

Výsledky

Byly testovány dva prebiotické preparáty Orafiti GR a Vivastar Dietary Fibre s obsahem vlákniny z cereálií a psyllia.

1. Kysaný mléčný výrobek s Orafiti GR

Mléko 3,5 % tuku s přidavkem 2 % Orafiti GR bylo vysoce pasterováno (85 °C/ 10 minut) a zaočkováno směsnou mlékařskou kulturou o složení CCDM 144 v dávce 1 %, CCDM 151 v dávce 0,1 % a CCDM 94 v dávce 0,1 %. Zaočkované mléko bylo kultivováno při teplotě 37 °C po dobu 15 hodin. Poté zchlazeno na teplotu 4 °C.

Po kultivaci byla stanovena aktivní kyselost a sensorické vlastnosti kysaného výrobku panelem 3 hodnotitelů (Tab. č. 3).

Tab. 3 Stanovení aktivní kyselosti a zhodnocení sensorických vlastností kysaného nápoje s 2 % Orafiti GR

Aktivní kyselost (pH)	Vzhled a konzistence	Chuť a vůně
4,2	Hustá až viskózní konzistence bez uvolňování syrovátky	Lahodná, mléčná

2. Kysaný mléčný výrobek s Vivastar Dietary Fibre

Mléko 3,5 % tuku bylo vysoce pasterováno (85 °C/10 minut) a zaočkováno směsnou mlékařskou kulturou o složení CCDM 144 v dávce 1 %, CCDM 151 v dávce 0,1 % a CCDM 94 v dávce 0,1 %. Mléko bylo kultivováno při teplotě 37 °C po dobu 15 hodin. Poté zchlazeno na teplotu 4 °C a byla přidána vláknina Vivastar Dietary Fibre s ochucením vanilka v dávce 80 g na 1 l mléka.

Po kultivaci byla stanovena aktivní kyselost a sensorické vlastnosti kysaného výrobku panelem 3 hodnotitelů (Tab. č. 4).

Tab. 4 Stanovení aktivní kyselosti a zhodnocení sensorických vlastností kysaného nápoje s 8 % Vivastar Dietary Fibre

Aktivní kyselost (pH)	Vzhled a konzistence	Chuť a vůně
4,2	Hustá až viskózní konzistence bez uvolňování syrovátky	Lahodná, po ochucení - vanilka

Závěr

Pokusy bylo zjištěno, že kysaný mléčný výrobek s probiotickými mikroorganismy lze obohatit o prebiotickou vlákninu bez negativního vlivu na konzistenci a chuť výrobku. Mléčný výrobek s Orafiti GR je vhodný produkt pro výdej v Milkbaru i pro skladování. Kysaný mléčný výrobek s probiotiky a vlákninou Vivastar Dietary Fibre je možno připravovat pouze jako nápoj pro okamžitou konzumaci pro přímý výdej v Milkbaru.

Uvedené výsledky vznikly za podpory TA02011293, RO0513.

Literatura:

- COLLINS M.D., GIBSON G.R. (1999): Probiotics, prebiotics, nad synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* Vol. 69, no.5, 1052-1057.
- CRUZ-GUERRERO A. a kol. (2013): Commercial probiotic bacteria and prebiotic carbohydrates: a fundamental study on prebiotics uptake, antimicrobials production and inhibition of pathogens. *J.Sci.Food Agric.*, doi: 10.1002/jsa.6549. (Epub akad of print)

- FLOCH M.H. (2014): Is there really anything new on dietary fiber in colonic diverticular disease? *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 1542-3565 (14).
- GIBSON G.R., ROBERFROID (2010): Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *JN The Journal of nutrition*. Downloaded from jn.nutrition.org at International Livestock Research Institute.
- RAJASEKARAN A., KALAIVANI M. (2013): Designer foods nad their benefits: A review. *J. Food Sci. Technol.* 50(1):1-16.
- ROBERFROID M. B. (2000): Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am. J. Nutr.* Vol. 71, no. 6, 1682-1687.
- SHIDA K., NOMOTO K. (2013): Probiotics as efficient immunopotentiators: Translational role in cancer prevention. *Indian. J. Med. Res.*, 138 (5): 808-14.
- VIEIRA AT, TEIXEIRA MM., MARTINS FS. (2013): The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Front. Immunol.*, 4, 445.

