

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Optimalizace kultivačních podmínek pro stanovení  
kvasinek *Saccharomyces boulardii***

**Diplomová práce**

**Lenka Šetková  
Výživa a potraviny**

**doc. Ing. Šárka Musilová, Ph.D.**

**© 2024 ČZU v Praze**



## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Optimalizace kultivačních podmínek pro stanovení kvasinek *Saccharomyces boulardii*" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21. 04. 2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala paní doc. Ing. Šárce Musilové, Ph.D. za milou spolupráci a za odborné vedení diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala všem z Výzkumného ústavu mlékárenského s.r.o. také za milou spolupráci a za umožnění realizace výzkumné části práce v laboratoři VÚM. Jmenovitě tedy děkuji paní MVDr. Gabriele Krausové, Ph.D., paní Ing. Ivaně Hyršlové, paní Ing. Jitce Peroutkové, paní Ing. Šárce Havlíkové a Janě Lindauerové. Dále děkuji za odbornou konzultaci ohledně zpracování statistické části práce paní Ing. Vladimíře Sedlákové Ph.D. a panu Ing. Petrovi Sedlákovu Ph.D. Naposledy taky děkuji mé rodině za podporu při studiu.

# Optimalizace kultivačních podmínek pro stanovení kvasinek *Saccharomyces boulardii*

## Souhrn

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* je z velké části geneticky podobná *S. cerevisiae*, ovšem vykazuje odlišné morfologické, fyziologické a metabolické vlastnosti. Kvasinka byla objevena v roce 1923 francouzským mikrobiologem H. Boulardem a již v roce 1947 byla patentována jako probiotikum. Ovšem není schopná tvořit askospory a také nedokáže využívat galaktózu jako zdroj uhlíku. *S. boulardii* se využívá jako probiotikum, protože je odolná vůči extrémním hodnotám pH, které se vyskytují v žaludku a ve dvanáctníku. