou doménou

K PCR produktům jsem dodala specifické domény primerů podle rodu mikroorganismu. Zaměřila jsem se na rody *Lactobacillus*, který byl ve vzorcích 1 až 4 a *Bifidobacterium*, který byl ve vzorcích A až D. Jako pozitivní kontrolu jsem použila DNA rodu *Lactobacillus acidophilus* CCM 4B33.

S A B C D Pk 1 2 3 4 Nk Pk S



Obrázek 11 Gelová elektroforéza PCR produktů pro doménu Bacteria a rod *Lactobacillus*

Tabulka 5 Zaznamenané výsledky PCR produktů specifických pro doménu Bacteria a rod *Lactobacillus*

Název	Značka	Detekce produktů
Standart	S	+
Kefirové mléko <i>Lactobacillus</i>	1	+
Kefirové mléko <i>Lactobacillus</i>	2	+
Kefirové mléko <i>Lactobacillus</i>	3	+
Kefirové mléko <i>Lactobacillus</i>	4	+
Negativní kontrola	Nk	-
Pozitivní kontrola	Pk	+
Kefirové mléko <i>Bifidobacterium</i>	A	+
Kefirové mléko <i>Bifidobacterium</i>	B	+
Kefirové mléko <i>Bifidobacterium</i>	C	+
Kefirové mléko <i>Bifidobacterium</i>	D	+
Negativní kontrola	Nk	-
Standart	S	+

## 5 Diskuse

### 5. 1 PCR specifická pro doménu *Bacteria*

Pro doménu *Bacteria* byly využity primery F\_eub a R\_eub o délce 466 bp. Detekce produktů byla provedena po amplifikaci DNA gelovou elektroforézou. Pomocí komerčního kitu, byla dokázána přítomnost produktů PCR o velikosti 466 bp. Využitím těchto primerů byla identifikováno přítomnost DNA domény *Bacteria* i v jiných studiích [25].

### 5. 2 PCR specifická pro rod *Lactobacillus*

Pro rod *Lactobacillus* byly využity primery F\_allact a R\_allact o délce 92 bp. Sadou Omni Bacteria DNA Purification Kit byla prokázána přítomnost mikroorganismů rodu *Lactobacillus* o velikosti 92 bp. Využitím totožných primerů byla dokázána přítomnost rodu *Lactobacillus* i v jiných studiích [25]. Pozitivní kontrola je srovnatelná s intenzitou produktů, která byla připravena z druhu *Lactobacillus plantarum*. Negativní kontrolu tvořila PCR voda, která byla společná pro obě PCR.

## 6 Závěr

Ve své práci jsem se zabývala probiotickými mikroorganismy patřící do skupiny bakterií mléčného kvašení, konkrétně rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Zaměřila jsem se na fermentovaný mléčný výrobek, kterým bylo keřirové mléko, u kterého jsem zjišťovala obsah deklarovaných probiotických kultur.

Prakticky jsem se zabývala izolací DNA ze zakoupeného keřirového mléka a tuto DNA jsem následně identifikovala pomocí PCR. DNA bakterií z keřirového mléka jsem izolovala sadou Omni Bacterial DNA Purification Kit. Genomové vzorky jsem detekovala agarózovou gelovou elektroforézou, která mi potvrdila přítomnost DNA. Genomovou DNA jsem amplifikovala polymerázovou řetězovou reakcí. DNA jsem smíchala se selektivními primery pro rod *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Po přidavku primeru jsem přítomnost nukleových kyselin detekovala gelovou elektroforézou. Vyhodnocení výsledků prokázalo přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* a rodu *Bifidobacterium* v potravinové matrici.

Cílem mé práce byl průkaz obsahu probiotických kultur mikroorganismů v potravinové matrici, který byl úspěšně splněn. Potvrdila jsem tím, že je možné metodou PCR a gelovou elektroforézou ověřovat složení výrobků, které obsahují mikrobiální DNA.

## 7 Zdroje

1. KOHOUTKOVÁ, Jana. Možnosti využití biologických agens v ochraně potravního řetězce člověka [online]. 2005. Dostupné z: <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2004/vvf-08-04.pdf>
2. ANGMO, Kunzes, Anila Kumari SAVITR a Tek Chand BHALLA. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. LWT – Food Science and Technology [online]. 2015, 428-435. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2015.10.057
3. National Center for Biotechnology Information [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1578&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
4. COUDEYRAS, Sophie, Hélène MARCHANDIN, Céine FAJON a Christiane FORESTIER. Taxonomic and Strain-Specific Identification of the Probiotic Strain Lactobacillus rhamnosus 35 within the Lactobacillus casei Group. Applied and environmental microbiology [online]. 2008, 74(9), 2679-2689. Dostupné z: doi:10.1128/aem.02286-07
5. KOREŇOVÁ, Janka. Viability of the probiotic bacteria L. acidophilus in dairy products. Potravinárstvo [online]. 2011, 5(4), 34-37. Dostupné z: doi:10.5219/147
6. National Center for Biotechnology Information [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1678&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
7. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii. 3. opr. a dopl. vadání. Praha: Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
8. KUNKEL, Dennis. Lactobacillus acidophilus bacterium, SEM. Science Photo Library [online]. Dostupné z: <https://www.sciencephoto.com/media/873997/view/lactobacillus-acidophilus-sem>
9. NUTRA WIKI, Bifidobacterium infantis Nutralwiki [online]. Dostupné z: <https://nutrawiki.org/wp-content/uploads/2015/03/Bifidobacterium-infantis.jpg>
10. DNA Purification. Promega Corporation [online]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/>



