

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Testování potenciálního kryo- a lyoprotektivního účinku
vybraných, ve vodě rozpustných forem disacharidů
a polysacharidů s probiotickým potenciálem u potenciálně
probiotických kmenů laktobacilů a bifidobakterií**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Nikola Vondráčková

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Jiří Killer, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Testování potenciálního kryo- a lyoprotektivního účinku vybraných, ve vodě rozpustných forem disacharidů a polysacharidů s probiotickým potenciálem u potenciálně probiotických kmenů laktobacilů a bifidobakterií" 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 mému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Jířímu Killerovi, Ph.D. z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR za vstřícný přístup a odborné rady při zpracovávání této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala mé rodině a partnerovi za podporu během studia.

Testování potenciálního kryo- a lyoprotektivního účinku vybraných, ve vodě rozpustných forem disacharidů a polysacharidů s probiotickým potenciálem u potenciálně probiotických kmenů laktobacilů a bifidobakterií

Souhrn

Bakterie s probiotickým účinkem mají příznivý vliv na zdraví svého hostitele. Měly by být součástí každodenní stravy člověka. Zdrojem probiotických bakterií mohou být potraviny (fermentované mléčné výrobky, kysané zelí, tempeh, miso atd.), nápoje (kombucha) a doplňky stravy (kapsle, tablety, prášek). Během procesu konzervace těchto bakterií je možné zvýšit jejich životaschopnost přidáním kryo(lyo)protektiv. Nové látky s potenciálním kryo- a lyoprotektivním účinkem jsou předmětem vědeckého zkoumání. Při dlouhodobé konzervaci potenciálně probiotických kmenů laktobacilů a bifidobakterií by takový účinek mohly mít i pro tento účel neprozkoumané, rozpustné disacharidy a polysacharidy.

Cílem navrhované práce byl průzkum potenciálního kryo(lyo)protektivního účinku určitých, ve vodě rozpustných disacharidů (např. laktulózy) a polysacharidů (např. betaglukanů) s víceméně prokázanou prebiotickou aktivitou na vybraných kmenech (izolátech) bifidobakterií a laktobacilů. Pro účely této studie bylo vybráno 12 kmenů, z nichž 6 zástupců bylo rodu *Lactobacillus* a 6 zástupců bylo rodu *Bifidobacterium*.

Z výsledků kryokonzervace a lyofilizace byla zjištěna možná nová využití konkrétních látek nejen pro potřeby uchovávání testovaných kmenů bifidobakterií a laktobacilů, ale i pro navržení nových synbiotických preparátů. V případě kryokonzervace byl prokázán významný kryoprotektivní efekt betaglukanového i laktulóзовého roztoku pro *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* a BB-12. Samotný β -glukanový roztok působil kryoprotektivně u *B. adolescentis*, *Lactobacillus gasseri* a *Lactobacillus johnsonii* a roztok obsahující laktulózu měl kryoprotektivní potenciál u *B. longum* subsp. *longum*, *B. bifidum* MG4 a všech testovaných laktobacilů (*Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus fermentum*). Během lyofilizace měl kryo(lyo)protektivní potenciál β -glukanový roztok především u *Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*.

Klíčová slova: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, konzervace, lyofilizace, zmrazení, kryoprotektivum, lyoprotektivum, probiotika, synbiotika

Testing the potential cryoprotective and lyoprotective effects of selected, water-soluble forms of disaccharides and polysaccharides with prebiotic potential in lactobacilli and bifidobacteria

Summary

Bacteria with a probiotic effect are beneficial for the health of a host. They should be a part of the daily human diet. Probiotic bacteria are present in food (fermented dairy products, sauerkraut, tempeh, miso etc.), beverages (kombucha) and food supplements (capsules, tablets, powder). During the preservation process of these bacteria, it is possible to increase their viability by adding cryo(lyo)protectants. Novel substances with a possible cryo- and lyoprotective effect are the subject of the scientific research. In the long-term preservation of potentially probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria, it may be useful to have soluble disaccharides and polysaccharides for this purpose as well.

We focused on potential cryo(lyo)protective effects, water-soluble disaccharides (e.g. Lactuloses) and polysaccharides (e.g. Betaglucans) with multiple prebiotic activity detected on selected stem (isolated) bifidobacteria and lactobacilli. We selected 12 strains, 6 types of the genus *Lactobacillus* and 6 types of the genus *Bifidobacterium* for this study.

The results of cryopreservation and lyophilization revealed possible new uses of specific substances for storage of tested strains (bifidobacteria and lactobacilli) as well as in design/proposition of new synbiotic preparations. In the case of cryopreservation, a suitable cryoprotective effect of betaglucan and lactulose was discovered for *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* and BB-12. A cryoprotective potential of the β -glucan solution was observed in *B. adolescentis*, *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus johnsonii*. The potential cryo(lyo)protective effectiveness in the lactulose solution was found in *B. longum* subsp. *longum*, *B. bifidum* MG4 and *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus fermentum*. The cryo(lyo)protective potential of β -glucan solution was observed in *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* during lyophilization.

Keywords: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, preservation, freeze-drying, cryopreservation, cryoprotectants, lyoprotectants, probiotics, synbiotics

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Probiotické bakterie	11
3.1.1 Využití a význam pro člověka	12
3.1.2 Probiotika.....	12
3.1.3 Prebiotika.....	14
3.1.4 Synbiotika.....	15
3.2 Laktobacily	15
3.3 Bifidobakterie	16
3.4 Charakteristika vybraných druhů bakterií	17
3.4.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	17
3.4.2 <i>Lactobacillus fermentum</i>	17
3.4.3 <i>Lactobacillus gasseri</i>	18
3.4.4 <i>Lactobacillus johnsonii</i>	19
3.4.5 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	19
3.4.6 <i>Lactobacillus reuteri</i>	20
3.4.7 <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	20
3.4.8 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	21
3.4.9 <i>Bifidobacterium bifidum</i>	21
3.4.10 <i>Bifidobacterium breve</i>	22
3.4.11 <i>Bifidobacterium infantis</i>	23
3.4.12 <i>Bifidobacterium longum</i>	23
3.5 Vybrané metody konzervace	24
3.5.1 Historie a současnost	24
3.5.2 Kryokonzervace	25
3.5.3 Lyofilizace	26
3.5.4 Sušení.....	27
3.5.5 Sprejové sušení	28
3.6 Kryo(lyo)protektiva	28
3.6.1 Glycerol	29
3.6.2 Fruktooligosacharidy (FOS)	29
3.6.3 Galaktooligosacharidy (GOS)	30
3.6.4 β -glukany	30
4 Materiál a metody	31

4.1	Bakteriální kmeny	31
4.2	Rekonstituce a kultivace kultur	32
4.3	Příprava potenciálních kryoprezervačních a lyoprotektivních roztoků... 32	32
4.4	Příprava směsi bakteriálních kultur a roztoků potenciálních kryo- a lyoprotektiv před kryoprezervací a lyofilizací	33
4.5	Stanovení počtu vitálních buněk v časových intervalech	34
5	Výsledky.....	35
5.1	Počty vitálních buněk u zmrazených kultur bifidobakterií	35
5.1.1	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	36
5.1.2	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	36
5.1.3	<i>Bifidobacterium breve</i>	37
5.1.4	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	38
5.1.5	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	38
5.1.6	<i>Bifidobacterium bifidum</i> MG4.....	39
5.2	Počty vitálních buněk u zmrazených kultur laktobacilů.....	39
5.2.1	<i>Lactobacillus gasseri</i>	41
5.2.2	<i>Lactobacillus reuteri</i>	41
5.2.3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	42
5.2.4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	43
5.2.5	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	43
5.2.6	<i>Lactobacillus fermentum</i>	44
5.3	Počty vitálních buněk u lyofilizovaných kultur laktobacilů a bifidobakterií	45
6	Diskuze.....	48
7	Závěr	54
8	Seznam použité literatury	55

Seznam tabulek

Materiál a metody

Tabulka 1. Kmeny bifidobakterií a laktobacilů se sbírkovými čísly použité pro splnění cílů diplomové práce (str. 31)

Tabulka 2. Složení potenciálních kryo- a lyoprotektivních roztoků (g / 100 ml deionizované vody, pokud není uvedeno jinak) (str. 32)

Výsledky

Tabulka 3. Počty vitálních buněk (\pm SO – směrodatná odchylka) u zmrazených kultur bifidobakterií v určitých časových intervalech (str. 35)

Tabulka 4. Počty vitálních buněk (\pm SO – směrodatná odchylka) u zmrazených kultur laktobacilů v určitých časových intervalech (str. 40)

Tabulka 5. Počty vitálních buněk (\pm SO – směrodatná odchylka) u lyofilizovaných kultur laktobacilů a bifidobakterií v určitých časových intervalech (str. 45)

Seznam obrázků

Literární rešerše

Obrázek 1. Změny v zastoupení mikrobioty s rostoucím věkem člověka (str. 11)

Obrázek 2. Teoretický základ pro výběr probiotických mikroorganismů (str. 13)

Obrázek 3. Adherence *Lactobacillus acidophilus* k mikrokřivkám střev člověka (str. 15)

Obrázek 4. Adherence *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* k mikrokřivkám střev člověka (str. 16)

Obrázek 5. Růstová křivka bakterií (str. 25)

Obrázek 6. Demonstrační design lyofilizátoru (str. 27)

Seznam grafů

Výsledky

Graf 1. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* v časových odstupech po kryoprezervaci (str. 36)

Graf 2. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Bifidobacterium adolescentis* v časových odstupech po kryoprezervaci (str. 36)

Graf 3. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Bifidobacterium breve* v časových odstupech po kryoprezervaci (str. 37)

Graf 4. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* v časových odstupech po kryoprezervaci (str. 38)

Graf 5. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* v časových odstupech po kryoprezervaci (str. 38)

Graf 6. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Bifidobacterium bifidum* MG4 v časových odstupech po kryoprezervaci (str. 39)

Graf 7. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Lactobacillus gasseri* v časových odstupech po kryoprezervaci (str. 41)

Graf 8. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Lactobacillus reuteri* v časových odstupech po kryoprezervaci (str. 41)

Graf 9. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Lactobacillus acidophilus* v časových odstupech po kryoprezervaci (str. 42)

Graf 10. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Lactobacillus rhamnosus* v časových odstupech po kryoprezervaci (str. 43)

Graf 11. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Lactobacillus johnsonii* v časových odstupech po kryoprezervaci (str. 43)

Graf 12. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Lactobacillus johnsonii* v časových odstupech po kryoprezervaci (str. 44)

1 Úvod

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické mikroorganismy různých tvarů a velikostí. Jejich velikost se pohybuje v řádu mikrometrů. Jsou to nejrozšířenější organismy na světě, osídlily různé ekologické niky, mezi které patří i vnější a vnitřní prostředí živých organismů. Mikrobiom je soubor všech mikroorganismů, které osidlují lidské tělo. Uvádí se, že tělo člověka obsahuje v průměru 1,3 bakteriální buňky na 1 buňku lidskou (Sender et al. 2016). Bakterie osidlují lidské tělo v mnoha jeho částech, primárně se vyskytují na vnějších a vnitřních površích. Jedná se především o povrchy gastrointestinálního traktu, kůže, dutiny ústní atd. Počet bakterií střevního mikrobiomu je odhadován na 10^{14} buněk (Savage 1977). A právě ve střevech nalezneme probiotické kmeny bakterií zahrnující rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, které mají příznivý vliv na zdraví svého hostitele. Probiotické bakterie pomáhají udržovat zdravé prostředí gastrointestinálního traktu, působí proti přemnožení patogenních bakterií a chrání tak svého hostitele před rozvojem infekce. Jejich působení však přesahuje hranice gastrointestinálního traktu, protože mají spoustu dalších funkcí. Modulují a stimulují imunitní systém, ovlivňují neurologickou soustavu, stav kůže, endokrinní systém zažívacího traktu, energetický metabolismus, biosyntézu vitamínů a hormonů, metabolizaci xenobiotik atd. (Lynch a Pedersen 2016). Lidem se v průběhu života mění složení střevní mikrobioty (Mitsuoka 1990), stále je ale nutné, aby byla zachována její rovnováha a nedocházelo k výkyvům, při kterých se zvyšuje riziko infekce a kolorektálního karcinomu (Haenel et al. 1975; Salminen et al. 1998b; Lynch a Pedersen 2016).

Probiotické bakterie jsou pro své účinky zahrnovány do běžně dostupných potravin a doplňků stravy. Nejen pro tyto účely je nutné bakteriální buňky konzervovat a uchovat tak, aby byl zajištěn co možná nejvyšší počet přeživších buněk při rekonstituci kultur. Před prvními pokusy o konzervaci bakterií bylo nutné pěstovat kultury v živném médiu nepřetržitě. V první polovině 20. století došlo k rozvoji využití kryokonzervačních a sušících technik pro bakterie (Swift 1920). Tím byla prodloužena doba životaschopnosti bakterií a snížily se náklady vydávané na nepřetržitou péči o kultury v živném médiu. Konzervace bakterií (například kryokonzervace) dosahovala větších úspěchů, když ke kulturám začaly být aplikovány kryoprotektivní látky, které byly empiricky testovány (Elliott et al. 2017). Kryo(lyo)protektivní látky tedy minimalizují riziko poškození buněk při jejich konzervaci, redukují množství vznikajících krystalků ledu a chrání buňky před prudkými změnami osmotického tlaku například při procesu kryokonzervace nebo lyofilizace. Jedním z úkolů této diplomové práce je odhalení látek, které jsou v tomto směru neprobádané, mají vlastnosti kryo(lyo)protektiv u konkrétních typových kmenů a které by mohly vést k navržení nových typů synbiotických preparátů.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotézou této diplomové práce je, že neprozkoumané di- a polysacharidy mají lyo- či kryoprotektivní účinek při konzervaci bifidobakterií a laktobacilů metodou lyofilizace a kryoprezervace.

Různé typy disacharidů, oligosacharidů a polysacharidů jsou známy pro svůj prebiotický účinek. Takové látky poskytují substrát pro probiotické bakterie, jejichž růst a/nebo metabolickou aktivitu stimulují. Tato stimulace je selektivní a znevýhodňuje patogenní mikroorganismy. Některé, pro dané účely dosud neprozkoumané, rozpustné disacharidy a polysacharidy mohou navíc také působit jako kryo(lyo)protektivní substance při dlouhodobé konzervaci potenciálně probiotických kmenů laktobacilů a bifidobakterií. Kryokonzervace (zmrazení) a lyofilizace (sušení mrazem) jsou konzervační procesy, které umožňují uchování kultur bakterií v čase. Modernizace konzervačních technik přináší snadnější manipulaci s konzervovanými vzorky, ale také jejich delší životnost. Snížení rizika poškození bakteriálních buněk během konzervačních procesů je zajišťováno přidáním kryo(lyo)protektiv. Inkorporace kryo(lyo)protektiv redukuje množství vznikajících krystalků ledu v průběhu procesu zmrazování. Volba kryo(lyo)protektiva nezávisí pouze na něm samotném, ale také na vlastnostech bakteriální kultury, ke které protektivní látku inkorporujeme.

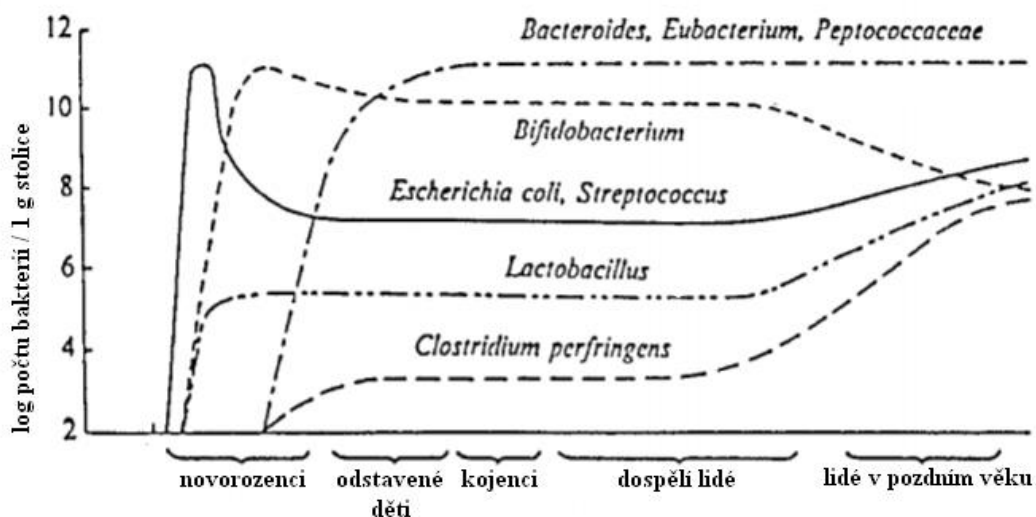
Vlastním cílem diplomové práce je průzkum potenciálního kryo(lyo)protektivního účinku určitých, ve vodě rozpustných disacharidů (např. laktulózy) a polysacharidů (např. beta-glukanů) s víceméně prokázanou prebiotickou aktivitou na vybraných kmenech (izolátech) bifidobakterií a laktobacilů. Výsledky by mohly odhalit nové využití konkrétních látek nejen pro potřeby dlouhodobého uchovávání těchto významných skupin bakterií, ale také využití těchto látek při navržení nových typů synbiotických preparátů.

3 Literární rešerše

3.1 Probiotické bakterie

Všechny organismy na Zemi podléhají evolučním změnám. Tyto změny mohou probíhat nezávisle na sobě. Pokud se však organismy vyvíjejí v těsné blízkosti, mohou na evoluční změny jedné populace reagovat v rámci své fylogeneze i jedinci z jiné populace. Prostřednictvím tohoto procesu, který nazýváme koevoluce (Janzen 1980), se mohou organismy vzájemně přizpůsobovat. Bakterie osídlily nejrozličnější typy ekologických nik a prostřednictvím koevoluce s organismy i zažívací ústrojí živých druhů.

Probiotické bakterie jsou životaschopné mikroorganismy, které mají příznivý vliv na zdraví svého hostitele (Donohue et al. 1996). K dosažení většího pozitivního účinku těchto bakterií jsou pomocí technologických postupů vyráběny probiotické doplňky stravy, které zlepšují rovnováhu žádoucích mikroorganismů v gastrointestinálním traktu člověka, ale i zvířat. Jedná se nejčastěji o tablety, jemný prášek nebo kapsle s lyofilizovanými mikroorganismy (Saarela et al. 2000; Rada 2010). V rámci potravin je také nalezneme ve fermentovaných mléčných výrobcích, kysaném zelí, misu, sýrech, fermentovaných masných výrobcích, oplatkách atd. Potraviny vyrobené z přirozeně se vyskytujících složek a obsahující probiotické bakterie nazýváme funkční potraviny. Funkčnost probiotik operuje s výslednými vlastnostmi vyjadřující použitelnost a efektivní účinky konkrétního probiotického výrobku (Salminen et al. 1998a; Rada 2010).



Obrázek 1. Změny v zastoupení mikrobioty s rostoucím věkem člověka (Mitsuoka 1990).

Během života člověka se mění složení jeho střevní mikrobioty (viz **Obrázek 1**). U novorozenců a kojenců je oproti adolescentům a dospělým jedincům zastoupení jednotlivých kmenů odlišné. S rostoucím věkem klesá počet bifidobakterií a narůstá počet clostridií, laktobacilů, streptokoků atd. (Mitsuoka 1990). Mezi druhy bifidobakterií, které byly izolovány

z gastrointestinálního traktu kojenců nejvíce, patří *Bifidobacterium breve* (Kitajima et al. 1997), *Bifidobacterium infantis* (He et al. 2001) a *Bifidobacterium bifidum* (Mitsuoka 1990; Barret et al. 2015). Jiné druhy bifidobakterií se vyskytují spíše u dospělých jedinců nežli u kojenců. Mezi takové bakterie patří například *Bifidobacterium longum* (Del Re et al. 2000) a *Bifidobacterium adolescentis* (Khedkar et al. 1994).

3.1.1 Využití a význam pro člověka

Vzhledem k již známým benefitům na lidské zdraví jsou probiotika zahrnována do jogurtů a fermentovaných mléčných nápojů ve zvýšené míře od 80. let 20. století (Daly et al. 1996). Využití potravin a doplňků stravy s probiotickými bakteriálními kulturami pomáhá udržovat zdravou střevní mikrobiotu. Takto ustanovená rovnováha poté poskytuje obranu před nemocemi gastrointestinálního traktu, přemnožením patogenních bakterií, rozvojem infekce, a dokonce i před vznikem kolorektálního karcinomu (Haenel et al. 1975; Salminen et al. 1998b; Lynch a Pedersen 2016). U novorozenců působí probiotika jako prevence proti závažné nekrotizující enterokolitidě a u dětí také jako prevence proti kolikám, syndromu dráždivého tračníku (IBS z angl. Irritable bowel syndrome) a infekci *Helicobacter pylori* (Szajewska et al. 2016). Probiotické bakterie mají také příznivý vliv na stravitelnost laktózy, alergie různého původu, zmírňují zácpu a působí jako podpůrná terapie při průjmu (Rada 2010).

Střevní mikrobiota má spoustu funkcí a její vliv přesahuje i bariéry gastrointestinálního traktu. Ovlivňuje imunitní systém, proliferaci hostitelských buněk, zdraví kůže, vaskularizaci střev, neurologickou soustavu, endokrinní systém zažívacího traktu, metabolizaci xenobiotik, energetický metabolismus, biosyntézu vitamínů, hormonů a neurotransmiterů atd. (Lynch a Pedersen 2016). Je tedy žádoucí, aby byla mikrobiota střev v rovnováze, na jejímž udržení a stabilizaci se velmi příznivě podílejí právě probiotické bakterie, které mají velký potenciál v léčbě chorob spojených s výše vyjmenovanými funkcemi střevní mikrobioty člověka (Salminen et al. 1998b).

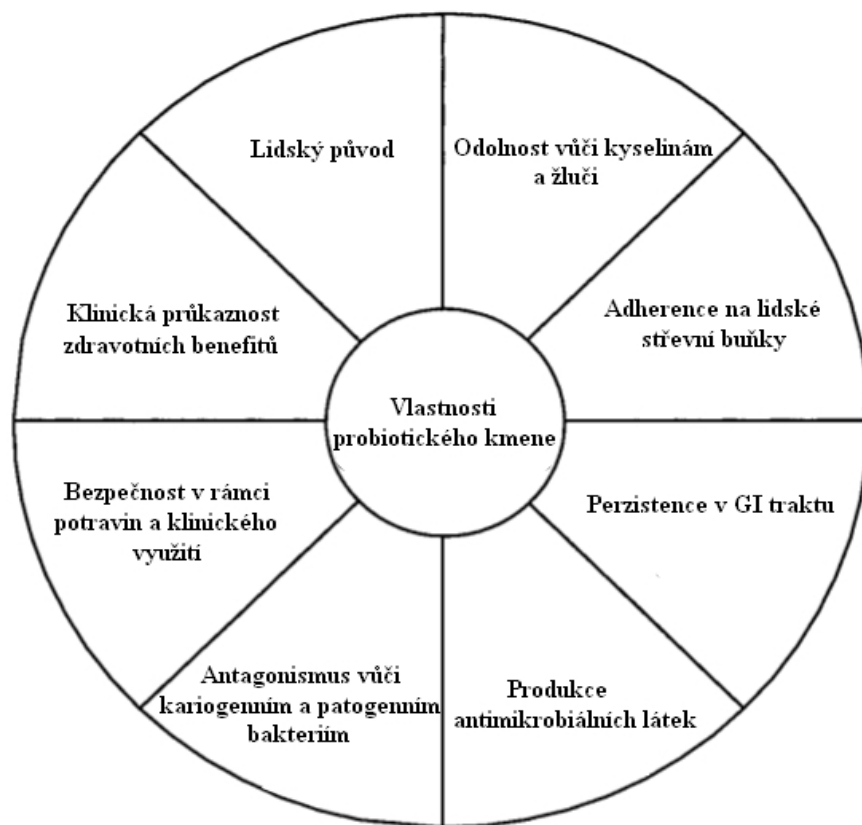
Navzdory rozsáhlému pozitivnímu účinku probiotických kmenů bakterií a kvasinek na lidské zdraví Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA z angl. European Food Safety Authority) doposud neschválil žádné zdravotní tvrzení týkající se probiotik. Některé země však mají regulační systémy, prostřednictvím kterých přisuzují probiotikům tvrzení o příznivém účinku na lidské zdraví (Szajewska et al. 2016).

3.1.2 Probiotika

Původ slova probiotika pochází z roku 1965, kdy Lilly a Stillwell tak označili látku vytvořenou prvokem, jež stimulovala růst jiného prvoka. „Pro bios“, tedy „pro život“, je jakýmsi opakem slova antibiotikum (Rada 2010). Probiotika sestávají z živých mikroorganismů a poskytují zdravotní benefity svému hostiteli (Salminen et al. 1998a).

Pro maximální účinnost humánních probiotik je vhodné, aby byly izolované mikroorganismy lidského původu a podávány v dostatečném množství. Probiotika musí totiž

překonat kyselé prostředí žaludku a odolat působení žlučových solí aj. možných inhibujících látek (Salminen et al. 1996). Kmeny bakterií jsou voleny na základě jejich bezpečnosti a funkčních vlastností. Mimo jiné je zapotřebí, aby mohly být kultivovány ve velkém množství a do potravin zapracovány v rámci průmyslové výroby produktů. Kromě probiotických bakterií se využívají i probiotické kvasinky jako např. *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces boulardii* (Szajewska et al. 2016). Při skladování si musí zachovat svou životaschopnost a funkční vlastnosti, přičemž je důležité, aby svými metabolickými produkty nezasahovaly do sensorických vlastností konečného produktu, pokud to není žádoucí. Životaschopnost probiotických bakterií v potravinách závisí na mnoha faktorech, jakými jsou např. pH, skladovací teplota výrobku, přítomnost kompetitivních mikroorganismů, inhibitorů (NaCl) atd. (Saarela et al. 2000; Lynch a Pedersen 2016). Výroba probiotik se řídí předpisy pro potraviny, nemají totiž status léčiva. Již od objevení probiotik patří mezi nejčastěji využívané kmeny rodů *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Enterococcus*. Důvodem je dlouhodobá zkušenost s těmito mikroorganismy při výrobě siláže, kysané zeleniny a zpracování mléka. Dále se s nimi manipuluje snadněji než se ‚striktně anaerobními‘ bifidobakteriemi a jsou ve většině případech nepatogenní. Jako další probiotické bakterie se využívají také rody *Bacillus*, *Clostridium*, *Propionibacterium* a především již zmiňovaný rod *Bifidobacterium* (Rada 2010; Hill et al. 2017).



