

Využití bakterií rodu *Lactobacillus* v genetickém inženýrství

Pavína Starostková

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Pavlína STAROSTKOVÁ
Osobní číslo: T10009
Studijní program: B2901 Chemie a technologie potravin
**Studijní obor: Chemie a technologie potravin-specializace
Technologie mléka a mléčných výrobků**
Forma studia: kombinovaná

**Téma práce: Využití bakterií rodu Lactobacillus v genetickém
inženýrství**

Zásady pro vypracování:

- 1. Význam genetického inženýrství.**
- 2. Charakteristika bakterií mléčného kvašení a rodu Lactobacillus.**
- 3. Perspektivy rodu Lactobacillus v genetickém inženýrství.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] ROSYPAL, Stanislav et al. **Úvod do molekulární biologie. 3. inovované vydání.** Brno: Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc., 2002. 1199s. ISBN 80-902565-4-4.

[2] ALBERTS, B., D. BRAY, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, P. WALTER. **Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky.** Přeložil Arnošt KOTYK. Ústí nad Labem: Opero Publishing, s.r.o., 1998. 630 s. ISBN 80-902906-0-4.

[3] KVASNIČKOVÁ Alexandra. **Sacharidy pro funkční potraviny: Probiotika-Prebiotika-Symbiotika.** Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2000. 81 s. ISBN 80-7271-001-X

[4] KADLEC P., K. MELZUCH, M. VOLDŘICH et al. **Co byste měli vědět o výrobě potravin.** Ostrava ? Přívoz: KEY Publishing s.r.o., 2009. 536 s. ISBN 978-80-7418-051-4

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

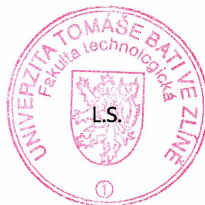
16. ledna 2013

Termín odevzdání bakalářské práce:

2. května 2013

Ve Zlíně dne 4. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Starostková Pavlína

Obor: Chemie a technologie potravin

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 2.5.2013

Starostková Pavlína

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou již dlouhou dobu využívány v průmyslové výrobě potravin a jsou známy svými příznivými účinky na zdraví lidí a zvířat. Laktobacily jsou všeobecně považovány za bezpečné mikroorganismy (GRAS – Generally Recognized As Safe), které jsou schopny přežít a kolonizovat střevní trakt.

Vzhledem k potřebám průmyslu a možnostem bakterií rodu *Lactobacillus* vzrostl během několika let zájem o jejich genetické modifikace. Pokrok v genových technologiích umožnil měnit jejich vlastnosti zavedením nových genů nebo změnou jejich metabolické funkce. To je možné díky objevům založeným na manipulaci s DNA, možnostmi změny genetické vybavenosti organismu nebo uspořádáním jeho genomu. K těmto účelům jsou využívány základní metody genetického inženýrství - hybridizace a elektroforéza nukleových kyselin, štěpení a klonování DNA a polymerázová řetězová reakce (PCR).

Geneticky modifikované bakterie rodu *Lactobacillus* jsou využívány v mnoha oborech. V potravinářském průmyslu mohou být nápomocné při získávání rekombinantních enzymů, ve zdravotnictví pokračují výzkumy zaměřené na využití laktobacilů pro výrobu orálních očkovacích látek, které by v budoucnu mohly nahradit stávající očkovací vakcíny podávané injekční formou.

Klíčová slova:

Lactobacillus, genetické inženýrství, geneticky modifikované bakterie

ABSTRACT

The bacteria of the *Lactobacillus* genus have been used in industrial food production for a long time and is known for its beneficial effects on human and animal health. Lactobacilli are generally considered to be safe microorganisms (GRAS – Generally Recognized As Safe), which are able to survive and colonize the intestinal tract. In relation to the industry's needs and *Lactobacillus* capabilities the considerable interest in their genetic modification has increased significantly over the years.

The progress in gene technology has enabled to change their modifications by introducing new genes or by changing their metabolic functions. This is possible thanks to the discoveries based on the DNA manipulation, the possibilities of the organism genetic quality changes or its genome arrangement. For these purposes there are used the following basic methods of genetic engineering - hybridization and nucleic acid electrophoresis, DNA cleavage and cloning and PCR polymerase chain reaction.

Gene-modified bacteria of the *Lactobacillus* genus are subsequently used in many branches. In the food industry it may be helpful in recombinant enzymes obtaining. In the healthcare, there have been continuing researches focusing on the *Lactobacillus* utilization for the oral vaccines production, which in the future could become a substitution for existing vaccines applied by injectable form.

Keywords:

Lactobacillus, genetic engineering, genetically modified bacteria

Na tomto místě chci poděkovat Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracovávání bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA RODU <i>LACTOBACILLUS</i>	12
1.1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	12
1.2 METABOLISMUS RODU <i>LACTOBACILLUS</i>	13
1.3 TAXONOMIE RODU <i>LACTOBACILLUS</i>	14
1.4 VÝSKYT BAKTERIÍ RODU <i>LACTOBACILLUS</i>	15
1.5 PŘÍNOS LAKTOBACILŮ PRO ZDRAVÍ	15
1.6 LAKTOBACILY JAKO PROBIOTIKA	16
1.6.1 Účinek probiotik	16
1.7 BAKTERIOCINY	17
1.7.1 Využití bakteriocinů produkovaných laktobacily	17
1.8 LAKTOBACILY V POTRAVINÁŘSTVÍ	18
2 GENETICKÉ INŽENÝRSTVÍ	20
2.1 ZÁKLAD BUNĚČNÝCH TECHNOLOGIÍ	20
2.2 ZÁKLADNÍ METODY GENETICKÉHO INŽENÝRSTVÍ	21
2.2.1 Izolace nukleových kyselin	22
2.2.2 Elektroforéza nukleových kyselin	22
2.2.3 Štěpení DNA specifickými restrikčními endonukleázami	23
2.2.4 Hybridizace nukleových kyselin	24
2.2.5 Polymerázová řetězová reakce PCR	25
2.2.6 Klonování DNA	27
2.2.7 Genové knihovny	30
2.3 TRANSGENNÍ ORGANISMY	31
2.3.1 Příprava transgenu	31
2.3.2 Geneticky modifikované organismy	33
2.3.3 Přínosy a rizika genetické modifikace organismů	34
3 VYUŽITÍ LAKTOBACILŮ V GENETICKÉM INŽENÝRSTVÍ	35
3.1 VÝZNAM V POTRAVINÁŘSKÝCH TECHNOLOGIÍCH	35
3.2 PŘÍNOS PRO ZEMĚDĚLSKÉ TECHNOLOGIE	36
3.3 LAKTOBACILY JAKO OČKOVACÍ LÁTKY	36
3.4 LAKTOBACILY – MOŽNOSTI PARATRANSGENOZE	38
ZÁVĚR	40
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	50

ÚVOD

Rod *Lactobacillus* je nejobsáhlejší v rámci skupiny bakterií mléčného kvašení. Laktobacily patří k velmi důležitým obyvatelům střevního traktu člověka a zvířat. Zastávají významnou úlohu v potravinářských biotechnologiích a ovlivňují kvalitu našeho lidského života, zejména svými fermentačními a probiotickými vlastnostmi. Podstatnou roli hrají také v procesu ekologie.

Přesná identifikace laktobacilů, je zatím velmi obtížná a nepřesná, jelikož jsou si velmi podobné ve fenotypových vlastnostech. Pro jejich přesnou charakterizaci a identifikaci jsou zapotřebí metody genotypické, metody pokročilé molekulární biologie. Díky těmto identifikacím je možno laktobacily využívat i v genetickém inženýrství.

Prostřednictvím technologie rekombinantní DNA se genetické inženýrství ukázalo důležitým oborem ve vývoji biologických procesů. Genetické inženýrství zabývající se molekulárním klonováním, technologií rekombinantní DNA či buněčnými manipulacemi představují budoucí perspektivy pro průmyslové, zemědělské aplikace a zpracování potravin. Jsme schopni získat nové generace organismů, které budou odolné vůči stresu, chorobám či poskytovat stabilnější výnosy. Rekombinantní mikroorganismy mohou být využity při vývoji nových vakcín či nedostatkových enzymů.

Je jen otázkou, jak člověk bude schopen správně zhodnotit přínosy a nebezpečí, které nám genetické inženýrství nabízí.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA RODU *LACTOBACILLUS*

1.1 Bakterie mléčného kvašení

Rod *Lactobacillus* je největší v rámci skupiny bakterií mléčného kvašení čítající okolo 214 druhů a poddruhů [1].

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou geneticky různorodá skupina mikroorganismů zahrnující grampozitivní, aerotolerantní nebo aerobní nesporeující tyčinky či koky, přirozeně se vyskytují v médiích bohatých na organické produkty. BMK můžeme rozdělit podle optimální teploty růstu na mezofilní – optimum růstu 25-30 °C a termofilní – optimum růstu 40-45°C. K dalším znakům patří tolerance nízkého pH 4,0-4,5 [2].

Biochemicky se BMK vyskytují jako homofermentativní a heterofermentativní. Homofermentativní druhy BMK (např. *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a některé rody *Lactobacillus*) metabolizují jeden mol glukózy na dva moly kyseliny mléčné, jako jediný produkt metabolismu cukrů. Heterofermentativní druhy (např. *Leuconostoc*) převádějí jeden mol glukózy na jeden mol kyseliny mléčné a celou řadu dalších produktů jako je kyselina jantarová, mravenčí, octová, etanol a CO₂. Ke skupině BMK jsou často řazeny i rody *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Scardovia* a *Parascardovia* a to na základě biochemických a fyziologických vlastností, ačkoliv fylogeneticky patří do kmene *Actinobacteria* [3].

Z ekonomických, praktických a historických důvodu byla pozornost zaměřena zejména na laktokoky a streptokoky, především pro jejich medicínský význam. *Lactococcus lactis* subsp. *lactic*, *diacetylactis* a *cremoris*, dříve nazývané Skupina N streptokoky, byla první potravinářskou kulturou navrženou ke genetickému přenosu rekombinantní DNA. Po tomto úspěchu se zvedl zájem i o jiné rody jako *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus*. Poslední dva rody obsahují omezený počet druhů pro komerční účely. V kontrastu rod *Lactobacillus* obsahuje asi 50 druhů, z nichž pak některé obsahují ještě řadu poddruhů [4].

Jednotlivé kmeny BMK vyskytující se v potravinářských produktech jsou přizpůsobeny životu a rozmnožování v prostředí s extrémními hodnotami pH, měnící se dostupností živin, s produkcí bakteriocinů, v konkurenci jiných mikroorganismů. Tyto vybrané a definované kultury jsou dnes hojně využívány v zemědělsko-potravinářském průmyslu [5].

Pokrok v genové technologii umožňuje jejich modifikace zavedením nového genu nebo změnou metabolické funkce. Znalost genomů u průmyslově využívaných BMK umožňují zjistit, kde je zakódovaná schopnost vytváření určitých nežádoucích složek, kde je odolnost vůči fágům nebo odolnost vůči kyselému prostředí. Vytvoření tzv. „ideálních mikroorganismů“ by mohlo zajistit zlepšení potravinářských technologií, kdy bakterie budou lépe vybaveny pro technologické procesy, což v důsledku povede ke zlepšení organoleptických vlastností a k prodloužení trvanlivosti [6].

