

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Diplomová práce**

**Výběr a testování nových prebiotických  
substrátů pro bifidobakterie**

**Autor: Bc. Marie Makovská  
Obor: Výživa a potraviny (AMD)**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.**

© 2018 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Výběr a testování nových prebiotických substrátů pro bifidobakterie" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu použitých zdrojů na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. 4. 2018

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D. za veškerou pomoc a odborné vedení mé práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Nikol Modráčkové a RNDr. Václavu Tejneckému, Ph.D. za výpomoc s praktickou částí diplomové práce. Velký dík patří také celé Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky a Katedře pedologie a ochrany půd.

# Výběr a testování nových prebiotických substrátů pro bifidobakterie

## Abstrakt

Bifidobakterie jsou běžným probiotickým rodem bakterií, který se vyskytuje v gastrointestinálním traktu lidí i zvířat. Genomové analýzy prokázaly, že existuje adaptace kmenů na prostředí, ve kterém žijí, a schopnost využít substráty vyskytující se ve stravě hostitele. V diplomové práci jsem navázala na svou práci bakalářskou (Degradace komplexních karbohydrátů bifidobakteriemi; 2016) a pokračovala s testováním dalších substrátů, potenciálně vhodných pro rod *Bifidobacterium*. Cílem diplomové práce bylo ověřit využití těchto substrátů vybranými kmeny bifidobakterií. Bylo použito celkem 117 kmenů (60 druhů) bifidobakterií, které pocházely z různých ekologických nik a na základě původu (diety hostitele) byly předpokládány různé substrátové preference. Čisté kultury byly naočkovány do média obohaceného vždy o jeden ze 13 různých substrátů (bramborový škrob, celulózu, lignin, xylan, jablečný a citrusový pektin, arabinogalaktan, gumu z rohovníku, guarovou gumu, tragantovou gumu, arabskou gumu, xanthanovou gumu a karayaovou gumu) v koncentraci 2 g.l<sup>-1</sup>. Jako pozitivní kontrola bylo použito médium s glukózou a jako negativní kontrola čisté médium bez zdroje uhlíku. Média obsahovala bromkresolovou červeň jako pH indikátor. Pozitivní vzorek kultury, který dokázal daný substrát využít, se projevil změnou barvy, jelikož zde došlo ke tvorbě metabolitů a snížení pH. Vyhodnocením testů bylo zjištěno, že schopnost využít přírodní gumy a další testované substráty je druhově a kmenově specifická, a je častější u izolátů pocházejících z trávicího traktu hostitele s dietou bohatou na rostlinný materiál. Velmi dobrou schopnost využít gumu z rohovníku, guarovou gumu a částečně arabskou gumu měly izoláty z trávicího traktu mláďat přežvýkavců (telat a jehňat) a dále některých primátů. Kmeny lidského původu vykazovaly nízkou schopnost metabolizovat dané substráty. Zajímavé výsledky byly zaznamenány u některých kmenů pocházejících ze stolice afrických kojenců, které prokázaly schopnost využít arabinogalaktan a/nebo arabskou gumu. Na základě této práce a vzhledem k anaerobním potřebám rodu *Bifidobacterium* by mohly být některé ze substrátů využity jako prebiotické obalové materiály do lidských nebo zvířecích synbiotik.

**Klíčová slova:** Bifidobakterie, hostitel, komplexní sacharid, prebiotika, *in vitro* testování.

# The selection and testing of new prebiotic substrates for bifidobacteria

## Abstract

Bifidobacteria are a common probiotic genus of bacteria that occurs in the gastrointestinal tract of humans and animals. Genomic analyzes have shown that there is a strain adaptation to the environment in which they live and the ability to utilize substrates found in the host's diet. In my diploma thesis I followed up on my bachelor thesis (Degradation of Complex Carbohydrates by Bifidobacteria, 2016) and tested other substrates, potentially suitable for bifidobacteria. The aim of the diploma thesis was to verify the use of these substrates by selected bifidobacteria strains. A total of 117 strains (60 species) of bifidobacteria, which were derived from different ecological niches, were tested and different substrate preferences were assumed based on their origin (host diets). Pure cultures were inoculated into the medium enriched with one of 13 different substrates (potato starch, cellulose, lignin, xylan, apple and citrus pectin, arabinogalactan, locust bean gum, guar gum, tragacanth gum, gum arabic, xanthan gum and karaya gum) at a concentration of 2 g.l<sup>-1</sup>. As a positive control, glucose medium was used and as a negative control, carbon-free medium was used. The media contained bromocresol red as a pH indicator. A positive culture sample that has been able to use the substrate has manifested in a color change because of the formation of metabolites and a decrease in pH. The evaluation of the tests revealed that the ability to use natural gums and other substrates is species-specific and strain-specific, and it is more common in isolates from the host's with a diet rich in plant material. A very good ability to use locust bean gum, guar gum and arabic gum had isolates from the digestive tract of ruminant youngsters (calves and lambs) and some primates. Strains of human origin showed a low ability to metabolize the substrates. Interestingly, some strains of African infants demonstrated the ability to use arabinogalactan and/or gum arabic. Based on this work and the anaerobic needs of the *Bifidobacterium* genus, some substrates could be used in synbiotic products for human or animal nutrition, serving as prebiotic packaging materials.

**Keywords:** Bifidobacteria, host, complex carbohydrate, prebiotics, *in vitro* testing.

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíl práce a metodika .....</b>	<b>9</b>
2.1 Cíl práce .....	9
2.2 Metodika .....	9
<b>3 Teoretická východiska .....</b>	<b>10</b>
3.1 Bifidobakterie.....	10
3.1.1 Taxonomie .....	10
3.1.2 Historie a výskyt .....	10
3.1.3 Morfologie a fyziologie .....	11
3.1.4 Metabolismus a substrátové preference .....	12
3.1.5 Význam.....	15
3.1.6 Probiotika.....	16
3.1.7 Psychobiotika.....	17
3.2 Prebiotika .....	18
3.2.1 Oligosacharidy .....	20
3.2.2 Polysacharidy.....	22
3.3 Použité substráty .....	22
3.3.1 Glukóza .....	22
3.3.2 Bramborový škrob .....	23
3.3.3 Celulóza .....	25
3.3.4 Lignin.....	26
3.3.5 Xylan.....	27
3.3.6 Pektiny .....	28
3.3.7 Arabinogalaktan.....	29
3.3.8 Guma z rohovníku .....	30
3.3.9 Guarová guma.....	32
3.3.10 Tragantová guma .....	33
3.3.11 Arabská guma .....	34
3.3.12 Xantanová guma .....	34
3.3.13 Karayaová guma .....	36
<b>4 Vlastní práce .....</b>	<b>37</b>
4.1 Materiál a metody .....	37
4.2 Příprava bakteriálních kultur pro test .....	37
4.3 Příprava substrátů pro test.....	38
4.4 Využití substrátu kulturou.....	39
4.5 Měření metabolitů bifidobakterií .....	40

<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuse .....</b>	<b>41</b>
5.1	Výsledky .....	41
5.2	Diskuze.....	50
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zdrojů .....</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>67</b>

# 1 Úvod

Mikrobiota gastrointestinálního traktu (GIT) představuje důležitou složku organismu, která se podílí na jeho správné funkci. V posledních letech se zvyšuje zájem o tuto problematiku a zkoumá se vliv probiotik dokonce i na psychiku člověka. Střevní mikrobiota hraje důležitou roli v prevenci a léčbě mnoha chorob, zejména v trávicím traktu. Má nezastupitelnou roli v trávení potravy, produkci prospěšných látek (např. vitaminů a mastných kyselin s krátkým řetězcem) a chrání slizniční povrch před napadením patogeny. Rod *Bifidobacterium* se řadí mezi nejvýznamnější pozitivní bakteriální rody. Svou přítomností v GIT snižuje pH tráveniny, čímž likviduje usazené cizorodé látky a zvyšuje vstřebatelnost živin z potravy. Pro tyto a mnoho dalších vlastností jsou bifidobakterie ceněny a stále častěji se objevují v potravinách a doplňcích stravy. Překážkou pro kolonizaci tlustého střeva může být při průchodu trávicím traktem například kyselé prostředí žaludku, sekrece žluči nebo přítomnost dalších bakterií. K tomu, aby bifidobakterie tuto cestu přežily a k jejich následné podpoře při usídlení ve střevě mohou sloužit prebiotické obalové materiály, které nepříznivým vlivům odolají. Předpokládají se určité substrátové preference bifidobakterií, které souvisí s dietou hostitele. Různá aditiva, jako jsou například arabinogalaktan, arabská a guarová guma, se nachází v dietách hostitelů a zároveň se v potravinách a doplňcích stravy již hojně využívají díky svým technologickým vlastnostem. Tyto substráty by v případě dobrého využití bifidobakteriemi mohly být potenciálně vhodným prebiotickým obalovým materiálem a ve spojení s probiotickými organismy by daly vzniknout novým synbiotikům.



## 2 Cíl práce a metodika

### 2.1 Cíl práce

Bifidobakterie jsou významnou složkou mikrobioty člověka i zvířat, včetně hmyzu se sociálním způsobem života. V současnosti je popsáno okolo šedesáti druhů a poddruhů tohoto rodu. Genom bifidobakterií obsahuje celou řadu genů zapojených do využívání široké škály komplexních sacharidů a dalších látek. Fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy a jiné sacharidy jsou hojně využívány jako prebiotika pro bifidobakterie. Nicméně, schopnost bifidobakterií využít tyto substráty je druhově či kmenově specifická. Předpokládáme, že jako prebiotika pro bifidobakterie by se mohly uplatnit substráty získané ze složek rostlinných materiálů vyskytujících se v přirozené potravě hostitele, ze kterého daný bifidobakteriální izolát pochází.

Cílem teoretické části práce bylo shrnout dosavadní poznatky o bifidobakteriích se zaměřením na jejich substrátové preference, a také základní informace o vybraných substrátech, které byly voleny díky svým technologickým vlastnostem a výskytu v dietách hostitelů. Cílem praktické části bylo najít nové vhodné prebiotické substráty pro vývoj potenciálních synbiotik ve formě prebiotických obalových materiálů.

### 2.2 Metodika

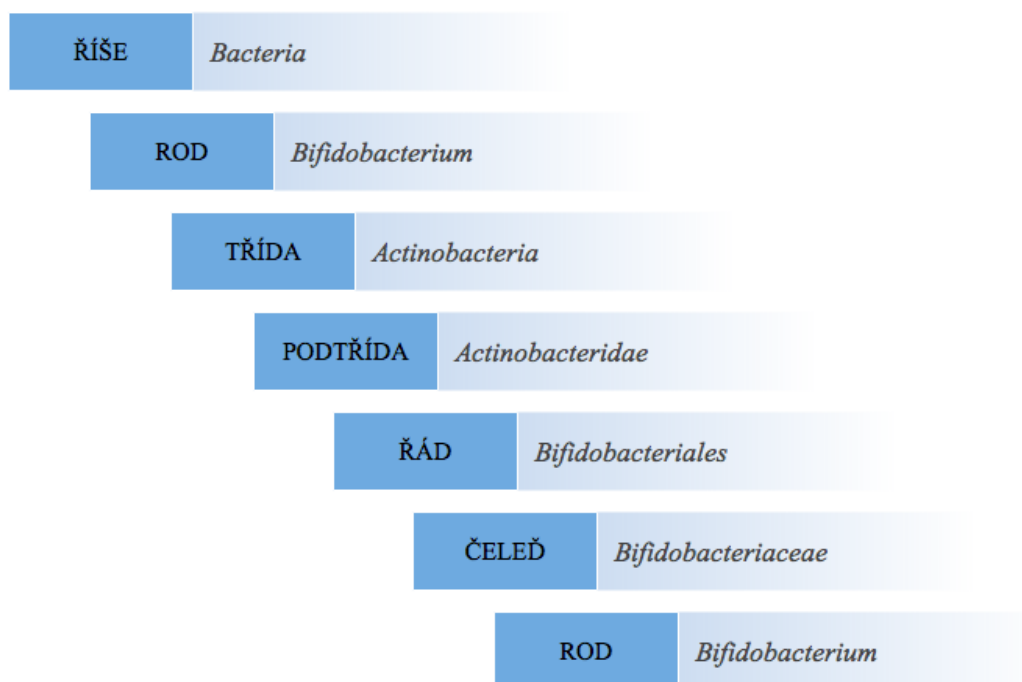
Kmeny bifidobakterií pocházející z různých ekologických nik a typové sbírkové kmeny byly testovány pro jejich schopnost využít substráty jako jsou arabská guma, guarová guma, pektin, xylan, arabinogalaktan, a další – celkem bylo připraveno 13 druhů tekutých API 50 CHL médií, ve kterých byl testovaný substrát jediným uhlíkatým zdrojem. Jako pozitivní kontrola bylo použito médium s glukózou a jako negativní kontrola čisté médium bez zdroje uhlíku. Testování probíhalo *in vitro* v mikrotitračních destičkách. Využití testovaného substrátu daným kmenem se projevilo změnou barvy, jelikož zde došlo ke tvorbě metabolitů a snížení pH. Metabolity (především laktát a acetát) byly dále měřeny v aniontové formě po 48 hodinách anaerobní kultivace v API 50 CHL médiu pomocí iontoměničové chromatografie (IC) s potlačenou vodivostí.

## 3 Teoretická východiska

### 3.1 Bifidobakterie

#### 3.1.1 Taxonomie

Bifidobakterie patří do rodu *Bifidobacterium* a třídy *Actinobacteria*, která je jednou z největších a nejvíce zastoupených taxonomických jednotek. Na Obr. 1 se nachází taxonomické zařazení rodu *Bifidobacterium* (upraveno podle Ventury et al., 2014).



Obrázek 1: Taxonomické zařazení rodu *Bifidobacterium*

#### 3.1.2 Historie a výskyt

Objev rodu *Bifidobacterium* byl připsán Henri Tissierovi, který v roce 1899 izoloval bakterie s podivným a charakteristickým tvarem „Y“ ze stolice kojence a nazval je *Bacillus bifidus*. V roce 1924 rozpoznal Orla-Jensen existenci rodu *Bifidobacterium* jako samostatného taxonu, ale přesto byly bifidobakterie po většinu 20. století nesprávně řazeny k rodu *Lactobacillus*. Od roku 1900 do roku 1957 bylo v jejich znalosti provedeno málo pokroků a teprve v roce 1957 Denhart poprvé uvědomil existenci více biotypů bifidobakterií a navrhl schéma pro diferenciaci těchto bakterií na základě jejich struktury sacharidové fermentace. Reuter v roce 1963 rozpoznal a pojmenoval 7 druhů bifidobakterií.

Charakteristická metabolická dráha bifidobakterií byla objasněna Scardoviim a Trovatellim (1965) a de Vriesem et al. (1967), kteří určili, že klíčovým enzymem je fruktóza-6-fosfát fosfoketoláza. Od roku 1970 se začala více sledovat také DNA bifidobakterií (Biavati et al., 2000; Bottacini et al., 2014).

### 3.1.3 Morfologie a fyziologie

Bifidobakterie mají tvar nepravidelných tyčinek, jsou nepohyblivé, nesporulující, sacharolytické, kataláza negativní a grampozitivní. Neprodukují plyny a ve vztahu ke kyslíku jsou převážně anaerobní (kromě několika druhů schopných tolerovat kyslík). Optimální teplota pro růst lidských kmenů bifidobakterií je kolem 36-38 °C, zatímco u zvířecích kmenů je tato hodnota vyšší (přibližně 41-43 °C) a může dosáhnout dokonce až 49,5 °C, což bylo dokázáno u *B. thermacidophilum*. Optimální pH pro růst bakterií je 6,5-7. Růst přestává při pH 4,5-5 a nižším a při 8-8,5 a vyšším (Bottacini et al., 2014). Tolerance žluči je u jednotlivých kmenů rozmanitá. To lze vysvětlit zjištěním Zavaglia et al. (2002), kteří popsali, že v kulturách vystavených žluči dochází ke změnám v buněčné membráně, což způsobuje autoagregaci.

Buněčná stěna bifidobakterií je tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu obsahující polysacharidy, proteiny a teichoové kyseliny. Diferenciaci druhů a/nebo kmenů umožňuje odlišné aminokyselinové složení základních tetrapeptidů mureinu (Biavati et al. 2000). Obvykle tetrapeptidy tvoří L-alanin, D-glutamová kyselina, L-ornitin a D-alanin, ale v některých kmenech může být ornitin substituován lysinem. Další rozdíly mezi kmeny mohou být dány rozsahem zkřížené vazby mezi sousedními tetrapeptidy, tj. spojením mezi jednou nebo více aminokyselinami. Buněčné stěny bifidobakterií často obsahují kromě glukózy a galaktózy také ramnózu, s kvalitativními a kvantitativními rozdíly mezi druhy, kmeny a jejich růstovými podmínkami (Nagaoka et al., 1995, 1996).

Pro adhezi buněk na stěnu střeva jsou důležité lipoteichoové kyseliny, které tvoří vazby s polysacharidovými řetězci. Několik druhů bifidobakterií obsahuje lipoglykany různých struktur, substituované L-alaninem místo obvyklého D-izomeru (Iwasaki et al., 1990). Imunologické studie ukázaly, že lipoteichoové kyseliny jsou běžným antigenem rodu *Bifidobacterium*. Proteiny a lipoteichoové kyseliny navíc určují hydrofobní charakter povrchu bifidobakterií (Op Den Camp et al., 1985).

### 3.1.4 Metabolismus a substrátové preference

Biavati et al. (1991) rozsáhle studovali několik výživových aspektů bifidobakterií, jako jsou komplexní požadavky na dusík, vitaminy, růstové faktory a kovy. N-acetylglukosamin a N-acetylaktosamin jsou mléčné složky, které růst bifidobakterií stimulují. Když jsou subkultivovány v médiu s přebytkem N-acetylglukosaminu, mají bifidobakteriální buňky pravidelnější formu, což souvisí s tím, že N-acetylglukosamin je důležitým prekurzorem biosyntézy peptidoglykanu. Důležitou roli bifidogenních faktorů přezkoumal také Modler (1994). Bylo zjištěno, že proliferace bifidobakterií v dolním GIT kojenců krátce po narození je stimulována glykoproteinovými složkami kappa-kaseinu přítomnými v lidském kolostru a v menší míře i v mateřském mléce. Druh a počet bifidobakterií obývajících střevní trakt se mění s věkem člověka a také s příjmem bifidogenních složek stravy. Je známo, že laktulóza je účinným faktorem pro růst bifidobakterií. Proto je aplikována v širokém spektru potravin jako funkční složka pro intestinální regulaci.

Analýza aktuálně dostupných sekvencí bifidobakteriálních genomů ukazuje, že obsahují geny pro syntézu alespoň 19 aminokyselin a také kódují všechny předpokládané enzymy potřebné pro biosyntézu pyrimidinových a purinových nukleotidů, stejně jako ty, které jsou nutné pro syntézu některých vitaminů B. Kmeny bifidobakterií mohou produkovat řadu vitaminů B – thiamin (B<sub>1</sub>), pyridoxin (B<sub>6</sub>), kyselinu listovou (B<sub>11</sub>) a kyselinu nikotinovou (niacin, B<sub>3</sub>). Některé kmeny navíc obsahují gen pro biosyntézu riboflavinu (B<sub>2</sub>). Schopnost produkce vitaminů byla zkoumána jako možný probiotický znak. Například 76 kmenů rodu *Bifidobacterium*, patřících do 9 různých druhů, bylo testováno na produkci folátu a schopnost poskytovat proliferující kolonocyty s kyselinou listovou. Požití identifikovaných bifidobakteriálních kmenů produkujících folát by mohlo být použito k prevenci nebo potlačení lokalizovaného deficitu folátu, které je spojeno s premaligními změnami v epitelu tlustého střeva (Cronin et al., 2011).

