

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Vliv čajových katechinů na adhezenci bakterií mléčného  
kvašení  
Bakalářská práce**

**Autor práce: Kateřina Nechvílová**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

**© 2016 ČZU v Praze**

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv čajových katechinů na adhezenci bakterií mléčného kvašení" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. dubna 2016

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za jeho cenné rady a vstřícnost při vedení mé bakalářské práci. Rovněž bych chtěla velmi poděkovat Ing. Tereze Volšátové za její velkou trpělivost, ochotu a pomoc při zpracování této bakalářské práce.



# Vliv čajových katechinů na adherenci bakterií mléčného kvašení

## Souhrn

Čaj je nápoj, který konzumují milióny lidí na celém světě. Mnozí odborníci a výzkumníci zejména z asijských zemí se snaží použít čaj jako léčivo. Studie dokazují, že čajové katechiny, a to zejména katechiny obsažené v zeleném čaji, mají pozitivní vliv na zdraví člověka.

Práce se zabývá vlivem čajových katechinů na probiotické mikroorganismy, obsahuje poznatky o druzích čajů a jejich výrobě, shrnuje účinky čajů na lidský organismus a jeho zdraví. V práci jsou popsány interakce čajových katechinů s různými nemocemi, mikroorganismy tvořící mikrobiotu trávicího traktu a vliv životního stylu na mikrobiom. Dále rozebírá adherenci mikroorganismů na stěnu střevního epitelu a popisuje, jak probíhá výzkum na modelech adherence *in vitro*.

Dle mnoha studií jsou čajové katechiny považovány za sloučeniny, které dokáží čistit organismus od odpadních látek. Vliv čajových katechinů na laktobacily byl zkoumán provedením testu adherence dvou bakteriálních kmenů *Lactobacillus gasseri* a *Lactobacillus casei* na směsné ko-kultuře Caco-2 a HT29-MTX. K inokulu byly přidávány extrakty z černého a zeleného čaje o koncentraci 20 µg/ml tří předních značek čajů a to Dilmah, Ahmad a Teekanne. Výsledkem bylo srovnání adherence laktobacilů účinkem čajových katechinů ve srovnání s kontrolou.

Práce prokázala, že čajové katechiny ovlivňují vybrané kmeny laktobacilů, kdy zelený čaj projevil větší efekt než čaj černý. Z výsledků vyplývá, že zelený čaj může podpořit adherenci bakteriálního kmene *L. gasseri*, a tím potencionálně zabránit patogenům adherovat na střevní epitel.

**Klíčová slova:** čajové katechiny, *in vitro*, mikrobiální adherence, buněčné linie, Caco-2, HT29-MTX, laktobacily

# Effect of tea catechins on the adherence of lactic acid bacteria

## Summary

Tea is a drink, what is consumed by millions of people worldwide. Many experts and researchers mainly from Asian countries are trying to use as a medicine. Studies show that tea catechins, particularly the catechins founded in green tea, have a positive effect on human health.

The work is focused on the influence of tea catechins on probiotic organisms, the work contains information about types of teas and, tea production and the effects on the human body and its health. In the work are described interactions of tea catechins with various diseases, microorganisms of the digestive system and the influence of lifestyle on the microbiome. Then is in my work described adherence of microorganisms on the wall of the intestinal epithelium. The next is described how to do the research on in vitro models of adherence too.

According to many studies are tea catechins considered as compounds which can cleanse the body from waste products. Effect of tea catechins on Lactobacilli was analysed by performing the tests of the adherences two bacterial tribes of Lactobacilli (*Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus casei*) on the mixed co- culture of Caco -2 and HT29 - MTX. To the inoculum were added extracts of black and green tea in concentration of 20 micrograms.ml-1 from three known brands of tea (Dilmah, Teekanne and Ahmad). In the results were compared adherences of Lactobacilli by effect of tea catechins to the control pattern.

The work showed that tea catechins affect the selected tribes of Lactobacilli and green tea has larger effect than black tea. Results showed, that green tea can support adherence of bacterial tribe *L. gasseri* and therefore tea can potentially stop the pathogens adherence on the intestinal epithelium.

**Keywords:** tea catechins, *in vitro*, microbial adherence, cell line, Caco-2, HT29-MTX, lactobacilli

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíl práce .....	10
2.1	Hypotéza.....	10
3	Literární rešerše.....	11
3.1	Mikrobiota trávicí soustavy .....	11
3.1.1	Mikroorganismy trávicího traktu .....	11
3.1.2	Probiotické organismy.....	12
3.1.3	Role probiotických organismů .....	13
3.1.4	Změny mikrobiomu se stravou.....	14
3.2	Mikrobiální adherence .....	16
3.2.1	Význam adherence .....	16
3.2.2	Mechanismy mikrobiální adherence .....	16
3.2.3	<i>In vitro</i> testy adherence .....	18
3.2.3.1	Adherence na mucin a slizniční buňky .....	18
3.2.3.2	Adherence na Caco-2, HT29 a HT29- MTX buněčné kultury .....	18
3.3	Čaje.....	20
3.3.1	Složení čajů .....	21
3.3.1.1	Polyfenoly .....	21
3.3.1.2	Purinové alkaloidy .....	23
3.3.1.3	Silice .....	24
3.3.1.4	Minerály.....	24
3.3.1.5	Vitaminy a enzymy .....	25
3.3.1.6	Aminokyseliny.....	25
3.3.2	Výroba čajů .....	26
3.3.2.1	Černý čaj .....	27

3.3.2.2	Zelený čaj .....	27
3.3.3	Účinek čajů na organismus .....	28
4	Materiál a metodika .....	30
4.1	Materiál.....	30
4.2	Metody.....	30
4.2.1	Příprava bakteriálních kmenů a suspenze .....	30
4.2.2	Kultivace buněčných kultur .....	31
4.2.3	Založení 24jamkové destičky .....	31
4.2.4	Příprava čajových katechinů .....	31
4.2.5	Stanovení adhezivních vlastností .....	32
4.2.6	Statistická analýza .....	33
5	Výsledky .....	34
6	Diskuze .....	37
7	Závěr .....	41
8	Seznam použité literatury.....	42
9	Seznam zkratk .....	51



# 1 Úvod

Čaj je kulturní nápoj připravovaný obvykle louhováním lístků rostliny čajovníku čínského v horké vodě.

Černý, bílý, zelený nebo červený má jinou chuť vůni i barvu. Jedno však mají společné a tím jsou zdraví prospěšné látky, jež pomáhají chránit buňky například před oxidačním stresem a mají protirakovinné účinky. Je známo, že nejen zelený, ale i černý čaj obsahuje velké množství fenolových sloučenin. Díky „fermentaci“ se tyto látky tzv. deaktivují a vytvoří se řada antioxidantů, které zastupují především theaflaviny. V čínštině existuje jedno rčení, které v překladu zní přibližně takto: „Vypijete-li denně šálek čaje, dozajista umoříte lékárníka hladem.“, proto má čaj nezastupitelné místo v tradiční čínské medicíně.

Polyfenoly mají vliv na střevní mikrobiotu, což příznivě ovlivňuje zdraví a pomáhá bojovat proti různým nemocem. Pitím čaje se může zlepšit vliv stávajících či požívaných probiotik v organismu člověka.

## **2 Cíl práce**

Cílem této bakalářské práce je zjištění vlivu čajových katechinů extrahovaných z černého a zeleného čaje na adhezní vlastnosti vybraných laktobacilů v *in vitro* modelu trávicího traktu na Caco-2 a HT29-MTX buněčných liniích.

### **2.1 Hypotéza**

Testovanou hypotézou je, že některé frakce čajových katechinů zvyšují schopnost probiotik adherovat na střevní stěnu.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Mikrobiota trávicí soustavy

Lidská střevní mikrobiota hraje klíčovou roli v mnoha metabolických, fyziologických, nutričních a imunologických procesech (O'Hara and Shanahan, 2006). Ačkoliv je složení a činnost mikrobioty během života velmi stabilní, může být ovlivněna celou řadou faktorů (O'Toole and Claesson, 2010). Na složení střevní mikrobioty má vliv především genetika, věk a strava (Chen et al., 2014).

Střevní bakterie zvyšují činnost imunitní ochrany a pro hostitele je významný i jejich metabolismus. Přetvářejí nestravitelné nebo nevstřebané sacharidy na vstřebatelné mastné kyseliny s krátkým řetězcem a na plyny, kromě toho mohou vytvářet vitamin K (Silbernagl, 2004)."

Odchytky ve složení a funkčnosti mikrobioty jsou většinou spojeny se zánětlivými a metabolickými procesy (například zánětlivé onemocnění střev, syndrom dráždivého tračníku a obezita). Změna složení mikrobioty tak ovlivňuje lidské zdraví (O'Toole and Claesson, 2010). Odhaduje se, že mikrobiota v celém gastrointestinálním traktu obsahuje 150krát více genů, než lidský genom (Qin et al., 2010). Většina bakterií patří buď do kmene Firmicutes (rody *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* a *Ruminococcus*), nebo kmene Bacteroidetes (rody *Bacteroides* a *Prevotella*), které tvoří více než 90 % známých fylogenetických kategorií nacházejících se v lidském střevě (Power et al., 2014).

#### 3.1.1 Mikroorganismy trávicího traktu

Druhy mikroorganismů gastrointestinálního traktu se mění podél jeho délky. V žaludku se vyskytuje malý počet a úzké spektrum mikroorganismů, což souvisí s nízkým pH žaludku. V tlustém střevě se už ale nacházejí mikroorganismy velice rozmanité a jejich množství exponenciálně roste (Tiihonen et al., 2010).

Lidské střevo je kolonizováno  $10^{13}$  až  $10^{14}$  mikroorganismy, z nichž drtivá většina patří do kmenů Firmicutes a Bacteroidetes (Power et al., 2014), jen 1 % připadá na aerobní *Escherichia coli*. Bakterie tračníku lze dle jejich účinku rozdělit na bakterie kvasné a hnilobné (Kittnar, 2011). Malé množství sacharidů a nestravitelných látek, především celulózy a pektinu, které se nevstřebali v tenkém střevě, je rozkládáno kvasnými bakteriemi (*E.coli*, *Enterobacter aerogene*). Vzniklými produkty jsou kyselina mléčná, alkohol, mastné kyseliny o krátkém řetězci, CO<sub>2</sub> a metan. Plynné látky navyšují objem tračníku a usnadňují tak jeho motilitu.

Kyseliny s krátkým řetězcem jsou poté resorbovány a slouží jako zdroj energie při regeneraci epitelu tlustého střeva. Hnilobné bakterie (*Proteus sp.*) přeměňují aminokyseliny z natrávených bílkovin na sirovodík, indol, skatol a merkaptany. Zdravá játra tyto látky po vstřebání vychytávají a následně detoxikují. Bakteriální činností vznikají i vitaminy (vitamin K a vitaminy komplexu B-B1) (Kittnar, 2011).

Gastrointestinální trakt novorozence je téměř sterilní (Favier et al., 2002). Střevní mikrobiota se zakládá při narození (Tiihonen et al., 2010). Novorozencům, kteří prošli porodními cestami, vzniká mikrobiom, který reflektuje vaginální a střevní mikrobiotu matky (Lupp and Finlay, 2005). Prvními kolonizátory jsou hlavně *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus* *Enterococcus*, *Enterobacter* a *Bacteroides*, kteří mohou pocházet z pochvy, výkalů či nemocnice (Marques et al., 2010). Kojenci narození císařským řezem mají tuto bakteriální rozmanitost v prvních týdnech života nižší (Power et al., 2014). U těchto dětí nastane mikrobiální kolonizaci rody *Bacteroides*, *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* opožděně. Během prvních týdnů života se střevo z orální strany osidluje bakteriemi anaerobů (Kittnar, 2011). Na konci 3. roku je už střevní mikrobiota ustálená a podobá se mikrobiotě dospělého člověka (Chen et al., 2014). V dospělosti je složení střevní mikrobioty relativně stabilní. Toto složení je pouze přechodně měněno vnějšími vlivy (Delgado et al., 2006). Nicméně tato relativní stabilita se snižuje s přibývajícím věkem (McCartney et al., 1996). Změny, vyvolané stárnutím, se týkají zejména v poměrovém zastoupení rodů Firmicutes a Bacteroidetes (Mariat et al., 2009). Tato přeměna střevní mikrobioty má za následek nižší gastrointestinální funkci (Štěpetova et al., 2011).

### 3.1.2 Probiotické organismy

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které jsou kolonizováním tlustého střeva zdraví prospěšné (Sanders, 2003). Z nichž nejčastější skupiny jsou rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Parracho et al., 2007) a některé rody *Enterococcus* a *Streptococcus*. Nejčastěji se vyskytující probiotické organismy jsou uvedeny v tabulce 1. V zásadě je dělíme do dvou následujících skupin (Ferenčík, 2005):

1. Jedná se o bakterie mléčného kvašení, kam zahrnujeme bakterie ze tří rodů: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*.