Obrázek 2. Teoretický základ pro výběr probiotických mikroorganismů (Saarela et al. 2000). Zahrnuje bezpečnost, vhodné funkční vlastnosti (životaschopnost, adherence, kolonizace, antimikrobiální aktivita, imunologická stimulace, antigenotoxická aktivita a prevence patogenů) a technologické aspekty (růst v mléčných výrobcích, sensorické vlastnosti, stabilita, rezistence vůči bakteriofágům, životaschopnost během technologického postupu).

Pro studium probiotických kmenů v gastrointestinálním traktu se využívá technika molekulární biologie, pomocí které lze rozlišit sledovaný kmen od tisíců dalších bakterií, které tvoří střevní mikrobiotu. Kromě toho, že je napříč studii prokazován příznivý účinek působení probiotických bakterií na zdraví hostitele, je nutné sledovat i případné škodlivé účinky (Mattila-Sandholm et al. 1999). Nejnovější studie se zabývají testováním působení probiotik na novorozencích za účelem snížení rizika vzniku autoimunitních onemocnění, jako je např. diabetes mellitus 1. typu (Uusitalo et al. 2016). Předpokládá se, že mikrobiota gastrointestinálního traktu zdravého člověka dokáže ovlivnit imunologickou odpověď organismu na vlivy přicházející z vnějšího prostředí.

3.1.3 Prebiotika

Pojem „prebiotika“ zavedli v roce 1995 Gibson a Roberfroid a definovali je jako nestravitelnou složku potravy, která příznivě ovlivňuje zdraví hostitele prostřednictvím stimulace růstu a/nebo aktivity jednoho i více druhů (resp. kmenů) zdraví prospěšných mikroorganismů. Cílovými organismy jsou pro prebiotika především bifidobakterie, méně již laktobacily. Populace patogenních nebo potenciálně patogenních bakterií (např. rod *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Salmonella*) naopak snižují, čímž modifikují složení střevní mikrobioty. Prebiotika se získávají extrakcí z rostlin a následnou hydrolýzou extrahovaných molekul nebo syntézou z disacharidu prostřednictvím transferázové aktivity (Gibson a Roberfroid 1995; Rada 2010). Poskytují substrát, který selektivně stimuluje růst a/nebo metabolickou aktivitu probiotických bakterií. Většina prebiotik zahrnuje zkvasitelné a nestravitelné oligosacharidy či polysacharidy, např. GOS (galaktooligosacharidy), (FOS) fruktooligosacharidy, inulin a dále např. laktulózu (Saarela et al. 2000).

Prebiotika musí pro svou funkčnost splňovat v organismu tři kritéria. Zaprvé je nutné, aby byly tyto látky rezistentní vůči prostředí trávicího traktu, ve kterém se vyskytují hydrolytické enzymy a žlučové kyseliny. Na druhou stranu je zapotřebí, aby tyto látky byly fermentovatelné cílenými střevními bakteriemi. A zatřetí musí efektivně stimulovat růst a/nebo aktivitu žádoucích a nepatogenních bakterií, které příznivě ovlivňují zdraví hostitele. S ohledem na tato kritéria jsou prebiotika přidávána do různých druhů potravin, např. do mléčných kysaných výrobků, rostlinných tuků, sušenek, zmrzlin atd. (Roberfroid 2007; Rada 2010).

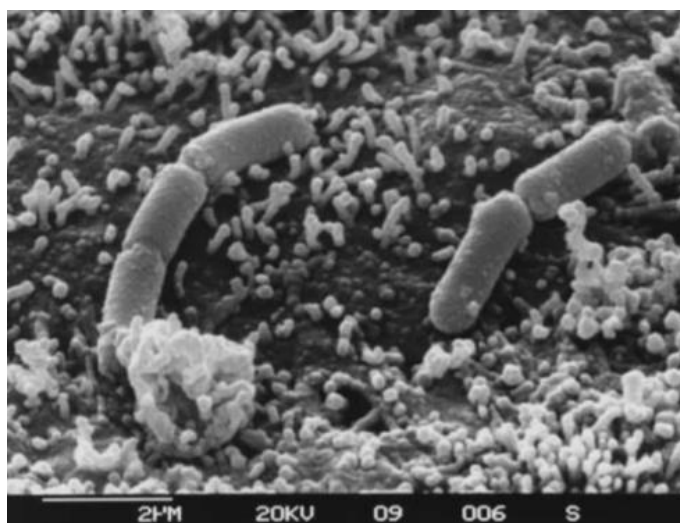
Savci se s prvním prebiotikem setkávají ihned po narození, je jím totiž mateřské mléko. Prebiotika v mateřském mléce mají bifidogenní účinek, protože je známo, že se u plně kojených dětí vyskytují bifidobakterie ve větší míře oproti dětem, které jsou krmeny umělou výživou na bázi kravského mléka. Prebiotické oligosacharidy galaktooligosacharidové řady v mateřském mléce mají kromě bifidogenního účinku i antimikrobiální vlastnosti a inhibují tak adhezi nežádoucích bakterií na stěnu střeva (Vlková et al. 2011).

3.1.4 Synbiotika

Synbiotika jsou funkční potraviny, která obsahují probiotika i prebiotika. Mezi oběma složkami je očekáván synergický účinek, kterým zvyšují životaschopnost probiotických bakterií a napomáhají jejich usídlení v gastrointestinálním traktu člověka. Tyto procesy probíhají prostřednictvím selektivní stimulace růstu a/nebo aktivace metabolismu žádoucích bakterií. Interakce *in vivo* je ovlivněna adaptací probiotik na prebiotika. Probiotikum přizpůsobí svůj metabolismus substrátu, který mu poskytne prebiotikum (Gibson a Roberfroid 1995; Saarela et al. 2000; Rada 2010). Další výhodou synbiotik je lepší přežívání probiotických kultur při průchodu horní částí trávicího traktu, kde je kyselé prostředí žaludku. Příkladem potraviny, která je synbiotikem, je jogurt, jež obsahuje jak probiotické bakterie, tak i prebiotickou oligofruktózu (Gibson a Roberfroid 1995; Vlková et al. 2011).

3.2 Laktobacily

Laktobacily patří do skupiny typických bakterií mléčného kvašení (BMK). Jsou tedy grampozitivní a kataláza-negativní, avšak některé kmeny mohou vykazovat katalázovou pseudoaktivitu. Konečným produktem fermentace cukrů těchto bakterií je především kyselina mléčná v případě obligátně homofermentativních druhů, obligátně heterofermentativní druhy navíc produkují etanol, CO₂, kyselinu octovou aj. organické kyseliny. Netvoří spory a vykazují v zásadě pravidelný, tyčinkovitý tvar.



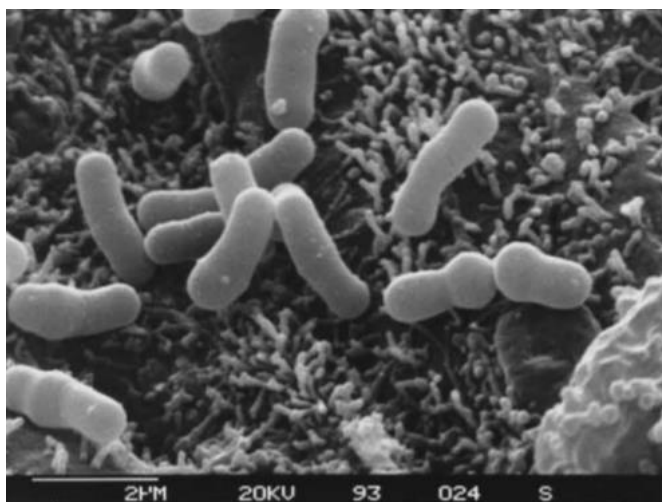
Obrázek 3. Adherence *Lactobacillus acidophilus* k mikroklkům střev člověka. Záznam z elektronového mikroskopu (Gopal et al. 2001).

Laktobacily jsou mikroaerofilní, chemoorganotrofní a sacharolytické mikroorganismy. Ty, co obývají intestinální trakt vykazují lepší růst za anaerobních podmínek. Jsou téměř všudypřítomné, můžeme je nalézt v prostředí, které je svou skladbou bohaté na dostupné cukry, např. v jídle (mléčné výrobky, fermentované masné produkty, kváskové pečivo, ovoce, zelenina, nápoje atd.), v dýchací soustavě, v gastrointestinálním traktu, v pohlavním ústrojí lidí i zvířat, v odpadních vodách a rostlinném materiálu (Gopal et al. 2001; Felis et al. 2005).

3.3 Bifidobakterie

Bifidobakterie poprvé izoloval Tissier ze střev kojence (1900), kdy je pojmenoval jako *Bacillus bifidus*. Jsou to grampozitivní, tyčinkovité bakterie nejčastěji nepravidelného tvaru (reálně v prostředí a rovněž v kultivačních podmínkách *in vitro* vytvářejí tvary napodobující písmena Y, X, často také vykazují kyjovitý tvar). Tvoří tyčinky, které se v médiu mohou vyskytovat jednotlivě nebo mohou vytvářet shluky a řetízky. Netvoří spory a vlákna. Jsou to anaerobní a chemoorganotrofní bakterie. Bifidobakterie jsou kataláza-negativní mimo několika výjimek (*Bifidobacterium indicum*, *Bifidobacterium asteroides*) (Felis et al. 2005; Quigley 2017)

Rod *Bifidobacterium* je nikoli odborně správně řazen mezi bakterie mléčného kvašení (hlavním finálním produktem jejich specifického, fermentativního metabolismu je kyselina octová a mléčná v přibližném molárním poměru 3:2), fylogeneticky, metabolicky, fenotypově a z pohledu ekologie (především místem výskytu) se od nich však podstatně liší. Typ metabolismu cukrů bifidobakterií je heterofermentativní. Finálními produkty fermentace, jak již bylo zmíněno, jsou acetát a laktát v poměru 3:2. Klíčovými enzymy pro degradaci glukózy jsou dvě fosfoketolázy – jedna specifická pro fruktóza-6-fosfát a druhá specifická pro xylóza-5-fosfát. Fruktóza-6-fosfát fosfoketoláza rozdělí fruktózu-6-fosfát na acetylfosfát a erytróza-4-fosfát, přičemž mluvíme o tzv. „bifidové dráze“.



Obrázek 4. Adherence *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* k mikroklkům střev člověka. Záznam z elektronového mikroskopu (Gopal et al. 2001).

Přirozeně se vyskytují v organismech zvířecího i lidského původu. Bifidobakterie bývají nejčastěji izolovány z výkalů, bacheru skotu, odpadních vod, zubních kazů a zažívacího traktu opylovačů – včel a čmeláků (Gottschalk 1986; Felis et al. 2005; Killer et al. 2010).

V roce 1994 bylo revidováno rozdělení laktobacilů na základě typu jejich fermentace. Pot et al. stanovil termíny: „homofermentativní“, „heterofermentativní“, „obligátně homofermentativní“, „fakultativně heterofermentativní“ a „obligátně heterofermentativní“. Potovy definice byly mnohými autory kritizovány jako nepřehledné, a tak Hammes a Vogel

(1995) tyto termíny předefinovali, čímž vzniklo i jejich dnešní moderní pojetí (Felis et al. 2005). Obligátně homofermentativní laktobacily fermentují hexózy téměř výhradně na kyselinu mléčnou pomocí EMP dráhy (Embden-Meyerhof-Parnas pathway), zatímco pentózy a kyselina glukonová nejsou fermentovány při nedostatku fosfoketoláz. Fakultativně heterofermentativní laktobacily fermentují hexózy na kyselinu mléčnou pomocí EMP dráhy a také degradují pentózy a často i kyselinu glukonovou za přítomnosti aldoláz a fosfoketoláz. Obligátně heterofermentativní degradují hexózy a pentózy prostřednictvím pentózofosfátového cyklu za vzniku laktátu, ethanolu, kyseliny octové a oxidu uhličitého (Hammes a Vogel 1995).

3.4 Charakteristika vybraných druhů bakterií

3.4.1 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus je převládající zdraví prospěšná bakterie s probiotickým potenciálem v gastrointestinálním traktu dospělého člověka (Mitsuoka 1990). Spolu s *Bifidobacterium longum* se pro své probiotické účinky využívá ke snížení abdominálního diskomfortu a negativních následků po antibiotické terapii (Reuter 1963). Můžeme ji nalézt v komerčně známých probiotických doplňcích stravy (například Biopron Forte) a v mléčných produktech, k jejichž výrobě se používá acidofilní kultura (například acidofilní mléko, zákysy atd.). Dále napomáhá ke zmírnění symptomů IBS (Preston et al. 2018).

Nevýhodou této bakterie je, že se během manipulace velmi rychle snižuje životaschopnost kolonií. Na druhou stranu bylo pomocí *in vitro* a *in vivo* modelů prokázáno, že má *Lactobacillus acidophilus* imunostimulační účinky, které zahrnují indukci produkce cytokinů, zvýšenou fagocytární aktivitu, stimulaci humorální (látkové) složky imunitního systému, funkci T-lymfocytů a NK buněk (NK z angl. angl. natural killer cells). *L. acidophilus* ovlivňuje také produkci mukózního sekretu, který mechanicky chrání stěnu střev a zároveň tvoří podjednotku imunitního systému jako slizniční imunitní systém (z angl. MALT–mucosa-associated lymphoid tissue), Zmiňované imunostimulační účinky mohou zmírnit příznaky již indukovaného zánětu tlustého střeva (Hamilton-Miller 2004; Mohamadzadeh et al. 2011; Lightfoot et al. 2015).

3.4.2 *Lactobacillus fermentum*

Lactobacillus fermentum je jedna z predominantních bakterií pro gastrointestinální trakt člověka. Při průchodu trávicím traktem dokáže odolávat působení žaludečních šťáv a žluči, proto může naplnit svůj probiotický potenciál ve střevech, kde se podílí na udržení rovnovážného stavu mikrobioty. Mimo to se také vyskytuje v lidském urogenitálním traktu a využívá se k prevenci a léčbě urogenitálních infekcí způsobených patogenními bakteriemi (Reid et al. 1993; Gardiner et al. 2002; Bao et al. 2010). Metabolity produkované *Lactobacillus fermentum* působí antimikrobiálně také proti bakterii *Streptococcus mutans*, která vylučuje v ústní dutině kyseliny, které naleptávají zubní sklovinu, spolupodílí se na tvorbě zubního plaku a případně i zubního kazu (Rodrigues et al. 2020).

Byla provedena studie (Olivares et al. 2007), při které byl zkoumán vliv *L. fermentum* jako adjuvantu (substance aplikována s antigenem za účelem vyšší stimulace adaptivního imunitního systému) při imunologické odpovědi na očkování proti chřipce. Polovině účastníků studie byly orálně podávány tablety s lyofilizovanou bakterií *Lactobacillus fermentum* a druhé polovině účastníků byly podávány tablety s methylcelulózou (placebo). Po dvou týdnech od vakcinace měla skupina, která užívala tablety s bakterií, oproti „placebo“ skupině vyšší poměr NK buněk. Vakcína indukovala nárůst počtu T-lymfocytů typu 1 u obou skupin zúčastněných, ale u skupiny, která užívala tablety s bakterií, byl tento počet znovu vyšší. U „placebo“ skupiny nebyla detekována protilátková odpověď, oproti tomu byla u druhé skupiny zaznamenána imunologická odpověď protilátkou Imunoglobulin A. V konečném výsledku měla skupina účastníků (ti, kteří užívali tablety s bakterií) ve sledovaném období (5 měsíců) dokonce nižší incidenci chřipky (Olivares et al. 2007).

Lactobacillus fermentum vykazuje jak antimikrobiální, tak i antioxidační aktivitu. To bylo prokázáno například eradikací patogenní bakterie *Salmonella enterica* (sérovary Typhimurium) a redukcí granulomatózního zánětu v játrech a slezině u myši. Léčba se skládala z kombinace ofloxacinu a *L. fermentum* kmene ME-3. *L. fermentum* zvyšuje antioxidační aktivitu séra a má antiaterogenní účinky, protože snižuje zastoupení LDL částic v krvi (Mikelsaar a Zilmer 2009).

3.4.3 *Lactobacillus gasseri*

Lactobacillus gasseri se vyskytuje v gastrointestinálním traktu člověka a je predominantní bakterií vaginální mikrobioty žen v reprodukčním věku (Fujiwara et al. 2001; Witkin a Linhares 2016). Tato bakterie působí antimikrobiálně díky produktům svého metabolismu (např. kyselina mléčná, peroxid vodíku) (Atassi a Servin 2010). Byla provedena studie zabývající se působením *L. gasseri* na přítomnost bakterie *Helicobacter pylori* v žaludku infikovaných jedinců. Přítomnost *Helicobacter pylori* nemusí způsobovat vážné problémy, ovšem při oslabení imunitního systému může vyvolat akutní gastritidu. Ukázalo se, že léčba pomocí probiotických účinků *Lactobacillus gasseri* je pacienty velmi dobře snášena. Oproti jiným způsobům léčby nevykazuje žádné vedlejší účinky (Sakamoto et al. 2001). Ve studii (Garcia-Gutierrez et al. 2020) byl objeven nový bakteriocin gassericin M produkovaný *Lactobacillus gasseri*. Tento bakteriocin byl vysoce účinný proti patogenní bakterii *Clostridium perfringens*.

Při vakcinaci proti chřipce byla u požití tablet s *Lactobacillus gasseri* stejně jako u *Lactobacillus fermentum* detekována imunologická odpověď protilátkou Imunoglobulin A. Znamená to tedy, že *Lactobacillus gasseri* ovlivňuje funkci imunitního systému hostitele (v tomto případě myši) a má protektivní charakter proti viru chřipky. U experimentu na lidech byla pozorována také vyšší aktivita NK buněk (Kadooka et al. 2019).

3.4.4 *Lactobacillus johnsonii*

Bakterie *Lactobacillus johnsonii* dokáže kolonizovat lidský a zvířecí gastrointestinální trakt (Granato et al. 2004). Produkuje exopolysacharidy, které ovlivňují složení mikrobioty hostitele. Exopolysacharidy působí proti narušení rovnováhy mikrobioty tak, že ji chrání před osídlením patogeny (Górska et al. 2010; Dertli et al. 2013). Také produkuje peroxid vodíku, který spolu s kyselinou mléčnou působí proti patogenům například v urogenitálním traktu ženy (Atassi a Servin 2010). Dalším probiotickým efektem je antimikrobiální aktivita proti *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* a *Escherichia coli* (Ahmed et al. 2019).

V *in situ* studii (Dertli et al. 2013) byla rozlišena struktura dvou různých polysacharidů produkovaných *Lactobacillus johnsonii* FI9785. Předpokládá se, že to je výsledkem delece *epsE* genu (kódující enzym zodpovědný za biosyntézu exopolysacharidů), spontánní mutaci *epsC* genu, který se podílí na regulaci biosyntézy polysacharidů, a mutaci, při které byl odstraněn celý cluster *eps* genu. Zjištění o produkci dvou různých exopolysacharidů (EPS1 a EPS2) *Lactobacillus johnsonii* FI9785 bylo přelomové, protože je to v bakteriální říši velmi ojedinělé (Dertli et al. 2013).

Neeser et al. se zabývali specifickými vazebnými místy na povrchu bakteriálních buněk *Lactobacillus johnsonii*. Identifikovali dvě specifická vazebná místa, která na sebe váží karbohydrátový substrát. Mnohé střevní patogenní bakterie mají na svém povrchu stejná vazebná místa, pomocí kterých se váží na mukózní stěnu střev hostitele a ulpívají tak v jeho gastrointestinálním traktu. *Lactobacillus johnsonii* obsazuje vazebná místa a soupeří o ně s patogenními bakteriemi, před kterými tak chrání svého hostitele (Neeser et al. 2000).

Dále byl studován vliv *Lactobacillus johnsonii* na chronické střevní záněty (IBD z angl. Inflammatory bowel disease). Exopolysacharidy, které tato bakterie produkuje, příznivě ovlivňují mukózní stěnu střev. Na mukózní stěně střev mohou ulpívat patogenní bakterie, jak bylo popsáno výše (Neeser et al. 2000). Ve střevech pacientů s IBD se vyskytuje větší množství bakterií, které mohou napadat mukózní stěnu, než je tomu u zdravých pacientů. *Lactobacillus johnsonii* působí antagonisticky proti těmto patogenním bakteriím a další výzkum těchto mechanismů působení by mohl objasnit patofyziologii IBD (Górska et al. 2010; Ruas-Madiedo et al. 2006).

3.4.5 *Lactobacillus rhamnosus*

Tato bakterie s probiotickým potenciálem kolonizuje lidskou ústní dutinu, urogenitální a gastrointestinální trakt (Gardiner et al. 2002). *Lactobacillus rhamnosus* se pro své probiotické účinky užívá spolu s *Lactobacillus fermentum* jako léčba nebo prevence urogenitálních infekcí u žen (Reid et al. 1993), ale působí také proti gastrointestinálním patogenům (Inturri et al. 2019). *L. rhamnosus* stimuluje imunitní systém a iniciuje tvorbu cytokinů nejen u savců, ale i u ryb. Přestože u ryb nekolonizuje gastrointestinální trakt, při experimentálním podávání této bakterie pstruhu duhovému *Oncorhynchus mykiss* do vody, byly potvrzeny probiotické účinky (Nikoskelainen et al. 2003), jakými jsou například modulace střevní mikrobioty tak,

aby podporovala tvorbu butyrátu, čímž se moduluje pH ve střevě a vytváří se prostředí vhodnější pro probiotické bakterie oproti patogenním bakteriím (Lin et al. 2020).

Lactobacillus rhamnosus zlepšuje stav obézních dětí, které trpí hypertransaminasemií (onemocnění vyznačující se zvýšenými hodnotami jaterních enzymů zvaných transaminázy). Ve studii (Vajro et al. 2011) jedna polovina pacientů užívala tablety s *Lactobacillus rhamnosus*, přičemž druhá polovina pacientů užívala tablety s placebo účinkem po dobu 8 týdnů. Při vyhodnocování výsledků se ukázalo, že u pacientů, kteří užívali probiotickou bakterii, poklesl enzym alaninaminotransferáza. Dále byl zaznamenán pokles specifických protisacharidových antigenů v játrech.

Vzhledem k nedostatku metod, které by spolehlivě léčily gastrointestinální onemocnění provázené bolestmi břicha, vznikají studie zabývající se možnými novými způsoby léčby. Je žádoucí, aby byla léčba pro organismus co nejšetrnější, ale maximálně účinná. Mezi nově probádané terapie v této oblasti patří i terapie pomocí *L. rhamnosus*. Co se týče úlevy od bolesti a zmírnění symptomů, má *L. rhamnosus* efekt zejména na pacienty s IBS (Horvath et al. 2011; Preston et al. 2018).

3.4.6 *Lactobacillus reuteri*

Lactobacillus reuteri se může nacházet v lidském urogenitálním a gastrointestinálním traktu, ale také např. ve střevech jiných savců a ptáků. Tato bakterie je modelovým mikroorganismem pro studium evolučních mechanismů mezi hostitelem a jeho symbiontem v zažívacím traktu, protože je rozšířena mezi velký počet různých druhů obratlovců *Vertebrate* (Walter et al. 2011). V lidské populaci je rozšířena minoritně. Studie Molin et al. (1993) uvádí, že pouze 4 % pacientů ze 75 testovaných, měli ve své střevní mukóze tuto bakterii. Z matky na dítě se přenáší při porodu, kdy dítě prochází porodními cestami, a při kojení stejně jako jiné druhy laktobacilů (Mändar a Mikelsaar 1996).

Co se týče probiotických účinků bylo prokázáno, že *Lactobacillus reuteri* má protizánětlivé účinky a zlepšuje klinicky pozorovatelné symptomy kolitidy (Savino et al. 2010). Vzhledem k bezpečnosti probiotik je *Lactobacillus reuteri* jakožto probiotická bakterie vhodným terapeutickým prostředkem k léčbě střevních onemocnění zejména u novorozenců a kojenců (Coccorullo et al. 2010). Také byla prostřednictvím animálních modelů potvrzena protinádorová aktivita této bakterie. Ve studii (Luo et al. 2020) byla zjištěna produkce cytokinů, které inhibují migraci a kolonizaci buněčné linie melanocytů, čímž působí preventivně proti melanomu.

3.4.7 *Bifidobacterium adolescentis*

Bakterie *Bifidobacterium adolescentis* nebyla nikdy izolována u novorozenců a dětí, lze ji nalézt ve stolici dospělého člověka, v lumen střev krav nebo v odpadních vodách. Co se týče výskytu u člověka jakožto hostitele, *B. adolescentis* se nachází v tlustém střevě a dále také v ženském reprodukčním traktu (Reuter 1963).

Výzkum probiotických účinků *Bifidobacterium adolescentis* prokázal, že má tato bakterie schopnost působit prostřednictvím modulace imunitního systému proti projevům atopické dermatitidy (Fang et al. 2019). Také byly provedeny *in vitro* studie, které potvrzují antagonistickou aktivitu *B. adolescentis* vůči patogenním bakteriím zahrnující *Escherichia coli* (Fujiwara et al. 1997), *Shigella dysenteriae* (Misra a Kuila 1995) a *Yersinia enterocolitica* (Ozbas a Aytac 1995). Dále také *in vivo* studie zaměřená na antagonistickou aktivitu *B. adolescentis* potvrdila inhibici koliformních bakterií v lidském gastrointestinálním traktu (Khedkar et al. 1994). Dále bylo prokázáno, že *B. adolescentis* má protivirový účinek. Ve studii Kim et al. (2014) byl demonstrován účinek *B. adolescentis* proti viru CVB3 prostřednictvím ovlivnění genové exprese a bylo navrženo užívání této bakterie s jídlem nebo léky. Tato bakterie by mohla být využita při alternativní léčbě infekce virem Coxsackie (lidský RNA-virus patřící mezi čeled' *Picornaviridae*), který způsobuje syndrom ruka-noha-ústa (HFMD z angl. Hand-foot-and-mouth disease). Tento syndrom je velmi ohrožující pro dětskou populaci, kterou postihuje nejčastěji. Při komplikacích může vyústit až v meningitidu, plicní edém a myokarditidu (Rosenbach et al. 2018).