Bifidobakterie mají obecně schopnost fermentovat glukózu, galaktózu a fruktózu. Ve fermentaci jiných sacharidů a alkoholů existují rozdíly mezi různými kmeny. Bifidobakteriální genomy kódují také velký arzenál proteinů, schopných katabolizovat složité sacharidy. Tato rozsáhlá schopnost svědčí o specifických genetických adaptacích v konkurenčním prostředí bohatém na komplexní sacharidy. Mnoho bifidobakteriálních glykosylhydroláz však zůstává neznámých. Cílené studie zaměřené na druhy bifidobakterií

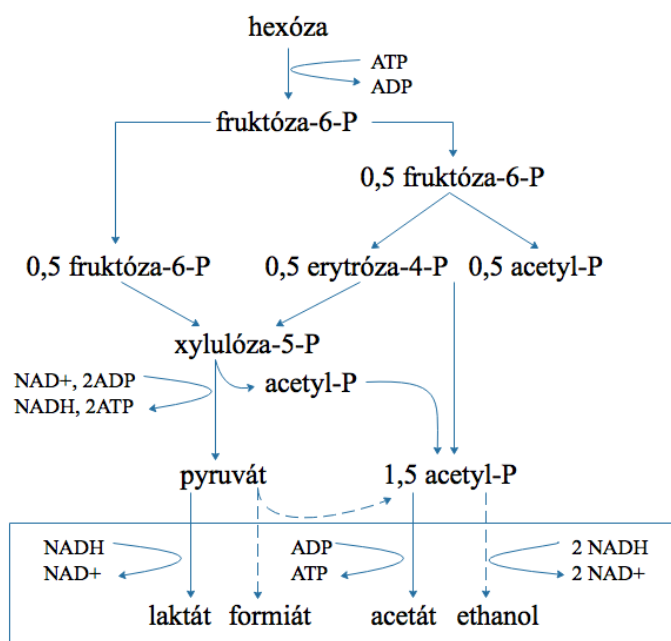
specifikovaly enzymy, jako je *apuB* v *Bifidobacterium breve* (UCC2003), u kterého bylo prokázáno, že je zodpovědný za rozklad velkých molekul škrobů a škrobových polysacharidů (Cronin et al., 2011). Vernazza et al. (2006) testovali substrátové preference pěti bifidobakteriálních kmenů a zjistili, že mezi bifidobakteriemi existují přednostní prebiotické oligosacharidy. Výsledky korespondovaly s dalšími studiemi (Hopkins et al., 1998; Schell et al., 2002). Kmeny byly porovnávány na základě rychlosti růstu při daném zdroji uhlíku. Xylooligosacharidy (XOS) zde nebyly dobře využity žádným z testovaných druhů. Sekvenování *Bifidobacterium longum* (NCC2705) sice ukázalo dva xylánázové homology, ale ty mohou být pouze kmenově specifické. Galaktooligosacharidy (GOS) vykazovaly vyšší rychlost růstu a byly fermentovány všemi testovanými bakteriemi. Ve většině případů byl použitý GOS dokonce fermentován lépe než glukóza. Isomaltooligosacharidy (IMO) také vedly k růstu všech testovaných bakterií. Nejrozšířenější zkoumanými prebiotiky jsou fruktooligosacharidy (FOS) a inulin. Používají se v mnoha přípravcích a je všeobecně známo, že mají bifidogenní účinky. Jejich molekuly jsou úzce příbuzné a lze očekávat, že i jako růstové substráty budou fungovat podobně. Vernazza et al. (2006) však zjistili, že tomu tak není, a i zde se preference jednotlivých kmenů liší. Jako kontrolu mimo jiné využili maltodextrin, který také prokázal selektivní vlastnosti a nebyl využit všemi testovanými kmeny. Proto by neměl být v dalších experimentech používán jako neselektivní kontrola.

Mezi selektivní prebiotika patří například oligosacharidy nacházející se v lidském mléce (human milk oligosaccharides – HMO). Můžeme je nalézt jako volné oligosacharidy nebo v konjugované formě s proteiny nebo lipidy. Schopností využívat HMO je známý především kmen *B. longum* subsp. *infantis* (Mills et al., 2015; Kyle et Mills, 2017; Tomson et al., 2017). Bylo prokázáno, že zvyšuje svůj relativní podíl ve střevním mikrobiomu u kojenců na úroveň až desetkrát vyšší (až na 90% podíl celkové mikrobiální populace distálního tlustého střeva), než byl při narození (před započítáním kojení a konzumací HMO) nebo u kojenců výhradně krmených náhradní výživou. Při přechodu na běžnou pevnou stravu *B. longum* subsp. *infantis* nemůže nadále konkurovat jiným střevním bakteriím a populace klesá i na méně než 1 % z celkového mikrobiomu. Překvapivě bylo také prokázáno, že *B. longum* subsp. *infantis* roste na oligosacharidech z hovězího mléka (bovine milk oligosaccharides – BMO). Koncentrace selektivních oligosacharidů podporujících růst *B. longum* subsp. *infantis* je však u BMO nižší v porovnání s HMO a celkově se strukturní

složení těchto dvou druhů oligosacharidů liší (Kyle et Mills, 2017). HMO dokáže kromě *B. longum* subsp. *infantis* využít také *B. bifidum* a *B. breve* (Mills et al., 2015; Kyle et Mills, 2017; Tomson et al., 2017). Dalším rozdílným typem mléčných oligosacharidů jsou ty, které se nacházejí v hovězím kolostru (bovine colostrum oligosaccharides – BCO). I tyto dokáží *B. longum* subsp. *infantis* a také *B. breve* využít (Kyle et Mills, 2017).

*B. bifidum* je jediný bifidobakteriální kmen, který je schopný degradovat mucin a uvolňovat monosacharidy, které mohou být využity jinými střevními mikroby. *Eubacterium hallii* je čteně se vyskytující komenzál, který produkuje butyrát a propionát z fermentačních metabolitů, ale nemůže sám degradovat oligo- a polysacharidy. Trofické interakce bifidobakterií a *E. hallii* vedou k tvorbě acetátu, butyrátu, propionátu a formiátu, potenciálně přispívajících ke tvorbě střevních SCFA s přínosem pro hostitele a pro mikrobiální kolonizaci střeva. Poměry vznikajících SCFA se liší v závislosti na mikrobiálních druzích (Bunesova et al., 2018).

Pro bifidobakterie je specifický tzv. hexózový metabolismus. Jedná se o katabolismus a jeho klíčovým enzymem je fosfoketoláza fruktózy-6-fosfátu, která štěpí hexózový fosfát na 4-fosfát erythrozou a acetylfosfát (Scardovi a Trovatelli, 1965; De Vries et al., 1967). Z tetrozových a hexózových fosfátů se postupným působením transaldelázy a transketolázy vytvářejí pentózové fosfáty, které prostřednictvím obvyklého štěpení 2-3 způsobují vznik kyseliny mléčné a kyseliny octové v teoretickém konečném poměru 1,0:1,5. Fermentační rovnováhu může změnit tvorba kyseliny mravenčí a etanolu. Různé druhy bifidobakterií produkují za stejných podmínek různé množství octanu, mléčného etanolu a formiátu (Biavati et al., 2000). Zjednodušené schéma fruktóza-6-fosfátové cesty je znázorněno na Obr. 2 (Amaretti et al., 2007). Mezi poměrně nové poznatky patří schopnost různých druhů bifidobakterií využít L-fukózu za vzniku 1,2-propandiolu. Protože je 1,2-propandiol prekurzorem tvorby intestinálních propionátů, využití fukózy bifidobakteriemi může ovlivnit vyváženost mastných kyselin s krátkým řetězcem (Bunešová et al., 2016).



**Obrázek 2: Fruktóza-6-fosfátová cesta** (upraveno podle Amarettiho et al., 2007)

### 3.1.5 Význam

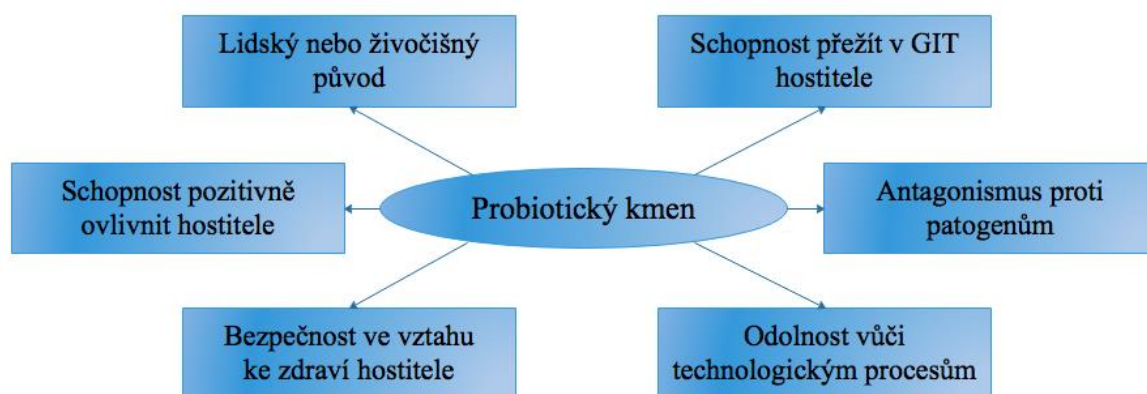
Lidský gastrointestinální trakt (GIT) představuje prostředí, které je hustě osídlené mikroorganismy. Při narození je GIT člověka v podstatě sterilní a je rychle kolonizován mikroorganismy, které pocházejí z matky a okolního prostředí. V krátkém časovém horizontu vzniká v GIT kojence mikrobiota, kde jsou bifidobakterie dominantními členy. Jejich dominance však mizí po odstavení kojence od mateřského mléka. Mnoho zdravotních přínosů spojených s bifidobakteriemi a výsledný komerční význam vyplývající z jejich začlenění do tzv. funkčních potravin vedly k intenzivnějšímu výzkumu zaměřenému na molekulární porozumění prokázaných probiotických vlastností tohoto rodu (Bottacini et al., 2014).

Bifidobakterie jsou vhodné organismy ke studiu genetické hranice mezi bakteriemi podporujícími zdraví (probiotiky) a patogenními bakteriemi. Na bifidobakterie jsou v posledních letech aplikovány tzv. „omics“ technologie, jako je sekvenování mikrobiálních genomů a analýza genomu. Tyto technologie jsou považovány za bránu do nové éry biologických výzkumů, které osvětlí interaktivní genetiku a základ všech mikrobiálních vlastností (Schell et al., 2002). Sledování genomu může poskytnout nové poznatky o tom, jak se například probiotika vyrovnávají s environmentálním stresem. Kmeny bifidobakterií musí prokázat odolnost vůči nepříznivým podmínkám, kterým jsou vystaveny

v průmyslových výrobních procesech (lyofilizace aj.). Kmeny jsou vystaveny potenciálně stresovým podmínkám nejen při průmyslovém zpracování, ale také v přirozeném prostředí, kde je jejich schopnost rychle reagovat nezbytná pro přežití (Lindner et al., 2007).

### 3.1.6 Probiotika

Pojem „probiotikum“ je známý od počátku 20. století (Metchnikoff, 1907). Fuller (1989) jej popisuje jako živou mikrobiální složku stravy, která pozitivně ovlivňuje hostitele tím, že zlepšuje jeho mikrobiální rovnováhu. Současná definice probiotik zní: „Probiotika jsou živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v dostatečném množství, poskytují hostiteli zdravotní přínos“ (Hill et al., 2014). Vzhledem k obecné domněnce, že jsou bifidobakterie užitečné při udržování rovnováhy v lidské střevní mikrobiotě, byly tyto organismy zařazeny do skupiny probiotik. Pro člověka se jako probiotika používají především druhy z rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Aby byl kmen zařazen mezi probiotika, musí splňovat následující kritéria viz Obr. 3 (Biavati et al., 2000).



**Obrázek 3: Definice probiotického kmene** (upraveno podle Biavatiho et al., 2000)

Všechna probiotika mají krátkou životnost v lidském střevě a potřebují opakované dávkování, aby udržely konstantní hladinu. Měření probiotik ve stolici vykazuje výrazný pokles už týden po ukončení perorálního podávání (Alander et al., 1999). Alternativní strategií pro změnu střevní mikrobioty jsou prebiotika. Ta mohou být snadno metabolizována specifickými žádoucími bakteriemi a tím podporují jejich růst. Kombinace prebiotik a probiotik se nazývá „synbiotika“ (Spiller, 2008).



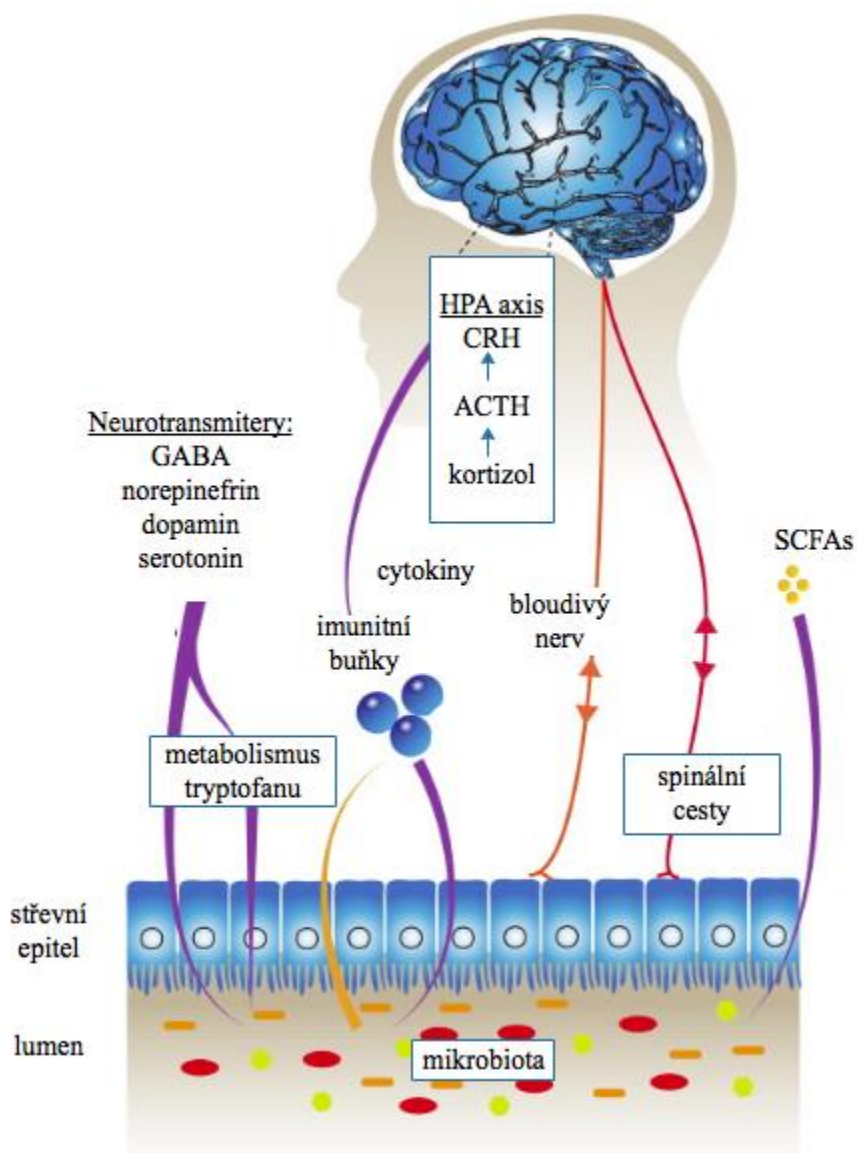
### 3.1.7 Psychobiotika

Objevily se studie zkoumající spojitosti mezi střevní mikrobiotou a funkcemi mozku. V těchto studiích se objevuje pojem „psychobiotikum“, který je definován jako živý organismus (probiotikum), který při přijímání v odpovídajícím množství přináší zdravotní přínos pacientům trpícím psychiatrickými onemocněními. Jako třída probiotik jsou tyto bakterie schopné produkovat a dodávat neuroaktivní látky, jako jsou kyselina gama-aminomáselná (GABA) a serotonin, které působí na komunikační osu mezi mozkem a střevy. Předklinická hodnocení u hlodavců naznačují, že některá psychobiotika mají antidepresivní nebo anxiolytickou aktivitu. Dosud byla psychobiotika nejčastěji studována v psychiatrickém prostředí u pacientů se syndromem dráždivého střeva, kde byly hlášeny pozitivní přínosy pro řadu organismů, včetně *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (Dinan et al., 2013). Sarkar et al. (2016) navrhuji, rozšířit definici psychobiotik, jako živých bakterií (probiotik), tak, aby zahrnovala také prebiotika, která zvyšují růst prospěšných střevních bakterií a dále nad rámec probiotik a prebiotik na jakýkoliv exogenní vliv, jehož účinek na mozek je zprostředkován bakteriálně.

Podle Dinana et al. (2015) evoluční tvorba komplexní střevní mikrobioty u savců hrála důležitou roli při umožnění vývoje mozku a možná i sofistikované sociální interakce. Geny lidské střevní mikrobioty významně převyšují lidské geny v těle a jsou schopné produkovat nesčetné množství neuroaktivních sloučenin. Nedávné výzkumy podle nich naznačují, že tyto mikrobi ovlivňují především kognitivní funkce a základní vzorce chování, jako je sociální interakce a řízení stresu. Při nepřítomnosti mikrobů nastane podstatná změna neurochemie v pozadí. Studie střevních mikrobů tedy mohou hrát důležitou roli v posílení porozumění poruch kognitivního fungování a společenské interakce, jako je autismus. Byla popsána obousměrná komunikační síť, jejímž prostřednictvím mohou signály z mozku ovlivňovat motorické, senzorycké a sekreční modality střev, a naopak viscerální zprávy ze střeva mohou ovlivňovat funkci mozku. Patří sem vagusový nerv, osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA), cytokiny produkované imunitním systémem, metabolismus tryptofanu a produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (Obr. 4). Také Schmidt et al. (2015) uvádí, že příjem probiotik (a prebiotik) moduluje zpracování informací, které jsou silně spojené s úzkostí a depresí a ovlivňují neuroendokrinní stresovou odezvu.

Evans et al. (2017) zjišťovali rozdíly v mikrobiálním složení stolice jedinců s bipolární poruchou a kontrolní skupinou. Jejich studie poskytuje první podrobnou analýzu

intestinálního mikrobiomu s vícenásobnými doménami z bipolární populace. Data podporují hypotézu, že cílení na střevní mikrobiotu může být účinným paradigmatem léčby bipolární poruchy.



**Obrázek 4: Obousměrné komunikační cesty mezi mozkiem a střevní mikrobiotou**  
(Dinan et al., 2015)

### 3.2 Prebiotika

Původně byla prebiotika popisována jako nestravitelná složka potravy, která ovlivňuje hostitele stimulačním růstem a/nebo aktivitou jednoho nebo omezeného počtu bakterií v tlustém střevě a tím zlepšuje zdraví hostitele. Tato definice zůstala nezměněna více než

15 let od jejího prvního zavedení v roce 1995 Gibsonem a Roberfroidem. Na 6. zasedání Mezinárodní vědecké asociace probiotik a prebiotik (ISAPP) v roce 2008 byla definice „dietních prebiotik“ aktualizována jako nestravitelná sloučenina, která vede ke specifickým změnám v kompozici a/nebo aktivitě gastrointestinální mikrobioty a tím přináší výhody pro zdraví hostitele. Autoři podporovali také rozšíření základního seznamu prebiotik o sloučeniny, jako jsou rezistentní škroby, pektin, arabinoxylan, ale také nesacharidové sloučeniny, jako jsou polyfenoly. Zda bude prebiotická koncepce procházet revolučním vývojem, který přijme koncepci vícenásobných interakcí mezi hostitelskou fyziologií, imunologií, funkcí střevní mikrobioty a potravou, je záležitostí konsenzu mezi vědci a regulačními agenturami (Valcheva et. Dieleman, 2016).

Prebiotikum musí splňovat následující požadavky – nesmí být hydrolyzováno nebo absorbováno v horní části gastrointestinálního traktu (GIT), musí podporovat rozvoj prospěšných bakterií, jako jsou bifidobakterie a laktobacily a musí vyvolávat příznivé fyziologické účinky na zdraví hostitele. GIT člověka zahrnuje více než 1000 druhů a kolem  $10^{14}$  mikroorganismů, převážně anaerobních (>99 %). Vědecké práce z této oblasti naznačují, že střevní mikrobiota není jen prostou sbírkou mikroorganismů, ale odráží také vzájemné vztahy mezi různými skupinami, které by mohly spolupracovat ve prospěch hostitele. Mikrobiota vytváří úzkou symbiózu s hostitelem, který poskytuje živiny a vhodné podmínky pro vývoj mikroorganismů. Existuje dlouhý seznam patologických stavů spojených se změnou střevní mikrobioty, včetně jaterní encefalopatie, průjmu, diabetu, obezity, rakoviny tlustého střeva, IBS (syndrom dráždivého střeva – irritable bowel syndrom), IBD (zánětlivé onemocnění střev – inflammatory bowel disease), gastrointestinálních infekcí a nekrotizující enterokolitidy (Spiller, 2008; Míguez et al., 2016). Složení střevní mikrobioty je ovlivněno řadou faktorů, které zahrnují mikrobiální druhy získané při narození, genetiku hostitele, věk, onemocnění a užívání antibiotik, stres a dietu. Ve skutečnosti je dieta hostitele pravděpodobně nejdůležitějším faktorem a několik studií se zaměřuje na modulaci střevní mikrobioty užíváním funkčních potravin, jako jsou prebiotika (Míguez et al., 2016).

Nejčastěji přijímaná prebiotika jsou inulin, laktulóza, fruktooligosacharidy (FOS), galaktooligosacharidy (GOS) a oligosacharidy lidského mléka (HMO – human milk oligosaccharides). Existuje stále rostoucí seznam potenciálních prebiotik, ačkoli důkazy o nich, zejména u lidí, nejsou zatím tak dobře známy jako u FOS a GOS. Některá prebiotika

jsou již komerčně dostupná, ale další jsou stále v počátečním stadiu vývoje (Belorkar et Gupta, 2016; Míguez et al., 2016).

Hlavními odvozenými produkty intestinální bakteriální fermentace prebiotických substrátů jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA – acetát, propionát, butyrát). SCFA vykazují několik příznivých účinků. Mají klíčovou roli při prevenci a léčbě metabolického syndromu, poruch střev a rakoviny, ochraně před obezitou indukovanou dietou a regulací střevních hormonů nebo pozitivní účinek na léčbu ulcerózní kolitidy, Crohnovy choroby a průjmu souvisejícího s antibiotiky a obezitou. Hlavním zdrojem pro kolonocyty je butyrát, propionát má úlohu v procesech glukoneogeneze a acetát je využit pro lipogenezi (Míguez et al., 2016).

