

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Adherence probiotických mikroorganismů na buňky
střevní mukózy**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kateřina Šebestová

Obor studia: AMD

Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Adherence probiotických mikroorganismů na buňky střevní mukózy" 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 literatury 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 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce. Děkuji také Akkenzhe Omarové za přivezení vzorků a práci na experimentu.

Adherence probiotických mikroorganismů na buňky střevní mukózy

Souhrn

Cílem práce bylo otestovat probiotika izolovaná z tradičních mléčných nápojů, které jsou produkovány v oblasti střední Asie. V současnosti dochází k rozvoji civilizačních onemocnění, kterým lze předejít konzumací prospěšných potravin s obsahem probiotik. Probiotika mohou mít vliv na zdraví hostitele v případě, že jsou schopny adherovat na buňky střeva. Adherence se posuzuje pomocí *in vitro* testů. V potravinách jsou nejčastěji využívány rody *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* spp.

Tradiční nápoje ze střední Asie se vyrábějí buď z mléka nám dobře známých hospodářských zvířat, ale především z mléka velblouda dvouhrbého, koně domácího nebo jaha domácího. Mezi tyto kvašené mléčné nápoje patří např. chal, kumis, dahi nebo tarag.

V této práci byly použity bakterie rodu *Bifidobacterium* spp., které byly izolovány ze vzorku velbloudího mléka z Kazachstánu. *In vitro* test adherence proběhl na směsné linii střevních buněk Caco-2 a HT29-MTX.

Nejvíce adheroval kmen *B. crudilactis* 7-5C, jehož hodnoty se pohybovaly od 74,28 % po 78,17 %. Kmen *B. crudilactis* 7-2C adheroval s hodnotami mezi 72,14 % a 75,21 %. Mezi těmito dvěma kmeny nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Nejméně ze všech kmenů adheroval kmen *B. crudilactis* 7-1C a to od 5,33 % do 7,04 %. Kmen *B. bifidum* T1-5 adheroval od 56,52 % do 57,31 % a kmen *B. bifidum* T1-8 adheroval méně a to mezi 16,5 % a 19,97 %.

Na základě výsledků vyplývá, že nejvíce ke směsi buněk kolorektálního adenokarcinomu Caco-2 a HT29-MTX adherovaly kmeny *B. crudilactis* 7-2C a *B. crudilactis* 7-5C, které pocházely z mléka velblouda dvouhrbého z Kazachstánu.

Klíčová slova: probiotika, *in vitro*, buněčný model, adherence, kvašené mléčné nápoje

Adhesion of probiotics microorganisms to the intestinal mucosa

Summary

The aim of this diploma thesis was to test probiotics which were isolated from traditional dairy beverages. These are produced in central Asia. Currently there are the civilization diseases which can be avoided by consumption of probiotics. Probiotics can give health benefits under the condition of adhesion to the intestinal mucosa. Adhesion is assessed using *in vitro* tests. The most occurring probiotics in the foodstuffs are *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* spp.

Traditional beverages from central Asia are produced from e.g. cow's or goat's milk, but especially they are from camel's, mare's or yak's milk. These dairy beverages are chal, koumiss, dahi or tarag.

Bifidobacterium spp. were used in this thesis. They were isolated from camel's milk in Kazakhstan. An adhesion test was run on the mixture of intestinal cells - Caco-2 and HT29-MTX.

B. crudilactis 7-5C was the best adhered strain. It adhered from 74,28 % to 78,17 %. *B. crudilactis* 7-2C adhered from 72,14 % to 75,21 %. There was no statistically significant difference between these two strains. *B. crudilactis* 7-1C was the worst adhered strain. It adhered from 5,33 % to 7,04 %. *B. bifidum* T1-5 adhered from 56,52 % to 57,31 % and *B. bifidum* T1-8 adhered from 16,5 % to 19,97 %.

Based on the results, *B. crudilactis* 7-5C and *B. crudilactis* 7-2C were the best adhered strains to the mixture of colorectal adenocarcinoma cells Caco-2 and HT29-MTX. These two strains were isolated from camel in Kazakhstan.

Keywords: probiotics, *in vitro*, cell model, adherence, fermented dairy beverages

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce a vědecká hypotéza	2
3 Přehled literatury	3
3.1 Mikrobiom	3
3.1.1 Funkce mikrobiomu	4
3.2 Probiotika	4
3.2.1 Mechanismus působení probiotik	5
3.2.1.1 Adherence.....	6
3.2.2 Potravinářsky využívané kmeny probiotik	8
3.2.2.1 Charakterizace rodu <i>Bifidobacterium</i> spp.	9
3.2.2.1.1 Optimální podmínky.....	11
3.2.2.2 Charakterizace rodu <i>Lactobacillus</i> spp.	12
3.2.2.2.1 Optimální podmínky.....	13
3.2.2.3 Charakterizace rodu <i>Streptococcus</i> spp.....	13
3.2.2.3.1 Optimální podmínky.....	14
3.2.3 Prospěšné účinky probiotik	15
3.2.3.1 Využití jako antibiotika	16
3.2.3.2 Rakovina tlustého střeva	16
3.2.3.3 Diabetes mellitus.....	18
3.2.3.4 Antihypertenzní a hypocholesterolemický účinek	18
3.2.3.5 Laktózová intolerance	19
3.3 Tradiční mléčné výrobky střední Asie	21
3.3.1 Velbloudí mléko	21
3.3.2 Tradiční produkty z velbloudího mléka	22
3.3.2.1 Chal.....	22
3.3.2.2 Gariss.....	23
3.3.2.3 Suusac.....	23
3.3.3 Kobydí mléko	24
3.3.4 Tradiční produkty z kobydího mléka	24
3.3.4.1 Kumis.....	24
3.3.5 Jačí mléko	25
3.3.6 Tradiční produkty z jačího mléka	26
3.3.7 Ostatní tradiční produkty	27

4	Materiál a metody	28
4.1	Materiál	28
4.2	Metody	28
4.2.1	Kultivace tkáně.....	28
4.2.2	Založení 24-jamkové destičky.....	28
4.3	Odběr vzorků	29
4.3.1	Izolace bifidobakterií.....	29
4.3.2	Test adherence.....	30
5	Výsledky	31
6	Diskuze	34
7	Závěr	38
8	Seznam tabulek, obrázků a grafů	39
8.1	Seznam obrázků.....	39
8.2	Seznam tabulek.....	39
8.3	Seznam grafů.....	39
9	Seznam literatury	40

1 Úvod

V současnosti dochází k vysokému rozvoji civilizačních chorob spojených se špatným životním prostředím a životním stylem, které mají nepříznivý účinek na lidský organismus a to včetně trávicího traktu. Je snaha tyto onemocnění potlačit či jim předejít, pomocí konzumace prospěšných potravin. Jednou z možností, jak předejít celé řadě onemocnění, je možný příjem probiotik, ať ve formě potravinových doplňků nebo funkčních potravin obsahujících probiotické organismy. Existuje celá řada funkčních potravin, jako jsou například mléčné nápoje obsahující přirozené mikroorganismy. Mezi takové nápoje patří i tradiční mléčné kvašené nápoje konzumované v asijských zemích.

Adherence je základní předpoklad pro posouzení probiotického kmene a jeho prospěšnosti pro zdraví. Je třeba tedy zjistit, jaký adhezenční potenciál mají probiotické bakterie v těchto nápojích, jestli budou schopny osidlovat lidský organismus a budou prospěšní pro svého hostitele. Pro posouzení adherence se nejlépe hodí posouzení pomocí *in vitro* testů.

2 Cíl práce a vědecká hypotéza

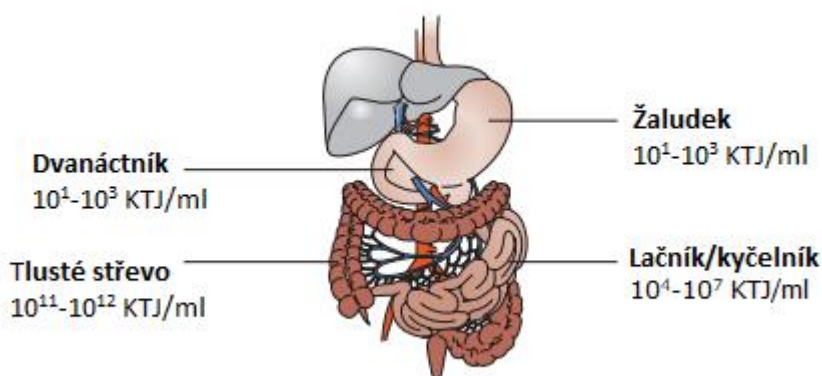
Cílem práce je otestování probiotik izolovaných z tradičních mléčných nápojů produkovaných v oblasti střední Asie. Ty byly již identifikovány a pojmenovány. A však u nich nejsou známy adhezenční vlastnosti a s tím spojená zdravotní prospěšnost pro lidský trávicí trakt.

Testovanou hypotézou je, že některé druhy probiotik přítomné v tradičních kvašených nápojích z mléka produkovaných v Asii mají vysoký adhezenční potenciál.

3 Přehled literatury

3.1 Mikrobiom

První roky našeho života představují období, která je náchylné k rizikům z okolního prostředí. Uplatňují se zde interakce mezi prostředím a hostitelem, které mají vliv na imunitní systém (Bisgaard et al., 2014). Lidský mikrobiom obsahuje 10^{13} až 10^{14} bakterií, jejichž celkový genom je nazýván mikrobiotou, což převyšuje celkový počet buněk v lidském těle asi desetkrát. Složení střevního mikrobiomu dozrává během prvních let života a právě ten má vliv na imunitní zrání hostitele (Gensollen et al., 2016; La Fata et al., 2018). Špatné osídlení střeva hostitele může mít za následek některé nemoci jako např. astma, alergii a jiné imunologické poruchy (Stockholm et al., 2018). Během vývoje symbiózy mezi člověkem a mikrobi, se bakterie zapojily do klíčových biologických procesů, jako je např. využití živin či jiné metabolické procesy (La Fata et al., 2018). Mikrobiom lze tedy považovat za faktor, který ovlivňuje celkové zdraví člověka (Stockholm et al., 2018).



Obrázek 1: Počet bakterií v orgánech lidského těla (O'Hara and Shanahan, 2006).

Mikrobiální společenstva osidlují další orgány lidského těla, než jsou uvedeny na obr. 1, jako např. vagínu, ústa, kůži nebo močové cesty. Ale prostředí obsahující nejvíce probiotických bakterií je právě trávicí trakt. (Fettweis et al., 2012).

Bakterie, které se v lidském mikrobiomu objevují, můžeme rozdělit na anaerobní a aerobní rody. Mezi anaerobní patří *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp., mezi aerobní řadíme *Escherischia* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. a *Klebsiella* spp. (O'Hara et Shanahan, 2006). Avšak složení mikrobiomu je závislé na několika faktorech. Způsob narození jedince, zda-li se narodil přirozenou

vaginální cestou, nebo císařským řezem, přímo ovlivňuje složení střevní mikrobioty. Dále střevní mikrobiotu ovlivňuje věk jejího hostitele. U mladších jedinců dochází k vzrůstu počtu či druhu bakterií, v dospělosti se tato hodnota ustálí a pak ve stáří dojde k poklesu. A v neposlední řadě ovlivňuje mikrobiotu složení naší stravy (La Fata et al., 2018).

3.1.1 Funkce mikrobiomu

Nejvíce bakterií se objevuje v gastrointestinální soustavě, která je centrem trávení nebo imunity, kde můžou mít velký vliv na člověka a jeho zdraví. Bakterie ve střevě produkují různé enzymy, které se podílejí na syntéze vitamínů důležitých pro hostitele. Mezi tyto vitamíny patří biotin, vitamin B12, riboflavin, listová kyselina a vitamin K (Hill, 1997). Střevní mikrobiom je také zapojen do fermentace nestravitelné vlákniny, které přvádějí na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (acetát, butyrát a prionát). Tyto mastné kyseliny se posléze mohou stát energetickým substrátem pro střevní entorocyty (den Besten et al., 2013). Další pozitivní úlohou těchto mastných kyselin s krátkým řetězcem je ten, že např. butyrát interaguje se specifickými povrchovými receptory ve střevě, které regulují zánětlivé procesy, alergické reakce, cévní systém a procesy, které vedou k projevu nádorových onemocnění (Sivaprakasam et al., 2016). Negativní vliv mlže mít mikrobiom na utilizaci laktózy. U jedinců, kterým chybí nativní enzym laktáza, dochází k fermentaci mléčného cukru mikroorganismy, což způsobuje plynatost a průjem (Zhao et al., 2010).

3.2 Probiotika

Termín „probiotika“ je relativně novým slovem znamenajícím "pro život" (Bartošová, 2009). Začátek používání termínu „probiotika“ je datováno od roku 1974, kdy ho Parker použil k popisu potravinových doplňků, speciálně navržených pro zlepšení zdraví hospodářských zvířat. Definoval ho jako: „Organismy a substance, které přispívají ke střevní mikrobiální rovnováze.“ Nedávno byla tato definice revidována na: „živé mikrobiální doplňky, které prospěšně působí na hostitele tím, že zlepšují jeho mikrobiální rovnováhu“, aby byla zdůrazněna důležitost životaschopnosti a nebyl obsažen příliš široký pojem „látky“, do nějž by se dala zahrnout i antibiotika (Fuller, 1991). Z výživového hlediska jsou probiotika charakterizována jako: „živoucí mikroorganismy, které po požití v určitém množství poskytují zdravotní výhody nad rámec vlastní základní výživy.“ Podle této definice mohou být probiotika konzumována buď jako komponent stravy nebo jako výživový doplněk (Guarner and Schaafsma, 1997).

Tyto mikroorganismy jsou tu s námi tak dlouho, jak dlouho lidé jedí fermentované výrobky, ale jejich spojení s výhodami pro zdraví je datováno pouze od přelomu století, kdy Mečnikov (1907) upozornil na nežádoucí účinky patogenních změn střevní mikroflóry na hostitele a navrhl, že konzumace kysaných výrobků zlepšuje tuto tzv. autointoxikaci (Fuller, 1991). Ke konceptu probiotik také přispěl nárůst rezistence škodlivých bakterií k antibiotikům a také hledání způsobu, jak přirozeně potlačit patogeny (Kailasapathy and Chin, 2000).

Jejich základním mechanismem působení je navození příznivého prostředí ve střevě s podporou růstu kvasných bakterií a potlačením růstu hnilobných bakterií, kvasinek a plísní. Tomuto působení napomáhá přítomnost prebiotik, tedy pro lidský organismus nestravitelných složek potravy (např. některých druhů vlákniny), ale především oligosacharidy, jež selektivně stimuluje jejich růst anebo aktivitu (Grofová, 2010; Musilová et al., 2015).

Neexistuje jeden soubor vybraných kritérií pro klasifikaci živých bakteriálních kmenů jako probiotik. Běžná kritéria používaná pro izolaci a identifikaci probiotických kmenů zahrnuje následující kritéria: lidský původ druhu, stabilitu vůči žluči, kyselině HCl, trávicím enzymům a kyslíku, potenciál kolonizace lidského gastrointestinálního traktu, produkci antimikrobiálních látek, vykazatelný pozitivní účinek na lidský organismus, zdravotní bezpečnost a hlavně schopnost adherence na střevní mukózu (Kailasapathy and Chin, 2000).

3.2.1 Mechanismus působení probiotik

Současný stav vědomostí o střevní mikroekologii navrhuje tři možnosti, jak mohou probiotika fungovat. Jedná se o

1) Produkce antimikrobiálních látek

Probiotika produkující antimikrobiální látky by mohla snižovat počty životaschopných patogenních buněk intestinálních bakterií, ovlivnit jejich metabolismus nebo produkci toxinů. Studie provedená na gnotobiotických myších s určitou patogenní střevní mikroflórou ukázala, že ačkoliv se probiotickým mikroorganismům zavedeným do jejich gastrointestinálního traktu nepodařilo odstranit *Clostridium difficile*, ochránili ji proti zánětu střev a pravděpodobně potlačovali produkci klostridiálního toxinu (Fuller, 1991). Některá probiotika také mohou zkracovat délku některých infekcí virového původu např. rotavirovým průjmům, kde jsou účinky potvrzeny

u *Bifidobacterium bifidum* a *Streptococcus thermophilus* nebo *Lactobacillus rhamnosus* GG nebo *Bifidobacterium lactis* Bb-12 (Salminen et al., 2010).