3.4.8 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* je bakterie, která je hojně komerčně využívána v probiotických výrobcích. Původně byla izolována z gastrointestinálního traktu savce a můžeme ji tedy nalézt ve výkalech krys, kuřat, králíků, prasat, telat, morčat, psů a v odpadních vodách (Scardovi a Trovatelli 1974; Bunesova et al. 2017). Výsledky studie (Bunesova et al. 2017) potvrdily, že bakterie *B. animalis* subsp. *lactis* je hostitelsky nespecifická a její různé poddruhy se vyskytují mezi různými druhy zvířat.

Jsou prokázány příznivé probiotické účinky *B. animalis* subsp. *lactis* na imunitní systém člověka, kde přispívá k imunitní odpovědi pro specifické antigeny. Takovým antigenem může být například virus chřipky (Rizzardini et al. 2011). Další studie se zaměřovala na výskyt respiračních onemocnění u kojenců, kdy jim ve věku od 1 do 8 měsíců byla podávána bakterie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ve formě tablet a prokázalo se, že děti užívající tyto tablety měly nižší výskyt respiračních onemocnění než děti, které tablety neužívaly (Taipale et al. 2010). Jiná studie se zaměřovala na dospělé jedince s nízkou frekvencí defekace, bolestivostí a diskomfortem v oblasti gastrointestinálního traktu. Suplementace tímto probiotickým kmenem po dobu čtyř týdnů u testovaných jedinců vedla k navýšení frekvence defekace, čímž byly i zmírněny projevy diskomfortu v oblasti břicha (Eskesen et al. 2015). *B. animalis* subsp. *lactis* má prokazatelné pozitivní účinky na gastrointestinální systém člověka. Mezi další probiotické účinky této bakterie na lidské zdraví patří také působení proti patogenním bakteriím (např. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*) a prevence vzniku infekcí (Zacarias et al. 2014).

3.4.9 *Bifidobacterium bifidum*

Až v 50. letech minulého století byla bakterie, která byla do té doby známá jako *Bacillus bifidus* (Tissier 1900), znovu izolována ze střev kojence a označena jako rod *Bifidobacterium*.

V roce 1963 bylo kategorizováno sedm druhů tohoto rodu, z nichž jeden byl *B. bifidum* (Reuter 1963) ustanovený jako typový pro rod *Bifidobacterium*. Tato bakterie se spolu s *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium breve* běžně vyskytuje především v tlustém střevě dětí kojeneckého věku, které jsou kojeny mateřským mlékem. Tvoří tak dominantní podíl celkové mikrobioty těchto dětí (Barret et al. 2015). U dospělých jedinců se vyskytují také v tlustém střevě (Mitsuoka 1990). Dále je bakterie *B. bifidum* obsažena v mateřském mléce a vagíně ženy, a tak dochází prostřednictvím přirozeného porodu a kojení ke kolonizaci gastrointestinálního traktu novorozence (Mändar a Mikelsaar 1996; Biavati et al. 2000).

Psychologický stres a jeho zátěž se na lidském těle projevuje také diskomfortem v oblasti gastrointestinálního traktu (Mitsuoka 1990). Studie (Culpepper et al. 2016) prokázala, že druh *B. bifidum* svými probiotickými účinky prokazatelně snižuje tento diskomfort a zažívací potíže, jakými jsou například akutní průjem a bolesti břicha, čímž má zpětně i pozitivní vliv na psychiku člověka. Dále napomáhá obnovování epitelálních buněk ve střevech, konkrétním příkladem může být studie Hsieh et al. (2015) zaměřená na vliv *B. bifidum* na „těsné spoje“ buněk (TJ z angl. Tight junctions) neboli *Zonula occludens* v epitelu střev. Obnovování těchto spojů posiluje bariéru střev a snižuje se tak propustnost pro patogeny do krevního řečiště.

Propionová kyselina je jednou z produkováných organických kyselin *Bifidobacterium bifidum* (Han et al. 2005), třebaže v minoritní míře. Pomocí propionátu se jídlo v lidském těle lépe tráví, snižuje hladinu cholesterolu v krvi a příznivě ovlivňuje metabolismus sacharidů. Dále se u této bakterie diskutují protirakovinné účinky, protože se přímým i nepřímým způsobem (pomocí vlastních enzymů) podílí na supresi prokarcinogenních látek (Hosono et al. 1990), aktivuje imunitní systém svého hostitele a ovlivňuje pH ve střevech (Abd El-Gawad et al. 2004; Hamilton-Miller 2004).

3.4.10 *Bifidobacterium breve*

Bifidobacterium breve se vyskytuje ve výkalech kojených dětí a telat, dále v reprodukčním traktu žen a v odpadních vodách (Reuter 1963). Nachází se v gastrointestinálním traktu člověka a je jednou z hlavních složek mikrobioty dětí v kojeneckém věku, u kterých příznivě působí na mikrobiální rovnováhu jejich střev. U novorozenců má *B. breve* větší afinitu ke stěnám tlustého střeva než například *Bifidobacterium longum* (Kitajima et al. 1997).

Z probiotických účinků je u *Bifidobacterium breve* znám vliv bakterie na imunitní systém hostitele. Stimuluje humorální (látkovou) složku imunitního systému tak, že dokáže indukovat produkci cytokinů (signální peptidy, které zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami imunitního systému) a působí proti patogenům (Marin et al. 1996). Ve studii Yasui et al. (1999), která byla prováděna na myších, bylo prokázáno, že *Bifidobacterium breve* ovlivňuje produkci IgA a IgG protilátek, čímž myši chrání například před infekcí viru chřipky a rotavirusovou infekcí. Mimo jiné tato studie předkládá návrh využít *B. breve* jako prostředek k transportu antigenů v orálně užívaných vakcínách (Yasui et al. 1999).

3.4.11 *Bifidobacterium infantis*

Bakterie *Bifidobacterium infantis* je svým výskytem stejně jako *Bifidobacterium breve* typická pro gastrointestinální trakt kojenců, kteří jsou krmeny mateřským mlékem nebo umělou kojeneckou výživou. Vyskytuje se tedy ve výkalech novorozenců, ale můžeme je nalézt i ve výkalech mláďat jiných savců, například telat (Reuter 1963).

Tato bakterie má příznivé účinky na zdraví člověka a její využití v léčbě zatím neprokázalo žádné negativní vedlejší účinky. Bylo prokázáno, že složený probiotický preparát s *Bifidobacterium infantis* je vhodnou terapeutickou volbou pro zmírnění příznaků syndromu dráždivého tračníku, jehož etiologie není doposud objasněna. Nicméně do budoucna jsou zapotřebí další a rozsáhlejší studie (Yuan et al. 2017). V *in vitro* a *in vivo* modelech působí biologická aktivita *Bifidobacterium infantis* na optimální látkovou propustnost střevní stěny, čím posiluje bariéru střeva a chrání svého hostitele před patogeny. U myši napomáhá při léčbě zánětu tlustého střeva tak, že ovlivňuje genovou expresi proteinů těsných spojů v epitelu střeva. Dále ovlivňuje aktivaci MAP kináz (enzymy účastníci se pochodů v buňce) (Ewaschuk et al. 2008). Ve studii (Xiao et al. 2014) byla porovnávána léčba nádoru ledvin u myši pomocí *Bifidobacterium infantis* s dalšími 3 způsoby léčby. Léčba pomocí této bakterie v kombinaci s protivirovou medikací vykazovala signifikantně nejefektivnější protinádorovou aktivitu a oproti ostatním způsobům léčby iniciovala apoptózu (typ programované buněčné smrti) nádorových buněk nejvíce.

3.4.12 *Bifidobacterium longum*

Bakterie *Bifidobacterium longum* se vyskytuje v ústní dutině a gastrointestinálních traktu člověka, a to jak dětí, tak i dospělých jedinců. Dále ji můžeme nalézt ve výkalech mláďat savců, v reprodukčním traktu ženy nebo v odpadních vodách (Reuter 1963). Perzistence *B. longum* ve střevech hostitele je výsledkem koevolučního vývoje, prostřednictvím kterého se bakterie přizpůsobila k využití substrátu, který může být hostitelem nebo ostatními bakteriemi jeho střevní mikrobioty obtížně katabolizován. Špatně stravitelné složené cukry se často rozkládají až v tlustém střevě, kde byly detekovány četné transportéry oligosacharidů typu MalEFG typické pro *Bifidobacterium longum* a pouze jeden transportér cukru typu PTS, který je běžný například pro *Enterococcus faecium* a *Escherichia coli* (Schell et al. 2002).

Co se týče výzkumu probiotických účinků *B. longum*, byla popsána produkce extracelulárních polysacharidů bakterie *B. longum* kultivované v odstředěném mléce. Tyto polymery se skládají z podjednotek glukózy, galaktózy a malého množství uronových kyselin. Spojení takto vznikajících polymerů s kyselinou teichoovou je důležité pro přilnavost bakterií ke stěně gastrointestinálního traktu (Abbad Andaloussi et al. 1995). Kyselina teichoová je jednou z hlavních složek buněčné stěny grampozitivních bakterií, tedy i probiotických bakterií. *Bifidobacterium longum* se spolu s dalšími probiotickými bakteriemi využívá ve formě doplňků stravy pro normalizaci střevní mikroflóry po užívání antibiotik. Působí antimikrobiálně (Inturri et al. 2019). Doplnky stravy mohou takto předcházet velkým ztrátám v počtu zdravých prospěšných bakterií mikrobioty střev (Orrhage et al. 1994; Ferrer et al. 2017). Dále může mít

Bifidobacterium longum anxiolytický efekt (tlumí úzkostné projevy hostitele) v případě chronické kolitidy. Tento účinek byl v *in vivo* studii na myších popsán tak, že bakterie *B. longum* snižuje dráždivost enterických neuronů, které se nacházejí v gastrointestinálním traktu hostitele a přenášejí signály do jeho centrální nervové soustavy (Bercik et al. 2011).

3.5 Vybrané metody konzervace

3.5.1 Historie a současnost

Konzervační metody slouží k uchování kultur bakterií v čase. Moderní techniky umožňují snadnější manipulaci s konzervovanými vzorky, ale také jejich delší životnost. Před prvními pokusy o konzervaci bakterií byli badatelé odkázáni na nepřetržité pěstování kultur v živném médiu. V první polovině 20. století se začaly objevovat konzervační techniky, které zahrnovaly mražení a sušení bakterií (Swift 1920). Tyto techniky poskytovaly oproti původním postupům prodlouženou dobu životaschopnosti bakterií a minimalizovaly úkony spojené s manipulací se vzorky. Bakterie byly při kultivaci po provedené konzervační technice identifikovatelné jako ty stejné izoláty před samotným procesem konzervace. Zachovaly si totožné vlastnosti, v případě patogenních bakterií i virulenci. Macfadyen et al. (1900) demonstrovali, že prakticky všechny bakterie a kvasinky je možné zmrazit superchladným tekutým vodíkem, který má teplotu $-252\text{ }^{\circ}\text{C}$, aniž by to po rozmrazení ovlivnilo životaschopnost těchto buněk a jejich metabolickou aktivitu. To znamenalo velký průlom ve výzkumu bakterií, protože převážení takových vzorků z místa na místo bylo mnohem odolnější vůči kontaminaci a destrukci bakteriálních buněk, než tomu bylo v případě nekonzervovaných izolátů. Princip zmrazování bakterií byl na počátku 20. století zřejmý, Shackell (1909) byl však jeden z prvních badatelů, který tato fakta verifikoval a poukázal na výhody stavu dormance bakterií po zmražení. Demonstroval, že i substance jako tkáň mohou být uniformně zbaveny vody, aniž by po dobu několika týdnů ztratily schopnost znovuobnovit svou aktivitu. Konkrétně u viru vztekliny prokázal, že vir i přes konzervaci zmrazením po dobu několika týdnů neztratil schopnost virulence.

Kryokonzervace a lyofilizace jsou velmi často využívané metody konzervace. Obě tyto techniky jsou účinné napříč různými bakteriálními druhy, které jsou po rozmrazení znovu životaschopné (Perry 1995). Výsledná životaschopnost bakterií není však závislá pouze na metodě konzervace, ale také na mnoha dalších faktorech. Jedním z nich je vhodně zvolená metoda rehydratace. Počty životaschopných bakterií jsou vyšší při pomalé rehydrataci než při rychlé rehydrataci, což souvisí s reakcí proteinů na teplotní šok. Rehydratace může probíhat například protřepáním lyofilizátu s deionizovanou vodou o teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Případná destrukce buňky souvisí nejčastěji s poškozením buněčné stěny, plazmatické membrány, proteinů nebo samotné DNA bakteriální buňky. Mezi ostatní faktory ovlivňující životaschopnost bakterií po proběhlé konzervaci můžeme dále zařadit růstové médium, sušící médium či podmínky růstu bakterií (Teixeira et al. 1995).

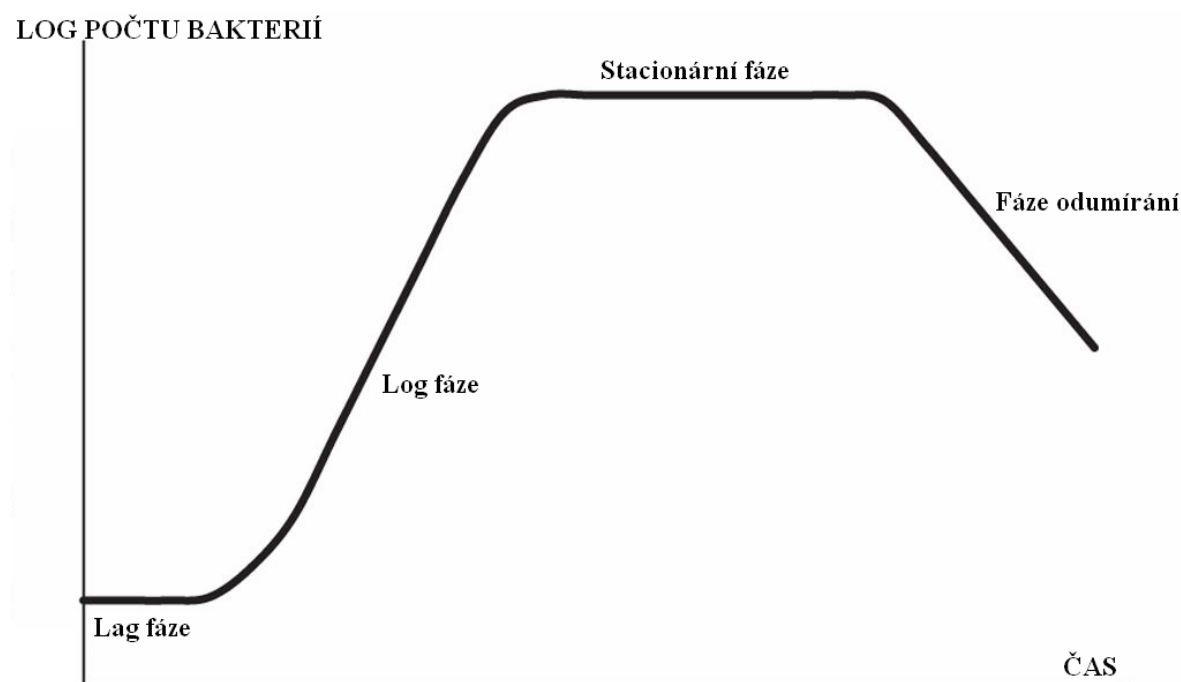
V dnešní době má konzervace bakterií široké uplatnění v průmyslu, potravinářství, biotechnologiích, zdravotnictví či vědeckém výzkumu a vzdělávání. Kultury bakterií jsou spolu

s dalšími mikroorganismy uchovávány ve sbírkách mikroorganismů. V rámci České republiky můžeme jmenovat Českou sbírku mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity, která chrání biodiverzitu mikroorganismů *ex situ* tím, že průběžně doplňuje svoje fondy (Ústav experimentální biologie PŘF MU, 2019). Sbírkový materiál při jednotlivých institucích jsou sdružovány do federací a organizací evropských i světových měřítek.

Co se týče potravinářství, je uchovávání kultur klíčovým parametrem pro výrobu některých potravin. Například výroba jogurtů je provázena očkovaním zahuštěného mléka jogurtovou kulturou (*Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Pro výrobu zakysané smetany a kysaných mléčných nápojů se využívá smetanová kultura (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetalactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a *dextranicum*) atd. (Vlková et al. 2010).

3.5.2 Kryokonzervace

Metoda kryokonzervace spočívá ve zmrazení kultur bakterií, aniž by docházelo k destrukci buněk. Voda se procesem zmrazení stane pro bakterie nevyužitelnou. Buněčný metabolismus je zpomalený nebo se úplně zastaví. To, v jaké fázi růstu bakterií je vhodné je konzervovat, se liší napříč druhy. Dle Perry (1995) je obecně vzato pro konzervaci bakterií nejvíce vhodná pozdní logaritmická fáze (známá také jako log fáze, exponenciální fáze; viz **Obrázek 5**).



Obrázek 5. Růstová křivka bakterií (Wang et al. 2015).

Dehydratované buňky jsou skladovány při nízkých teplotách. Při teplotách od -20 °C do -30 °C se materiál skladuje v běžně dostupných laboratorních mrazácích, výsledky jsou ale doprovázeny velkými ztrátami, co se týče zachované životaschopnosti bakterií. Při teplotě

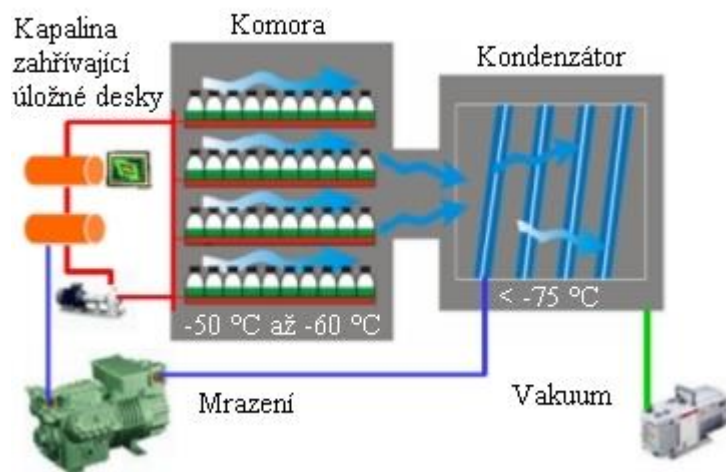
kolem $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ se pro dlouhodobější skladování využívají speciální mrazáky. Dále je možné bakterie uchovávat při teplotách od $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomocí tekutého dusíku. Při teplotě $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ se využívá plynné fáze dusíku a při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ kapalné fáze dusíku (WU et al. 2008). V takto extrémně nízkých teplotách, jaké jsou dosaženy prostřednictvím tekutého dusíku, je dle Heckly (1978) možné bakterie skladovat neomezeně dlouhou dobu. Životaschopnost buněk je při takových skladovacích podmínkách nezávislá na době uchování a jejich genetický základ zůstává stabilní. Dochází k vitifikaci vody (Fahy et al. 1984), při které se mění její viskozita. To má za následek, že voda před úplným zmrznutím získá podobné vlastnosti jako sklo – nekystalická amorfni látka. Tvoří se malé rozptýlené krystalky, které buňku nepoškodí tak, jak by tomu bylo u velkých přirozeně vznikajících krystalů vody.

V praxi se však pro konzervaci bakterií velmi často využívají teploty od $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, protože zachovaná životaschopnost vykazuje nízké ztráty, a navíc tyto ztráty můžeme maximálně snížit pomocí kryo(lyo)protektiv (Perry 1995), kterými se budu dále zabývat v kapitole 3.6.

3.5.3 Lyofilizace

Lyofilizace neboli sušení mrazem (anglicky freeze-drying) je proces, při kterém dochází k vysušení zmrazených bakteriálních buněk prostřednictvím sublimace ledu ve vakuu (Macfadyen et al. 1900). Neboli zmrazení buněk způsobuje oddělení vody od pevného materiálu ve formě ledu, který je odstraněn odpařením – sublimací (první sušení). První sušení musí být pomalé, aby nedošlo k poškození bakteriálních buněk. Vzniklá energie se vyloučí jako teplo. Energie vložená do výparu musí být kontrolována a řízena, aby nedošlo ke kolapsu buněčných struktur. Vytvořenou páru je nutné odstranit od kultur bakterií. Většina buněk není strukturálně a chemicky stabilní, dokud se vázaná voda neodstraní pomocí desorpce (druhé sušení) (Perry 1995).

K procesu lyofilizace se využívá přístroj lyofilizátor. Existuje více druhů tohoto přístroje. Dva komponenty jsou však pro všechny stejné. Jedním z nich je vakuová pumpa, která snižuje obsah plynů obklopující vzorek v obalovém materiálu (nejčastěji hermeticky uzavřené skleněné vialky). Druhým z nich je kondenzátor k odstranění vlhkosti, která vzniká ochlazením. Přístroje se mohou lišit ve způsobu, jakým kondenzátor interferuje se vzorky. Úspěšně dokončený proces lyofilizace je také závislý na materiálu, ze kterého lyofilizátor sestává. Důležitou vlastností pro tento materiál je tepelná vodivost a odolávání tepelným výkyvům (Nireesha et al. 2013).



Obrázek 6. *Demonstrační design lyofilizátoru (Nireesha et al. 2013). Komora obsahuje policičky s vialkami. Kondenzátor vychytává rozpouštědlo, kterým je např. voda. Externě orientovaný kondenzátor může být napojen ke komoře různými způsoby, běžně bývá umístěn takto za komorou. Kapalina zahřívající úložné desky koluje o uzavřeném obvodu. Mrazení vzorků může probíhat před vložením do lyofilizátoru nebo v lyofilizační komoře. Sušení probíhá za nízkého tlaku a ve vakuu.*

Preparáty připravené lyofilizací přináší oproti jiným metodám konzervace řadu výhod (Carvalho et al. 2004). Jsou nenáročné na manipulaci, uskladnění a praktické využití, což je velkým plusem pro různá průmyslová odvětví. Pokud se jedná o probiotické preparáty, je tato metoda ekonomicky a technologicky nejefektivnější. Mimo jiné je tato metoda šetrná pro buněčné proteiny, které mohou být citlivé na teplotní šok, během kterého mohou zdenaturovat, a tak se nenávratně a funkčně poškodit.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.5.1, velmi důležitým faktorem pro výslednou životaschopnost bakterií po lyofilizaci je i sušící médium. V průběhu lyofilizace sušící médium chrání bakteriální buňky před poškozením a také usnadňuje rehydrataci. V potravinářském průmyslu je pro většinu komerčně využívaných bakterií mléčného kvašení jako sušící médium využíváno sušené odstředěné mléko. Takové mléko navíc poskytuje proteiny, které na bakteriálních buňkách vytvoří film, čímž je chrání a zvyšují tak jejich životaschopnost (Carvalho et al. 2004).

3.5.4 Sušení

Metoda konzervace sušením je založena na působení tepla, při kterém se sníží obsah vody v buňkách a nedochází k narušení chemické podstaty buněk (Misra a Kuila 1995).

Výhodou této metody jsou nízké investiční a údržbové náklady, časová nenáročnost a možnost nepřetržité práce. Mezi nevýhody patří drastická dehydratace buněk, protože při ní může docházet k tranzici-transformaci fosfolipidů (součást buněčné membrány) a ke změnám objemu bakteriální buňky. Z toho důvodu se při sušení stejně jako u mrazení a lyofilizace využívají protektiva, která buňku v rámci tohoto procesu chrání. Během sušení je důležité předcházet prudkým změnám osmotického tlaku, a tak se využívá přidání různých karbohydrátů (Linders et al. 1997) nebo glycerolu do tekutého média (Misra a Kuila 1995).

Mille et al. (2004) se ve své studii zabývali optimalizací procesu sušení. Předmětem zkoumání byla bakterie *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus bulgaricus*. Optimalizace zahrnovala dvě fáze. V první fázi byly bakterie mléčného kvašení namixovány s kaseinovým práškem. Bakteriím je tak poskytnuto médium a před zahájením sušení je zajištěna stálá hodnota vodní aktivity a_w . Výsledky studie prokázaly, že daná hodnota a_w před začátkem sušení ovlivňuje životaschopnost bakterií na konci celého procesu. Druhá fáze optimalizace zahrnovala samotné sušení sušičkou s fluidním ložem. Kolem granul s bakteriemi je proháněn horký vzduch, vlhkost je odváděna z přístroje směrem ven a na konci přístroje jsou získávána granula s vysušenými bakteriemi. V této fázi se však životaschopnost jednotlivých bakteriálních kmenů liší v závislosti na použitém médiu a sušícím plynu (Castro et al. 1995). Neméně důležitým faktorem pro výslednou životaschopnost bakterií je i vliv osmotického tlaku v průběhu procesu sušení (Poirier et al. 1998), což bylo potvrzeno i v konečném výsledku studie (Mille et al. 2004).

3.5.5 Sprejové sušení

Během sprejového sušení dochází k velmi rychlému odpaření rozpouštědla, čímž dochází k přeměně tekuté hmoty v suché a pevné částice. První zmínka o sprejovém sušení pochází z roku 1860 (Cal a Sollohub 2010a). V dnešní době je tato metoda využívána například při přípravě doplňků stravy s probiotickými bakteriemi, výrobě sušených potravin (sušené mléko), ke stabilizaci a výrobě farmaceutik (léky s inhalační aplikací apod.) (Sollohub a Cal 2010b). Při sprejovém sušení bakterií může docházet k poškození buněčných struktur rychlým odpařením rozpouštědla (vody) a vlivem prudkých změn teploty. Těmto komplikacím je možné předcházet upravením složení sušící směsi a dalších podmínek v průběhu procesu v závislosti na konkrétním bakteriálním kmenu a jeho vlastnostech (Gardiner et al. 2000).