Na tvorbě polysacharidů se podílí pouze několik monosacharidů a jejich derivátů (D-glukóza, D-galaktóza, D-manóza a další), přesto se však vyznačují odlišnými vlastnostmi. Mimo jiné mají široké využití také v potravinářství a farmacii. Celulóza a škrob, pektin a různé druhy gum se používají kvůli svým zahušťovacím, emulgačním a želírovacím schopnostem (Čopíková et al., 2005).

### **3.2.1 Oligosacharidy**

Oligosacharidy jsou cukry složené z několika monosacharidových jednotek (2–10). V přírodě jsou běžně dostupné a jedná se především o složky rostlin, ale i živočišných produktů (med a mléko). V posledních letech se u oligosacharidů diskutuje jejich syntéza zprostředkovaná mikrobiálními enzymy a také fyziologické účinky na zdraví člověka, protože některé získávají široké uplatnění jako prebiotika (Belorkar et Gupta, 2016). Především galaktooligosacharidy (GOS) a fruktooligosacharidy (FOS) bývají zkoumány pro své schopnosti stimulovat růst prospěšné mikrobioty. Fanaro et al. (2005) ve studii na nedonošených dětech prokázali, že prebiotická směs GOS s krátkým řetězcem a FOS s dlouhým řetězcem moduluje střevní mikrobiotu a imunitní systém stejně dobře, jako mateřské mléko. Oligosacharidy, které se v současnosti přidávají do kojenecké výživy jsou však strukturálně odlišné od oligosacharidů přirozeně se vyskytujících v mateřském mléce, a proto podle Musilové et al. (2014) nemusí napodobovat některé strukturálně specifické účinky. Singh et al. (2015) zase zjistili, že fermentace xylooligosacharidů (XOS; produkt hydrolyzy xylanu) a produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem zlepšuje zdraví střevního epitelu a reguluje metabolický proces.

**Tabulka 1: Rozdělení nejčastějších přirozeně se vyskytujících oligosacharidů**  
(upraveno podle Belorkar et Gupta, 2016).

Druh oligosacharidů	Popis
<b>FOS</b>	
Fruktooligosacharidy	Fruktózové jednotky spojené pomocí $\beta$ -2,1 vazby. Použití jako alternativní sladidla, inhibiční účinek na patogeny a stimulační pro rod <i>Bifidobacterium</i> – potenciál synbiotik.
<b>GOS</b>	
Galaktooligosacharidy	Galaktózové jednotky spojené pomocí různých vazeb ( $\beta$ -1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,6). Metabolismus absorpce cholesterolu a triglyceridů, minerálů, zlepšení vyprazdňování, prevence rakoviny.
<b>LDGOS</b>	
Galaktooligosacharidy odvozené od laktózy	Galaktózové jednotky spojené pomocí různých vazeb ( $\beta$ -1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,6). Metabolismus absorpce cholesterolu a triglyceridů, minerálů, zlepšení vyprazdňování, prevence rakoviny.
<b>XOS</b>	
Xylooligosacharidy	Xylózové jednotky spojené pomocí $\beta$ -1,4 vazby. Přínos pro léčbu diabetu II. typu, snižuje celkový cholesterol a LDL cholesterol, léčba aterosklerózy, vysoce bifidogenní.
<b>AOS</b>	
Arabinooligosacharidy	Složené z jednotek arabinózy. Snižování zánětlivých stavů u ulcerózní kolitidy, stimulace rodů.
<b>ADMO</b>	
Oligosacharidy odvozené od mořských řas	Podle chemické struktury: chitosan-, laminarin-, alginát-, fukoidan-, karagenan-, ulva-oligosacharidy. Prebiotika, stimulace imunity, pozitivní vliv na rakovinu.
<b>pAOS</b>	
Kyselé oligosacharidy odvozené od pektinu	Použití např. v kojenecké výživě k potlačení průjmů a zvýšení absorpce minerálů a iontů, antiox. účinky, pomoc při plicních infekcích.
<b>CD</b>	
Cyklodextriny	Stabilizátory a látky upravující chuť v potravinách, antioxidanty.
<b>HMO</b>	
Oligosacharidy lidského mléka	Stimulace rodů <i>Bifidobacterium</i> a <i>Lactobacillus</i> u kojenců krmených mateřským mlékem.

Dalšími významnými skupinami přirozeně se vyskytujících oligosacharidů jsou také manooligosacharidy, oligosacharidy odvozené od sóji, chitooligosacharidy aj. Mezi syntetickými oligosacharidy pak isomaltooligosacharidy, glukooligosacharidy a laktulóza. Dělení se u různých autorů liší (Macfarlane et al., 2007; Belorkar et Gupta, 2016).

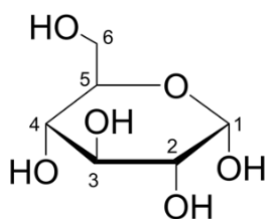
### 3.2.2 Polysacharidy

Polysacharidy jsou v přírodě velmi rozšířené. Tvoří je monosacharidové jednotky vázané glykosidovou vazbou. Mezi nejznámější zástupce patří například škrob, glykogen, celulóza nebo chitin. Nyní jsou stále častěji některé polysacharidy zkoumány jako prebiotika, pro své antioxidační a protirakovinné účinky, vliv na podporu imunity apod. Nové polysacharidy z různých zdrojů vyžadují další testování a výzkum. Jedním z nejvíce zkoumaných polysacharidů ve vztahu k bifidobakteriím je škrob. Bylo zjištěno, že škrob a škrobové hydrolyzáty jsou nejobecnějším a příznivým zdrojem uhlíku pro bifidobakterie (Cronin et al., 2011; Sánchez-Zapata et al., 2011; Liu et al., 2015). Kvůli vyšší odolnosti a schopnosti dosáhnout tlustého střeva je v tomto ohledu zkoumán tzv. rezistentní škrob (Raigond et al., 2015). Potenciálními prebiotiky však může být spousta dalších polysacharidů, He et al. (2016) dále například zkoumali ve vodě rozpustné polysacharidy z bambusových výhonků a prokázali jejich prebiotické účinky na některé zástupce rodu *Bifidobacterium*.

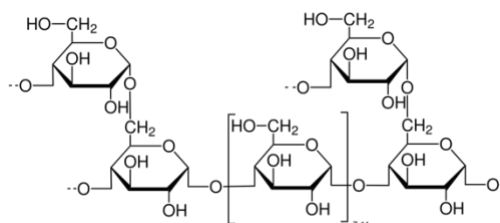
## 3.3 Použité substráty

### 3.3.1 Glukóza

D-glukóza je nejvýznamnější přirozeně se vyskytující monosacharid. Jedná se o hexózu a aldózu. Velkou roli hraje především v energetickém metabolismu. Mezi hlavní metabolické dráhy, kterých se glukóza a její deriváty účastní, patří glykolýza, glukoneogeneze, syntéza a degradace glykogenu a pentózový cyklus. Glukóza je stavebním kamenem důležitých polysacharidů, jako je glykogen (Obr. 6), škrob (Obr. 7a a 7b) a celulóza (Obr. 9). Volná glukóza se vyskytuje v ovoci (tzv. hroznový cukr) a medu. Je vázána v glykolipidech a nachází se v krvi většiny živočichů (Matouš et al., 2010).



**Obrázek 5: D-glukóza**  
([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org))



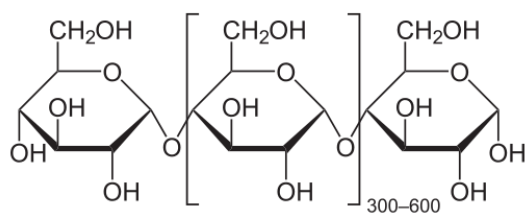
**Obrázek 6: Glykogen**  
([www.wikiskripta.cz](http://www.wikiskripta.cz))

### 3.3.2 Bramborový škrob

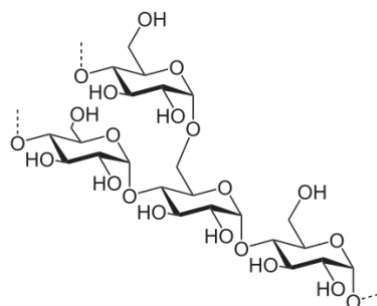
Škrob je zásobní polysacharid rostlin, uložený ve formě granulí v buňkách listů, semen a hlíz. V případě potřeby je z něj odštěpována glukóza. Pro člověka představuje škrob nutričně nejdůležitější sacharid. Škrob je směsí dvou typů polymerů – amylozy (20 %) a amylopektinu (80 %), které představují přibližně 98–99 % suché hmotnosti. Poměr obou polysacharidů se mění podle botanického původu škrobu (Tester et al., 2004). Amylóza je tvořena nerozvětveným řetězcem, který se skládá z molekul glukózy spojených O-glykosidovou vazbou  $\alpha$ -1,4. Díky  $\alpha$ -konfiguraci na 1. uhlíku vytváří amyλόza šroubovici se stabilizovanou strukturou. Amyλόza je rozpustná ve vodě. Oproti tomu amylopektin má rozvětvený řetězec a je ve vodě nerozpustný. Základní řetězec amylopektinu má stejnou strukturu jako amyλόza, ale po 20–30 glukózových jednotkách je větven vazbou  $\alpha$ -1,6 (struktura připomíná strom; Matouš et al., 2010).

Bramborový škrob má granule čočkovitého tvaru o velikosti 5–100  $\mu\text{m}$ , s charakteristickou vrstvenou strukturou (Tester et al., 2014). Obsah škrobu v hlíze stoupá během růstu hlízy. Zvýšení je způsobeno jak nárůstem počtu granulí, tak zvětšením jejich velikosti. Přírodní bramborový škrob se hojně využívá v potravinářském, papírenském a textilním průmyslu (Grommers et van der Krogt, 2009).

Nový potenciál jako prebiotická složka potravy nabízí tzv. rezistentní škrob (resistant starch – RS). Je uznaným zdrojem vlákniny, klasifikovaným jako komponenta vlákniny s částečnou nebo úplnou fermentací v tlustém střevě mikrobiotou a poskytující různé pozitivní účinky na zdraví hostitele. Obsah RS v potravinách je velmi ovlivněn způsobem přípravy jídla a technikami zpracování. RS v potravě je také měněn fyzikálním nebo chemickým ošetřením (Raigond et al., 2015). O RS v potravinách je velký zájem díky jeho fyziologickým účinkům (zvýšení defekace, snížení rizika rakoviny trávicího traktu, snížení postprandiální reakce glukózy a hladiny lipidů v krvi, kontrola hladiny triglyceridů a cholesterolu v plazmě, absorpce minerálů a slibný vliv v prevenci vzniku žlučových kamenů). RS lze díky jeho pozitivním účinkům na zdraví konzumenta využít jako prebiotickou složku potravy. Prebiotické účinky je možné ještě zvýšit kombinací s fruktooligosacharidy s krátkým řetězcem (Evangélica et al., 2011; Raigond et al. 2015).

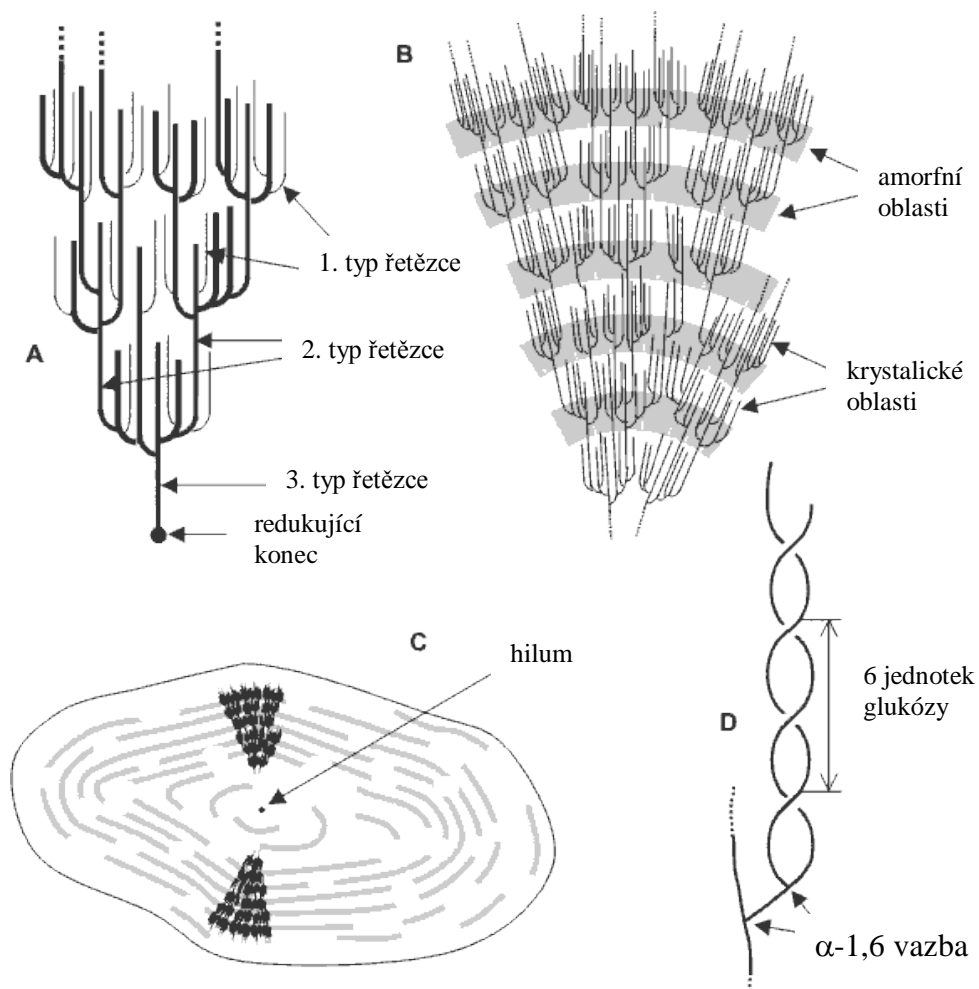


Obrázek 7a: Amylóza



Obrázek 7b: Amylopektin

Struktura škrobu je zobrazena na Obr. 8: **A** – základní řetězec amylopektinu; **B** – organizace amorfních a krystalických oblastí (struktur, které přispívají k vytváření „růstových kruhů“; **C** – orientace molekul amylopektinu v průřezu granule; **D** – struktura dvojité šroubovice ze sousedních řetězců. **Typy řetězce** – (1.) vytváří hustší krystaly (většina obilovin), (2.) vytváří otevřenější hydratované hexagonální krystaly (banány a některé hlízy včetně brambor), (3.) kombinace typů 1 a 2 (hrách a fazole).



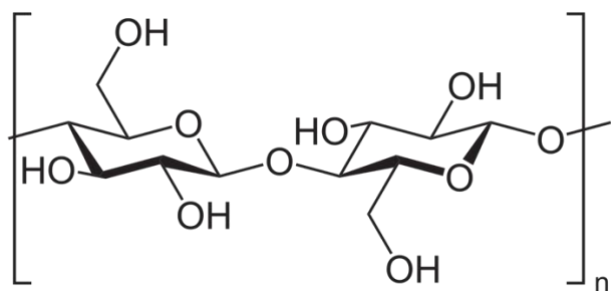
Obrázek 8: Struktura škrobu (upraveno z <http://www1.lsbu.ac.uk>)



### 3.3.3 Celulóza

Celulóza je polysacharid skládající se z jednotek beta-D-glukózy spojených glykosidovou vazbou  $\beta$ -1,4. Tvoří dlouhé nerozvětvené řetězce, které jsou zcela nerozpustné ve vodě. Celulóza je hlavní stavební látkou rostlinných primárních buněčných stěn a spolu s ligninem a hemicelulózami se podílí na stavbě stěn sekundárních. Kromě vyšších rostlin je syntetizována také většinou skupin řas, řadou bakteriálních druhů a pláštěnců. Je obecně známo, že celulóza je velmi důležitý biopolymer a téměř nevyčerpatelná a obnovitelná surovina, která se využívá v řadě produktů. Termín celulóza bývá nesprávně používán pro označení polotovaru v papírenském průmyslu. Jde o směs celulózy, hemicelulóz a zbytků ligninu a správný termín je „buničina“. Většina celulózových materiálů se skládá z krystalických a amorfních částí (v různých poměrech) v závislosti na zdroji. Fyzikální vlastnosti, chemická povaha a reaktivita celulózy jsou ovlivněny uspořádáním molekul vůči sobě navzájem i vůči ose vlákna. Interakce mezi pevnými celulózovými materiály s vodou, enzymy nebo jinými reaktivními a adsorpčními látkami se objevují dříve v nekrystalických oblastech a/nebo na povrchu krystalitů celulózy (Matouš et al., 2010; Ciolacu et al., 2011).

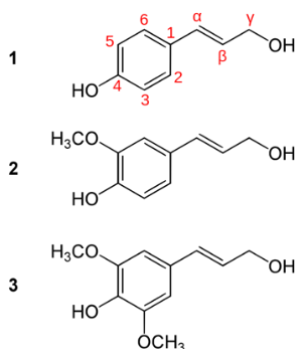
Většina savců má omezenou schopnost trávit vlákninu, jako je celulóza. Příčinou je chybějící enzym hydroláza, který je schopný štěpit  $\beta$ -1,4 glykosidové vazby (Matouš et al., 2010). Někteří přežvýkavci (např. krávy a ovce) však mají v GIT symbiotické bakterie, které produkují enzym celulózu. Ta mikroorganismům pomáhá celulózu trávit a rozkladné produkty jsou bakteriemi využívány k proliferaci. Celulóza je bakteriemi hydrolyticky štěpena na menší polysacharidy (celldextriny) až po glukózu (Fosses et al., 2017).



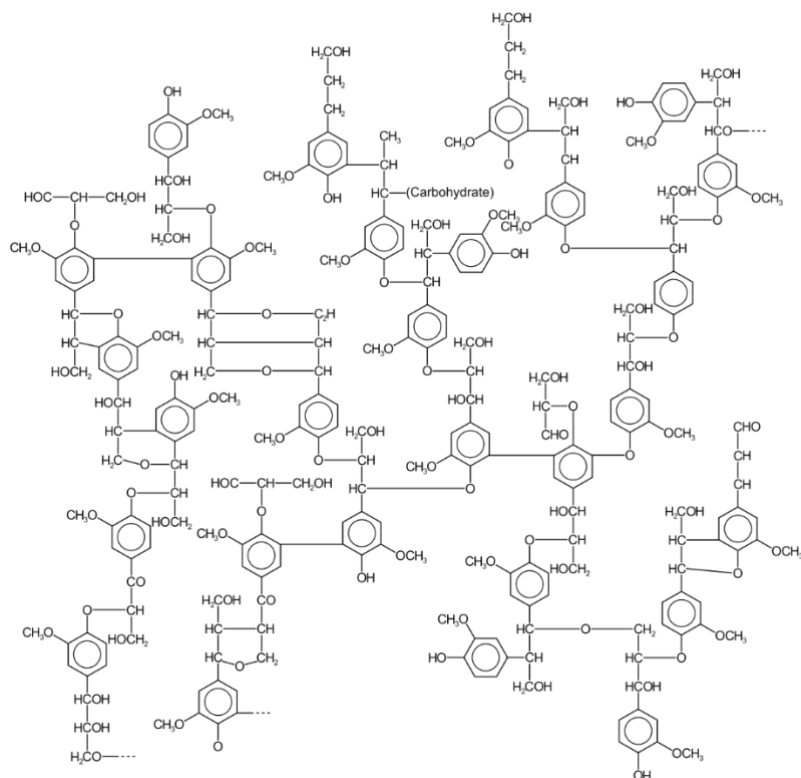
**Obrázek 9: Strukturní vzorec celulózy** ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org))

### 3.3.4 Lignin

Lignin, odvozený od latinského výrazu „lignum“, znamená dřevo a tvoří velkou část rostlinné biomasy. Je druhým nejbohatším obnovitelným přírodním zdrojem vedle celulózy. Jedná se o vysoce heterogenní biopolymer s rozvětvenou 3D strukturou, která obsahuje různé funkční skupiny – hydroxylové, methoxylové, karbonylové a karboxylové (Naseem et al., 2016). Základní stavební jednotkou jsou deriváty fenylypropanu, které jsou označovány jako prekurzory ligninu (kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol). Tyto prekurzory jsou vázány do trojrozměrných struktur etherovými vazbami nebo vazbami mezi dvěma uhlíky (Wengenmayer et al., 1976). Lignin je důležitou součástí všech cévnatých rostlin, poskytuje jim pevnost a tuhost a je poměrně odolný vůči degradaci (Naseem et al., 2016). Lignin lze získat z různých obnovitelných surovin, například z cukrové třtiny, bagasy, borovice nebo cedrového dřeva. Tvrdé dřevo (například javor) obsahuje menší množství ligninu, než měkké (například borovice). Přírodní lignin je bezbarvý nebo světle žlutý, ale při ošetření kyselinou nebo zásadou změní barvu na tmavě hnědou. Lignin má vysokou tepelnou stabilitu, antioxidační vlastnosti, je biologicky odbouratelný, má antimikrobiální povahu a adhezivní vlastnosti. Kromě četného využití v technickém průmyslu (výroba plastů, pryskyřic, obalové materiály aj.) nachází využití také v průmyslu potravinářském, jako zdroj nerozpustné vlákniny. Je obzvláště odolný vůči trávicím enzymům. Chemicky modifikovaný lignin je používán jako dispergační činidlo, zahušňovadlo a další (Naseem et al., 2016). Příroda našla způsob, jak úplně degradovat lignin pomocí ligninolytických enzymových systémů, které mají některé houby. V posledních letech se zintenzivnil výzkum bakteriálních enzymů schopných modifikace ligninu a odhalilo se několik z nich, které na lignin působí. Dvě hlavní třídy jsou peroxidázy typu DyP a lakázy (de Gonzalo et al., 2016).