2. Do druhé skupiny patří probiotické organismy, které představují nepatogenní izoláty, např.: *Escherichia coli*, *Clostridium butyricum* nebo *Saccharomyces boulardii*.

Tab. 1 Probiotické organismy (Mazánková and Kotásková, 2011)

Grampozitivní koky	Bifidobakterie	Lactobacily	Kvasinkové mikroorganismy
<i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. Cremoris</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>bifidum</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>boulardii</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>adolescentis</i>	<i>Lactobacillus casei</i> <i>subsp. Rhamnosus</i>	
<i>Escherichia coli</i> (sérotyp O83: K24:H1)	<i>Bifidobacterium</i> <i>animalis</i>	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Shirota</i>	
<i>Streptococcus</i> <i>diacetylactis</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>infantis</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii subs.</i> <i>Bulgaricus</i>	
<i>Streptococcus</i> <i>intermedius</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>longum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	
<i>Streptococcus</i> <i>salivarius subsp.</i> <i>thermophilus</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>thermophilum</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	
		<i>Lactobacillus</i> <i>cellobiosus</i>	
		<i>Lactobacillus curvatus</i>	
		<i>Lactobacillus</i> <i>fermentum</i>	
		<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum 299v</i>	

### 3.1.3 Role probiotických organismů

Probiotické organismy se podílí na udržení rovnováhy mikrobiálního prostředí a přispívají k zachování epiteliální integrity (Ouwehand et al., 1999). V několika studiích bylo dokázáno, že bifidobakterie snižují hladinu střevního endotoxinu a zlepšují střevní bariérovou funkci, která chrání buněčnou sliznici před patogeny (Griffiths et al., 2004; Wang et al., 2006). Zlepšení bariérové funkce spočívá nejen ve zlepšení integrity, ale i zvýšenou sekrecí hlenu

a nižší propustností střev (Spinler et al., 2008; Saulnier et al., 2009; O'Shea et al., 2012; Shen et al., 2013).

Probiotika jsou dnes využívány jako doplňková léčba obezity a chorob souvisejících s obezitou (Shen et al., 2013; Sommer and Backhed, 2013). Kromě toho mohou probiotika působit na střevní imunitní systém, kde ovlivňují citlivost buněk imunitního systému k mikrobům v lumen střeva (Thomas et al., 1974). Podstatou zdravotně prospěšné funkce probiotické střevní mikromikrobioty je její bezprostřední kontakt s místním imunitním systémem, který tvoří lymfoidní tkáň sdruženou se střevem – GALT (gut-associated lymphoid tissue). Porucha kterékoliv z těchto tří složek má za následek nedostatečnou obranu proti patogenním či podmíněně patogenním mikroorganismům nedostatečnou imunologickou toleranci k potravinovým antigenům (Ferenčík, 2005).

Imunomodulační účinky probiotik dle Ferenčíka (Ferenčík, 2005):

- Stimulace mechanismů přirozené imunity, tvorby sekrečního IgA a místní imunitní reakce, orální tolerance na potravinové antigeny a rezistence na spontánní nádory.
- Udržování fyziologické rovnováhy mezi TH1 a TH2.
- Snížení neregulovaného zánětu v lidském střevě, alergické přecitlivělosti na potravinové antigeny.
- Normalizace dysfunkce střevní sliznice.

Nutnou podmínkou, aby se výše uvedené vlastnosti probiotických bakterií mohly uskutečnit, je jejich schopnost adherovat k intestinálnímu mukóznímu gelu nebo k epitelialním buňkám (Dunne et al., 2001).

#### 3.1.4 Změny mikrobiomu se stravou

Strava je jedním z faktorů, který má nepochybně vliv na složení střevní mikrobioty. Dodává živiny nejen organismu hostitele ale i střevním bakteriím.

Složení střevní mikrobioty se mění v závislosti na druhu přijímané potravy. Různé druhy bakterií mají rozdílnou genetickou výbavu a je tedy přirozené, že každý druh bude lépe využívat jiné nutrienty (Scott et al., 2008). Obecně platí, že bakterie upřednostňují sacharidy, jako primární energetický zdroj (Power et al., 2014). Enzymy pro degradaci polysacharidů rostlinného původu většinou nejsou kódovány savčím genomem. Tyto polysacharidy jsou pak rozkládány enzymy, které jsou produkovány qawstřevní mikrobiotou (Flint et al., 2012).

Některé bílkoviny (např. kolagen a elastin), stejně jako různé rostlinné metabolity (např. polyfenolické látky) se mohou také dostat do tlustého střeva, a můžou být podrobeny bakteriální transformaci (Power et al., 2014).

Kulturní zvyklosti, životní styl, socioekonomický status a v neposlední řadě geografie hraje velkou roli ve stravovacích návycích a tedy i ve složení střevní mikrobioty. Významné rozdíly ve střevní mikrobiotě byly zpozorovány u ruských, amerických, dánských a čínských národností (Tyakht et al., 2013). Podobné srovnání bylo provedeno na populaci Korejců, Američanů, Číňanů a Japonců, kde analýza populací ukázala, že fekální mikrobiální organismy se v každé zemi nepatrně liší. Američané měly vyšší zastoupení kmenu Firmicutes, Japonci Actinobacteria, Korejci a Číňané měly vyšší podíl Bacteroidetes (Nam et al., 2011). Tento výzkum naznačil, že složení mikrobioty pravděpodobně souvisí s životním stylem člověka.

Vliv stravy na střevní mikrobiotu má pro lidské zdraví velký význam. Například, vegetariánská a západní strava jsou dva naprosto odlišné styly stravování. Vegetariáni přijímají oproti „západně“ se stravujícím lidem mnohem více vlákniny a méně tuku. Ve střevní mikrobiotě vegetariánů převládá *Clostridium coccoides*, *Clostridium ramosum* a není v ní obsažena *Faecalibacterium prausnitzii* (Hayashi et al., 2002), kterou je možné naleznout u lidí, kteří konzumují hlavně ryby a maso (Mueller et al., 2006). Studie z roku 2011 ukazují, že vegetariáni a vegani mají menší počet *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli*, a *Enterobacteriaceae spp.* oproti lidem stravujícím se všežravě (Zimmer et al., 2012). Složení mikrobioty se rapidně mění i s množstvím neškrobových polysacharidů (Turnbaugh et al., 2009). Dle Štěpetové et al. (2011) může vysoký obsah laktobacilů ve střevech zvýšit riziko obezity a hyperglykémie u zdravých dospělých. Tyto účinky se ale připisují pouze specifickým kmenům. Například *Lactobacillus ingluviei*, *Lactobacillus acidophilus* zvyšují hmotnost, zatímco *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus gasseri* má opačný účinek (Million et al., 2012). Další studie odhalila, že *Lactobacillus paracasei* by mohl snížit ukládání tuku, tím že by zvýšil aktivitu Angptl4, což je inhibitor lipoproteinové lipázy, který řídí ukládání triacylglyceridů do tukových buněk (Aronsson et al., 2010). Potraviny bohaté na prebiotika, jako topinambur a čekanka, zvyšují počet bifidobakterií a laktobacilů (Kleessen et al., 2007) a snižují počet bakterií *Clostridium leptum* (Pyra et al., 2012). Je zajímavé, že některé fruktany jsou schopny zvýšit počet i jiných bakterií, jako je *Faecalibacterium prausnitzii* (Power et al., 2014).

Za posledních sto let došlo také k nepříznivým změnám ve složení střevní mikrobioty, zvláště v průmyslově vyspělých státech, kde přírodní potraviny byly nahrazeny potravinami

uměle připravovanými s různými přísadami a konzervanty. Hnilobné procesy se tak objevují nejen u starších, ale i u mladších věkových kategorií. Na základě těchto zkušeností je prospěšné regulovat střevní mikrobiotu během celého života člověka (Ferenčík, 2005).

## 3.2 Mikrobiální adherence

Ve vícebuněčných organismech hraje intercelulární adheze a adheze mezi buňkami a extracelulární matrix (ECM) důležitou úlohu v architektuře těchto tkání a orgánů. Epiteliální tkáň je reprezentativní příklad buněčné adheze a hraje klíčovou roli v architektuře tkáně. Tkáň epitelová je nezákladnější tkáň, ze které se skládají těla živočichů. Téměř všechny orgány v našem těle jsou vytvářeny na základě epitelové tkáně. Tato tkáň uzavírá celé tělo živočichů a odděluje vnitřní prostředí jedince z vnějšího prostředí. To je podobné jako v buněčné membráně v buňkách. Z tohoto důvodu, epitheliální tkáň hraje různé role, včetně omezení pronikání látek, strukturně odolávání vnější síly, selektivní výměnu látek mezi vnitřním prostředím těla a vnějším prostředím a přijímání informací z vnějšího prostředí (CSLS/The University of Tokyo, 2011). Pokud se na tuto tkáň přichytí bakterie lze hovořit o mikrobiální adherenci.

### 3.2.1 Význam adherence

Při vývoji probiotického produktu je nejdůležitější odolnost a účinnost mikroorganismu (např. z rodu *Lactobacillus*). Zásadní úlohou při výběru mikroorganismu je schopnost adherence prokaryotní buňky na buňku střevní sliznice. Bez této interakce by probiotický výsledek nebyl možný. Pomocí adheze se zamezí vyloučení probiotických buněk, které tak mohou dočasně kolonizovat střevní sliznici, utvářet imunitní systém a kompetitivně vytěsnit patogeny (Bezkorovainy, 2001). V nedávných studiích bylo prokázáno, že mechanismem probiotického působení mikroorganismů slouží právě adheze (Blum et al., 1999). Faktory ovlivňující adhezivitu probiotik jsou dle Gusilsa (2002) především druhová specifita, složení buněčné stěny, které ovlivňuje její vlastnosti a specifitu hostitele.

### 3.2.2 Mechanizmy mikrobiální adherence

Proces adherence probíhá ve dvou fázích. První (primární) fáze je přilnutí bakterie pomocí fyzikálních vlastností a jedná se o vratný proces (Rulík et al., 2011)

Pro druhou (sekundární) fázi je potřeba, aby bakterie setrvala přilnutá dostatečně dlouho, tak aby vyprodukovala povrchové molekuly – adheziny (Eiff et al., 2012). Přítomnost



adhezinu je zásadní pro adhezi na receptory epitelu. To zajistí dlouhodobé setrvání a tvorbu biofilmu na hostitelské tkáni (Rice et al., 2014).

Molekuly substrátu se na povrchu nosiče zachycují velmi rychle a řídí se zákony adsorpce. Hlavní mechanismy transportu mikrobiálních buněk k povrchu nosiče jsou molekulární a turbulentní difuze, chemotaxe, termoforéza a sedimentace. Zachycení buněk na povrch je složitý proces, nicméně je pro vznik biofilmu esenciální. Nejprve nastane reverzibilní adsorpce a poté následuje permanentní zachycení.

Primární adheze nastává v momentě, kdy se bakterie dostane do kritické vzdálenosti od substrátu, což je méně než 1  $\mu\text{m}$  (Marshall et al., 1971).

Iniciální adheze bakteriálních buněk na „kondiciovaný“ povrch je pokládána za náhodný děj převážně proudem kapaliny nebo cíleně vlastním pohybem (Rice et al., 2014). Úspěšnost adheze je dána fyzikálními silami (van der Waalsovy síly, hydrofobní interakce, elektrostatické interakce), nespecifickými chemickými vazbami (kovalentní polární vazby, vodíkové vazby) a nespecifickými interakcemi mezi receptory bakterie a hostitelské buňky. Další podstatné faktory ovlivňující adhezenci jsou změna pH, koncentrace nabitých iontů vzorku apod. (Gristina, 1994; von Eiff et al., 2012).

Po primární adhezenci exprimují bakterie povrchové molekuly nazývané jako adheziny, které mohou být bílkovinou, glykopeptidem či polysacharidem (Neu, 1996). Po přichycení se buňky reprodukuje, hromadí a vytvářejí „primární biofilm“, na který se mohou další buňky přichytit a kumulovat. Vytváří tzv. sekundární biofilm (Rice et al., 2014).

Ačkoliv povrch převážné části bakterií je hydrofobní, je pro počáteční tvorbu biofilmu výhodnější hydrofobní povrch biomateriálů, jelikož tak snadněji zdolávají počáteční elektrostatický odpor a rychleji adherují (Cerca et al., 2005; Donlan and Costerton, 2002). Tvorbu biofilmu ovlivňuje především povrch nosiče a podmínky okolního prostředí. Drsná a porézní struktura povrchu je výhodnější pro adhezenci buněk a biofilm se tak snadněji utváří (Rulík et al., 2011). Přímou souvislost s rychlostí tvorby biofilmu je výživová hodnota média (Lindsay and Holy, 2006). Biofilmy obsahující velké množství živin se formují rychleji. Naopak nedostatek nutrientů spouští odpoutávání buněk z povrchu. Autoři Thompson et al. (2006) zkoušeli poměr prvků uhlíku, dusíku a fosforu a došli k závěru, že jejich poměr je daleko významnější pro produkci biofilmu než jejich samotné množství (Dunne, 2002).