Sprejové sušení sestává z tří hlavních fází. První fází je atomizace částic tekuté hmoty vhodným atomizérem. Takto upravené částice hmoty v tekutém skupenství jsou připravené na druhou fázi, která spočívá v jejich reakci s dostatečným množstvím sušícího plynu. Sušící plyn má obvykle vyšší teplotu než samotná sprejovaná tekutá hmota. Dochází k disperzi částic sušícího plynu a k jejich splnutí s atomizovanými částicemi tekuté hmoty. Prostřednictvím působení sušícího plynu dochází k odpaření rozpouštědla, což vede k tvorbě meziprojektu, který již získává podobu pevných částic, aglomerátů částic, sypkého prášku apod. Ve třetí fázi je zapotřebí oddělit vysušené částice od sušícího plynu vhodným separačním zařízením, jakým je například centrifuga. Po centrifugaci získáváme finální produkt (Cal a Sollohub 2010a).

3.6 Kryo(lyo)protektiva

Kryo(lyo)protektiva snižují riziko poškození bakteriálních buněk během konzervačních procesů. Inkorporace kryo(lyo)protektiv k bakteriálním kulturám redukuje množství vznikajících krystalků ledu v průběhu procesu zmrazování, a to při různých teplotách. Vznik takových krystalů může být pro buňku ničivý (Perry 1995). Protektivní substance se využívají i při sušení nebo sprejovém sušení. Přidání těchto substancí k bakteriálním buňkám nemusí být

využíváno pouze pro svůj protektivní charakter. Mezi další možnosti využití patří například jejich schopnost měnit sekundární strukturu proteinů, inaktivace proteinů a enzymů apod. (Sollohub a Cal 2010b). Látky, které jsou využívány jako kryo(lyo)protektiva vykazují různou míru působení protektivního účinku. Volba kryo(lyo)protektiva nezávisí pouze na něm samotném, ale také na vlastnostech bakteriální kultury, pro kterou je využit protektivní charakter látky.

Mezi využívaná kryo(lyo)protektiva patří glycerol (vhodný pro pozitivní kontrolu) (Reddy et al. 2009; Kanmani et al. 2011), dimethylsulfoxid (Ashwood-Smith 1967), rekonstituované sušené mléko, krevní sérum apod. Tato diplomová práce se bude dále v rámci kryo(lyo)protektiv zaměřovat převážně na disacharidy a polysacharidy s prebiotickým potenciálem.

Protektivní vlastnosti polysacharidů na biomolekuly během konzervace jsou vysvětlovány několika faktory (Tymczyszyn et al. 2011). Prvním z nich je vodíková vazba mezi částí polysacharidu a polárními zbytky makromolekul ve vysušeném stavu. To má za následek, že i přes ztráty vody není narušena fyzikální podstata makromolekuly. Makromolekula se pomocí vazby s polysacharidy udržuje v podobném stavu jako za přítomnosti vody. Druhým faktorem je formování polysacharidů do konformace, kdy získávají skelnou podobu (tzv. „sugar glass“). Vlastnosti „sugar glass“ matrice zlepšují stabilitu makromolekul během jejich skladování (Santivarangkna et al. 2008). Třetím faktorem je odstranění navázané vody a polysacharidů z povrchu makromolekul za přítomnosti vody, čímž si makromolekula částečně zachovává své nativní uspořádání a jiné původní vlastnosti (Arakawa a Timasheff 1982).

3.6.1 Glycerol

Využití glycerolu jako látky s protektivním potenciálem u různých typů biomolekul je celkem probádané a empiricky ověřené (Howard 1956). Glycerol je organická sloučenina. Využívá se především v kosmetickém odvětví, potravinářském průmyslu, lékařství a také například pro výrobu nemrznoucích směsí. Jedná se o bezbarvou viskózní kapalinu bez zápachu. Má hygroskopické vlastnosti, tzn., že dokáže pohlcovat a udržovat vzdušnou vlhkost.

Glycerol je v dnešní době v rámci mikrobiologických experimentů běžně využívaná látka s kryo(lyo)protektivním charakterem. Jeho protektivní účinky mají u probiotických bakterií stabilní úspěšnost (Reddy et al. 2009; Kanmani et al. 2011), a tak se často jedná o pozitivní kontrolu při testování méně probádaných alternativ.

3.6.2 Fruktooligosacharidy (FOS)

Fruktooligosacharidy jsou složené sacharidy z monomerních jednotek fruktózy a vyskytují se přirozeně v mnoha rostlinách, z kterých se získávají deriváty fruktooligosacharidů pro využití v potravinářství a lékařství.

Fruktóza se váže na buněčnou stěnu probiotických bakterií, čímž chrání bakteriální buňku před poškozením nebo odumřením během vysušení například při konzervaci sprejovým sušením (Rajam a Anandharamakrishnan 2015). Startovací kultura konzervovaných bakterií je při využití fruktooligosacharidů obohacena také o jejich prebiotický účinek, což podporuje přežití probiotických bakterií při průchodu gastrointestinálním traktem člověka. Ve studii zabývající se účinky fruktooligosacharidů získaných z rýžového proteinu na *Lactobacillus plantarum* během lyofilizace bylo prokázáno, že lyofilizované buňky této probiotické bakterie nevykazovaly v inhibici patogenů oproti nelyofilizovaným bakteriím odlišné výsledky. Dalším důležitým poznatkem studie bylo, že fruktooligosacharidy navázané na buněčnou stěnu *L. plantarum* během lyofilizace zajistily na povrchu bakteriálních buněk vysoký stupeň hydrofobicity, což je pro udržení co nejpůvodnější fyzikální podstaty buňky velmi výhodné. Je tak chráněna před poškozením způsobeným ztrátou vody (Sayedboworn et al. 2018).

3.6.3 Galaktooligosacharidy (GOS)

Galaktooligosacharidy se skládají z monosacharidových jednotek galaktózy. Vyskytují se přirozeně například v mateřském a kravském mléce. Byly vyhodnoceny jako velmi vhodné protektivní složky při kryokonzervaci *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Probiotické doplňky stravy obohacené o galaktooligosacharidy mají včetně protektivních vlastností na probiotické bakterie i prebiotický účinek (Tymczyszyn et al. 2011, 2012). Galaktooligosacharidy jsou produktem enzymatického štěpení laktózy působením enzymu laktázy (β -galaktosidázy) (Splechtna et al. 2006). Vzhledem k tomu, že se laktóza získává ze syrovátky, která je hlavním odpadním produktem při výrobě sýrů, je využití galaktooligosacharidů jako kryo(lyo)protektiva jedním z vhodných způsobů recyklace této odpadní hmoty (Playne a Crittenden 2009).

3.6.4 β -glukany

β -glukany jsou polysacharidy, které jsou tvořeny molekulami glukózy spojenými glykosidickou vazbou. Jedná se o heterogenní látky. Ve studii Da Silva Guedes et al. z roku 2019 bylo prokázáno, že je možné využít β -glukany jako kryoprotektivum pro probiotické laktobacily (*L. acidophilus* LA-05, *L. plantarum* 49, a *L. plantarum* 201). β -glukany jsou diskutovány jako vhodná složka funkčních potravin, protože mají blahodárné účinky na lidský organismus (Daou a Zhang 2012). Mimo to je jejich průmyslová výroba levná a nemá negativní dopad na životní prostředí, protože je možné je vyextrahovat bez promývání alkalickými nebo kyselými rozpouštědly a nevytváří se tak polutanty, které by životní prostředí zatěžovaly (Da Silva Guedes et al. 2019).

4 Materiál a metody

4.1 Bakteriální kmeny

Pro účely diplomové práce byly zvoleny kmeny druhů bifidobakterií a laktobacilů, u nichž byl prokázán probiotický efekt a které jsou hojně přítomny v probiotických a synbiotických preparátech nejen na tuzemském trhu (**Tabulka 1**).

Tabulka 1. Kmeny bifidobakterií a laktobacilů se sbírkovými čísly použité pro splnění cílů diplomové práce

Laktobacily	Bifidobakterie
<i>L. gasseri</i> DSM 20243 ^T (typový)	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 17930
<i>L. reuteri</i> DSM 20016 ^T	<i>B. adolescentis</i> DSM 20083 ^T
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 ^T	<i>B. breve</i> ATCC 15700 ^T
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> ATCC 15707 ^T
<i>L. johnsonii</i> DSM 10533 ^T	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 Ch. Hansen
<i>L. fermentum</i> ATCC 14931 ^T	<i>B. bifidum</i> MG4

Za názvy jednotlivých kmenů jsou vypsány zkratky, které udávají název a číslo sbírky, odkud použité kultury pochází. Zkratka „DSM“ znamená Deutsche Sammlung von Mikroorganismen neboli Německá sbírka mikroorganismů, zkratka „ATCC“ znamená American Type Culture Collection neboli Americká sbírka typových kultur.

Zvolené kmeny jsou součástí interní sbírky mikroorganismů LAM ÚŽFG AV ČR, v. v. i., kde byla experimentální práce provedena. V tabulce je zahrnut kmen *Bifidobacterium bifidum* MG4, jakožto nesbírkový, z důvodu potvrzení či vyvrácení hypotéz, že nejen sbírkové kmeny budou chráněny vůči nízkým teplotám a lyofilizačnímu procesu za přítomnosti potenciálních kryo(lyo)protektiv. Tento kmen byl izolován ze stolice pětiměsíčního kojence (chlapce) prostřednictvím modifikovaného TPY (Rada a Petr 2000) a klasifikován na základě komparativní analýzy 16S rRNA (ribozomální RNA malé podjednotky ribozomu) genu. Gen byl amplifikován prostřednictvím PCR (polymerázová řetězová reakce) a „primerového“ páru 616V (5'- AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') – 630R (5'- CAKAAAGGAGGTGATCC-3') (Loy et al. 2002). PCR reakce v objemu 25 µL sestávaly z 1x PPP Master Mix (75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 1.25 U *Taq* - purple DNA polymerase; Top-Bio, ČR), 0.5 µM obou primerů a 20 – 50 ng templátové DNA. Úspěšná amplifikace byla potvrzena na základě 1.5 % agaróзовé elektroforézy za těchto podmínek: 110 V, 40 min, ethidium bromid pro obarvení DNA v koncentraci 50 ng / 100 ml. Získané amplikony byly purifikovány kitem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Německo) podle instrukcí výrobce a sekvenovány z obou stran, tj. pomocí obou primerů, ve společnosti SEQme company (ČR). Kompletní

sekvence byly rutinně sestaveny v programu Geneious version 7.1.7 software (Biomatters Ltd., Nový Zéland). Výsledné sekvence byly vloženy do databáze EzBioCloud volně přístupné na webové stránce: <https://www.ezbiocloud.net/identify> (Yoon et al. 2017) porovnávající vloženou sekvenci se všemi kompletními (v nejvyšší míře vyextrahované z kompletních genomů) sekvencemi příslušného genu typových kmenů prokaryot. Výsledkem jsou procentuální podobnosti s nejbližšími taxony. V případě izolátu MG4 to bylo 99,85 % s typovým kmenem *B. bifidum*.

4.2 Rekonstituce a kultivace kultur

Zmrazené kultury bifidobakterií a laktobacilů (kryoprotektivum glycerol: 20% v/v) byly rekonstituovány („oživeny“) přeočkováním do modifikovaného M.R.S. bujónu (mMRS) o následném složení (g / L): 12 trypton, 20 glukóza, 5 g kvasničný extrakt, 5 g sójový pepton, 5 octan sodný, 5 NaCl, 1 MgCl₂ x 6 H₂O; 0,2 cystein x HCl, 1 ml Tween 80, přičemž pH před sterilací bylo upraveno na 7,3 pomocí 5M NaOH. Anaerobní podmínky byly zajištěny vytěsněním atmosférického O₂ pomocí CO₂ z tlakové láhve (čistota plynu > 99,99 %). Toto médium, v případě nutnosti zjištění počtu životaschopných buněk v podobě KTJ – kolonií tvořící jednotky s přidavkem 13,5 g bakteriologického agaru (Oxoid, Anglie), bylo použito nejen pro rekonstituci zmrazených kultur, ale také pro kultivaci – řízené pomnožování bifidobakterií i laktobacilů. Empiricky jsme v počátku pokusů zjistili, že toto médium je vhodné pro kultivaci obou skupin probiotických bakterií.

4.3 Příprava potenciálních kryoprezervačních a lyoprotektivních roztoků

V níže situované tabulce jsou uvedena složení dvou potenciálních kryo- a lyoprotektivních roztoků na bázi β – glukanů a laktulózy. Dále tabulka zahrnuje složení negativní a pozitivní kontroly (jen v případě kryoprezervace).

Tabulka 2. Složení potenciálních kryo- a lyoprotektivních roztoků (g / 100 ml deionizované vody, pokud není uvedeno jinak)

β -glukanový roztok	Laktulóзовý roztok	K - (negativní kontrola)	K+ (pozitivní kontrola, kryoprezervace)
β -glukany kvasničné (Apotex, ČR) 3	Laktulóza (ALIUD® PHARMA GmbH, Německo) 10	Narostlá kultura na konci Log fáze 1,5 ml	Narostlá kultura na konci Log fáze 1,5 ml + 50 % roztok glycerolu 1,5 ml
Lecithin sójový (SunPharm, ČR) 2,5	Lecithin sójový (SunPharm, ČR) 2,5	-	-
Kvasničný extrakt (Oxoid, UK) 2,5	Kvasničný extrakt (Oxoid, Anglie) 2,5	-	-
K ₂ HPO ₄ 2	K ₂ HPO ₄ 2	-	-
MgCl ₂ x 6 H ₂ O 0,5	MgCl ₂ x 6 H ₂ O 0,5	-	-

Jednotlivé komponenty byly řádně resuspendovány ve vodě a roztok lehce povařen ve vodní lázni (10 minut). Po úpravě pH pomocí 5M NaOH na hodnotu 7,1 - 7,3 u nich byla

vytvořena anaerobní atmosféra vytěsněním kyslíku prostřednictvím CO₂, stejně jako v případě kultivačního modifikovaného M.R.S. média. Toto růstové médium i připravené roztoky byly sterilovány při 107 °C po dobu 55 minut. V případě přípravy roztoku s laktulózou byl samostatně připravený, anaerobní a sterilní roztok této látky přidán do roztoku zbylých sloučenin v příslušné koncentraci až po jeho sterilaci, aby nedošlo k nežádoucím Maillardovým reakcím (reakce redukcujících sacharidů s aminokyselinami). U pozitivní kontroly kryoprotektivní roztok sestával z 50 % glycerolu (v/v) a 50% roztoku v deionizované vodě o tomto složení (g / L): 1,2 K₂HPO₄; 0,33 g KH₂PO₄ a 0,5 cystein-HCl. Rovněž u tohoto sterilizovaného roztoku (121 °C / 20 minut) byla vytvořena anaerobní atmosféra pomocí CO₂.

4.4 Příprava směsi bakteriálních kultur a roztoků potenciálních kryo- a lyoprotektiv před kryoprezervací a lyofilizací

U rekonstituovaných kultur vybraných kmenů bifidobakterií a laktobacilů byl ukončen růst při 37 °C na konci Log fáze růstové křivky po 18–24 h kultivaci v mMRS bujónu. Růstové křivky, nezbytné k určení doby kultivace na konci Log fáze, byly u každé kultury v daném médiu provedeny pomocí spektrofotometrického (Jenway 6100 Spectrophotometer, Anglie) měření zákalu (resp. míry koncentrace buněk) v určitých časových intervalech. V této době byl u každého z vybraných kmenů zjištěn kultivačně počet buněk v 1 ml narostlé kultury (počáteční hodnota před procesy zmrazování a lyofilizace). Zároveň v 7 kopiích bylo 1,5 ml kultury smícháno s 1,5 ml potenciálních kryo- a lyoprotektivních roztoků, přičemž výsledná koncentrace aktivních látek byla v takto připravených vzorcích tato: laktulóza (2,5 %, v/v), β - glukany (0,75 % w/v), lecithin a kvasničný extrakt 0,625 % (w/v). Pro přípravu vzorků byly využity skleněné 15 ml penicilínky obsahující 2 ml anaerobního „udržovacího“ roztoku o složení (g / L): 5 trypton; 2,5 kvasničný autolyzát (oba Oxoid, Anglie); 2,5 NaCl; 1,2 KH₂PO₄; 0,2 cystein-HCl a 0,5 ml Tween 80 (Sigma-Aldrich, USA). Po úpravě pH 5M NaOH na hodnotu 7,2 - 7,5 byly lahvičky naplněny roztokem kalibrovanou dávkovací pipetou, přičemž byla vytvořena anaerobní atmosféra pomocí CO₂. Lahvičky byly hermeticky uzavřeny gumovou zátkou a hliníkovým uzávěrem. Tento postup byl zvolen pro stabilizaci prostředí a udržení co nejvyšší vitality (životaschopnosti) buněk. Před aplikací kultur a roztoků byl celý objem udržovacího roztoku odstraněn sterilní, kalibrovanou a jednorázovou stříkačkou s jehlou (Braun, Německo).

V případě kryoprezervace i lyofilizace, kopie připravené suspenze buněk a roztoků (β-glukanový, laktulózový, kontrolní s glycerolem – K⁺ a kontrolní obsahující pouze narostlou kulturu – K⁻) v daném poměru byly ponechány 2 hodiny při teplotě 15 °C pro účely homogenizace. Vzorky určené pro sledování možného kryoprotektivního efektu byly vloženy do mrazničky s nastavenou teplotou – 20 °C. Jako další kontrolní vzorek byla použita kultura v objemu 3 ml a uskladněná při teplotě – 80 °C (Ultra-low Temperature Freezer, MDF-U73V, SANYO Electric Co., Ltd., Japonsko).

Vzorky určené pro stanovení možného lyoprotektivního účinku shodných roztoků byly připraveny stejným způsobem a poté vloženy po dobu 4 hodin do mrazicího zařízení s teplotou

– 80 °C. Jako negativní kontrola byly použity lahvičky s 1,5 ml kulturou bez přídavku roztoků. Po rychlém zmrazení byla v co možná nejkratším časovém období u kopií vzorků bakteriálních kultur odstraněna gumová zátká s hliníkovým uzávěrem a nahrazena speciální lyofilizační zátkou, jenž byla ihned zakryta (kvůli minimalizaci kontaminace zvenčí) sterilním, dvojvrstevným, aluminiovým obalem. Po této přípravě byly vzorky bezprostředně vloženy do lyofilizátoru (Lyovac GT 2, Leybold-Heraeus, Německo) a lyofilizovány po dobu 24 hodin. Poté byly vzorky v co nejkratším čase (minimalizace průniku vzduchu, respektive vzdušné vlhkosti) hermeticky uzavřeny hliníkovým uzávěrem a uskladněny při teplotě 25 °C.

4.5 Stanovení počtu vitálních buněk v časových intervalech

Pro dané účely byla použita klasická metoda anaerobní kultivace v mMRS agaru. Pro zhodnocení možného kryo- a lyoprotektivního účinku roztoků byly vzorky naředěny desítkovým systémem v penicilínkách, které obsahovaly 4,5 ml „udržovacího“ roztoku (složení uvedeno výše). Při přípravě ředících řad byly použity kalibrované, sterilní 1ml stříkačky s jehlou (Omnifix-F, Braun, Německo). Z ředících řad bylo aplikováno 0,5 ml suspenze na dno sterilních Petriho misek, přelito anaerobním, sterilním mMRS agarem a kultivováno po dobu 24 (nejčastěji) – 48 hodin při 37 °C v anaerostatu (Anaerobic jar 3,5L; Oxoid, Anglie) s přídavkem vyvíječe anaerobní atmosféry (AnaeroGen™ 3.5L, Oxoid, Anglie).

Počty narostlých kolonií byly v případě kryoprezervace počítány (a ihned přepočítávány na hodnoty \log_{10} KTJ – kolonie tvořící jednotky) na 1 ml původní kultury nacházející se na konci Log fáze růstové křivky před procesem mrazení a dále v intervalech 24 hodin, 30., 120. a 210. den po vložení do mrazícího zařízení. Vždy byly zvoleny 3 nezávislé kopie, u nichž byly detekovány počty a stanoveny směrodatné odchylky. Vyhodnocení bylo provedeno graficky s porovnáním negativních a pozitivních kontrolních vzorků. Kontrola kontaminace byla prováděna u náhodně zvolených kolonií, přičemž byla hodnocena typická morfologie buněk příslušných bakteriálních kmenů.

U lyofilizátů byl stanovován počet vitálních buněk stejným způsobem, jen v kratších časových intervalech a bez zahrnutí pozitivní kontroly. Počty (\log_{10} KTJ / ml kultury na konci Log fáze růstové křivky) byly stanovovány před lyofilizací, ihned po lyofilizačním procesu, a dále 20., 40. a 60. den po lyofilizaci. Rovněž bylo prováděno stanovení u 3 nezávislých kopií s výpočtem směrodatné odchylky.

5 Výsledky

5.1 Počty vitálních buněk u zmrazených kultur bifidobakterií

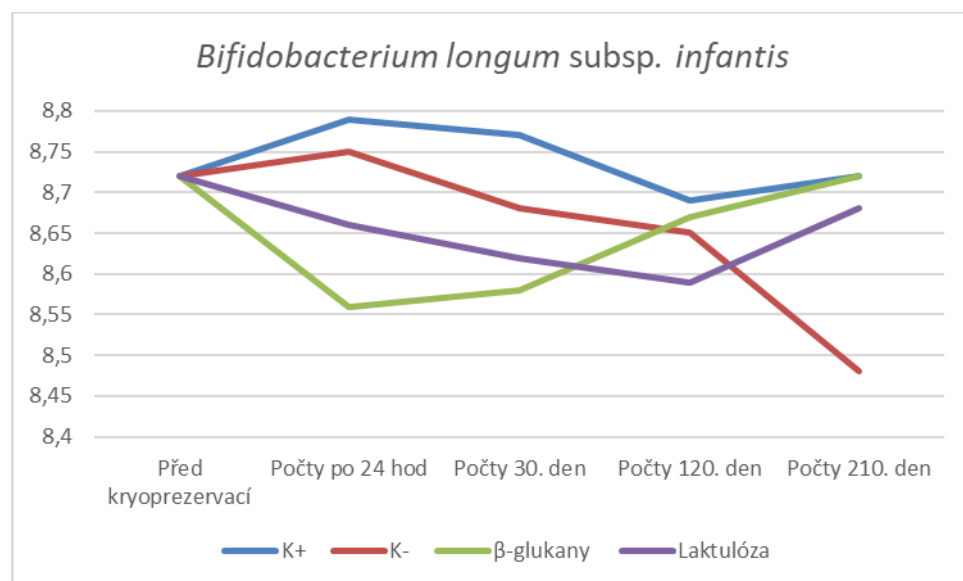
Níže jsou uvedeny výsledné počty kultur bifidobakterií zmrazených za přítomnosti 2 možných kryoprotektivních roztoků, a rovněž výsledné počty u pozitivních a negativních kontrolních vzorků.

Tabulka 3. Počty vitálních buněk (\pm SO – směrodatná odchylka) u zmrazených kultur bifidobakterií v určitých časových intervalech

Kmeny bifidobakterií	Kryoprotektivum	Počty před kryoprezervací (\log_{10} KTJ / ml)	Počty po kryoprezervaci (24 hodin)	Počty 30.den	Počty 120.den	Počty 210.den	Počty 210.den (-80 °C)
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	K+	8,72 \pm 0,22	8,79 \pm 0,07	8,77 \pm 0,11	8,69 \pm 0,03	8,72 \pm 0,01	8,55 \pm 0,09
	K -		8,75 \pm 0,04	8,68 \pm 0,02	8,65 \pm 0,15	8,48 \pm 0,09	
	B - glukany + Lecitin		8,56 \pm 0,21	8,58 \pm 0,14	8,67 \pm 0,26	8,72 \pm 0,07	
	Laktulóza + Lecitin		8,66 \pm 0,11	8,62 \pm 0,2	8,59 \pm 0,34	8,68 \pm 0,12	
<i>B. adolescentis</i>	K+	7,88 \pm 0,07	7,91 \pm 0,03	7,92 \pm 0,05	7,77 \pm 0,02	7,79 \pm 0,08	7,93 \pm 0,21
	K -		7,75 \pm 0,06	7,68 \pm 0,19	7,13 \pm 0,03	6,22 \pm 0,11	
	B - glukany + Lecitin		7,83 \pm 0,02	7,78 \pm 0,12	7,83 \pm 0,05	7,88 \pm 0,04	
	Laktulóza + Lecitin		7,69 \pm 0,05	7,73 \pm 0,01	7,81 \pm 0,17	7,01	
<i>B. breve</i>	K+	9,12 \pm 0,17	9,15 \pm 0,19	9,09 \pm 0,07	9,11 \pm 0,13	8,94 \pm 0,08	9,2 \pm 0,08
	K -		6,09 \pm 0,16	4,38 \pm 0,35	< 1	< 1	
	B - glukany + Lecitin		8,02 \pm 0,41	7,91 \pm 0,18	7,38 \pm 0,1	7,55 \pm 0,29	
	Laktulóza + Lecitin		8,11 \pm 0,02	7,06 \pm 0,11	7,1 \pm 0,24	7,15 \pm 0,05	
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	K+	9,41 \pm 0,03	9,25 \pm 0,14	9,31 \pm 0,06	9,14 \pm 0,11	8,88 \pm 0,26	9,45 \pm 0,07
	K -		8,51 \pm 0,14	4,48 \pm 0,29	< 1	< 1	
	B - glukany + Lecitin		9,08 \pm 0,35	8,76 \pm 0,1	7,65 \pm 0,22	7,29 \pm 0,06	
	Laktulóza + Lecitin		9,19 \pm 0,09	9,14 \pm 0,05	9,17 \pm 0,07	9,07 \pm 0,16	
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	K+	9,34 \pm 0,15	9,38 \pm 0,21	9,31 \pm 0,13	9,32 \pm 0,02	9,28 \pm 0,09	9,17 \pm 0,24
	K -		9,41 \pm 0,08	9,31 \pm 0,02	8,65 \pm 0,23	7,53 \pm 0,18	
	B - glukany + Lecitin		9,37 \pm 0,07	9,39 \pm 0,23	9,39 \pm 0,05	9,47 \pm 0,05	
	Laktulóza + Lecitin		9,37 \pm 0,11	9,41 \pm 0,03	9,38 \pm 0,03	9,39 \pm 0,12	
<i>B. bifidum</i> MG4	K+	8,04 \pm 0,04	7,91 \pm 0,08	7,95 \pm 0,11	7,83 \pm 0,02	7,29 \pm 0,19	7,89 \pm 0,18
	K -		7,92 \pm 0,06	7,27 \pm 0,22	5,69 \pm 0,31	3,75 \pm 0,06	
	B - glukany + Lecitin		7,53 \pm 0,17	7,35 \pm 0,03	6,86 \pm 0,19	6,51 \pm 0,09	
	Laktulóza + Lecitin		7,68 \pm 0,04	7,59 \pm 0,15	7,41 \pm 0,18	7,56 \pm 0,12	

Z **Tabulky 3** je patrné, že kryoprotektivní účinek roztoků byl mezi jednotlivými kmeny bifidobakterií odlišný. U typového kmene *B. longum* subsp. *infantis* a BB-12 byl prokázán kryoprotektivní efekt obou navržených roztoků, neboť počty na konci pokusu dosahovaly téměř shodných hodnot jako u původní rekonstituované kultury. β -glukanový roztok působil kryoprotektivně u *B. adolescentis* a roztok obsahující laktulózu měl kryoprotektivní potenciál u *B. longum* subsp. *longum* a *B. bifidum* MG4. V následujících kapitolách budou obsaženy grafy zaznamenávající rozdíl kryoprotektivního účinku mezi jednotlivými kryoprotektivy, pozitivní a negativní kontrolou.