Přijato do tisku: 13. 1. 2014

Lektorováno: 4. 2. 2014

JEDNODUCHÝ POSTUP IZOLACE DNA Z BUNĚK BAKTERIÍ RODU LACTOBACILLUS

Fričová, M., Čuta, R., Španová, A., Rittich, B.
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická,
Purkyňova 464/118,612 00 Brno

Simply method of DNA isolation from bacterial cells of genus *Lactobacillus*

Souhrn

Identifikace bakteriální DNA se skládá z několika kroků: příprava DNA ve vhodné kvalitě, která zahrnuje lyzi buněk, extrakci a purifikaci DNA. Poté následuje vlastní identifikace bakterií pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a jiných molekulárně diagnostických metod. Pomocí roztoku pracího prášku (obsahujících enzymy pro degradaci bakteriálních buněk) byly připraveny hrubé lyzáty buněk *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825 a *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088. Z hrubých lyzátů buněk byla izolována DNA za použití metody vysolování roztokem NaCl. Kvalita DNA a přítomnost cílové DNA byla ověřena PCR, ve které byly použity primery specifické pro rod *Lactobacillus*.

Klíčová slova: buněčné lyzáty, *Lactobacillus*, DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR), NaCl

Abstract

Identification of bacterial DNA consists of several steps: preparation of DNA in a suitable quality. The process includes cell lysis, extraction and purification of DNA followed by identification of the bacterial species using polymerase chain reaction (PCR) and other molecular diagnostic methods. Cell lysates of *Lactobacillus plantarum*

CCM 7039, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825, and *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088 were prepared using washing powder solutions (containing enzymes for bacterial cell destruction). DNA was salted out by NaCl solution from these crude cell lysates. The quality of isolated DNA and the presence of the target DNA were verified by PCR using primers specific to the genus *Lactobacillus*.

Key words: cell lysates, *Lactobacillus*, DNA, polymerase chain reaction (PCR), NaCl

1. Úvod

Některé druhy bakterií mléčného kvašení (BMK) jsou po staletí používány při přípravě fermentovaných potravin (mléko a mléčné výrobky, zelenina, maso) a jsou považovány za zcela bezpečné (mají status GRAS - Generally Recognized As Safe) [1]. Jsou důležité pro lidské zdraví, neboť pozitivně ovlivňují funkci gastrointestinálního traktu [2]. Pro praktické využití je důležitá identifikace druhů, tj. jejich přiřazení do stávajících taxonů. Moderní bakteriální taxonomie využívá analýzy makromolekul, zejména DNA. V současné době existuje velké množství molekulárně-biologických metod, pomocí kterých je možno identifikovat cílový mikroorganismus. Nejrozšířenější molekulárně diagnostickou metodou v laboratořích je polymerázová řetězová reakce (PCR), která byla použita i pro identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus* [3-4]. Identifikace bakteriální DNA se skládá z několika kroků: lyze buněk, extrakce a purifikace DNA a identifikace bakteriálního druhu pomocí PCR. Prvním krokem je izolace bakteriální DNA v čistotě vhodné pro PCR. Nejvíce používanými postupy izolace DNA jsou fenolová extrakce [5], chelatační činidla [6], adsorpce na magnetické částice [7] a vysolování [8, 9]. Enzymy používané pro přípravu hrubých lyzátů bakteriálních buněk jsou poměrně drahé a náročné na skladování. Tento problém může být vyřešen použitím alternativní metody - použití pracích prášků obsahujících enzymy pro degradaci bakteriálních buněk s následujícím vysolováním DNA.

Cílem práce bylo ověřit vhodnost použití metody přípravy hrubých lyzátů buněk různých druhů rodu *Lactobacillus* působením enzymů z pracího prostředku; z hrubých lyzátů buněk izolovat DNA vysolováním roztokem NaCl a ověřit kvalitu izolované DNA použitím v PCR.

2. Materiál a Metody

2.1. Chemikálie a bakteriální kultury

Primery pro PCR byly syntetizovány ve firmě Geni-Biotech (Hradec Králové, ČR); *Taq*I a *Taq* Purple DNA polymerasy byly od firmy Bio-Tech (Praha, ČR). DNA standard -100 bp žebříček (1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 a 100 bp) pro gelovou elektroforézu byl z Malamité (Moravské Prusy, ČR). Analyzované kmeny *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192, *Lactobacillus rham-*

nosus CCM 1825, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088. byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM Brno, ČR). Ostatní chemikálie byly čistoty p.a. a pocházely z běžných komerčních zdrojů. Pro lyzi buněk byl použit roztok pracího prášku Persil zakoupeného v komerční síti.