### 3.2.3 *In vitro* testy adherence

Ochranná vrstva z exopolysacharidů (EPS) může pomoci bakteriím lépe odolávat žaludečním kyselinám a žlučovým solím. Kromě toho, výroba EPS může zlepšit přilnavost na střevní sliznici a zvýšit životnost ve střevním traktu (Rulík et al., 2011). Účinnost těchto organismů, souvisí s jejich schopností přilnout na stěnu střeva. Schopnost udržet se na stěně střeva je nezbytným předpokladem pro bakteriální kolonizaci; to je také důležité pro rovnováhu střevní mikrobioty, střevní bakteriální aktivitu enzymu a stabilizaci střevní propustnosti (Walker and Duffy, 1998). Z tohoto důvodu, slizniční adheze byla navržena jako jeden z hlavních kritérií výběru pro probiotické kmeny (He et al., 2001). Kromě toho, může přispívat ke schopnosti vyloučit enteropatogeny.

*In vivo* studie mikrobiální adherence nejsou snadné provést a také jsou nákladné a časově náročné oproti *in vitro* modelovým systémům, které jsou založeny především na použití lidských buněk enterocytů podobné jako Caco-2 (Canzi et al., 2005). Je nutné zvolit takové kmeny, které zlepšují schopnosti adheze, čímž se zvýší jejich kolonizace (Ram and Chander, 2003).

#### 3.2.3.1 Adherence na mucin a slizniční buňky

Adherence na mucin a slizniční buňky je nejjednodušší model vyhodnocení adherence. Jeho základem je imobilizace mucinu na povrchu mikrotitračních destiček (Izquierdo et al., 2008). Množství adherovaných bakterií se stanovuje tradičními metodami např. barvením nebo počítáním KTJ (kolonie tvořící jednotku). Výsledky adheze jsou ale mnohem variabilnější, než při aplikaci buněčných kultur (Laparra and Sanz, 2009).

Tento model *in vitro* adherence je tedy používán především k rozlišení adherence bakterií k mukózní vrstvě a používají se k němu intestinální mucin odebraný ze střevního epitelu prasat (Li et al., 2008).

#### 3.2.3.2 Adherence na Caco-2, HT29 a HT29- MTX buněčné kultury

Model adherence na mucin a slizniční buňky nedokáže tak dobře simulovat přirozené prostředí střev, proto se vědci snažili najít jiný typ modelu, který by napodobil lidský střevní epitel.

## **Caco-2**

Buněčná kultura Caco-2 byla původně získána z adenokarcinomu tlustého střeva. Svým charakterem se tak blíží epitelu tenkého střeva, jelikož v Caco-2 buněčné linii můžeme rozlišit apikální a basolaterální membrány, které mezi sebou mají nepropustné spoje (Simons and Fuller, 1985). Za určitých podmínek se tato vrstva diferencuje a vytváří homogenní a polarizovanou monovrstvu, která funkčně i morfologicky připomíná zralé enterocyty lemující tenké střevo (Sambuy et al., 2005). Buňky vytváří mikrokly a napodobují kartáčový lem střeva, což je využito k *in vitro* testům adherence (Grajek and Olejnik, 2004). Monovrstva buněčné linie Caco-2 je široce využívána ve farmaceutickém průmyslu jako *in vitro* model lidské sliznice tenkého střeva pro předvídaní absorpce perorálně podávaných léčiv (Artursson and Karlsson, 1991). Ačkoliv je Caco-2 model vhodný pro studie adherence a může být využíván jako alternativa k radioaktivně značeným bakteriím, studie prokázaly, že kultury Caco-2 buněk nevytvářejí dostatečnou vrstvu mucinu (Bianchi et al., 2004).

## **HT29 a HT29-MTX**

V roce 1964 byla izolována z adenokarcinomu tlustého střeva 44 leté ženy buněčná linie HT29 (Fogh and Trempe, 1975). Původně se tato linie používala pro studium nádorů. Jejich schopnost diferencovat se v *in vitro* podmínkách na zralé enterocyty nebo buňky produkující hlen přitáhla pozornost ke studiím adheze lactobacilů (Lesuffleur et al., 1990). Jednu ze studií provedl Wang et al. (2008), v níž dokázal, že *L. reuteri* z kuřecího střeva má vysokou schopnost adheze. Následovala izolace *L. acidophilus* z lidského střeva, která též prokázala vysokou adherenci. Průměrnou adherenci pak vykazovali *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus* a *L. plantarum*. Od této doby se provedlo mnoho studií s buněčnou linií HT29, které jsou zaměřeny na probiotický účinek a adherenci na střevní epitel (Jensen et al., 2012). Na rozdíl od Caco-2 nevytváří kartáčový lem a její morfologie je podobná epitelovým buňkám (Grajek and Olejnik, 2004).

Studie některých bakteriálních kmenů (např. *L. rhamnosus* GG, *B. lactis* Bb12 nebo *B. animalis* IATA-A2) ke Caco-2 buňkám prokázaly nižší adherenci než k samotnému mucinu a jiné studie ukazují, že adherence některých kmenů patogenních bakterií *E. coli* ke Caco-2 buňkám je vyšší než k samotnému mucinu (Laparra and Sanz, 2009). Toto jsou důvody, proč se v současnosti upřednostňují buněčné linie HT29-MTX vzniklé z HT29 buněk adaptovaných na methotrexát (MTX) (Lesuffleur et al., 1990). Působením metotrexátu na HT29 buněčnou linii se vyseletovali speciální pohárkové buňky schopné produkovat mucin (Leteurtre et al.,

2004) . Studie od Laparry and Sanze (2009) ukázala, že tato buněčná linie má nižší schopnost adherence některých probiotických kmenů než linie Caco-2. Aby se docílilo stejného efektu, který vytváří přirozený lidský střevní epitel, byl vytvořen model, který se skládá z kultur Caco-2 a HT29-MTX. Buněčná linie HT29-MTX zde zastupuje pohárkové buňky a Caco-2 představuje enterocyty. Linie se používají v poměru 9:1 (Caco-2:HT29-MTX) (Pontier et al., 2001).

Adheze není jen ovlivněna použitou kulturou. Je třeba mít na paměti i jiné faktory ovlivňující adherenci mikroorganismů. Jsou to zejména typ mucinu, živné médium, teplota, tepelná stabilita pH a dokonce i  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. V úvahu je třeba vzít odlišnou schopnost adherence různých bakteriálních kmenů (Tuomola et al., 2001).

### 3.3 Čaje

Čaj je nápojem užívaným po celém světě, který vzniká louhováním rostlin nebo částí rostlin v horké vodě. Pro přípravu čaje se používají různé teploty vody s ohledem na typ nápoje a louhované rostliny a existuje jich celá řada od ovocných čajů po pravé čaje z Čajovníků. Dle (Chow, 1998) je čajovník stálezelená rostlina s drobnými kvítky bílé barvy podobnými jabloňovým kvítkům.

Čajovník čínský, *Camellia sinensis*, se pěstuje v Číně několik tisíciletí, pochází z jižní a jihovýchodní Číny a přilehlých oblastí Indie, Laosu, Vietnamu a Barmy. Do Japonska se dostal v 9. století a do dalších zemí až za éry kolonizace v 19. století (Valíček, 2002).

Rod *Camellia* má stovky druhů a vyvinul se ještě před dobou ledovou ve třetihorách, kde přežil díky náhorním plošinám kuejčouská a jünnanská, které nebyly pod ledem (Chow, 1998). Odhaduje se, že existuje cca 300–500 druhů čaje a jen několik odrůd. Z čajovníku se zpracovávají listy, mladé výhonky a semena, které obsahují vysoký obsah oleje používaného v technickém i potravinářském průmyslu. Využívá se i v lékařství jako antioxidant s obsahem vitamínu C (Valíček, 2002).

K největším producentům kromě Číny a Indie patří i Srí Lanka, Japonsko, Keňa a velká část Indonésie (Valíček, 2002). Nejlepší podmínky pro pěstování čaje jsou místa ve vysokých horách do nadmořské výšky 1800 metru nad mořem. Čaje z těchto oblastí oplývají vyšším obsahem kofeinu, aminokyselin a silic (Chow, 1998).

Pěstitelé člení čajovník čínský do tří tříd, tzv. džátů. Z čínské skupiny se vyrábí čaj s vysokou kvalitou a je získávána z prvních sklizní po období vegetačního klidu. Další třídy jsou Ásámská a Indočínská. Dnes se převážně pěstují kříženci těchto džátů, jelikož tak poskytují

větší výnosy. Na druhou stranu ale nedosahují tak vysoké jakosti, jako původní džáty (Valíček, 2002).

### 3.3.1 Složení čajů

Chemické složení čaje (Tabulka 2), se může velmi lišit podle druhů, místa pěstování, doby sklizně, podnebí či věku čajovníku, ze kterého byly sklizeny (Arcimovičová, 1998).

Tab. 2 Chemické složení čaje. Hodnoty v tabulce jsou uvedena v % z celku. (Arcimovičová, 1998)

<b>Třída čaje</b>	<b>Polyfenoly</b>	<b>Bílkoviny</b>	<b>Kofein</b>	<b>Vláknina</b>	<b>Škroby</b>	<b>Cukry</b>	<b>Pektiny, tuky a aminokyseliny</b>
<b>Ásam</b>	22,2	17,2	4,3	27,0	0,5	3,5	6,5

#### 3.3.1.1 Polyfenoly

Jednou z nejdůležitějších skupin látek vyskytujících se v listech čajovníku jsou fenolové sloučeniny, které reagují s bílkoviny (Velíšek, 2002). Říká se jim třísloviny či taniny (Augustín, 2001). Dle Arcimovičové (1998) zelený čaj obsahuje až o 90 % více polyfenolů než čaj černý, a proto nejsou účinky černého čaje tak výrazné. Transformační proces oxidace úspěšně deaktivuje polyfenoly.

Dle Velíška (2002) se třísloviny dají rozdělit na dvě skupiny, hydrolyzovatelné a kondenzované. Hydrolyzovatelné taniny jsou polymery esterů kyseliny gallové tedy polygalloylestery. Kondenzované taniny nebo také flavolany mají strukturu 3-hydroxyflavanu, jsou to jeho polymery. V čajích se nacházejí také libovolné kombinace kondenzovaných a hydrolyzovatelných tříslovin. Ty se pak nazývají komplexní třísloviny.

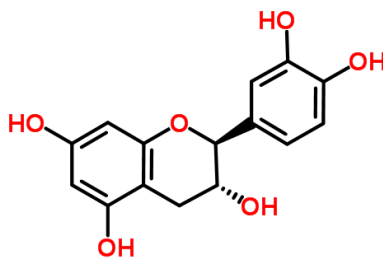
Polyfenoly, kterých je kolem třiceti, představují skoro třetinu rozpustných látek v čerstvém listu čajovníku. Oxidací se třetina (podle některých autorů až polovina) polyfenolů zoxiduje do komplikovanějších okysličených látek jako je např. theaflavin. Po skončení tohoto procesu se v listech čajovníku nachází dva druhy polyfenolů: okysličené a neokysličené (Chow, 1998). Neokysličené polyfenoly vytvářejí trpkost, zatímco okysličené dodávají čaji jeho barvu a chuť. Čím je čaj „zoxidovanější“, tím má více barvy a méně trpkosti (Chow, 1998).

Dle druhu zpracování se liší obsah tříslovin. Zelené čaje obsahují (10-27 %), černé čaje (5-12 %). Čajovník pěstovaný ve vysokohorských polohách obsahuje vyšší procento tříslovin

než čajovník z nížin. Množství tříslovin je možné ovlivnit postupem při přípravě nálevu. Při 2-3 minutách se vylouhují většinou pouze aromatické látky, ovšem při louhování 5-7 minut se do nálevu vyloučí třísloviny (Augustín, 2001). Z uvolněných tříslovin získá čaj trpčí chuť. Protože zelený čaj obsahuje větší množství tříslovin než černý, doba louhování by neměla trvat déle než 2 minuty (Wachendorf, 2007). Předpokládá se, že třísloviny, dohromady s katechiny, bezprostředně ovlivňují syntézu aromátů v listech čajovníku (Augustín, 2001).

#### 3.3.1.1.1 Čajové katechiny

Majoritně jsou v čajích zastoupeny flavonoly, které se také nazývají čajové katechiny (Valíček, 2002). Kondenzované taniny jsou polymerní látky, jejichž monomerními jednotkami jsou flavonoidy, flavany, hlavně flava-3-oly, zvané katechiny. Flavanové jednotky jsou spojovány vazbami mezi atomy uhlíku 4 a 8 (Obr. 1). Katechiny mají strukturu blízkou anthokyanidinům a flavonolu, mnohé vyšší oligomery a polymery proanthokyanidinů jsou kondenzované taniny. Kondenzované taniny se vyskytují ve formě dimerů a trimerů, které však snadno podléhají enzymové oxidaci za vzniku polymerních hnědě až červeně zbarvených látek (Vodrážka, 2007).