Genom BMK zahrnuje plazmidovou a chromozomální DNA. Dlouhodobý výzkum plazmidů naznačuje užitečnost při výrobě mléčných výrobků. Např. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* a *Streptococcus thermophilus* bývají snadno napadány bakteriofágy, což v důsledku způsobuje negativní dopad na fermentační proces, na ekonomiku a kvalitu výroby. Na druhé straně jsou známy laktokoky odolné vůči fágům, jejichž plazmidy s rezistencí lze přesunout konjugací, která je považována za přirozenou formu přenosu genů. Genetické manipulace s rody *Streptococcus*, *Lactobacillus* spp. a *Leuconostoc* spp. vyžadují rozvoj metod pro přenos genů, efektivní genové transkripce a překlad signálu. Získané genetické poznatky jsou následně využívány pro studium metabolických vlastností, k vytváření specifických mutantů, přirozeně se vyskytujících fágů a obranných mechanismů [4]. Sekvencování genomu a studie funkční genomiky BMK rychle poskytují důležité informace o jejich rozmanitosti, vývoji a odhalují molekulární základ pro důležité znaky, jakými jsou stresové reakce, adaptace a interakce. Tyto informace vedou k lepšímu pochopení fyziologie BMK, zejména při použití nových genomických technologií, jako jsou komparativní genomika a globální transkripční analýza [5]. Celogenomové sekvence mají za následek významné změny v taxonomickém zařazení BMK. Např. během roku 1980 byl rod *Streptococcus* rozdělen do tří rodů *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Streptococcus*. [7].

1.2 Metabolismus rodu *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* řadíme mezi grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní tyčinky rostoucí za striktně anaerobních podmínek. Laktobacily jsou obvykle tenké štíhlé tyčinky, mohou se však objevit i jako spirály nebo kokobacily [8].

Tradičně je rod rozdělen do tří skupin, podle způsobu fermentace:

- obligátně homofermentativní;
- fakultativně homofermentativní;
- obligátně heterofermentativní.

Obligátně homofermentativní laktobacily fermentují glukózu a ostatní hexózy výhradně na kyselinu mléčnou (>85%). Mezi zástupce této skupiny patří druhy *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum* [9].

Fakultativně homofermentativní laktobacily fermentují hexózu na kyselinu mléčnou, jako jediný produkt. Při nedostatku glukózy se homofermentativní dráha mění na heterofermentativní a dochází k produkci kyseliny octové, mravenčí a etanolu. Tato skupina zahrnuje např. druhy *Lb. casei*, *Lb. plantarum* nebo *Lb. bavaricus* [9].

U obligátně heterofermentativních laktobacilů dochází k fermentaci hexóz na kyselinu mléčnou, octovou, etanol a CO₂. Často se jedná o koloidní buňky. Zástupcem jsou např. druhy *Lb. buchneri*, *Lb. brevis* [9].

Laktobacily mají poměrně vysoké nutriční požadavky na růst (sacharidy, aminokyseliny, peptidy, estery mastných kyselin, soli, deriváty nukleových kyselin, vitamíny), upřednostňující mezofilní až mírně termofilní teploty s horní hranicí okolo 40°C, jsou acidotolerantní až acidofilní - při fermentaci snížení pH prostředí až na 4,0 [10].

1.3 Taxonomie rodu *Lactobacillus*

Rozmanitost a všestrannost rodu *Lactobacillus* se odráží ve značných fenotypových a genotypových variacích. Rod *Lactobacillus* patří fylogeneticky do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae*. Na základě sekvencí 16S rRNA, jsou laktobacily fylogeneticky zařazeny v sedmi skupinách: *Lb. buchneri*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. sakei* a *Lb. salivarius* [11].

V posledních letech významně stoupá počet popsáných druhů rodu *Lactobacillus* – v roce 2003 to bylo 88 druhů a 15 poddruhů, v roce 2013 již 186 druhů a 28 poddruhů [1]. Tento rychlý nárůst popsáných druhů vyžaduje další podrobné studie některých předchozích identifikací a možné rekvalifikace u některých druhů. Taxonomie rodu *Lactobacillus* je velmi složitá z důvodů velmi blízké příbuznosti některých druhů. Změny v klasifikaci jsou dnes

významně ovlivňovány novými poznatky získaných díky rozmachu molekulárně-biologických metod [12]

1.4 Výskyt bakterií rodu *Lactobacillus*

Bakterie patřící do rodu *Lactobacillus* lze nalézt v různých ekologických přírodních nikách. Laktobacily byly izolovány v půdních vzorcích a rostlinách např. *Lactobacillus plantarum* je druhem bakterie přirozeně se vyskytující v zelenině jako je zelí a salát. Jsou přítomny v mléčném prostředí, zvláště ve fermentovaných mléčných výrobcích [10]. Jsou součástí také živočišné říše od včel až po člověka. Vyskytují se v gastrointestinálním a urogenitálním traktu, na kůži a v dutině ústní. Ve slinách a v zubním plaku byly izolovány např. druhy *Lb. rhamnosus*, *Lb. gasseri* a *Lb. casei*. Laktobacily v dutině ústní jednak přispívají k ochraně proti škodlivým mikrobům, ale zároveň jako producenti kyseliny mléčné mohou sami přispět k zubní erozi [13].

1.5 Přínos laktobacilů pro zdraví

U žen jsou laktobacily důležitou součástí zdravé vaginální mikroflóry bránící pronikání infekce do dělohy. Dominantními druhy jsou *Lb. fermentum*, *Lb. crispatus*, *Lb. gasseri* a *Lb. jenssenii*. Tyto bakterie vytvářejí dva mechanismy zabraňující rozmnožování patogenů. Produkci hlenu vytvářejí bariéru proti kolonizaci pochvy patogeny a výrobou antimikrobních látek, jako např. peroxid vodíků, kyselina mléčná a případně bakteriocin, a tím přispívají k prevenci genitálních infekcí ženského pohlavního ústrojí [14].

Četné druhy laktobacilů byly izolovány v gastrointestinálním traktu, kde jsou dobře přizpůsobeny životním podmínkám. U zdravého jedince laktobacily tvoří součást přirozené mikroflóry podílející se na mnoha interakcích s hostitelem vedoucím ke správnému fungování metabolismu, vyloučení patogenů, včetně imuno-stimulačních reakcí a výrobě bioaktivních peptidů a enzymů. Laktobacily tak přispívají ke zlepšení trávení, vstřebávání a tím dostupnosti živin [10, 15].

Rovněž podporují látkovou výměnu ve střevní stěně, pohyb střev a produkci vitamínu skupiny B (thiamin, riboflavin, niacin, pyridoxin, vitamín B12). Některé kmeny jsou schopny degradovat sacharidy, jako laktózu nebo α -galaktosidázu, způsobující bolesti břicha. Stav

mikroflóry a tedy i zdravotní stav jedince lze částečně ovlivnit používáním probiotik a probiotik [16].

1.6 Laktobacily jako probiotika

Probiotika nazvaná od „pro bios” (tj. „pro život”) jsou používána po staletí jako přirozená složka potravin. Jsou definována různými způsoby, např. podle FAO/WHO jsou probiotika živé mikroorganismy, které při podání v adekvátním množství přináší hostiteli zdravotní výhody. Probiotické bakterie jsou nepatogenní mikroorganismy izolované z lidského zažívacího traktu, přičemž jsou upřednostňovány kmeny schopné růst v mléce, vykazující maximální životaschopnost po celou dobu skladování výrobků. Počet živých mikroorganismů přítomných v probiotickém výrobku by se měl pohybovat okolo 10^6 - 10^8 KTJ/ml [17].

Mléčné výrobky patří mezi nejrozšířenější nositele probiotik. Širokou škálu probiotických výrobků tvoří fermentovaná i nefermentovaná mléka, syrovátkové nápoje, sýry, tvarohy a jogurty. Mezi významné probiotické mikroorganismy patří: *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. helveticus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. casei*, *Lb. reuteri*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* a *Lb. fermentum* [18].

1.6.1 Účinek probiotik

Mikroorganismy využívané jako probiotika musí splňovat řadu parametrů, týkajících se jejich bezpečnosti, funkčnosti, ale také stability a technologických vlastností. Ze zdravotního hlediska nesmí být patogenní, mutagenní nebo karcinogenní a musí mít klinicky prokázané zdravotní účinky. Musí mít schopnost kolonizovat intestinální trakt, přičemž se upřednostňují kmeny probiotických bakterií, vykazující schopnost vázat se na střevní buňky. Zároveň musí být rezistentní vůči kyselinám a žluči [19].

K nejdůležitějším funkčním účinkům probiotik u člověka, které byly vědecky podloženy, patří stimulace imunitního systému, prevence, snížení intenzity a doby trvání průjmů [20]. Nedávné studie přinesly pozitivní výsledky v účincích probiotik na dýchací ústrojí, a to zejména v oblasti prevence a snížení závažnosti respiračních infekcí. Studie byla prováděna na dospělých osobách, po dobu třech zimních období, podáváním vitamínů a minerálních látek obohacených o probiotika. Během této doby, kdy byly podávány tyto obohacené přípravky obsahující tři druhy probiotik (*Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* a *L. lactis*) došlo

u pacientů ke snížení závažnosti příznaků a zkrácení průběhu sezónních virových infekcí [21].

Probiotické laktobacily mají spoustu potenciálu, kde mohou přispívat ke zdraví a pomáhat před nemocemi. Nejnovější výzkumy se dnes zaměřují na možnosti využití probiotik, jako podpůrnou léčbu u nádorových a kardiovaskulárních onemocnění nebo jejich schopnosti tlumit příznaky alergií. I zde je však nutno brát zřetel na to, že některé kmeny mohou účinkovat různým způsobem na zdravého nebo nemocného jedince [16]. Důležité je si také uvědomit, že ačkoliv jsou probiotika všeobecně označována jako bezpečná, tak tyto prospěšné vlastnosti se týkají pouze jednotlivého kmene a nikoliv celého druhu. Proto je nezbytná genetická charakterizace probiotických kmenů s nutností jednoznačně určit genotypy, které řídí všechny přínosné vlastnosti. Účinek probiotik je z velké části dán rovněž tvorbou tzv. bakteriocinů. Jedná se o látky, které více nebo méně selektivně blokují růst a množení ostatních mikroorganismů [22].

1.7 Bakteriociny

Laktobacily se zasloužily o zvláštní pozornost díky produkci bakteriocinů. Bakteriociny jsou látky proteinové struktury produkované při svém růstu některými bakteriemi (např. bakteriemi mléčného kvašení) vykazující antimikrobiální vlastnosti [22]. Produkce antimikrobiálních peptidů je první linií obrany a také součástí vrozené imunity u většiny mikroorganismů. Antimikrobiální peptidy chrání hostitele podle různých specifických mechanismů. Nejčastěji se však cíleně zaměřují na poškození permeability plasmatické membrány, což následně vede k úniku buněčného materiálu a ke smrti buňky [23].

1.7.1 Využití bakteriocinů produkovaných laktobacily

Bakteriociny produkované bakteriemi rodu *Lactobacillus* jsou účinné zejména proti bakteriím, vyskytujícím se ve stejných ekologických nikách. V potravinářském průmyslu mohou být použity jako vhodná alternativa přírodních konzervačních látek náhradou za chemické sloučeniny při výrobě produktů s prodlouženou trvanlivostí [24].

V rozvojových zemích patří produkty z fermentovaných obilovin k tradičnímu a často také jedinému zdroji potravin. Mezi takový produkt patří např. prosná kaše „ben saalga”. Výroba těchto fermentovaných potravin je, ale spojena s nedostatečnou hygienou a krátkou trvanli-

vostí způsobenou patogenní mikroorganismy *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7 a *Salmonella enterica*. Proto se poslední výzkumy zaměřily na bakteriociny produkované kmeny *Lactobacillus plantarum* 2,9, které jsou známy svou vysokou antimikrobiální aktivitou. Testy byly prováděny v MRS bujónu při inkubační teplotě 30, 22 a 15 °C. Během kultivace při 30 °C v prvních 8 hodinách, došlo k rychlé inhibici patogenů a zároveň k vysoké koncentraci bakteriocinů. Podobný výsledek byl zaznamenán také u teplot 22 a 15 °C po prvních 24 hodinách. Výsledky studie ukazují, že *Lactobacillus plantarum* 2,9 může být použit jako startovací kultura pro zlepšení mikrobiologické bezpečnosti fermentovaných „ben saalga“ [25].