Mechanismem antimikrobiálního působení probiotik je jejich schopnost snižovat pH v lumenu, vylučovat tzv. bakteriociny a inhibovat adhezenci patogenních bakterií na buňky epitelu (Boirivant et Strober, 2007).

2) Schopnost adherence na střevní stěnu

Probiotika jsou schopny adherovat k mukóze a epitelu. Svou interakcí se střevním epitelem stimulují buňky sekretující hlen, posilují imunitní funkci střev, redukují zánětlivé bakteriální infekce a zlepšují tím i peristaltiku střev (Collado et al., 2009). Střevní epitel je přirozenou bariérou pro vstup patogenů do těla ze střevního lumen. Probiotické kmeny mohou chránit proteiny těsných spojů, které jsou místem, kde patogeny nejlépe procházejí, a to v důsledku patologických netěsností vzniklých v důsledku infekčních nebo zánětlivých chorob (Gill, 2003).

3) Stimulace imunity

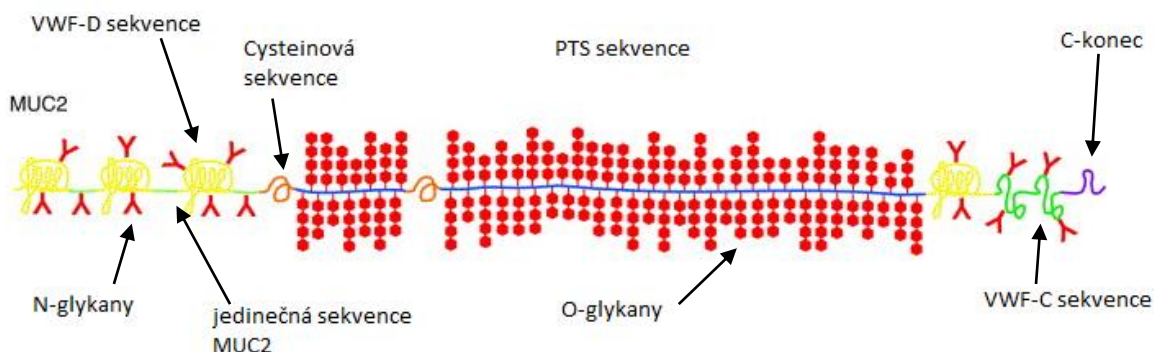
Probiotika jsou schopny také ovlivnit celkovou imunitu hostitele díky schopnosti stimulovat a regulovat humorální i buněčné imunitní odpovědi. Celý tento mechanismus je na principu interakce probiotik s lymfoidní tkání, která je propojená se střevní sliznicí (Cross, 2002).

3.2.1.1 Adherence

Přirozenou bariérou gastrointestinálního traktu je mukózní povrch, který má funkci chránit ho před patogenními mikroorganismy. Intestinální epitel je pokryt specializovanými pohárkovými buňkami, které sekretují vysokomolekulární glykoprotein, nazývaný mucin. Mucin slouží jako bariéra organismu proti pronikání toxinů do vnitřního prostředí nebo jako lubrikant lumenu střeva, usnadňující pasáž tráveniny. Mucin může obsahovat specifické oligosacharidy, které napodobují specifickou strukturou epiteliální receptory, které naváží patogenní bakterie, a tím dojde k jejich imobilizaci. Bylo identifikováno 20 druhů mucinu, z nichž převládá MUC2 (Kadlec et al., 2011).

Muciny jsou vysoce glykosylované bílkoviny, kde obsah sacharidů představuje přibližně 80 % a více. Proteinové jádro obsahuje prolin, serin a threonin, které se označují jako tzv. PTS sekvence. Když se nacházejí muciny na rozhraní, předpokládá se, že orientují

své hydrofilní glykosylované části k vodné (polární) fázi. MUC2, má základní proteinový řetězec, který obsahuje dvě PTS sekvence (obr. 2). Jinak obsahuje dalších 5200 aminokyselin. Tato proteinová kostra je hustě pokryta glykany, které slouží jako ochranná vrstva a pojivová vrstva, což má za následek jejich gelové vlastnosti (Lousinian et al., 2017).



Obrázek 2: Chemická struktura MUC2 (www.cell.com).

Některé kmeny jako např. *Lactobacillus johnsonii*, *L. reuteri* nebo *Bifidobacterium* sp. jsou schopny adherovat na sliznici díky dlouhým slizničním sacharidovým vazbám. Bakteriální buňky se mohou lišit ve složení svého povrchu. Ten může být složen z lipoteichové kyseliny, vnější membrány, obsahující glykolipidové lipopolysacharidy, peptidoglykany. Tyto složky se podílejí na interakci s hostitelskými buňkami. Zástupci jsou schopny s pomocí jejich proteinů (protein vázající fibronectin) přilnout ke komponentům hleny, který pokrývá sliznici střeva. Tato hlenová vrstva má v organismu dvojí roli. Slouží jako bariéra pro přilnavost určitých mikroorganismů a pod ní nacházející se epitel. Ale zároveň může také poskytnout prostředí pro lepší přilnavost ostatních bakterií (Andaloussi et al., 1995; Mukai et al., 2004).

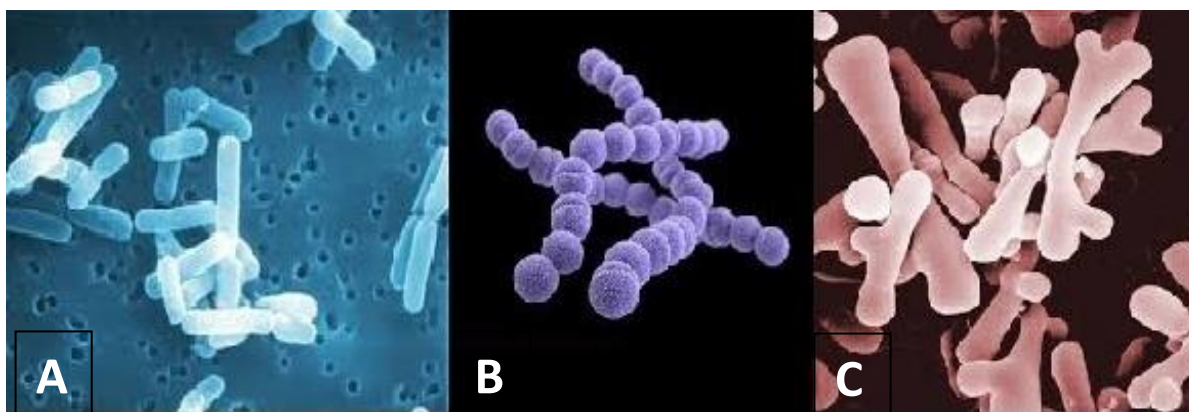
Byl také identifikován gen, který kóduje adhezi mannózy, z *L. plantarum*. Lipoteichové kyseliny, napojené na povrch bakterie *L. johnsonii* La 1, se podílejí na adhezi k buněčné linii kolorektálního adenokarcinomu Caco-2. Na rozdíl od toho u bifidobakterií neexistuje takové množství přesvědčivých důkazů. Předpokládá se ale, že by adheze mohla být přes glykoproteiny nebo sacharidové řetězce jejich buněčné stěny. Například *Bifidobacterium bifidum* EB102 vykazuje více bílkovinných složek, které jsou schopny vázat glykolipidy buněčné linie Caco-2. Autoři jako Okochi a kol. (2017) nebo Ruas-Madiedo a kol. (2006) také zdůrazňují důležitost hydrofobie jako jeden z faktorů adheze u bifidobakterií. Mimo jiné, se na adhezi bakterií mléčného kvašení podílejí také

exopolysacharidy. Exopolysacharidy jsou exocelulární polymery přítomné na povrchu bakterií (Okochi et al., 2017; Ruas-Madiedo et al., 2006).

3.2.2 Potravinářsky využívané kmeny probiotik

V posledních letech stále vzrůstá zájem o některé kmeny bakterií mléčného kvašení, u kterých bylo navrženo nebo dokázáno, že poskytují specifické zdravotní výhody, když jsou konzumovány jako potravinové doplňky nebo komponenty potravy. Avšak názory se velmi liší s ohledem na podmínky potřebné k doložení požadavku na prospěšný účinek daných bakteriálních kmenů, a zatím neexistuje žádný celosvětový konsens na to, jak definovat a prověřit životaschopné kmeny mikroorganismů jako probiotika (Guarner and Schaafsma, 1997).

Probiotické přípravky, které se v současné době vyskytují na trhu, obsahují zejména bakterie mléčného kvašení – *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* sp. (obr. 3).



Obrázek 3: Příklad kmenů bakterií mléčného kvašení, jejichž vybraní zástupci jsou řazeni mezi probiotika. A = *Lactobacillus* sp. (<http://www.solarfarma.com/uploads/content/1343472913.jpg>); B = *Streptococcus* sp. (<https://www.flickr.com/photos/ajc1/4197076733/>); C = *Bifidobacterium* sp. (<http://www.bacteriainphotos.com/photo%20gallery/streptococcus%20pyogenes%203D.jpg>).

Bylo prokázáno, že tyto tři výše zmíněné rody jsou součástí lidské gastrointestinální mikroflóry a jsou relativně neškodné. Kmeny bakterií mléčného kvašení užívané na výrobu těchto potravinových doplňků jsou většinou intestinální izoláty jako *L. acidophilus*, *L. casei* a *B. bifidum*. Dále jsou také zahrnovány zástupci jogurtové kultury (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *S. thermophilus*), protože jogurt byl v minulosti spojován s prospěšnými účinky na zdraví konzumentů (Fuller, 1991). Méně často jsou používány kmeny *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* a *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (obr. 4). Probiotika

se na trhu objevují jako doplňky stravy nebo jako složka funkčních potravin, ale i jako součást krmiv hospodářských zvířat pro prevenci gastrointestinálních infekcí (Bengmark, 1998).



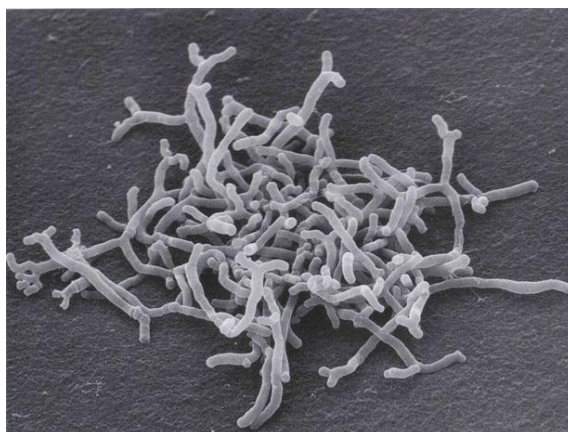
Obrázek 4: Příklad dalších méně často užívaných kmenů probiotik. A= *E. faecium* (<http://petnet-wp.s3.amazonaws.com/wp-content/uploads/2014/03/Enterococcus-Faecium-L.jpg>);

B= *E. coli* (www.dangeralimentaires.com); C = *S. cerevisiae* var. *bouardii* (<http://www.rochway.com.au/media/wysiwyg/saccharomyces-bouardii.jpg>).

3.2.2.1 Charakterizace rodu *Bifidobacterium* spp.

Bifidobakterie představují jeden z nejčastějších a nejpočetnějších bakteriálních kolonizátorů střeva a jsou známy především pro svoje benefity pro zdraví, metabolismus a imunitu hostitele (Nagpal et al., 2017). Bifidobakterie byly poprvé objeveny v roce 1900 Tissierem v dětských výkalech. Tissier vyizoloval bakterii s charakteristickým tvarem Y a nazval ho *Bacillus bifidus*. Tato bakterie byla anaerobní a během růstu nedocházelo ke tvorbě plynu. Jako samotný taxon byly definovány až v roce 1924 (Biavati et al., 2000).

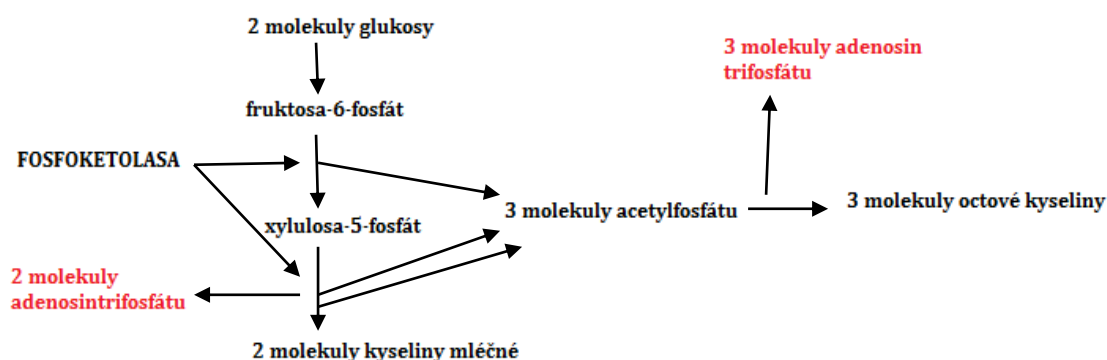
Rod *Bifidobacterium* spp. zahrnuje komensální gram-positivní, polymorfní tyčinkovité, bakterie. Jsou to anaerobní bakterie, ale citlivost na kyslík se mění podle druhu. Tento rod většinou tvoří téměř 10 % typické střevní mikrobioty dospělého jedince. Rod *Bifidobacterium* spp. je složen z více než 50 druhů/podruhů, ale druhy typické pro člověka jsou *B. adolescenti*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. infantis*, *B. longum* (obr. 5), *B. pseudocatenulatum* a *B. pseudolongum* (Nagpal et al., 2017; Biavati et al., 2000). *B. breve* a *B. infantis* jsou typické bakterie ve střevech kojenců, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. longum* a *B. pseudocatenulatum* jsou přítomny ve výkalech jak u novorozenců, tak i u dospělých a *B. adolescentis* byl identifikován pouze ve střevech dospělých jedinců (Biavati et al., 2000; Ruas-Madiedo et al., 2006). Bifidobakterie se v zažívacím traktu objevují v počtu 2×10^{11} kolonie tvořící jednotka (KTJ)/g výkalů (Hill, 1997). Podrobněji jsou zástupci a jejich výskyt uvedeny v tabulce 1.



Obrázek 5: *Bifidobacterium longum* (<http://www.mysticalbiotech.com/portfolio/bifidobacterium-longum/>).

Bifidobakterie se nalézají také ve vaginální mikroflóře, jsou to například *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve* nebo *B. longum*. Nalézají se i v zubním kazu, kde najdeme *B. denticolens*, *B. dentium* a *B. inopinatum*. Některé rody bifidobakterií vyskytující se v trávicím traktu zvířat jsou vypsány v tabulce 1. Sacharidy, přítomné na povrchu sliznice jsou zodpovědné za adhezi bakterií mléčného kvašení, jako jsou právě bifidobakterie (Biavati et al., 2000; Ruas-Madiedo et al., 2006).

Bakterie rodu *Bifidobacterium* spp. mají charakteristickou metabolickou cestu fermentace hexózy. Klíčovým enzymem je fruktosa-6-fosfátfosfoketolasa, která štěpí hexosafosfát na erytrosu-4-fosfát a acetylfosfát. Konečnými produkty této metabolické dráhy jsou kyselina mléčná a octová, vznikající v poměru 2:3 (Biavati et al., 2000). Schematicky je metabolická dráha znázorněna na obr. 6.



Obrázek 6: Schéma metabolické dráhy bifidobakterií.