**Obrázek 10: Prekurzory ligninu** (www.wikipedia.org)

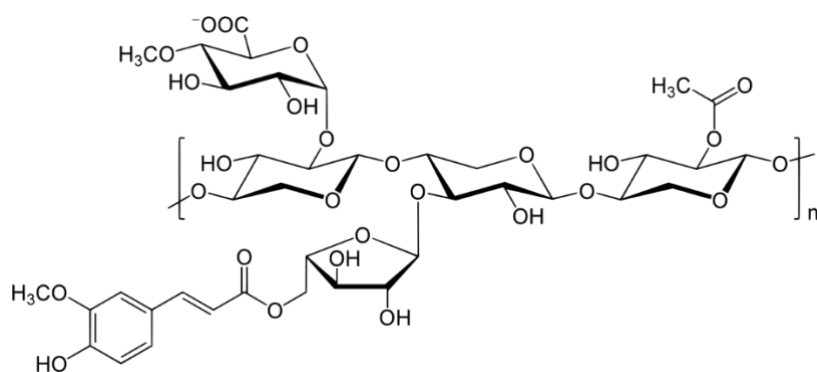


**Obrázek 11: Jedna z možností struktury ligninu** ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org))

### 3.3.5 Xylan

Xylany jsou spolu s ligniny hlavní součástí druhotných buněčných stěn dřevnatých částí rostlin a jsou potřebné pro jejich normální růst a vývoj. Xylan je jednou z nejvíce zastoupených složek hemicelulóz, které se spolu s pektiny a  $\alpha$ -celulózou řadí mezi rozpustnou vlákninu. Suroviny bohaté na xylan, jako jsou rýžové otruby, proso a další, mohou být enzymaticky převedeny na bioaktivní sloučeniny (oligosacharidy, alkoholy a fenolové kyseliny). Xylanázovou hydrolyzou xylanu extrahovaného z rostlin vznikají xylooligosacharidy (XOS), třída nestravitelných funkčních složek potravin, které mají nižší stupeň polymerace (Ayyappan et al., 2017). Protože je většina xylanů rozvětvená a obvykle mívají zbytky kyselin, mnoho fragmentů XOS má také boční zbytky. Ty mohou zablokovat xylanázové a xylosidázové reakce kolem rozvětvené oblasti a způsobit pomalé a neúplné trávení. Účinná a úplná degradace XOS vyžaduje spolupráci různých enzymů, včetně  $\beta$ -xylosidázy,  $\alpha$ -glukuronidázy,  $\alpha$ -L-arabinosidázy nebo acetyl-xylan-esterázy. Bifidobakterie mohou metabolizovat xylooligosacharidy, ale tato schopnost závisí na účinnosti jejich xylanolytických enzymových systémů (Zeng et al., 2007).

XOS na sebe mohou mít navázané fenoly (včetně kyseliny ferulové a kyseliny kumarové), což jim přidává na antioxidačním účinku a imunomodulační aktivitě (Singh et al., 2015). Mají významný prebiotický potenciál, přestože jsou ve srovnání s fruktooligosacharidy (FOS) a galaktooligosacharidy (GOS) používány méně. V současné době je hlavním zdrojem pro produkci XOS kukuřice a jako alternativní zdroje xylanu je třeba prozkoumat rýžové otruby a proso, protože vzhledem k omezené dostupnosti xylanu v komerčním měřítku je vhodné najít zdroj ze zemědělských odpadů (Ayyappan et al., 2017).



**Obrázek 12: Jedna z možností struktury xylanu** (www.wikipedia.org)

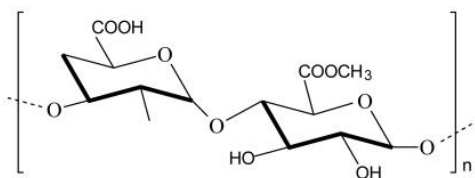
### 3.3.6 Pektiny

Pektiny jsou všudypřítomné rostlinné polysacharidy. Nachází se v buněčných stěnách ve střední vrstvě (mezi primární a sekundární buněčnou stěnou). Pektinové struktury představují obrovskou strukturální rozmanitost, mohou mít různé fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti, které jsou užitečné v širokém spektru aplikací. Chemická struktura pektinu je heterogenní, v závislosti na původu, umístění v rostlině a extrakční metodě. Hlavní struktura je tvořena zbytky uronové kyseliny spojenými pomocí  $\alpha$ -1-4-glykosidických vazeb (Müller-Maatsch et al., 2016). Tato frakce je známá jako tzv. „hladká oblast“ a občas je přerušena tzv. „vlasovou oblastí“, kde se nacházejí postranní řetězce tvořené řadou neutrálních cukrů (Míguez et al., 2016).

Podle definic FAO (Food and Agriculture organization) a WHO (World Health Organization) pro potravinářské přídatné látky a Evropské komise musí pektin obsahovat nejméně 65 % kyseliny galakturonové. Pektiny jsou široce používány jako technologické pomocné látky v potravinářském průmyslu a je využívána jejich strukturální rozmanitost. Rozdílná struktura vede k různým gelovacím vlastnostem, emulzním aktivitám, stabilitě

emulze a účinkům uvolňování v komplexních matricích potravin. Mimo jiné se pektin používá ve farmaceutických přípravcích jako funkční složka pro kontrolu uvolňování oligomerů vykazujících prebiotickou aktivitu (Müller-Maatsch et al., 2016). V současné době jsou hlavními zdroji pektinu jablečné výlisky a citrusová buničina (Míguez et al., 2016).

Částečnou hydrolyzou pektinů lze získat oligosacharidy (pectic oligosaccharides, POS), které mají velmi složitou strukturu. POS byly navrženy jako nová třída prebiotik, která je schopna vyvinout řadu zdravotně prospěšných účinků, jako jsou stimulace apoptózy u buněk adenokarcinomu tlustého střeva, potenciál kardiovaskulární ochrany *in vivo*, snížení poškození těžkými kovy, antiobezní účinky, antitoxické, antiinfekční, antibakteriální a antioxidační vlastnosti. (Míguez et al., 2016).

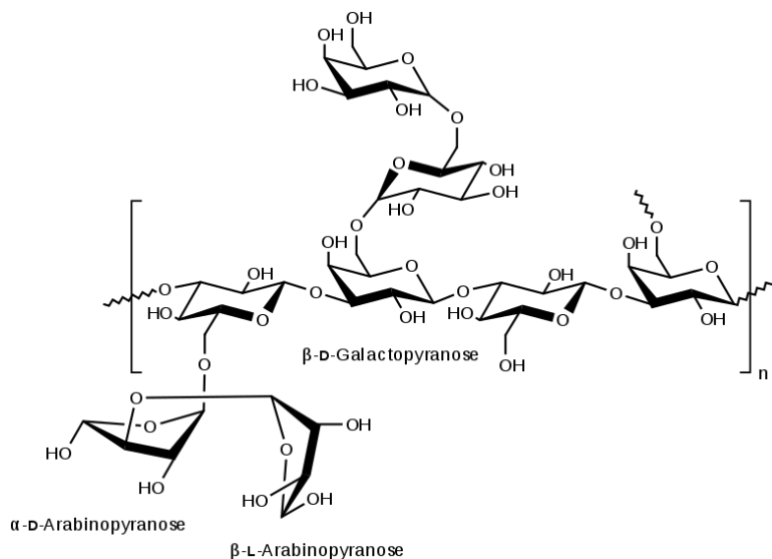


**Obrázek 13: Strukturní vzorec pektinu** ([www.researchgate.net](http://www.researchgate.net))

### 3.3.7 Arabinogalaktan

Arabinogalaktany patří do skupiny sacharidů známých jako hemicelulózy, které se hojně vyskytují v buněčných stěnách rostlinných buněk. Ve většině rostlin se arabinogalaktany vyskytují v kovalentní vazbě s proteinem (jako proteoglykany nebo jako glykoproteiny). Proteinová část bílkovin asociovaných s arabinogalaktanem je typicky bohatá na hydroxyprolin, serin, alanin, treonin a glycin a je rezistentní na proteolýzu ve svém přirozeném stavu. Arabinogalaktany jsou již tisíce let součástí lidské stravy. Byly zjištěny v semenech, listech, kořenech, ovoci a xylému všech vyšších rostlin. Hlavními zdroji v lidské stravě je ovoce a zelenina (pórek, mrkev, hrušky, kukuřice a další), ale i léčivé bylinky (*Echinacea*, *Curcuma longa* a další). Hlavními komerčními zdroji arabinogalaktanu jsou severoamerické modřínky, které jsou geneticky odlišné od evropských druhů (Kim et al., 2002; Dion et al., 2016).

Arabinogalaktan se skládá ze dvou monomerů, D-galaktózy a L-arabinózy, se stopami uronové kyseliny. Společný výbor odborníků FAO a WHO pro potravinářské přídatné látky (JEFCA) zahrnul arabinogalaktan do oddílu „Želírovací činidla, zahušťovací činidla, stabilizátory rostlinného původu“ a zaregistroval jej pod číslem E 409 (Grube et al., 2012).



**Obrázek 14: Strukturní vzorec arabinogalaktanu** (www.wikipedia.org)

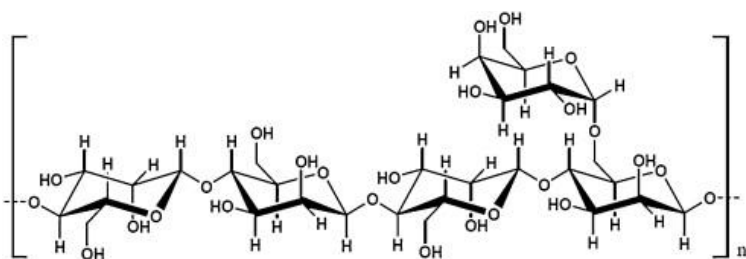
Arabinogalaktan je klasifikován jako vláknina, protože odolává trávení enzymy ve slinách i v tenkém střevě a do tlustého střeva vstupuje v neporušeném stavu, kde je fermentován rezidentní mikrobiotou (Grube et al., 2012). Vlastnosti arabinogalaktanů závisí na jejich původu a mohou zahrnovat ochranu střevní sliznice a funkce tlustého střeva, podporu trávení a zlepšení střevní mikrobioty, zlepšení stresem indukovaných gastrointestinálních dysfunkcí, účinek na vaskulární permeabilitu, účinek na metastatické onemocnění a posílení imunitní funkce (Dion et al., 2016).

### 3.3.8 Guma z rohovníku

Rohovník obecný (*Ceratonia siliqua*) je rostlina z čeledi bobovitých. Plodům se přezdívá svatojánský chléb nebo karob (Obr. 16). Z plodů se izoluje guma, která je povoleným potravinářským aditivem pod číslem E 410. Obsahuje hlavně hydrokoloidní polysacharid s vysokou molekulovou hmotností, složený z jednotek galaktopyranózy a mannopyranózy, které jsou vázány prostřednictvím glykosidických vazeb a mohou být

chemicky nazvány jako galaktomanan (Mortensen et al., 2017). Struktura se podobá guarové gumě, rozdíl je v úrovni D-galaktózového postranního řetězce (má menší počet galaktózových jednotek). Guma z rohovníku je částečně rozpustná ve vodě a používá se jako zahušťovadlo. Kombinace s karagenanem, agarem, xanthanovou a guarovou gumou má synergický efekt. Podobně jako u guarové gumy je viskozita a stabilita velmi ovlivněna změnami pH (Sheweta et Deepak, 2014; Saha et al., 2017).

Guma z rohovníku je považována za první galaktomanan, používaný jako aditivum v průmyslových odvětvích (papírenský, textilní, farmaceutický, kosmetický a potravinářský průmysl). Díky své schopnosti vytvářet velmi viskózní vodný roztok v poměrně nízké koncentraci se používá jako stabilizátor a náhrada tuků v mnoha potravinářských produktech (Sheweta et Deepak, 2014). Řadí se do rozpustné vlákniny a díky vlivu na viskozitu a strukturu potravin může měnit rychlost rozkladu sacharidů během trávení. To může mít příznivé účinky na regulaci postprandiální hladiny cukru a hladiny inzulínu v krvi, a také může působit preventivně při léčbě obezity a diabetu. Viskózní rozpustná vláknina, jako je svatojánský chléb, zpomaluje postprandiální glykémii důsledněji než pšeničné otruby a jiná nerozpustná vláknina (Anderson et al., 2001). Zařazení této gumy do jídelníčku může být přínosem i při snižování zánětu a zánětlivých onemocnění střev, Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy. Fyziologický účinek a viskozitní vlastnosti gumy ze svatojánského chleba jsou srovnatelné s guarovou gumou a  $\beta$ -glukanem (Sheweta et Deepak, 2014).



**Obrázek 15: Strukturní vzorec gumy z rohovníku (Sheweta et Deepak, 2014)**

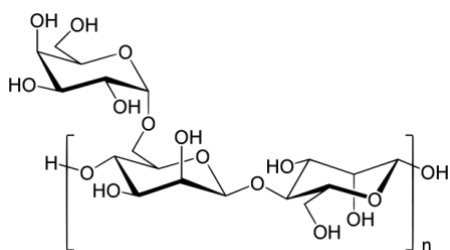


**Obrázek 16: Svatojánský chléb (www.lbg.it)**

### 3.3.9 Guarová guma

Guarová guma (E 412) je endosperm semen luštěniny *Cyamopsis tetragonolobus*, ve formě prášku. Endosperm obsahuje komplexní polysacharid nazývaný galaktomanan, což je polymer d-galaktózy a d-manózy. Tento polymer je bohatý na hydroxylové skupiny, ve vodě vytváří vodíkové vazby, roztok zahušťuje a zvyšuje jeho viskozitu. Díky svým zahušťovacím, emulgačním, vázacím a gelovacím vlastnostem, rychlé rozpustnosti ve studené vodě, široké stabilitě v různém pH, schopnosti vytvářet film a biologické odbouratelnosti nalézá uplatnění ve velkém počtu průmyslových odvětví. V posledních několika desetiletích bylo provedeno hodně výzkumů guarové gummy, která se hodí do konkrétních aplikací (Thombare et al., 2016).

Guarovou gumu je možné využít jako zdroj rozpustné vlákniny, může snížit glykemickou odpověď organismu, záněty a zánětlivá onemocnění střev. Je bezpečná také pro zvířata a je široce využívána v krmivech. Množství konzumované guarové gummy je však omezeno (v potravinách na 2 % obsahu) vzhledem k tomu, že nadměrná koncentrace gummy v potravinách může způsobit trávicí obstrukci a jiné související problémy (Thombare et al., 2016). Těmto problémům se lze vyhnout použitím částečně hydrolyzované guarové gummy. V adekvátním množství guarová guma snižuje zácpu a související chronická střevní onemocnění, jako je divertikulóza, Crohnova choroba a syndrom dráždivého střeva (Takahashi et al., 2009). Díky svým vlastnostem tvorby gelu vykazuje účinky na snížení cholesterolu a glukózy. Snižuje hlad a touhu po jídle, což pomáhá při úbytku hmotnosti a prevenci obezity. Pomáhá také proti průjmům, choleře a snižuje hladinu cholesterolu v krvi (Rideout et al., 2008).



**Obrázek 17: Strukturní vzorec guarové gummy** ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org))



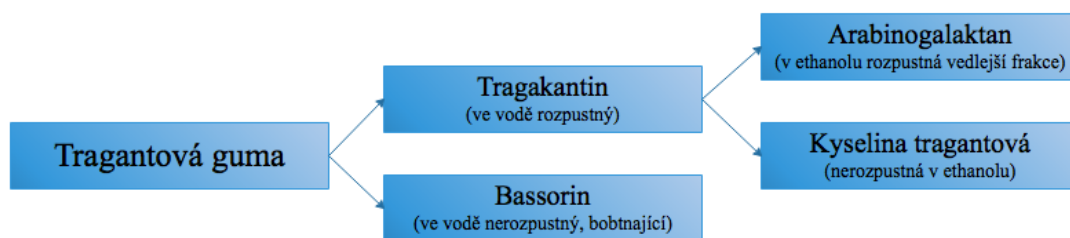
**Obrázek 18: Lusk *Cyamopsis tetragonolobus* a guma guar** ([www.jayrajinternational.com](http://www.jayrajinternational.com))



### 3.3.10 Tragantová guma

Tragantová guma pochází ze stonků některých asijských druhů *Astragalus* (kozinec). Rostliny vytváří gumu ve středu kořene a stonku. Po rozříznutí se vylučuje ve formě „stužek“ nebo „vloček“, které při sušení křehnou (Gavlighi, 2013). Tragantová guma se skládá ze dvou hlavních frakcí – kyselé (rozvětvené a ve vodě rozpustné části s vysokou molekulovou hmotností, nazývané tragacanthin) a bobtnající (ve vodě nerozpustné části, nazývané bassorin; Gavlighi, 2013; Moradi et al., 2017).

Tragantová guma je schválena jako potravinářská přídatná látka s označením E 413. Rychle bobtná v chladné i horké vodě, v potravinářském průmyslu je komerčně využívána jako přírodní emulgátor (Saha et al., 2017). Ve srovnání s ostatními gumami je tragantová guma poměrně stabilní v širokém rozmezí pH, až po extrémně kyselé podmínky při pH 2 (Gavlighi, 2013). Kromě vysoké stability v širokém rozmezí teplot a pH vykazuje vysokou odolnost vůči mikrobiálnímu napadení (Saha et al., 2017).



**Obrázek 19: Frakce tragantové gumy** (upraveno podle Gavlighiho, 2013)



**Obrázek 20: *Astragalus* – kořen** (www.selfhacked.com)

### 3.3.11 Arabská guma

Arabská guma je pryskyřice získávaná z některých druhů akácií (akácie senegalská – *Acacia senegal*, akácie arabská – *Acacia seyal*). Hlavní a postranní řetězec arabské gumy se skládá z  $\beta$ -D-galaktopyranosylových jednotek spojených 1,3 vazbou a připojených k hlavnímu řetězci pomocí 1,6 vazeb. Jedná se o dobře stravitelnou směs sacharidů a glykoproteinů, která se používá v potravinářství jako aditivum s označením E 414. Uplatnění nachází především jako stabilizátor, emulgátor a zahušťovadlo, ale i v podobě povlaků k prodloužení skladovatelnosti ovoce a zeleniny. Dále se hojně využívá v lékařství, v malířství (součást klovatiny a fixativu) nebo jako lepidlo na poštovních známkách a papírcích k balení tabáku. Arabská guma nemá vlastní výraznou vůni, ale snadno přebírá vonné vlastnosti jiných látek, a proto se využívá jako součást bylinných vonných směsí (Saha et al., 2017).

Arabská guma se řadí mezi dietní vlákninu, protože není trávena v tenkém střevě, ale dosáhne střeva tlustého, kde je fermentována za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem. Vzhledem ke svým fyzikálním vlastnostem arabská guma zpomaluje vstřebávání glukózy, zvyšuje hmotnost stolice a odstraňuje žlučové kyseliny. Je schopna selektivně zvýšit počet bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií u zdravých jedinců. Všechny tyto vlastnosti podporují potenciální úlohu arabské gumy jako prebiotického doplňku stravy (Khalid et al., 2014).



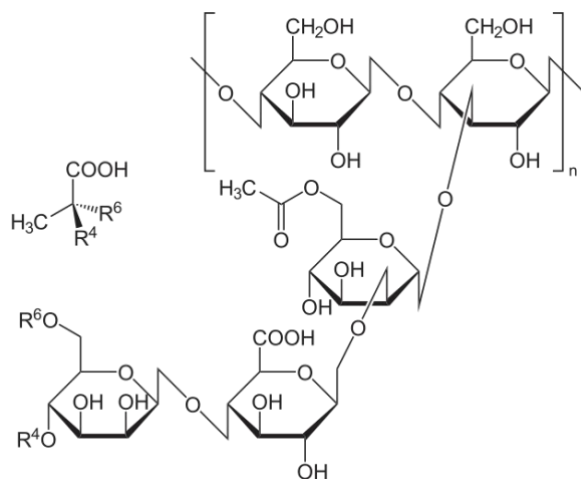
**Obrázek 21: Arabská guma** (www.britannica.com)

### 3.3.12 Xantanová guma

Xantanová guma byla objevena v padesátých letech minulého století (García-Ochoa et al., 2000). Je to mikrobiální exopolysacharid vyrobený průmyslově z uhlíkových zdrojů fermentací za použití gramnegativních bakterií *Xanthomonas* spp. Mezi mikrobiálními gumami zaujímá xanthan významné místo na trhu díky tomu, že má relativně odlišné

reologické vlastnosti, jako je vysoký stupeň pseudoplasticity, vysoká viskozita i při nízkých koncentracích, kompatibilita s většinou solí, vynikající rozpustnost a stabilita v kyselých a alkalických roztocích a odolnost proti degradaci při různých hodnotách pH a vysokých teplotách (Kang et Pettitt 1993; Habibi et al., 2017). Hlavní řetězec sestává z jednotek  $\beta$ -d-glukózy spojených v polohách 1 a 4 a chemická struktura hlavního řetězce je shodná se strukturou celulózy (García-Ochoa et al., 2000; Sotiropoulos et al., 2017). Postranní řetězce trisacharidů obsahují skupiny kyseliny glukuronové, manóзовé jednotky a pyruvátové zbytky (Sotiropoulos et al., 2017).