Obr. 1 L-(-)-Catechin

Pomocí polyfenolových oxidás se katechinové jádro přemění na chinon a poté se kondenzací vytvářejí theaflaviny, thearubiny, theasinensis a bisflavanoly. Konkrétněji dimerizací polyfenolů vznikají theaflaviny cca 2-6 % ze sušiny a polymerizací se vytvoří thearubiny v množství 15-20 %.

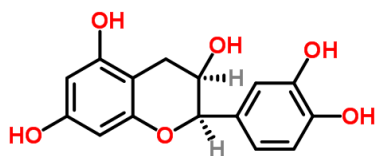
Theaflaviny v černém čaji se jsou charakteristické tím, že obsahují theaflaviny (TF1), theaflaviny-3-gallatu (TF-2A), theaflaviny-3'-gallatu (TF-2B) a theaflavinu-3,3'-digallatu

(TF3). Jejich množství bylo zjištěno následovně 0,08 %, 0,34 %, 0,11 % a 1,5 % (Ho et al., 2008).

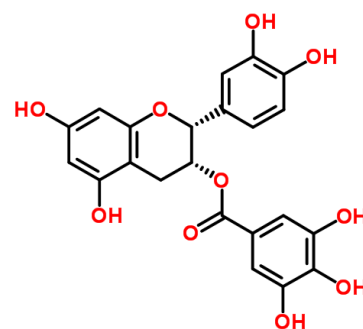
### 3.3.1.1.2 Nejvýznamnější katechiny

Katechiny v zeleném čaji mohou mít v některých případech až 30 % podíl. Čaj obsahuje například gallokatechin (GC), epigallokatechin (EGC), epikatechin (EC), epigallokatechin-3-gallát (EGCG), epikatechin-3-gallát (ECG) a katechin (C) (Vodrážka, 2007). Na obrázku 2 jsou zobrazeny vybrané sloučeniny katechinů.

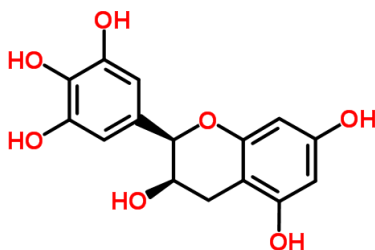
(-)-Epicatechin



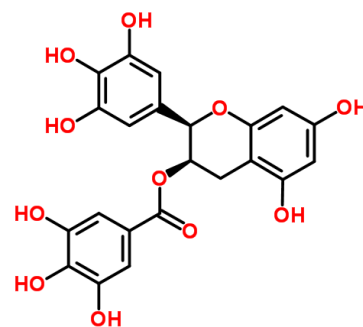
(-)-Epicatechin-3-O-gallate



(-)-Epigallocatechin



(-)-Epigallocatechin gallate



Obr. 2 Strukturální vzorce vybraných katechinů

### 3.3.1.2 Purinové alkaloidy

„Další skupinou látek obsažených v čaji se nazývají purinové alkaloidy, patří mezi ně kofein (3-5 %), theobromin (0,1 %) a theofylin (0,02 %).“ (Arcimovičová, 1998)

Kofein, chemicky 1,3,7-trimethylxanthin, zaujímá 2–8 %. Dle odrůd se liší i obsah kofeinu, nejvyšších dosahují černé čaje (Ho et al., 2008). Podle čínských odborníků je koeficient pro obsah kofeinu v čajích následující: černý čaj 3, oolong 1,5 a zelený čaj 1.

Vycházíme-li z těchto údajů, získáme tento přehled: černý čaj 25-110 mg, oolong 12–55 mg, zelený čaj 8–36 mg. Dalším faktorem ovlivňující obsah kofeinu je doba louhování. Po třímínutovém louhování se z čaje uvolní pouze 20–40 mg, avšak po pěti minutách luhování se uvolní 40–100 mg. Což je o více než polovinu. Dle Čchen Pin-fana z Fuťienského čajového spolku se uvolní z dvaceti šálků zeleného čaje 240 mg kofeinu. Na jeden šálek pak vychází 12 mg (Chow, 1998). Další faktor je stupeň oxidace. Delší oxidací čajových lístků se dosáhne vyššího obsahu kofeinu, ale zároveň i nižšího obsahu polyfenolů (Sharangi, 2009).

Když se objevovali jednotlivé vlastnosti čajových polyfenolů, kofein zde figuroval jako potencionální faktor, který je schopný podněcovat hubnutí a vyvolávat antikarcinogenní účinek. K jasnějším závěrům došli studie, při nichž se podával zelený, černý čaj nebo kofein myším s karcinomem z UVB záření. U myši užívající kofein či čaj karcinom zastavil svůj růst, oproti myším, kterým nebyl podáván kofein se karcinom nezmenšoval (Ho et al., 2008).

#### 3.3.1.3 Silice

Silice neboli též éterické oleje jsou těkavé látky se složitou strukturou získávané z rostlinných materiálů. Tyto látky se vytvářejí v listech čajovníku během růstu (Chow, 1998). Z chemického hlediska se jedná o terpenové uhlovodíky s obecným vzorcem  $(C_5H_8)_n$ . Vyskytují se buď v podobě monoterpenů, nebo seskviterpenů. Nejvýznamnější acyklické monoterpenové alkoholy, ať volné nebo přítomné jako estery, jsou linalool (3,7-dimethyl-1,6-oktadien-3-ol), geraniol (3,7-dimethyl-trans-2,6-oktadien-1-ol), jeho isomer nerol (3,7-dimethyl-cis-2,6-oktadien-1-ol), acitronellool (3,7-dimethyl-6-okten-1-ol) (Velíšek, 2002). Jelikož černý čaj prochází složitými oxidačními procesy, silice se vypařují a aroma typické pro zelený čaj, se vytrácí a mění. Silice nejenže vytváří aroma nápoje, ale i pomáhají zažívání a emulgaci tuků (Chow, 1998).

#### 3.3.1.4 Minerály

V čaji se nachází asi pět procent různých anorganických látek (Tabulka 3), které jsou ve formě solí. K nejdůležitějším patří draslík. Uvádí se, že šálek černého čaje obsahuje přibližně 60 mg K. Dále je to hliník, hořčík, vápník, zinek, železo, fosfor, sodík, fluor a mangan. Množství dalších látek v čaji kolísá podle druhu a místa, kde se rostlina pěstuje (Arcimovičová, 1998).



Tab. 3 Obsah minerálů v čaji vyjádřený v procentech (Arcimovičová, 1998)

Draslík	Vápník	Fosfor	Hořčík	Železo	Fluór
0,50-0,70	0,46	0,32	0,23	0,15	0,14

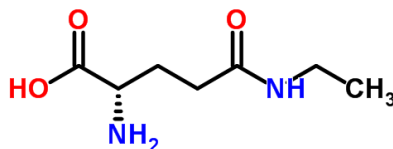
### 3.3.1.5 Vitaminy a enzymy

Oxidace fenolických látek za přístupu vzduchu probíhá velmi pomalu. Enzymy obsažené v čaji tento proces urychlují. Technologické zpracování čaje se tedy bez těchto enzymů neobejde. Jedním z nejdůležitějších enzymů, který tento proces zabezpečuje, se nazývá oxidáza (Augustín, 2001). V čaji jsou přítomny také vitaminy B1, B2, P, niacin, kyselina listová či antioxidantně působící vitamin C a E (Mitscher and Toews, 2006). Vitaminy B1 a B2 se při fermentaci či dlouhodobém skladování nijak nedegradují a zůstávají tak v čaji nezměněny. Naopak vitaminy E, A, C a P se bohužel fermentačním procesem rozkládají. Jelikož zelený čaj fermentačním procesem neprochází, obsahuje dle Augustína (2001) až desetkrát více vitaminů než černý čaj.

### 3.3.1.6 Aminokyseliny

Čaj ať už černý nebo zelený obsahuje 1-2 % aminokyselin. Nejdůležitější z nich je methylglutamin, neboli theanin (Obr.3) (Velíšek, 2002).

Další složky jsou dusíkaté sloučeniny cca 17 %, skládající se z proteinů 6 %, aminonukleových kyselin cca 8 % a theaninu 3 %, což je aminokyselina vyskytující se pouze v čaji (Ho et al., 2008).



Obr. 3 L - Theanin – chemická struktura

### 3.3.2 Výroba čajů

„Z čajovníku se sklízí nejmladší část větvíček, tzv. fleše, s vrcholovým pupenem (T) a jedním nebo několika listy. Na prýtu pak zůstává obvykle jen vyvinutý list a 1-2 tzv. rybí listy (R) neboli džamamy (Valíček, 2002).“ Vzhledem k tomu, že kvalita, a tím i cena čaje je podmíněna počtem sklizených listů na keři, používají se pro různé typy čajů tzv. sběrové formule. Nejčastěji používanou sběrovou formulí je  $Fine = (T + 2) / (R + 1)$ , kde T + 2 znamená, že sklizené fleše jsou složeny z terminálu a dvoulistů pod ním, R + 1 značí, že na bazálním konci prýtu zůstal jeden normální a jeden rybí list (Arcimovičová, 1998). K dosažení nejkvalitnějšího čaje se používají listy získané z vrcholových pupenů a nejvýše položeného listu (Valíček, 2002).

Získání černého nebo zeleného čaje závisí na zpracování sklizené suroviny při výrobním procesu. Jedním z hlavních rozdílů je, zda se čajové lístky podrobí fermentaci. Fermentace je však chemický děj, který způsobují živé mikroorganismy. Správně by se tento postup měl nazývat oxidace.

Hlavní druhy čaje jsou dle fáze sklizení a oxidace následující:

- Oxidovaný **černý čaj**
- **Oolong**, který se oxiduje dvakrát kratší dobu než čaj černý
- Neoxidovaný **zelený čaj**
- **Pu –Ehr**
- **Bílý čaj**

Čaje, které se na Západě označují jako „černé“ však Číňané nazývají chung - čcha („červené čaje“) a to především kvůli jejich barvě (Chow, 1998).

Všechny druhy čaje, ať už prošli oxidačním či neoxidačním procesem se zpracovávají tak, že se čajové lístky svinují. Dojde tak k vytlačení šťávy na povrch listů. Následně se suší v horkém vzduchu, aby se snížila jejich vlhkost. Takto zpracované lístky se prosévají několika sítí s odlišnými průměry, aby se roztřídily podle velikosti. Nejlepší a také nejdražší čaje se skládají z největších lístků. Nižší třídy obsahují menší fragmenty (Mitscher and Toews, 2006).

Při svinování čajových lístků se naruší buněčná membrána a vytékající šťáva s polyfenoly zreaguje s enzymem polyfenolázou, který je katalyzátorem při oxidaci polyfenolů atmosférickým kyslíkem. Činnost enzymů a oxidace se zastaví sušením. Látky vzniklé při tomto procesu ale zůstanou součástí suchých listů, do té doby než se nerozpustí ve vroucí vodě (Chow, 1998).

### 3.3.2.1 Černý čaj

Černý čaj je výsledkem procesu, jehož hlavními etapami je zavadnutí, svinování, fermentace, sušení a třídění. Již v průběhu vadnutí v řízených podmínkách nastávají důležité změny vyvolané působením endogenních enzymů. Začíná rozklad chlorofylu, bílkovin a tříslovin (Valíček, 2002).

Dle Arcimovičové (1998) se při zavadání z listů vypaří asi polovina vody. Zavadlé listy se svinují ve speciálních strojích, rozrušují se buněčné stěny (Valíček, 2002). Buněčný obsah se promíchá a okyslíčí (Arcimovičová, 1998). Svinuté listy se dopravují do fermentačních komor s regulovanou teplotou 28 °C a vlhkostí vzduchu. Čaj leží asi hodinu až dvě rozložen v tenkých vrstvách. Fermentaci doprovází změna barvy svinutých listů ze zelené na medově červenou a přitom se uvolňuje doposud vázaný kofein a vzniká typická čajová vůně (Valíček, 2002). V průběhu fermentace probíhají chemické reakce, které změní čajové katechiny na bisflavanoly, theaflaviny, thearubiginy a další oligomery s krátkým řetězcem (Arcimovičová, 1998). Po ukončené fermentaci se čaj suší v proudu horkého vzduchu, jeho barva se mění na hnědočervenou až téměř černou, což je způsobené právě přítomnými theaflaviny (Valíček, 2002).