3.2.2.1.1 Optimální podmínky

Rozmezí optimální teploty pro rod *Bifidobacterium* spp. je 37 – 41 °C. Přestávají růst při teplotě nižší než 20 °C nebo vyšší než 46 °C. Výjimkou je *B. thermacidophilum*, který je schopný růstu i při mírně termofilních podmínkách (49,5 °C) (Gavini et al., 1991).

Bifidobakterie jsou mikroorganismy odolné vůči kyselinám. Jejich optimální pH je mezi 6,5 a 7,0. Není zaznamenán růst při pH nižším než 4,5 a vyšším než 8,5 (Biavati et al., 2000).

Tabulka 1. **Druhy bifidobakterií a jejich výskyt** – souhrn (Biavati et al., 2000).

Druh	Výskyt	Druh	Výskyt
<i>B. adolescentis</i>	Výkaly dospělého jedince, vagina, bachor přežvýkavců, odpadní vody	<i>B. infantis</i>	Výkaly telete
<i>B. angulatum</i>	Odpadní vody, výkali dospělých jedinců	<i>B. inopinatum</i>	Zubní kaz
<i>B. animalis</i>	Krysí, kuřecí, králičí, telecí výkaly, odpadní vody	<i>B. lactis</i>	Fermentované mléko
<i>B. asteroides</i>	Trávicí trakt Včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)	<i>B. longum</i>	Lidské výkaly, telecí výkaly, vagina, odpadní vody
<i>B. bifidum</i>	Výkali dospělého jedince, výkali novorozence telete, vagina	<i>B. magnum</i>	Králičí výkaly
<i>B. boum</i>	Bachor přežvýkavců, výkaly selete	<i>B. merycicum</i>	Bachor přežvýkavců
<i>B. breve</i>	Výkaly novorozence a kojence telete, odpadní vody, vagina	<i>B. minimum</i>	Odpadní vody
<i>B. catenulatum</i>	Výkaly novorozence a dospělého jedince, odpadní vody	<i>B. pseudocatenulatum</i>	Telecí výkaly, odpadní vody
<i>B. choerinum</i>	Výkaly selete, odpadní vody	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Prasečí, kuřecí, býčí, telecí, krysí a morčecí výkaly, bachor přežvýkavců, odpadní vody
<i>B. coryneforme</i>	Trávicí trakt Včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	selečí, telecí, krysí, králičí a jehněčí výkaly, bachor přežvýkavců, odpadní vody
<i>B. cuniculi</i>	Králičí výkaly	<i>B. pullorum</i>	Výkaly kuřat
<i>B. denticolens</i>	Zubní kaz	<i>B. ruminatum</i>	Bachor přežvýkavců
<i>B. dentium</i>	Zubní kaz, ústní dutina, výkaly dospělého jedince	<i>B. saeculare</i>	Králičí výkaly
<i>B. gallicum</i>	Lidské výkaly	<i>B. subtitle</i>	Odpadní vody
<i>B. gallinarum</i>	Slepé střevo kuřat	<i>B. suis</i>	Selečí výkaly
<i>B. indicum</i>	Trávicí trakt Včely východní (<i>Apis cerana</i>) a Včely obrovské (<i>Apis dorsata</i>)	<i>B. thermoacidophilum</i>	Odpadní vody
		<i>B. thermophilum</i>	Prasečí a telecí výkaly

3.2.2.2 Charakterizace rodu *Lactobacillus* spp.

Zástupci rodu *Lactobacillus* spp. mají tvar pravidelných tyčinek, které se shlukují do palisád nebo krátkých řetízků. Jsou to gram-pozitivní, kataláza negativní, nesporulující a nepohyblivé bakterie. Dle potřeby kyslíku je můžeme označit za fakultativní anaeroby nebo mikroaerofily (mají slabý růst na vzduchu, ale silnější růst při redukované koncentraci kyslíku), avšak někteří zástupci vyžadují při izolaci anaerobní podmínky (Sedláček, 2007).

Podle konečných produktů fermentace cukrů, lze laktobacily rozdělit do 3 skupin:

1. Obligátně homofermentativní – jsou schopny fermentace hexózy na kyselinu mléčnou. Do této skupiny patří např. *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. salivarius*.
2. Fakultativně heterofermentativní – mají dvě metabolické dráhy. Fermentují hexózu na kyselinu mléčnou, ale pokud jsou limitovány kyslíkem, produkují směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a ethanolu. Zde můžeme jmenovat zástupce jakou např. *L. casei* (obr.7), *L. curvatus*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*.
3. Obligátně heterofermentativní – ty z hexózy prodují pouze směs kyseliny mléčné, octové, ethanolu a CO₂. Do této skupiny lze zařadit *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. kefir*, *L. panis*, *L. reuteri*, *L. vaginalis* (de Vuyst et Vendamme, 1994). Zástupci rodu *Lactobacillus* spp. a jejich výskyt je uveden v tabulce 2.

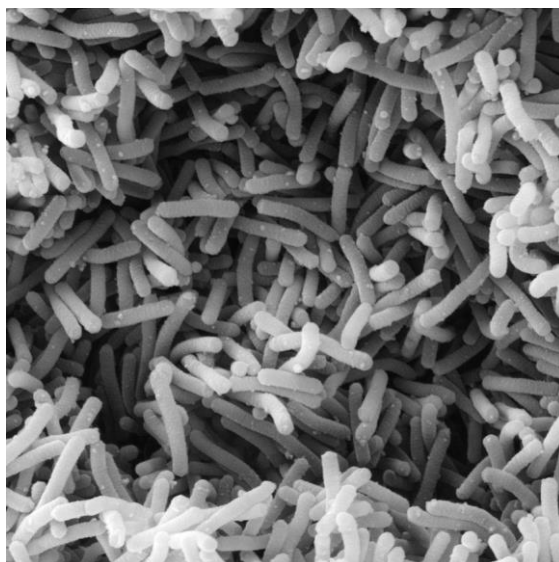
Tabulka 2. **Druhy laktobacilů a jejich výskyt** – upraveno (Walter, 2008).

Výskyt	Druh	Výskyt	Druh
Výkaly	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. curvatus</i>	Fermentované mléčné výrobky	<i>L. johnsonii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
Ústní dutina	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. vaginalis</i>	Směsné jogurtové a termofilní kultury (sýry švýcarského nebo italského typu)	<i>L. delbrueckii</i>

Laktobacily se nacházejí v místech, která jsou bohatá na sacharidy, tedy např. ve sliznici vstupních orgánů těla (vagína, střevo, ústní dutina) (Hammes et Vogel, 1995). V trávicím traktu jsou laktobacily zastoupeny v množství 10^9 KTJ/g výkalů (Hill, 1997). Nacházejí se i v rostlinném materiálu jako je např. hnůj, siláž, fermentované potraviny (Hammes et Vogel, 1995).

3.2.2.2.1 Optimální podmínky

Jejich optimální teplota růstu se pohybuje v rozmezí 30 – 40 °C. Optimální rozmezí pH je neutrální, tedy 5,5 – 6,2. Laktobacily mají komplexní nutriční požadavky (na sacharidy, aminokyseliny, peptidy, estery mastných kyselin, soli, deriváty nukleových kyselin a vitaminy) (Hammes et Vogel, 1995; Sedláček, 2004).



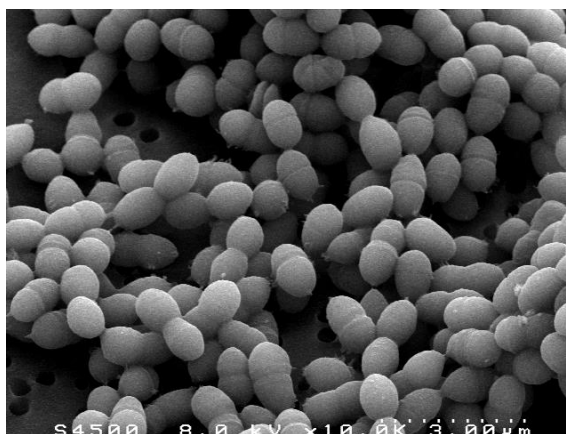
Obrázek 7: *Lactobacillus casei* (<https://fineartamerica.com/featured/1-lactobacillus-casei-shirota-bacteria-science-photo-library.html/>)

3.2.2.3 Charakterizace rodu *Streptococcus* spp.

Rod *Streptococcus* spp. zahrnuje gram-pozitivní, nepohyblivé a kataláza negativní koky, které se sdružují do dvojic až řetězků. Všichni zástupci tohoto rodu jsou fakultativně anaerobní, takže nevyžadují ke svému růstu kyslík, ale tolerujího. Mají fermentační metabolismus, sacharidy přeměňují na kyselinu mléčnou, bez produkce plynu, proto se zařazují mezi homofermentativní bakterie. Tento rod zahrnuje druhy jak komenzální, tak i parazitické až patogenní. Některé nepatogenní druhy jsou součástí mikroflory ústní dutiny (Sedláček, 2007; Votava, 2003). V živačím traktu se vyskytují v počtu 10^7 KTJ/g výkalů (Hill, 1997).

Rod *Streptococcus* spp. je členěn do 4 skupin:

1. Pyogenní β -hemolytické – sem patří patogenní druhy pro člověka, jako např. *S. pyogenes*, který je příčinou angín.
2. Orální – nejpočetnější skupina tohoto rodu. Řadí se sem *S. salivarius* a *S. sanguinis*, které se nacházejí v ústech člověka i zvířat.
3. Ostatní – sem jsou řazeny streptokoci, kteří se nacházejí především u zvířat, např. *S. uberis*, přítomný na kůži, bradavkách nebo tkáni kravského vemene, může se vyskytovat i v syrovém mléce, nebo *S. equinus*, nacházející se v trávicím traktu koně. Do této skupiny se řadí i *S. thermophilus* (obr. 8)
4. Anaerobní – mezi které řadíme *S. hansenii*, nacházející se ve stolici člověka (Šilhánková, 2002). V tabulce 3 jsou uvedené další vybrané druhy a jejich přirozený výskyt.



Obrázek 8: *Streptococcus thermophilus* (<http://www.mysticalbiotech.com/portfolio/streptococcus-thermophilus/>)

3.2.2.3.1 Optimální podmínky

Teplota pro růst zástupců rodu *Streptococcus* spp. je 25 – 45 °C, ale maximální a minimální teploty se liší v závislosti na jednotlivých druzích. Obvykle ale růst neprobíhá pod 10 °C, optimální teplota je 37 °C. Optimální pH je mírně zásadité 9,5. Jejich růst probíhá pouze na komplexních mediích, neboť streptokoky jsou náročné na živiny. Pro svůj růst potřebují aminokyseliny, peptidy, puriny, pyrimidiny a vitaminy (Sedláček, 2007).

Tabulka 3. **Vybrané druhy streptokoků a jejich výskyt** – upraveno (Bednář, 1996).

Druh	Výskyt
<i>S. pyogenes</i>	Kůže, ústní dutina
<i>S. agalactiae</i>	Vagina, gastrointestinální trakt
<i>S. mutans</i>	Ústní dutina, zubní kaz
<i>S. thermophilus</i>	Součást jogurtové kultury, fermentované mléčné výrobky

3.2.3 Prospěšné účinky probiotik

Důležitým požadavkem na probiotické kmeny mikroorganismů, aby mohly být použity při výrobě potravin a mít prospěšné účinky na hostitele (člověka), je potřeba udržet si životaschopnost a aktivitu v potravinové matrici před konzumací. Vhodnými nosiči jsou například fermentované mléčné výrobky, jejichž pufovací schopnost poskytuje ochranu mikroorganismům v gastrointestinálním traktu.

Bakteriální kmeny, které jsou používány do probiotických potravinářských výrobků, musí plně splňovat tyto požadavky:

- 1) Přežít kyselé podmínky žaludku (pH 1 – 4).
- 2) Být rezistentní k aktivitě žlučových solí.
- 3) Být rezistentní k degradaci trávicími enzymy, které jsou přítomné v tenkém střevě.
- 4) Přežít aktivitu toxických metabolitů, v první řadě fenolů, produkovaných během trávicího procesu, antibiotik a fágů, při anaerobních podmínkách a podmínkách skladování nosiče (Kailasapathy and Chin, 2000; Salminen et al., 1998).

Tyto probiotické bakterie jsou v potravině ve formě životaschopných buněk, kterých je k jejich účinku potřeba poměrně velké množství. Kultury musí být nejen schopny odolat kyselému prostředí žaludku, ale také je nutné, aby se poté ve střevě množily. Jejich působení musí být charakterizovatelné například zvýšením odolnosti konzumenta vůči některým patogenním mikroorganismům (Bartošová, 2009). Schopnost probiotik osidlovat tlusté střevo je však často velice nejistá, ačkoliv přežívají a zůstávají životaschopné po celou dobu průchodu gastrointestinálním traktem. Ve většině případů je tedy nutné pokračovat s pravidelným přijímáním potravy obsahující probiotické kultury, spíše než předpokládat, že pár dávek umožní mikroorganismům osídlit střevo permanentně (Fuller, 1991). Minimální terapeutické dávky, je navrženo na $10^8 - 10^9$ KTJ/ml denně, je tedy běžné, že probiotické produkty prodávané v EU s jakýmkoli nárokem na zlepšení zdraví spotřebitelů, musí

dodržovat kritérium minimálního obsahu 10^6 KTJ/ml živých buněk k datu spotřeby. (Kailasapathy and Chin, 2000).

V přirozeném prostředí se ochranná střevní mikroflóra vyvíjí do značné míry automaticky a není zde potřeba probiotických doplňků stravy, ale v současnosti žijí lidé a hospodářská zvířata však spíše v poněkud nepřirozených podmínkách. Je stále více evidentní, že velké množství lidských civilizačních onemocnění je často spojeno s nezdravým životním stylem a teoreticky bychom jim tedy měli být schopni předejít. Stres moderního života, snižující se fyzická aktivita a konzumace nevyvážené stravy přispívají ke zvýšení rizika rozvoje různých chorob, jež jsou způsobeny nebo podpořeny změnami přirozené střevní mikroflóry. (Bengmark, 1998). Také příjem nadměrného množství antibakteriálních látek, sahajících od vinného octa po antibiotika, intestinální mikrobiotě neprospívá (Fuller, 1991).

Ukazuje se, že udržováním příznivého mikrobiálního osídlení střeva lze dosáhnout pozitivních účinků na organismus jako celek. K tomu přispívá strava s dostatečným množstvím vlákniny, zejména rozpustné, zakysaných mléčných výrobků a dalších kvašených potravin obsahujících probiotické kmeny mikroorganismů. Ani přípravkům s probiotiky však nelze upřít jejich význam v prevenci a léčbě nemocí (Grofová, 2010).

3.2.3.1 Využití jako antibiotika

V roce 1877 Pasteur a Joubert objevili antagonistickou interakci mezi některými bakteriálními kmeny a na přelomu století Mečnikov diskutoval možnosti léčby intestinálních poruch pomocí střevu prospěšných mikroorganismů. Během posledních 50 let se však zájem zaměřil na užívání chemoterapeutik a antibiotik. Důvody pro současné obnovení zájmu o kontrolu střevních infekcí pomocí zdravé intestinální mikroflóry, zahrnují následující body:

- 1) Zjištění, že léčba antibiotiky není úspěšná v takové míře, jak bylo očekáváno.
- 2) Uvědomění si faktu, že léčba antibiotiky narušuje ochranou střevní flóru a činí organismus náchylnější k dalším infekcím.
- 3) Zvyšující se obavy z rezistence k antibiotikům jako výsledek jejich všeobecně rozšířeného častého předepisování a užívání (Bengmark, 1998).

3.2.3.2 Rakovina tlustého střeva

Probiotické bakterie mohou vykazovat účinky proti nádorovým onemocněním a to na nádory v oblastech prsu, děložního čípku a tlustého střeva. Tento antikancerogenní efekt je vysvětlen několika způsoby. Probiotika snižují pH, snižují hladinu prokarcinogenních

enzymů, zlepšují proliferaci buněk inhibicí normální buněčné apoptózy a také mají citoprotektivní účinek (Donaldson, 2004).