Bakteriociny jsou zajímavé i z lékařského hlediska. Účinky *Lactobacillus fermentum* jsou vědecky zkoumány pro zabránění šíření infekce v ráně produkovanou patogenní bakterií *Staphylococcus aureus*, která je původcem „nemocničních infekcí“ operačních ran. Pod kůži krysy byly zavedeny silikonové implantáty infikované *Staphylococcus aureus*, současně s *Lactobacillus fermentum*. Během tří dnů došlo k rozvinutí infekce, která byla následně potlačena působením proteinů ze sekretu *Lactobacillus fermentum*. Zmíněný protein zabránil vazbě bakterie *Staphylococcus aureus* na kolagen, jenž je jejím vazebným místem a tím zabránil jejímu dalšímu šíření. V budoucnu by tato metoda léčby měla značnou výhodu oproti dnes užívaným antibiotikům, jenž často kromě patogenů zničí i značnou část přirozené mikroflóry [26].

K většímu porozumění bakteriocinů nepochybně povede průběžný výzkum. Posouzení rizik a očekávané přínosy pro společnost budou určovat budoucí použití bakteriocinů v oblastech potravinářských technologií a zdraví člověka.

1.8 Laktobacily v potravinářství

Laktobacily mají významnou roli v potravinářských biotechnologiích, pro své fermentační vlastnosti a antimikrobiální aktivitu. Laktobacily našly své uplatnění jako startéry v mléčném, masném a pekárenském průmyslu.

V mléčném průmyslu jsou zejména využívány termofilní sýrařské zákysové kultury pro výrobu sýru s vysokodohřívanou sýřeninou, termofilního zakysaného mléka a tvarohu. Tyto kultury fermentují laktózu na kyselinu mléčnou, zároveň se vyznačují mírnou proteolytickou aktivitou a schopností inhibovat růst nežádoucích kontaminujících enterobakterií.

Mezi bakterie kyselinotvorných kultur řadíme *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Při výrobě jogurtů a jogurtových mlék jsou používány *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, které mají symbiotický vztah a spolu se vyznačují rychlou tvorbou kyseliny mléčné [9].

V masném průmyslu nacházejí laktobacily své uplatnění jako startovací kultury při výrobě fermentovaných masných výrobků. K nejvíce používaným druhům patří *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* a *Lactobacillus sakei*. Hlavní funkcí těchto bakterií je zajištění rychlého kvašení sacharidů přidaných do masových směsí, což následně vede k poklesu pH a k inaktivaci patogenů způsobující nežádoucí změny. Tím dochází k zlepšení stability a trvanlivosti produktů. Zároveň laktobacily vytvářejí biochemické podmínky pro dosažení konečných žádoucích sensorických vlastností, mezi něž patří zejména vůně, chuť a struktura masného výrobku [27].

V pekárenském průmyslu při výrobě (kynutí) žitného nebo pšeničnožitného chleba se využívají startovací kultury *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* nebo *Lactobacillus brevis*, kdy s jejich pomocí vzniká dobře a standardně prokynuté těsto. Chléb je základní potravinou a zároveň produktem podléhající rychlé zkáze a to zejména mikrobiologické. Tento problém je velmi závažný. Kromě odpuzujícího pohledu na viditelný růst plísní, se tyto plísně podílí na produkci nebezpečných mykotoxinů a alergenů způsobujících vážné zdravotní problémy. Proto byly provedeny studie u *Lactobacillus amylovorus* DSM19280, který produkuje široké spektrum protiplísňových látek. Pšeničné těsto kvašené *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 vykazovalo dobré reologické vlastnosti a upečený chléb byl kvalitní. Navíc byla prokázána schopnost zpomalit růst u *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* a *Penicillium expansum*, které patří mezi hlavní plísně podílející se na kažení chleba. Biologická ochrana chleba s *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 byla následně také porovnávána s nejčastěji používaným antimykotikem propionátem vápenatým. Chleby kvašené kváskem *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 byly účinnější v prodloužení trvanlivosti chleba, než chleba s přídavkem propionátu vápenatého. Jelikož spotřebitelská poptávka dnes roste po potravinách bez chemických přísad je to jedna z možností jak nahradit chemické konzervační látky [28].

2 GENETICKÉ INŽENÝRSTVÍ

Genetické inženýrství patří mezi důležitou dynamicky se rozvíjející oblast molekulární biologie a genetiky. Cíleně přetváří buňky, respektive organismy, a to v takových kombinacích genů, které v přírodě nenacházíme – mohou se přenášet vlastnosti organismu, které se v přírodě prakticky nikdy neseťkají. Získáváme tak nové, umělé kombinace genů, které jsou zaváděny do genomu organismu s cílem rekonstruovat jejich genetickou výbavu [29]. Gen uměle upravený a přenesený do nového hostitelského organismu označujeme jako transgen a vzniklý organismus pak transgenní, nebo také geneticky modifikovaný organismus (GMO) [30].

Nové genetické metody a genomová analýza nekulturních organismů se snaží identifikovat a charakterizovat získaný genetický materiál a aplikovat tyto poznatky pro pochopení pochodů lidského bytí. Otevírají se tak možnosti nových biotechnologií pro životní prostředí, veřejné zdraví a využívat mikroorganismy pro jejich schopnost rozkládat odpadní produkty. V potravinářství umožňují získávat odolné plodiny s většími výnosy, v medicíně výzkum nových generací vakcín, diagnostikování a léčbu dědičných chorob. Z bakterií s rekombinovanou DNA je možno získávat mimořádně čisté AMK, enzymy, alkaloidy, steroidy a mnoho dalších významných biologicky aktivních látek [31].

2.1 Základ buněčných technologií

Základ všech buněčných technologií byl položen v sedmdesátých letech tohoto století, kdy se poprvé podařilo izolovat požadovaný úsek DNA. Dříve byla analýza molekuly stanovována pouze nepřímou, a to na základě mapování genů a sekvencování RNA a proteinů. Následně byly zavedené metody molekulového klonování DNA, využívány pro tvorbu rekombinantní DNA (1972-1973, Boyer, Cohen a Berg), metody detekce specifických sekvencí DNA na bázi gelové elektroforézy (1975, Southern) a technika sekvencování DNA (1975 -1977, Sanger, Barrel, Maxam a Gilbert) [32]. Tyto techniky umožnily vytvářet nové molekuly DNA in vitro, cíleně s nimi manipulovat a zpětně je zavádět do živých organismů. Složitějšími metodami může být následně pozměněný gen začleněn do genomu celé rostliny nebo živočicha a stát se jeho dědičnou součástí [33].

Exprese genů neboli realizace genetické informace je proces, kdy je v genu uložena důležitá genetická informace ve formě deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a převedena v konkrétní

buněčné struktury. Produktem exprese jsou ribonukleové kyseliny (RNA), ale i molekuly proteinu [34].

Na rozdíl od klasické dědičnosti organismů, pro kterou je typický vertikální přenos DNA z generace na generaci, dovolují metody genového inženýrství přenášet geny do taxonomicky vzdálených organismů, čímž získáváme zcela nové nebo pozměněné produkty. Struktura DNA, která je základní nositelkou genetické informace s přesným uspořádáním purinových a pyrimidových bází se promítá do uspořádání aminokyselin v bílkovinách a je pro všechny živé organismy totožná. Můžeme tedy cíleně přenášet hmyzí nebo rostlinné genetické materiály do buněk savců, nebo lidské geny do bakterií [35].

Nové metody rekombinantní DNA, umožňují vytvoření chromosomů s novými kombinacemi genů, které by se v přírodě samy nikdy nevyskytly. Technologie rekombinantní DNA umožňují sledovat expresi genů, studovat funkci proteinů, detekovat mutace DNA, které jsou příčinou dědičných chorob a produkovat zvyšující se počet farmaceutických látek (např. produkce insulínu pro diabetiky v bakterii *Escherichia coli*) [36].

2.2 Základní metody genetického inženýrství

Základní metody genetického inženýrství byly vyvinuty díky převratným objevům v enzymologii nukleových kyselin a jsou založeny na manipulaci DNA, jako nositelkou genetické informace u prokaryot, eukaryot a DNA-virů. Těmito metodami lze pozměnit genovou výbavu organismu nebo upravit uspořádání genomu. Úpravy DNA jsou uskutečňovány mnoha metodami. Mezi nejdůležitější patří:

- izolace nukleových kyselin;
- elektroforéza nukleových kyselin;
- štěpení DNA specifickými restričními endonukleázami;
- hybridizace nukleových kyselin;
- polymerázová řetězcová reakce (PCR);
- klonování DNA;
- genové knihovny [29].

Poměrně novou a možná právě proto tolik diskutovanou oblastí genového inženýrství tvoří transgenní organismy neboli geneticky modifikované organismy (GMO).

2.2.1 Izolace nukleových kyselin

Cílem je získat nukleovou kyselinu v nativním stavu z přirozeného materiálu, v dostatečném množství a v čistotě. Výběr metody izolace DNA nebo RNA závisí na způsobu jejich následné analýzy, proto je třeba zbavit nukleové kyseliny všech kontaminujících látek, jako např. glykogen, proteiny nebo ionty kovů, které by mohly bránit účinnému a specifickému působení enzymů používaných k jejich analýze a úpravám [29].

Výchozím materiálem mohou být jednak kultury prokaryotických buněk, kvasinek, tkáně a orgány eukaryot, které musí být při lyzi homogenizovány. Zdrojem DNA mohou také být buněčné orgány a částice virů purifikované centrifugačními metodami [37]. K uvolnění vnitřního obsahu buňky je nutno rozrušit buněčné stěny nebo virových kapsidu působením enzymů a detergentů. Na narušení stěny bakteriální buňky se obvykle používá enzym lysozym a celulázy, z detergentů pak laurylsíran sodný a chelatační činidla [38]. Po rozrušení buněčné stěny a plazmatické membrány přechází do roztoku spolu s degradačními produkty komplexní směs DNA, RNA, proteiny, lipidy, sacharidy nízkomolekulárních látek a uhlovdíky. V závislosti na tom, co potřebujeme získat, zda DNA nebo RNA, se nežádoucí typ nukleové kyseliny odstraní působením příslušné nukleázy [29].

2.2.2 Elektroforéza nukleových kyselin

Elektroforéza v agarózovém či polyakrylamidovém gelu patří k nejpoužívanějším separačním technikám pro identifikaci, separaci a purifikaci nukleových kyselin a proteinů. Principem elektroforézy je pohyb záporně nabitých molekul DNA nesoucí elektrický náboj (hlavním nositelem záporného náboje nukleových kyselin jsou zbytky kyseliny fosforečné) v elektrickém poli směrem k anodě. Nukleové kyseliny se chovají jako polyionty a pohybují se směrem ke kladnému pólu. K dělení fragmentů DNA i RNA následně probíhá v závislosti na velikosti jednotlivých částic [39].

K třídění molekul DNA nedochází přímo v roztoku, ale na vhodném nosiči a tím zpravidla bývá gel. Gel je tvořen složitou sítí polymerních molekul s póry. Volbou koncentrace gelu zajistíme vhodné podmínky pro dělení fragmentů podle rozdílných molekulových velikostí. [29]. Molekuly DNA se v gelu pohybují rozdílnou rychlostí, která je označována jako elek-

troforetická pohyblivost a je nepřímě úměrná logaritmu jejich velikosti. Vzájemná pohyblivost je však dána podmínkami elektroforézy, zejména na iontové síle pufru a napětí [38].

Po skončení elektroforézy identifikujeme polohy rozdělených molekul obarvením vhodným barvivem, nejčastěji je využíván ethidium bromid, který se váže mezi vlákna DNA, vytvářející komplex, který po ozáření ultrafialovým světlem přístroje zvaném UV transluminátor zviditelní fragmenty DNA, které červeně fluoreskují [40]. Pro detekci fragmentů DNA využíváme radioaktivní značení nebo hybridizaci se značenou sondou. Rozdělené molekuly DNA lze také ve funkční formě izolovat z gelu [41].