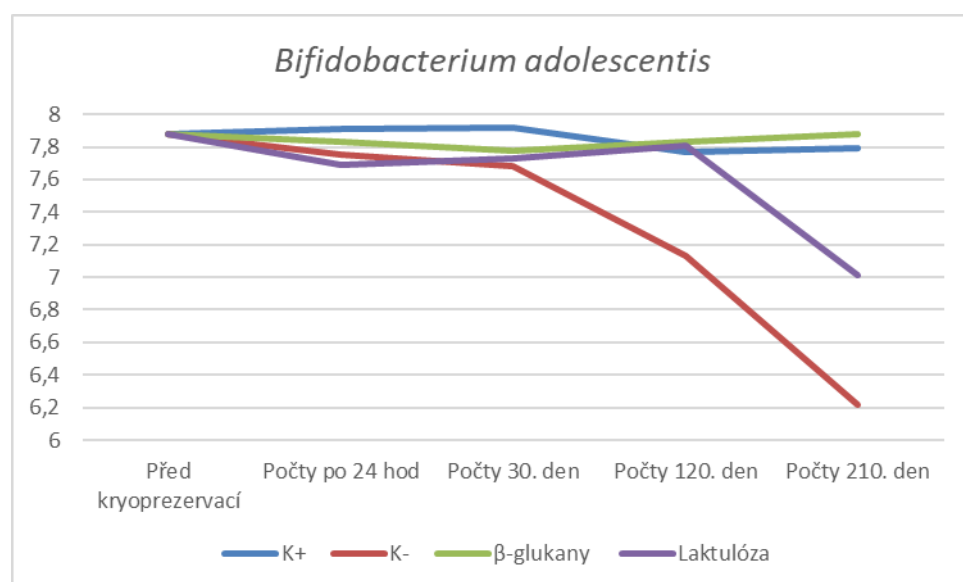
5.1.1 *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*



Graf 1. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* v časových odstupech po kryoprezervaci

Výsledky působení kryoprotektiv na *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* jsou si velmi podobné. Obě testovaná kryoprotektiva (β -glukanový roztok, laktulóзовý roztok) byla srovnatelně účinná jako kontrolní glycerol (K+). Konečné počty bakteriálních buněk dosahovaly téměř shodných hodnot jako před kryoprezervací. Oproti tomu negativní kontrola (K-) bez použití ochranných látek značí pokles počtu přeživších buněk.

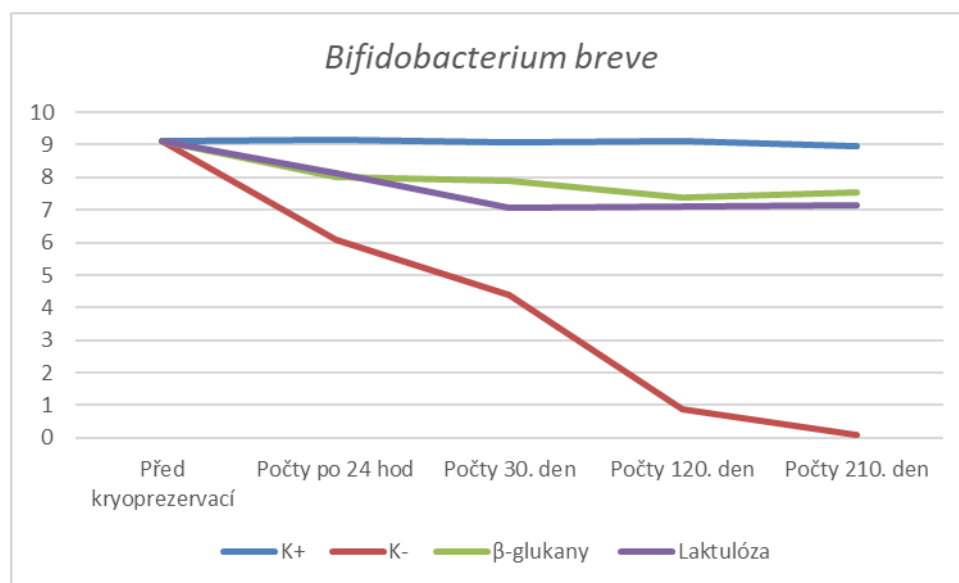
5.1.2 *Bifidobacterium adolescentis*



Graf 2. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Bifidobacterium adolescentis* v časových odstupech po kryoprezervaci

Při použití β -glukanového roztoku byly počty buněk *Bifidobacterium adolescentis* v rozmezí hodnot jako na začátku pokusu. Jeho kryoprezervační účinek byl na konci pokusu vyšší než u roztoku s glycerolem (K+). Laktulózový roztok vykazoval při kontrole 120. den pokusu výsledky jako ostatní kryoprotektiva a při kontrole 210. den pokusu měl již účinnost nižší. Přesto je v grafu znázorněný kryoprotektivní potenciál laktulózy oproti negativní kontrole.

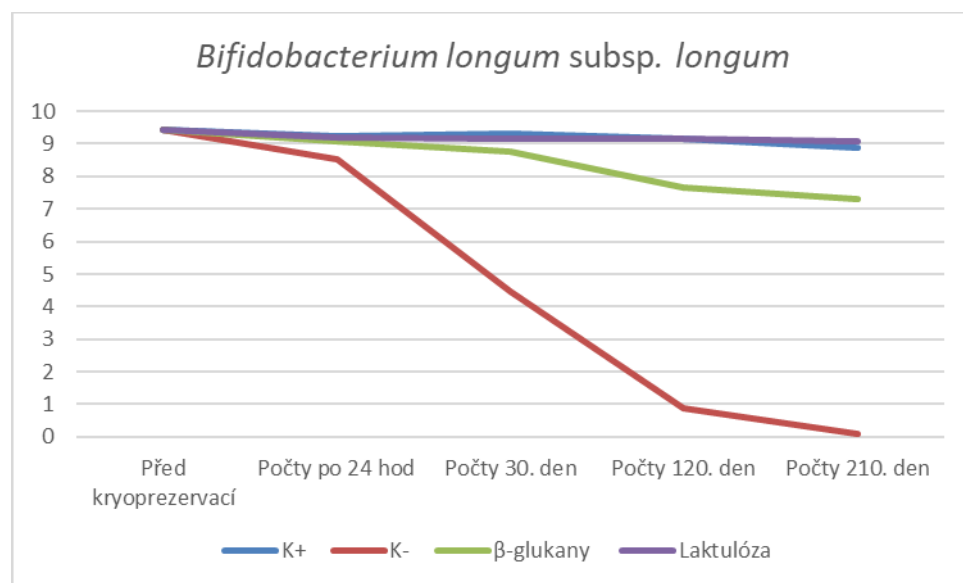
5.1.3 *Bifidobacterium breve*



Graf 3. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *Bifidobacterium breve* v časových odstupech po kryoprezervaci

V **Grafu 3** je znázorněný určitý kryoprotektivní efekt obou testovaných roztoků. 30. den byly počty životaschopných buněk *Bifidobacterium breve* rozdílné o jednu jednotku \log_{10} KTJ / ml, kdy vyššího kryoprotektivního efektu dosahoval roztok s β -glukany oproti roztoku s laktulózou. 120. den byly počty přeživších buněk s použitím testovaných kryoprotektiv téměř shodné a až do konce pokusu konstantní. Roztok s glycerolem (K+) vykazoval nejvyšší kryoprotektivní efekt a křivka negativní kontroly (K-) klesala po dobu trvání pokusu k hodnotě 0.

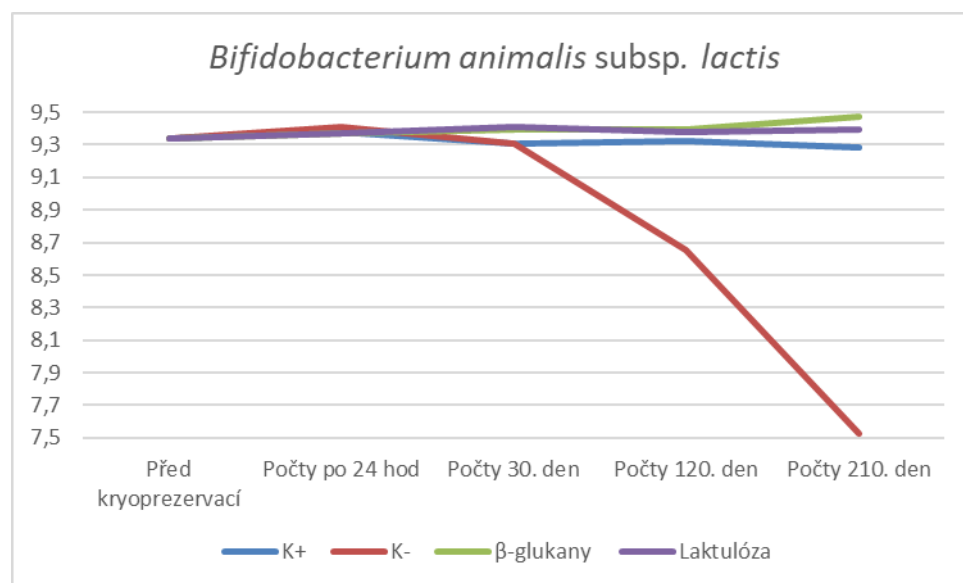
5.1.4 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*



Graf 4. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* v časových odstupech po kryoprezervaci

Počty přeživších bakteriálních buněk na konci pokusu dosahovaly při použití β -glukanového a glycerolového (K+) roztoku téměř shodných hodnot jako u původní rekonstituované kultury. Byl tedy zjištěn výrazný kryoprotektivní efekt β -glukanů pro *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. Kryoprotektivní potenciál byl zaznamenán i u laktulóзовého roztoku. Křivka negativní kontroly (K-) klesala již od 120. dne k hodnotě nižší než 1.

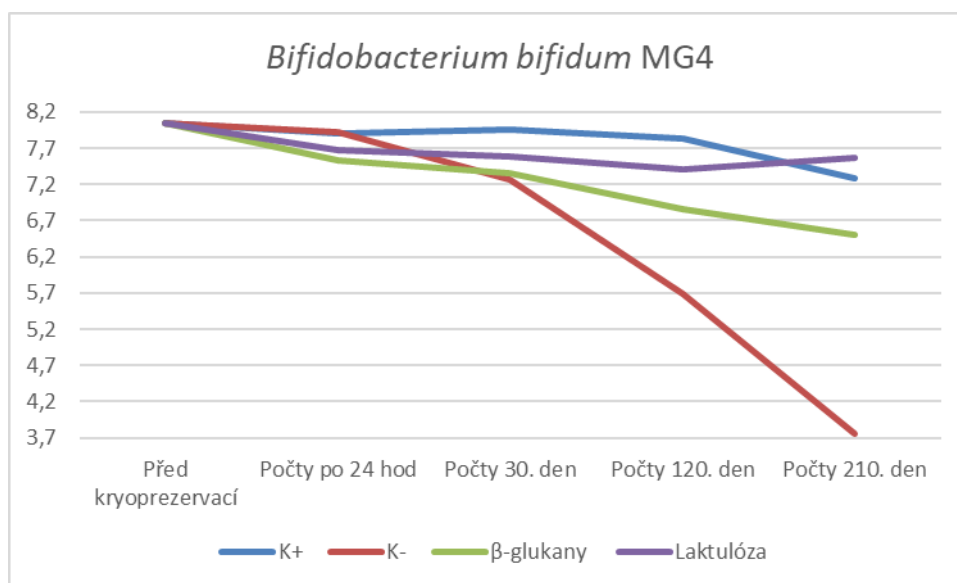
5.1.5 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*



Graf 5. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* v časových odstupech po kryoprezervaci

Z uvedeného grafu je patrné, že oba testované roztoky mají kryoprotektivní účinek. Ve srovnání s počtem buněk, jaký byl na začátku pokusu, je tento kryoprotektivní efekt velmi příznivý. Počty přeživších bakterií u β -glukanového a laktulózového roztoku byly dokonce vyšší než u roztoku s glycerolem (K+). U vzorku, který neobsahoval žádné kryoprotektivum (K-), byla křivka počtu přeživších buněk do 30. dne pokusu srovnatelná se vzorky s přídavkem kryoprotektiv, od 30. dne až ke konci pokusu však strmě klesala.

5.1.6 *Bifidobacterium bifidum* MG4



Graf 6. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *Bifidobacterium bifidum* MG4 v časových odstupech po kryoprezervaci

Všechna kryoprotektiva prokázala u *Bifidobacterium bifidum* MG4 kryoprotektivní efekt. Nejvyšších hodnot přeživších buněk na konci pokusu dosahoval vzorek s přídavkem laktulózového roztoku. S tím měl srovnatelný účinek roztok s glycerolem (K+). Roztok s β -glukany měl účinek nejnižší, přesto je jeho kryoprotektivní efekt také příznivý. Do 30. dne pokusu měl vzorek bez kryoprotektiv (K-) podobné počty přeživších buněk jako vzorky s kryoprotektivou, od 30. dne tyto počty však klesají.

5.2 Počty vitálních buněk u zmrazených kultur laktobacilů

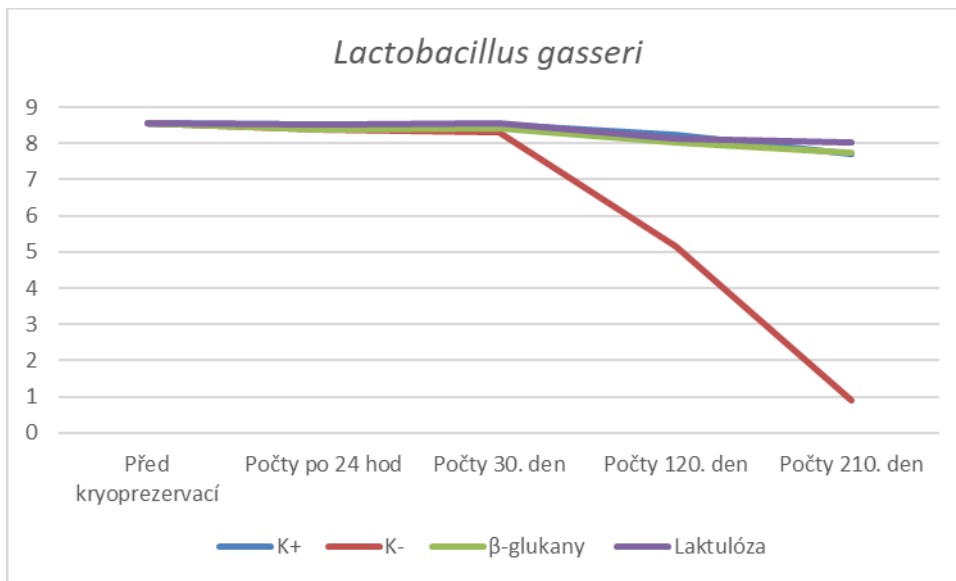
Níže jsou uvedeny výsledné počty kultur laktobacilů zmrazených za přítomnosti 2 možných kryoprotektivních roztoků, a rovněž výsledné počty u pozitivních a negativních kontrolních vzorků.

Tabulka 4. Počty vitálních buněk (\pm SO – směrodatná odchylka) u zmrazených kultur laktobacilů v určitých časových intervalech

Kmeny laktobacilů	Kryoprotektivum	Počty před kryoprezervaci (\log_{10} KTJ / ml)	Počty po kryoprezervaci (24 hodin)	Počty 30.den	Počty 120.den	Počty 210.den	Počty 210.den (-80 °C)
<i>L. gasseri</i>	K+	8,56 \pm 0,08	8,53 \pm 0,14	8,51 \pm 0,05	8,24 \pm 0,09	7,72 \pm 0,17	8,48 \pm 0,11
	K -		8,37 \pm 0,09	8,31 \pm 0,11	5,16 \pm 0,05	< 1	
	B- glukany + Lecitin		8,37 \pm 0,18	8,41 \pm 0,07	8,01 \pm 0,16	7,74 \pm 0,09	
	Laktulóza + Lecitin		8,51 \pm 0,02	8,55 \pm 0,07	8,13 \pm 0,11	8,02 \pm 0,03	
<i>L. reuteri</i>	K+	8,99 \pm 0,14	8,94 \pm 0,01	8,96 \pm 0,03	7,68 \pm 0,12	6,43 \pm 0,22	9,05 \pm 0,04
	K -		7,68 \pm 0,04	7,53 \pm 0,14	3,53 \pm 0,07	< 1	
	B- glukany + Lecitin		8,78 \pm 0,09	8,78 \pm 0,23	6,17 \pm 0,16	6,13 \pm 0,19	
	Laktulóza + Lecitin		9,03 \pm 0,06	8,68 \pm 0,02	7,72 \pm 0,12	7,67 \pm 0,11	
<i>L. acidophilus</i>	K+	6,04 \pm 0,32	6,05 \pm 0,16	5,75 \pm 0,08	5,21 \pm 0,28	4,58 \pm 0,14	5,95 \pm 0,19
	K -		5,73 \pm 0,02	3,93 \pm 0,13	2,62 \pm 0,04	< 1	
	B- glukany + Lecitin		5,91 \pm 0,08	5,18 \pm 0,01	4,21 \pm 0,2	3,46 \pm 0,11	
	Laktulóza + Lecitin		5,89 \pm 0,05	5,27 \pm 0,04	4,78 \pm 0,11	4,75 \pm 0,06	
<i>L. rhamnosus</i>	K+	9,21 \pm 0,06	9,24 \pm 0,11	9,2 \pm 0,03	9,18 \pm 0,07	9,09 \pm 0,13	9,23 \pm 0,08
	K -		9,16 \pm 0,01	7,68 \pm 0,18	4,51 \pm 0,03	3,63 \pm 0,12	
	B- glukany + Lecitin		9,2 \pm 0,09	9,08 \pm 0,22	8,8 \pm 0,13	8,08 \pm 0,32	
	Laktulóza + Lecitin		9,24 \pm 0,12	9,23 \pm 0,05	8,82 \pm 0,11	8,83 \pm 0,21	
<i>L. johnsonii</i>	K+	9,39 \pm 0,11	9,41 \pm 0,13	8,99 \pm 0,02	7,91 \pm 0,16	7,52 \pm 0,09	9,29 \pm 0,04
	K -		9,43 \pm 0,05	8,09 \pm 0,19	5,76 \pm 0,36	< 1	
	B- glukany + Lecitin		9,44 \pm 0,23	9,26 \pm 0,18	8,94 \pm 0,06	8,44 \pm 0,14	
	Laktulóza + Lecitin		9,38 \pm 0,04	9,37 \pm 0,12	9,03 \pm 0,19	9,11 \pm 0,08	
<i>L. fermentum</i>	K+	9,11 \pm 0,09	9,12 \pm 0,12	9,05 \pm 0,03	9,08 \pm 0,1	9,01 \pm 0,11	9,15 \pm 0,15
	K -		8,97 \pm 0,26	8,05 \pm 0,19	6,11 \pm 0,05	4,31 \pm 0,23	
	B- glukany + Lecitin		9,13 \pm 0,11	8,98 \pm 0,05	8,31 \pm 0,18	7,76 \pm 0,12	
	Laktulóza + Lecitin		9,16 \pm 0,03	9,15 \pm 0,04	8,86 \pm 0,11	8,86 \pm 0,08	

Tabulka 4 zaznamenává počty přeživších bakterií u testovaných kultur laktobacilů v čase trvání pokusu. Pro všechny kmeny rodu *Lactobacillus* byl nejvyšší kryoprotektivní efekt dosažen při použití laktulózového roztoku. Pro *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. acidophilus* a *L. johnsonii* byl laktulózový roztok účinnější než roztok s glycerolem, který sloužil jako pozitivní kontrola. Pro *L. gasseri* a *L. johnsonii* byla vyšší přežitelnost buněk zjištěna také při použití roztoku s β -glukany. U laktobacilových kultur bylo oproti kulturám s bifidobakteriemi (viz **Tabulka 3**) dosaženo lepších výsledků, u kterých byl potvrzen kryoprotektivní efekt testovaných roztoků. V následujících kapitolách bude pomocí grafů znázorněno, jakou přežitelnost buněk měly testované kryoprotektivní roztoky pro jednotlivé kmeny laktobacilů.

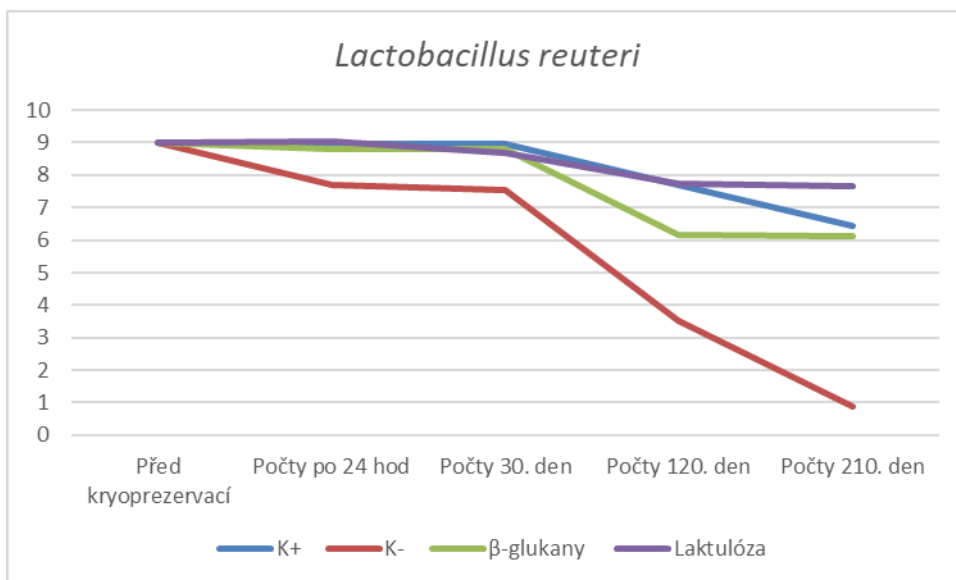
5.2.1 *Lactobacillus gasseri*



Graf 7. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Lactobacillus gasseri* v časových odstupech po kryoprezervaci

U vzorků s *Lactobacillus gasseri* byl prokázán velmi významný kryoprotektivní účinek β -glukanového a laktulóзовého roztoku. Křivka roztoku s β -glukany se v grafu překrývá s křivkou roztoku s glycerolem (K+), oba námi testované roztoky však dosahovaly vyššího kryoprotektivního účinku než samotná pozitivní kontrola. Vzorky bez přidavku kryoprotektiv byly od 30. dne v počtu přeživších bakterií v prudkém poklesu k hodnotě 0.

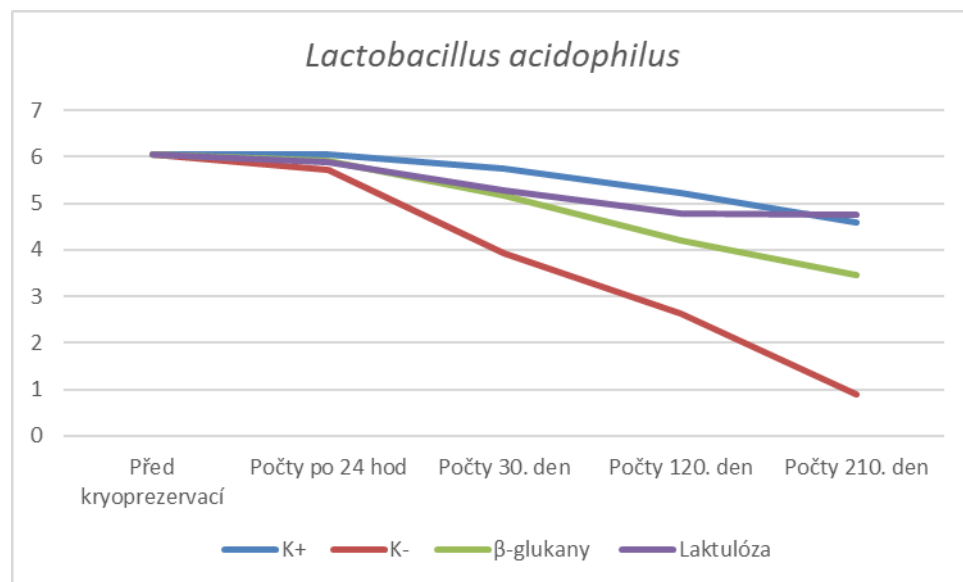
5.2.2 *Lactobacillus reuteri*



Graf 8. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Lactobacillus reuteri* v časových odstupech po kryoprezervaci

Příznivý kryoprotektivní potenciál byl u vzorku s *Lactobacillus reuteri* prokázán u roztoku s laktulózou. β -glukanový roztok prokázal také určitý kryoprotektivní efekt, který byl podobný efektu roztoku s glycerolem (K+). Stejně jako u předchozích grafů, počty přeživších bakterií u vzorku bez přídatných kryoprotektiv (K-) klesaly od 30 dne pokusu.