Usušený čaj se třídí na sítích. Ta část, která propadá, se nazývá čaj listový, část zůstávající na sítích se dále řeže a vzniká čaj zlomkový. Podle podílu vrcholových pupenů, nejjemnějších listů, dokonalosti svinutí či fermentace se čaj listový i zlomkový se dělí do jakostních skupin. „Černý čaj představuje asi 85 % objemu světového obchodu čajem (Valíček, 2002).“

### 3.3.2.2 Zelený čaj

Výroba zeleného čaje probíhá, takže se lístky nechají zavadnout prudkým sušením nebo napařením (Arcimovičová, 1998). Tím se inaktivují enzymy a nedochází k podstatným změnám chlorofylu a tříslovin, potom se listy suší, svinují, dosušují a třídí. Nálev zeleného čaje má žlutou barvu. Jeho chuť je trpce svíravé a má silnou vůni. Lidem navyklým na chuť černého čaje se zdá být příliš „drsný“ (Valíček, 2002).

### 3.3.3 Účinek čajů na organismus

Čaj je využíván v tradiční čínské medicíně na základě praktických zkušeností. Spektrum účinků proti chorobám je rozsáhlé. Dnes víme, jaké jsou jeho hlavní složky. Zdravotní účinky čaje jsou spojeny především s polyfenoly (Arcimovičová, 1998). Tabulka 4 ukazuje přehled nejběžnějších účinků. Jsou v ní zaznamenány provedené studie a látka, které jsou účinky přisuzovány.

Epigallokatechin gallát je zřejmě nejefektivnější protirakovinná substance. Testy na zvířatech prokázali hypotézu, že EGCG brání vzniku rakovinotvorného bujení v kůži, brání rozvoji rakoviny nejen v trávicí soustavě, ale i v jiných orgánech, a přitom dokáže léčit již vzniklé nádory ve střevě. Následně byl prokázán protirakovinný účinek EGCG i u lidí při pozorování předcházení rakoviny v trávicí soustavě včetně jater, pokožky, plic. Zároveň se prokázalo snížení rizika rozvoje rakoviny prsu. Urokináza, která se pozitivně projevuje při vzniku metastáz, je inhibována EGCG tím, že jí EGCG dokáže navázat a pak jsou následně vyloučeny z těla. To dokazuje preventivní působení EGCG při rozvoji rakoviny (Arcimovičová, 1998). V mnohých studiích bylo prokázáno, jak moc je významná přítomnost gallátových skupin. Bylo zjištěno, že k inhibici fosforylace destičkového růstového faktoru (PDGF) beta receptorů, vyvolané tyrosinem, dochází pouze v přítomnosti katechinů s gallátovými skupinami. Toto omezuje rychlé množení lidského glioblastomu A172 (Ho et al., 2008).

Další z podstatných účinků zeleného čaje je antioxidačních účinků. Zde je seřazena účinnost fenolických složek čajů od největšího po nejmenší následovně: TF3>ECG>EGCG>TF-2B≥TF-2A>TF1≥EC>EGC. Tato hypotéza je zase založena na pozorování gallátové skupiny. TF3 vykazuje lepší výsledky než TF-2A a TF-2B a ty mají lepší výsledky než TF1. Analogicky s tímto pozorováním byly EC a EGC méně efektivními inhibitory než EGCG a ECG (Ho et al., 2008). Další studií antioxidačních účinků katechinů zeleného čaje a theaflavinů černého čaje bylo zjištěno, že theaflaviny jsou stejně účinné, možná lepší než jejich katechinoví předchůdci v potlačování oxidace LDL (Ho et al., 2008). Látky obsažené v čaji inhibují růst *Streptococcus mutans* (Arcimovičová, 1998), který je jednou z příčin vzniku zubního kazu. Další vědci došli k závěrům, že EC v těle působí synergicky s látkami mající schopnost podpořit vstup glukosy do tkání (Mitscher and Toews, 2006, Sharangi, 2009). Též byl zjištěn silnější inhibitorový efekt antivirotik u SARS-CoV 3 C v theaflavinech TF-2B a TF3 (Ho et al., 2008).

Izolovanému gallokatechin gallátu (GCG) byly prokázány antialergické vlastnosti (Augustín, 2001). Fenolické látky v čaji mají mnoho dalších farmakologických účinků. Za zmínku stojí ještě detoxikační účinek na jaterní enzymy (Augustín, 2001, Arcimovičová, 1998, Valíček, 2002).

Tab. 4 Přehled léčivých účinků čaje

<b>Účinek</b>	<b>Hlavní účinná složka</b>	<b>Studie</b>
protirakovinný	EGCG	(Chen, 2011) (Wang and Bachrach, 2002) (Ahn et al., 1999)
kardiovaskulární	katechiny	(Mukamal et al., 2006) (Arts et al., 2001) (Wolfram., 2007)
snížení LDL	TF	(Davies et al., 2003)
dlouhověkost	katechiny	(Lopez et al., 2014)
proti zubnímu kazu	složení čaje oolong	(Subramaniam et al., 2012)
antidiabetický	EC	(Murase et al., 2002)
redukce hmotnosti	EGCG	(Kao et al., 2006)
antivirotikum	GCG	(Song et al., 2005)
antioxidační	TF3,EGCG, ECG	(Hirai et al., 2007)

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Materiál

Mikrobiální kmeny *Lactobacillus casei* FMP a *Lactobacillus gasseri* R, buněčné kultury Caco-2 (kolorektální adenokarcinom) a HT29-MTX (mucin produkující buněčná linie), Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM), penicilin, streptomycin, hydrogenuhličitán sodný, pyruvát sodný, neesenciální aminokyseliny, fetální bovinní sérum (FBS), fosfátový pufr (PBS), Rogosa agar, trypsin, Triton X - 100, dimetylsulfoxid (DMSO), destilovaná voda, čajové sáčky s čajovou směsí Earl Grey od firmy Teekanne, Ahmad Tea a Dilmah, čajové sáčky s čajovou směsí nazvanou Green tea od firmy Teekanne a Pure Green od firem Ahmad Tea a Dilmah. Média a činidla byla zakoupena od firem Sigma - Aldrich (Praha, CZ) a Oxoid Ltd. (Basingstoke, UK).

Laboratorní plasty a sklo pro tkáňové kultury (24jamkové destičky, serologické pipety, kultivační láhve, Petriho misky) a pro čajové extrakty (kádinky, titrační baňky, pipeta) byly získány z Merci (Brno, CZ) a Schoeller Pharma (Praha, CZ).

### 4.2 Metody

#### 4.2.1 Příprava bakteriálních kmenů a suspenze

Kmen *Lactobacillus casei* FMP byl izolován z komerčního probiotického mléčného výrobku; kmen *Lactobacillus gasseri* R byl izolován ze vzorku stolice plně kojeného jednoměsíčního dítěte.

Oba kmeny laktobacilů byly izolovány pomocí Rogosa agaru (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) po 72 hodinách mikroaerofilní kultivace při 37°C. Kmeny byly identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie za použití systému MALDI BioTyper (TM) (Bruker Daltonik, DE) podle metodiky Kmet a Drugdova (2012). Tyto kmeny byly dále charakterizovány pomocí biochemického testu API 50CHL (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francie) a jejich autoagregační vlastnosti byly stanoveny podle Reniero et al. (1992) a Vlkova et al. (2008).

Před vlastním experimentem byly bakterie nakultivovány za anaerobních podmínek na Man, Rogosa a Sharpe (MRS) živné půdě při teplotě 37°C po dobu 24 h. Nakultivované kmeny laktobacilů byly 2krát promyty v PBS a odstředěny (2000 × g; 10 min). Bakteriální suspenze byla následně naředěna v PBS na konečnou koncentraci 2 x 10<sup>8</sup> KTJ/ml na základě

spektrofotometrického měření optické hustoty při 420 nm (Infinite M200; Tecan, Austria GmbH, Grödig, AT).

#### 4.2.2 Kultivace buněčných kultur

Lidská kolorektální buněčná linie Caco-2 byla získána z American Type Tissue Collection (Rockville, Maryland, USA); buněčná linie produkující mucin HT29-MTX-E12 byla zakoupena od Sigma-Aldrich (Praha, CZ). Obě buněčné linie byly použity pro hodnocení schopnosti adheze dvou různých bakteriálních kmenů v přítomnosti nebo nepřítomnosti šesti různých čajových extraktů. Buněčné linie byly kultivovány v Dulbecco modifikovaném Eagle médiu (DMEM) obohaceném o 20 % fetálního bovinního séra (FBS), 1 % neesenciálních aminokyselin, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu a inkubovány při 37°C v 5% (v/v) CO<sub>2</sub> atmosféře a 95% vzduchu. Médium bylo měněno každé dva dny, a buňky byly subkultivovány při 80% nárůstu každý týden (Jensen et al., 2012; Bustos et al., 2012).

#### 4.2.3 Založení 24jamkové destičky

Z rozpuštěné suspenze byla aplikována jedna kapka na Bürkerovu komůrku a byl spočítán obsah buněk v 1 ml suspenze. Pomocí výpočtu byla zjištěna přesná koncentrace sklizených buněk. Směsná kultura Caco-2 a HT29-MTX byla naočkována do 24jamkových kultivačních destiček v objemu 1 ml na jamku o koncentraci  $3,6 \times 10^4$  Caco-2 a  $0,4 \times 10^4$  HT29-MTX a kultivována při teplotě 37°C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře a 95% vzduchu. Kultivační médium bylo měněno každé dva dny. Směsná kultura byla kultivována do plné diferenciaci mikrokulturních po dobu  $14 \pm 1$  dní.

#### 4.2.4 Příprava čajových katechinů

Pro stanovení čajových katechinů byl zvolen zelený a černý čaj od tří různých výrobců (tab. 5). Z důvodu stanovení rozdílnosti v obsahu čajových katechinů mezi výrobci, byl vybrán vždy jeden druh od zeleného a černého čaje. Černé čaje byly zastoupeny čajovou směsí s příchutí bergamotu: Earl Grey. Zelené čaje představovala čajová směs s názvem Pure Green od značek Ahmad a Dilmah, od značky Teekanne nesl čaj název Green tea. Všechny zvolené čaje byly sáčekové, přičemž každý sáček obsahoval cca 2 g čajové směsi.

V kádince s vroucí destilovanou vodou byl ponechán louhovat 3 minuty sáček s čajem a poté byl vyjmut z roztoku. Čajový roztok byl poté kvalitativně pomocí destilované vody

převeden do titrační baňky o přesně stanovené hmotnosti. Roztok byl odpařen na vakuové rotační odparce. Na stěnách baňky zůstal odpařený extrakt. Extrakt s baňkou se zvážil a byla stanovena hmotnost samotného extraktu. Poté byl extrakt rozpuštěn v poměru 1:50 v DMSO. Aby byly čajové katechiny snadněji převedeny do roztoku, byla použita ultrazvuková čistička. Naředěné roztoky o koncentraci 50 mg/ml pro jednotlivé čaje byly převedeny do 15 ml polypropylenových zkumavek a zamrazeny na teplotu -18°C pro další experimenty.

Tab. 5 Přehled šesti druhů použitých čajů.

Označení	Komerční název	Výrobce
DEG I.	Earl Grey	Dilmah
DPG II.	Pure Green	
AEG III.	Earl Grey	Ahmad Tea
APG IV.	Pure Green	
TEG V.	Earl Grey	Teekanne
TGr VI.	Green tea	

#### 4.2.5 Stanovení adhezivních vlastností

Test adheze byl proveden podle metodiky popsané ve studii Jensen et al. (2012), s malými změnami. Před testem adherence byly buněčné vrstvy v 24jamkových destičkách třikrát promyty pomocí PBS a k takto promýtvým monovrstvám byla přidána bakteriální suspenze v objemu 100 µl. Poté bylo přidáno 100 µl šesti různých zředěných čajových extraktů v konečné koncentraci 20 µg/ml. Poměr bakteriální suspenze/čajového extraktu byl 10:1(bakterie/eukaryotických buněk). Do kontrolních jamek bylo přidáno 100 µl PBS namísto čajových extraktů. Následně byly destičky inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě 37°C a 5% CO<sub>2</sub>.

Po inkubaci byly vrstvy s buňkami třikrát jemně promyty pomocí PBS, aby se odstranili neadherované bakterie. Nakonec byly vrstvy buněk trypsinizovány přidáním 300 µl 1% Triton-X100 (Sigma-Aldrich, Praha, CZ) po dobu 3 minut s následným přidáním 700 µl PBS. Suspenze s životaschopnými bakteriemi byly přeneseny do mikrozkušavek, zředěny a napipetovány na MRS agar na Petriho miskách. Počty bakterií byly stanoveny po 48 hodinách inkubace při teplotě 37°C v aerobním prostředí a vyjádřeny jako procento bakterií



adherovaných ve srovnání s celkovým počtem přidanych bakterií. Všechny experimenty byly provedeny ve třech opakováních.