Metodou pulzní gelové elektroforézy (PFGE) můžeme charakterizovat a porovnávat DNA u jednotlivých biovarů, druhů nebo kmenů bakterií mléčného kvašení. PFGE může být nápomocná k určení velikosti chromozomů a vybudování fyzické mapy bakteriálních chromozomů. Využití nacházíme zejména v průmyslových procesech, kdy nám jednak poskytuje možnosti sledování a řízení průběhu fermentace a zároveň detekci přítomných nežádoucích kontaminantů. Konkrétně byla zjišťována velikost chromozomů u *Lactobacillus plantarum*, který je důležitý jako startovací kultura ve fermentačních procesech, zejména zeleniny. Velikost chromozomů *Lactobacillus plantarum* se pohybuje v rozmezí 3-4 Mb a jsou daleko větší než u všech ostatních bakterií mléčného kvašení. Relativně malé chromosomy BMK jsou podle všeho spojeny s absencí metabolických funkčních genů a špatnou adaptací na životní prostředí [42].

2.2.3 Štěpení DNA specifickými restričními endonukleázami

Restriční endonukleázy neboli restriktázy jsou enzymy schopné štěpit specifické sekvence DNA. Jsou součástí mnoha bakterií, kde slouží jako ochrana před cizorodou DNA, která se do bakteriálních buněk dostává při infekci bakteriofágem. Bakteriální DNA je v cílových místech chráněna metylací adeninu a cytosinu [36].

Cílovým místem restričních endonukleáz je specifické místo tvořené krátkou sekvencí, zpravidla 4 až 8 nukleotidovými páry na dvouřetězcové molekule DNA, které štěpí a je pravděpodobné, že se tatáž místa mohou náhodně objevit v každé další molekule DNA [33]. Tato místa jsou většinou palindromické sekvence tzn. mající stejné pořadí nukleotidů ve směru od 5' konce na obou vláknech DNA. Štěpení molekuly DNA pak nastává v restričním místě umístěného uvnitř rozpoznávacího místa. Produktem štěpení jsou frag-

menty DNA o definované délce nazývané restrikčními fragmenty [29]. V závislosti na způsobu štěpení mezi nukleotidy získáváme kohézní konce s přečnávajícími jednořetězovými úseky, které se mohou spojit vodíkovými můstky na základě komplementarity bází s jiným koncem fragmentu DNA, vzniklého působením téhož restrikčního enzymu, nebo získáváme tzv. tupé konce, kdy dochází ke štěpení mezi protilehlými nukleotidy. Pomocí enzymu DNA ligáza vytváří fosfodiesterové kovalentní vazby a dochází k následnému propojení konců za vzniku rekombinantní molekuly DNA [36].

Pokud tedy štěpíme opakovaně DNA z lidské tkáně určitou restrikční endonukleázou, dostaneme vždy stejnou sadu fragmentů [33]. Restrikční endonukleázy jsou dnes důležitým nástrojem pro moderní technologie DNA využívané zejména v biologickém výzkumu.

2.2.4 Hybridizace nukleových kyselin

Při hybridizace nukleových kyselin dochází k vytváření dvouřetězových molekul z jednořetězových molekul DNA nebo RNA za předpokladu, že se jejich sekvence vyznačují úplnou nebo částečnou komplementaritou bází [29]. Principem hybridizace je rozrušení kovalentních vazeb cukr-fosfátové kostry řetězce DNA a vodíkových můstků, které vážou oba řetězce dvoušroubovice DNA prostřednictvím párování bází. Dojde k denaturaci DNA, kdy získáváme z původní dvoušroubovice DNA dva jednoduché polynukleotidové řetězce [43]. Tento proces je na rozdíl od denaturace proteinů reverzibilní. Řetězce je znovu možno párovat neboli renaturovat díky komplementaritě bází. Denaturaci lze vyvolat zvýšením teploty, specifickými enzymy DNA-polymerázou nebo chemickými činidly např. NaOH [38].

Hybridizační reakce se provádí v gelu, roztoku, na filtrech, čípech nebo *in situ*. Hybridizace *in situ* je metodou využívanou pro bakteriální identifikaci, umožňující určit přítomnost specifických sekvencí nukleových kyselin v cytologických preparátech chromozomů, buněk nebo řezech tkání a určit jejich prostorovou lokalizaci. K hybridizaci dochází přímo ve vyšetřovaném biologickém materiálu tedy na místě (*in situ*), nikoliv na izolované DNA. Tato metoda je vhodná pro detekci specifických molekul RNA uvnitř buněk a tkání. V současnosti je nejvíce využívanou metodou fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH), při které se provádí jejich určování pomocí fluorescenčně značenou protilátkou nebo jsou sondy značeny přímo pomocí fluorescenčně značených nukleotidů [44].

Sondou bývá jednořetězcová DNA o délce 10 až 1000 bází, která je modifikována radioaktivním prvkem nebo chemickou molekulou umožňující její detekci. Zobrazení navázaných sond je prováděno fluorescenční mikroskopií. FISH fluorescenční sondy vykazují vysoký stupeň specifčnosti doplňkových sekvencí, a proto jsou využívány v mnoha oblastech výzkumu [33].

Konkrétně v potravinářských technologiích k detekci specifických bakterií mléčného kvašení, syrovátkových kultur pro výrobu přírodních tvrdých sýrů a bifidobakterií u fermentovaných potravin.

Fluorescenční metodou *in situ* (FISH) sondy je možno přesně identifikovat rod *Lactobacillus* spp. pomocí nové Peptido-nukleové kyseliny (PNA). Sonda (Lac663) byla testována na využití metody ve vzorcích mléka s přídavkem probiotických kmenů *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus pentosus*, dalších taxonomicky příbuzných bakterií a patogenních bakterií. Lac663 sonda vykazuje vysokou specifitu, váže se výhradně na kmeny *Lactobacillus* spp., přičemž byla prokázána nepřítomnost hybridizace u několika druhů bakterií z třídy *Bacillus*, jako *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*. Zároveň nedocházelo ke křížení sondy ani s patogenními bakteriemi, které kontaminují potravinářské výrobky jako *Salmonella* spp., *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes* [45].

PNA-FISH metoda je rychlá (cca 3 hod.), spolehlivá a je schopna přímo detekovat a kvantifikovat *Lactobacillus* spp. v koncentracích, při kterých jsou tyto potenciální probiotické bakterie považovány za prospěšnou dávku pro lidské zdraví [45].

2.2.5 Polymerázová řetězová reakce PCR

Polymerázové řetězové reakce (PCR) byly zavedeny v roce 1985 Kary B. Mullisem a znamenala revoluci v metodice molekulární biologie. Výhodou PCR je umožnění získat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech [36].

PCR je enzymová metoda sloužící k opakující se syntéze definovaného úseku DNA, *in vitro*, pro něž jsou k dispozici oligonukleotidové primery o délce 17 až 28 nukleotidů komplementární k 3' a 5'- koncovým sekvencím DNA určené k amplifikaci. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů probíhá následně syntéza nových řetězců na obou matricových řetězcích protisměrně [39].

Při syntéze DNA se používají termostabilní enzymy DNA polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů odolávající vysokým teplotám (např. *Taq* polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech), při nichž dochází k denaturaci DNA. Tím je umožněno, aby syntéza DNA probíhala opakovaně v cyklech, přičemž v závislosti na teplotě reakční směsi probíhají 3 fáze [38].

Jednotlivé kroky zahrnují:

1. denaturace – rozvolnění řetězců DNA vlivem vysoké teploty (94-95°C, 20-40 s)
2. annealing – připojení (nasedání) primerů na vlákno DNA na principu komplementarity dusíkatých bází (50-60°C, 30-90 s)
3. extenze – polymerační reakce, syntéza komplementárního řetězce DNA, kdy vlákna DNA polymeráza nasedne na primery a připojí volné nukleotidy k vláknu DNA na principu komplementarity dusíkatých bází (72°C, 45-90 s).

Do reakce je navíc zařazena počáteční denaturace a závěrečná polymerační reakce, kdy dochází k dosyntetizování řetězců [46].

Reakce se provádějí v zařízení nazvaném termocykler, v němž dochází ke změnám teploty automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Vzhledem k vysoké citlivosti detekce stačí pro zahájení reakce velmi malé množství výchozích molekul DNA (teoreticky by měla stačit jediná molekula DNA nebo ve zvláštních případech RNA) [29]. Cyklus je opakován obvykle 25-30x, kdy dochází ke zdvojnásobení a následně k exponenciálnímu nárůstu počtu úseků DNA ohraničených místy, k nimž se připojily primery. Výsledným produktem reakce jsou tedy fragmenty DNA definované délkou (obsahující obvykle desítky až tisíce nukleotidů) analogické restričními fragmentům [47].

Metoda PCR umožnila řadu experimentálních přístupů, které byly v minulosti neproveditelné, přičemž počet aplikací PCR neustále vzrůstá. PCR nachází uplatnění při syntéze fragmentů DNA při:

- detekci infekčních mikroorganismů a virů v potravinách, vodě a půdě;
- kontrole výrobků (např. při zjišťování geneticky modifikovaných potravin nebo mikrobiologická jakost potravin);
- izolaci určitého genu ze vzorku tkáně;

- přípravě velkého množství templátu pro sekvencování;
- oligonukleotidově řízené mutagenezi – tj. definované změně jednoho nebo více nukleotidů [39].

Důležitou úlohu hrají metody PCR v potravinářském průmyslu, zejména pro identifikaci některých druhů *Lactobacillus*, které jsou po celém světě využívány jako průmyslové startéry pro výrobu fermentovaných mlék, sýrů, masa a masných výrobků. Zároveň je využívána k vyhledávání potencionálních probiotických kmenů *Lactobacillus* [48].

Pro rychlou identifikaci probiotických kmenů *Lactobacillus* izolovaných z farmaceutických a mléčných výrobků byla vybudovaná multiplex primer PCR sada obsahující devět primerů. Tato sada je schopna s přesností 93,6 % identifikovat všechny typy kmenů patřících do sedmi cílových druhů. Výsledky analýzy u některých probiotik následně ukázaly, že určité druhy laktobacilů, deklarované výrobcem byly zcela odlišné od těch, které se nacházely ve výrobcích [48].

Lactobacillus delbrueckii je součástí startovací kultury k výrobě různých fermentovaných výrobků, včetně jogurtů. Zároveň je velmi citlivý na napadení bakteriofágů, což v důsledku vede k fermentačnímu selhání a zhoršení kvality konečných produktů. Účinný způsob, jak se vyhnout fágovým útokům v mléčných výrobcích je včasná detekce bakteriofágů kdykoli během výroby. Metoda specifické PCR je rychlý a účinný způsob sledování a identifikace *Lactobacillus delbrueckii* bakteriofágů. Nejdůležitější výhodou pro mlékárenský průmysl je značné zkrácení doby analýzy, neboť detekci je možné provést v době kolem 30 minut i bez předchozího zpracování vzorků [49].

Všeobecně lze říci, že metody založené na PCR našly široké uplatnění díky své jednoduchosti, rychlosti a citlivosti a nahradily v řadě případů metodické postupy založené na klonování DNA a vektorech. Jsou uplatňovány především při vyhledávání a klonování specifických sekvencí, pro odhalování mutací, identifikaci bakteriálních a virových patogenů, rozpoznávání nádorů apod. [38].

2.2.6 Klonování DNA

Klonování obecně označuje pořizování identických kopií neboli klonů. Klon je soubor identických buněk odvozených ze společného předka mitózou u eukaryot a prostým dělením u prokaryot [29].

Klonování DNA je chápáno jako „vyjímání a vkládání“ DNA z jeho původního genomu do vhodného nosiče. Klon DNA, nebo také molekulární klon je soubor identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA, připravených např. rozmnožením rekombinantních molekul DNA v hostitelské buňce (*in vivo*) nebo polymerázovou řetězovou reakcí *in vitro*. Jako rekombinantní molekula DNA je označována molekula DNA vytvořená *in vitro* spojením cizorodé DNA s klonovacím vektorem [29].

Klonovací vektor neboli přenašeč, je molekula DNA schopná samostatné reprodukce v hostitelském organismu, tzn. schopná autonomní replikace. Spojení vektorové a cizí DNA zabezpečuje DNA-ligáza. Do hostitelské buňky je obvykle transportována pouze jedna rekombinantní DNA. Reprodukce hostitelské buňky zahrnuje replikaci DNA a vytvoření mnoha identických kopií DNA neboli klonů [50].