2.2. Zařízení

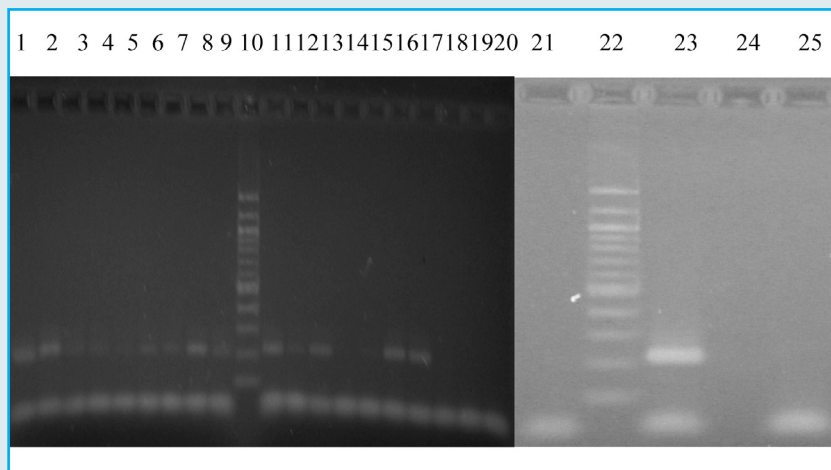
Byly použity následující přístroje a pomůcky: programovatelný cyklátor PTC-100 (MJ Research, Watertown, USA), vana pro horizontální agarosovou gelovou elektroforézu (Bio-Rad, USA), UltraLum EB-20E UV transilluminator (Paramount, USA), UV/Vis NanoPhotometer (Implen, Německo).

2.3. Metody

Jeden ml přes noc narostlé buněčné suspenze byl centrifugován při 15 000 g a pelet byl resuspendován v 1 000 µl roztoku A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0). Po další centrifugaci (14 000 ot/min) byl pelet resuspendován v 500 µl 4% roztoku pracího prášku a inkubován při 55 °C přes noc s cílem připravit hrubé lyzáty buněk. K 500 µl hrubého lyzátu (HL) byl přidán definovaný objem 5,5 M NaCl a sterilní destilované vody do objemu 1 ml (Tabulka 1). Směs byla promíchávána 10 minut, centrifugována při 14 000 otáčkách po dobu 15 minut a odebrán supernatant. K 50 µl supernatantu bylo přidáno takové množství sterilní destilované vody, aby výsledná koncentrace NaCl byla asi 0,3 M, a 2,5 objemu ethanolu. DNA byla srážena 15-30 minut při -20 °C a byla centrifugována 15 minut při 14 000 otáčkách. Sediment byl vysušen v exikátoru a resuspendován v 120 µl TE pufru. Kvalita a přítomnost cílové DNA byla ověřena pomocí PCR, ve které byly použity primery specifické pro rod *Lactobacillus* LBLMA 1-rev (5'- CTC AAAACT AAA CAA AGT TTC - 3') a R16-1 (5'- CTT GTACAC ACC GCC CGT CA - 3'). [3]. Velikost produktu PCR byla asi 250 bp. Při amplifikaci byla použita směs o následujícím složení: PCR voda- 19 µl, 10x reakční pufr kompletní (10x) 2,5 µl; dNTP směs (10 mM) 0,5 µl; primer LBLMA 1-rev (10 pmol/µl) 0,5 µl a primer R16-1 (10 pmol/µl) 0,5 µl; *Taq* DNA polymerasa 1.1 (1 U/µl) 1 µl a DNA matrice 1 µl. Celkový objem PCR směsi byl 25 µl. Podmínky amplifikace byly následující: denaturace DNA 94 °C/60 s, hybridizace primerů 55 °C/60 s a syntéza komplementárního řetězce 72 °C/120 s. Před prvním cyklem byla směs zahřívána při 94 °C/5min; v posledním cyklu byla syntéza řetězce při 72 °C prodloužena na 7 min. Produkty PCR byly detegovány pomocí

Tab. 1 Izolace DNA z hrubých lyzátů (HL) buněk vysolováním s použitím roztoku chloridu sodného

Postup	HL (µl)	5,5 M NaCl (µl)	H2O (µl)	Koncentrace NaCl (M)
1	500	100	400	0,55
2	500	200	300	1,10
3	500	300	200	1,65
4	500	400	100	2,20
5	500	500	0	2,75

Obr. 1 Agarosová elektroforéza produktů PCR

Podmínky: 1,8 % agarosový gel, TBE pufr (45 mM kyselina boritá, 45 mM Tris-báze, 1 mM EDTA (pH 8,0)).
 Běhy: 1 - 4: postup 1; 5 - 8: postup 2; 9, 11-13: postup 3; 4 - 17: postup 4; 18 - 21: postup 5; 10, 22: DNA standard (100 bp žebříček); 23: pozitivní kontrola; 25: negativní kontrola; druhy v pořadí: *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus fermentum* CCM 7192, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825 a *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088.

agarosové gelové elektroforézy na 1,8 % agarosovém gelu v TBE pufru (45 mM kyselina boritá, 45 mM Tris-báze, 1 mM EDTA, pH 8,0). DNA v gelu byla nabarvena pomocí ethidium bromidu (0,5 µg/ml), gel byl opláchnut ve vodě a fotografován v UV světle (305 nm). Jako DNA standard byl použit 100 bp žebříček. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA (koncentrace 10 ng/µl) izolovaná fenolovou extrakcí [5] z *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088. Jako negativní kontrola byla použita směs PCR bez DNA.