#### 4.2.6 Statistická analýza

Všechny statistické analýzy byly provedeny ve třikrát nezávislých měřeních se 3 technickými opakováními (n=3). Vzorky byly otestovány testem normality (Shapiro-Wilk), následné rozdíly mezi průměrnými hodnotami byly analyzovány jednocestnou ANOVA analýzou s post-hoc Bonferroniho testem ( $P < 0,05$ ). Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru GraphPad Prism verze 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly prezentovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD).

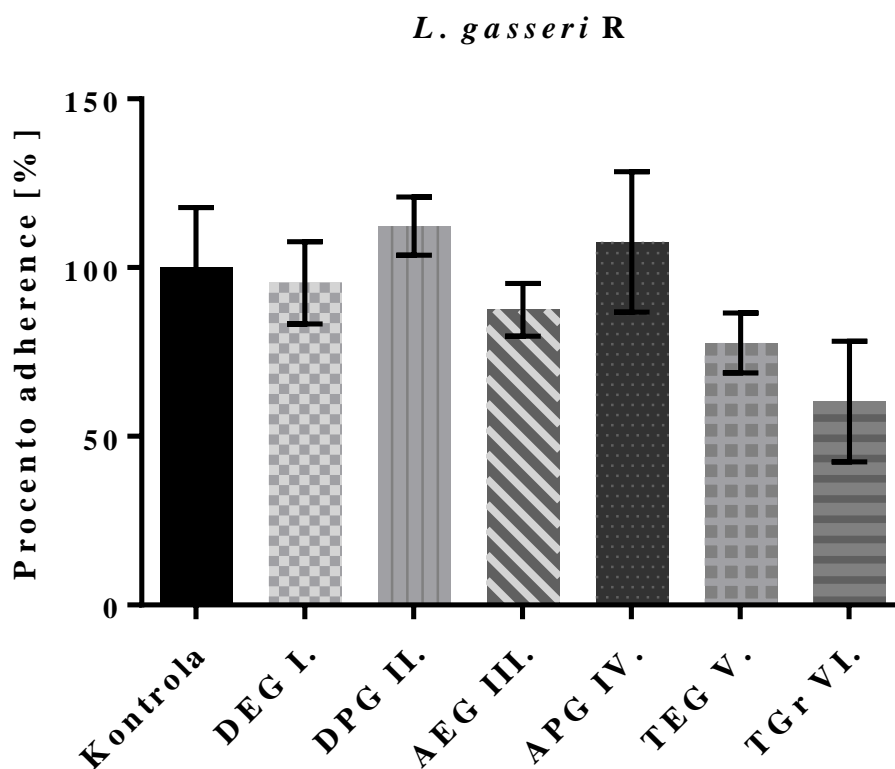
## 5 Výsledky

Cílem práce bylo zhodnotit schopnost adherence dvou potencionálních probiotických kmenů laktobacilů (*Lactobacillus gasseri* R a *Lactobacillus casei* FMP) na směsné ko-kultuře Caco-2/HT29-MTX, která představovala *in vitro* buněčný model střevního epitelu, v přítomnosti zeleného a černého čaje z produkce různých výrobců. K samotnému experimentu byly použity tři druhy černých čajů a tři druhy zelených čajů, a to následující: černý Dilmah Earl grey (DEG I.), Ahmad Earl grey (AEG III.) a Teekanne Earl grey (TEG V.); zelený Dilmah Pure green (DPG II.), Ahmad Pure green (APG IV.) a Teekanne Green (TGr VI.). Jako kontrola byl vzorek bez přídavku extraktu s čajovými katechiny.

Z výsledků v tabulce 6 je patrné, že po aplikaci extraktu čajových katechinů o koncentraci 20 µg/ml se zvýšila adherence oproti kontrolnímu vzorku pouze u bakteriálního kmene *L. gasseri* R a to jen v případě přídavku extraktu zeleného čaje od dvou výrobců Dilmah a Ahmed. U výrobce zeleného čaje Teekanne byla naopak adheze bakteriálního kmene *L. gasseri* R zcela nejnižší. V případě použití černých čajů byla u bakteriálního kmene *L. gasseri* R naměřena nižší adherence oproti kontrolnímu vzorku u všech výrobců. Detailně jsou zobrazeny účinky jednotlivých extraktů čajových katechinů na grafu XX, z něhož je patrné, že nejnižší hodnota adherence byla zjištěna u vzorku TGr VI. (Teekanne) u bakteriálního kmene *L. gasseri* R.

Tab. 6 Adherence kmene *Lactobacillus gasseri* R na směsné ko-kultuře Caco-2/HT29-MTX po přídavku čajových extraktů vyjádřená v procentech vztažená ke kontrolnímu vzorku.

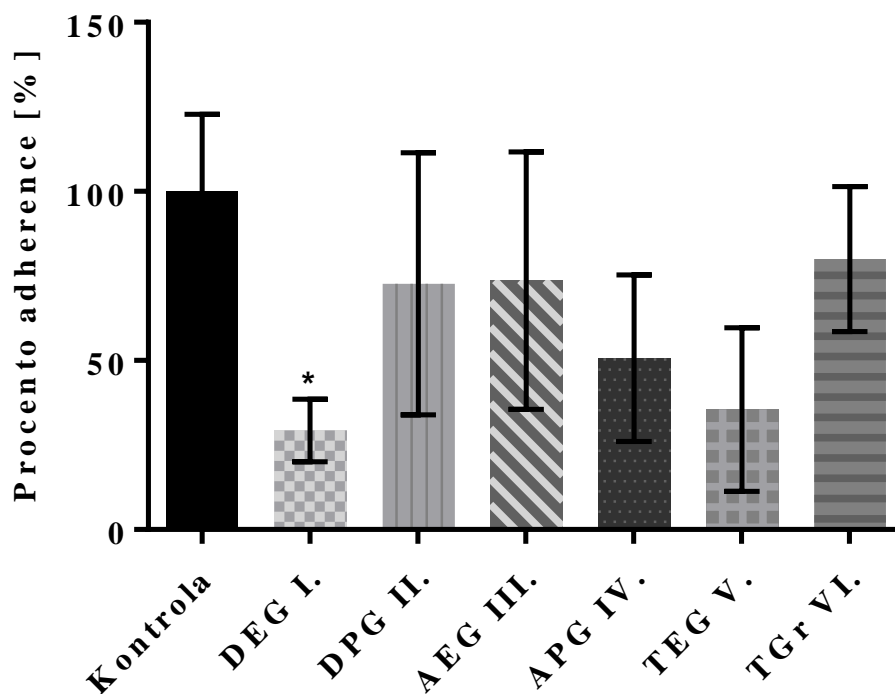
Vzorek	Adherence [%]
Kontrola	100,0
DEG I.	96,0
DPG II.	113,2
AEG III.	88,6
APG IV.	108,0
TEG V.	75,3
TGr VI.	55,9



Graf 1 Adherence bakteriálního kmene *L. gasseri* R na ko-kultuře Caco-2 a HT29-MTX buněčných linií po přidavku šesti čajových extraktů v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$ . Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD (směrodatná odchylka).

U bakteriálního kmene *L. casei* FMP bylo při stejných koncentracích (20  $\mu\text{g/ml}$ ) extraktů čajových katechinů pozorováno, že jednotlivé adherence po přidání každého extraktu byly nižší než u kontrolního vzorku (graf 2). Zajímavé je, že zatímco měl vzorek TGr VI. nejhorší adherenci ze všech testovaných čajů u kmene *L. gasseri* R, u kmene *L. casei* FMP se tento extrakt jevil jako nejefektivnější. Hodnoty účinku jednotlivých extraktů čajů jsou zobrazeny v tabulce 7.

*L. casei* F M P



Graf 2 Vliv přidavku šesti různých čajových extraktů (koncentrace 20 µg/ml) na adhezi bakteriálního kmene *Lactobacillus casei* FMP na směsné kultuře Caco-2/HT29-MTX. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD (směrodatná odchylka). \* statisticky významná hodnota na hladině významnosti  $P < 0,05$

Tab. 7 : Adherence kmene *Lactobacillus casei* FMP na směsné ko-kultuře Caco-2/HT29-MTX po přidavku čajových extraktů vyjádřená v procentech vztážená ke kontrolnímu vzorku.

Vzorek	Adherence [%]
Kontrola	100,0
DEG I.	46,8
DPG II.	57,2
AEG III.	63,8
APG IV.	49,7
TEG V.	48,1
TGr .	69,1

## 6 Diskuze

Při testování potencionálních probiotických kmenů *Lactobacillus gasseri* R a *Lactobacillus casei* FMP v buněčném modelu intestinálního epitelu na směsné ko-kultuře Caco-2/HT29-MTX *in vitro* byl zjišťován vliv čajových extraktů ze zeleného a černého čaje na adhezenční vlastnosti.

Model střevního epitelu buněčných kultur Caco-2 byl vybrán, jelikož vytváří homogenní vrstvu buněk podobnou enterocytům střevního epitelu. V případě buněčné linie HT29-MTX z důvodu produkce hlenu tzv. mucinu zastupujícího pohárkové buňky. Tyto dvě buněčné linie použité v poměru 9:1 (Caco2:HT29-MTX) nejlépe napodobují vlastnosti zralých střevních buněk, proto slouží jako cenné *in vitro* nástroje pro studia týkající se střevního buněčného modelu (Pontier et al., 2001; Walter et al., 1996). Je velmi obtížné interpretovat výsledky *in vitro* v podmínkách *in vivo*, jelikož v tomto prostředí figurují další faktory, které ovlivňují veškeré dění v prostředí gastrointestinálního traktu, např. komunikace na molekulární úrovni, hostitelské odezvy, stávající mikrobiota. Všechny tyto vlastnosti mají vliv na adheenci mikroorganismů (Bustos et al., 2012). Nicméně experimenty *in vitro* napomáhají k pochopení dějů, probíhajících ve velmi složitém a propracovaném prostředí gastrointestinálního traktu.

Z výsledků vyplývá, že větší schopnost pozitivně ovlivnit adheenci měli zelené čaje oproti čajům černým. Nejvyšší vliv na adheenci bakteriálního kmene *Lactobacillus gasseri* R byla zjištěna u zeleného čaje značky Dilmah a na adheenci kmene *Lactobacillus casei* FMP měly čajové extrakty ze zeleného čaje firmy Teekanne.

Polyfenoly obsažené ve stravě jsou absorbovány v gastrointestinálním traktu, a tak mohou být metabolizovány střevní mikrobiotou a vyvolat fyziologické účinky. Čajové fenolové sloučeniny a to hlavně epikatechin, katechin, 3-O-methyl kyseliny gallové a kyseliny kávové byly metabolizovány bakteriemi na aromatické sloučeniny, které byly nalezeny ve fekálním vzorku. Různé kmeny střevních bakterií vykazovali odlišnou senzitivitu růstu v přítomnosti fenolických látek a jejich metabolitů. Růst některých patogenních bakterií, jako je *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* a *Bacteroides* spp. byl čajovými fenolickými látkami významně inhibován, přičemž komensální anaeroby, jako je *Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp. a probiotika, jako je *Lactobacillus* sp., nebyly tolik ovlivněny. Obecně platí, že gramnegativní bakterie jsou odolnější vůči polyfenolům než grampozitivním bakteriím (Díaz-Gómez et al., 2014). Z čehož vyplývá, že čajové katechiny mají významný vliv na střevní

mikrobiotu. Studie dle Lee et al. (2009) poskytla důkaz o důležitosti probiotických organismů a fenolických látek na lidské zdraví a to především v boji proti nemocem.

Samotný EGCG snížil růst *Escherichia coli* o 50 %, bohužel ale čajový extrakt takto účinný v inhibici *Escherichia coli* nebyl. Tato skutečnost je spjatá s přítomností kyseliny gallové. Studie dokázali, že kyselina gallová vykazovala inhibiční účinek proti *E. coli* a *Helicobacter pylori* (Díaz-Gómez et al., 2013; Díaz-Gómez et al., 2014).

Dle studií, které posuzují možné vlivy polyfenolových sloučenin na probiotický bakteriální kmen *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534, byl tento kmen tolerantnější k modifikacím s kyselinou gallovou a katechinem. Takto upravené buňky přežívaly ve vyšších hodnotách pH a při vyšších koncentracích oxgallu. Data také ukazují, že takto upravené buňky výrazně inhibují růst *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* a bakterie *Listeria monocytogenes*. Kmen *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 použitý v mléčných výrobcích může představovat spouštěč probiotických mikroorganismů. Některé z nich pak mohou produkovat látky s antimikrobiálními účinky, jiné mohou soutěžit s patogeny o živiny či vazební místa na střevním epitelu nebo mohou ovlivňovat imunitní systém (Khalil, 2010).