V literatuře je zaznamenán pravděpodobný pozitivní účinek probiotik při prevenci rakoviny tlustého střeva. Obecně antikarcinogenní mechanismy zahrnují systémové účinky, přímý účinek na střevní sliznici a intraluminální účinek (Chong, 2014). Antinádorové působení probiotik může být způsobeno: inhibicí karcinogenů a/nebo prokarcinogenů, inhibicí růstu mikroorganismů, které konvertují prokarcinogeny na karcinogeny, aktivací hostitelského imunitního systému, redukcí střevního pH a tím regulaci aktivity potenciálně patogenních mikroorganismů, změnou motility tlustého střeva a doby průchodu tráveniny (McIntosh, 1996). Probiotika také mají imunomodulační efekt na hostitele, kde mají schopnost modulovat zánět ve střevě, který vede ke vzniku karcinomu (Chong, 2014).

Pokusy na zvířatech potvrdily, že jogurt a fermentovaná mléka s probiotickými kulturami inhibují tvorbu a proliferaci nádoru. To může být vysvětleno metabolickým účinkem probiotických bakterií, jež zahrnuje redukcí fekálních enzymů, které v gastrointestinálním traktu konvertují prokarcinogeny v karcinogeny. U některých kmenů *L. acidophilus* a *Bifidobacterium* spp. bylo pozorováno, že redukuje hladinu fekálních enzymů jako β -glukuronidázy, azoreduktázy, nitroreduktázy a ureázy, jež katalyzují přeměnu karcinogenních aminů. Konzumace probiotik při spojení s oligosacharidy může navíc podpořit jejich růst v tlustém střevě a tím i produkci většího množství mastných kyselin s krátkými řetězci jako je máselná, octová, mléčná a mravenčí kyselina, u nichž byly potvrzeny protinádorové účinky na buněčné úrovni (Kailasapathy and Chin, 2000).

Ve studii Ankaiah a spol. (2017) se zabývali protirakovinnými účinky enterocinu bakterií rodu *Enterococcus* spp. Konkrétně se zabývali enterocinem A, který je důkladně charakterizován a produkován *E. faecium*, který byl izolován z lidského střeva. Došli k závěru, že vykazuje i antibiotickou aktivitu proti patogenním mikroorganismům jako jsou *Acinetobacter baumannii*, *Lysteria monocytogenes* nebo *Streptococcus aureus*. Došli také k závěru, že tento enterocin vykazoval protirakovinné účinky i na buňkách typu Caco-2, kde indukuje pozdní apoptózu a zastaví buněčný cyklus ve fázi sub – G, G1 a nevykazuje žádnou inhibiční aktivitu k růstu normálních buněk (Ankaiah et al., 2017).

Autoři Rajoka a kol. (2018) zkoumaly adhezi *Lactobacillus* spp. *in vitro* k buněčné linii Caco-2. Všechny testované kmeny vykazovaly stejnou míru adheze k této adenokarcinomní buněčné linii, ale největší míru vykazovaly kmeny *Lactobacillus ingluviei* a *Lactobacillus vaginalis* (> 90 %). Tím autoři potvrdili schopnost adherence tohoto kmene

a navrhli myšlenku, že bakterie *Lactobacillus* spp. mohou mít v tlustém střevě inhibiční účinky proti rakovinným buňkám (Rajoka et al., 2018).

3.2.3.3 Diabetes mellitus

Diabetes 2. typu u osob, které konzumují dlouhodobě stravu s vysokým obsahem tuku, je spojen s proinflamatorním stavem. Složení přirozené mikroflóry střeva často určuje stupeň zánětu, jež přispívá ke vzniku onemocnění diabetes mellitus a obezity. Bylo zjištěno, že protizánětlivý faktor nepřímo koreluje s populací bifidobakterií ve střevě. Ukázalo se také, že u diabetu vyvolaného tučnou stravou korelovalo zvyšující se množství bifidobakterií ve střevě se zlepšením glukózové tolerance. Pozitivním působením na chronickou zánětlivou odpověď organismu, snížením množství endotoxinu ve střevě a posílením střevní bariéry by tak mohly bifidobakterie pomoci redukovat výskyt diabetu 2. typu (Grofová, 2010).

U diabetu 1. typu by mohla probiotika významně pomoci modulací imunitních reakcí organismu při správném osídlení zažívacího traktu malých dětí, a tím případně i zabránit jeho vzniku. Děti, které se dostaly do styku s probiotickými kmeny laktobacilů v ranném věku, vykazovaly snížené riziko vzniku autoimunitních ostrůvků. Mechanismus působení zatím není dostatečně popsán, ale předpokládá se, že nedostatek bakterií, které produkují laktát ve střevě, jsou nahrazeny kmeny, které vytvářejí butyrát, a to vede k aberantní imunitní odpovědi (de Goffau et al., 2014; Heeney et al., 2018).

3.2.3.4 Antihypertenzní a hypocholesterolemický účinek

Probiotika jsou primárně spojována hlavně s pozitivními účinky na trávicí trakt, ale výsledky některých současných studií také ukazují, že hrají důležitou roli v metabolických poruchách, které vedou k hypertenzi. Diskutována je schopnost modulovat lipidový profil, působit na hladinu inzulínu, reninu a pohlavních hormonů. Snížení množství sérového cholesterolu a zlepšení profilu krevních lipidů vede ke snížení rizika hypertenze. V roce 1974 zjistili Mann a Spoerry, že mléko fermentované laktobacily mělo hypocholesterolemický efekt. Podobné účinky později prokázaly také bifidobakterie, u nichž bylo zaznamenáno, že její konzumace znatelně snižují hladinu sérového cholesterolu. Mechanismem může být pravděpodobně asimilace cholesterolu bakteriemi v tenkém střevě, jeho zabudování do buněčné stěny nebo schopnost enzymaticky dekonjugovat žlučové kyseliny (Grofová, 2010; Klaver et Van, 1993). Na biotransformaci žlučových kyselin, která má za následek zlepšení metabolismu lipidů a cholesterolu, se účastní bakterie lidského mikrobiomu a to *Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides fragilis* a *Escherichia coli* (Fukiya et al., 2009).

3.2.3.5 Laktózová intolerance

Laktózová intolerance neboli laktázová nedostatečnost znamená, že koncentrace enzymu β -D-galaktosidázy (triviálně laktáza) štěpícího laktózu, který je syntetizován v kartáčovém lemu mukózy tenkého střeva, je nízká nebo není produkována vůbec. Tento stav způsobuje neschopnost trávení laktózy, fenomén nazývaný také laktózová malabsorbce nebo laktózová maldigestce (de Vrese et al., 2001). Schéma procesů trávení laktózy v lidském těle tolerantních a intolerantních pacientů znázorňuje obr. 9.

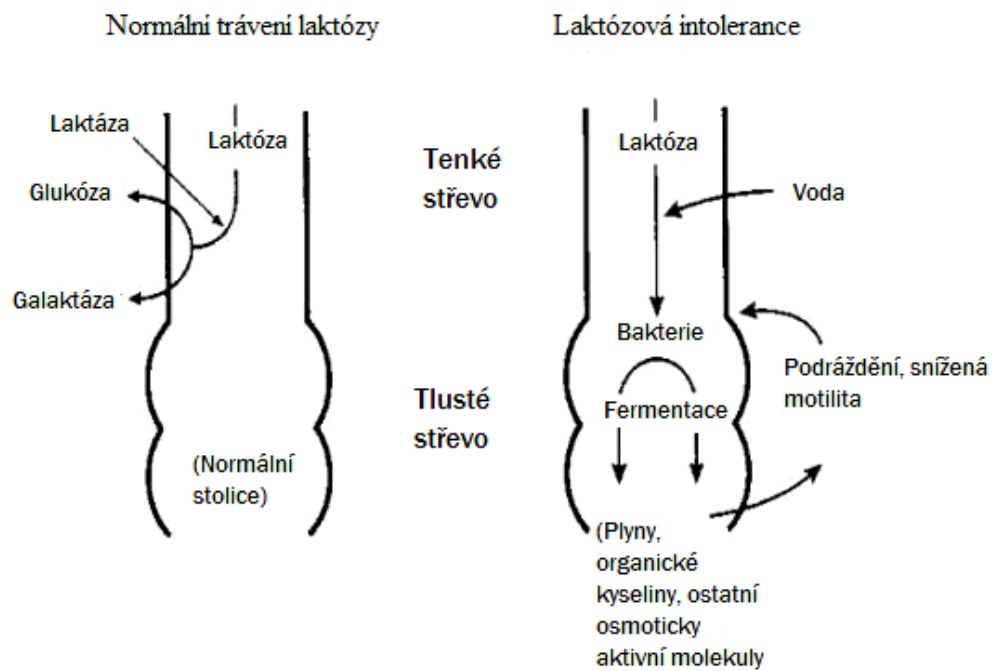
Velká část světové populace je laktózově intolerantní. Schopnost vytvářet dostatečné množství enzymu zodpovědného za trávení laktózy, ačkoli je přítomná v kojeneckém období, vymizela po přechodu na normální stravu. V místech, kde mléko nepředstavuje základní potravinu, nezpůsobuje laktózová nesnášenlivost žádné problémy, ale když tito lidé migrují do Evropy nebo USA, problémy nastanou, protože příjem laktózy v potravinách je těžké se vyhnout.

Mechanismus zatím nebyl zcela objasněn, ale bylo navrženo, že fermentované mléčné produkty jsou zdrojem předem vytvořené laktázy a bakterií, které laktázu produkují, když se dostanou do tenkého střeva (Fuller, 1991).

Aktivita mikrobiální β -D-galaktosidázy zůstává nedotčena při průchodu žaludeční částí trávicího traktu a enzym je poté uvolněn žlučovými solemi do tenkého střeva, kde podporuje trávení laktózy. Dalším mechanismem je pak zpomalení vyprazdňování žaludku a průchodu tráveniny střevem, což prodlužuje dobu působení zbytků β -D-galaktosidázy, produkované (v nižší míře) v tenkém střevě a snižuje tak pacientům osmotickou zátěž laktózy. Krátkodobé a dlouhodobé přijímání laktózy a bakterií ve fermentovaných mléčných produktech může navíc působit na střevní pH a ostatní proměnné intestinálního prostředí a může tedy zmírnit příznaky laktózové intolerance nebo ostatních gastrointestinálních poruch (de Vrese et al., 2001).

Ne všechny probiotické kmeny mikroorganismů jsou však schopny uvolňovat laktázu do tenkého střeva. Tento jev byl pozorován například u některých zástupců *Lactobacillus acidophilus* a probiotických i neprobiotických bifidobakterií (de Vrese et al., 2001; Fuller, 1991).

Schopnost uvolňovat enzym byla naopak prokázána u *Bifidobacterium angulatum*, v nižší míře u *B. breve* a *B. longum* (Kailasapathy and Chin, 2000).



Obrázek 9: Schematické znázornění trávení laktózy za normálních podmínek a při laktózové intoleranci (<http://www.rayur.com/wp-content/uploads/2012/07/Lactose-Intolerance.jpg>).

3.3 Tradiční mléčné výrobky střední Asie

3.3.1 Velbloudí mléko

Velbloud dvouhrbý (*Camelus bactrianus*), jehož výskyt je znázorněn na obr. 10, a velbloud jednohrbý (*Camelus dromedarius*) patří do řádu sudokopytníků a čeledi velbloudovitých. Mají třídílný žaludek, ale přežvykují jinak než vlastní přežvýkavci. Velbloudí mléko patří mezi tzv. mléka kaseinová, takže v jeho složení převládají kaseinové bílkoviny. Vybrané složky mléka, porovnané ke kravskému mléku, jsou uvedeny v tabulce 4. Velbloud se chová nejenom pro přepravu břemen, ale i pro maso a mléko či vlnu. Kazachstán je země, kde žijí dva druhy velbloudů (*C. bactrianus* a *C. dromedarius*) a jejich hybridi (Konuspayeva et al., 2007; Tsakalidou et Papadimitriou, 2016).



Obrázek 10: Výskyt velblouda dvouhrbého (<http://www.atlaszvirat.cz/photos-mapy/mapa-velbloud-dvouhrby.jpg>)

Velbloudí mléko a výrobky z něj jsou velmi populární v Kazachstánu, kde jsou známy jeho léčivé a dietární vlastnosti. (Faye et al., 2008). Mléko velblouda má protirakovinové, hypoalergení a antidiabetické vlastnosti. Velbloudí mléko je i důležitým zdrojem bílkovin pro lidi, kteří žijí v suchých oblastech světa (Magjeed, 2005; Shabo et al., 2005; Agrawal et al., 2003). Spotřeba velbloudího mléka je stále oblíbenější v Asii, Africe a Evropě pro své výživné i léčebné vlastnosti, které toto mléko má v důsledku přítomnosti základních živin (bílkoviny, tuky, laktóza a minerály) a bioktivních látek (imunoglobuliny, laktoferin, lysozym nebo protein rozpoznávající peptidoglykan). Specifikací velbloudího mléka je blaktoglobulin, patřící k rozpustné frakci mléka (Lajnaf et al. 2018). Studie uvádí zajímavé biochemické vlastnosti velbloudího mléka a lepší stabilitu složek ve srovnání s mlékem jiných savců jako je například skot nebo člověk. Nejdůležitější vlastností velbloudího mléka je jeho hypoglykemická aktivita, která byla zkoumána u diabetu 1. typu, pozorována na zvířecím

i lidském modelu. Bylo navrženo, že konzumace velbloudího mléka vede ke snížení potřebné dávky inzulínu u diabetických pacientů (Abdulrahman et al., 2016).

Tabulka 4. Složení velbloudího mléka (Konuspayeva et al., 2009) v porovnání s kravským mlékem (Ceballos et al., 2009).

Vybrané složky	Velbloudí mléko	Kravské mléko
Tuk	5,8 %	3,42 %
Laktóza	5,33 %	4,11 %
Bílkoviny	4,02 %	3,48 %

Nejběžnějšími druhy probiotických bakterií ve velbloudím mléce jsou *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (Khedid et al., 2009). Dále byl izolován *L. plantarum* v množství 10^9 KTJ/ml. *L. reuteri* byl izolován v množství $10^{9,2}$ KTJ/ml.

3.3.2 Tradiční produkty z velbloudího mléka

3.3.2.1 Chal

Chal nebo šubat je turkický nápoj z fermentovaného velbloudího mléka, který má velký potenciál stát se funkční potravinou. Je to nápoj, charakteristický svou šumivostí a kyselou příchutí. Tento nápoj je populární ve střední Asii, především v Kazachstánu a Turkmenistánu. Tento nápoj patří mezi základní letní jídla. Z povrchu chalu při výrobě se odebírá agar. Tomuto fermentovanému nápoji se připisují virucidní vlastnosti. Tento tradiční nápoj se připravuje v koženém vaku či v keramické nádobě. Ke zředěnému mléku se po dobu 3 – 4 dnů přidává čerstvé mléko. Velbloudí mléko nezksyne po dobu 72 hodin při teplotě 10 °C, kdy se využívá spontánní kvašení. Při 30 °C toto mléko zksyne během 8 hodin. Chal se také může vyrobit pomocí *Lactobacillus casei* a *Streptococcus thermophilus* při teplotě 25 °C po dobu 8 hodin (Grigoryants, 1954; Moslehisad et al., 2013; Yagil, 1982). Autoři Soleymanzadeh a kol. (2016) izolovaly bakterie z tradičního chalu z oblasti Íránu. Celkový počet bakterií se pohyboval mezi 7,3 a 9,04 log KTJ/ml po 24 hodinách fermentace (Soleymanzadeh et al., 2016).