Aby molekula DNA při klonování genů dobře fungovala, klonovací vektor, musí splňovat určité vlastnosti. Jedná se zejména o schopnost se v hostitelské buňce replikovat, a tím vyprodukovat velký počet rekombinantní DNA a předat je svým dceřiným buňkám. Dále je pro dobrou manipulaci a zabránění lámavosti při purifikaci zapotřebí, aby klonovací vektor byl poměrně malý [51].

Jako klonovací vektory se zejména využívají plazmidy, fasmidy, bakteriofágy, kozmidy a umělé bakteriální a kvasinkové chromosomy.

- Plazmidy (bakteriální a kvasinkové) – jsou malé kruhové DNA, vyskytující se přirozeně v bakteriálních buňkách, nesoucí jeden až dva geny, které buňce hostitelské bakterie zajistí potřebné vlastnosti. Jsou schopny samostatné replikace integrací do bakteriálního chromozomu. Kromě počátku replikace obsahují také tzv. selekční marker – gen, který zajišťuje udržení plazmidu v hostitelské buňce. Může se jednat např. o rezistenci vůči antibiotikům. Do plazmidu lze běžně vložit molekulu cizí DNA o velikosti 10-15 kb [52].
- Bakteriofágy (virové) – neboli fágy, jsou viry, které specificky infikují bakterie. Fágy jsou tvořeny pouze molekulou DNA, popř. RNA nesoucí geny nezbytné pro replikaci fága. Infekce hostitelského kmene bakterie bakteriofágem s cizí DNA neboli lytický cyklus je velmi rychlý, přičemž dochází k namnožení celé fágové DNA včetně cizí DNA [51].

- Kosmidy (bakteriálně – virové) – jsou odvozené z plazmidu, do kterého byly naklonovány *cos* místa bakteriofága lambda. Výhodně spojují vlastnosti plazmidů a bakteriofágů. Rekombinantní DNA je naklonována do lineárního kosmidu a sbalena *in vitro* virovým mechanismem a infikována do bakterie. Uvnitř bakterie nabývá kosmid kružnicovou formu bez podstatných genů fága lambda a tudíž neprochází lytickým cyklem. V buňkách je replikován jako plazmid [38].
- Fasmidy (bakteriálně- virové) – jsou plazmidy vybavené navíc částí genomu některého bakteriofága. Nejčastěji jsou používané fasmidy vybavené replikačním začátkem vláknitého bakteriofága *φ1*, který umožňuje připravit z fasmidu od bakteriofága jednovláknitou DNA vhodnou pro sekvencování [53].
- Umělé bakteriální chromosomy (BAC) – jedná se o plazmidové vektory odvozené z plazmidu F *Escherichia coli*, jejich předností je velká klonovací kapacita.
- Umělé kvasinkové chromosomy (YACs) – patří mezi kyvadlové klonovací vektory, replikující se v *Escherichia coli* a kvasinkách. Vedle sekvencí bakteriálního plazmidu obsahují části kvasinkového chromosomu (centromera, počátek replikace a dvě kvasinkové telomery). Během štěpení plazmidů dochází k zformování dvou ramen, mezi něž se začlení klonovaná genomová DNA. Rekombinantní DNA je vložena do kvasinkových sféroplastů, kde se chová jako ostatní kvasinkové chromosomy [38].

Klonování DNA je prováděno v několika krocích:

1. Ligace: integrace genu do vektoru – po vložení cizí DNA do plazmidu dochází k rozštěpení kruhové molekuly pomocí restriční endonukleázy, která vytváří konce komplementární ke koncům cizorodé DNA. Po vytvoření jednotlivých fragmentů DNA, dojde ke vzájemnému spojení jejich konců a pomocí DNA-ligázy k vytvoření kovalentní vazby. V této směsi fragmentů se nespojují jen plazmidy s požadovaným úsekem DNA, ale také s jinými fragmenty, stejně tak i plazmidy navzájem.

2. Transformace: vnesení vektoru do hostitelských buněk (nejčastěji bakterií) – vektor se dostává do hostitelské buňky transformací tj. přímým vstupem DNA přes buněčnou stěnu a plazmatickou membránu. Transformace může být způsobena teplotním šokem nebo elektroporací.

3. Kultivace: amplifikace vektoru v hostitelských buňkách – rekombinantní plazmidy se množí v buňkách jako normální plazmidy, kdy dochází ke vzniku desítek až stovek kopií jedné buňky.

4. Izolace plazmidové DNA: separace vektoru s naklonovanou DNA z bakterií - selekce buněk nesoucí rekombinantní vektor je zásadním krokem, kdy je potřeba oddělit klony, které obsahují klonovací vektor od klonů, které vektor nenesou a nemají schopnost replikace.

5. Identifikace klonů – rozpoznání buněk obsahující namnožený vektor – transformované buňky můžeme rozpoznat pomocí detekce PCR, sekvencováním, nebo hybridizací nukleových kyselin [54].

2.2.7 Genové knihovny

Klonované geny mohou být uchovávány v genových knihovnách. DNA knihovny jsou kolekce hostitelských buněk, které fungují jako skladovací systémy pro celé genomy (genomové knihovny), nebo pro sadu genů, které jsou vyjádřeny typem buňky (cDNA knihovny). Genomové knihovny obsahují prakticky všechny klonované fragmenty připravených štěpením genomové DNA, které dohromady představují celý genom daného organismu. Knihovny cDNA (complementary DNA) jsou připravovány přepisem z mRNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy [55].

Jednotlivé typy knihoven mají své výhody i nevýhody. Genomová knihovna je daleko větší než cDNA knihovna (neobsahuje sekvence intronů) a umožňuje studovat geny v jejich přirozené podobě, včetně intronů a regulačních oblastí [29].

Pro hledání v knihovně obsahující několik tisíc klonovaných fragmentů, je zapotřebí DNA sonda, která je schopna se specificky vázat na požadovanou cílovou DNA.

Lactobacillus plantarum hraje důležitou roli v průmyslových technologiích, např. jako ochrana silážních rostlin. Stále se proto vyhledávají nové možnosti vývoje vylepšených kmenů. Z tohoto důvodu byl také prověřován vliv metylace DNA na účinnost přeměny BMK a zároveň snaha o vytvoření přímého klonovacího přístupu k *Lactobacillus plantarum* CD033. Po záměně různých kmenů BMK, plazmidové DNA vykazovaly odlišné Dam/DCM vlastnosti. Nejlepší výsledky byly dosaženy pomocí nedenaturované DNA, která vedla k transformační účinnosti až $\sim 10^9$ KTJ/ug DNA v *Lactobacillus plantarum* CD033. Tento nový přístup umožňuje výstavbu velmi malých plazmidů složených výhradně

z počátku replikace BMK. Kromě poskytování menších expresních vektorů, tato metoda vylučuje jakoukoliv strukturální nestabilitu či mutagenезi, která bývá někdy spojená s propagačním plazmidem *Escherichia coli*. Výsledky přinesly nové genetické nástroje pro *Lactobacillus plantarum*, které umožní rychlejší a snadnější klonovací postupy a výstavbu genových knihoven [56].

2.3 Transgenní organismy

Transgenní organismus neboli také geneticky modifikovaný organismus (GMO) je podle zákona 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, organismus (kromě člověka), jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací. Genetická modifikace je cílená změna dědičného materiálu spočívající ve vnesení cizorodého dědičného materiálu do dědičného materiálu organismu nebo vynětí části dědičného materiálu organismu způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací [57].

Pod pojmem transgenní organismus si můžeme představit konkrétní mikroorganismus, rostlinu nebo zvíře, které se na první pohled ničím neliší od nemodifikovaného organismu, ale má upravené vlastnosti, které se přirozeně nevyskytují. Možnosti použití těchto organismů jsou velmi rozmanité, od využití ve farmacii, v zemědělství či v potravinářství, i když zatím velká část slouží pouze k výzkumu v laboratořích [58].

2.3.1 Příprava transgenu

Z každého organismu je možno izolovat jeho DNA, která je nositelkou genetické informace, v níž jsou uloženy geny. Přidáváním nebo nahrazováním určitých úseků DNA je umožněno navozování cílených dědičných změn. Jelikož člověk, rostliny a živočichové mají stejnou stavbu molekuly DNA a stejný genetický kód, je teoreticky možné, geny z kteréhokoliv organismu vložit do dědičné informace jiného organismu [59].

Exprese transgenu v hostitelském organismu je podmíněna řadou faktorů, které mají zajistit, aby cizorodá genetická informace v novém hostiteli setrvala a nějakým způsobem se projevila. Patří zde:

- transkripce transgenu, popřípadě posttranskripční úpravy primárních transkriptů;
- translace mRNA a posttranslační modifikace primárního produktu;
- příprava fúzních proteinů;

- dosažení transportu proteinu do příslušného kompartmentu buňky nebo jeho sekrece do vnějšího prostředí.

Zajištění transkripce – pro zahájení transkripce transgenu je vyžadován promotor, který je rozpoznán RNA-polymerázou hostitelé buňky [29].

Jednotlivé hodnoty specifických rysů genu *Lactobacillus*, např. promotoru, ribozomálních vazebných míst a terminátoru se od sebe vzájemně liší a tyto rozdíly jsou dány v původu těchto genu. Geny, které se podařilo u laktobacilů sekvencovat, jsou odvozeny od devíti nebo více druhů, které jsou evolučně příbuzné, ale taxonomicky zcela odlišné. Prvotní důkaz, o tom, že k expresi *Lactobacillus* genu vůbec dochází, byly získány při přenesení těchto genu do jiných druhů *Lactobacillus* nebo do *Escherichia coli*. Tyto výsledky umožnily předběžnou analýzu transkripčních a translačních signálů u laktobacilů, které jsou dostatečně podobné, a je možno je uznat i pro jiné hostitele, i když kontrola genové exprese se může odlišovat [4].

Fragmenty DNA obsahující aktivní promotor byly také izolovány v *Lactobacillus curvatus* a *Lactobacillus acidophilus* pomocí promotor- vektorové sondy. Analýza nukleotidové sekvence těchto fragmentů odhalila výskyt promotoru s podobnými prvky. Sekvence jednoho fragmentu byly identifikovány jako ribozomální promotor RNA. Porovnávání sekvencí jiných částí klonovaných fragmentů s databází nukleotidových sekvencí, však nepřinesly výsledek o tom, zda tyto sekvence představují originální promotory nebo pouze sekvence s činností promotorů [4].

Zajištění translace – pro translaci bakteriální mRNA je nezbytná sekvence pro vazbu na ribozom a přítomnost iniciačního kodonu. Významnou roli hraje vzdálenost mezi 5' koncem mRNA, místem zodpovědným za vazbu mRNA na ribozom a polohou iniciačního kodonu [29].

Pozorováním nukleotidových sekvencí v místě zahájení translace u více než padesáti *Lactobacillus* genů, se ukázalo, že preferují ATG jako počáteční kodon. Sekvence (AGGAGG) s vnitřním tripletem (GGA) se nacházejí v 90 % analyzovaných sekvencí ve vzdálenosti 6-10 nukleotidů na 5' počátečním tripletu. Sekvence pravděpodobně funguje jako Shine-Dalgarno sekvence vázaná na 3' konec 16S RNA. V souladu s hypotézou je zjištění, že sekvence 3' konce 16S RNA u *Lactobacillus* je 3'CUUCUU 5' [4].

2.3.2 Geneticky modifikované organismy

Geneticky modifikovaný organismus může být bakterie, rostlina nebo zvíře.

U geneticky modifikovaných mikroorganismů jsou pozměňovány metabolické dráhy týkající se tvorby některých důležitých sloučenin, např. enzymů, antibiotik, organických kyselin, aminokyselin nebo vitamínů, přičemž výsledný produkt se následně vyznačuje novými vlastnostmi [31].