Zánětlivá onemocnění střevního traktu se projevují těžkými průjmy, zvracením a bolestmi břicha. Tyto příznaky jsou reakcí imunitního systému na některé patogenní bakterie v zažívacím traktu. V rámci projektu PROEUHEALTH bylo prokázáno, že některá probiotika, v tomto případě specifické kmeny *Lactococcus* a *Lactobacillus* mohou chránit před záněty střev. Bakterie *Helicobacter pylori* mohou u lidí vyvolávat gastritidy, žaludeční vředy a v nejhorších případech i rakovinu žaludku, zatímco *Escherichia coli* a *Salmonella triphimurium* jsou příčinou infekčních průjmů (Goktepe et al., 2005).

Pomocí polyfenolových oxidás se katechinové jádro přemění na chinon a poté se kondenzací vytvářejí theaflaviny, thearubiny, theasinensis a bisflavanoly. Konkrétněji dimerizací polyfenolů vznikají theaflaviny cca 2-6 % ze sušiny a polymerizací se vytvoří thearubiny v množství 15-20 % (Ho et al., 2008).

U polysacharidů obsažených v zeleném čaji *Camellia sinensis* byla pozorována antiadhesivní aktivita proti patogenům *Helicobacter pylori*, *Propionibacterium acnes* a *Staphylococcus aureus* u lidských a myších buněčných linií. Extrakt ze zeleného čaje se skládal především ze sacharidů, které obsahují 40 % kyseliny uronové, avšak nedostatek katechinů. Naopak extrakt CSI-4 nevykazoval žádné inhibiční účinky proti *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Escherichia coli* nebo *Staphylococcus epidermis*. Z výsledků dané

studie vyplynulo, že extrakt ze zeleného čaje může selektivně působit na patogeny antiadhesivně bez nepříznivých účinků na prospěšné a symbiotické bakterie (Lee et al., 2009).

Polyfenoly interagují s mikrobiálními membránovými proteiny, enzymy a lipidy. Tato interakce mění buněčnou permeabilitu. Rostlinné polyfenoly narušují tvorbu biofilmu, a tím zamezují adhezi patogenních mikroorganismů. Neschopnost adherovat na buněčnou tkáň znemožní vzniku infekčním onemocněním (Parkar et al., 2008). Působení polyfenolů, konkrétně flavan-3-olů, na adherenci probiotických kmenů laktobacilů ke střevním buňkám bylo také objasněno ve studii Bustos et al. (2002), ve které poukazují na potenciál flava-3-olů modifikovat složení střevní mikrobioty adherencí laktobacilů ke střevním buňkám.

Dle Arcimovičové (1998) zelený čaj obsahuje až o 90 % více polyfenolů než čaj černý, a proto nejsou účinky černého čaje tak výrazné. Theaflaviny v černém čaji jsou charakteristické tím, že obsahují theaflavin (TF1), theaflavin-3-gallát (TF-2A), theaflavin-3'-gallát (TF-2B) a theaflavin-3,3'-digallát (TF3). Jejich množství bylo zjištěno následovně 0,08 %, 0,34 %, 0,11 % a 1,5 % (Ho et al., 2008).

Co se týče antioxidačních účinků je účinnost jednotlivých katechinů seřazena od největšího po nejmenší následovně: TF3>ECG>EGCG>TF-2B>TF-2A>TF1>EC>EGC. Tato hypotéza je založena na pozorování gallátové skupiny TF3, která vykazuje lepší výsledky než TF-2A a TF-2B a ty mají lepší výsledky než TF1. Analogicky s tímto pozorováním byly EC a EGC méně efektivními inhibitory než EGCG a ECG, proto je gallátová skupina hlavním účastníkem v antioxidačních aktivitách (Ho et al., 2008).

Čajové extrakty působí také antimikrobiálně na *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni* a *Listeria monocytogenes*. Další mikrobiální účinky byly prokázány na klostridie a *Helicobacter pylori*. U bakterií *L. acidophilus* CECT 930, *L. acidophilus* ATCC 4356 či bakterie z rodu *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacter* a *Salmonella* nebyl v této studii antimikrobiální účinek prokázán (Chung et al., 1998). Tento antimikrobiální efekt nebyl prokázán ani u některých střevních bakterií mléčného kvašení (Gramza and Korczak, 2005). Naopak v přítomnosti katechinu se stimuloval růst *Lactobacillus acidophilus* CECT 903 a zvýšila se i biomasa *Lactobacillus hilgardii* (Almajano et al., 2008).

Epigallocatechin gallát (EGCG) inhiboval produkci exopolysacharidů, které jsou součástí biofilmu, na kterém adherují bakterie. Studie dle Zhu et al. (2015) naznačuje, že by se extrakt ze zeleného čaje mohl používat i jako konzervační prostředek. Ve studii Asahi et al. (2014) bylo zjištěno, že polyfenoly ze zeleného čaje, zejména (-)-epigallocatechin gallát (EGCG), který je v zeleném čaji majoritně zastoupený, kompletně inhibuje růst a přilnavost

*Porphyromonas gingivalis* na buňky lidského lícního epitelu při koncentracích 250 až 500 ug/ml. Vysoce účinné byly především ECG a EGC, menší účinek byl zaznamenán u C, EC, GC a EGC. Tato skutečnost je připisována přítomnosti galloyl skupině, která je na katechin navázána v poloze 3-OH.



## 7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zjištění vlivu čajových katechinů extrahovaných z černého a zeleného čaje na adhezní vlastnosti vybraných laktobacilů v *in vitro* modelu trávicího traktu na Caco-2 a HT29-MTX buněčných liniích. Výchozí hypotéza byla, že některé frakce čajových katechinů zvyšují schopnost probiotik adherovat na střevní stěnu. Tato hypotéza se potvrdila jen z části, jelikož ovlivnění adherence na střevní stěnu záviselo na druhu a původu jednotlivého čaje. Výsledky také ukazují, že v jednotlivých použitých bakteriálních kmenech byla značná variabilita. Bylo by tedy zajímavé rozšířit testování na více kmenů, nejen probiotických, ale i patogenních a s tím spojené rozšíření spektra testovaných druhů čajů. Z výsledků vyplývá, že rozdíly ve vlivu na jednotlivé kmeny se značně lišili dle druhu i výrobce čaje.

Tím, že byly testy prováděny *in vitro* a ne *in vivo* mohou být údaje od skutečného vlivu na lidský organismus zkrácené. Nicméně z mnoha studií, které jsou k dispozici, vyplývá, že čaj má pozitivní vliv na zdraví člověka a jeho mikrobiotu.

## 8 Seznam použité literatury

- Ahn, H.-Y., et al. Epigallocatechin-3 Gallate Selectively Inhibits the PDGF-BB-induced Intracellular Signaling Transduction Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells and Inhibits Transformation of si-transfected NIH 3T3 Fibroblasts and Human Glioblastoma Cells (A172). *Molecular Biology of the Cell*, 1999, 10.4: 1093-1104.
- Almajano, M. P., Carbó, R., Jiménez, J. A. L., Gordon, M. H. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108, 55-63.
- Arcimovičová, J. 1998. *Vůně čaje*, Start, Benešov. ISBN: 80-86231-10-0.
- Aronsson, L., Huang, Y., Parini, P., Korach-Andre, M., Hakansson, J., Gustafsson, J. A., Pettersson, S., Arulampalam, V., Rafter, J. 2010. Decreased Fat Storage by *Lactobacillus Paracasei* Is Associated with Increased Levels of Angiopoietin-Like 4 Protein (ANGPTL4). *Plos One*, 5.
- Arts, I. CW, et al. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, 74.2: 227-232.
- Artursson, P., Karlsson, J. 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 175, 880-5.
- Asahi, Y., Noiri, Y., Miura, J., Maezono, H., Yamaguchi, M., Yamamoto, R., Azakami, H., Hayashi, M., Ebisu, S. 2014. Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 1164-1171.
- Augustín, J. 2001. *Povídání o čaji*, Fontána. ISBN: 80-86179-75-3.
- Bezkorovainy, A. 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr*, 73, 399s-405s.
- Bianchi, M. A., Del Rio, D., Pellegrini, N., Sansebastiano, G., Neviani, E., Brighenti, F. 2004. A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Lett Appl Microbiol*, 39, 301-5.
- Blum, S., Reniero, R., Schiffrin, E. J., Crittenden, R., Mattila-Sandholm, T., Ouwehand, A. C., Salminen, S., Von Wright, A., Saarela, M., Saxelin, M., Collins, K., Morelli, L. 1999. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 405-410.
- Bustos, I., García-Cayuela, T., Hernández-Ledesma, B., Peláez, C., Requena, T., Martínez-Cuesta, C. 2012. Effect of flavan-3-ols on the adhesion of potential probiotic lactobacilli to intestinal cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(36), 9082-9088.

Canzi, E., Gueglielmetti, S., Mora, D., Tamagnini, I., Parini, C. Conditions affecting cell surface properties of human intestinal bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88, 207-219.

Cellular Adhesion and Tissue Architecture. A comprehensive approach to Life Science. Tokyo. 2011[online].[cit. 2016-03-19]. Dostupné z <[http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/inactive/11\\_06.html](http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/inactive/11_06.html)>

Cerca, N., Pier, G. B., Vilanova, M., Oliveira, R., Azeredo, J. 2005. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Research in Microbiology*, 156, 506-514.

Davies, M. J., Judd, J. T., Baer, D. J., Clevidence, B. A., Paul, D. R., Edwards, A. J., Chen, S. C. 2003. Black tea consumption reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolemic adults. *The Journal of nutrition*, 133(10), 3298S-3302S.

Delgado, S., Suarez, A., Mayo, B. 2006. Identification of dominant bacteria in feces and colonic mucosa from healthy Spanish adults by culturing and by 16S rDNA sequence analysis. *Dig Dis Sci*, 51, 744-51.

Díaz-Gómez, R., et al. Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori*. *LWT-Food Science and Technology*, 2013, 54.2: 331-335.

Díaz-Gómez, R., et al. Combined effect of gallic acid and catechin against *Escherichia coli*. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 59.2: 896-900.

Donlan, R. M., Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15, 167-93.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., Collins, J. K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr*, 73, 386s-392s.

Dunne, W. M., JR. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*, 15, 155-66.

Eiff, C., Jansen, B., Kohnen, W., Becker, K. 2012. Infections Associated with Medical Devices. *Drugs*, 65, 179-214.

Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M., Akkermans, A. D. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol*, 68, 219-26.

Ferenčík, M. 2005. Imunitní systém : informace pro každého, Grada, Praha. ISBN:80-89104-45-2.

Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., Forano, E. 2012. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, 3, 289-306.

- Fogh, J., Trempe, G. 1975. New Human Tumor Cell Lines. In: FOGH, J. (ed.) Human Tumor Cells in Vitro. Boston, MA: Springer US.
- Goktepe, I., Juneja, V. K., Ahmedna, M. (Eds.). 2005. Probiotics in food safety and human health. CRC Press.
- Gramza, A., Korczak, J. 2005. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 351-358.
- Grajek, W. O., Olejnik, A. 2004. Epithelial cell cultures in vitro as a model to study functional properties of food. *Pol J Food Nutr Sci*, 13, 5-24.
- Griffiths, E. A., Duffy, L. C., Schanbacher, F. L., Qiap, H., Dryja, D., Leavens, A., Rossman, J., Rich, G., Dirienzo, D., Ogra, P. L. 2004. In vivo effects of bifidobacteria and lactoferrin on gut endotoxin concentration and mucosal immunity in Balb/c mice. *Dig Dis Sci*, 49, 579-89.
- Gristina, A. G. 1994. Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. *Clinical Orthopaedics And Related Research*, 106-118.
- Hayashi, H., Sakamoto, M., Benno, Y. 2002. Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. *Microbiology and Immunology*, 46, 819-831.
- He, F., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Hashimoto, H., Benno, Y., Salminen, S. 2001. Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 30, 43-47.
- Hirai, M., Hotta, Y., Ishikawa, N., Wakida, Y., Fukuzawa, Y., Isobe, F., Kawamura, N. 2007. Protective effects of EGCG or GCg, a green tea catechin epimer, against postischemic myocardial dysfunction in guinea-pig hearts. *Life sciences*, 80(11), 1020-1032.
- Ho, C.-T., Simon, J. E., Shanidi, F., Yu, S. 2008. Dietary supplements, American Chemical Society, Washington. ISBN 978-0-8412-3992-0.
- Chen, D., et al. EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. *Advances in clinical chemistry*, 2011, 53: 155.
- Chen, J., He, X., Huang, J. 2014. Diet Effects in Gut Microbiome and Obesity. *Journal of Food Science*, 79, R442-R451.
- Chow, K. B. 1998. Všechny čaje Číny, Dharmagaia, Praha. ISBN 80-85905-54-X.
- Chung, K. T., Lu, Z., Chou, M. W. (1998). Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 36(12), 1053-1060.