3.3.2.2 Gariss

Velbloudí mléko je také používáno v některých afrických regionech. Například v některých oblastech Súdánu se výrobku z velbloudího mléka říká gariss. Výroba produktů z tohoto mléka je v této zemi nestabilní, díky nomádskému způsobu života jejich obyvatelů, výrobky se tudíž nedostávají k obyvatelům měst nebo větších obcí. Avšak kočovní obyvatelé si musí z velbloudího mléka připravit kvašený nápoj zvaný gariss, který jim slouží po několik měsíců jako zdroj různých živin (Abdelgadir et al., 1998; Abdelgadir et al., 2008).

Gariss je z velbloudího mléka vyráběn pomocí semikontinuálního fermentačního procesu, kdy fermentace probíhá ve dvou kožených vacích obalených mokrou travou na hrbech velblouda, kde je mléčný obsah vystaven neustálému promíchávání, díky trhavé chůzi velbloudů. Z těchto vaků se odebírá část ke spotřebě, která je ihned nahrazena čerstvým velbloudím mlékem. Takto se to opakuje až měsíce (Abdelgadir et al., 1998).

Z mikrobiologického hlediska bylo zjištěno, že za fermentační proces je zodpovědná směs bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus* spp. a *Streptococcus* spp.) a kvasinek. Ve studii dle Sulieman a kol. (2006) byla charakterizována mikroflora vzorků garissu ze dvou oblastí Súdánu pomocí fenotypových metod. Zjistili, že v garissu se nachází bakterie jako *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, který byl nejdominantnější, dále pak *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* sp. a *Leuconostoc* sp. (Abdelgadir et al., 2008; Sulieman et al., 2006).

3.3.2.3 Suusac

V Keni je jak čerstvé, tak i fermentované mléko konzumováno obyvateli, žijícími pasteveckým způsobem života v suchých a polosuchých oblastech země. Tradičně se tu připravuje z velbloudího mléka fermentovaný nápoj zvaný suusac, který vzniká fermentací z nechlazeného mléka v kouřem ošetřené tykvy. Proces kvašení probíhá při okolní teplotě (26 – 29 °C) po dobu 1 – 2 dnů. Vzniklý výrobek má bílou barvu, nízkou viskozitu a výraznou kouřovou chuť. V mikrofloře podílející se na vzniku nápoje suusac byly identifikovány bakterie mléčného kvašení (*L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. raffinolactis* a *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) a kvasinky (*Candida krusei*, *Geotrichum penicillatum* a *Rhodotorula mucilaginosa*) (Lore et al., 2005; Sanders, 1991).

3.3.3 Kobydí mléko

Kůň domácí (*Equus caballus*) patří do řádu lichokopytníků a čeledi koňovití. Koňovití jsou specializováni na život ve stepích či savanách a žijí ve stádech. Tato čeleď má jednoduchý žaludek se dvěma laloky, na konci jícnu je klapka, která zabraňuje navrácení potravy. Kobydí mléko se řadí mezi mléka tzv. albuminová (Law, 1997). Vybrané složky mléka jsou uvedeny v tabulce 5.

Ya et al. (2008) izolovali z kobydího mléka *Lactobacillus casei* Zhang, který vykazoval příznivé probiotické vlastnosti, jako jsou: odolnost vůči kyselinám, žlučová rezistence nebo kolonizace trávicí soustavy (Ya et al., 2008).

Tabulka 5. Složení kobydího mléka (Marconi et Panfili, 1998) s kravským mlékem (Ceballos et al., 2009).

Vybrané složky	Kobydí mléko	Kravské mléko
Tuk	1,5 %	3,42 %
Laktóza	6,2 %	4,11 %
Vápník	64,7 mg/100 g	113,58 mg/100 g

3.3.4 Tradiční produkty z kobydího mléka

3.3.4.1 Kumis

Kumis neboli airag či chigee je tradiční nápoje kočovných kmenů ve střední Asii. Jedná se o spontánně fermentované kobydí mléko, které je oblíbené mezi obyvateli Mongolska, Kazachstánu, Kyrgystánu a některých oblastí Ruska. Kumis je používán také v tradiční čínské medicíně. Kumis je mléčný výrobek velmi podobný kefiru až na to, že kumis je fermentován pomocí kapalné startovací kultury. Kobydí mléko obsahuje větší množství laktózy než mléko kravské, proto tedy konečný produkt má větší obsah ethanolu. Kobydí mléko je v procesu výroby kumisu fermentováno rodem *Lactobacillus* spp. a kvasinkami, za míchání či chvění. V řízené výrobě, trvá fermentace 2-5 hodin při teplotě 27 °C. Hotový výrobek obsahuje mezi 0,7 – 2,5 % alkoholu, 0,5 – 1,5 % kyseliny mléčné, 2 – 4 % laktózy a 2 % tuku (Law, 1997).

Existují tři typy kumisu v závislosti na obsahu kyseliny mléčné: silný, střední a lehký kumis. Silný kumis je získáván pomocí fermentace bakteriemi mléčného kvašení (*L. bulgaricus* a *L. rhamnosus*), které okyselí mléko až na pH 3,6 – 3,3, a jejichž konverzní

poměr laktózy ke kyselině mléčné je asi 80 – 90 %. Mírný kumis obsahuje také bakterie rodu *Lactobacillus* spp., konkrétně *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* a *L. plantarum*. Tyto bakterie mají omezenější okyselovací vlastnosti, takže tento nápoje má pH 4,5 – 3,9 na konci fermentace. Poměr konverze těchto bakterií je v průměru 50 %. Lehkým kumisem je mírně kyselý produkt (pH 4,5 – 5,0) a vzniká pomocí fermentace bakteriemi *S. thermophilus* a *S. cremoris*. (Danova et al., 2005; Law, 1997). Počet bakterií mléčného kvašení zjištěných v kumisu byl následující: *L. casei* v počtu 6,11 KTJ/ml, *L. helveticus* v počtu 7,45 KTJ/ml, *L. kefir* v počtu 6,21 KTJ/ml, *L. plantarum* v počtu 5,6 KTJ/ml. Déle byly spočítány i další druhy bakterií mléčného kvašení např. *Leuconostoc mesenteroides* v počtu 6,58 KTJ/ml nebo *Lactococcus* sp. v počtu 6,86 KTJ/ml (Watanabe et al., 2008).

Fermentace je symbiotická a zaleží na působení dvou typů mikroorganismů. Vedle bakterií jsou to také kvasinky (*Kluyveromyces*, *Saccharomyces* a *Candida* sp.). Ale právě laktobacily hrají hlavní roli ve fermentačním procesu, která ovlivňuje vůni, strukturu a kyselost produktu, stejně tak mají i vliv na lidské zdraví (Danova et al., 2005; Montanari et al., 1996).

Studie dle Rong et al. (2015) navrhovala, že kumis může mít vliv na aktivitu trávicí soustavy, oběhové soustavy, nervové soustavy a imunitního systému (Rong et al.; 2015). Dále byly popsány další příznivé účinky, a to na tvorbu krve, funkci ledvin a endokrinních žláz. Dnes už je kumis řazen mezi funkční potraviny (Fedechko et al., 1995).

3.3.5 Jačí mléko

Jak divoký (*Bos mutus*) je zástupce řádu sudokopytníků a čeledi turů pravých, který je adaptovaný na život ve vysokohorských oblastech centrální Asie. Jeho domovinou jsou hory v Tibetu, Nepálu a čínské části Turkestánu. Jeho domestikovanou formou je jak domácí (*Bos grunniens*), který je chován ve stejných oblastech jako jeho divoký předek. Užívá se jako tažné zvíře, ale zároveň je dojen a porážen pro maso. Zvláštností jeho chovu je, že se sbírá jeho trus, který obyvatelům horských oblastí slouží k zateplování domů nebo jako topivo (Sharma et al., 2006). Jačí mléko je mnohem bohatší na tuk než je mléko kravské – obsahuje 5,3 – 8,8 % mléčného tuku. Zajímavostí je i to, že tukové kapénky v jačím mléce jsou větší oproti mléku kravskému a proto je lze lépe rozbít a zkoagulovat (Luo et al., 2018). Složení jačího mléka je uvedeno v tabulce 6.

Tradičně je v oblasti Himalájí jačí mléko užíváno jako lék proti zánětlivým onemocněním gastrointestinální soustavy (Pei et al., 2018).

Tabulka 6. **Složení jačího mléka** (Li et al, 2011) s **kravským mlékem** (Ceballos et al., 2009).

Vybrané složky	Jačí mléko	Kravské mléko
Tuk	6,12 %	3,42 %
Laktóza	5,03 %	4,11 %
Bílkoviny	4,95 %	3,48 %
Vápník	154,54 mg/100 g	113,58 mg/100 g

3.3.6 Tradiční produkty z jačího mléka

Lidé z oblasti Himaláje připravují řadu fermentovaných mléčných výrobků, které jsou lokálně nazývány jako dahi, mohi, gheu, maa, chhurpi, čhu, somar, philu a shyow. Avšak produkce těchto mléčných produktů je omezena pouze na jednotlivé domácnosti. Výše vyjmenované výrobky, tradiční pro oblast Himaláje, jsou důležitou součástí každodenní stravy obyvatel ve venkovských oblastech. Výroba je velmi jednoduchá, používají část předem fermentovaného mléka jako zdroj bakterií mléčného kvašení do čerstvého převařeného mléka (Dewan et Tamang, 2006; Sharma et al., 2006). Bakterie mléčného kvašení, které byly ve vzorcích těchto produktů identifikovány, byly *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus alimentarius*, *L. bifermatas*, *L. hilgardii*, *L. kefir*, *L. paracasei* subsp. *pseudoplantarum*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L.plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *L. lactis* subsp. *lactis*. Tyto bakterie, vyizolované z tradičních produktů z oblasti Himaláje, vykazovaly vysokou galaktosidázu a antagonitu proti gram-negativním bakteriím (Dewan et Tamang, 2007). Watanabe a kol. (2008) se zaměřili na enumeraci bakterií ze vzorků taragů, které byly vyrobeny z různých druhů mlék. Ve výrobku tarag z jačího mléka z oblasti Arhangai (Mongolsko) byly nalezeny tyto bakterie *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* v počtu 7,74 KTJ/ml, *L. fermentum* v počtu 6,56 KTJ/ml, *L. helveticus* v počtu 7,48 KTJ/ml, *L. kefiri* v počtu 6,60 KTJ/ml (Watanabe et al., 2008). Autoři Ghatani a Tamang (2017) se zabývali izolací probiotic z fermentovaných výrobků z jačího mléka a jejich schopnostmi přinést člověku zdravotní benefity. Dospěli k závěru, že bakterie z jačího mléka snižují hladinu cholesterolu v krvi, jsou odolné proti působení kyselého prostředí v žaludku a jsou schopny dekonjugovat soli žlučových kyselin. Jsou tedy vhodnými kandidáty pro zařazení do funkčních potravin s potenciálem hypocholesterolemickým účinkem (Ghatani et Tamang, 2017).

3.3.7 Ostatní tradiční produkty

Další tradiční produkt v Mongolsku se nazývá tarag. Jde o druh jogurtového mléka, který je vyroben ze směsi kravského a ovčího nebo kozího mléka, ale i velbloudího nebo jačího mléka. Z mongolského taragu se dále, delší fermentací získávají produkty nazývané Isgelen tarag a qoormog. V prvním případě se používá koagulační činidlo jako při výrobě sýrů. Druhý jmenovaný výrobek se dále zpracovává na výrobu destilovaného likéru zvaného šimiyn arqi. Qoormog musí být při své výrobě míchán, aby docházelo k pokročilému alkoholovému kvašení. V těchto výrobcích jsou za fermentaci zodpovědné bakterie např. *Lactobacillus casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. kefiranofaciens*, *L. plantarum* subsp. *plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Streptococcus thermophilus* (Uchida et al., 2007; Yu et al., 2011).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Buněčné linie Caco-2 a HT29-MTX, Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), penicilin a streptomycin, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, neesenciální aminokyseliny, fetální bovinní sérum (FBS), fosfátový pufr (PBS), trypsin, triton X-100, vše zakoupeno od Sigma-Aldrich (CZ). Plastik pro tkáňové kultury a to 24-jamkové destičky, serologické pipety, kultivační láhve, petriho misky vše od Thermo Fisher Scientific (UK).

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace tkáně

Buněčné linie kolorektálního adenokarcinomu Caco-2 a HT29-MTX byly kultivovány v kultivačních lahvích, o velikosti 75 cm². Buňky byly kultivovány v 15 ml DMEM media, které bylo obohaceno 10 % FBS, 1 % hydrogenuhličitanu sodného, 1 % pyruvátu sodného, 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % penicilinu a streptomycinu, a to po dobu 7 dní, kdy každý druhý den bylo toto medium vyměněno za čerstvé. Po sedmi dnech byly buněčné linie sklizeny. V prvním kroku byly buňky opláchnuty 5 ml PBS, které bylo následně odstraněno. Poté bylo k buňkám přidáno 5 ml 1×trypsinu, který byl nechán působit po dobu 3-5 minut. Po uplynutí této doby byl triton zneutralizován, a to přidáním 1 ml DMEM media. Pomocí plastové škrabky byly buněčné linie uvolněny a obsah lahve byl přenesen do 15ml zkumavky typu Falcon a zcentrifugován při 200 × g po dobu 10 minut. Staré medium bylo odstaněno a bylo přidáno medium nové v objemu 5 ml, ve kterém byly buňky rozpuštěny. Do nové kultivační lahve bylo připraveno 15 ml DMEM media. Ze zkumavky byl odebrán 1 ml suspenze a přenesen do této nové kultivačné lahve. Kultivační láhev byla umístěna do CO₂ inkubátoru, kde byla nastavena teplota 37 °C a byla zde 5% CO₂ atmosféra.

4.2.2 Založení 24-jamkové destičky

Z buněčné suspenze, která byla důkladně rozpuštěna, bylo odebráno 100 µl suspenze a smícháno se 100 µl tripanové modře a následně byla odebrána kapka a byla dána na Bürkerovu komůrku. V 1 ml suspenzy byl spočítán obsah buněk. Dle výpočtu byla zjištěna přesná koncentrace sklizených buněk. Do směsi bylo přidáno $3,6 \times 10^4$ Caco-2 a $0,4 \times 10^4$ HT29-MTX. Tato směs byla pipetována na jamku v objemu 500 µl a takto připravená destička byla uložena v kultivačním boxu. Po dobu 14 dní probíhalo každé 2 – 3 dny krmení

těchto buněk. Po 14 dnech by měla proběhnout plná diference buněk a také k plné konflucenci monovrstvy.

4.3 Odběr vzorků

Vzorek velbloudího mléka byl shromážděn na farmě v Almaty (Kazachstán) ze zdravého velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) ručním dojením do sterilních šroubových lahví a uchován v chladných boxech až do transportu do mikrobiologické laboratoře.

4.3.1 Izolace bifidobakterií

Pro izolaci bifidobakterií byl použit Wilkins-Chalgrenův agar (Oxoid, UK) doplněný peptonem ze sojových bobů (5 g/l, Oxoid) a L-cystein-HCl (0,5 g/l, Sigma-Aldrich). Jako součást média byla zahrnuta i selektivní činidla mupirocin (100 mg/l, Oxoid) a ledová kyselina octová (1 ml/l, Sigma-Aldrich). Čerstvě nashromážděný vzorek velbloudího mléka byl sériově zředěn v Wilkins-Chalgren bujonu (Oxoid, UK) obsahující sojový pepton, L-cystein-HCl a Tween 80. Poté byl inokulován na selektivní Wilkins-Chalgrenův agar za anaerobních podmínek (CO₂:H₂ = 90:10) v anaerobních nádobách po dobu 72 hodin při 37 °C. Vzrostlé bakteriální kolonie byly převedeny do zkumavek s anaerobním Wilkins-Chalgrenovým bujonem. Izoláty byly dále kultivovány po dobu 24 hodin při 37 °C. Čistota byla zkontrolována pomocí světelného mikroskopu. Pro účely experimentu byly použity pouze čisté izoláty, mající typickou bifidobakteriální morfologii. Izoláty byly identifikovány na základě fosfoketolázové aktivity fruktózy-6-fosfátu a 16S rRNA sekvence genu (tabulka 7).