Mikroorganismy jsou taktéž využívány pro přípravu proteinů, které jsou vytvářeny v nepříbuzných organismech. Geny, které řídí jejich tvorbu, jsou vloženy do buněk bakterií či kvasinek, a kultivovány v živném roztoku, do něhož se požadovaný protein uvolňuje a izoluje. Gen izolovaný z dárcovského organismu je vložen do expresního vektoru a rekombinantní molekula je přenesena do hostitelské buňky. Takto získána bílkovina je zcela totožná s původní, a hlavně není zdrojem patogenů způsobujících onemocnění. Touto cestou se již několik let vyrábí např. lidský inzulin [59].

U transgenních rostlin byla genetická výbava pozměněna přidáním jednoho nebo více genů. Po přidání nových genů může rostlina vypadat jinak, ale také nemusí, nebo se může vyznačovat odlišnou chutí. Do rostlinného genomu lze vnášet geny jiných rostlinných druhů, bakterií, řas nebo živočichů [59].

Hlavním cílem transgenozy u rostlin je především ovlivnit jejich technologické vlastnosti, podílející se na zvyšování výnosnosti, nebo vedoucí k vyšší kvalitě plodů a semen, které mají význam hlavně pro zemědělce a zpracovatele. U některých plodin jsou využívány modifikace také proti virovým chorobám a herbicidům, používané pro ničení plevelů. Nyní je také snaha o přípravu geneticky modifikovaných rostlin s vlastnostmi, které by mohly příznivě ovlivnit zdraví spotřebitele (odstranění bílkovin způsobujících alergie, rýže s obsahem karotenu v celém zrnu a další možnosti) [58].

Přenos genů do rostlin může být prováděn různými způsoby. Mezi nejrozšířenější způsob, patří přenos založený na přirozené schopnosti půdní bakterie rodu *Agrobacterium* napadat poraněné rostliny a přenést část DNA (T-DNA) svého Ti-plazmidu (Ti = tumor inducing) do rostliny a začlenit v něm obsažené geny do náhodných míst rostlinného genomu. Pro expresi genu v rostlině je nutné použít rostlinný promotor [29].

Transgenní živočichové zatím nenašli tak široké uplatnění jako v případě geneticky upravených bakterií nebo rostlin, i když možný potenciál jejich využití je v budoucnu obrovský. Pro výzkumné účely jsou např. připravovány transgenní myši, u nichž se po vložení cizího DNA segmentu nebo vyřazením funkce konkrétního genu sledují důsledky na zvíře. Taková zvířata slouží, jako modely pro řadu lidských onemocnění. Mezi další transgenní zvířata patří hospodářská zvířata (krávy, ovce, kozy), u nichž je žádoucí transgenozí dosáhnout lepších užitných parametrů, případně získat odolnost vůči nemocem [60].

2.3.3 Přínosy a rizika genetické modifikace organismů

Postoj veřejnosti ke geneticky modifikovaným organismům se velmi různí. Na otázku, zda jsou produkty geneticky modifikovaných organismů škodlivé či nikoliv, nelze jednoznačně odpovědět. Jelikož jsou transgenní organismy vytvářeny pouze krátkou dobu, nemůžeme dnes dopředu předpovídat, jak ovlivní naši budoucnost.

Přínosy:

- výroba účinnějších léků, zlepšení léčebných postupů;
- odolnost rostlin vůči herbicidům, škůdcům či parazitům a infekčním chorobám, chladu, teplu atd.;
- prodloužení technologické trvanlivosti potravin;
- využití transgenních rostlin s většími výnosy pro rozvojové země trpící hladomorem.

Rizika:

- nejčastěji kritizovaná oblast GMO potravin a zemědělských plodin zejména ze strany ekologů;
- možné narušení biodiverzity;
- zneužití infekčních organismů a toxických látek [61].

3 VYUŽITÍ LAKTOBACILŮ V GENETICKÉM INŽENÝRSTVÍ

Konkrétnímu využití rodu *Lactobacillus* je v poslední době věnována značná pozornost. Genetické modifikace laktobacilů jsou schopny vytvářet širokou škálu kmenů, které je možno vzájemně kombinovat v závislosti na konkrétním požadovaném procesu nebo při tvorbě produktu [62].

3.1 Význam v potravinářských technologiích

V mlékárenském průmyslu mají velký význam enzymy β -galaktosidázy produkované rodem *Lactobacillus*, které katalyzují hydrolytické reakce podílející se na zlepšení stravitelnosti a rozpustnosti sacharidů a to zejména laktózy. Enzym β -galaktosidáza slouží jako substrát pro produkci galakto-oligosacharidů, které jsou zařazovány mezi prebiotika, příznivě ovlivňující zdraví hostitele selektivní stimulací určitých druhů bakterií ve střevech. Nedávné studie byly zaměřeny na intracelulární enzymy β -galaktosidázy z potencionálně probiotických kmenů *Lactobacillus reuteri*. Kmeny L103 a L461 jsou heterodimery s molekulovou hmotností 105 kDa, skládající se z podjednotek 35 a 75 kDa. Heterodimerická β -galaktosidáza v *Lactobacillus reuteri* byla kódována dvěma překrývajícími se geny *lacL* a *lacM*. Amino-kyselinové sekvence genů *lacL* a *lacM* ukazují významnou identitu se sekvencemi β -galaktosidázy v jiných laktobacilech a *Escherichia coli*. Kódovací oblasti genů *lacL* a *lacM* byly úspěšně klonovány a vyjádřeny v *Escherichia coli* pomocí systému založeného na polymerázovém promotoru T7 RNA. Výsledky prokázaly, že klonování těchto genů do expresního vektoru umožňuje správné složení a efektivní produkci proteinů. Oba enzymy jsou proto vhodné pro produkci galakto-oligosacharidů a jejich následné využití v tzv. funkčních potravinách [63].

Laktobacily taktéž plní důležitou úlohu při výrobě sladkých sýrů. Pro jejich správné srážení je nutné dodat syřidlo (proteolytické enzymy). Jelikož přírodních enzymů získávaných z žaludků sajících telat je nedostatek, hledají se možnosti náhrady, jak tento důležitý enzym získat a to zejména pomocí izolace enzymů z bakteriálních kultur. Nízká výtěžnost přírodní aminopeptidázy u druhů *Lactobacillus* vedla k použití genové technologie. Ze sýrů obsahující laktobacily, se podařilo izolovat poměrně velké množství intracelulární aminopeptidázy. Izolovaná aminopeptidáza z *Lactobacillus rhamnosus* S93 byla vnesena do *Escherichia coli*, přičemž výtěžnost rekombinantní aminopeptidázy mnohonásobně vzrostla. Vzniklý rekombinantní enzym je nyní s úspěchem používán pro produkci rekombinantního syřidla

(chymozin) při výrobě sýrů. Tento rekombinantní chymozin je levný, čistý a tvoří asi 70 % podíl na trhu v Severní Americe [64].

3.2 Přínos pro zemědělské technologie

Mezi negativní vlastnosti brambor patří, že v chladnu sládnou a bramborové lupínky tmavnou při smažení, pokud není použit přídavek oxidu siřičitého jako antioxidantu. Tyto vlastnosti, které jsou spojeny s látkovou přeměnou sacharidů v hlízách brambor, způsobují celkovou zhoršenou kvalitu, vzhled a chuť brambor. Tento problém by mohl být vyřešen vnesením genu chladově stabilní 6- fosfofruktokinázy izolované z bakterie *Lactobacillus bulgaricus* do genu rostliny brambor. Gen kódující 6- fosfofruktokinázu z *Lactobacillus bulgaricus* byl začleněn do promotoru B33 *Solanum tuberosum*, který je zodpovědný za transkripci v bramborových hlízách. Rekombinantní gen byl následně vložen do binárního vektoru pBin19 a začleněn do *Agrobacterium tumefaciens*, která zprostředkovala přenos cizorodé DNA do rostliny. Následná biochemická analýza prokázala snížený obsah sacharidů u geneticky modifikovaných brambor [65].

3.3 Laktobacily jako očkovací látky

Laktobacily jsou vhodnými kandidáty pro vývoj nových slizničních očkovacích látek. V současné době jsou očkovací vakcíny založené na využívání oslabených patogenů, jejichž použití představuje určité riziko. Oproti tomu některé druhy laktobacilů jsou brány jako neškodné nebo dokonce prospěšné a proto do budoucna představují vhodnou alternativu, jako slizniční očkovací látky. Na rozdíl od očkovacích látek, které využívají oslabené patogeny a jsou podávány injekční formou, jsou tyto vakcíny z praktického hlediska snadno aplikovatelné (např. nosní sprej, ústně), mají nižší náklady na výrobu, a jsou proto vhodné i pro hromadné očkování zejména v rozvojových zemích. Těmto slizničním očkovacím látkám je v poslední době věnován značný zájem ze strany výzkumu [66].

Výskyt antigenů na povrchu laktobacilů je vhodný pro konstrukce vakcín, zejména pokud peptidoglykanová vrstva některých kmenů vykazuje přirozené imuno-adjuvanty. Tyto druhy laktobacilů jsou výbornými kandidáty pro rozvoj bezpečných slizničních nosičů profylaktických a terapeutických molekul [67].

Rekombinantní *Lactobacillus plantarum* byl ověřován jako možná perorální vakcína vyvolávající systémovou i slizniční imunitu proti onemocnění lymfskou boreliózou. Izolovaný

lipoprotein OspA *Borrelia burgdorferi* byl přenesen do *Lactobacillus plantarum*. Vzniklými rekombinantními laktobacily bylo orálně naočkováno 36 myší. Během očkovacího režimu byly shromažďovány vzorky stolice po dobu 55 dní, pro sledování životaschopnosti rekombinantního *Lactobacillus plantarum* po průchodu gastrointestinálním traktem. Dosažení nejvyššího počtu živých bakterií bylo dosaženo po 2 hodinách od prvního očkování. Zpět na původní úroveň byl navrácen v rámci 24 hodin. Proto byl navržen dvakrát denně očkovací režim, pro vytvoření imunogenu ve střevním systému, který by byl schopen kolonizovat střevo po dlouhou dobu. Výsledky ukázaly, že u všech myší se vyvinuly protilátky proti šíření *Borrelia burgdorferi* a tato metoda by mohla být účinně využívána v boji proti této nákaze [68].

Další studie se zabývala přenesením heterologních proteinů - antioxidantních enzymů z *Lactococcus lactis* do *Lactobacillus casei*, který je charakteristický svým pomalým průchodem trávicím traktem. Rekombinantní kmen *Lactobacillus casei* produkující katalázy nebo superoxidismutázy byl perorálně podáván ve vodě myším s chronickým zánětlivým onemocněním střev, způsobující gastrointestinální dysfunkce. Toto onemocnění je doprovázeno poklesem antioxidantních systémů, kdy vzniká nerovnováha mezi zánětlivými a protizánětlivými účinky. Pravidelné denní podávání rekombinantních *Lactobacillus casei* BL23 vedlo k významnému snížení zánětu slepého a tlustého střeva [66].

Na využití rekombinantního *Lactobacillus gasseri* jako vakcíny proti viru lidské imunodeficiency (HIV) jsou zaměřeny nedávné výzkumy. Přenos HIV-1 se uskutečňuje převážně sliznicemi, proto vakcíny proti HIV-1 musí vyvolávat slizniční, humorální a buněčné odpovědi. *Lactobacillus gasseri* je bakterie osídlující lidskou dutinu ústní a gastrointestinální trakt a jako takové mohou být využity jako efektivní orální očkovací vektory proti HIV-1. Ve studii byl klonován HIV gen do *Lactobacillus gasseri*. Rekombinantní bakterie byla přenesena do myšího modelu. Pro posouzení imunitní účinnosti nové vakcíny byly analyzovány sérové hladiny IgG a IgA v tlustém střevu a reprodukčním traktu po podání jedné perorální dávky. Výsledky naznačovaly pozitivní imunitní reakci ve střevní sliznici, a proto byla navržena další strategie výzkumu pro využití rekombinantního kmene *Lactobacillus gasseri*, který může vyvolat ochrannou imunitní odpověď proti HIV-1 [69, 70].