Bezpečnost a aplikace xanthanové gumy v potravinářském a farmaceutickém průmyslu byla rozsáhle zkoumána. Na základě toho byl xanthan schválen FDA pro použití jako aditiva bez jakýchkoli konkrétních množstevních omezení, s označením E 415. Přidání gumy z rohovníku nebo guarové gumy ke xanthanové gumě má synergické účinky (García-Ochoa et al., 2000). Výtěžek a vlastnosti produkce xanthanové gumy jsou ovlivňovány použitým mikrobiálním kmenem, pH, teplotou, mícháním a provzdušňováním. Odlišnost od ostatních gum a přednosti xanthanové gumy z ní činí vhodnou složku mnoha potravin (Habibi et al., 2017).



**Obrázek 22: Strukturní vzorec xanthanové gumy** (www.wikipedia.org)

### 3.3.13 Karayaová guma

Karayaová guma je exsudát rostliny sterkulie neboli lejnice pálivé (*Sterculia urens*), dřeviny z čeledi slézovité. Kompozice gummy závisí na druhu, ze kterého je odvozena. Chemicky se jedná o kyselý polysacharid složený z galaktózy, ramnózy a kyseliny galakturonové (Mirhosseini et al., 2012; Saha et al., 2017). Má podobné vlastnosti jako tragantová guma. Ve vodě je přírodní karayaová guma nerozpustná a pouze bobtná, vytváří gel (Postulkova et al., 2017; Saha et al., 2017). Je také rezistentní vůči hydrolýze mírnou kyselinou a částečně rezistentní vůči bakteriální a enzymatické degradaci (Postulkova et al., 2017). Karayaová guma se používá v potravinářství jako stabilizátor, emulgátor a zahušťovadlo pod označením E 416, a to především v mléčných výrobcích a pekárenském průmyslu. Ve farmaceutickém průmyslu se využívá jako projímadlo (Saha et al., 2017).



Obrázek 23: Plod lejnice (*Sterculia urens*)

## 4 Vlastní práce

### 4.1 Materiál a metody

Bylo vybráno celkem 117 kmenů bifidobakterií na testování schopnosti růstu a využití 13 různých substrátů. Jednalo se o 60 druhů a poddruhů bifidobakterií, pocházejících z různých ekologických nik (lidské, zvířecí, potravinové a odpadní zdroje). Kromě oficiálních sbírkových typových kmenů byly testovány další „netypové“ oficiální sbírkové kmeny, a dále kmeny izolované na katedře Mikrobiologie, výživy a dietetiky na ČZU a jinde. Všechny testované kmeny byly identifikovány na druhovou a poddruhovou úroveň. Celý a podrobný seznam a informace ke kmenům jsou uvedeny v Tab. 1 (přílohy). Kmeny byly testovány pro jejich schopnost využít substráty jako jsou arabská guma, guarová guma, pektin, xylan, arabinogalaktan, a další – celkem bylo připraveno 13 druhů tekutých API 50 CHL médií, ve kterých byl testovaný substrát jediným zdrojem uhlíku. Jako pozitivní kontrola bylo použito médium s glukózou a jako negativní kontrola čisté médium bez zdroje uhlíku. Testování probíhalo *in vitro* v mikrotitračních destičkách. Využití testovaného substrátu daným kmenem se projevilo změnou barvy, jelikož zde došlo ke tvorbě metabolitů a snížení pH. Metabolity (především laktát a acetát) byly dále měřeny v aniontové formě po 48 hodinách anaerobní kultivace v API 50 CHL médiu pomocí iontoměničové chromatografie (IC) s potlačenou vodivostí.

### 4.2 Příprava bakteriálních kultur pro test

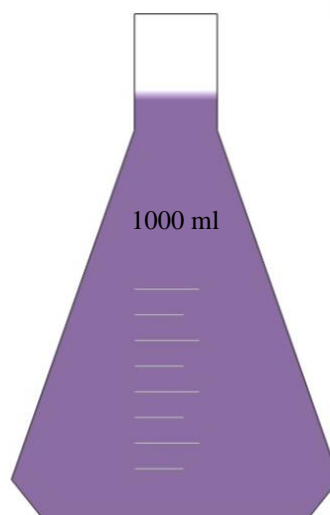
Dva dny před pokusem byly testované kultury přeočkovány do Wilkins-Chalgrenova živného bujónu, médium bylo „proubláno“ oxidem uhličitým a zbaveno kyslíku a následně uzavřeno vzduchotěsným uzávěrem. Následovala kultivace po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C. Každý vzorek byl přeočkován dvakrát, pro možnost výběru lépe narostlé kultury. Správně narostlá kultura byla vybrána podle většího zákalu. Poté proběhla kontrola čistoty kultury pod světelným mikroskopem. Kapka vzorku byla aplikována injekční stříkačkou na podložní sklíčko, přikryta krycím a sledována na základě mikroskopie s fázovým kontrastem. Čistá kultura se vyznačuje výskytem nepravidelných tyčinek bifidobakterií, bez koků, laktobacilů apod. Pouze čistá kultura je použitelná pro další testování.

### 4.3 Příprava substrátů pro test

Bylo připraveno celkem 13 druhů tekutých API 50 CHL médií, ve kterých byl testovaný substrát v 0,2% koncentraci jediným zdrojem uhlíku. Jako pozitivní kontrola bylo použito médium s glukózou a jako negativní kontrola čisté médium bez zdroje uhlíku. Byly použity suroviny od firem Sigma a Oxoid.

Všechny suroviny (Obr. 24) byly smíchány v 1,5 l destilované vody. Bylo odpipetováno 15 x 100 ml média do laboratorních lahvíček. Poté bylo do 14 lahvíček přidáno po 0,2 g daného substrátu a rozmícháno (Tab. 2). U jablečného a citrusového pektinu bylo upraveno pH z hodnot 5,8-5,9 na 6,8-6,9.

Polypepton	10 g
Kvasinkový extrakt	5 g
Tween 80	1 ml
Hydrogenuhličitan draselný	2 g
Octan sodný	5 g
Diamonium-citrát	2 g
Síran hořečnatý	0,2 g
Bromkresolová červeň	0,17 g
Demineralizovaná voda	1000 ml
→ Testovaný substrát (Tab. 2)	0,2 g/100 ml



**Obrázek 24: Složení API 50 CHL média**

**Tabulka 2: Seznam testovaných substrátů**

Testovaný substrát	Označení	výchozí pH
Kontrola	A	6,87
Glukóza	B	7,30
Bramborový škrob	C	7,18
Celulóza	D	7,20
Lignin	E	6,89
Xylan	F	7,05
Jablečný pektin	G	5,88
Citrusový pektin	H	5,86

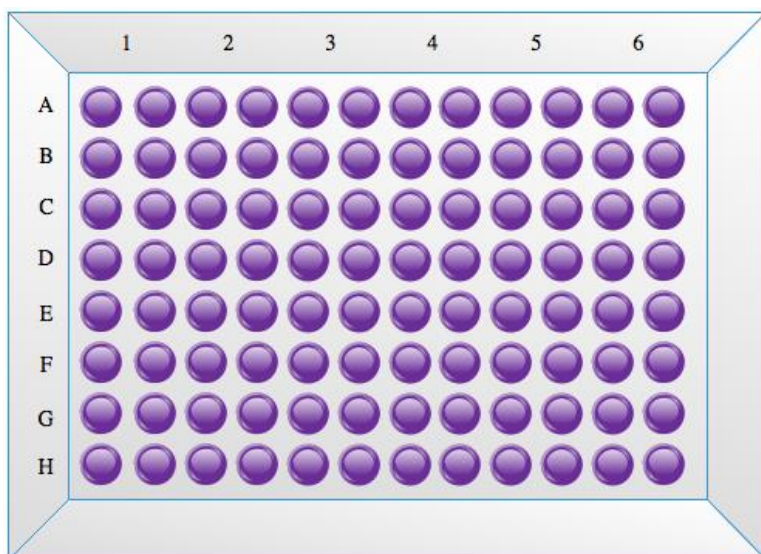
Arabinogalaktan	I	7,10
Guma z rohovníku	J	7,30
Guarová guma	K	7,33
Tragantová guma	L	7,17
Arabská guma	M	7,11
Xanthanová guma	N	7,16
Karayaová guma	O	6,70

#### 4.4 Využití substrátu kulturou

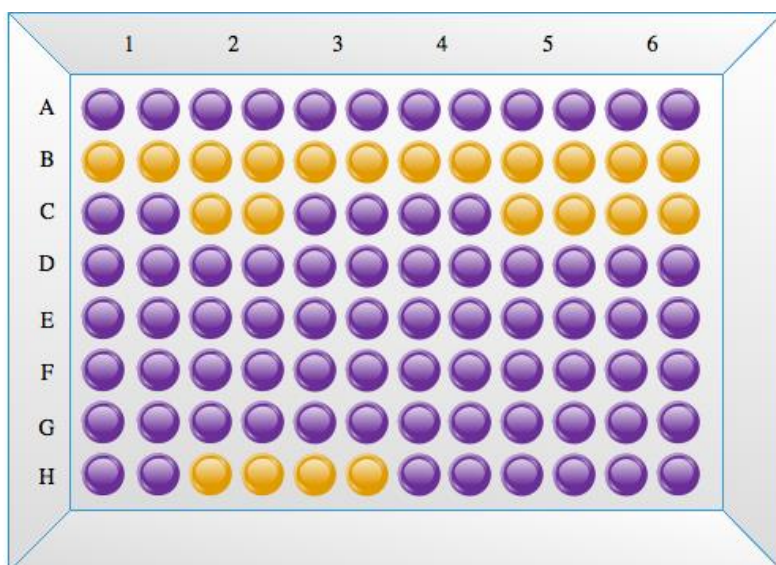
Před založením testu byl připraven potřebný počet mikrotitračních destiček a nadepsán předem zvolenými čísly (pro testované kmeny) a písmeny A-O (pro testované substráty). V jedné destičce o 12x8 jamkách bylo testováno 6 kmenů a 8 substrátů (Obr. 25). Substrátová média byla po jednom asepticky injekční stříkačkou převáděna do sterilních Petriho misek a pipetována v objemu 180  $\mu$ l do každé jamky příslušného řádku. Každé substrátové médium bylo pro daný kmen napipetováno ve dvou kopiích, pro přesnější vyhodnocení testu. Destička byla vždy po naplnění médií uzavřena.

Bakteriální kmeny bylo potřeba před založením testu stočit v centrifuze. Množství 1 ml substrátu bylo injekční stříkačkou převedeno do 1,5 ml Eppendorf zkumavky, ta byla ihned uzavřena a všechny zkumavky pak umístěny do centrifugy nastavené na nejvyšší výkon, na dobu 3 minut. Supernatant byl slit a sediment nejprve opláchnut 0,5 ml bifipufu a poté v 1 ml bifipufu rozpuštěn. Každý kmen byl pipetován ve dvou sloupcích do každého substrátu v objemu 20  $\mu$ l. Bylo potřeba postupovat asepticky a rychle (kvůli anaerobním potřebám bifidobakterií). Každá destička byla po dokončení ihned uzavřena, vložena do sáčku s vyvíječem anaerobního prostředí (Thermo Scientific), umístěna do anaerostatu a anaerobně kultivována po dobu 48 hodin.

Po 48 hodinách proběhla kontrola barevného zbarvení. Pozitivní vzorek kultury, který dokázal daný substrát využít, se projevil změnou barvy, jelikož došlo ke tvorbě metabolitů, především kyseliny octové a mléčné, a snížení pH. Původní barva substrátu byla tmavě fialová, při využití substrátu kulturou se změnila na světle žlutou (Obr. 26). Po sensorickém vyhodnocení zrakem došlo u některých vzorků k jejich zpracování na analýzu metabolitů.



**Obrázek 25: Nadepsaná destička se substráty připravená k aplikaci kmenů**



**Obrázek 26: Využití substrátu kulturou a změna barvy**

#### 4.5 Měření metabolitů bifidobakterií

Laktát a acetát byly měřeny v aniontové formě po 24 hodinách anaerobní kultivace v API 50 CHL médiu, pomocí iontoměničové chromatografie (IC) s potlačenou vodivostí. Pro měření byl použit iontový chromatograf ICS 1600 (Dionex, USA) vybavený IonPac AS11-HC (Dionex, USA) a pro analýzu byly použity ochranná a analytická kolona. Eluent byl složen z 1-32,5 mM KOH, s gradientem 1-65 min a průtok byl nastaven na 1 min<sup>-1</sup>. K potlačení vodivosti eluentu byl použit odrušovač ASRS 300 (4 mm; Dionex, USA). Vzorek k měření byl 100x naředěn, proto bylo výsledky potřeba vynásobit 100x.



## 5 Výsledky a diskuse

### 5.1 Výsledky

Celkem bylo testováno 117 kmenů (60 různých druhů) pocházejících ze 4 ekologických nik – zvířecích hostitelů, lidských hostitelů, potravinových výrobků (zahrnujících i probiotické doplňky stravy) a odpadních vod. Některé rozdílné kmeny stejného druhu byly izolovány z více zdrojů (např. *B. breve* ATCC 15700 ze střeva dítěte a *B. breve* BR03 z probiotického produktu ve formě kapek). V Tab. 3 (str. 43) se nachází seznam a počet všech testovaných druhů s výsledky využití jednotlivých substrátů. Obrázky 27-29 znázorňují procentuální využití daných substrátů druhy testovaných bifidobakterií. Seznam všech testovaných kmenů i s výsledky je podrobně rozepsán v Tab. 1 (přílohy).

Bramborový škrob dokázalo využít celkem 22 lidských kmenů (11 různých druhů), 66 zvířecích kmenů (40 různých druhů), 7 kmenů izolovaných z potravin (6 různých druhů) a 3 kmeny (3 různé druhy) z odpadních vod. Dalšími nejčastěji využívanými zdroji byla guma z rohovníku a guarová guma, které dokázalo využít celkem 13 zvířecích kmenů a 8 různých druhů (guarovou gumu pouze 12 kmenů a 7 druhů, bez typového oficiálního kmene *B. tissieri*), 2 lidské druhy (*B. dentium* a *B. scardovii*) a gumu z rohovníku pak ještě jeden typový oficiální kmen izolovaný z odpadních vod (*B. thermacidophilum* subsp. *thermacidophilum*). Arabinogalaktan využilo 5 lidských druhů bifidobakterií (*B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *globosum*), 2 zvířecí (typové oficiální kmeny *B. aesculapii* a *B. bohemicum*), 2 z potravinových zdrojů (typový oficiální kmen *B. crudilactis* ze syrového mléka a sýrů a *B. longum* subsp. *longum* izolovaný z probiotického produktu NUTRA BONA). Celulózu dokázal využít pouze typový oficiální kmen *B. minimum*, izolovaný z odpadních vod. Jablečný a citrusový pektin dokázaly využít celkem 3 zvířecí kmeny (všechny typové, oficiální), a to *B. bohemicum* z trávicího traktu čmeláka, *B. eulemuris* z výkalů lemura a *B. tissieri* z výkalů mláďete kočkodana. Tragantovou gumu dokázal využít pouze jeden lidský kmen (typový oficiální kmen *B. longum* subsp. *longum* ze střeva dospělého člověka), jeden zvířecí (typový oficiální kmen *B. aesculapii* z výkalů kosmana bělouchého) a jeden potravinový (typový oficiální kmen *B. crudilactis*). Arabskou gumu využily 2 lidské kmeny (typový oficiální kmen *B. catenulatum* z lidské stolice a *B. longum* subsp. *longum* ze stolice afrického kojence) a 5 zvířecích kmenů (pouze 2 druhů, *B. aesculapii* a *B. animalis* subsp.

*animalis* z telecích výkalů). Karayovou gumu využily celkem 3 zvířecí kmeny (typové oficiální kmeny *B. tissieri* a *B. bohemicum* a neoficiální *B. pseudocatenulatum*) a xanthanovou gumu pouze jeden zvířecí kmen (*B. pseudocatenulatum*). Lignin a xylan nedokázal využít ani jeden z testovaných kmenů.

Dále jsme u několika vybraných kmenů a substrátů změřili produkované metabolity. V Tab. 4 (str. 49) se nachází naměřené hodnoty u oficiálních sbírkových kmenů *B. dentium* (20436), *B. moukalabense* (27321), *B. stellenboschense* (23968) a *B. longum* subsp. *infantis*, (20088) v médiích s glukózou, škrobem, gumou z rohovníku a guarovou gumou. Jsou zde uvedeny hodnoty pro laktát, acetát a formiát, jakožto hlavní metabolity, které byly naměřeny v nejvyšších koncentracích. Dále je uveden přibližný (zaokrouhlený) poměr těchto metabolitů. Všechny kmeny na všech substrátech produkovaly největší množství acetátu, následoval laktát a formiát. Jako kontrola bylo použito čisté médium bez zdroje uhlíku, u kterého byly naměřeny velice nízké hodnoty laktátu a acetátu, odpovídající hodnotám u vzorků nevykazujících růst. Na obrázku 30 (str. 49) je grafické znázornění množství naměřených metabolitů.

Tabulka 3: Testované druhy a výsledky využití daného substrátu

Druh	Počet kmenů	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. actinocoloniiforme</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	3	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>B. aesculapii</i>	1	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1	-	-
<i>B. angulatum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	9	9	-	-	-	-	-	-	7	7	-	4	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	9	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. asteroides</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. avesanii</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. biavati</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	6	4	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>B. bohemicum</i>	1	1	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	1
<i>B. bombi</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. boum</i>	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. breve</i>	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. callitrichos</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. catenulatum</i>	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>B. coryneforme</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Druh	Počet kmenů	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. crudilactis</i>	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-
<i>B. cuniculi</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. dentium</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
<i>B. eulemuris</i>	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. gallicum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. gallinarum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. hapali</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. choerinum</i>	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. indicum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. kashiwanohense</i>	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	3	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	3	1	-	-	-	-	-	2	-	-	1	1	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>suillum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. magnum</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. merycicum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. minimum</i>	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. mongoliense</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Druh	Počet kmenů	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. moukalabense</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
<i>B. myosotis</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i>	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>B. pseudolongum</i>	6	4	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	4	4	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>longum</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. psychraerophilum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pullorum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. ramosum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. reuteri</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. ruminantium</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. saeculare</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. saguini</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. scardovii</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
<i>B. stellenboschense</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. stercoris</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

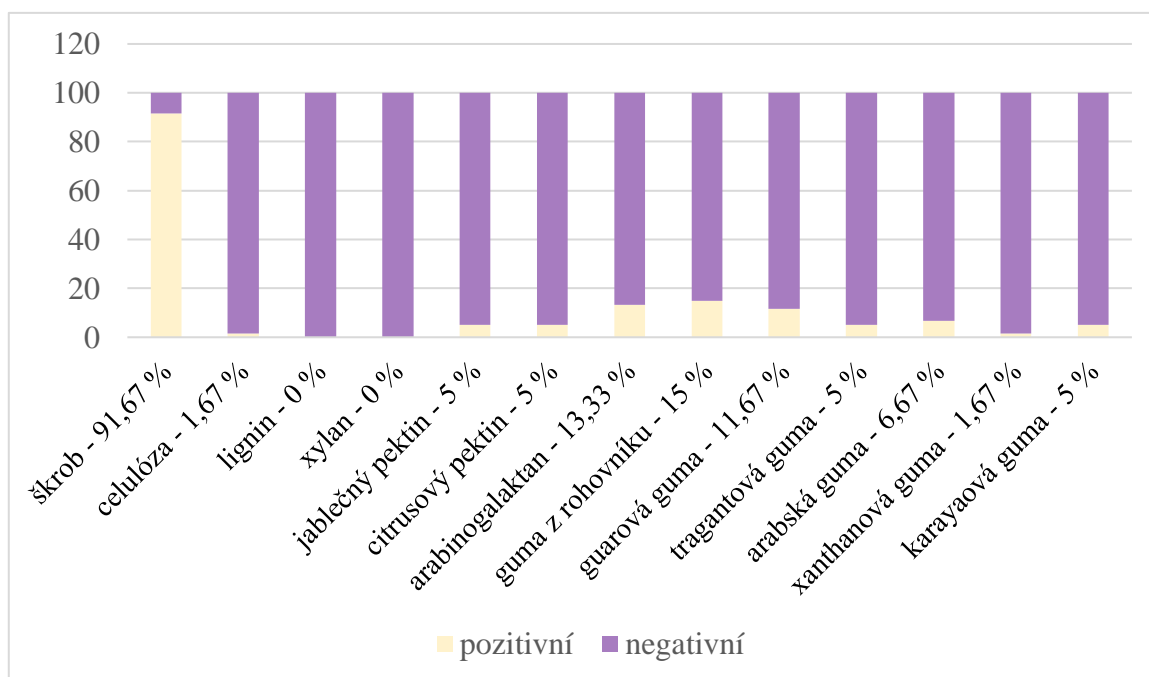
Druh	Počet kmenů	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. subtile</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thermacidophilum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>B. thermophilum</i>	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. tissieri</i>	1	1	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	1
<i>B. tsurumiense</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-