3. Výsledky a diskuse

Byla optimalizována metoda přípravy hrubých lyzátů buněk z různých druhů rodu *Lactobacillus* s následnou izolací DNA vysolováním. K lyzi buněk byl použit 4% roztok pracího prášku. Při izolaci DNA byly testovány různé koncentrace NaCl (0,55 - 2,75 M) (Tabulka 1). Amplifikovatelnost takto izolované DNA byla ověřena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s použitím primerů specifických pro rod *Lactobacillus*. Výsledky agarosové gelové elektroforézy produktů PCR jsou uvedeny na Obr. 1. Z Obr. 1 je patrné, že byla prokázána přítomnost produktů PCR, to znamená že byla získána amplifikovatelná DNA (dostatečné množství DNA o vhodné kvalitě). Jako nejvhodnější koncentrace NaCl pro izolaci DNA byla zjištěna koncentrace 1,65 M a 2,2 M (postupy 3 a 4 - viz. Tabulka 1). V těchto případech byly po amplifikaci DNA izolované ze všech testovaných bakteriálních druhů detegovány specifické produkty PCR (Obr. 1, běh č. 11-17). Při použití nižších koncentrací NaCl (0,55 a 1,10 M) byly detegovány produkty PCR nižší intenzity (Obr. 1, běh č. 1-9). Postup 5 s 2,75 M NaCl byl vyhodnocen jako nejméně účinný, protože po amplifikaci DNA produkty PCR nebyly detegovány (Obr. 1, běh č. 18 až 21).

Z výsledků vyplývá, že pro lyzi bakteriálních buněk lze použít roztok pracího prášku. Metoda izolace DNA z lyzátu buněk vysolováním roztokem chloridu sodného se jeví

jako vhodná pro lyzi buněk rodu *Lactobacillus*. Rozdíly v intenzitě produktů PCR získaných po amplifikaci DNA izolované vysolováním stejnou koncentrací NaCl mohou odrážet rozdíly v lyzi buněk pracím práškem. Tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdíly ve složení buněčných stěn testovaných druhů. Výsledky dosažené uvedenými postupy jsou srovnatelné s výsledky metod izolace DNA magnetickými nosiči či fenolovou extrakcí, při nichž se při přípravě hrubých lyzátů buněk používají purifikované enzymy. Výhodou této metody je skutečnost, že se nemusí pracovat s organickými toxickými látkami.

4. Závěr

Z hrubých lyzátů buněk různých druhů rodu *Lactobacillus* připravených lyzí pracím práškem lze vysolováním izolovat DNA amplifikovatelnou v PCR. Metoda je jednoduchá, rychlá a levná, vhodná zejména pro izolaci bakteriální DNA z velkého množství vzorků v kvalitě dostatečné pro PCR.

Poděkování

Tato práce byla podporována vnitřním grantem FCH-S-13-1912.

Literatura

- [1] Bernardeau M., Vernoux, V. S., Dubernet H., Guégen M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126 (2008) 278-285.
- [2] Walter J. Ecological Role of *Lactobacilli* in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 4985-4996.
- [3] Dubernet S., N Desmasures N., M Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.* 214 (2002) 271-275.
- [4] Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjärvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatosava T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 297-303.
- [5] Sambrook J., Russel D. W. L. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold Spring Laboratory Harbor Press, 2001.
- [6] Giraffa G., Rossetti L., Neviani E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods* 42 (2000) 175-184.
- [7] Rittich, B., Španová, A. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2472-2485.
- [8] Nasiri H., Forouzandeh M., Rasaee M. J., Rahbarzadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *J. Clin. Lab. Anal.* 19 (2005) 229-232.
- [9] d Angelo F., Santillo A., Sevi A., Albenzio M. A simple salting-out method for DNA extraction from Milk Somatic Cells. *J. Dairy Sci.* 90 (2007) 3550-3552.

Přijato do tisku: 10. 1. 2014

Lektorováno: 10. 2. 2014