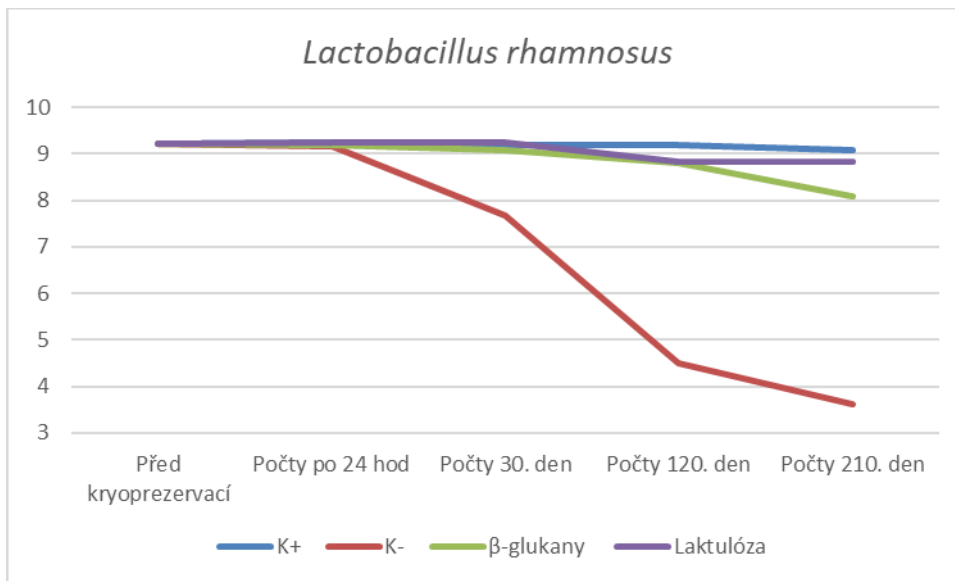
5.2.3 *Lactobacillus acidophilus*



Graf 9. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Lactobacillus acidophilus* v časových odstupech po kryoprezervaci

Podobně jako u přechozího grafu s *Lactobacillus reuteri* měl na konci pokusu (210. den) u vzorku s *Lactobacillus acidophilus* nejpříznivější kryoprotektivní efekt roztok s laktulózou. 30. den pokusu si byly oba testované vzorky ve své účinnosti podobné, nicméně od toho dne začaly počty přeživších bakterií u roztoky s β -glukany poměrně strmě klesat. U vzorku bez kryoprotektiv byl pokles přeživších buněk zaznamenán již od 1. dne od zahájení pokusu.

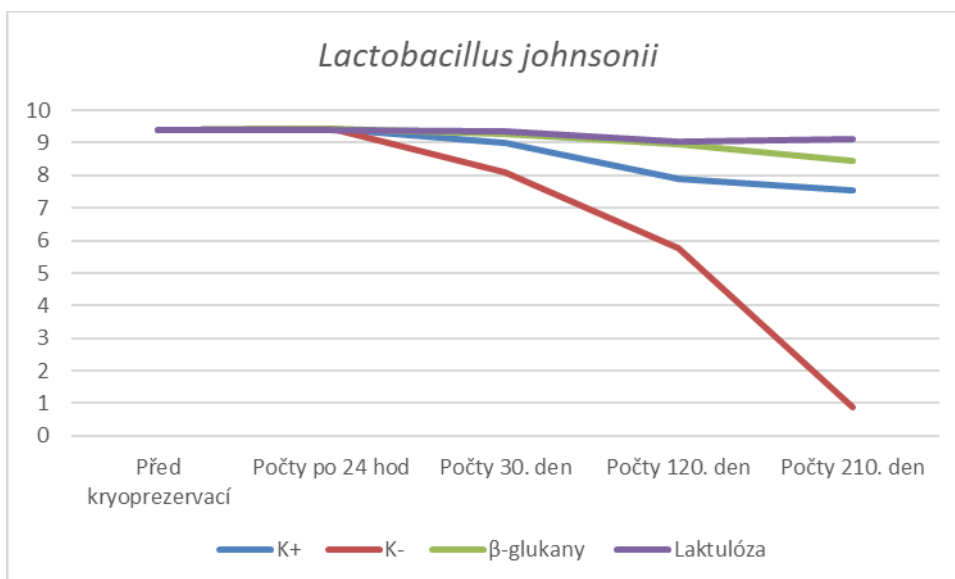
5.2.4 *Lactobacillus rhamnosus*



Graf 10. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *Lactobacillus rhamnosus* v časových odstupech po kryoprezervaci

V grafu jsou znázorněny vysoké počty přeživších buněk *Lactobacillus rhamnosus* ve vzorku s přidavkem laktulóзовého roztoku. Roztok s laktulózou měl příznivý kryoprotektivní efekt po celou dobu trvání pokusu. Použitím roztoku na bázi β -glukanů byl kryoprotektivní efekt nižší, přesto také velmi příznivý, protože až do 120. dne pokusu byly počty přeživších bakterií při použití obou testovaných roztoků téměř shodné. U vzorku bez kryoprotektiv byl zaznamenán významný pokles přeživších buněk.

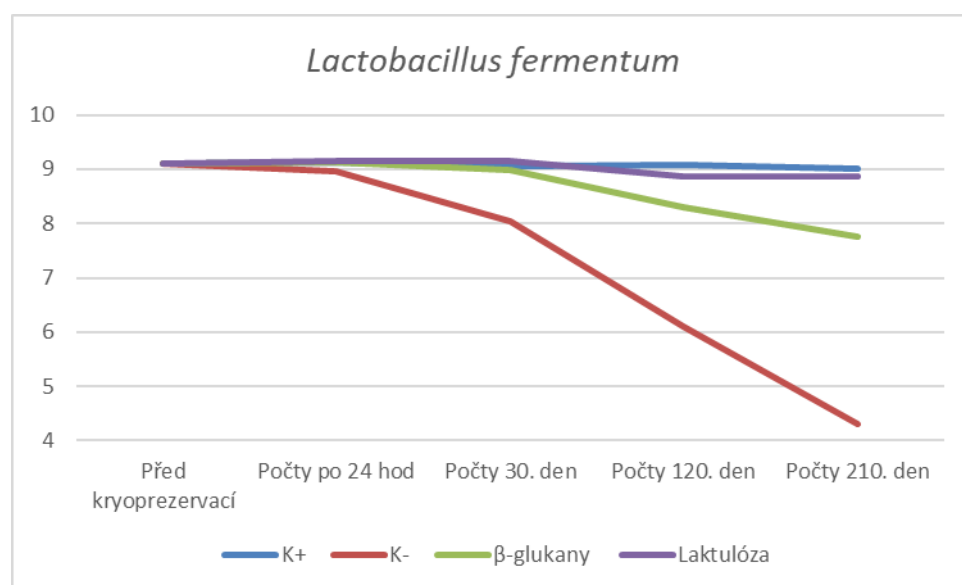
5.2.5 *Lactobacillus johnsonii*



Graf 11. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *Lactobacillus johnsonii* v časových odstupech po kryoprezervaci

Pro *Lactobacillus johnsonii* byl kryoprotektivní efekt obou testovných roztoků velmi významný. Nejvyššího kryoprotektivního efektu dosáhl opět roztok s laktulózou. β -glukanový roztok měl až do 120. dne trvání pokusu téměř shodné výsledky počtu přeživších bakterií jako laktulózový roztok, od 120. dne však jeho účinnost začala až do konce trvání pokusu mírně klesat. Počty přeživších bakterií u vzorku bez kryoprotektiv (K-) klesají již po 1. dni od zahájení pokusu.

5.2.6 *Lactobacillus fermentum*



Graf 12. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *Lactobacillus johnsonii* v časových odstupech po kryoprezervaci

Podobně jako u *Lactobacillus rhamnosus* je pro *Lactobacillus fermentum* nejúčinnějším testovaným kryoprotektivem roztok s laktulózou, jehož účinnost je srovnatelná s účinností glycerolového roztoku (K+). U roztoku s β -glukany byl také zjištěn příznivý kryoprotektivní potenciál. Negativní kontrola ztrácí na počtu přeživších bakteriálních buněk již od samotného zahájení pokusu.

5.3 Počty vitálních buněk u lyofilizovaných kultur laktobacilů a bifidobakterií

Výsledné počty v určitých časových intervalech za použití shodných roztoků s možným lyoprotektivním účinkem jako v případě kultur zmrazených jsou zobrazeny níže (**Tabulka 5**).

Tabulka 5. Počty vitálních buněk (\pm SO – směrodatná odchylka) u lyofilizovaných kultur laktobacilů a bifidobakterií v určitých časových intervalech

Lyoprotektivum	Počty (\log_{10} KTJ / ml) před lyofilizací	Počty ihned po lyofilizaci 0.den	Počty 20.den	Počty 40.den	Počty 60.den
K -	8,56 \pm 0,34	5,99 \pm 0,09	< 1	< 1	< 1
B- glukany + Lecitin		7,49 \pm 0,41	4,88 \pm 0,28	4,07 \pm 0,13	< 1
Laktulóza + Lecitin		7,67 \pm 0,12	< 1	< 1	< 1
K -	8,99 \pm 0,06	7,03 \pm 0,33	< 1	< 1	< 1
B- glukany + Lecitin		8,29 \pm 0,47	4,74 \pm 0,07	< 1	< 1
Laktulóza + Lecitin		7,18 \pm 0,13	2,48 \pm 0,36	< 1	< 1
K -	6,04 \pm 0,21	< 1	< 1	< 1	< 1
B- glukany + Lecitin		5,51 \pm 0,05	3,1 \pm 0,32	< 1	< 1
Laktulóza + Lecitin		5,51 \pm 0,25	3,44 \pm 0,16	< 1	< 1
K -	9,21 \pm 0,25	8,81 \pm 0,04	< 1	< 1	< 1
B- glukany + Lecitin		9,21 \pm 0,15	8,3 \pm 0,3	7,24 \pm 0,28	5,72 \pm 0,2
Laktulóza + Lecitin		9,22 \pm 0,09	7,5 \pm 0,12	6,62 \pm 0,04	< 1
K -	9,39 \pm 0,12	6,82 \pm 0,43	1,32 \pm 0,37	< 1	< 1
B- glukany + Lecitin		9,05 \pm 0,02	8,74 \pm 0,14	7,44 \pm 0,35	< 1
Laktulóza + Lecitin		9,03 \pm 0,22	5,35 \pm 0,33	< 1	< 1
K -	9,11 \pm 0,15	7,05 \pm 0,04	< 1	< 1	< 1
B- glukany + Lecitin		8,74 \pm 0,07	8,11	5,54	< 1
Laktulóza + Lecitin		8,99 \pm 0,16	7,71	1,93	< 1

Lyoprotektivum	Počty (\log_{10} KTJ / ml) před lyofilizací	Počty ihned po lyofilizaci 0.den	Počty 20.den	Počty 40.den	Počty 60.den
K -	8,72 \pm 0,26	8,71 \pm 0,06	1,69 \pm 0,41	< 1	< 1
B- glukany + Lecitin		8,75 \pm 0,09	7,6 \pm 0,22	7,64 \pm 0,24	2,68 \pm 0,36
Laktulóza + Lecitin		8,73 \pm 0,16	7,36 \pm 0,06	< 1	< 1
K -	7,87 \pm 0,34	7,66 \pm 0,28	6,62 \pm 0,48	< 1	< 1
B- glukany + Lecitin		7,86 \pm 0,16	6,66 \pm 0,24	< 1	< 1
Laktulóza + Lecitin		7,96 \pm 0,1	6,64 \pm 0,07	5,68 \pm 0,26	< 1
K -	9,12 \pm 0,27	6,92 \pm 0,05	< 1	< 1	< 1
B- glukany + Lecitin		8,67 \pm 0,12	5,83 \pm 0,21	< 1	< 1
Laktulóza + Lecitin		8,68 \pm 0,08	< 1	< 1	< 1
K -	9,41 \pm 0,12	8,51 \pm 0,28	< 1	< 1	< 1
B- glukany + Lecitin		9,03 \pm 0,02	7,77 \pm 0,11	2,78 \pm 0,53	< 1
Laktulóza + Lecitin		9,31 \pm 0,06	4,12 \pm 0,07	< 1	< 1
K -	9,34 \pm 0,07	9,36 \pm 0,17	< 1	< 1	< 1
B- glukany + Lecitin		9,42 \pm 0,12	8,85 \pm 0,08	2,22 \pm 0,45	< 1
Laktulóza + Lecitin		9,34 \pm 0,09	5,09 \pm 0,24	< 1	< 1
K -	8,04 \pm 0,18	7,83 \pm 0,03	< 1	< 1	< 1
B- glukany + Lecitin		7,81 \pm 0,07	3,08 \pm 0,22	< 1	< 1
Laktulóza + Lecitin		8,03 \pm 0,07	6,06 \pm 0,05	< 1	< 1

Vzhledem k tomu, že docházelo během krátkého časového úseku ke značnému úbytku vitálních buněk jak u lyofilizovaných kultur laktobacilů, tak i u lyofilizovaných kultur bifidobakterií, byly výsledky shrnuty do jedné tabulky (**Tabulka 5**). Bylo zjištěno, že β -glukanový roztok měl nejvyšší lyoprotektivní potenciál, protože u vzorků *Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* s přidavkem β -glukanového roztoku byly zjištěny vyšší počty vitálních buněk i na konci pokusu neboli 60. den. U všech ostatních vzorků byly na konci pokusu zjištěny hodnoty počtu vitálních buněk nižší než $1 \log_{10}$ KTJ / ml. V následujících odstavcích budou reflektovány výsledky nejprve všech testovaných druhů laktobacilů a poté všech testovaných druhů bifidobakterií.

Okamžitě po lyofilizaci měl roztok s laktulózou pro vzorek kultury *Lactobacillus gasseri* lyoprotektivní efekt srovnatelný s β -glukanovým roztokem. U vzorku, který byl určený jako negativní kontrola, byl zaznamenán pokles přeživších buněk ihned po lyofilizaci. U vzorku s roztokem laktulózy a u vzorku bez lyoprotektiv (K-) nebyly napočítány téměř žádné vitální buňky již od 20. dne pokusu. Pro *Lactobacillus gasseri* měl nejvyšší lyoprotektivní efekt roztok s β -glukany, neboť bylo 40. den zjištěno, že počet vitálních buněk klesl oproti původní rekonstituované kultuře na polovinu. Na konci pokusu nebyly zjištěny téměř žádné přeživší buňky ve všech vzorcích. V případě *Lactobacillus reuteri* nebyl zaznamenán významný lyoprotektivní efekt testovaných protektivních látek. Oproti negativní kontrole byly 20. den pokusu při použití β -glukanového roztoku zjištěny přeživší buňky, o něco méně poté u roztoku s laktulózou. Od 40. dne pokusu nebyly detekovány téměř žádné vitální buňky ve všech vzorcích až do konce trvání pokusu. Vzorek *Lactobacillus acidophilus* bez protektivních látek neměl žádné přeživší buňky již 0. den pokusu. Částečný lyoprotektivní efekt byl zaznamenán u obou testovaných lyoprotektiv, kdy až do 20. dne pokusu, byly u vzorků s β -glukany a laktulózou napočítány přeživší buňky. Vzorky *Lactobacillus rhamnosus* měly významnou přežitelnost buněk. Okamžitě po lyofilizaci poklesly přeživší buňky u vzorku bez lyoprotektiv a 20. den u něho nebyly zjištěny téměř žádné vitální buňky. Oproti tomu nebyl u vzorku s laktulózou a s β -glukany zjištěn žádný pokles buněk po provedené lyofilizaci. 20. a 40. den pokusu byl zaznamenán mírný pokles počtu vitálních buněk. 60. den pokusu již nebyly zjištěny téměř žádné buňky u vzorku s laktulózou. Roztok s β -glukany měl však pro kulturu s *Lactobacillus rhamnosus* stále velmi příznivý lyoprotektivní efekt i na konci pokusu. Pro *Lactobacillus johnsonii* byl okamžitě po lyofilizaci zaznamenán pokles vitálních buněk u negativní kontroly a velmi mírný pokles vitálních buněk u vzorku s testovanými lyoprotektivy. 20. den pokusu byl zaznamenán významný lyoprotektivní efekt obou testovaných roztoků, u vzorku bez lyoprotektiv nebyly napočítány téměř žádné přeživší buňky. 40. den byl jako jediný stále účinný roztok s β -glukany. 60. den nebyly zjištěny počty vitálních buněk u žádného ze vzorků vyšších než $1 \log_{10}$ KTJ / ml. U *Lactobacillus fermentum* byl až do 40. dne trvání pokusu prokázán lyoprotektivní efekt obou testovaných lyoprotektiv, přičemž dle výsledků byl více účinný roztok s β -glukany. Ve vzorku označeném jako negativní kontrola nebyly téměř žádné přeživší buňky od 20. dne trvání pokusu. 60. den nepřesáhly počty vitálních buněk u všech vzorků hodnotu vyšší než $1 \log_{10}$ KTJ / ml.

Vzorky *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* měly podobně jako *Lactobacillus rhamnosus* významnou přežitelnost buněk. Ihned po lyofilizaci (0. den) se počty vitálních buněk téměř nezměnily u všech vzorků. 20. den byl u vzorku bez lyoprotektiv zaznamenán prudký pokles přeživších buněk, který pokračoval až do 40. dne, odkdy už ve vzorku nebyly téměř žádné vitální buňky. Oproti tomu měly oba testované roztoky 20. den příznivý vliv na přežitelnost kultury. Od 40. dne nebyly u vzorku s laktulózou detekovány téměř žádné vitální buňky, ale u vzorku s β -glukany trval příznivý lyoprotektivní efekt až do konce pokusu, tedy až do 60. dne. Počty přeživších buněk *Bifidobacterium adolescentis* udržovaly mírný pokles až do 20. dne pokusu u všech 3. vzorků včetně negativní kontroly. 40. den pokusu nepřesáhly počty vitálních buněk u negativní kontroly a vzorku s β -glukanovým roztokem hodnotu vyšší než $1 \log_{10}$ KTJ / ml. Laktulózový roztok měl pro *Bifidobacterium adolescentis* významný lyoprotektivní efekt až do 40. dne pokusu. U *Bifidobacterium breve* nebyl zaznamenán příznivý vliv lyoprotektiv. U vzorku s β -glukanovým roztokem bylo 20. den napočítáno přibližně poloviční množství vitálních buněk oproti původní kultuře, nicméně od 40. dne se vzorky s lyoprotektivy v počtech přeživších buněk nelišily od negativní kontroly a jejich počty nepřesáhly hodnotu $1 \log_{10}$ KTJ / ml. Podobně jako i u předchozí kultury s *Bifidobacterium breve* nebyl pro bakterie *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* zaznamenán významný lyoprotektivní efekt testovaných protektivních látek. Pro oba bakteriální kmeny byl u vzorků s β -glukanovým roztokem vyšší počet přeživších buněk než $1 \log_{10}$ KTJ / ml až do 40. dne a u vzorků s laktulózovým roztokem do 20. dne. Na konci pokusu byly výsledky vzorků ošetřených lyoprotektivy shodné s negativní kontrolou, tzn. počet vitálních buněk byl menší než $1 \log_{10}$ KTJ / ml. Ani u *Bifidobacterium bifidum* neprokázaly testované látky svůj lyoprotektivní potenciál. Oba testované roztoky měly až do 20. dne pokusu vyšší počet vitálních buněk oproti negativní kontrole, nicméně od 40. dne pokusu i u vzorků s lyoprotektivy klesla hodnota přeživších buněk pod $1 \log_{10}$ KTJ / ml.

6 Diskuze

Prostřednictvím konzervačních technik je možné uchovávat bakteriální kultury v čase. Moderní metody konzervace využívají také přídatné protektivní látky, pomocí kterých jsou snižovány ztráty vitálních buněk. Konzervace buněk pomocí zmrazení nebo lyofilizace je velmi účinná napříč různými bakteriálními druhy (Perry 1995). Kryokonzervace spočívá ve zmrazení bakteriálních kultur, čímž se voda obsažená v těchto buňkách stává nevyužitelnou. Metabolismus buňky se tak zpomalí nebo úplně zastaví. Takto dehydratované buňky je nutné skladovat při nízkých teplotách. Při lyofilizaci v přístroji zvaném lyofilizátor dochází také k dehydrataci buněk, kdy po jejich zmrazení následuje proces sublimace ledu ve vakuu (Macfadyen et al. 1900). Vzhledem k tomu, že obě tyto metody konzervace mají široké uplatnění v průmyslu, potravinářství, biotechnologiích, zdravotnictví, vědeckém výzkumu, vzdělávání atd., jsou zkoumány nové protektivní látky, které by se mohly podílet na minimalizaci ztrát vitálních bakteriálních buněk. Kryo(lyo)protektiva snižují riziko, že budou jednotlivé bakteriální buňky poškozeny. V průběhu procesu zmrazování kryo(lyo)protektiva redukuje množství krystalků ledu, které mohou buňky nenávratně poškodit a zničit. Vedle toho chrání také před prudkými změnami osmotického tlaku, které mohou zapříčinit úplnou dehydrataci buněk. Kryo(lyo)protektiva mají i další možnosti využití, mezi které patří například jejich schopnost měnit sekundární strukturu proteinů, inaktivace proteinů a enzymů apod. (Sollohub a Cal 2010b).

Na vitalitě buněk rekonstituovaných kultur bakterií se podílí mnoho faktorů. Z toho vychází i aktuálně dostupné studie, ve kterých jsou zkoumány účinky kryo(lyo)protektiv. Zpravidla se nejedná pouze o jedinečný účinek zkoumaného kryo(lyo)protektiva, které by vykazovalo jednoznačné protektivní účinky. Nicméně jsou objevovány nové potenciální kryo(lyo)protektivní látky, jejichž účinky jsou různě vysoké. V diplomové práci byl pro pozitivní kontrolu při zkoumání kryo(lyo)protektiv použit glycerol, protože je pro své kryo(lyo)protektivní účinky běžně používán například právě při kryokonzervaci (Felthram et al. 1978; Reddy et al. 2009; Kanmani et al. 2011). V některých studiích je účinek nové testované látky s kryo(lyo)protektivním potenciálem u daného bakteriálního kmene oproti glycerolu vyšší. Jedná se například o studii zabývající se kryoprotektivou pro *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Panoff et al. 2000), ve které je signifikantně vyšší kryo(lyo)protektivní účinek způsoben dimethylsulfoxidem, který nyní patří mezi další již využívaná kryo(lyo)protektiva. V této diplomové práci se tento fenomén vyskytl u *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* a *Bifidobacterium bifidum*. Neboli dokonce pro osm bakteriálních kmenů z dvanácti testovaných byla některá nová kryo(lyo)protektiva účinnější než běžně používaný glycerol. V rámci polysacharidů jsou pro svůj kryo(lyo)protektivní potenciál a prebiotický účinek používány různé typy fruktooligosacharidů (Rajam a Anandharamakrishnan 2015; Savedboworn et al. 2018), galaktooligosacharidů (Splechtna et al. 2006; Playne a Crittenden 2009; Tymczyszyn et al. 2011, 2012) a β – glukany (Da Silva Guedes et al. 2019).

Pro testování kryo(lyo)protektivního účinku zkoumaných látek byly zvoleny bakteriální kmeny, u nichž byl prokázán probiotický efekt a které jsou používány pro výrobu probiotických a synbiotických preparátů. Jednalo se o šest druhů bifidobakterií a šest druhů laktobacilů. Jednotlivé kmeny pochází z interní sbírky mikroorganismů LAM ÚŽFG AV ČR, v. v. i. Výjimkou je kmen *Bifidobacterium bifidum* MG4, který nebyl součástí sbírky. Byl izolován ze stolice kojence (pětiměsíční chlapec) prostřednictvím modifikovaného TPY (Rada a Petr 2000). Důvodem zahrnutí tohoto kmene do výzkumu bylo, aby byl do práce zahrnut i nesbírkový kmen kvůli potvrzení či vyvrácení hypotéz, že ochrana bakteriálních buněk při kryokonzervaci a lyofilizaci prostřednictvím kryo(lyo)protektiv bude zahrnovat i jiné než sbírkové kmeny. Potenciální ochranný účinek testovaných kryo(lyo)protektiv byl zkoumán jejich sloučením s jednotlivými bakteriálními kmeny, u nichž byl zjištěn kultivačně počet buněk v 1 ml narostlé kultury (počáteční hodnota před procesy zmrazování a lyofilizace). Testované sacharidové látky byly laktulóza a β – glukany spolu s lecithinem a kvasničným extraktem. Sloučením bakterií s probiotickým potenciálem a sacharidovými látkami, které mají prebiotický účinek, je očekáván synergismus, při němž je zesílen léčebný účinek těchto složek. Prebiotika zvyšují vitalitu probiotických bakterií a usnadňují jejich kolonizaci v gastrointestinálním traktu člověka (Gibson a Roberfroid 1995; Saarela et al. 2000; Rada 2010). U obou testovaných kryo(lyo)protektiv, laktulózy i β – glukánů, byl prokázán prebiotický účinek (Tuohy et al. 2002; Rosburg et al. 2010; De Souza Oliveira et al. 2011; Carlson et al. 2017; Da Silva Guedes et al. 2019). Nicméně působení laktulózy a β – glukánů nebylo v zásadě vůbec podrobně zkoumáno v kombinaci s lecithinem a kvasničným extraktem v případě jejich možného kryo- a lyoprotektivního efektu, jako je tomu v této diplomové práci. β – glukany jsou pro lidské zdraví prospěšné i z dalších důvodů (Daou a Zhang 2012). Snižují hladinu LDL cholesterolu v krvi a riziko kardiovaskulárního onemocnění (Saltzman et al. 2001; Maki et al. 2003). Působí preventivně proti rakovině a diabetes mellitus 2. typu (Di Luzio et al. 1979; Hong et al. 2004; Charles 2005). Stimulují imunitní systém a zároveň působí i jako imunomodulant (Hong et al. 2004; Yang et al. 2008). Lecithin má mnohostranné využití v potravinářském průmyslu, jeho účinky jsou však významné i pro využití v lékařství a dietetice. Lecithin má své neopomenutelné zastoupení ve fyziologických pochodech organismu. Je významným podpůrným prostředkem v psychiatrii a geriatrii. Je totiž prekurzorem syntézy acetylcholinu, a tak se používá jako podpůrný prostředek pro léčbu pacientů s demencí nebo Alzheimerovou chorobou (Koukolík a Jiráček 1998). Vzhledem k vysokému množství nenasycených mastných kyselin s vysokým podílem kyseliny linolové funguje jako antagonist LDL cholesterolu v krvi, čímž napomáhá ke správnému poměru mezi HDL a LDL cholesterolem. Také podporuje správnou činnost srdce a funkci jater (Morrison 1958; Higgins a Flicker 2000). U laktulózy je také znám prebiotický účinek (Saarela et al. 2000) a mimo něj se běžně využívá k léčbě zácpy při nesprávné funkci střev. Kvasničný extrakt vykazuje možné protektivní účinky při procesu lyofilizace (Winkelhausen et al. 2010), nicméně pro kryokonzervaci tomu žádné studie nenaznačují. Kvasničný extrakt má výživovou hodnotu pro lidský organismus. Je zdrojem proteinů, esenciálních mastných kyselin, vitamínů skupiny B. Do vitamínů skupiny B patří i kyselina listová, jejíž dostatečný příjem je důležitý pro správný vývoj plodu v těhotenství a vitamín B12, který je zapotřebí uměle suplementovat například v případě alternativního stravování (vegetariánství, veganství). Kvasničný extrakt je navíc

možné obohatit o vitamín B12 uměle, jako je tomu například u některých druhů běžně prodávaného lahůdkového droždí.