#### Vysvětlivky k tabulce:

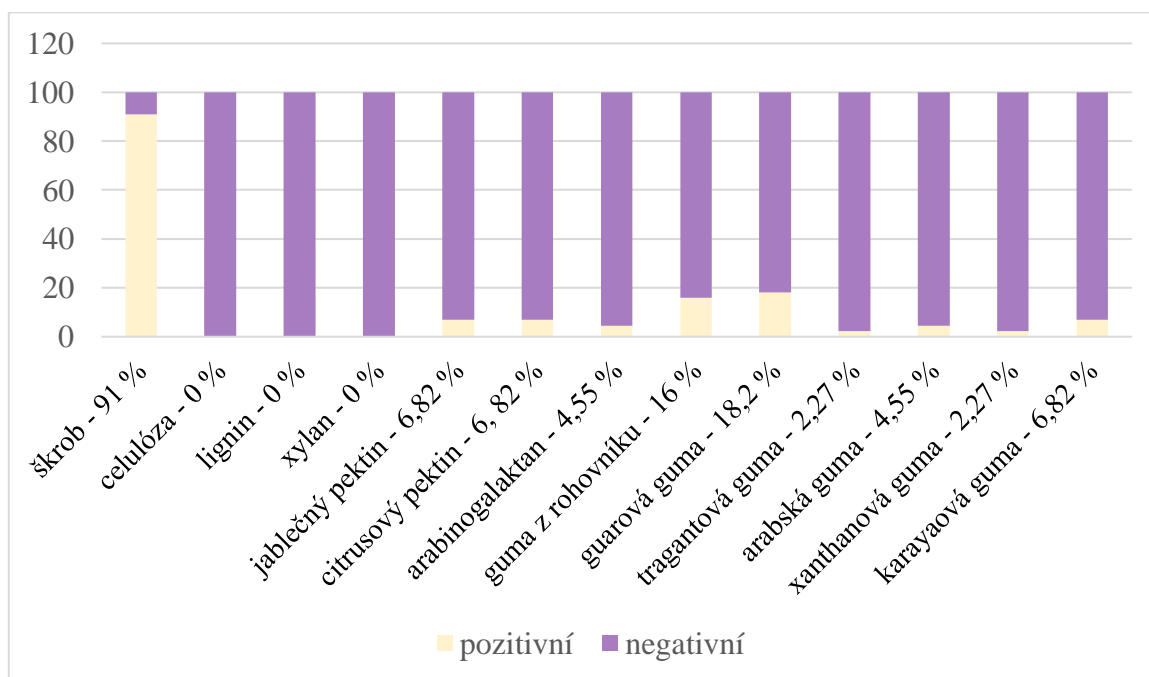
Počet kmenů : počet testovaných kmenů daného druhu (v případě 1 testovaného druhu se jednalo o typový oficiální kmen)

Znaménko - : ani jeden z testovaných druhů nedokázal daný substrát využít

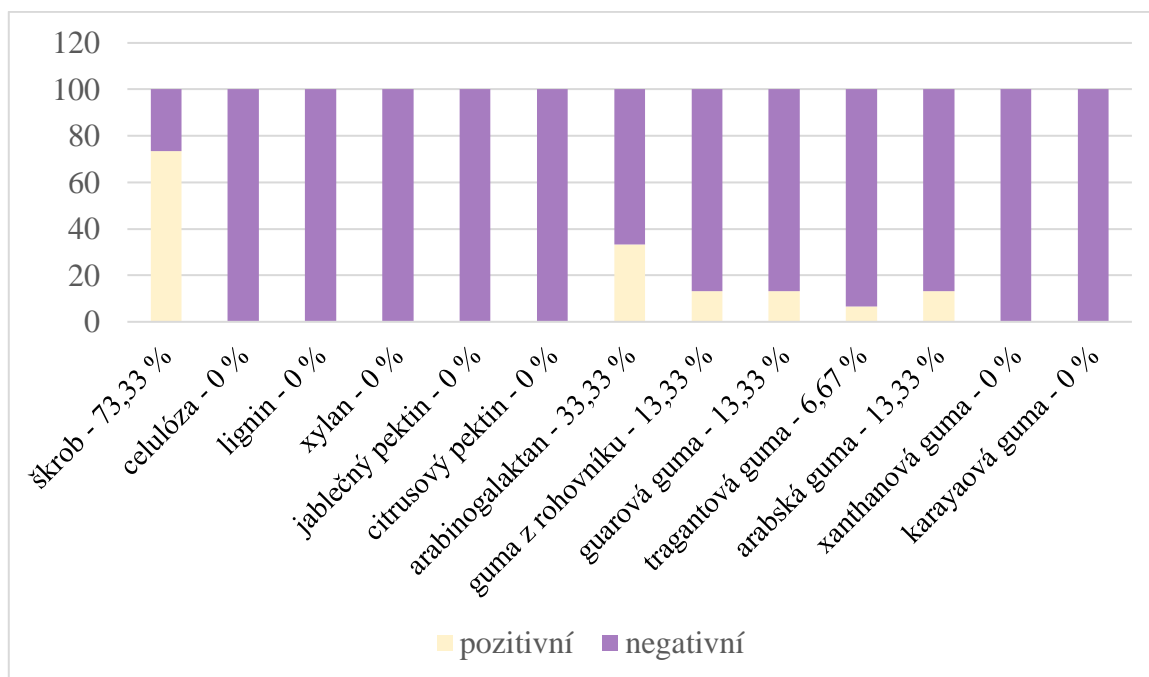
Číslo 1-X : počet druhů daného kmene, které dokázaly daný substrát využít



**Obrázek 27: Procentuální vyjádření využití jednotlivých substrátů 60 testovanými druhy bifidobakterií bez ohledu na jejich původ**



**Obrázek 28: Procentuální vyjádření využití jednotlivých substrátů 44 testovanými zvířecími druhy bifidobakterií**



**Obrázek 29: Procentuální vyjádření využití jednotlivých substrátů 15 testovanými lidskými druhy bifidobakterií**

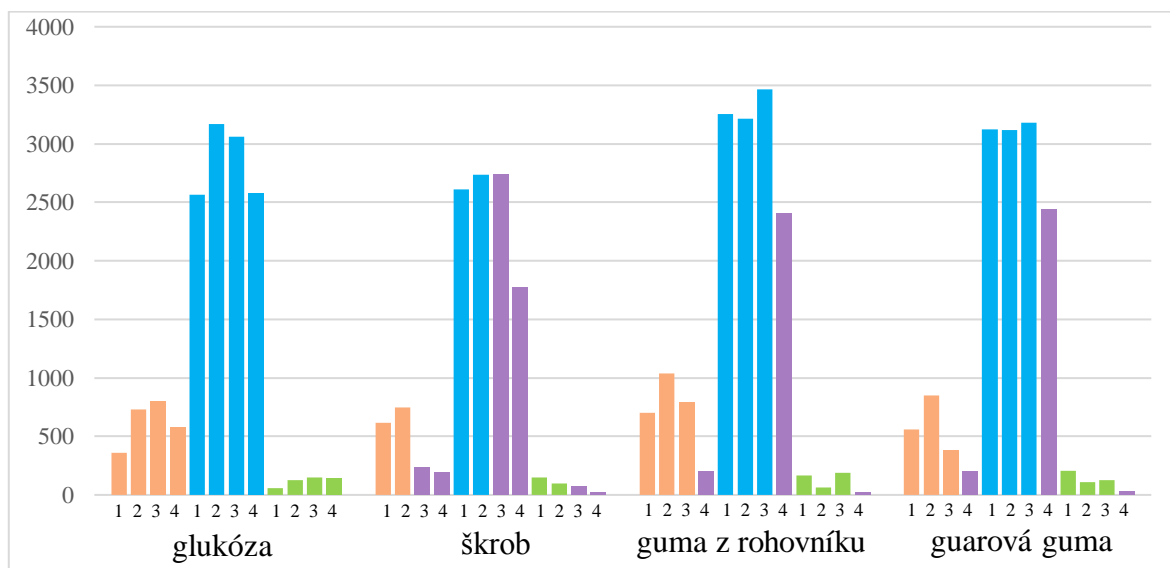


**Tabulka 4: Naměřené metabolity u vybraných kmenů a substrátů**

Substrát	Kmen	Laktát (mg.l <sup>-1</sup> )	Acetát (mg.l <sup>-1</sup> )	Formiát (mg.l <sup>-1</sup> )	Poměr L:A:F
glukóza	<i>B. dentium</i>	360,23	2562,51	60,45	1:7:0,2
škrob	<i>B. dentium</i>	613,27	2611,32	150,51	1:4:0,3
guma z rohovníku	<i>B. dentium</i>	699,77	3256,65	165,99	1:5:0,3
guarová guma	<i>B. dentium</i>	558,02	3121,12	203,65	1:5:0,3
glukóza	<i>B. moukalabense</i>	732,67	3167,84	128,76	1:4:0,2
škrob	<i>B. moukalabense</i>	746,86	2738,17	94,72	1:4:0,1
guma z rohovníku	<i>B. moukalabense</i>	1037,2	3213,26	61,42	1:3:0,1
guarová guma	<i>B. moukalabense</i>	848,19	3119,83	108,46	1:4:0,1
glukóza	<i>B. stellenboschense</i>	795,14	3061,59	149,47	1:4:0,2
škrob	<i>B. stellenboschense</i>	233,27	2741,92	74,82	1:12:0,3
guma z rohovníku	<i>B. stellenboschense</i>	791,51	3467,84	190,73	1:5:0,3
guarová guma	<i>B. stellenboschense</i>	380,44	3178,79	124,85	1:8:0,3
glukóza	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	580,80	2575,60	136,04	1:5:0,3
škrob	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	192,35	1770,28	18,63	1:10:0,1
guma z rohovníku	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	204,85	2403,81	24,36	1:12:0,1
guarová guma	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	198,15	2439,04	26,47	1:13:0,1
kontrola	-	149,9	2392,08	24,95	1:16:0,2

**Vysvětlivky k tabulce:**

Žlutý substrát – byl využit testovaným kmenem, fialový substrát – nebyl využit.



**Obrázek 30: Naměřené metabolity u vybraných kmenů a substrátů**

**Vysvětlivky k obrázku:**

1: *B. dentium*, 2: *B. moukalabense*, 3: *B. stellenboschense*, 4: *B. longum* subsp. *infantis*

Barvy: laktát, acetát, formiát, kmen nedokázal substrát využít.

## 5.2 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo stanovit schopnost různých kmenů bifidobakterií pocházejících z rozdílných ekologických nik využít vybrané substráty. Bylo testováno celkem 117 kmenů (60 druhů) rodu *Bifidobacterium* a 13 substrátů, které byly v médiu jediným zdrojem uhlíku. Dále pak byly měřeny metabolity u vybraných bifidobakterií a substrátů.

U bifidobakterií obecně byla prokázána schopnost fermentovat glukózu, galaktózu a fruktózu, nicméně mezi jednotlivými kmeny a druhy bifidobakterií existují rozdíly ve fermentaci dalších komplexních sacharidů a alkoholů. Fyziologické údaje potvrzují, že některé bifidobakterie dokáží využít širokou škálu sacharidů, jako jsou xylooligosacharidy, pektin, fruktooligosacharidy, rostlinné oligosacharidy a mucin. U některých bifidobakterií se zdá, že získaly své metabolické schopnosti, aby dokázaly využít energii z glykanů hostitele (jako je mucin) – tato schopnost se prokázala například u *B. bifidum* (Cronin et al., 2011; Bottacini et al., 2014). Cílené druhově specifické studie identifikovaly enzymy, jako je například apuB v *B. breve*, který je odpovědný za štěpení škrobu a jeho derivátů. Škrob dokáže využít mnoho kmenů bifidobakterií, jak ukazují některé studie (Cronin et al., 2011; Duranti et al., 2014; Liu et al., 2015). V testování škrobu jsem navázala na bakalářskou práci (Degradace komplexních karbohydrátů bifidobakteriemi; 2016), ve které jsme zjišťovali využití několika jeho typů bifidobakteriemi. V diplomové práci jsme zvolili pro ověření výsledků pouze bramborový škrob, protože se ukázalo, že schopnost daného kmenu škrob degradovat nezávisí na typu použitého škrobu. Potvrdili jsme, že škrob opravdu dokáže využít mnoho kmenů rodu *Bifidobacterium*. Díky tomu by se dalo o škrobu a jeho derivátech uvažovat jako o možném a dobře dostupném prebiotiku, které prospívá hostiteli tím, že stimuluje růst nebo aktivitu prospěšných bakterií v tlustém střevě. Rezistentní škrob musí splňovat tři charakteristiky, aby mohl být klasifikován jako prebiotikum – odolnost vůči prostředí horní části trávicího traktu, fermentace střevní mikrobiotou a selektivní stimulace růstu a/nebo aktivity prospěšných bakterií (Zaman et al., 2015). U škrobu je obecně známo, že kromě prospěšných bakterií podporuje i růst klostridií. Proto by vhodným substrátem na bázi škrobu mohla být Nutriosa, která v testech při konzumaci 8 g Nutriosa denně po dobu 14 dnů výrazně snížila počet *Clostridium perfringens* (Berard et al., 2009).

Škrob ale není jediným potenciálně vhodným prebiotickým substrátem pro bifidobakterie. Už v roce 1994 Crociani et al. testovali 290 kmenů bifidobakterií (29 různých

druhů) lidského i zvířecího původu na schopnost využít různé komplexní sacharidy, které se běžně vyskytují ve stravě zvířecích i lidských hostitelů. Zjistili, že *B. dentium* dokáže fermentovat guarovou gumu a gumu z rohovníku. Kmeny *B. longum* dokázaly využít například arabinogalaktan a arabskou gumu. Tyto pozitivní výsledky mohou vycházet z diety hostitele, protože arabinogalaktany jsou již tisíce let součástí lidské stravy. Byly zjištěny v semenech, listech, kořenech, ovoci a xylému všech vyšších rostlin. Jejich hlavními zdroji v lidské stravě je ovoce a zelenina, ale i léčivé bylinky (Dion et al., 2016). Calame et al. (2008) zkoumali prebiotické účinky arabské gumy (EmulGold®) na zdravé dobrovolníky konzumující různé dávky po dobu až 4 týdnů. Prokázali nárůst rodů *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Bacteroides*. Během studie nebyla zjištěna žádná významná nevýhoda a došlo se k závěru, že arabská guma může mít prebiotickou účinnost alespoň stejně dobrou jako inulin. Optimální denní dávka byla stanovena na 10 g. Pozitivní vliv arabinogalaktanu a arabské gumy na některé druhy bifidobakterií se ukázaly i v našich testech. Můžeme potvrdit výsledky Crocianiho et al. (1994). Arabinogalaktan i arabskou gumu dokázaly ve větší míře využít lidské kmeny bifidobakterií.

Geigerová et al. (2017) testovali *in vitro* vybrané fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy a inulin na bifidogenní účinky. Největší nárůst pozorovali u přípravků Vivinal® (galaktooligosacharidy) a Raftilosa P85 (fruktooligosacharidy); proto tato prebiotika dále použili pro *in vivo* testy na telatech po dobu několika týdnů. První skupině telat (PROB) podávali pouze probiotika (směs 5 kmenů bifidobakterií), druhé skupině (SYNB) probiotika a zároveň prebiotika a třetí skupina (bez léčení) byla použita jako kontrolní. Skupina SYNB vykazovala vyšší počet bifidobakterií ( $10^8$  CFU/g) než skupina PROB ( $10^7$  CFU/g). V obou skupinách přetrvávaly probiotické kmeny minimálně po dobu dalších 49 dnů bez významných rozdílů. V naší studii jsme zjistili, že kmeny testované Geigerovou et al. (2017) jsou navíc schopny využít substráty, jako je škrob a rostlinné gumy. Jednalo se například o poddruh *B. animalis* subsp. *animalis*, který byl schopen využít škrob, gumu z rohovníku, guarovou gumu a částečně arabskou gumu. Stejně substrátové preference vykazoval i kmen stejného poddruhu pocházející z trávicího traktu jehňat. Zde je prokazatelný vliv diety hostitele na substrátovou preferenci bifidobakterií. Typové kmeny z výkalů myši tuto schopnost naopak neměly. Stejně tak kmeny poddruhu *B. animalis* subsp. *lactis* izolované z ovce a paovce nedokázaly přírodní gumy využít, ale zde se jedná o jiný poddruh, tudíž nelze porovnávat jako kmenovou specifitu.

Tuohy et al. (2007) podávali dobrovolníkům sušenky s částečně hydrolyzovanou guarovou pryskyřicí a fruktooligosacharidy a zjistili, že počet bifidobakterií po konzumaci vzrostl v porovnání se skupinou, které podávali placebo. Během studie nezaznamenali nárůst rodu *Bacteroides* ani rodu *Clostridium*. Z námi testovaných kmenů dokázaly guarovou gumu využít pouze *B. dentium* a *B. scardovii*, což mohlo být způsobeno rozdílnou strukturou guarové pryskyřice způsobenou hydrolyzací ve studii Tuohyho et al. (2007).

Gavlighi (2013) testoval in vitro tři různé frakce tragantové gumy (HAG1 <2 kDa; 2 kDa <HAG2 <10 kDa; HAG3> 10 kDa) na růst několika vybraných kmenů bifidobakterií (*B. longum* subs. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis* a *B. longum* subsp. *lactis*) a *Clostridium perfringens*. Všechny frakce (HAG1 a HAG2 více než HAG3) podporovaly růst probiotických kmenů, především *B. longum* subsp. *infantis*. Jedna z frakcí (HAG3) dokázala zcela inhibovat *Clostridium perfringens*. V našich testech dokázalo tragantovou gumu využít několik kmenů, převážně z lidských zdrojů, mezi nimi i jeden kmen *B. longum* subsp. *infantis*. Modrackova et al. (2018) testovali 290 kmenů bifidobakterií a zjistili pozitivní výsledky ve fermentaci tragantové gumy u 6 z 20 kmenů *B. longum*. Kromě tragantové gumy testovali také arabskou gumu, guarovou gumu a gumu z rohovníku. Většina výsledků koresponduje s naší prací. Tato studie zatím nebyla publikována, kompletní výsledky jsou uvedeny v příloze v Tab. 3.

Přestože ani jeden z námi testovaných kmenů nedokázal využít celulózu, existují studie, které tuto schopnost bifidobakterií naznačují. Morishita et al. (1994) podávali potkanům po dobu 7 týdnů krmiva s různým obsahem celulózy a zjistili pozoruhodné zvýšení koncentrací bifidobakterií. Srovnání pH mezi obsahem slepého střeva a stolicí naznačovalo, že největší fermentace celulózy probíhala v distální části tenkého střeva. Mezi nejběžněji používané deriváty celulózy v potravinářském průmyslu patří mikrokrytalická celulóza (MCC). Prokázalo se, že MCC podporuje růst prospěšné mikrobioty (včetně bifidobakterií) a poskytuje pozitivní účinky na gastrointestinální fyziologii a hypolipidemické účinky ovlivňující expresi enzymů, které se podílejí na metabolismu lipidů (Nsor-Atindana et al., 2017).

Negativní výsledky jsme získali také u xylanu, ale existují studie, které potvrzují schopnost bifidobakterií využít xylooligosacharidy (XOS). Rajagopalan et al. (2017) testovali vybrané probiotické kmeny bifidobakterií (*B. animalis* a *B. adolescentis*) a laktobacilů (*L. acidophilus* a *L. brevis*) a zjistili, že účinně využívají XOS produkované

z mahagonového a mangového xylanu. Rychlejší růst bifidobakterií proběhl při doplnění média o komerční xylobiózu nebo glukózu. Pastell et al. (2009) testovali *B. adolescentis* (ATCC 15703), *B. breve* (ATCC 15700) a *B. longum* (ATCC 15707) a zjistili rozdílné substrátové preference těchto druhů. *B. adolescentis* upřednostňoval XOS, na D-xylóze rostl pomalu a na L-arabinóze vůbec. Naproti tomu *B. longum* preferoval L-arabinózu a nerostl na čisté D-xylóze ani XOS. Oba kmeny byly schopny využít arabinoxylo-oligosacharidy (AXOS), ale různými strategiemi, protože po štěpení L-arabinózy kmen *B. adolescentis* využíval vzniklé XOS a kmen *B. longum* využíval uvolněnou L-arabinózu. *B. breve* rostl špatně na všech těchto substrátech. Stejně tak v našich testech kmeny *B. breve* kromě škrobu nedokázal využít žádný jiný substrát, zatímco některé kmeny *B. adolescentis* a *B. longum* degradovaly kromě škrobu také arabinogalaktan. Ze studie (Pastell et al., 2009) vyplývá, že AXOS by mohly být potenciálně vhodným prebiotikem, ale jejich prebiotické účinky mohou záviset na typu substituce arabinózy a na přítomnosti jiných sacharidů.