Tabulka 7. **Izolované druhy a jejich původ.**

Původ	Označení	Druh
Kmen izolovaný v Kazachstánu	T1-5	<i>B. bifidum</i>
Kmen izolovaný v Kazachstánu	T1-8	<i>B. bifidum</i>
Velbloudí mléko	7-1C	<i>B. crudilactis</i>
	7-2C	<i>B. crudilactis</i>
	7-5C	<i>B. crudilactis</i>

4.3.2 Test adherence

Pro zjištění adhezenčních vlastností byla použita modifikovaná metodika dle Jensen et al. (2012). Z každé jamky na destičce bylo odstraněno staré medium a každá jamka byla propláchnuta 3× pomocí PBS. Poté bylo přidáno 0,5 ml DMEM media bez suplementů. Následně bylo přidáno 0,5 ml kmenů bifidobakterií, kdy výsledná koncentrace byla 1×10^7 . Destička byla inkubována v anaerobním boxu při 37 °C po dobu 2 hodin.

Po dvou hodinách bylo odstraněno medium s bifidobakteriemi. Monovrstvy buněk byly 3× promyty pomocí PBS pro odstranění neadherovaných bakterií. Do prázdných jamek bylo přidáno 300 μ l 1% Triton-X100 na 1 minutu a zředěno 700 μ l PBS. Následně byl roztok pomocí ředící řady aplikován na kultivační medium (Wilkins-Chalgrenův anaerobní agar, Oxoid) v Petriho miskách. Všechny Petriho misky byly inkubovány v anaerobním prostředí při 37 °C pro dobu 48 hodin. Poté byly bakterie spočítány.

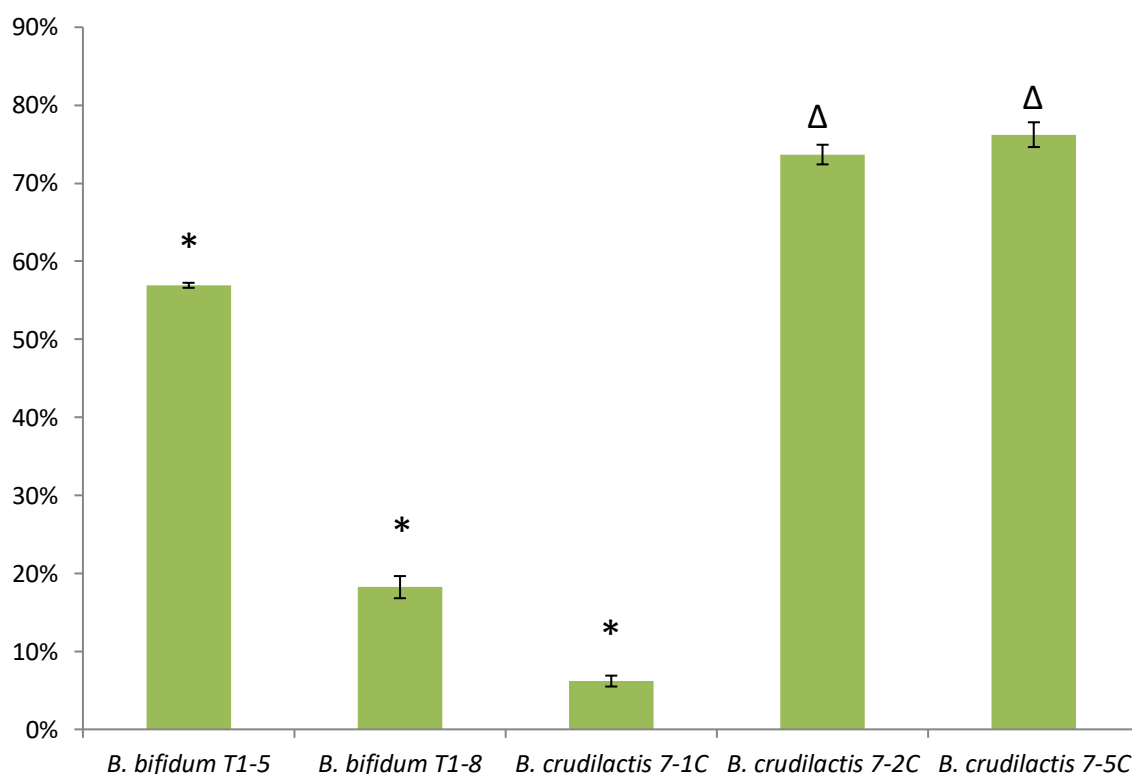
Adherence byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$\text{Adherence} = \frac{\text{počet bakterií ve vzorku}}{\text{počet bakterií v kontrole}} \times 100 \text{ (kontrola reprezentuje 100\% adherenci)}$$

5 Výsledky

Cílem práce bylo zjistit, jestli izolované bakterie z velbloudího mléka jsou schopny adherence k buňkám střevní linie. Adherence byla vyjádřena jako procento bakterií adherovaných k počátečnímu počtu bakterií k mediu. Testování adherence probíhalo ve dvou opakování.

Kmen *B. bifidum* T1-5 adheroval ke směsi buněčných linií Caco-2 a HT29-MTX od 56,52 % do 57,31 %. Další kmen *B. bifidum* T1-8 adheroval mezi 16,5 % a 19,97 %. Kmen *B. crudilactis* 7-1C adheroval ze všech kmenů nejméně a to od 5,33 % do 7,04 %. Nejvíce adheroval kmen *B. crudilactis* 7-2C a to s hodnotami mezi 72,14 % a 75,21 % a hodnoty kmene *B. crudilactis* 7-5C se pohybovaly od 74,28 % po 78,17 %. Největší adherenci ke směsi buněk Caco-2 a HT29-MTX ze všech testovaných kmenů vykazoval kmen *B. crudilactis* 7-5C (graf 1).



Graf 1. **Celková adherence** – grafické znázornění průměru adherence v % a směrodatné odchylky kmenů bifidobakterií ke směsi střevních buněk Caco-2 a HT29-MTX. * označené kmeny mají mezi sebou a kmeny *B. crudilactis* 7-2C a *B. crudilactis* 7-5C statisticky významnou rozdílnost na hladině významnosti $p \leq 0,05$. Mezi Δ označenými kmeny neexistuje statisticky významný rozdíl.

Pro statistické zhodnocení adherence byl použit program Statistica Cz verze 12. Byla stanovena nulová hypotéza, že adherence všech kmenů je stejná. Pro výpočet byl použit jednorozměrový test významnosti (ANOVA), hladina významnosti $p \leq 0,05$. Dle tabulky 8 je p menší než stanovená hladina významnosti (0,05), musíme nulovou hypotézu zamítnout a přijmout hypotézu alternativní – mezi adherencí jednotlivých kmenů existuje statisticky významný rozdíl. Je tedy nutné další statistické prošetření pomocí Schéffeho metody (tabulka 9).

Tabulka 8. **Jednorozměrný test významnosti pro adherenci.** Hladina významnosti $p \leq 0,05$.

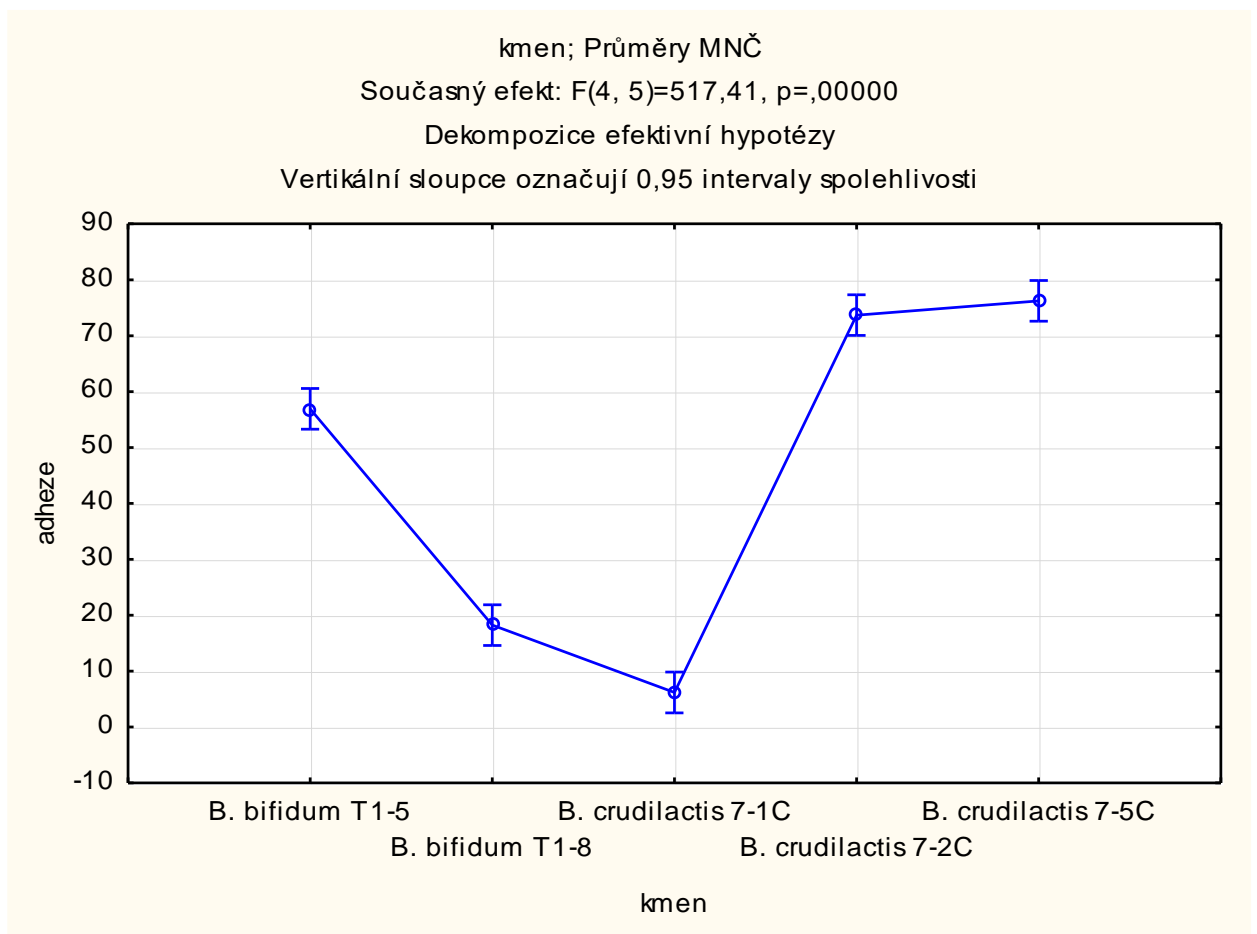
Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro adheze Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	21387,85	1	21387,85	5327,504	0,000000
kmen	8308,84	4	2077,21	517,412	0,000001
Chyba	20,07	5	4,01		

Tabulka 9. **Schéffeho metoda.** Hladina významnosti $p \leq 0,05$.

Č. buňky	kmen	Scheffého test; proměnná adheze Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 4,0146, sv = 5,0000				
		<i>B. bifidum</i> T1-5	<i>B. bifidum</i> T1-8	<i>B. crudilactis</i> 7-1C	<i>B. crudilactis</i> 7-2C	<i>B. crudilactis</i> 7-5C
		56,915	18,235	6,1850	73,675	76,225
1	<i>B. bifidum</i> T1-5		0,000070	0,000018	0,003829	0,001989
2	<i>B. bifidum</i> T1-8	0,000070		0,016431	0,000012	0,000009
3	<i>B. crudilactis</i> 7-1C	0,000018	0,016431		0,000004	0,000004
4	<i>B. crudilactis</i> 7-2C	0,003829	0,000012	0,000004		0,799120
5	<i>B. crudilactis</i> 7-5C	0,001989	0,000009	0,000004	0,799120	

Mezi adherencí kmenů *B. crudilactis* 7-2C a *B. crudilactis* 7-5C neexistuje statisticky významný rozdíl. Mezi kmenem *B. bifidum* T1-5 a kmeny *B. bifidum* T1-8, *B. crudilactis* 7-1C, *B. crudilactis* 7-2C a *B. crudilactis* 7-5C existuje statisticky významný rozdíl v adherenci k buněčným liniím Caco-2. Mezi adherencí kmene *B. bifidum* T1-8 a kmeny *B. bifidum* T1-5, *B. crudilactis* 7-1C, *B. crudilactis* 7-2C a *B. crudilactis* 7-5C existuje statisticky významný

rozdíl. Ve statistickém porovnání kmene *B. crudilactis* 7-1C a kmenů *B. bifidum* T1-5, *B. bifidum* T1-8, *B. crudilactis* 7-2C a *B. crudilactis* 7-5C existuje statisticky významný rozdíl v jejich adhezenci. Adherence kmene *B. crudilactis* 7-2C a kmenů *B. bifidum* T1-5, *B. bifidum* T1-8, *B. crudilactis* 7-1C a *B. crudilactis* 7-5C vykazuje statisticky významný rozdíl v jejich adhezenci. Kmen *B. crudilactis* 7-5C a kmeny *B. bifidum* T1-5, *B. bifidum* T1-8, *B. crudilactis* 7-1C a *B. crudilactis* 7-2C byly dle statistického vyhodnocení zhodnoceny, že je mezi nimi statisticky významný rozdíl. Přehledněji zobrazeno v grafu 2.



Graf 2. **Graf pro ANOVA.** Intervaly významnosti se u kmenů *B. crudilactis* 7-2C a *B. crudilactis* 7-5C překrývají, což potvrzuje, že mezi nimi neexistuje statisticky významný rozdíl v jejich adhezenci na hladině významnosti $p \leq 0,05$.

6 Diskuze

Probiotika jsou bakterie, které mají velký vliv na zdraví svého hostitele, buď díky produkci enzymů nebo syntézou vitamínů (Hill,1997). Bakterie, aby mohly být využívány jako probiotika musí splňovat několik kritérií: být rezistentní k žlučovým solím a kyselému prostředí žaludku, zdravotní bezpečnost, kolonizace střevního epitelu a schopnost adherence na střevní mukózu (Kailasapathy and Chin, 2000). Probiotika mohou vykazovat prospěšné účinky na zdraví jako antibiotika, mohou mít antikarcinogenní, antidiabetické, antihypertenzní a hypocholesterolemický účinek a mohou být nápomocné i při laktóзовé intoleranci.

Pro využití všech zdravotních benefitů probiotik je důležité zjistit adherenci jednotlivých kmenů. Pro tyto *in vitro* testy jsou využívány různé modely, zejména buněčné linie střevního epitelu Caco-2, HT-29, HT29-MTX nebo HCT116. Tyto modely se liší právě v produkci mucinu, kdy buněčná linie Caco-2 mucin neprodukuje a představuje enterocyty, zatímco HT29-MTX mucin produkuje a představuje pohárkové buňky (Grajek et Olejnik, 2004). Pro naše testování jsme zvolili právě směs těchto buněčných linií a zkoumali jsme rozdíl mezi jednotlivými kmeny bifidobakterií v jejich adherenci.

Výsledky pro *B. bifidum* T1-5 byla hodnota adherence $56,92 \pm 0,32$ %, pro *B. bifidum* T1-8 $18,23 \pm 1,42$ %, pro *B. crudilactis* 7-1C $6,19 \pm 0,70$ %, pro *B. crudilactis* 7-2C $73,68 \pm 1,26$ % a pro *B. crudilactis* 7-5C $76,23 \pm 1,59$ %.

Musilová a kol. (2017) se zaměřili na adherenci bifidobakterií a klostridií. Došli k výsledkům, že *B. bifidum* 2 adherovalo z $44,39 \pm 5,45$ %, pro *B. bifidum* 1 byla naměřená adherence $38,91 \pm 6,83$ % bez přídavku oligosacharidů obsažených v mateřském mléku. S přidáním oligosacharidů byla adherence obou kmenů nižší ($22,59 \pm 1,32$ %, resp. $32,59 \pm 4,82$ %). Výsledky studie Musilová a kol. (2017) jsou podobné jako výsledky u našeho kmene *B. bifidum* T1-5.