Výsledky, kterých bylo v této diplomové práci dosaženo, vypovídají o potenciálním kryo- a lyoprotektivním účinku zkoumaných látek (β -glukany + lecithin; laktulóza + lecithin) u jednotlivých sbírkových kmenů *Lactobacillus gasseri* (DSM 20243^T (typový)), *Lactobacillus reuteri* (DSM 20016^T), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356^T), *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 9595), *Lactobacillus johnsonii* (DSM 10533^T), *Lactobacillus fermentum* (ATCC 14931^T), *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (ATCC 17930), *Bifidobacterium adolescentis* (DSM 20083^T), *Bifidobacterium breve* (ATCC 15700^T), *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* (ATCC 15707^T), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 Ch. Hansen a jednoho nesbírkového kmene *Bifidobacterium bifidum* MG4. Posuzování účinku testovaných látek probíhalo na základě zjištění počtu životaschopných buněk v kultuře jednotlivých kmenů v časových intervalech. Nejprve byly zjištěny počty vitálních buněk před zahájením pokusu. Pro kryokonzervaci byly poté zjišťovány počty buněk po 24 hodinách, 30. den, 120. den a 210. den pokusu, přičemž byl vytvořen kontrolní vzorek, který byl uskladněný při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 210. den proběhlo zjištění životaschopných buněk těchto kultur. Pro lyofilizaci byly zjišťovány počty životaschopných buněk ihned po lyofilizaci, poté 20. den, 40. den a 60. den pokusu.

Co se týče výsledků působení protektivních látek při kryokonzervaci bifidobakterií, tak pozitivní výsledky vykazovala obě testovaná kryo(lyo)protektiva. U *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* se neobjevily náhlé změny počtu vitálních buněk v průběhu celého pokusu. Obě testované látky v kombinaci s lecithinem vykazovaly výsledky ekvivalentní pozitivní kontrole. Ve studii (Rosburg et al. 2010) nevykazoval roztok s β – glukany žádné kryoprotektivní vlastnosti během skladování při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, v případě této diplomové práce byly vzorky skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a u vzorku s betaglukanovým roztokem byly zaznamenány vyšší počty přeživších bakteriálních buněk. Na tomto faktu se mohla podílet i kombinace kryoprotektiv s lecithinem. U *Bifidobacterium adolescentis* vykazoval vzorek v kombinaci s β – glukany a lecithinem nejvyšší počet životaschopných buněk oproti všem ostatním vzorkům *Bifidobacterium adolescentis*. Ren et al. (2018) demonstrovali použití betaglukanů jako vhodného prebiotika, které prospívá lidské střevní mikrobiotě právě na příkladu *B. adolescentis*. Naše výsledky prokázaly i kryoprotektivní vlastnosti betaglukanů pro *B. adolescentis*. Výsledky vzorků *Bifidobacterium breve* byly rozdílné. Počty životaschopných bakterií u negativní kontroly klesaly prudce k hodnotě 0. Nejvyšší účinnost vykazoval glycerol (pozitivní kontrola). Oproti negativní kontrole byl patrný kryoprotektivní potenciál testovaných roztoků a počty vitálních buněk v roztoku s β – glukany byly vyšší oproti vzorku s laktulózou. Ve studii (Rosburg et al. 2010) však nebyl prokázán kryoprotektivní vliv β – glukanů pro *B. breve* podobně jako u *B. longum* subsp. *infantis*. Kultura *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* vykazovala stejně prudký pokles vitálních buněk v negativní kontrole stejně jako předchozí kultura *B. breve*. V působení kryoprotektivních látek byly výsledky odlišné. V případě *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* měl nejvyšší kryoprotektivní potenciál roztok s laktulózou v kombinaci s lecithinem. Oproti negativní kontrole byly

zaznamenatelné i účinky roztoku s β – glukany a lecithinem. Challa (1997) uvádí, že kombinace *Bifidobacterium longum* a laktulózy působí v tlustém střevě protinádorově. Důvodem je pozměněná metabolická aktivita střevní mikrobioty způsobená suplementací *Bifidobacterium longum* a snížení hodnoty pH ve střevech působením bifidogenního účinku laktulózy. To potvrzuje i Bouhnik et al. (2004), který navazuje na Challa (1997), a zmiňuje prebiotický potenciál laktulózy pro bifidobakterie a laktobacily v lidském gastrointestinálním systému. V této diplomové práci byl navíc zaznamenán významný kryoprotektivní efekt laktulózy pro *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. Pro *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* byl podobně jako u *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* zaznamenán kryoprotektivní potenciál obou testovaných roztoků. Působení β – glukánů a laktulózy na vyšší přežitelnost buněk *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* bylo potvrzeno již dříve (Vasiljevic et al. 2007; Altieri et al. 2013), později bylo zkoumáno společné působení *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* a β – glukánů v souvislosti se snižováním hladiny LDL cholesterolu v krvi krys (Shirzad 2016) a prokázalo se, že probiotický jogurt obohacený o β – glukany může vyrovnat hladiny cholesterolu v krvi, čímž se β – glukany nepřímo podílí na snížení rizika kardiovaskulárního onemocnění. Co se týče posledního nesebírkového kmene *Bifidobacterium bifidum* MG4, byla nejvyšší přežitelnost buněk při kryokonzervaci u vzorku s laktulózou a lecithinem stejně jako u *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, což vyvrací hypotézu, že pouze sbírkové kmeny jsou chráněny vůči nízkým teplotám za přítomnosti potenciálních kryoprotektiv. U vzorku s betaglukanovým roztokem a lecithinem nebyl zaznamenán významný kryoprotektivní efekt.

U *Lactobacillus gasseri* byl zaznamenán prudký pokles vitálních buněk u vzorku s negativní kontrolou. Oproti tomu testované roztoky dosahovaly dokonce vyššího kryoprotektivního efektu než vzorek s roztokem glycerolu (pozitivní kontrola). *Lactobacillus reuteri* vykazuje nízkou přežitelnost buněk během zmrazování a následném uskladnění při nízkých teplotách (Tsen et al. 2007). Výsledky jednotlivých vzorků s *Lactobacillus reuteri* v této práci toto tvrzení potvrzují. U vzorku s kulturou bez kryoprotektiv (negativní kontrola) byl zaznamenán prudký pokles počtu vitálních buněk v čase. Účinek kryoprotektiv rovněž nebyl tak silný jako u jiných kmenů, avšak v případě laktulózy a lecithinu byl kryoprotektivní účinek významný. Použití vhodné kombinace kryoprotektivních látek by tak mohlo umožnit využití *Lactobacillus reuteri* například v potravinářském průmyslu, kde se pro svou nízkou přežitelnost buněk používá velmi málo, přestože má prostřednictvím svého probiotického potenciálu prospěšný účinek na lidské zdraví. Další vhodnou alternativou kryoprotektiva by pro *Lactobacillus reuteri* mohla být imobilizace při použití alginátu vápenatého (Tsen et al. 2007). Kryoprotektivní potenciál testovaných látek byl pro *Lactobacillus acidophilus* obdobný jako pro *Lactobacillus reuteri*. Nejvyšší počet přeživších buněk byl na konci pokusu zaznamenán pro vzorek s laktulózou a lecithinem. Murga et al. (2000) uvádí, že na rezistenci vůči škodlivým efektům zmrazení se podílí také teplota, při které byly kultury *Lactobacillus acidophilus* kultivovány. Může za to rozdílné složení zastoupení lipidů v membráně bakteriálních buněk, které je ovlivněno teplotou, ve které jsou kolonie uloženy při svém narůstání. Všechny kultury bifidobakterií i laktobacilů byly v této diplomové práci kultivovány při teplotě 37 °C. Dle výsledků studie (Murga et al. 2000) by adaptace na zmrazení byla vyšší při nižší teplotě (25 °C) kultivace termofilní bakterie *Lactobacillus acidophilus*.

Pokud by taková kultura byla navíc ošetřena účinným kryoprotektivem (například námi testovanou laktulózou a lecithinem) bylo by teoreticky možné zajistit ještě vyšší přežitelnost buněk *Lactobacillus acidophilus*. U *Lactobacillus rhamnosus* byl potvrzen kryoprotektivní efekt u všech testovaných látek. Nejvíce účinný byl roztok s glycerolem (pozitivní kontrola), poté laktulóza + lecithin a β – glukany + lecithin. Efekt laktulózy na *Lactobacillus rhamnosus* má navíc již známý prebiotický potenciál (De Souza Oliveira et al. 2011). U *Lactobacillus johnsonii* byl zaznamenán vyšší účinek testovaných kryoprotektiv, než jaký byl zaznamenán u pozitivní kontroly. Nejvyššího efektu dosahoval roztok laktulózy a lecithinu. Kmen *Lactobacillus johnsonii* je vysoce odolný vůči různým stresovým podmínkám – tzn. také vůči poškození buněk následkem zmrazení. Alamprese et al. (2002) zkoumali mimo jiné i přežitelnost *Lactobacillus johnsonii* ve zmrzlinových směsích, ve kterých nedošlo i po 8 měsících skladování při mrazírenských teplotách k žádnému úbytku vitálních buněk. Prebiotický potenciál námi testovaných kryoprotektiv účinných pro *Lactobacillus johnsonii* by tak být dalším benefitem pro mražené potraviny obohacené o tuto probiotickou bakterii.

Počty vitálních buněk *Lactobacillus fermentum* klesly v rámci negativní kontroly o polovinu z původní hodnoty. Oproti tomu vzorky ošetřené kryoprotektivními látkami měly vyšší počty přeživších buněk, u laktulózy s lecithinem se jednalo téměř o shodnou hodnotu se vzorkem ošetřeným glycerolovým roztokem (pozitivní kontrola), která byla téměř totožná s počtem buněk v původní rekonstituované kultuře.

U lyofilizovaných kultur laktobacilů, tak i u lyofilizovaných kultur bifidobakterií docházelo během krátkého časového úseku ke značnému úbytku vitálních buněk. Lyofilizáty byly deponovány při teplotě 25 °C, vyšší přežitelnosti buněk bývá však dosahováno uskladněním lyofilizátů při nižších teplotách (Castro et al. 1995; Killer 2005; Smith a Berkheimer 2014). Oproti kryokonzervaci byly počty vitálních buněk u lyofilizátů stanovovány v kratších časových intervalech a bez zahrnutí pozitivní kontroly. Pro *Lactobacillus gasseri* měl účinný lyoprotektivní efekt betaglukanový roztok s lecithinem. Dalšími vhodnými lyoprotektivy pro *L. gasseri*, která byla testována s pozitivním efektem, jsou odtučněné mléko, laktóza a sacharóza ve vodném roztoku / v odtučněném mléce (Otero et al. 2007; Juárez Tomás et al. 2009). Pro *Lactobacillus reuteri* a *Lactobacillus acidophilus* jsme nezaznamenali významný lyoprotektivní efekt námi testovaných látek. U těchto kmenů je účinnou ochranou při lyofilizaci například přidání trehalózy nebo metoda enkapsulace (zapouzdření) do alginátových, xanthanových, gellanových (polysacharidových) částic (Conrad et al. 2000; Capela et al. 2006; De Prisco et al. 2015). Kmen *Lactobacillus rhamnosus* měl ze všech námi testovaných laktobacilů nejvyšší přežitelnost buněk. Ošetření betaglukanovým roztokem s lecithinem mělo největší lyoprotektivní účinek, ovšem u roztoku laktulózy s lecithinem se jednalo také o významnou lyoprotektivní aktivitu, což bylo potvrzeno i ve studii Kordowska-Wiater et al. (2011). U *Lactobacillus johnsonii* a *Lactobacillus fermentum* byl potvrzen lyoprotektivní efekt betaglukanového roztoku s lecithinem. Podobná metodika nebyla v rámci lyofilizace pro tyto kmeny testována, často je pro ně využívána metoda enkapsulace alginátovými částicemi (Martin et al. 2013). Pro *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* byla nejúčinnější ochrana prostřednictvím betaglukanového roztoku

s lecithinem. Ze všech bifidobakteriálních kmenů byl pro tento kmen zaznamenán nejvyšší lyoprotektivní účinek. Testováním lyoprotektivního charakteru látek pro *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* bylo zjištěno, že je pro tuto bakterii vhodným lyoprotektivem také odtučněné mléko v kombinaci s prebiotiky (Shamekhi Fatemeh 2011). U *Bifidobacterium adolescentis* byl zaznamenán lyoprotektivní potenciál roztoku s laktulózou a lecithinem. *Bifidobacterium adolescentis* a další námi testované kmeny *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium bifidum* MG4, pro které neprojeví námi testované látky svůj lyoprotektivní charakter, bývají hodně diskutovány ve spojitosti s enkapsulací buněk za účelem ochrany buněk při lyofilizaci (López-Rubio et al. 2012; Shamekhi et al. 2012; Khan et al. 2013)

Výsledky této diplomové práce by mohly vést k vývoji nových probiotik a synbiotik ve zmrazeném stavu, která jsme pojmenovali jako tzv. „zmrazená nutribiotika“. Jedná se o „specifickou formu probiotik a synbiotik s aditivním nutričním (výživovým) efektem“. Zmrazená nutribiotika mají výživovou hodnotu v podobě lecithinu a kvasničného extraktu („nutri-“) a rovněž si zachovávají po dlouhou dobu expirace vysoký počet vitálních buněk probiotických bakterií („-bios“) s jejich všemi pozitivními efekty. Výživová hodnota těchto látek by mohla pomoci předcházet deficitu vitamínu B12 u lidí, kteří se stravují alternativně a tento vitamín musí svému tělu dodávat v tabletách. Konkrétním produktem, který by mohl být navržen na základě těchto výsledků, je zmrzlina. Tato zmrzlina by byla inovativní v tom, že by obsahovala probiotika či synbiotika, čímž by poskytovala benefity jako bakterie s probiotickým potenciálem v potravinových doplncích. Dále by se mohlo jednat o další lahůdkářské produkty, jakými jsou například mražené dezerty obsahující krém, náplně v mraženém pečivu, nanuky atd.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce byl průzkum potenciálního kryo(lyo)protektivního účinku určitých, ve vodě rozpustných disacharidů (laktulózy) a polysacharidů (betaglukanů) s víceméně prokázanou prebiotickou aktivitou na vybraných kmenech bifidobakterií a laktobacilů. Hypotézou bylo, že neprozkoumané disacharidy a polysacharidy mají lyo- či kryoprotektivní účinek při konzervaci bifidobakterií a laktobacilů metodou lyofilizace a kryoprezervace. Kryo(lyo)protektivní účinek byl testován na 6 kmenech bifidobakterií a 6 kmenech laktobacilů prostřednictvím zjišťování počtu vitálních buněk v různých časových intervalech v průběhu 7 měsíců v případě kryokonzervace a 2 měsíců v případě lyofilizace.

Pomocí výsledků této práce byla odhalena nová využití konkrétních látek nejen pro potřeby dlouhodobého uchovávání těchto významných skupin bakterií, ale také využití těchto látek při navržení nových typů synbiotických preparátů. Hypotéza byla potvrzena pouze částečně, protože kryo(lyo)protektivní potenciál nebyl prokázán u všech testovaných kmenů. Nicméně u *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* a BB-12 byl v případě kryokonzervace prokázán významný kryoprotektivní efekt obou navržených roztoků. Samotný β -glukanový roztok působil kryoprotektivně u *B. adolescentis*, *Lactobacillus gasseri* a *Lactobacillus johnsonii* a roztok obsahující laktulózu měl kryoprotektivní potenciál u *B. longum* subsp. *longum*, *B. bifidum* MG4 a všech testovaných laktobacilů (*Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus fermentum*). V případě lyofilizace měl kryo(lyo)protektivní potenciál β -glukanový roztok především u *Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*.

Otestování, pro jaké typové kmeny bifidobakterií a laktobacilů mají testované látky kryo(lyo)protektivní charakter, nás vedlo k návrhu „zmrazených nutribiotik“. Zjistili jsme, jaké bifidobakterie a jaké laktobacily mají potenciál pro použití do složení inovativních mražených produktů, kterým je například probiotická/synbiotická zmrzlina s aditivním nutričním efektem. Produkt by poskytoval zdravotní benefity probiotik/synbiotik, jakými jsou například příznivý vliv na ustanovení rovnováhy mikrobioty ve střevech člověka a na stravitelnost laktózy, obrana před patogeny, rozvojem infekce a alergií různého původu, obrana před vznikem rakoviny tlustého střeva atd. Nutričním efektem je výživový potenciál látek, které jsme testovali. Jedná se o zdroj proteinů, esenciálních mastných kyselin, vitamínů skupiny B. Mezi vitamíny skupiny B řadíme i kyselinu listovou neboli vitamín B9 (podpora správného vývoje plodu v těhotenství) a vitamín B12, jehož příjem je problémový v případě alternativních výživových směrů (vegetariánství, veganství) a o který můžeme kvasničný extrakt navíc obohatit uměle, jako je tomu například u některých druhů běžně prodáváného lahůdkového droždí.

8 Seznam použité literatury

- Abbad Andaloussi, S., Talbaoui, H., Marczak, R., Bonaly, R.** 1995. Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(6), 995–1000. DOI: 10.1007/bf00166915
- Abd El-Gawad, I. A., El-Sayed, E. M., Hafez, S. A., El-Zeini, H. M., Saleh, F. A.** 2004. Inhibitory effect of yoghurt and soya yoghurt containing bifidobacteria on the proliferation of Ehrlich ascites tumour cells in vitro and in vivo in a mouse tumour model. *British Journal of Nutrition*, 92(01), 81. DOI: 10.1079/bjn20041183
- Ahmed Z., Vohra M. S., Khan M. N., Ahmed A., Khan T. A.** 2019. Antimicrobial role of *Lactobacillus* species as potential probiotics against enteropathogenic bacteria in chickens. *J Infect Dev Ctries* 13:130-136. DOI: 10.3855/jidc.10542
- Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C., Savani, L.** 2002. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 201–208. DOI: 10.1016/s0958-6946(01)00159-5
- Altieri, C., Bevilacqua, A., Perricone, M., Sinigaglia, M.** 2013. Using a simplex centroid to study the effects of pH, temperature and lactulose on the viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in a model system. *Anaerobe*, 23, 23–26. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.07.008
- Arakawa, T., Timasheff, S. N.** 1982. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*, 21(25), 6536–6544. DOI: 10.1021/bi00268a033
- Ashwood-Smith, M. J.** 1967. Radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 141(1 Biological Ac), 45–62. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1967.tb34865.x
- Atassi, F., Servin, A. L.** 2010. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathog. *FEMS Microbiology Letters*, 304(1), 29–38. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01887.x
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Zhang, H.** 2010. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695–701. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.10.010
- Barrett, E., Deshpandey, A. K., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Murphy, B., O’Sullivan, L., Stanton, C.** 2015. The neonatal gut harbours distinct bifidobacterial strains. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 100(5), F405–F410. DOI: 10.1136/archdischild-2014-306110
- Bercik, P., Park, A. J., Sinclair, D., Khoshdel, A., Lu, J., Huang, X., Verdu, E. F.** 2011. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterology & Motility*, 23(12), 1132–1139. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2011.01796.x

- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V.** 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of microbiology*. 2000, Vol 50, Num 2, pp 117-131; ref: 5 p.
- Bouhnik, Y., Attar, A., Joly, F. et al.** 2004. Lactulose ingestion increases faecal bifidobacterial counts: A randomised double-blind study in healthy humans. *Eur J Clin Nutr* 58, 462–466. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601829
- Bunesova, V., Killer, J., Javurkova, B., Vlkova, E., Tejnecky, V., Musilova, S., & Rada, V.** 2017. Diversity of the subspecies *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Anaerobe*, 44, 40–47. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2017.01.006
- Cal, K., Sollohub, K.** 2010a. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(2), 575–586. DOI: 10.1002/jps.21886
- Capela, P., Hay, T. K. C., Shah, N. P.** 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39(2), 203–211. DOI: 10.1016/j.foodres.2005.07.007
- Carlson, J., Erickson, J., Hess, J., Gould, T., Slavin, J.** 2017. Prebiotic Dietary Fiber and Gut Health: Comparing the in Vitro Fermentations of Beta-Glucan, Inulin and Xylooligosaccharide. *Nutrients*, 9(12), 1361. DOI: 10.3390/nu9121361
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P.** 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14(10), 835–847. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.02.001
- Castro, H. P., Teixeira, P. M., Kirby, R.** 1995. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(1-2), 172–176. DOI: 10.1007/bf00164498
- Coccorullo, P., Strisciuglio, C., Martinelli, M., Miele, E., Greco, L., Staiano, A.** 2010. *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938) in Infants with Functional Chronic Constipation: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *The Journal of Pediatrics*, 157(4), 598–602. DOI: 10.1016/j.jpeds.2010.04.066
- Conrad, P. B., Miller, D. P., Cielenski, P. R., De Pablo, J. J.** 2000. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, 41(1), 17–24. DOI: 10.1006/cryo.2000.2260
- Culpepper, T., Christman, M. C., Nieves, C., Specht, G. J., Rowe, C. C., Spaiser, S. J., Langkamp-Henken, B.** 2016. *Bifidobacterium bifidum* R0071 decreases stress-associated diarrhoea-related symptoms and self-reported stress: a secondary analysis of a randomised trial. *Beneficial Microbes*, 7(3), 327–336. DOI: 10.3920/bm2015.0156
- Da Silva Guedes, J., Pimentel, T. C., Diniz-Silva, H. T., Tayse da Cruz Almeida, E., Tavares, J. F., Leite de Souza, E., Magnani, M.** 2019. Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. *LWT*, 108496. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108496

- Daly, C., Fitzgerald, G. F., Davis, R.** 1996. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 99–110. DOI: 10.1007/bf00395928
- Daou, C., Zhang, H.** 2012. Oat Beta-Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(4), 355–365. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2012.00189.x
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D.** 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(6), 438–442. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x
- De Prisco, A., Maresca, D., Ongeng, D., Mauriello, G.** 2015. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2), 452–462. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.12.011
- Dertli, E., Colquhoun, I. J., Gunning, A. P., Bongaerts, R. J., Le Gall, G., Bonev, B. B., Narbad, A.** 2013. Structure and Biosynthesis of Two Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *Journal of Biological Chemistry*, 288(44), 31938–31951. DOI: 10.1074/jbc.m113.507418
- De Souza Oliveira, R. P., Rodrigues Florence, A. C., Perego, P., De Oliveira, M. N., Converti, A.** 2011. Use of lactulose as prebiotic and its influence on the growth, acidification profile and viable counts of different probiotics in fermented skim milk. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 22–27. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.011
- Di Luzio N. R., Williams D. L., McNamee R. B., Edwards B. F., Kitahama A.** 1979. Comparative tumor inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucana. *Int J Cancer* 24:773–9.
- Donohue D. C., Salminen S.** 1996. Safety of probiotic bacteria, 5, 25-28. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106872
- Elliott, G. D., Wang, S., Fuller, B. J.** 2017. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 76, 74–91. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.004
- Eskesen, D., Jespersen, L., Michelsen, B., Whorwell, P. J., Müller-Lissner, S., Morberg, C. M.** 2015. Effect of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, on defecation frequency in healthy subjects with low defecation frequency and abdominal discomfort: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. *British Journal of Nutrition*, 114(10), 1638–1646. DOI: 10.1017/s0007114515003347
- Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., Madsen, K. L.** 2008. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(5), G1025–G1034. DOI: 10.1152/ajpgi.90227.2008
- Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A., Meryman, H. T.** 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21(4), 407–426. DOI: 10.1016/0011-2240(84)90079-8

Fang, Z., Li, L., Zhao, J., Zhang, H., Lee, Y., Lu, W., Chen, W. 2019. Bifidobacteria adolescentis regulated immune responses and gut microbial composition to alleviate DNFB-induced atopic dermatitis in mice. *European Journal of Nutrition*. DOI: 10.1007/s00394-019-02145-8

Felis, G. E., Dellaglio, F., Scientifico, D., Scienze, F. 2005. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria Further Reading, 44–61.