Bylo prokázáno, že purifikovaný lignin Alcell vykazuje prebiotické účinky u kuřat tím, že podporuje růst užitečných bakterií a zlepšuje morfologickou strukturu střev. Čištěné ligniny jsou monofenolové fragmenty s nízkou molekulovou hmotností, které mají odlišné biologické vlastnosti než klasický lignin. Na rozdíl od nativního ligninu, vyčištěný lignin nepředstavuje bariéru pro trávení monogastričních nebo přežvýkavých zvířat. Tato zjištění naznačují, že purifikovaný lignin může mít příznivý vliv na zdraví u monogastričních zvířat a mohl by být potenciálně považován za přírodní doplňkovou látku. Na základě několika málo studií se zdá, že odezvy zvířat na čištěný lignin jsou závislé na dávce, druhu zvířete a druhu a zdroji ligninového produktu (Baurhoo et al., 2008). V našich testech nedokázal ani jeden kmen bifidobakterií lignin využít. Před stanovením přesvědčivých přínosů ligninu pro zdraví zvířat je zapotřebí dalšího výzkumu.

Pektiny v naší studii dokázaly využít jen 3 zvířecí kmeny. Gómez et al. (2016) však testovali společné populace bifidobakterií a laktobacilů na růst v médiu s pektickými oligosacharidy a zjistili, že tyto oligosacharidy mají lepší prebiotické vlastnosti než samotné pektiny, a to podobné nebo dokonce lepší než fruktooligosacharidy. Li et al. (2016) testovali několik frakcí pektických oligosacharidů a zaznamenali prebiotický potenciál. Olano-Martin et al. (2002) také potvrdili, že pektické oligosacharidy jsou lepšími prebiotickými kandidáty než pektiny, i když jejich bifidogenní účinek je v porovnání s oligofruktózou nízký. Dále

dokázali, že ve fermentačních vlastnostech pektinů hraje důležitou roli stupeň methylace a jejich bifidogenní vlastnosti se dají zlepšit částečnou hydrolyzou.

Kromě schopnosti využít testované substráty, jsme u 4 vybraných oficiálních sbírkových kmenů (*B. dentium*, *B. moukalabense*, *B. stellenboschense* a *B. longum* subsp. *infantis*) měřili množství produkovaných metabolitů ve 4 různých substrátech (glukóza, škrob, guma z rohovníku a guarová guma). V nejvyšším množství vznikal u všech kmenů a substrátů acetát, následoval laktát a formiát. Kromě těchto tří hlavních metabolitů jsme naměřili i další, ty však byly produkovány v malém, až zanedbatelném množství. Bifidobakterie, které nedokázaly daný substrát využít, produkovaly podstatně méně metabolitů v porovnání s ostatními kmeny. Poměr produkovaného laktátu a acetátu se v našem měření pohybuje od 1:3 do 1:13.

Je prokázáno, že poměr metabolitů bifidobakterií se mění v závislosti na využitém substrátu. Obecně bývá dosažena vyšší produkce laktátu v souvislosti s nízkou produkcí formiátu a naopak. To je dané změnou metabolických drah bifidobakterií na základě sacharidů, které mají k dispozici. (Miller et Wolin, 1996; Palframan et al., 2003; McLaughlin et al. 2015). Enzymy metabolických drah nejsou u všech druhů bifidobakterií stejné, to je jedním z důvodů rozdílných substrátových preferencí v rodu. Porovnávání poměrů produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) umožňuje spekulaci o různých cestách používaných při fermentaci jednotlivých sacharidů. Teoreticky by měly bifidobakterie fermentovat hexóзовé cukry tak, aby byl získán poměr laktátu a acetátu 1:1,5, ale těchto poměrů dosahují zřídka (Palframan et al., 2003). To je znát i na našich výsledcích, kde se tento poměr u glukózy pohybuje od 1:4 do 1:7 nebo ve studii McLaughlina et al. (2015), kde bylo dosaženo velmi podobných poměrů.

Palframan et al. (2003) uvádí, že současný výčet prebiotických oligosacharidů je charakterizován na úrovni rodu, nicméně ne všechny bifidobakterie mají stejné zdravotní výhody. Například Gibson et Wang (1994) prokázali, že protipatogenní aktivita řady druhů bifidobakterií se liší. Proto je velmi žádoucí charakterizovat druhovou specifičnost prebiotických oligosacharidů. Znalost fermentačních cest takových oligosacharidů specifickými bifidobakteriemi může umožnit racionální návrh sacharidů zaměřených na konkrétní druhy probiotických mikroorganismů.

Dále je jisté, že probiotika vyžadují specifické úpravy k tomu, aby dokázaly projít v neporušeném stavu trávicím traktem a dosáhly tlustého střeva. Existuje několik technik,

jako je například lyofilizace, sušení rozprašováním nebo fluidní sušení pro přeměnu kultur na práškovou formu. Takto zapouzdřené bakterie jsou však následně v potravinovém produktu zcela uvolněny a nejsou chráněny před prostředím produktu nebo při průchodu trávicím traktem hostitele. Nabízí se technika zapouzdření do hydrokoloidních kuliček, která buňky zachytí v matrici a poskytne jim ochranu před okolním prostředím i technologickými úpravami jako je mražení. Takto mohou být probiotické bakterie použity v mnoha fermentovaných mléčných výrobcích a pro výrobu biomasy, jelikož mají v této formě konstantní vlastnosti, vyšší stabilitu během skladování a vyšší produktivitu (Krasaekoopt et al., 2003).

## 6 Závěr

Mikrobiota gastrointestinálního traktu (GIT) hraje v organismu důležitou roli a podílí se na mnoha procesech úzce souvisejících se zdravím hostitele. Díky tomu zájem o tuto problematiku stále stoupá. Rod *Bifidobacterium* se řadí mezi nejvýznamnější bakteriální rody a kvůli mnoha svým pozitivním vlastnostem se bifidobakterie čím dál tím častěji objevují v potravinách a doplňcích stravy. K tomu, aby bifidobakterie přežily cestu trávicím traktem hostitele a proběhlo úspěšné usídlení v tlustém střevě mohou sloužit prebiotické obalové materiály, díky nimž mikroorganismy nepříznivým vlivům odolají. Jednotlivé kmeny bifidobakterií mají určité substrátové preference, které, zdá se, souvisí s dietou hostitele a enzymy metabolických drah, které daný kmen k využití substrátu využívá. Velký prebiotický potenciál pro bifidobakterie mají například některé gumy, které se nachází v dietách hostitelů a zároveň se běžně využívají v potravinách a doplňcích stravy díky svým technologickým vlastnostem. Podaří-li se najít vhodné kombinace bifidobakterií a prebiotik, mohou vzniknout nová synbiotika pro lidskou i zvířecí výživu, která budou odolnější a účinnost probiotických kmenů se tak mnohanásobně zvýší. V naší práci se ukázalo, že takovou kombinací by mohl být například lidský kmen *B. dentium* s gumou z rohovníku nebo guarovou gumou. Dále pak mnoho zvířecích kmenů, především izoláty pocházející z trávicího traktu přežvýkavců, bylo schopno růstu na substrátech, jako je guma z rohovníku, guarová a arabská guma. Bifidogenní účinky některých substrátů lze zvýšit hydrolýzou a výběrem správné frakce, která růst daného kmene lépe podpoří. Pro ještě větší účinnost a ochranu se nabízí například technika zapouzdrnění bakterií do hydrokoloidních kuliček, které zachytí buňky ve své matrici a poskytnou jim ochranu před okolním prostředím i některými technologickými procesy. Vývoj nových synbiotik však vyžaduje další výzkum, především v *in vivo* podmínkách.



## 7 Seznam použitých zdrojů

- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T., von Wright, A. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus*GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (1). 351-354.
- Amaretti A., Bernardi T., Tamburini E., Zanoni S., Lomma M., Matteuzzi D., Rossi M. 2007. Kinetics and Metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 Growing on Glucose, Galactose, Lactose, and Galactooligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 73. 3637-3644.
- Anderson, J. W., Akanji, A. O., Randles, K. M. 2001. Treatment of diabetes with high fiber diets. *CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition*. 3. 373.
- Ayyappan P., Shanmuga S., Y., Saravanan S., Usha A. 2017. Characterization of xylan from rice bran and finger millet seed coat for functional food applications. *Journal of Cereal Science*. 75. 296-305.
- Baurhoo, B., Ruiz-Feria, C. A., Zhao, X. 2008. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals—A review. *Animal Feed Science and Technology*. 144 (3-4). 175-184.
- Belorkar, S.A., Gupta, A. K. 2016. Oligosaccharides: a boon from nature's desk. *AMB Express*. 6 (1). 82.
- Berard, M., Deremaux, L., LEFRANC-MILLOT, C., MACIOCE, V. 2009. Prebiotic effects of NUTRIOSE®: a review. In *International Congress of Nutrition*. Vol. 4, No. 9.
- Biavati B., Sgorbati B., Scardovi V. 1991. The genus *Bifidobacterium*. In: Balows A., Truper G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H., eds, *The Prokaryotes*, 2nd edn., Springer-Verlag. New York. 816-833.
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. 2000. *Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications*. *Annals of Microbiology*. 50. 117-131.
- Bottacini, F., Ventura, M., Van Sinderen, D., Motherway, M. O. C. 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. In *Microbial cell factories*. Vol. 13. No. 1 (S4). BioMed Central.
- Bunesova, V., Lacroix, C., Schwab, C. 2016. Fucosyllactose and L-fucose utilization of infant *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium kashiwanohense*. *BMC mikrobiology*. 16 (1). 248.
- Bunesova, V., Lacroix, C., Schwab, C. 2018. Mucin cross-feeding of infant bifidobacteria and *Eubacterium hallii*. *Microbial ecology*. 75 (1). 228-238.

- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Killer, J., Musilová, Š. 2014. Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Beneficial Microbes*. 5 (4). 377-388.
- Calame, W., Weseler, A. R., Viebke, C., Flynn, C., Siemensma, A. D. 2008. Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner. *British Journal of Nutrition*. 100 (6). 1269-1275.
- Ciolacu, D., Ciolacu, F., Popa, V. I. 2011. Amorphous cellulose – structure and characterization. *Cellulose chemistry and technology*. 45 (1). 13.
- Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M. M., Biavati, B. 1994. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *International journal of food microbiology*, 24 (1-2). 199-210.
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D. 2011. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International journal of food mikrobiology*. 149 (1). 4-18.
- Čopíková, J., Synytsya, A. 2005. Polysacharidy, jejich význam a uplatnění. *Chemické listy*. 99. 621.
- De Gonzalo, G., Colpa, D. I., Habib, M. H., Fraaije, M. W. 2016. Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *Journal of biotechnology*. 236. 110-119.
- De Vries W., Gerbrandy S. J., Stouthamer A. H. 1967. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochim. Biophys. Acta*. 136. 415-425.
- Dinan, G. T., Stanon, C., Cryan, F. J. 2013. Psychobiotics: a Novel Class of Psychotropic. *Biological Psychiatry: A Journal of Psychiatric Neuroscience and Therapeutics*. 74 (10). 720-726.
- Dinan, G. T., Stilling, M. R., Stanon, C., Cryan, F. J. 2015. Collective unconscious: How gut microbes shape human behaviour. *Journal of Psychiatric Research* 63. 1-9.
- Dion, C., Chappuis, E., Ripoll, C. 2016. Does larch arabinogalactan enhance immune function? A review of mechanistic and clinical trials. *Nutrition & metabolism*. 13 (1). 28.
- Duranti, S., Turrone, F., Lugli, G. A., Milani, C., Viappiani, A., Mangifesta, M., ... Ventura, M. 2014. Genomic characterization and transcriptional studies of the starch-utilizing strain *Bifidobacterium adolescentis* 22L. *Applied and environmental mikrobiology*. 80 (19). 6080-6090.
- Evangélica Fuentes-Zaragoza, Elena Sánchez-Zapata, Esther Sendra, Estrella Sayas, Casilda Navarro, Juana Fernández-López and José A. Pérez-Alvarez. 2011. Resistant Starch as Prebiotic: A review. *Starch-Stärke*. 63 (7). 406-415.
- Evans., J. S., Bassis, M. Ch., Assari, S., Flowers, A., Kelly, B. M., Young, B. V.,

- Ellingrod, E. V., McInnis, G. M. 2016. The gut microbiome composition associates with bipolar disorder and illness severity. *Journal of Psychiatric Research*. 87. 23-29.
- Fanaro, S., Boehm, G., Garssen, J., Knol, J., Mosca, F., Stahl, B., Vigi, V. 2005. Galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: A review. *Acta paediatrica*. 94 (449). 22-26.
- Fosses, A., Fierobe, H. P., Maté, M., Franche, N., Liu, N., Philip, P., ... Denis, Y. 2017. A seven-gene cluster in *Ruminiclostridium cellulolyticum* is essential for signalization, uptake and catabolism of the degradation products of cellulose hydrolysis. *Biotechnology for biofuels*. 10 (1). 250.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol*. 66. 365-378.
- García-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., Gomez, E. 2000. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology advances*. 18 (7). 549-579.
- Gavlighi, H. A. 2013. Tragacanth gum: structural composition, natural functionality and enzymatic conversion as source of potential prebiotic activity: Ph. D Thesis. DTU Chemical Engineering, Department of Chemical and Biochemical Engineering.
- Geigerová, M., Bunešová, V., Vlková, E., Salmonová, H., & Rada, V. 2017. Selection of prebiotic oligosaccharides suitable for synbiotic use in calves. *Animal Feed Science and Technology*. 229. 73-78.
- Gibson, G. R., & Wang, X. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 77 (4). 412-420.
- Gómez, B., Gullón, B., Yáñez, R., Schols, H., Alonso, J. L. 2016. Prebiotic potential of pectins and pectic oligosaccharides derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: A comparative evaluation. *Journal of Functional Foods*. 20. 108-121.
- Grommers, H. E., van der Krogt, D. A. 2009. Potato starch: production, modifications and uses. In *Starch (Third Edition)*. 511-539.
- Grube, B., Stier, H., Riede, L., Gruenwald, J. 2012. Tolerability of a proprietary larch arabinogalactan extract: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial in healthy subjects. *Food and Nutrition Sciences*. 3 (11). 1533.
- Habibi, H., Khosravi-Darani, K. 2017. Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.
- He, S., Wang, X., Zhang, Y., Wang, J., Sun, H., Wang, J., ... Ye, Y. 2016. Isolation and prebiotic activity of water-soluble polysaccharides fractions from the bamboo shoots (*Phyllostachys praecox*). *Carbohydrate polymers*. 151. 295-304.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... Calder, P. C. 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics

and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 11 (8). 506-514.

Hopkins, M. J., Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. 1998. Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *Journal of Applied Microbiology*. 85 (2). 381-386.

Iwasaki H., Araki Y., Ito E., Nagaoka M., Yokokura T. 1990. Structure of macroamphiphiles from several *Bifidobacterium* strains. *J. Bacteriol.* 172. 845-852.

Kang, K. S., Pettitt, D. J. 1993. Xanthan, gellan, welan, and rhamosan. *Industrial gums: polysaccharides and their derivatives*. 341-399.

Khalid, S. A., Musa, A. M., Saeed, A. M., Abugroun, E. A., Ahmed, E. O. S., Ghalib, M. B., ... Phillips, G. O. 2014. Manipulating dietary fibre: Gum Arabic making friends of the colon and the kidney. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 3 (2). 71-76.

Kim, L. S., Burkholder, P. M., Waters, R. F. 2002. Effects of low-dose larch arabinogalactan from *larix occidentalis*: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Complementary health practice review*. 7 (3). 221-229.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 13 (1). 3-13.

Kyle, D., Mills, D., Freeman-sharky, S. 2017. U.S. Patent Application No. 15/521. 502.

Lauer E., Kandler O. 1983. DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*. *System. Appl. Microbiol.* 4:42-64.

Li, P. J., Xia, J. L., Nie, Z. Y., Shan, Y. 2016. Pectic oligosaccharides hydrolyzed from orange peel by fungal multi-enzyme complexes and their prebiotic and antibacterial potentials. *LWT-Food Science and Technology*. 69. 203-210.

Lindner, J., D., D., Canchaya, C., Zhang, Z., Neviani, E., Fitzgerald, G., F., van Sinderen, D., Ventura, M. 2007. Exploiting *Bifidobacterium* genomes: The molecular basis of stress response. *International Journal of Food Microbiology*. 120. 13-24.

Liu, S., Ren, F., Zhao, L., Jiang, L., Hao, Y., Jin, J., ... Liu, H. 2015. Starch and starch hydrolysates are favorable carbon sources for *Bifidobacteria* in the human gut. *BMC mikrobiology*. 15 (1). 54.

Matouš, B. et al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha: Galén. 2010. 540 s. ISBN 978-80-7262-8.

McLaughlin, H. P., Motherway, M. O. C., Lakshminarayanan, B., Stanton, C., Ross, R. P., Brulc, J., ... van Sinderen, D. 2015. Carbohydrate catabolic diversity of bifidobacteria and lactobacilli of human origin. *International journal of food mikrobiology*. 203. 109-121.

- Miller, T. L., & Wolin, M. J. 1996. Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Applied and environmental microbiology*. 62 (5). 1589-1592.
- Mills, D. A., Lebrilla, C. B., German, J. B., Sela, D. 2015. U.S. Patent No. 8,999,705. Washington. DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Míguez, B., Gómez, B., Gullón, P., Gullón, B., Alonso, J. L. 2016. Pectic Oligosaccharides and Other Emerging Prebiotics. In *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. InTech.
- Mirhosseini, H., Amid, B. T. 2012. A review study on chemical composition and molecular structure of newly plant gum exudates and seed gums. *Food Research International*. 46 (1). 387-398.
- Modler H. W. 1994. Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications. *Int. Dairy J.* 4. 383-407.
- Moradi, S., Taran, M., Shahlaei, M. 2017. Investigation on human serum albumin and Gum Tragacanth interactions using experimental and computational methods. *International journal of biological macromolecules*.
- Morishita, Y., Konishi, Y. 1994. Effects of high dietary cellulose on the large intestinal microflora and short-chain fatty acids in rats. *Letters in applied microbiology*. 19 (6). 433-435.
- Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Frutos, M. J., Galtier, P., ... Lindtner, O. 2017. Re-evaluation of locust bean gum (E 410) as a food additive. *EFSA Journal*. 15 (1).
- Musilova, S., Rada, V., Vlkova, E., Bunesova, V. 2014. Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. *Beneficial microbes*. 5 (3). 273-283.
- Müller-Maatsch, J., Bencivenni, M., Caligiani, A., Tedeschi, T., Bruggeman, G., Bosch, M., ... Sforza, S. 2016. Pectin content and composition from different food waste streams. *Food chemistry*. 201. 37-45.
- Nagaoka M., Hashimoto S., Shibata H., Kimura I., Kimura K., Sawada H., Yokokura T. 1996. Structure of a galactan from cell walls of *Bifidobacterium catenulatum* YIT4016. *Carbohydr. Res.* 281. 285-291.
- Nagaoka M., Shibata H., Kimura I., Hashimoto S., Kimura K., Sawada H., Yokokura T. 1995. Structural studies on a cell wall polysaccharide from *Bifidobacterium longum* YIT4028. *Carbohydr. Res.* 274. 245-249.

- Naseem, A., Tabasu, S., Zia, K., M., Zuber, M., Ali, M., Noreen, A. 2016. Lignin-derivatives based polymers, blends and composites: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 93/ A. 296-313.
- Nsor-Atindana, J., Chen, M., Goff, H. D., Zhong, F., Sharif, H. R., & Li, Y. 2017. Functionality and nutritional aspects of microcrystalline cellulose in food. *Carbohydrate polymers*. 172. 159-174.
- Olano-Martin, E., Gibson, G. R., Rastall, R. A. 2002. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*. 93 (3). 505-511.
- Op den Camp H.J.M., Oosterhof A., Veerkamp J.H. 1985. Cell surface hydrophobicity of *Bifidobacterium bifidum* subsp. *pennsylvanicum*. *Antoine Van Leeuwenhoek*. 51. 303-312.
- Palframan, R. J., Gibson, G. R., Rastall, R. A. 2003. Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Current issues in intestinal mikrobiology*. 4 (2). 71-75.
- Pastell, H., Westermann, P., Meyer, A. S., Tuomainen, P., Tenkanen, M. 2009. In vitro fermentation of arabinoxylan-derived carbohydrates by bifidobacteria and mixed fecal microbiota. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57 (18). 8598-8606.
- Postulkova, H., Chamradova, I., Pavlinak, D., Humpa, O., Jancar, J., Vojtova, L. 2017. Study of effects and conditions on the solubility of natural polysaccharide gum karaya. *Food Hydrocolloids*. 67. 148-156.
- Raigond, P., Ezekiel, R., Raigond, B. 2015. Resistant starch in food: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95 (10). 1968-1978.
- Rajagopalan, G., Shanmugavelu, K., Yang, K. L. 2017. Production of prebiotic-xylooligosaccharides from alkali pretreated mahogany and mango wood sawdust by using purified xylanase of *Clostridium* strain BOH3. *Carbohydrate polymers*. 167. 158-166.
- Rideout, T. C., Harding, S. V., Jones, P. J., Fan, M. Z. 2008. Guar gum and similar soluble fibers in the regulation of cholesterol metabolism: current understandings and future research priorities. *Vascular Health and Risk Management*. 4 (5). 1023.
- Saha, A., Tyagi, S., Gupta, R. K., Tyagi, Y. K. 2017. Natural gums of plant origin as edible coatings for food industry applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1-15.
- Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-López, J., Pérez-Alvarez, J. A. 2011. Resistant starch as prebiotic: a review. *Starch-Stärke*. 63 (7). 406-415.
- Sarkar, A., Lehto, M. S., Harty, S., Dinan, G. T., Cryan, F. J., Burnet, W. J. P. 2016. Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria-Gut-Brain Signals. *Trends in Neurosciences*. 39 (11). 763-781.