11. Izolace genomové DNA pomocí fenol-chloroformu. LabGuide [online]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyselin/izolace-genomove-dna-pomoci-fenol-chloroformu/>
12. Izolace DNA pomocí gravitačních kolonek. LabGuide [online]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyselin/izolace-dna-pomoci-gravitacni-chkolonek>
13. DNA polymeráza a pufrý. Top-Bio [online]. Dostupné z: <http://www.top-bio.cz/dnapolymerazy-a-pufry-13.html>
14. PCR. LabGuide [online]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/pcr/>
15. PCR – polymerázová řetězová reakce. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno [online]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/uni03/uni03.html>
16. PCR (polymerázová řetězová reakce). Veterinární a farmaceutická univerzita Brno [online]. Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-pcr&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz)
17. HUANG, Qing, Larry BAUM a Wei-Ling FU. Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis [online]. 2010, 56(3-4), 149-152. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20476647/>
18. Gelová elektroforéza. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno [online]. 2018. Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metodgelova\\_elektroforeza&lang=c](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metodgelova_elektroforeza&lang=c)
19. Schéma mléčného kvašení, Masarykova univerzita Brno [online]. Dostupné z: [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fis.muni.cz%2Fth%2Fxyymm%2FBP\\_Kotrsova\\_FINAL.pdf&psig=AOvVaw3pYQTWfYmhozipSZwGdAaN&ust=1674596513220000&source=images&cd=vfe&ved=0CBAQjRxqFwoTCLD6lqTU3vwCFQAAAAA](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fis.muni.cz%2Fth%2Fxyymm%2FBP_Kotrsova_FINAL.pdf&psig=AOvVaw3pYQTWfYmhozipSZwGdAaN&ust=1674596513220000&source=images&cd=vfe&ved=0CBAQjRxqFwoTCLD6lqTU3vwCFQAAAAA)
20. Blokové schéma výroby fermentovaných mléčných nápojů, Univerzita Pardubice [online]. Dostupné z: [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fdk.upce.cz%2Fbitstream%2Fhandle%2F10195%2F47473%2FPodmolikovaK\\_Technologie%2520fermentovanych\\_MA\\_2012.pdf%3Fsequence%3D2%26isAllowed%3Dy&psig=AOvVaw3tUeLLczTkSdxo0ywrhghN&ust=1674595688199000&source=images&cd=vfe&ved=0CBAQjRxqFwoTCMjx-ZrR3vwCFQAAAAAdAAAAABAE](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fdk.upce.cz%2Fbitstream%2Fhandle%2F10195%2F47473%2FPodmolikovaK_Technologie%2520fermentovanych_MA_2012.pdf%3Fsequence%3D2%26isAllowed%3Dy&psig=AOvVaw3tUeLLczTkSdxo0ywrhghN&ust=1674595688199000&source=images&cd=vfe&ved=0CBAQjRxqFwoTCMjx-ZrR3vwCFQAAAAAdAAAAABAE)

21. Illustrated protocols, Omni Bacterial DNA Purification Kit [online]. Dostupné na: [omni\\_bead\\_mill\\_bacterial\\_dna\\_kit\\_manual.pdf\(email.cz\)](mailto:omni_bead_mill_bacterial_dna_kit_manual.pdf(email.cz))
22. Pavel Kadlec. Karel Melzoch, Michal Voldřich a kolektiv, Technologie mléka a mlékárenských výrobků, Technologie potravin - Co byste měli vědět o výrobě potravin?, vydání 2009 KEY Publishing s. r. o. Ostrava
23. Schématický diagram DNA, Mendelova univerzita [online]. Dostupné z: [https://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/files/59/9227.png](https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9227.png)
24. Obrázek polymerázové řetězové reakce, Wikimedia [online]. Dostupné z: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/96/Polymerase\\_chain\\_reaction.svg/640px-Polymerase\\_chain\\_reaction.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/96/Polymerase_chain_reaction.svg/640px-Polymerase_chain_reaction.svg.png)
25. HAARMAN, Monique a Jan KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. Applied and Environmental Microbiology [online]. The Netherlands: American Society for Microbiology, 2006, 72(4), 2359–2365. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.72.4.2359–2365.2006
26. Obrázek kefirového mléka nízkotučného, Mlékárna Velmez [online]. Dostupné z: [https://www.mlekarna-valmez.cz/data/produkty/1000/100/11/kefirove-mleko-nizkotucne\\_v280.jpg](https://www.mlekarna-valmez.cz/data/produkty/1000/100/11/kefirove-mleko-nizkotucne_v280.jpg)