- Gusils, C., Cuozzo, S., Sesma, F., Gonzalez, S. 2002. Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. *Canadian journal of microbiology*, 48(1), 34-42.
- Izquierdo, E., Medina, M., Ennahar, S., Marchioni, E., Sanz, Y. 2008. Resistance to Simulated Gastrointestinal Conditions and Adhesion to Mucus as Probiotic Criteria for *Bifidobacterium longum* Strains. *Current Microbiology*, 56, 613-618.
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., Axelsson, L. 2012. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 153, 216-22.
- Kao, Y. H., Chang, H. H., Lee, M. J., Chen, C. L. 2006. Tea, obesity, and diabetes. *Molecular nutrition & food research*, 50(2), 188-210
- Khalil, R. K. 2010. Influence of gallic acid and catechin polyphenols on probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(11), 2069-2079.
- Kittnar, O. 2011. *Lékařská fyziologie*, Grada, Praha. ISBN: 9788024730684
- Kleessen, B., Schwarz, S., Boehm, A., Fuhrmann, H., Richter, A., Henle, T., Krueger, M. 2007. Jerusalem artichoke and chicory inulin in bakery products affect faecal microbiota of healthy volunteers. *British Journal of Nutrition*, 98, 540-549.
- Kmet, V., Drugdova, Z. 2012. Antimicrobial susceptibility of microflora from ovine cheese. *Folia Microbiologica*, 57, 291-293.
- Laparra, J. M., Sanz, Y. 2009. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology*, 49(6), 695-701.
- Lee, J. H., Shim, J. S., Cchung, M. S., Lim, S. T., Kim, K. H. 2009. In vitro anti-adhesive activity of green tea extract against pathogen adhesion. *Phytotherapy Research*, 23(4), 460-466.
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., Zweibaum, A. 1990. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res*, 50, 6334-43.
- Leteurtre, E., Gouyer, V., Rousseau, K., Moreau, O., Barbat, A., Swallow, D., Huet, G., Lesuffleur, T. 2004. Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate. *Biology of the Cell*, 96, 145-151.
- Li, X. J., Yue, L. Y., Guan, X. F., Qiao, S. Y. 2008. The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1082-1091.

- Lindsay, D., Holy, A. 2006. What food safety professionals should know about bacterial biofilms. *British Food Journal*, 108, 27-37.
- Lopez, T., Schriener, S. E., Okoro, M., Lu, D., Chiang, B. T., Huey, J., Jafari, M. 2014. Green tea polyphenols extend the lifespan of male drosophila melanogaster while impairing reproductive fitness. *Journal of medicinal food*, 17(12), 1314-1321.
- Lupp, C., Finlay, B. B. 2005. Intestinal microbiota. *Current Biology*, 15, R235-R236.
- Marek, J. 2010. *Farmakoterapie vnitřních nemocí - 4. zcela přepracované a doplněné vydání*, Grada. ISBN: 978-80-247-2639-7.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimaraes, V., Sokol, H., Dore, J., Corthier, G., Furet, J. P. 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*, 9, 123.
- Marques, T. M., Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Ryan, C. A., Stanton, C. 2010. Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 149-156.
- Marshall, K. C., Stout, R., Mitchell, R. 1971. Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. *Microbiology*, 68, 337-348.
- Mazánková, D., Kotásková 2011. Probiotika z pohledu praktického lékaře -- kmeny bakterií používané jako probiotika, jejich účinek, bezpečnost a dávkování. Probiotics from the view of general practitioner -- bacteria species used as a probiotics, their effect, safety and dosage., 91, 586-589.
- McCartney, A. L., Wenzhi, W., Tannock, G. W. 1996. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4608-4613.
- Million, M., Angelakis, E., Paul, M., Armougom, F., Leibovici, L., Raoult, D. 2012. Comparative meta-analysis of the effect of Lactobacillus species on weight gain in humans and animals. *Microbial Pathogenesis*, 53, 100-108.
- Mitscher, L. A., Toews, V. D. 2006. *Kniha o zeleném čaji: čínský pramen mládí : jak pomocí zeleného čaje předcházet rakovině a zpomalovat stárnutí*, ZEMS. ISBN: 80-7205-892-4.
- Mueller, S., Saunier, K., Hanish, C., Norin, E., Alm L., Midtvedt, T., Cresci, A., Silvi, S., Orpianesi, C., Verdenelli, M. C., Clavel, T., Koebnick, C., Zunft, H. J., Dore, J., Blaut, M. 2006. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol*, 72, 1027-33.
- Mukamal, K., J., et al. Tea consumption and infarct-related ventricular arrhythmias: the determinants of myocardial infarction onset study. *Journal of the American College of Nutrition*, 2006, 25.6: 472-479.

- Murase, T., Nagasawa, A., Suzuki, J., Hase, T., Tokimitsu, I. 2002. Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders*, 26(11).
- Nam, Y. D., Jung, M. J., Roh, S. W., Kim, M. S., Bae, J. W. 2011. Comparative Analysis of Korean Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *Plos One*, 6, 15.
- Neu, T. R. 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol Rev*, 60, 151-66.
- O'Hara, A. M., Shanahan, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7, 688-693.
- O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P., Hill, C. 2012. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 152, 189-205.
- O'Toole, P. W., Claesson, M. J. 2010. Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal*, 20, 281-291.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., Salminen, S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9, 43-52.
- Parkar, S. G., Stevenson, D. E., Skinner, M. A. 2008. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International journal of food microbiology*, 124(3), 295-298.
- Parracho, H., McCartney, A. L., Gibson, G. R. 2007. Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66, 405-411.
- Pontier, C., Pachot, J., Botham, R., Lenfant, B., Arnaud, P. 2001. HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. *J Pharm Sci*, 90, 1608-19.
- Power, S. E., O'Toole, P. W., Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. 2014. Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr*, 111, 387-402.
- Pyra, K. A., Saha, D. C., Reimer, R. A. 2012. Prebiotic Fiber Increases Hepatic Acetyl CoA Carboxylase Phosphorylation and Suppresses Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Secretion More Effectively When Used with Metformin in Obese Rats. *Journal of Nutrition*, 142, 213-220.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yimada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou Y., Li, Y.,

- Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S. D., Wang, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59-65.
- Ram, C., Chander, H. 2003. Optimization of culture conditions of probiotic bifidobacteria for maximal adhesion to hexadecane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 407-410.
- Reniero, R., Cocconcelli, P., Bottazzi, V., Morelli, L. 1992. High-frequency of conjugation in lactobacillus mediated by an aggregation-promoting factor. *Journal of General Microbiology*, 138, 763-768.
- Rice, A. R., Hamilton, M. A., Camper, A. K. 2014. Apparent Surface Associated Lag Time in Growth of Primary Biofilm Cells. *Microbial Ecology*, 40, 8-15.
- Rulík, M., Holá, V., Růžička, F., Votava, M. 2011. *Mikrobiální biofilmy*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc. ISBN 978-80-244-2747-8.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., Zucco, F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol*, 21, 1-26.
- Sanders, M. E. 2003. Probiotics: Considerations for human health. *Nutrition Reviews*, 61, 91-99.
- Saulnier, D. M., Spinler, J. K., Gibson, G. R., Versalovic, J. 2009. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Curr Opin Biotechnol*, 20, 135-41.
- Scott, K. P., Duncan, S. H., Flint, H. J. 2008. Dietary fibre and the gut microbiota. *Nutrition Bulletin*, 33, 201-211.
- Sharangi, A. B. 2009. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. *Food Research International*, 42, 529-535.
- Shen, J., Obin, M. S., Zhao, L. P. 2013. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Molecular Aspects of Medicine*, 34, 39-58.
- Silbernagl, S. 2004. *Atlas fyziologie člověka = [Orig.: Taschenatlas der Physiologie]*, Grada Publishing, Praha. ISBN: 9788024706306.
- Simons, K., Fuller, S. D. 1985. Cell surface polarity in epithelia. *Annu Rev Cell Biol*, 1, 243-88.
- Sommer, F., Backhed, F. 2013. The gut microbiota - masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 227-238.



- Song, J. M., Lee, K. H., Seong, B. L. 2005. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral research*, 68(2), 66-74.
- Spinler, J. K., Taweechoitapatr, M., Rognerud, C. L., Ou, C. N., Tumwasorn, S., Versalovic, J. 2008. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*, 14, 166-71.
- Subramaniam, P., Eswara, U., Reddy, K. M. 2012. Effect of different types of tea on *Streptococcus mutans*: an in vitro study. *Indian Journal of Dental Research*, 23(1), 43.
- Štšepetova, J., Sepp, E., Kolk, H., Loivukene, K., Songisepp, E., Mikelsaar, M. 2011. Diversity and metabolic impact of intestinal *Lactobacillus* species in healthy adults and the elderly. *Br J Nutr*, 105, 1235-44.
- Thomas, D. J., Kendall, M. J., Whitfield, A. G. 1974. Nervous system involvement in ankylosing spondylitis. *Br Med J*, 1, 148-50.
- Thompson, L. J., Gray, V., Lindsay, D., Von Holy, A. 2006. Carbon: nitrogen: phosphorus ratios influence biofilm formation by *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. *Journal of applied microbiology*, 101(5), 1105-1113.
- Tiihonen, K., Ouwehand, A. C., Rautonen, N. 2010. Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*, 9, 107-116.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., Salminen, S. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr*, 73, 393s-398s.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., Gordon, J. I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-484.
- Tyakht, A. V., Kostryukova, E. S., Popenko, A. S., Belenikin, M. S., Pavlenko, A. V., Larin, A. K., Karpova, I. Y., Sselezneva, O. V., Semashko, T. A., Ospanova, E. A., Babenko, V. V., Maev, I. V., Cheremushkin, S. V., Kucheryavyy, Y. A., Shcherbakov, P. L., Grinevich, V. B., Efimov, O. I., Sas, E. I., Abdulkhakov, R. A., Abdulkhakov, S. R., Lyalyukova, E. A., Livzan, M. A., Vlassov, V. V., Sagdeev, R. Z., Tsukanov, V. V., Osipeko, M. F., Kozlova, I. V., Tkachev, A. V., Sergienko, V. I., Alexeev, D. G., Govorun, V. M. 2013. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nature Communications*, 4.
- Valíček, P. 2002. *Užitkové rostliny tropů a subtropů*, Academia, PRAHA. ISBN: 80-200-0939-6.
- Velíšek, J. 2002. *Chemie potravin: 1*, OSSIS. ISBN, 978-80-86659-17-6.
- Vlková, E., Rada, V., Šmehilova, M., Killer, J. 2008. Auto-aggregation and Co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiologica*, 53, 263-269.

- Vodrážka, Z. 2007. Biochemie, Academia, Praha. ISBN: 978-80-200-0600-4.
- Wachendorf, V. V. 2007. Čaj, [Praha], Slovart. WALTER, E., et al. HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: In vitro–in vivo correlation with permeability data from rats and humans. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1996, 85.10: 1070-1076
- Walker, W. A., Duffy, L. C. 1998. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 9, 668-675.
- Wang, Y.-C., Bachrach, U. The specific anti-cancer activity of green tea (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Amino acids*, 2002, 22.2: 131-143.
- Wang, B., Wei, H., Yuan, J., Li, Q., Li, Y., Li, N., Li, J. 2008. Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells. *Curr Microbiol*, 57, 33-8.
- Wang, Z., Xiao, G., Yao, Y., Guo, S., Lu, K., Sheng, Z. 2006. The role of bifidobacteria in gut barrier function after thermal injury in rats. *J Trauma*, 61, 650-7.
- Wolfram, S. 2007. Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(4), 373S-388S.
- Zhu, J., Huang, X., Zhang, F., Feng, L., Li, J. 2015. Inhibition of quorum sensing, biofilm, and spoilage potential in *Shewanella baltica* by green tea polyphenols. *Journal of Microbiology*, 53, 829-836.
- Zimmer, J., Lange, B., Frick, J. S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwiertz, A., Rusch, K., Klosterhalfen, S., Enck, P. 2012. A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66, 53-60.

## 9 Seznam zkratek

AEG III	Ahmad Earl grey
APG IV	Ahmad Pure green
Angptl4	inhibitor lipoproteinové lipázy
C	katechin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
DEG I	Dilmah Earl grey
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPG II.	Dilmah Pure grey
ECM	extracelulární matrix
EGC	epigallokatechin
EC	epikatechin
EGCG	epigallokatechin-3-gallát
EGC	epikatechin-3-gallát
FBS	fetální bovinní sérum
GALT	gut - associated lymphoid tissue
GC	gallokatechin
IgA	imunoglobulin A
KTJ	kolonie tvořící jednotku
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MTX	metotrexát
MRS	Man, Rogosa, Sharpe živná půda
PBS	folátový pufr
PDGF	destičkový růstový faktor
R	rybí list
SD	směrodatná odchylka
T	vrcholový pupen
TEG V	Teekanne Earl grey
TF1	theaflaviny

TF - 2A	theaflavin-3-gallát
TF - 2B	theaflavin-3'-gallát
TF3	theaflavin-3,3'-digallát
TH1	subpopulace 1 T lymfocytu
TH2	subpopulace 2 T lymfocytu
TGr VI	Teekanne Green tea