Scardovi V., Trovatelli L. D. 1965. The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol. Enzimol.* 15. 19-29.

Sheweta, B., Deepak, M. 2014. Locust bean gum: Processing, properties and food applications – a review. *International Journal of Biological Macromolecules.* 66. 74-80.

Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M.C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R.D., Arigoni, F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99. 14422–14427.

Schmidt, K., Cowen, P. J., Harmer, C. J., Tzortzis, G., Errington, S., Burnet, P. W. 2015. Prebiotic intake reduces the waking cortisol response and alters emotional bias in healthy volunteers. *Psychopharmacology.* 232 (10). 1793-1801.

Singh, R. D., Banerjee, J., Arora, A. 2015. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre.* 5 (1). 19-30.

Sotiropoulos, K., Papagiannopoulos, A. 2017. Modification of xanthan solution properties by the cationic surfactant DTMAB. *International journal of biological macromolecules.* 105. 1213-1219.

Spiller, R. 2008. Probiotics and prebiotics in irritable bowel syndrome. *Alimentary pharmacology & therapeutics.* 28 (4). 385-396.

Takahashi, T., Yokawa, T., Ishihara, N., Okubo, T., Chu, D. C., Nishigaki, E., ... Juneja, L. R. 2009. Hydrolyzed guar gum decreases postprandial blood glucose and glucose absorption in the rat small intestine. *Nutrition research.* 29 (6). 419-425.

Tester, R. F., Karkalas, J., Qi, X. 2004. Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science.* 39 (2). 151-165.

Thombare, N., Jha, U., Mishra, S., Siddiqui, M. Z. 2016. Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. *International journal of biological macromolecules.* 88. 361-372.

Thomson, P., Medina, D. A., Garrido, D. 2017. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: molecular strategies for their utilization. *Food Microbiology.*

Tuohy, K. M., Kolida, S., Lustenberger, A. M., Gibson, G. R. 2001. The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides—a human volunteer study. *British Journal of Nutrition.* 86 (3). 341-348.

Valcheva, R., Dieleman, L. A. 2016. Prebiotics: definition and protective mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 30 (1). 27-37.

Ventura, M., Turróni, F., Lugli, G. A., van Sinderen, D. 2014. Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94 (2). 163-168.

Vernazza, C. L., Gibson, G. R., Rastall, R. A. 2006. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. *Journal of Applied Microbiology*. 100 (4). 846-853.

Gómez Zavaglia, A., Kociubinski, G., Pérez, P., Disalvo, E., De Antoni, G. 2002. Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 93 (5). 794-799.

Wengenmayer, H., Ebel, J., Grisebach, H. 1976. Enzymic synthesis of lignin precursors. *The FEBS Journal*. 65 (2). 529-536.

Zaman, S. A., Sarbini, S. R. 2015. The potential of resistant starch as a prebiotic. *Critical reviews in biotechnology*. 1-7.

Zeng, H., Yemin, X., Tingting, P., Weilan, S.. 2007. Properties of xylanolytic enzyme system in bifidobacteria and their effects on the utilization of xylooligosaccharides. *Food Chemistry*. 101. 1172-1177.

## **Obrázky:**

### **Obr. 1: Taxonomické zařazení rodu *Bifidobacterium***

Ventura, M., Turróni, F., Lugli, G. A., van Sinderen, D. 2014. Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94 (2). 163-168.

### **Obr. 2: Fruktóza-6-fosfátová cesta**

Amaretti A., Bernardi T., Tamburini E., Zanoni S., Lomma M., Matteuzzi D., Rossi M. 2007. Kinetics and Metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 Growing on Glucose, Galactose, Lactose, and Galactooligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 73. 3637-3644.

### **Obr. 3: Definice probiotického kmene**

Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*. 50. 117-131.

### **Obr. 4: Obousměrné komunikační cesty mezi mozkem a střevní mikrobiotou**

Dinan, G. T., Stilling, M. R., Stanon, C., Cryan, F. J. 2015. Collective unconscious: How gut microbes shape human behaviour. *Journal of Psychiatric Research* 63. 1-9.

### **Obr. 5: D-glukóza**

Wikipedia, the free encyclopedia. Glucose Haworth.png [online]. Cit: [07-12-2017]. Dostupné z: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glucose\\_Haworth.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glucose_Haworth.png)>.



**Obr. 6: Glykogen**

Wikiskripta: Struktura glykogenu [online]. Cit: [07-12-2017]. Dostupné z: <[https://www.wikiskripta.eu/w/Chemie\\_živin#/media/File:Glykogen.svg](https://www.wikiskripta.eu/w/Chemie_živin#/media/File:Glykogen.svg)>.

**Obr. 7a: Amylóza**

Wikipedie, otevřená encyklopedie. Amylóza, složka škrobu [online]. Cit: [08-12-2017]. Dostupné z: <<https://cs.wikipedia.org/wiki/Škrob#/media/File:Amylose2.svg>>.β

**Obr. 7b: Amylopektin**

Wikipedie, otevřená encyklopedie. Amylopektin, složka škrobu [online]. Cit: [08-12-2017]. Dostupné z:

<[https://cs.wikipedia.org/wiki/Škrob#/media/File:Amylopektin\\_Sessel.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Škrob#/media/File:Amylopektin_Sessel.svg)>.

**Obr. 8: Struktura škrobu**

Chaplin, M. 2017. Starch is an inexpensive thickener, water binder, and gelling agent [online]. Cit: [07-12-2017]. Dostupné z: <<http://www1.lsbu.ac.uk/water/starch.html>>.

**Obr. 9: Struktura celulózy**

Wikipedia, the free encyclopedia. Cellulose, a linear polymer of D-glucose units (two are shown) linked by  $\beta(1 \rightarrow 4)$ -glycosidic bonds.

[online]. Cit: [08-12-2017]. Dostupné z:

<[https://en.wikipedia.org/wiki/Cellulose#/media/File:Cellulose\\_Sessel.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Cellulose#/media/File:Cellulose_Sessel.svg)>.

**Obr. 10: Prekurzory ligninu**

Wikipedie, otevřená encyklopedie. Prekurzory ligninu [online]. Cit: [08-12-2017].

Dostupné z: <[https://cs.wikipedia.org/wiki/Lignin#/media/File:Monolignols\\_general.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Lignin#/media/File:Monolignols_general.svg)>.

**Obr. 11: Jedna z možností struktury ligninu**

Wikipedia, the free encyclopedia. Lignin [online]. Cit: [08-12-2017]. Dostupné z:

<[https://en.wikipedia.org/wiki/Lignin#/media/File:Lignin\\_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Lignin#/media/File:Lignin_structure.svg)>.

**Obr. 12: Jedna z možností struktury xylanu**

Wikipedia, the free encyclopedia. Example of one possible xylan structure. Ferulate is in the lower left corner. [online]. Cit: [08-12-2017]. Dostupné z:

<<https://en.wikipedia.org/wiki/Xylan#/media/File:Xylan.svg>>.

**Obr. 13: Strukturní vzorec pektinu**

Researchgate. Chemical structure of pectin [online]. Cit: [08-12-2017]. Dostupné z:

<[https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-pectin\\_44608948](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-pectin_44608948)>.

**Obr. 14: Strukturní vzorec arabinogalaktanu**

Wikipedia, the free encyclopedia. Arabinogalactan.svg [online]. Cit: [08-12-2017].

Dostupné z: <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Arabinogalactan.svg>>.

**Obr. 15: Strukturní vzorec gumy z rohovníku**

Sheweta, B., Deepak, M. 2014. Locust bean gum: Processing, properties and food applications – a review. International Journal of Biological Macromolecules. 66. 74-80.

**Obr. 16: Svatojánský chléb**

LBG Sicilia ingredients. Chemical free proces Carrubba [online]. Cit: [12-12-2017].  
Dostupné z: <[http://www.lbg.it/images/chemical\\_free\\_process-Carrubba1-LD.jpg](http://www.lbg.it/images/chemical_free_process-Carrubba1-LD.jpg)>.

**Obr. 17: Strukturní vzorec guarové gumy**

Wikipedia, the free encyclopedia. Structural formula of a guaran unit [online]. Cit: [12-12-2017]. Dostupné z: <[https://en.wikipedia.org/wiki/Guar\\_gum#/media/File:Guaran.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Guar_gum#/media/File:Guaran.svg)>.

**Obr. 18: Lusk *Cyamopsis tetragonolobus* a guarová guma**

JAYRAJ International. Guar Gum Powder Guar Derivates [online]. Cit: [12-12-2017].  
Dostupné z: <<http://www.jayrajinternational.com/guar-gum-powder-guar-derivatives/>>.

**Obr. 19: Frakce tragantové gumy**

Gavlighi, H. A. 2013. Tragacanth gum: structural composition, natural functionality and enzymatic conversion as source of potential prebiotic activity: Ph. D Thesis. DTU Chemical Engineering, Department of Chemical and Biochemical Engineering.

**Obr. 20: *Astragalus* – kořen**

Selfhacked. Astragalus [online]. Cit: [12-12-2017]. Dostupné z: <<https://selfhacked.com/blog/astragalus/>>.

**Obr. 21: Arabská guma**

Encyclopaedia Britannica. Gum arabic from *Acacia* species [online]. Cit: [12-12-2017].  
Dostupné z: <<https://www.britannica.com/technology/gum-arabic>>.

**Obr. 22: Strukturní vzorec xanthanové gumy**

Wikipedia, the free encyclopedia. Structure of Xanthan gum [online]. Cit: [12-12-2017].  
Dostupné z: <[https://en.wikipedia.org/wiki/Xanthan\\_gum#/media/File:Xanthan.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Xanthan_gum#/media/File:Xanthan.svg)>.

**Obr. 23: Plod lejnice (*Sterculia urens*)**

Wikipedia, the free encyclopedia. *S. setigera* – dry capsules and seeds.jpg [online]. Cit: [12-12-2017]. Dostupné z: <[https://en.wikipedia.org/wiki/Sterculia#/media/File:Sterculia\\_setigera\\_MHNT.BOT.2004.0.226.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Sterculia#/media/File:Sterculia_setigera_MHNT.BOT.2004.0.226.jpg)>

## 8 Přílohy



**Obrázek 1: Fotografie využití substrátu kulturou**

Tabulka 1: Úplný seznam výsledků využití testovaných substrátů kmeny bifidobakterií

Kmen	Izolován z	Označení kmene	kontrola	glukóza	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. actinocoloniiforme</i> *	trávicí trakt čmeláka	DSM 22766 <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	bachor skotu	DSM 20087 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	stolice muže (27 let)	DSM 24849 <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	dospělý člověk na konvenční dietě	1M Bif <sup>b</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. aesculapii</i> *	stolice kosmana bělouchého	DSM 26737 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>B. angulatum</i> *	lidská stolice	DSM 20098 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	stolice jehněte	J 3II	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	stolice jehněte	J5 IIA	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	stolice jehněte	J6II	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	C57BL/6J divoký druh myši	DSM 26074 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Kmen	Izolován z	Označení kmene	kontrola	glukóza	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	krysí stolice	DSM 20104 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	stolice telete	023 II <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	stolice telete	813 P2 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	stolice telete	805 III2 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	stolice telete	805 P4 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	stolice ovce kamerunské	ZDK 1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	stolice paovce hřivnaté	ZDK 4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	stolice okapi	ZDK 7	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	stolice muflona	MUF1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	stolice psa	10/6C <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	stolice psa	11/6A <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Kmen	Izolován z	Označení kmene	kontrola	glukóza	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	stolice štěněte	P2 N1 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	probiotický produkt (kapky)	BB 12 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> *	jogurt	DSM 10140 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. asteroides</i> *	zadní trávicí trakt včely	DSM 20089 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. avesanii</i> *	stolice tamarína	DSM 100685 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. biavati</i> *	stolice tamarína	DSM 23969 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	NUTRA BONA probiot. produkt	NB	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	stolice kojence (mateřské mléko)	DSM 20239 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	střevo dospělého člověka	DSM 20082 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	kojenec 3 měsíce	V33N <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	kojenec 2 týdny	MA1 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Kmen	Izolován z	Označení kmene	kontrola	glukóza	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. bifidum</i> *	střevo dospělého a stolice kojence	DSM 20456 <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bohemicum</i> *	trávicí trakt čmeláka	DSM 22767 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>B. bombi</i> *	trávicí trakt čmeláka	DSM 19703 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. boum</i>	stolice slona	18 2/3 A <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. boum</i>	stolice prasete	P1-3 <sup>b</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. boum</i> *	bachor skotu	DSM 20432 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. breve</i>	probiotika ve formě kapek	BR03	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. breve</i>	kojenec 10 týdnů	TA1 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. breve</i> *	střevo dítěte	ATCC 15700 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. callitrichos</i> *	stolice kosmana bělouchého	DSM 23973 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. catenulatum</i>	kojenec (2 týdny)	MA7 <sup>b</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Kmen	Izolován z	Označení kmene	kontrola	glukóza	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. catenulatum</i>	kojenec	20To Bif N <sup>b</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. catenulatum</i> *	lidská stolice	DSM 16992 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. coryneforme</i> *	zadní trávicí trakt včely	DSM 20216 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. crudilactis</i> *	syrové mléko a sýry z něj	LMG 23609 <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>B. cuniculi</i> *	stolice králíka	DSM 20435 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. dentium</i>	kojenec (3 měs.)	J36 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>B. eulemuris</i> *	stolice lemura	DSM 100216 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. gallicum</i> *	střevo dospělého člověka	DSM 20093 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. gallinarum</i> *	slepé střevo kuřete	DSM 20670 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. hapali</i> *	stolice mláďěte kočkodana	DSM 100202 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. choerinum</i>	stolice telete	023 I2 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Kmen	Izolován z	Označení kmene	kontrola	glukóza	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. choerinum</i>	stolice telete	023I2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. choerinum</i>	stolice jehněte	J13 VA	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. choerinum</i>	stolice jehněte	J10 VI	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. choerinum</i>	stolice jehněte	J2 VI	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. choerinum</i> *	stolice selete	DSM 20434 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. indicum</i> *	zadní trávicí trakt včely	DSM 20214 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. kashiwanohense</i>	stolice dítěte (z Afriky)	ETH B8M 11	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. kashiwanohense</i>	stolice kojence (Afrika)	PV 20-2 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. kashiwanohense</i> *	dětská stolice (muž 1,5 roku)	DSM 21854 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	stolice telete	T49 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	kojenec 2 týdny	MA2 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Kmen	Izolován z	Označení kmene	kontrola	glukóza	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. longum</i>	kojenec 10 týdnů	OL5 <sup>b</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	dětská výživa Nestlé	DV	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	stolice dítěte (z Afriky)	ETH 13 W	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	stolice kojence (Afrika)	ETH 13Y <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> *	střevo dítěte	DSM 20088 <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	NUTRA BONA probiot. produkt	NB	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	stolice kojence (Afrika)	ETH 47 <sup>b</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> *	střevo dospělého člověka	DSM 20219 <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>suillum</i> *	stolice prasete	DSM 28597 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>	stolice telete	022II	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>	stolice telete	5/9	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Kmen	Izolován z	Označení kmene	kontrola	glukóza	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i> *	stolice prasete	DSM 20211 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. magnum</i> *	stolice králíka	DSM 20222 <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. merycicum</i> *	bachor skotu	DSM 6492 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. minimum</i> *	odpadní vody	DSM 20102 <sup>a</sup>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. mongoliense</i> *	airag (kumys)	DSM 21395 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. moukalabense</i> *	stolice gorily nížinné	DSM 27321 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>B. myosotis</i> *	stolice mláděte kočkodana	DSM 100196 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i>	stolice jehněte	J9 VIA	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i>	stolice telete	T63 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>B. pseudocatenulatum</i> *	dětská stolice	DSM 20438 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i>	stolice hlodavce slepce ( <i>Spalax</i> )	JU 4/3 C	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Kmen	Izolován z	Označení kmene	kontrola	glukóza	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. pseudolongum</i>	stolice psa	W11 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i>	stolice hlodavce slepce ( <i>Spalax</i> )	JU 4/4E <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i>	stolice telete	T71 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i>	stolice hlodavce slepce ( <i>Spalax</i> )	JV 4/3B <sup>b</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i>	stolice psa	15/4D <sup>b</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	stolice jehněte	J7 VIA	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	stolice kojence (Afrika)	ETH 43 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	stolice telete	T19 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> *	bachor skotu	DSM 20092 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>longum</i>	stolice psa	17/4W <sup>b</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> *	stolice prasete	DSM 20099 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Kmen	Izolován z	Označení kmene	kontrola	glukóza	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. psychraerophilum</i>	slepé střevo prasete	DSM 22366 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pullorum</i> *	stolice kuřete	DSM 20433 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. ramosum</i> *	stolice dospělého tamarína	DSM 100688 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. reuteri</i> *	stolice kosmana bělouchého	DSM 23975 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. ruminantium</i> *	bachor skotu	DSM 6489 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. saeculare</i> *	stolice králíka	DSM 6531 <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. saguini</i> *	stolice tamarína	DSM 23967 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. scardovii</i> *	lidská krev	DSM 13734 <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>B. stellenboschense</i> *	stolice tamarína	DSM 23968 <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. stercoris</i> *	lidská stolice	DSM 19555 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtile</i> *	odpadní vody	DSM 20096 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Kmen	Izolován z	Označení kmene	kontrola	glukóza	bramborový škrob	celulóza	lignin	xylan	jablečný pektin	citrusový pektin	arabinogalaktan	guma z rohovníku	guarová guma	tragantová guma	arabská guma	xanthanová guma	karayaová guma
<i>B. thermacidophilum</i>	stolice telete	T15 <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i> *	stolice selete	DSM 17755 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i> *	odpadní vody (z výroby tofu)	DSM 15837 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. thermophilum</i>	bachor skotu	DSM 20212 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thermophilum</i>	stolice telete	D25 II	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thermophilum</i> *	stolice prasete	DSM 20210 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. tissieri</i> *	stolice mláděte kočkodana	DSM 100201 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>B. tsurumiense</i> *	zubní plak křečka	DSM 17777 <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Vysvětlivky k tabulce:

**Bifidobakterie označené \*** - typové oficiální kmeny

**Kmeny označené <sup>a</sup>** : DSM – německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen)

GmbH, Braunschweig, Germany), LMG – belgická sbírka bakterií laboratoře mikrobiologie, Univerzita Gent (Bacterium Collection Laboratorium Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium), ATCC – americká typová sbírka kultur (American Type Culture Collection)

**Kmeny označené<sup>b</sup>** : sbírka Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky

**Kmeny označené<sup>c</sup>** : sbírka v přípravě

**Znaménko +**: pozitivní reakce (utilizuje testovaný substrát)

**Znaménko -**: negativní reakce (neutilizuje testovaný substrát)

**Kombinace znamének** (např. +/-): jedna ze dvou kopií pozitivní, druhá negativní

**Tabulka 2: Vyhodnocení – škála barev**

Vyhodnocení	Barevné označení v Tab. 1
<b>negativní</b> (nedokáže využít substrát)	-
<b>pozitivní</b> (dokáže výborně využít substrát)	+
<b>převážně pozitivní</b> (dokáže využít substrát)	+
<b>částečně pozitivní</b> (dokáže částečně využít substrát)	+

**Tabulka 3: Využití gum bifidobakteriemi (upraveno podle Modrackove et al., 2018)**

Kmen	Počet kmenů	Guma z rohovníku	Guarová guma	Tragantová guma	Arabská guma
<i>B. adolescentis</i>	17	-	-	-	1
<i>B. angulatum</i>	4	-	-	-	-
<i>B. animalis</i>	12	3	1	-	-
<i>B. asteroides</i>	6	-	-	1	-
<i>B. bifidum</i>	25	-	-	-	-
<i>B. boum</i>	6	-	1	-	-
<i>B. breve</i>	16	-	-	-	-
<i>B. catenulatum</i>	13	-	-	-	-
<i>B. choerinum</i>	6	2	2	-	-
<i>B. coryneforme</i>	6	-	-	1	-
<i>B. cuniculi</i>	5	-	-	-	-
<i>B. dentium</i>	28	27	27	-	-
<i>B. gallicum</i>	1	-	-	-	-
<i>B. gallinarum</i>	2	-	-	-	-
<i>B. globosum</i>	27	-	-	-	-
<i>B. indicum</i>	6	-	-	2	-
<i>B. infantis</i>	10	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	20	2	-	6	12
<i>B. magnum</i>	6	-	-	-	-
<i>B. merycicum</i>	4	-	-	-	-
<i>B. minimum</i>	2	-	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i>	27	-	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i>	4	-	-	1	-
<i>B. pullorum</i>	3	-	-	-	-
<i>B. ruminantium</i>	4	-	-	-	-
<i>B. saeculare</i>	3	-	-	-	-
<i>B. subtile</i>	5	-	-	-	-
<i>B. suis</i>	10	-	-	-	-
<i>B. thermophilum</i>	12	2	2	-	-
<b>Celkem 29 druhů</b>	<b>290 kmenů</b>	<b>12,41 %</b>	<b>11,38 %</b>	<b>3,79 %</b>	<b>4,48 %</b>