Inturri a kol. (2017) zkoumali schopnost adherence *B. longum* W11 k monovrstvám buněčných linií HT-29, kdy použili *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 jako referenční materiál. Adherence k lidským intestinálním buňkám se mezi těmito kmeny nijak nelišila, proto autoři označili, že přítomnost exopolysacharidů, které byly přidány k prvnímu kmeni, neovlivnila přilnavost. Došli k závěru, že účinek přidání exopolysacharidů závisí na kmeni. Lze tedy říci, že adherenci bifidobakterií lze ovlivnit přídavkem exopolysacharidů či oligosacharidů, a to buď pozitivně nebo negativně.

Nishiyama a kol. (2017) předpokládali, že při adhezenci kmene *B. bifidum* je hlavním receptorem glykoprotein mucin, který podporuje bakteriální kolonizaci povrchu střevních buněk. Test adherence provedli na buňkách HT-29, které sekretují oba typy mucinu – MUC5Ac a MUC2. Došli k závěru, že adhezenci tohoto kmene lze modifikovat přítomností uhlíku. Jelikož adherence našich kmenů byla zkoumána na směsi buněk, z nichž jedna mucin neprodukuje, je možné, že výsledky adherence pro samotnou buněčnou linii HT29-MTX by byly mnohem větší.

Guglielmetti a kol. (2008) tvrdí, že izolát z lidského střeva *B. bifidum* MIMBb75 velice silně adhezuje k buňkám Caco-2. Studium proteinů identifikovali specifický protein na povrchu, který byl označen jako BopA. Tento protein působí jako promotor adherence k buňkám Caco-2. Podobné bílkoviny a geny, kodující protein BopA, byly nalezeny u dalších osmi kmenů *B. bifidum*. Tato bílkovina ovlivňuje produkci interleukinu-8 v epiteliálních buňkách.

Studie dle Shibahara-Sone a kol. (2016) se zabývala adhezencí kmene *B. bifidum* YIT 10347 na epitelní monovrstvě GCIY. Došli k závěru, že adherence bakterií tohoto kmene byla přibližně desetkrát větší než byla u ostatních bakterií mléčného kvašení. Monovrstva GCIY je buněčná linie simulující rakovinu žaludku. Lze tedy předpokládat, že antikarcinogenní účinek probiotik, resp. kmene *B. bifidum* by šlo použít i k jinému typu karcinomu gastrointestinální soustavy.

Tématu adherence bakterií z velbloudího mléka se zabývala studie dle Vimont a kol. (2017), kteří zkoumali adhezenci probiotických bakterií izolovaných ze syrového velbloudího mléka na buněčné linie Caco-2 a HT-29. Změřili se hlavně na aktivitu *E. faecium* LCW 44, kde se ukázalo, že má vysokou odolnost vůči žaludečním a intestinálním podmínkám prostředí. Jeho index adherence byl hodnocen na 176 ± 86 a 24 ± 86 .

Collado a kol. (2007) uvádějí, že všechny jimi testované kmeny probiotik byly schopny se do určité míry neodlučovat od střevního hlenu. Adhezenci bakterií zkoumali na buňkách, které byli reselectovány ze zdravého jedince. Nejvíce adhezivním kmenem byl *L. rhamnosus* GG (20%) a nejméně adhezivním kmenem byl kmen *Propionibacterium freudenreichii* JS (0,9%). *B. breve* Bb99 adheroval pouze ze 3 %.

Ve studii dle Gagnon a kol. (2016) byla porovnávána schopnost adherence *B. thermophilum* RBL67 k buňkám Caco-2 a HT-29 se čtyřmi dalšími kmeny, a to *B. thermacidophilum* (RBL69 a RBL70), *B. longum* ATCC 15707 a *B. pseudolongum* ATCC 25526. Index adheze kmenu *B. thermophilum* RBL67 byl vyhodnocen jako 625 ± 84 (Caco-2), resp. 1958 ± 318 (HT-29). Mezi ostatními kmeny nebyly zaznamenány žádné

výrazné rozdíly. Nejmenší index adheze měl *B. longum* ATCC 15707 s 54 ± 97 (Caco-2), resp. 150 ± 318 (HT-29).

Studie dle Wickramasinghe a kol. (2015) se zabývala adhezí kmenů *B. infantis* ATCC 15697 a *B. breve* (SC95, SC154 a ATCC 1570) k buněčným liniím Caco-2. Adheze se u kmenu *B. infantis* ATCC 15697 pohybovala mezi 1,1 % - 9,6 %. Nejnižší přilnavost vykazoval kmen, který byl kultivovaný na glukóze jako zdroje uhlíku. *B. breve* SC95 adheroval od 0,9 % do 1,3 %, kde nejvyšší procento adherence vykazoval kmen, který byl kultivován na laktóze jako zdroji uhlíku. Schopnost adherence by mohla být podpořena přidávkem zdroje uhlíku a to v podobě laktózy.

Studie dle Andriantsoanirina a kol. (2014) se zaměřila na adhezi kmenů *B. breve* a *B. longum*, které byly vyizolovány z předčasně narozených a donošených novorozenců. Experiment prováděli na buněčných liniích Caco-2. Adheze kmenů z předčasně narozených dětí byla pro *B. breve* $4,6 \times 10^4$ KTJ/jamku a pro *B. longum* $3,7 \times 10^4$ KTJ/jamku. U donošených novorozenců se adheze vyizolovaných kmenů lišila, a to pro *B. breve* $1,7 \times 10^4$ KTJ/jamku a pro *B. longum* $1,1 \times 10^4$ KTJ/jamku.

Studie dle Ranadheera a kol. (2014) se zabývala adhezí jednotlivých probiotik a jejich vzájemnou kombinací. Pro kmen *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 byla adheze změřena na 1,1 %, kdy přidání kmenů *L. acidophilus* LA-5 a *P. Jensenii* 702 tuto hodnotu snížily na 0,9 %, resp. 0,25 %. Vzájemná kombinace probiotických kmenů nemá pozitivní vliv na zvýšení hodnoty adherence.

Adherenční vlastnosti mohou vykazovat i jiné probiotické kmeny. Byl zkoumán jejich antikarcinogenní potenciál v souvislosti s přilnavostí k buněčné linii adenokarcinomu. Studie dle Balthazar a kol. (2018) testovala adhezí *L. casei* 01, přidaného do zmrzliny, vyrobené z ovčího mléka, k buňkám adenokarcinomu Caco-2, a jak je tato adherence ovlivněna přidáním inulinu. Adhezí zkoumali 1. den, 90. den a 150. den skladování. Adherence *Lactobacillus casei* 01 přidaného do zmrzliny z ovčího mléka byla 79 %, resp. 75 % a 75 %. S přidávkem inulinu se adherence tohoto kmene snížila a to na 73 %, resp. 66 % a 67 %. Přídavek polysacharidů má také spíše negativní vliv na adhezí. Autoři Rani a kol. (2018) se zabývali adhezí kmene *Lactobacillus gasseri* FR4, který byl vyizolován z trávicí soustavy kuřat (*Gallus galus* subsp. *domesticus*), na rakovinnou buněčnou linii lidského kolonokarcinomu HCT116. Došli k závěru, že adherence byla $9,43 \pm 0,51$ %. Bengoa a kol. (2018) se zabývala schopností adheze kmenů *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339, *L. paracasei* CIDCA 83123 a *L. paracasei* CIDCA 83124, které byly vyizolovány z keříru. K posouzení byly použity buněčné linie Caco-2. Autoři porovnávali, jak se změní adherence

těchto kmenů, pokud projdou trávicí soustavou. *L. paracasei* CIDCA 8339 adheroval v obou případech stejně a to $10^{6,5}$ KTJ/ml. *L. paracasei* CIDCA 83123 adheroval před projitím trávicí soustavou $10^{5,9}$ KTJ/ml a v případě, kdy prošel trávicím traktem $10^{6,2}$ KTJ/ml. Poslední ze zkoumaných kmenů *L. paracasei* CIDCA 83124 vykazovala největší rozdíl mezi adherencí před a po projitím trávicím traktem, a to $10^{5,2}$ KTJ/ml, resp. $10^{6,3}$ KTJ/ml.

Studie dle autorů Veljović a kol. (2017) podrobila prozkoumání kmen *Lactobacillus helveticus* BGRA43, který byl izolován z lidského trávicího traktu, jeho schopnosti adherovat k intestinálním buňkám Caco-2. Zjištěná schopnost adherence byla 18 %.

Son a kol. (2018) testovali adherenci *Lactobacillus brevis* FI10700, *L. plantarum* FI10604 a *L. perolens* FI10842 k buňkám lidského adenokarcinomu HT-29. Kmeny byly vyizolovány z typických korejských mléčných výrobků. Největší schopnost adheze z těchto kmenů měl *L. brevis* FI10700 (12,37 %).

7 Závěr

Cílem práce bylo otestovat adhezenci probiotik, které byly vyizolované z tradičních mléčných nápojů, produkovaných v oblasti střední Asie. Z výsledků vyplývá, že dva kmeny, které nejvíce adheroval ke směsi střevních buněk kolorektálního adenokarcinomu Caco-2 a HT29-MTX, byly *B. crudilactis* 7-2C s hodnotou $73,68 \pm 1,26$ % a *B. crudilactis* 7-5C s hodnotou $76,26 \pm 1,59$ %, mezi nimiž nebyl shledán statisticky významný rozdíl. Tyto dva kmeny, které se nacházeli ve velbloudím mléce mají vysoký adhezenční potenciál a mají výrazný probiotický efekt. Jsou schopny velmi dobře osidlovat lidský trávicí trakt.

8 Seznam tabulek, obrázků a grafů

8.1 Seznam obrázků

Obrázek 1: Počet bakterií v orgánech lidského těla.	3
Obrázek 2: Chemická struktura MUC2.....	7
Obrázek 3: Příklad kmenů bakterií mléčného kvašení, jejichž vybraní zástupci jsou řazeni mezi probiotika.	8
Obrázek 4: Příklad dalších méně často užívaných kmenů probiotik.	9
Obrázek 5: <i>Bifidobacterium longum</i>	10
Obrázek 6: Schéma metabolické dráhy bifidobakterií.	10
Obrázek 7: <i>Lactobacillus casei</i>	13
Obrázek 8: <i>Streptococcus thermophilus</i>	14
Obrázek 9: Schematické znázornění trávení laktózy za normálních podmínek a při laktózové intoleranci.	20
Obrázek 10: Výskyt velblouda dvouhrbého	21

8.2 Seznam tabulek

Tabulka 1. Druhy bifidobakterií a jejich výskyt	11
Tabulka 2. Druhy laktobacilů a jejich výskyt.	12
Tabulka 3. Vybrané druhy streptokoků a jejich výskyt.....	15
Tabulka 4. Složení velbloudího mléka v porovnání s kravským mlékem.....	22
Tabulka 5. Složení kobyliho mléka s kravským mlékem.....	24
Tabulka 6. Složení jačího mléka s kravským mlékem.	26
Tabulka 7. Izolované druhy a jejich původ.	29
Tabulka 8. Jednorozměrný test významnosti pro adhezenci.	32
Tabulka 9. Schéffeho metoda	32

8.3 Seznam grafů

Graf 1. Celková adherence	31
Graf 2. Graf pro ANOVA.....	33

9 Seznam literatury

- Abdelgadir, W., Nielsen, D.S., Hamad, S., Jakobsen, M. 2008. A traditional Sudanese fermented camel's milk product, Gariss, as a habitat of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. *International Journal of Food Microbiology*. 127. 215–219.
- Abdelgadir, W.S., Ahmed, T.K., Dirar, H.A., 1998. The traditional fermented milk products of the Sudan. *International Journal of Food Microbiology*. 44. 1–13.
- Abdulrahman, A. O., Ismael, M. A., Al-Hosaini, K., Rame, C., Al-Senaigy, A. M., Dupont, J., Ayoub, M. A. 2016. Differential Effects of Camel Milk on Insulin Receptor Signaling – Toward Understanding the Insulin-Like Properties of Camel Milk. *Frontiers in Endocrinology*. 7. 1-13.
- Agrawal, R., Swami, S., Beniwal, R., Kochar, D., Sahani, M., Tuteja, F., Ghouri, S. 2003. Effect of camel milk on glycemic control, risk factors and diabetes quality of life in type-1 diabetes: a randomised prospective controlled study. *Journal of Camel Practice and Research*. 10. 45-50.
- Andaloussi, S. A., Talbaoui, H., Marczak, R., Bonaly, R. 1995. Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. *Application of Environmental Biotechnology*. 43. 995–1000.
- Andriantsoanirina, V., Teolis, A.-C., Xin, L.X., Butel, M.J., Aires, J. 2014. *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium breve* isolates from preterm and full term neonates: Comparison of cell surface properties. *Anaerobe*. 28. 212-215.
- Ankaiah, D., Palanichamy, E., Perumal, V., Ayyanna, R., Venkatesan, A. 2017. Probiotic characterization of *Enterococcus faecium* por1: Cloning, over expression of Enterocin-A and evaluation of antibacterial, anti-cancer properties. *Journal of Functional Foods*. 38. 280–292.

Balthazar, C.F., Silva, H.L.A., Esmerino, E.A., Rocha, R.S., Moraes, J., Carmo, M.A.V., Azevedo, L., Camps, I., Abude, Y.K.D., Sant'Anna, C., Franco, R.M., Freitas, M.Q., Silva, M.C., Raices, R.S.L., Escher, G.B., Granato, G., Ranadheera, C.S., Nazarro, F., Cruz, A.G. 2018. The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. Food Chemistry. 246. 464-472.

Bartošová, L. Účinky živých bakterií v potravinách [online]. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. 2009 [cit. 2015-05-14]. Dostupné z:

< <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000465&docType=ART&nid=12076>>

Bednář, M., Souček, A., Fraňková, V. 1996. Lékařská mikrobiologie : Bakteriologie, virologie, parazitologie. 1. vydání. Praha : Marvil, 1996. 558 s. ISBN 8023802976.

Bengmark, S. 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. Gut. 42. 2-7.

Bengoa, A.A., Zavala, L., Carasi, P., Trejo, S.A., Bronsoms, S., Serradell, M.D.L.Á., Garrote, G.L., Abraham, A.G. 2018. Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. Food research International. 103. 462-467.

den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., Bakker, B.M. 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. Journal of Lipid Research. 54. 2325–2340.

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

Bisgaard, H., Bønnelykke, K., Stokholm, J. 2014. Immune-mediated diseases and microbial exposure in early life. Clinical and Experimental Allergy. 44. 475–481.

Boirivant, M., Strober W. 2007. The mechanism of action of probiotics. Current Opinion in Gastroenterology. 22. 679-692.

- Ceballos, L.S., Morales, E.R., de la Torre Adarve, G., Castro, J.D., Martínez, L.P., Sanz Sampelayo, M.R. 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22 (4). 322-329.
- Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S. 2007. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International*. 40. 629–636.
- Collado, M.C., Isolauri, E., Salminen, S., Sanz, Y. 2009. The impact of probiotic on gut health. *Current Drug Metabolism*. 10. 68-78.
- Cross, M.L. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 34. 245-253.
- Danova, S., Petrov, K., Pavlov, P., Petrova, P. 2005. Isolation and characterization of Lactobacillus strains involved in koumiss fermentation. *International Journal of Dairy Technology*. 58 (2). 100 – 105.
- Dewan, S., Tamang, J.P. 2006. Microbial and analytical characterization of Chhu, a traditional fermented milk product of the Sikkim Himalayas. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 65. 747–752.
- Dewan S., Tamang, J.T. 2007. Dominant lactic acid bacteria and their technological properties isolated from the Himalayan ethnic fermented milk products. *Antonie van Leeuwenhoek*. 92 (3). 343-352.
- Donaldson, M. S. 2004. Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal*. 21. 1–21.
- Faye, B., Konusbayeva, G., Messad, S., Loiseau, G. 2008. Discriminant Milk Components of Bactrian Camel (*Camelus Bactrianus*), Dromedary (*Camelus Dromedarius*) and Hybrids. *Dairy Science and Technology*. 88. 607-617.