Feltham, R. K. A., Power, A. K., Pell, P. A., Sneath, P. H. A. 1978. A Simple Method for Storage of Bacteria at - 76°C. *Journal of Applied Bacteriology*, 44(2), 313–316. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1978.tb00804.x

Ferrer, M., Méndez-García, C., Rojo, D., Barbas, C., Moya, A. 2017. Antibiotic use and microbiome function. *Biochemical Pharmacology*, 134, 114–126. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.09.007

Fujiwara S., Hashiba H., Hirota T., Forstner J.F. 1997. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic Escherichia coli to gangliosylceramide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 506- 512

Fujiwara, S., Seto, Y., Kimura, A., Hashiba, H. 2001. Establishment of orally-administered Lactobacillus gasseri SBT2055SR in the gastrointestinal tract of humans and its influence on intestinal microflora and metabolism. *Journal of Applied Microbiology*, 90(3), 343–352. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01251.x

Garcia-Gutierrez, E., O'Connor, P. M., Colquhoun, I. J., Vior, N. M., Rodríguez, J. M., Mayer, M. J., Narbad, A. 2020. Production of multiple bacteriocins, including the novel bacteriocin gassericin M, by Lactobacillus gasseri LM19, a strain isolated from human milk. *Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI: 10.1007/s00253-020-10493-3

Gardiner, G. E., Heinemann, C., Baroja, M. L., Bruce, A. W., Beuerman, D., Madrenas, J., Reid, G. 2002. Oral administration of the probiotic combination Lactobacillus rhamnosus GR-1 and L. fermentum RC-14 for human intestinal applications. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 191–196. DOI: 10.1016/s0958-6946(01)00138-8

Gardiner, G. E., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., Stanton, C. 2000. Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic Lactobacillus paracasei and L. salivarius Strains during Heat Treatment and Spray Drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2605–2612. DOI: 10.1128/aem.66.6.2605-2612.2000

Gibson G. R., Roberfroid M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401-1412. DOI: 10.1093/jn/125.6.1401

Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., Gill, H. S. 2001. In vitro adherence properties of Lactobacillus rhamnosus DR20 and Bifidobacterium lactis DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic Escherichia coli. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3), 207–216. DOI: 10.1016/s0168-1605(01)00440-8

Górska, S., Jachymek, W., Rybka, J., Strus, M., Heczko, P. B., Gamian, A. 2010. Structural and immunochemical studies of neutral exopolysaccharide produced by Lactobacillus johnsonii 142. *Carbohydrate Research*, 345(1), 108–114. DOI: 10.1016/j.carres.2009.09.015

- Gottschalk, G.** 1986. Bacterial Fermentations. Springer Series in Microbiology, 208–282.
- Granato, D., Bergonzelli, G. E., Pridmore, R. D., Marvin, L., Rouvet, M., Corthesy-Theulaz, I. E.** 2004. Cell Surface-Associated Elongation Factor Tu Mediates the Attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to Human Intestinal Cells and Mucins. *Infection and Immunity*, 72(4), 2160–2169. DOI: 10.1128/iai.72.4.2160-2169.2004
- Haenel, H., Bendig, J.** 1975. Intestinal flora in health and disease. *Progr. Food Nutr. Sci.* 1, 21–64.
- Hamilton-Miller, J. M. T.** 2004. Probiotics and prebiotics in the elderly. *Postgraduate Medical Journal*, 80(946), 447–451. DOI: 10.1136/pgmj.2003.015339
- Hammes, W.P., Vogel, R.F.** 1995. The genus *Lactobacillus*. In: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol. 2, pp. 19–54. Edited by B.J.B. Wood and W.H. Holzapel. Blackie Academic & Professional (UK).
- Han, R., Ebert, C. E., Zhao, Z., Li, L., Zhang, H., Tian, R.** 2005. Novel Characteristics of *Bifidobacterium bifidum* in Solid State Fermentation System. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6-7), 1245–1248. DOI: 10.1007/s11274-005-1805-z
- He, F., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Hashimoto, H., Benno, Y., Salminen, S.** 2001. Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 30(1), 43–47. DOI: 10.1111/j.1574-695x.2001.tb01548.x
- Heckly, R. J.** 1978. Preservation of micro-organisms. *Adv. Appl. Microb.* 3,1-76. DOI: 10.1016/s0065-2164(08)70635-x
- Hill, D., Ross, R. P., Arendt, E., Stanton, C.** 2017. Microbiology of Yogurt and Bio-Yogurts Containing Probiotics and Prebiotics. *Yogurt in Health and Disease Prevention*, 69–85. DOI: 10.1016/b978-0-12-805134-4.00004-3
- Higgins, J. P., Flicker, L.** 2000. Lecithin for dementia and cognitive impairment. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. DOI: 10.1002/14651858.cd001015
- Hong F., Yan J., Baran J. T., Allendorf D. J., Hansen R. D., Ostroff G. R., Xing P. X., Cheung N. K., Ross GD.** 2004. Mechanism by which orally administered β -(1, 3)-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J Immunol* 173(2):797–806.
- Howard, D.H.** 1956. The preservation of bacteria by freezing in glycerol broth. *J. Bacteriol.* 71, 625.
- Horvath, A., Dziechciarz, P., Szajewska, H.** 2011. Meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for abdominal pain-related functional gastrointestinal disorders in childhood. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 33(12), 1302–1310. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04665.x
- Hosono, A., Wardojo, R., Otani, H.** 1990. Inhibitory Effects of Lactic Acid Bacteria from Fermented Milk on the Mutagenicities of Volatile Nitrosamines. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(7), 1639–1643. DOI: 10.1080/00021369.1990.10870210

- Hsieh, C.-Y., Osaka, T., Moriyama, E., Date, Y., Kikuchi, J., Tsuneda, S.** 2015. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiological Reports*, 3(3), e12327. DOI: 10.14814/phy2.12327
- Challa, A.** 1997. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 18(3), 517–521. DOI: 10.1093/carcin/18.3.517
- Charles S. B.** 2005. Dietary fiber, glycemic response, and diabetes. *Mol Nutr Food Res* 49:560–70.
- Inturri, R., Trovato, L., Volti, G. L., Oliveri, S., Blandino, G.** 2019. In vitro inhibitory activity of *Bifidobacterium longum* BB536 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 alone or in combination against bacterial and *Candida* reference strains and clinical isolates. *Heliyon*, 5(11), e02891. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02891
- Janzen, D. H., May, N.** 2007. When is it Coevolution?. *34(3)*, 611–612. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1980.tb04849.x
- Juárez Tomás, M. S., Bru, E., Martos, G., Nader-Macias, M. E.** 2009. Stability of freeze-dried vaginal *Lactobacillus* strains in the presence of different lyoprotectors. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(5), 544–552. DOI: 10.1139/w08-159
- Kadooka, Y., Ogawa, A., Takano, Y., Moriya, T., Sakai, F., Nishihira, J., Sato, M.** 2019. Research and Application of Health-Promoting Functions of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 through the Gastrointestinal Tract. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, 72(2), 79–83. DOI: 10.4327/jnsfs.72.79
- Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., Arul, V.** 2011. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. *Biochemical Engineering Journal*, 58-59, 140–147. DOI: 10.1016/j.bej.2011.09.006
- Khan, N. H., Korber, D. R., Low, N. H., Nickerson, M. T.** 2013. Development of extrusion-based legume protein isolate–alginate capsules for the protection and delivery of the acid sensitive probiotic, *Bifidobacterium adolescentis*. *Food Research International*, 54(1), 730–737. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.08.017
- Khedkar J. N., Sannabhadtti S. S., Dave J. M.** 1994. Inhibitory effect of *Bifidobacterium adolescentis* (Hb1) on faecal coliform counts. *J. Dairying, Foods and Home Science*, 13 (3-4): 187-191.
- Killer, J.** 2005. Metody uchovávání čistých kultur bifidobakterií. Praha. 1-87. Diplomová práce. Doc. Ing. Vojtěch Rada, CSc.
- Killer, J., Kopečný, J., Mrazek, J., Koppová, I., Havlík, J., Benada, O., Kott, T.** 2010. *Bifidobacterium actinocoloniiforme* sp. nov. and *Bifidobacterium bohemicum* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 61(6), 1315–1321. DOI: 10.1099/ijs.0.022525-0
- Kim, M. J., Lee, D. K., Park, J. E., Park, I. H., Seo, J. G., Ha, N. J.** 2014. Antiviral activity of *Bifidobacterium adolescentis* SPM1605 against Coxsackievirus B3. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(4), 681–688. DOI: 10.1080/13102818.2014.945237

- Kitajima, H., Sumida, Y., Tanaka, R., Yuki, N., Takayama, H., Fujimura, M.** 1997. Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants: randomised controlled trial. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 76(2), F101–F107. DOI: 10.1136/fn.76.2.f101
- Kordowska-Wiater, M., Waśko, A., Polak-Berecka, M., Kubik-Komar, A., Targoński, Z.** 2011. *Spirulina* enhances the viability of *Lactobacillus rhamnosus* E/N after freeze-drying in a protective medium of sucrose and lactulose. *Letters in Applied Microbiology*, 53(1), 79–83. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2011.03068.x
- Koukolík, F., Jiráček, R.** 1998. *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha: Grada Publishing a.s. 229 s. ISBN 80-7169-615-3.
- Lightfoot, Y. L., Selle, K., Yang, T., Goh, Y. J., Sahay, B., Zadeh, M., Mohamadzadeh, M.** 2015. SIGNR3-dependent immune regulation by *Lactobacillus acidophilus* surface layer protein A in colitis. *The EMBO Journal*, 34(7), 881–895. DOI: 10.15252/embj.201490296
- Lin, R., Sun, Y., Mu, P., Zheng, T., Mu, H., Deng, F., Wen, J.** 2020. *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation modulates the gut microbiota to promote butyrate production, protecting against deoxynivalenol exposure in nude mice. *Biochemical Pharmacology*, 113868. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.113868
- Linders, L. J. M., de Jong, G. I. W., Meerdink, G., van't Riet, K.** 1997. Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*: The role of moisture distribution and water activity. *Journal of Food Engineering*, 31(2), 237–250. DOI: 10.1016/s0260-8774(96)00077-5
- López-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., Lagaron, J. M.** 2012. Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 159–167. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.12.008
- Loy A., Lehner A., Lee N., Adamczyk J., Meier H., Ernst J., Schleifer K. H., Wagner M.** 2002. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl Environ Microbiol* 68:5064-5081. DOI: 10.1128/AEM.68.10.5064-5081.2002
- Luo, M., Hu, M., Feng, X., XiaoLi, W., Dong, D., Wang, W.** 2020. Preventive effect of *Lactobacillus reuteri* on melanoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 126, 109929. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.109929
- Lynch, S. V., Pedersen, O.** 2016. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2369–2379. DOI: 10.1056/NEJMra1600266
- Macfadyen, A.** 1900. *Proc. Roy. Soc. London, Series B*, lxvi, 180.
- Macfadyen, A., Rowland, S.** 1900. *Proc. Roy. Soc. London, Series B*, lxvi, 488.
- Maki K. C., Schinnick F., Sceley M. A., Veith P. E., Quinn L. C., Hallissey P. J., Temer A., Davidson M. H.** 2003. Food products containing free tall-oil based phytosterol and oat β -glucan lower serum total and LDL-cholesterol in hypercholesterolemic adults. *J Nutri* 133(3):808–13.

- Mändar, R., Mikelsaar, M.** 1996. Transmission of Mother's Microflora to the Newborn at Birth. *Neonatology*, 69(1), 30–35. DOI: 10.1159/000244275
- Marin, M. L., Lee, J. H., Murtha, J., Ustunol, Z., Pestka, J. J.** 1997. Differential Cytokine Production in Clonal Macrophage and T-Cell Lines Cultured with Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 80(11), 2713–2720. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(97)76232-5
- Martin, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., Morales, M. E.** 2013. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 480–486. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.03.019
- Mattila-Sandholm, T., Mättö, J., Saarela, M.** 1999. Lactic acid bacteria with health claims-interference and interactions with gastrointestinal flora. *Int. Dairy J.* 9, 25–35. DOI: 10.1016/S0958-6946(99)00041-2
- Mikelsaar, M., Zilmer, M.** 2009. *Lactobacillus fermentum* ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 21(1), 1–27. DOI: 10.1080/08910600902815561
- Mille, Y., Obert, J.-P., Beney, L., Gervais, P.** 2004. New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(1), 71–76. DOI: 10.1002/bit.20211
- Misra A. K., Kuila R. K.** 1995. Antimicrobial substances from *Bifidobacterium bifidum*. *Indian J. Dairy Sci.*, 48: 612-614.
- Mitsuoka, T.** 1990. Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology*, 6(4), 263–267. DOI: 10.1007/bf01575871
- Mohamadzadeh M., Pfeiler E. A., Brown J. B., Zadeh M., Gramarossa M., Managlia E., Bere P., Sarraj B., Khan M. W., Pakanati K. C., Ansari M. J., O'Flaherty S., Barrett T., Klaenhammer T. R.** 2011. Regulation of induced colonic inflammation by *Lactobacillus acidophilus* deficient in lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 108. Suppl. 1: 4623–4630
- Molin, G., Jeppsson, B., Johansson, M.-L., Ahrné, S., Nobaek, S., Ståhl, M., Bengmark, S.** 1993. Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(3), 314–323. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb03031.x
- Morrison L. M.** 1958. Serum cholesterol reduction with lecithin. *Geriatrics* 13, 12 ± 19.
- Murga, M. L. F., Cabrera, G. M., de Valdez, G. F., Disalvo, A., Seldes, A. M.** 2000. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 342–348. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00967.x
- Neeser, J.-R., Granato, D., Rouvet, M., Servin, A., Teneberg, S., Karlsson, K.-A.** 2000. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology*, 10(11), 1193–1199. DOI: 10.1093/glycob/10.11.1193

- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E.-M.** 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 15(5), 443–452. DOI: 10.1016/s1050-4648(03)00023-8
- Nireesha, G. R., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N., Babu, M. N., Lavakumar, V.** 2013. Lyophilization / Freeze Drying - An Review, 3(4), 87–98.
- Roberfroid, M.** 2007. Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 830S–837S. DOI: 10.1093/jn/137.3.830S
- Olivares, M., Díaz-Ropero, M. P., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Fonollá, J., Navas, M., Xaus, J.** 2007. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition*, 23(3), 254–260. DOI: 10.1016/j.nut.2007.01.004
- Orrhage, K., Brismar, B., Nord, C. E.** 1994. Effect of Supplements with *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on the Intestinal Microbiota during Administration of Clindamycin. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 7(1), 17–25. DOI: 10.3109/08910609409141570
- Otero, M. C., Espeche, M. C., Nader-Macías, M. E.** 2007. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. *Process Biochemistry*, 42(10), 1406–1411. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.07.008
- Ozbas Z.Y., Aytac S.A.** 1995. Behaviour of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in yogurt made with probiotic bacteria: *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwiss.*, 50: 626-629.
- Panoff, J.-M., Thammavongs, B., Guéguen, M.** 2000. Cryoprotectants Lead to Phenotypic Adaptation to Freeze–Thaw Stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T. *Cryobiology*, 40(3), 264–269. DOI: 10.1006/cryo.2000.2240
- Perry, S. F.** 1995. Freeze-Drying and Cryopreservation of Bacteria. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, 21–30. DOI: 10.1385/0-89603-296-5:21
- Playne, M. J., Crittenden, R. G.** 2009. Galacto-oligosaccharides and Other Products Derived from Lactose. *Advanced Dairy Chemistry*, 121–201. DOI: 10.1007/978-0-387-84865-5_5
- Poirier, I., Maréchal, P.-A., Evrard, C., Gervais, P.** 1998. *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* responses to osmotic stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(6), 704–709. DOI: 10.1007/s002530051354
- Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K., Schleifer, K.-H.** 1994. Taxonomy of Lactic Acid Bacteria. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, 13–90.
- Preston, K., Krumian, R., Hattner, J., de Montigny, D., Stewart, M., Gaddam, S.** 2018. *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 improve quality-of-life and IBS symptoms: a double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Beneficial Microbes*, 1–10. DOI: 10.3920/bm2017.0105

Quigley, E. M. M. 2017. *Bifidobacterium bifidum*. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology, 131–133. DOI: 10.1016/b978-0-12-804024-9.00014-8

Rada, V. 2010. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik, 12(2).

Rada V., Petr J. 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods*. 43 (2). 127-132. DOI: 10.1016/S0167-7012(00)00205-0

Rajam, R., Anandharamakrishnan, C. 2015. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 773–780. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.09.062

Reddy, K. B. P. K., Awasthi, S. P., Madhu, A. N., Prapulla, S. G. 2009. Role of Cryoprotectants on the Viability and Functional Properties of Probiotic Lactic Acid Bacteria during Freeze Drying. *Food Biotechnology*, 23(3), 243–265. DOI: 10.1080/08905430903106811

Reid, G., Servin, A., Bruce, A. W., & Busscher, H. J. 1993. Adhesion of three *Lactobacillus* strains to human urinary and intestinal epithelial cells. *Microbios*, 75, 57–65.

Ren, Y., Xie, H., Liu, L., Jia, D., Yao, K., Chi, Y. 2018. Processing and Prebiotics Characteristics of β -Glucan Extract from Highland Barley. *Applied Sciences*, 8(9), 1481. DOI: 10.3390/app8091481

Reuter G. 1963. Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl. *Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten, Hygiene, Abteilung I, Originalarbeiten, Reihe A*, 191: 486-507.

Rizzardini, G., Eskesen, D., Calder, P. C., Capetti, A., Jespersen, L., Clerici, M. 2011. Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, BB-12® and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, L. casei 431® in an influenza vaccination model: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *British Journal of Nutrition*, 107(06), 876–884. DOI: 10.1017/s000711451100420x

Rodrigues, J. Z. de S., Passos, M. R., Silva de Macêdo Neres, N., Almeida, R. S., Pita, L. S., Santos, I. A., Yatsuda, R. 2020. Antimicrobial activity of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 against *Streptococcus mutans* UA159. *Microbial Pathogenesis*, 104063. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104063

Rosburg, V., Boylston, T., White, P. 2010. Viability of Bifidobacteria Strains in Yogurt with Added Oat Beta-Glucan and Corn Starch during Cold Storage. *Journal of Food Science*, no–no. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01620.x

Rosenbach, M., Wanat, K. A., Micheletti, R. G., Taylor, L. A. (Eds.). 2018. *Inpatient Dermatology*. DOI: 10.1007/978-3-319-18449-4

Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., Salminen, S. 2006. Exopolysaccharides Produced by Probiotic Strains Modify the Adhesion of Probiotics and Enteropathogens to Human Intestinal Mucus. *Journal of Food Protection*, 69(8), 2011–2015. DOI: 10.4315/0362-028x-69.8.2011

- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T.** 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197–215. DOI: 10.1016/s0168-1656(00)00375-8
- Sakamoto, I., Igarashi, M., Kimura, K., Takagi, A., Miwa, T., Koga, Y.** 2001. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 709–710. DOI: 10.1093/jac/47.5.709
- Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E.** 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 347–358. DOI: 10.1007/bf00395941
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron, M.-C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R. Rowland, I.** 1998a. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80(S1), S147. DOI: 10.1079/bjn19980108
- Salminen, S., Ouwehand, A.C., Isolauri, E.** 1998b. Clinical applications of probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 8, 563–572. DOI: 10.1016/S0958-6946(98)00077-6
- Saltzman E., Das S. K., Lichtenstein A. H., Dallal G. E., Corrales A., Schaefer E. J., Greenberg A., Roberts S. B.** 2001. An oat-containing hypocaloric diet reduces systolic blood pressure and improves lipid profile beyond effects of weight loss in men and women. *J Nutr* 131:1465–70.
- Santivarangkna, C., Higl, B., Foerst, P.** 2008. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiology*, 25(3), 429–441. DOI: 10.1016/j.fm.2007.12.004
- Savage, D. C.** 1977. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annual Review of Microbiology*, 31(1), 107–133. DOI: 10.1146/annurev.mi.31.100177.000543
- Savedboworn, W., Teawsomboonkit, K., Surichay, S., Riansa-ngawong, W., Rittisak, S., Charoen, R., Phattayakorn, K.** 2018. Impact of protectants on the storage stability of freeze-dried probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Food Science and Biotechnology*. DOI: 10.1007/s10068-018-0523-x
- Savino, F., Cordisco, L., Tarasco, V., Palumeri, E., Calabrese, R., Oggero, R., Matteuzzi, D.** 2010. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in Infantile Colic: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *PEDIATRICS*, 126(3), e526–e533. DOI: 10.1542/peds.2010-043
- Scardovi V., Trovatelli L.D.** 1974. *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka) comb. nov. and the “minimum” and “subtile” groups of new bifidobacteria found in sewage. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 21-28.
- Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Arigoni, F.** 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14422–14427. DOI:10.1073/pnas.212527599
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R.** 2016. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*, 164(3), 337–340. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.013

Shackell, L. F. 1909. Am. J. Physiol. xxiv, 325

Shamekhi Fatemeh. 2011. Optimization of a cryoprotective medium and survival of freeze-dried *Bifidobacterium infantis* 20088 throughout storage, rehydration and gastrointestinal tract transit for infant formula probiotic applications. African Journal of Microbiology Research, 5(21), 3373–3384. DOI: 10.5897/ajmr11.319

Shamekhi, F., Shuhaimi, M., Ariff, A., Manap, Y. A. 2012. Cell viability of microencapsulated *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* under freeze-drying, storage and gastrointestinal tract simulation conditions. Folia Microbiologica, 58(2), 91–101. DOI: 10.1007/s12223-012-0183-9

Shirzad, F. Z. 2016. Archive of SID Effect of oat β -glucan and probiotic yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in wistar rats fed on a cholesterol-enriched diet Archive of SID. (Ldl), 1678–1682.

Smith, M. T., Berkheimer, S. D. 2014. Lyophilized *Escherichia coli*-based cell-free systems for robust, high-density, long-term storage. BioTechniques, 56(4). DOI: 10.2144/000114158

Sollohub, K., Cal, K. 2010b. Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. Journal of Pharmaceutical Sciences, 99(2), 587–597. DOI: 10.1002/jps.21963

Splechtna, B., Nguyen, T., Steinböck, M., Kulbe, K. D., Lorenz, W., Haltrich, D. 2006. Production of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides from Lactose Using β -Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(14), 4999–5006. DOI: 10.1021/jf053127m

Swift, H. F. 1920. Preservation of stock cultures of bacteria by freezing and drying. Journal of Experimental Medicine, 33(1), 69–75. DOI: 10.1084/jem.33.1.69

Szajewska, H., Konarska, Z., Kołodziej, M. 2016. Probiotic Bacterial and Fungal Strains: Claims with Evidence. Digestive Diseases, 34(3), 251–259. DOI:10.1159/000443359

Taipale, T., Pienihäkkinen, K., Isolauri, E., Larsen, C., Brockmann, E., Alanen, P., Söderling, E. 2010. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. British Journal of Nutrition, 105(03), 409–416. DOI: 10.1017/s0007114510003685

Teixeira, P., Castro, H., Kirby, R. 1995. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. Journal of Applied Bacteriology, 78(4), 456–462. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb03433.x

Tissier, H. 1900. Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson, pp. 1-253, These de Paris.

Tsen, J.-H., Huang, H.-Y., Lin, Y.-P., King, V. A.-E. 2007. Freezing resistance improvement of *Lactobacillus reuteri* by using cell immobilization. Journal of Microbiological Methods, 70(3), 561–564. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.06.004

Tuohy, K. M., Ziemer, C. J., Klinder, A., Knöbel, Y., Pool-Zobel, B. L., Gibson, G. R. 2002. A Human Volunteer Study to Determine the Prebiotic Effects of Lactulose Powder on Human Colonic

Microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14(3), 165–173. DOI: 10.1080/089106002320644357

Tymczyszyn, E. E., Gerbino, E., Illanes, A., Gómez-Zavaglia, A. 2011. Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Cryobiology*, 62(2), 123–129. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2011.01.013

Tymczyszyn, E. E., Sosa, N., Gerbino, E., Hugo, A., Gómez-Zavaglia, A., Schebor, C. 2012. Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 217–221. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.008

Uusitalo, U., Liu, X., Yang, J., Aronsson, C. A., Hummel, S., Butterworth, M. 2016. Association of Early Exposure of Probiotics and Islet Autoimmunity in the TEDDY Study. *JAMA Pediatrics*, 170(1), 20. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2015.2757.

Vajro, P., Mandato, C., Licenziati, M. R., Franzese, A., Vitale, D. F., Lenta, S., Meli, R. 2011. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG in Pediatric Obesity-related Liver Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 52(6), 740–743. DOI:10.1097/mpg.0b013e31821f9b85

Vasiljevic T., Kealy T., Mishra V. K. 2007. Effects of beta-glucan addition to a Probiotic containing yogurt. *J Food Sci* 72:C405–11.

Vlková E., Rada V., Killer J. 2011. *Potravinářská mikrobiologie*. Praha: Česká zemědělská univerzita, 168 s. ISBN 978-80-213-1988-2.

Walter, J., Britton, R. A., Roos, S. 2011. Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4645–4652. DOI: 10.1073/pnas.1000099107

Winkelhausen, E., Velickova, E., Amartey, S. A., Kuzmanova, S. 2010. Ethanol Production Using Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in Lyophilized Cellulose Gel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(8), 2214–2220. DOI: 10.1007/s12010-010-8995-z

Witkin, S., Linhares, I. 2016. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 124(4), 606–611. DOI: 10.1111/1471-0528.14390

Wu, X., Xin, X., Jiang, Y., Liang, R., Yuan, P., Fang, C. 2008. Liquid-nitrogen cryopreservation of three kinds of autotrophic bioleaching bacteria. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 18(6), 1386–1391. DOI: 10.1016/s1003-6326(09)60013-3

Xiao, X., Jin, R., Li, J., Bei, Y., Wei, T. 2014. The Antitumor Effect of Suicide Gene Therapy Using *Bifidobacterium infantis*-mediated Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase/Ganciclovir in a Nude Mice Model of Renal Cell Carcinoma. *Urology*, 84(4), 982.e15–982.e20. DOI: 10.1016/j.urology.2014.05.020

Yang J. L., Jang J. H., Radhakrishnan V., Kim Y. H., Song Y. S. 2008. β -Glucan suppresses LPS-stimulated NO production through the down-regulation of iNOS expression and NF κ B transactivation in RAW 264.7 macrophages. *Food Sci Biotechnol* 17:106–13.

Yasui, H., Shida, K., Matsuzaki, T., Yokokura, T. 1999. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, 383–389. DOI: 10.1007/978-94-017-2027-4_24

Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. Chun, J. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613-1617. DOI: 10.1099/ijsem.0.001755

Yuan, F., Ni, H., Asche, C. V., Kim, M., Walayat, S., Ren, J. 2017. Efficacy of *Bifidobacterium infantis* 35624 in patients with irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Current Medical Research and Opinion*, 33(7), 1191-1197. DOI: 10.1080/03007995.2017.1292230

Zacarias, M. F., Reinheimer, J., Forzani, L., Grangette, C., Vinderola, G. 2014. Mortality and translocation assay to study the protective capacity of *Bifidobacterium lactis* INL1 against *Salmonella Typhimurium* infection in mice. *Beneficial Microbes*, 5(4), 427–436. DOI: 10.3920/bm2013.0086

Zdroje obrázků:

Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., Gill, H. S. 2001. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3), 207–216. DOI:10.1016/s0168-1605(01)00440-8

Nireesha, G. R., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N., Babu, M. N., Lavakumar, V. 2013. Lyophilization / Freeze Drying - An Review, 3(4), 87–98.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197–215. DOI: 10.1016/s0168-1656(00)00375-8

Wang, L., Fan, D., Chen, W., Terentjev, E. M. 2015. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Scientific Reports*, 5(1). DOI: 10.1038/srep15159