Laktobacily, které jsou dnes prezentovány jako pravděpodobné a vhodné očkovací látky pro člověka mohou být taktéž využívány u zvířat. Lososovité ryby jsou často napadány infekční nekrózou slinivky (IPNV), která je spojena s vysokou úmrtností a způsobuje vážné ekono-

mické ztráty v chovu ryb. Kmeny *Lactobacillus* vykazují řadu pozitivních vlastností. Jsou schopny fungovat jako exogenní antigeny na povrchu sliznic a vyvolávat místní slizniční imunitní odpověď. Fúzní geny IPNV VP2-VP3 byly vloženy do vektorů *Lactobacillus* / *Escherichia coli*. Získané dva rekombinantní kmeny Lc: PG1-VP2-VP3 (působící na povrchu) a Lc: PG2-VP2-VP3 (sekreční) byly přeneseny do *Lactobacillus casei*. Těmito rekombinantními laktobacily byli naočkováni duhový pstruzi. Očkovací látka s fúzním proteinem IPNV VP2-VP3 byla schopná vytvářet dostatečné množství protilátek proti přirozenému IPNV. U očkováných duhových pstruhů došlo k významnému poklesu virového onemocnění a k vytvoření slizniční bariéry proti IPNV infekci [71, 72].

3.4 Laktobacily – možnosti paratransgenóze

Velkým problémem jsou nemoci přenašené hmyzem. Studie se dnes zaměřují na interakce mikroorganismů v komáří střevní mikroflóře a možnosti geneticky transformovat střevní symbionty, tak aby vytvářela antiparazitika účinné proti infekcím. To znamená, že jakákoliv bakterie, která není symbiotická, ale má vysokou schopnost kultivace a genetické přeměny je vhodným kandidátem pro paratransgenózi [73].

Aedes albopictus je druh komára pocházející z jihovýchodní Asie, vyskytující se v 25 zemích celého kontinentu. Tento komár je zodpovědný za přenos onemocnění žluté zimnice, encefalitidy a zvláště pak horečky dengue, která se řadí mezi nejhorší onemocnění přenosné komáry. Patogenní vektor *Aedes albopictus* byl zaveden do symbiontů *Lactobacillus reuteri* a *Lactobacillus brevis*. Následně byly posuzovány účinky nepatogenních laktobacilů na syntézu střevních proteinů při nakažení komára horečkou dengue. Během studie bylo zjištěno, že obě bakterie snižují syntézu proteinů ve střevech, čímž dochází k absenci základních živin komára. Tyto běžně se vyskytující bakterie, jsou pravděpodobně ideální kandidáti paratransgenóze pro ovládnutí horečky dengue [73].

Metoda paratransgenóze se jeví jako přínosná i v boji proti patogenům, které způsobují onemocnění včel, se kterým se několik posledních let potýkají včelaři v Evropě a Spojených státech. Cílem paratransgenóze je kontrola vektoru s přenosným onemocněním. V prvním kroku dochází k identifikaci proteinů, které zabraňují přenašečům předávání patogenů. Geny kódující tyto proteiny jsou zavedeny do symbionta tak, aby byly vyjádřeny vektorem. Tyto transgenní symbionty jsou následně schopny zabránit vývoji nebo přenosu patogenů. Taktéž střevní mikroflóra včely medonosné obsahuje bakterie mléčného kvašení, včetně

rodu *Lactobacillus*, který má paratransgenozní potenciál, jeví se tato metoda, která je předmětem současného výzkumu, jako velice perspektivní [74].

ZÁVĚR

V současné době patří genetika bakterií rodu *Lactobacillus* k významným předmětům výzkumu, kterému je věnována značná pozornost. Využíváním různých moderních metod a manipulací s DNA existuje možnost ověření výsledků, a z taxonomického hlediska dostáváme spolehlivější informace pro správnou identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus*. V této práci jsou popsány některé z metod, které jsou v současné době využívány k identifikaci a následným genetickým manipulacím.

Rod *Lactobacillus* hraje významnou úlohu jako startovací a probiotická kultura, která se podílí na imunostimulaci, eliminaci patogenů a výrobě bioaktivních peptidů a enzymů. Laktobacilly mají velký význam v potravinářských technologiích při výrobě sladkých sýrů, kde umožňují zvýšit výtěžnost rekombinantní aminopeptidázy. Další možnost využití se nabízí v zemědělství, kde lze genetickou úpravou získávat modifikované potraviny s lepšími technologickými vlastnostmi jako je údržnost, kvalita a vzhled. Laktobacily jsou nyní zkoumány jako přínosné pro vývoj nových druhů tzv. slizničních očkovacích látek. Pro tyto účely je jako možná perorální vakcína ověřován rekombinantní *Lactobacillus plantarum*. Dále mohou jejich prospěšné účinky být využity např. v rybářství při ochraně ryb, včelařství proti onemocnění včel, při léčbě některých nemocí přenášených hmyzem a v dalších oborech lidské činnosti.

V této souvislosti je nutná genetická charakterizace laktobacilů, která by zcela odhalila jak pozitivní, tak i negativní vlastnosti kmenů, které by mohly být využity při přípravě geneticky modifikovaných organismů. Z výše uvedeného je zřejmý jejich velký význam, který však v budoucnu může být ještě více rozšířen na základě dalšího studia a poznávání genetické charakterizace tohoto rodu bakterií.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] J.P. Euzéby: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature- Genus *Lactobacillus*. [online]. [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html>
- [2] *Mlékárenská technologie* [online]. [cit. 2013-02-06]. Dostupné z: <http://utb.cepac.cz/Screens/Explorer.aspx?id=32>
- [3] GASSON, Michael J a Gillem M VOS. *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. 1st ed. New York: Blackie Academic, 1994, xi, 300 p. ISBN 07-514-0098-X.
- [4] CHAMPOMIER-VERGÈS, Marie-Christine, Emmanuelle MAGUIN, Michel-Yves MISTOU, Patricia ANGLADE a Jean-François CHICH. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography B*. 2002, roč. 771, 1-2, s. 329-342. ISSN 15700232. DOI: /10.1016/S1570-0232(01)00624-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023201006249>
- [5] SIEZEN, Roland J, Frank HJ VAN ENCKEVORT, Michiel KLEEREBEZEM a Bas TEUSINK. Genome data mining of lactic acid bacteria: the impact of bioinformatics. *Current Opinion in Biotechnology*. 2004, roč. 15, č. 2, s. 105-115. ISSN 09581669. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166904000217>
- [6] RENAULT, Pierre. Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment. *Biochimie*. 2002, roč. 84, č. 11, s. 1073-1087. ISSN 03009084. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908402000299>
- [7] STILES, Michael E. A Wilhelm H. HOLZAPFEL. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 1997, roč. 36, č. 1, s. 1-29. ISSN 01681605. DOI: 10.1016/S0168-1605(96)01233-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160596012330>
- [8] SINGH, Smita, Pawas GOSWAMI, Rameshwar SINGH a Knut J. HELLER. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT - Food Science and Technology*. 2009, roč. 42, č. 2, s. 448-457. ISSN 00236438. DOI: 10.1016/j.lwt.2008.05.019. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643808001400>

- [9] *Potravinářská mikrobiologie I.: Mikroorganismy v potravinářství* [online]. [cit. 2013-03-06]. Dostupné z: <http://utb.cepac.cz/Screens/Explorer.aspx?id=18>
- [10] *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th ed. Editor Sampo Lahtinen. Boca Raton: CRC Press, c2012, 779 s. ISBN 978-1-4398-3677-4.
- [11] EDITOR-IN-CHIEF, John W a Patrick J EDITORS. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2011, s. 78-90. ISBN 978-012-3744-074.
- [12] JANOSZOWSKÁ, Dagmar. *Identifikace bakterií rodu Lactobacillus s využitím nových postupů izolace genomové DNA* [online]. 2008 [cit. 2013-02-27]. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Alena Španová. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/106173/prif_m/?so=nx;objem=1
- [13] YANG, R., S. ARGIMON, Y. LI, X. ZHOU a P. W. CAUFIELD. Determining the genetic diversity of lactobacilli from the oral cavity. *Journal of Microbiological Methods*. 2010, roč. 82, č. 2, s. 163-169. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701210001946>
- [14] BORIS, Soledad a Covadonga BARBÃ©S. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infection*. 2000, roč. 2, č. 5, s. 543-546. ISSN 12864579. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457900003130>
- [15] KLAENHAMMER, Todd R. Genetics of intestinal lactobacilli. *International Dairy Journal*. 1995, roč. 5, č. 8, s. 1019-1058. ISSN 09586946. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0958694695000445>
- [16] TURPIN, Williams, ChristÃ©le HUMBLLOT, Muriel THOMAS a Jean-Pierre GUYOT. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. 2010-10-15, roč. 143, č. 3, s. 87-102. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510004411>
- [17] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009, 536 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.

- [18] GIRAFFA, Giorgio, Nina CHANISHVILI a Yantiyati WIDYASTUTI. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*. 2010, roč. 161, č. 6, s. 480-487. ISSN 09232508. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250810000549>
- [19] *Výrobní zemědělská praxe a potravinářské biotechnologické úpravy pro zvýraznění pozitivních zdravotních vlivů mléka a mléčných výrobků: sborník příspěvků = Agricultural Production Practice and Food Biotechnological Manipulations for Support of Positive Health Impacts of Milk and Milk Products : proceedings of contributions : Rapotín, 8. 10. 2008*. 1. vyd. Rapotín: Výzkumný ústav pro chov skotu, 2008, 91 s. ISBN 978-80-87144-03-9.
- [20] KVASNIČKOVÁ, Alexandra. *Sacharidy pro funkční potraviny: probiotika - prebiotika - symbiotika*. 1. vyd. Praha: ÚZPI-Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2000, 81 s. ISBN 80-727-1001-X.
- [21] AURELI, Paolo, Lucio CAPURSO, Anna Maria CASTELLAZZI, Mario CLERICI, Marcello GIOVANNINI, Lorenzo MORELLI, Andrea POLI, Fabrizio PREGLIASCO, Filippo SALVINI a Gian Vincenzo ZUCCOTTI. Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological Research*. 2011, roč. 63, č. 5, s. 366-376. ISSN 10436618. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661811000569>
- [22] KLAENHAMMER, T. Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. roč. 50, 1-2, s. 45-57. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160599000768>
- [23] CLEVELAND, Jennifer, Thomas 20.J. MONTVILLE, Ingolf F. NES a Michael L. CHIKINDAS. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, roč. 71, č. 1, s. 1-20. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501005608>
- [24] ZACHAROF, M.P. a R.W. LOVITT. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*. 2012, roč. 2, s. 50-56. ISSN 22126708. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212670812000814>
- [25] VALENZUELA, Antonio SÃ¡nchez, Gloria DÃ¡az RUIZ, Nabil Ben OMAR, Hikmate ABRIOUEL, Rosario Lucas LÃ¡pez, Magdalena MartÃ¡nez CAÃ±ero, Elena

- ORTEGA a Antonio GÁLVEZ. Inhibition of food poisoning and pathogenic bacteria by *Lactobacillus plantarum* strain 2.9 isolated from ben saalga, both in a culture medium and in food. *Food Control*. 2008, roč. 19, č. 9, s. 842-848. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713507001703>
- [26] *Bakterie proti infekci* [online]. [cit. 2013-02-18]. Dostupné z: <http://www.vesmir.cz/clanek/bakterie-proti-infekci>
- [27] ESSID, Ines, Maher MEDINI a Mnasser HASSOUNA. Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science*. roč. 81, č. 1, s. 203-208. ISSN 03091740. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030917400800243X>
- [28] RYAN, Liam A. M., Emanuele ZANNINI, Fabio DAL BELLO, Agata PAWLOWSKA, Peter KOEHLER a Elke K. ARENDT. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, roč. 146, č. 3, s. 276-283. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160511001164>
- [29] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priority, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*. 3. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2000, s. 904-1200. ISBN 80-902-5624-4.
- [30] STRATILOVÁ, Zuzana. *GMO bez obalu*. Praha: Ministerstvo zemědělství, odbor bezpečnosti potravin, 2012, 31 s. ISBN 978-80-7434-057-4.
- [31] *Genomika: Genomická revoluce* [online]. [cit. 2013-02-13]. Dostupné z: <http://natura.baf.cz/natura/2004/12/20041201.html>
- [32] *Dějiny objevu a výzkumu DNA* [online]. [cit. 2013-03-07]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/D%C4%9Bjiny_objevu_a_v%C3%BDzkumu_DNA
- [33] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Ústí nad Labem: Espero, c1998, 1 sv. s. 740. ISBN 80-902-9062-0.
- [34] MIŠURCOVÁ, Ladislava. *Základy biologie*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. ISBN 978-807-3184-346.