- Fedechko, I.M., Hrytsko, R.I., Herasun, B.A. 1995. The antiimmunodepressive action of koumiss made from cow's milk. *Likars'ka Sprava*. 9. 104–106.
- Fettweis, J.M., Serrano, M.G., Girerd, P.H., Jefferson, K.K., Buck, G.A. 2012. A New Era of the Vaginal Microbiome: Advances Using Next-Generation Sequencing. *Chemical Biodiversity*. 9. 965–976.
- Fukiya, S., Arata, M., Kawashima, H., Yoshida, D., Kaneko, M., Minamida, K., Watanabe, J., Ogura, Y., Uchida, K., Itoh, K., Wada, M., Ito, S., Yokota, A. 2009. Conversion of cholic acid and chenodeoxycholic acid into their 7-oxo derivatives by *Bacteroides intestinalis* AM-1 isolated from human feces. *FEMS Microbiology Letters*. 293. 263–270.
- Fuller, R. 1991. Probiotics in human medicine. *Gastroenterology*. 126 (6). 1620-1633.
- Gagnon, M., Vimont, A., Darveau, A., Fliss, I., Jean, J. 2016. Study of the ability of bifidobacteria of human origin to prevent and treat rotavirus infection using colonic cell and mouse models. *Public Library of Science ONE*. 11 (10). 1-18.
- Gavini F., Pourcher A.M., Neut C., Monget D., Romond C., Oger C., Izard D. 1991. Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origin. *International Journal Systematic Bacteriology*. 4. 548-557.
- Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L., Blumberg, R. S. 2016. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*. 352. 539–544.
- Ghatani, K., Tamang, B. 2017. Assessment of probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from fermented yak milk products of Sikkim, India: Chhurpi, Shyow, and Khachu. *Food Biotechnology*. 31 (3). 210-232.
- Gill, H.S. 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practise and Research Clinical Gastroenterology*. 17. 755-773.

- de Goffau, M.C., Fuentes, S., Van Den Bogert, B., Honkanen, H., De Vos, W.M., Welling, G.W., Hyoty, H., Harmsen, H.J.M. 2014. Aberrant gut microbiota composition at the onset of type 1 diabetes in young children. *Diabetologia*. 57. 1569-1577.
- Grajek W., Olejnik A. 2004. Epithelial cell cultures in vitro as a model to study functional properties of food. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 13 (54). 5-24.
- Grigoryants, N.N. 1954. Composition of camel milk and chal. *Vop. Pit.* 13. 41–5.
- Grofová, Z. 2010. Probiotika a jejich vliv na dyslipidemii a diabetes. *Medicína pro praxi*. 7 (5). 233-234.
- Guarner, F., Schaafsma, G.J. 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 39 (3). 237-238. ISSN 0168-1605.
- Guglielmetti, S., Tamagnini, I., Mora, D., Minuzzo, M., Scarafoni, A., Arioli, S., Hellman, J., Karp, M., Parini, C. 2008. Implication of an Outer Surface Lipoprotein in Adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 Cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (15). 4695–4702.
- Hammes, W.P., Vogel, R.F. 1995. The genus *Lactobacillus*. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2. 19-54.
- Heeney, D.D., Gareau, M.G., L Marco, M. 2018. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Current Opinion in Biotechnology*. 49. 140–147.
- Hill, M.J. 1997. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *European Journal of cancer preventiv*. 6 (1). S43-S45.
- Chong, E. S. L. 2014. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30. 351-374.

Inturri, R., Molinaroc, A., Di Lorenzoc, F., Blandino, G., Tomasello, B., Hidalgo-Cantabrana, C., De Castro, C., Ruas-Madiedo, P. 2017. Chemical and biological properties of the novel exopolysaccharide produced by a probiotic strain of *Bifidobacterium longum*. *Carbohydrate Polymers*. 174. 1172–1180.

Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., Axelsson, L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*. 153(1). 216-222.

Kadlec, R., Křížová, L., Halová D. 2011. In vitro modely adherence probiotik – Přehled. *Mlékařské listy*. 124. I-III.

Kailasapathy, K., Chin, J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*. 78. 80-88.

Khedid, K., Faid, M., Soulaymani, A., Zinedine, A. 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol Res* 164. 81-91.

Klaver, F.A., Van, D.M.R. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugating activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 59. 1120–1124.

Konuspayeva, G., Faye, B., Loiseau, G. 2009. The composition of camel milk: A meta-analysis of the literature data. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22 (2). 95-101.

Konuspayeva, G., Faye, B., Loiseau, G., Levieux, D. 2007. Lactoferrin and Immunoglobulin Contents in Camel's Milk (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius*, and Hybrids) from Kazakhstan. *Journal of Dairy Science*. 90. 38 – 46.

La Fata, G., Weber, P., Mohajeri, M.H. 2018. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 10 (1). 11-21.

- Lajnaf, R., Picart-Palmade, L., Cases, E., Attia, H., Marchesseau, S., Ayadi, M.A. 2018. The foaming properties of camel and bovine whey: The impact of pH and heat treatment. *Food Chemistry*. 240. 295-303.
- Law, B. A. 1997. *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. Springer US. Springer. p. 120. ISBN: 0-7514-0346-6.
- Li, H., Ma, Y., Li, Q., Wang, J., Cheng, J., Xue, J., Shi, J. 2011. The Chemical Composition and Nitrogen Distribution of Chinese Yak (Maiwa) Milk. *International Journal of Molecular Sciences*. 12. 4885-4895.
- Lore, T.A., Mbugua, S.K., Wangoh, J. 2005. Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie*. 38. 125–130.
- Lousinian, S., Mackie, A.R., Rigby, N.M., Panayiotou, C., Ritzoulis, C. 2017. Microcalorimetry of the intestinal mucus: Hydrogen bonding and self-assembly of mucin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 112. 555-560.
- Luo, J., Huang, Z., Liu, H., Zhang, Y., Ren, F. 2018. Yak milk fat globules from Qinghai-Tibetan Plateau: Membrane lipid composition and morphological properties. *Food Chemistry*. 245. 731-737.
- Marconi, E., Panfili G. 1998. Chemical Composition and Nutritional Properties of Commercial Products of Mare Milk Powder. *Journal of Food Composition and Analysis*. 11. 178-187.
- Magjeed, N. 2005. Corrective effect of milk camel on some cancer biomarkers in blood of rats intoxicated with aflatoxin B1. *Journal of the Saudi Chemical society*. 9. 253-263
- McIntosh, G. H. 1996. Probiotic and colon cancer prevention. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 5. 48-52.

- Montanari, G., Zambonelli, C., Grazia, L., Kamesheva, G.K., Shigaeva, M.K. 1996. *Saccharomyces unisporus* as the principal alcoholic fermentation microorganism of traditional koumiss. *Journal of Dairy Science*. 63. 327–331.
- Moslehishad, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M.R., Ezzatpanah, H., Moosavi-Movahedi, A.A. 2013. The proteolytic activity of selected lactic acid bacteria in fermenting cow's and camel's milk and the resultant sensory characteristics of the products. *International Journal of Dairy Technology*. 66(2). 279–285.
- Mukai, T., Kaneko, S., Matsumoto, M., Ohori, H. 2004. Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. *International Journal of Food Microbiology*. 90. 357–362.
- Musilová, Š., Modráčková, N., Doskočil, I., Švejstl, R., Rada, V. 2017. Influence of human milk oligosaccharides on adherence of bifidobacteria and clostridia to cell lines. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 64 (4). 415–422.
- Musilová, Š., Rada, V., Marounek, M., Nevoral, J., Dušková, D., Bunešová, V., Vlková, E., Zelenka, R. 2015. Prebiotic Effects of a Novel Combination of Galactooligosaccharides and Maltodextrins. *Journal of Medicinal Food*. 18 (6). 685-689.
- Nagpal, R., Kurakawa K., Tsuji H., Takahashi T., Kawashima K., Nagata S., Nomoto K., Yamashiro Y. 2017. Evolution of gut Bifidobacterium population in healthy Japanese infants over the first three years of life: a quantitative assessment. *Scientific Reports*. 7. 1-11.
- Nishiyama, K., Yamamoto, Y., Sugiyama, M., Takaki, T., Urashima, T., Fukiya, S., Yokota, A., Okada, N., Mukaib, T. 2017. *Bifidobacterium bifidum* Extracellular Sialidase Enhances Adhesion to the Mucosal Surface and Supports Carbohydrate Assimilation. *American society for microbiology*. 8 (5). 1-15.
- O'Hara, A.M., Shanahan, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*. 7 (7). 688-693.

- Okochi, M., Sugita, T., Asai, Y., Tanakaa, M., Honda, H. 2017. Screening of peptides associated with adhesion and aggregation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro. *Biochemical Engineering Journal*. 128. 178–185.
- Pei, J., Li, X., Han, H., Tao, Y. 2018. Purification and characterization of plantaricin SLG1, a novel bacteriocin produced by *Lb. plantarum* isolated from yak cheese. *Food Control*. 84. 111-117.
- Rajoka, M.Sch.R., Hayat, H.F., Sarwar, S., Mehwishc, H.M., Ahmada, F., Hussain, N., Shah, S.Z.H., Khurshid, M., Siddiqu, M., Shi, J. 2018. Isolation and Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Poultry Intestine. *Microbiology*. 87 (1). 116-126.
- Ranadheera, C.S., Evans, C.A., Adams, M.C., Baines, S.K. 2014. Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. *Journal of Functional Foods*. 8 (1). 18-25.
- Rani, R.P., Anandharaj, M., Ravindran, A.D. 2018. Characterization of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus gasseri* FR4 and demonstration of its in vitro biological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 109. 772-783.
- Rong, J., Zheng H., Liu M., Hu X., Wang T., Zhang X., Jin F., Wang L. 2015. Probiotic and anti-inflammatory attributes of an isolate *Lactobacillus helveticus* NS8 from Mongolian fermented koumiss. *BMC Microbiology*. 15. 1-11.
- Ruas-Madiedo, M. P., Gueimonde, M., Margolles, A., De Los Reyes-Gavila´ N, C. G., Salminen, S. 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal. *Journal of Food Protection*. 69 (8). 2011–2015.
- Salminen, S., Bouley, M. C., Boutron-Rualt, M. C. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*. 80. 147–71.

- Salminen, S., Nybom, S., Meriluoto, J., Collado, M.C., Vesterlund, S., El-Nezami, H. 2010. Interaction of probiotics and pathogens – benefits to human health? *Current Opinion Biotechnology*. 21. 157-167.
- Sanders, M.E. 1991. Mixed cultures in dairy fermentations. *Mixed cultures in biotechnology*. 105–133.
- Sedláček, I. 2007. *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita. Brno. 270 s. ISBN: 80-210-4207-9.
- Shabo, Y., Barzel, R., Margoulis, M., Yagil, R. 2005. Camel milk for food allergies in children. *Immunology and Allergy*. 7. 796-798.
- Sharma, D.K., Ghosh, K., Raquib, M., Bhattacharya, M. 2006. Yak products' profile: an overview. *Journal of Food Science Technology*. 43 (5). 447–452.
- Shibahara-Sone, H., Gomi, A., Iino, T., Kano, M., Nonaka, C., Watanabe, O., Miyazaki, K., Ohkusa, T. 2016. Living cells of probiotic *Bifidobacterium bifidum* YIT 10347 detected on gastric mucosa in humans. *Beneficial Microbes*. 7 (3). 319-326.
- Sivaprakasam, S., Prasad, P.D., Singh, N. 2016. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacology and Therapeutics*. 164. 144–151.
- Soleymanzadeh, N., Mirdamadi, S., Kianira, M. 2016. Antioxidant activity of camel and bovine milk fermented by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented camel milk (Chal). *Dairy Science and Technology*. 96 (4). 443-457.
- Son, S.-H., Jeon, H.-L., Yang, S.-J., Sim, M.-H., Kim, Y.-J., Lee, N.-K., Paik, H.-D. 2018. Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional Korean fermented foods based on *b*-glucosidase activity. *Food Science and Biotechnology*. 27 (1). 123-129.
- Stokholm, J., Blaser, M.J., Thorsen, J., Rasmussen, M.A., Waage, J., Vinding, R.K., Schoos, A.-M.M., Kunøe, A., Fink, N.R., Chawes, B.L., Bønnelykke, K., Bregnbjerg, A.D., Mortensen,

M.S., Al-Soud, W.A., Sørensen, S.J., Bisgaard, H. 2018. Maturation of the gut microbiome and risk of asthma in childhood. *Nature Communications*. 9 (1). 1-10.

Sulieman, A.M.E.H., Ilayan, A.A., El Faki, A.E.A., 2006. Chemical and microbiological quality of Garris, Sudanese fermented camel's milk product. *International Journal of Food Science and Technology*. 41. 321–328.

Šilhánková, L. 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Academia: nakladatelství Akademie věd České republiky. Praha. 363 s. ISBN: 80-200-1024-6.

Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. 2016. *Non-bovine milk and Milk products*. Elsevier Inc. London. 273 s. ISBN: 978-012803361-6.

Uchida, K., Hirata, M., Motoshima, H., Urashima, T., Arai, I. 2007. Microbiota of 'airag', 'tarag' and other kinds of fermented dairy products from nomad in Mongolia. *Animal Science Journal*. 78 (6). 650 – 658.

Veljović, K., Dinic, M., Lukic, J., Mihajlovic, S., Tolinacki, M., Živkovic, M., Begovic, J., Mrvaljevic, I., Golic, N., Terzic-Vidojevic, A. 2017. Promotion of early gut colonization by probiotic intervention on microbiota diversity in pregnant sows. *Frontiers in Microbiology*. 8 (OCT). 1-12.

Vimont, A., Fernandez, B., Hammami, R., Ababsa, A., Daba, H., Fliss, I. 2017. Bacteriocin-Producing. *Enterococcus faecium* LCW 44: A High Potential Probiotic Candidate from Raw Camel Milk. 8 (865). 1-12.

Votava, M. 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Neptun. Brno. 495 s. ISBN: 80-902-8966-5.

de Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, Ch., Schrezenmeir, J. 2001. Probiotics—compensation for lactase insufficiency. *American Society for Clinical Nutrition*. 73 (2). 421-429.

- de Vuyst, L., Vandamme E.J. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. Blackie Academic & Professional. London. p. 539. ISBN: 978-1-4613-6146-6.
- Walter, J. 2008. Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *American Society for Microbiology*. 74 (16). 4985-4996.
- Watanabe, K., Fujimoto, J., Sasamoto, M., Dugersuren, J., Tumursuh, T., Demberel S. 2008. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in Airag and Tarag, traditional fermented milk products of Mongolia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24. 1313-1325.
- Wickramasinghe, S., Pacheco, A.R., Lemay, D.G., Mills, D.A. 2015. Bifidobacteria grown on human milk oligosaccharides downregulate the expression of inflammation-related genes in Caco-2 cells. *BMC Microbiology*. 15 (1). 1-12.
- Ya, T., Zhang Q., Chu F., Merritt J., Bilige M., Sun T., Du T., Zhang H. 2008. Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: a newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China. *BMC Immunology*. 9 (68). 1-9.
- Yagil, R. 1982. Camels and Camel milk. FAO animal production and health paper. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). ISBN 92-5-101169-9.
- Yu, J., Wang , W.H., Menghe, B.L.G., Jiri, M.T., Wang, H.M., Liu, W.J., Bao, Q.H., Lu, Q., Zhang, J.C., Wang, F., Xu, H.Y., Sun, T.S., Zhang, H.P. 2011. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *Journal of Dairy Science*. 94 (7). 3229–3241.
- Zhao, J., Fox, M., Cong, Y., Chu, H., Shang, Y., Fried, M., Dai, N. 2010. Lactose intolerance in patients with chronic functional diarrhoea: the role of small intestinal bacterial overgrowth. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 31. 892–900.