- [35] BENEŠOVÁ, Luisa. *Potravinářství* 5. 1. vyd. Praha: ÚZPI-Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1999, 135 s. ISBN 80-861-5393-2.
- [36] KOTRBA, Pavel, Zdeněk KNEJZLÍK a Zdeněk CHODORA. Izolace, klonování a analýza DNA. [online]. [cit. 2013-02-07]. Dostupné z: <http://znamky.szesro.cz/text/TECHNOLOGICK%C3%89%20PROCESY/izolace%20a%20klonov%C3%A1n%C3%AD%20DNA.pdf>
- [37] Izolace nukleových kyselin [online]. [cit. 2013-02-12]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm>
- [38] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd., 2. dotisk. Brno: Masarykova univerzita, 2010, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [39] RUML, Tomáš. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 270 s. ISBN 80-708-0499-8.
- [40] *Gelová elektroforéza* [online]. [cit. 2013-02-24]. Dostupné z: http://opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz
- [41] *Elektroforéza nukleových kyselin*. [online]. [cit. 2013-01-31]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Elektrofor%C3%A9za_nukleov%C3%BDch_kyse-lin
- [42] CHEVALLIER, Bruno, Jean-Claude HUBERT, Beonit Kammerer. *Determinativ of chromosome size and number of rrn loci Lactobacillus plantarum by pulsed-field gel electrophoresis*, 1994, [cit. 2013-02-27]. Sv. 120, č. 1-2, s. 51-56 Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/037810979400174X>
- [43] *Hybridizace in situ* [online]. [cit. 2013-02-15]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Hybridizace_in_situ
- [44] *FISH: hybridizace in situ* [online]. [cit. 2013-02-15]. Dostupné z: <http://www.cba.muni.cz/cytogenlab/index.php?pg=metody--fish>
- [45] MACHADO, Antonio, Carina ALMEIDA, Ana CARVALHO, Filip BOYEN, Freddy HAESBROUCK, Ligia RODRIGUES, Nuno CERCA a Nuno Filipe AZEVEDO. Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Lactobacillus* spp. in milk samples. *International Journal of Food Microbio-*

- logy. 2013, roč. 162, č. 1, s. 64-70. ISSN 01681605. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160512005673>
- [46] PCR (*polymerázová řetězová reakce*) [online]. [cit. 2013-02-27]. Dostupné z:
http://opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis_metod-pcr&lang=cz
- [47] *Polymerázová řetězová reakce* [online]. [cit. 2013-02-07]. Dostupné z:
http://www.wikiskripta.eu/index.php/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce
- [48] KWON, Hyuk-Sang, Eun-Hee YANG, Seung-Woo YEON, Byoung-Hwa KANG a Tae-Yong KIM. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, roč. 239, č. 2, s. 267-275. ISSN 03781097. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.femsle.2004.08.049>
- [49] MARTIN, M, B DELRIO, N MARTINEZ, A MAGADAN a M ALVAREZ. Fast real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages in milk. *Food Microbiology*. 2008, roč. 25, č. 8, s. 978-982. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002008001317>
- [50] Fitzgerald-Hayes, Molly; Reichsman, Frieda (2010). *DNA and Biotechnology* (3rd Edton). (pp: 101-126). Elsevier. Online version available at:
http://www.knovel.com.proxy.k.utb.cz/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_
- [51] BROWN, T. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. 1. české vyd. Překlad Martin Fellner. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2007, xviii, 389 s. ISBN 978-802-4417-196.
- [52] *Klonování DNA* [online]. [cit. 2013-02-26]. Dostupné z:
<http://biologie.upol.cz/metody/Klonovani%20DNA.htm>
- [53] *KURZ ZÁKLADNÍCH METOD MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE* [online]. [cit. 2013-02-24]. Dostupné z: <http://www.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/ZMMB4.pdf>
- [54] *BIOLOGIE v kostce: 54. Klonování DNA-princip, využití v genovém inženýrství* [online]. [cit. 2013-03-06]. Dostupné z: <http://biologie-v-kostce.blogspot.cz/2011/05/59-klonovani-dna-princip-vyuziti-v.html>

- [55] FITZGERALD-HAYES, Molly; Reichsman, FRIEDA (2010). DNA and Biotechnology (3rd Edition). (pp: 101-126). Elsevier. Online version available at:
http://www.knovel.com.proxy.k.utb.cz/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=3194&VerticalID=0
- [56] SPATH, Katharina, Stefan HEIN a Reingard GRABHERR. "Direct cloning in *Lactobacillus plantarum*: Electroporation with non-methylated plasmid DNA enhances transformation efficiency and makes shuttle vectors obsolete". *Microbial Cell Factories*. 2012, roč. 11, č. 1, s. 141-. ISSN 1475-2859. Dostupné z:
<http://www.microbialcellfactories.com/content/11/1/141>
- [57] *Zákon č. 78/2004 Sb. o nakládání s GMO a genetickými produkty* ([online]. [cit. 2013-02-28]. Dostupné z: http://www.mzp.cz/cz/legislativa_a_formulare
- [58] DEMNEROVÁ, Kateřina. *Geneticky modifikované organismy: otázky spojené s jejich vznikem a využíváním*. Editor Zuzana Doubková. Praha: Ministerstvo životního prostředí, 2003, 38 s. ISBN 80-721-2259-2.
- [59] CUSTERS, René. *Průvodce biotechnologiemi: biotechnologie v zemědělství a potravinářství*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2006, 104 s. ISBN 80-200-1350-4.
- [60] POLÁČKOVÁ, Petra. *TÉMA: GMO-Geneticky modifikované organismy* [online]. 21. května 2010. [cit. 2013-03-05]. Dostupné z: <http://www.veda.muni.cz/tema/1843-tema-gmo--geneticky-modifikovane-organismy#.UTWylqJMr-g>
- [61] *Genetické modifikace-možnosti jejich využití a rizika* [online]. 2008 [cit. 2013-02-25]. Dostupné z
[http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/geneticke_modifikace/\\$FILE/oeres-geneticke_modifikace-20120822.pdf](http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/geneticke_modifikace/$FILE/oeres-geneticke_modifikace-20120822.pdf)
- [62] RENAULT, Pierre. Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment. *Biochimie*. 2002, roč. 84, č. 11, s. 1073-1087. ISSN 03009084. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908402000299>
- [63] NGUYEN, Thu-Ha, Barbara SPLECHTNA, Montarop YAMABHAI, Dietmar HALTRICH a Clemens PETERBAUER. Cloning and expression of the $\hat{\text{I}}^2$ -galactosidase genes from *Lactobacillus reuteri* in *Escherichia coli*. *Journal of Biotech-*

- nology*. 2007, roč. 129, č. 4, s. 581-591. ISSN 01681656. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165607001095>
- [64] AZARNIA, Sorayya, Byong H. LEE, Varoujan YAYLAYAN a Kieran N. KILCAWLEY. Proteolysis development in enzyme-modified Cheddar cheese using natural and recombinant enzymes of *Lactobacillus rhamnosus* S93. *Food Chemistry*. 2010, roč. 120, č. 1, s. 174-178. ISSN 03088146. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609011819>
- [65] NAVRÁTIL, O., L. FISCHER, J. ČMEJLOVÁ a J. VLČEK. Decreased amount of reducing sugars in transgenic potato tubers and its influence on yield characteristics. [online]. [cit. 2013-02-26]. Dostupné z:
http://www.ueb.cas.cz/cs/system/files/users/public/Navratil-BP_2007_.pdf
- [66] BERMÚDEZ-HUMARÁN, Luis G., Philippe LANGELLA. Utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs vaccinaux. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2009, roč. 2009, č. 417, s. 79-89. ISSN 1773035x. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773035X09703120>
- [67] DEL RIO, Beatriz, Jos F. M. L. SEEGER, Maria GOMES-SOLECKI a JÄ©rome NIGOU. Immune Response to *Lactobacillus plantarum* Expressing *Borrelia burgdorferi* OspA Is Modulated by the Lipid Modification of the Antigen. *PLoS ONE*. 2010-6-18, roč. 5, č. 6, e11199-. ISSN 1932-6203. Dostupné z:
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0011199>
- [68] DEL RIO, B., R. J. DATTWYLER, M. AROSO, V. NEVES, L. MEIRELLES, J. F. M. L. SEEGER a M. GOMES-SOLECKI. Oral Immunization with Recombinant *Lactobacillus plantarum* Induces a Protective Immune Response in Mice with Lyme Disease. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008-09-04, roč. 15, č. 9, s. 1429-1435. ISSN 1556-6811. Dostupné z: <http://cdli.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00169-08>
- [69] *Recombinant Lactobacillus as an Oral Mucosal Vaccine Against HIV-1* [online]. [cit. 2013-03-19]. Dostupné z:
<http://www.labome.org/grant/r01/de/recombinant/lactobacillus/recombinant-lactobacillus-as-an-oral-mucosal-vaccine-against-hiv-1-7932516.html>

- [70] *Recombinant Lactobacillus as a Vaccine Vector for HIV* [online]. [cit. 2013-03-19].
Dostupné z: <http://www.lib.ncsu.edu/resolver/1840.16/2949>
- [71] LI-LI, Zhao, Liu MIN, Ge JUN-WEI, Qiao XIN-YUAN, Li YI-JING a Liu DI-QIU.
Expression of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) VP2 & VP3 fusion protein in
Lactobacillus casei and immunogenicity in rainbow trouts. *Vaccine*. 2012, roč. 30, č.
10, s. 1823-1829. ISSN 0264410x. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X11020937>
- [72] MIN, Liu, Zhao LI-LI, Ge JUN-WEI, Qiao XIN-YUAN, Li YI-JING a Liu DI-QIU.
Immunogenicity of Lactobacillus-expressing VP2 and VP3 of the infectious pancreatic
necrosis virus (IPNV) in rainbow trout. *Fish*. 2012, roč. 32, č. 1, s. 196-203. ISSN
10504648. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464811004256>
- [73] DIENG, Hamady, Parimal TALUKDER, Tomomitsu SATHO, Yukihiro
NAKASHIMA, Nobuhiro KASHIGE, Ikenna N. NWACHUKWU, Adzitey
FREDERICK, Rahman G. M. SAIFUR, Che Salmah Md RAWI, Abu Hassan AHMAD
a Fumio MIAKE. Lactobacillus infection related to midgut protein synthesis in the den-
gue vector *Aedes albopictus*: Platform of non-symbiont bacteria for the control of *Ae-*
des vectors. February, 2010. Dostupné z:
[http://www.email.cz/download/i/jAjc4SQOOMg9gIrk3-
tWhm_VxgOHgssjs9oRRXvP2eFgBabRB4kLCGJRpFtu3bDnS2m8c7c/kom%C3%A1
%C5%99i.pdf](http://www.email.cz/download/i/jAjc4SQOOMg9gIrk3-tWhm_VxgOHgssjs9oRRXvP2eFgBabRB4kLCGJRpFtu3bDnS2m8c7c/kom%C3%A1%C5%99i.pdf)
- [74] RANGBERG, A., D. B. DIEP, K. RUDI a G. V. AMDAM. Paratransgenesis: An
Approach to Improve Colony Health and Molecular Insight in Honey Bees (*Apis mel-*
lifera)?. *Integrative and Comparative Biology*. 2012-06-22, roč. 52, č. 1, s. 89-99.
ISSN 1540-7063. Dostupné z: <http://icb.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/icb/ics089>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK	Baktérie mléčného kvašení.
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
GMO	Geneticky modifikovaný organismus
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PFGE	Pulzní gelová elektroforéza
FISH	Fluorescenční hybridizace <i>in situ</i>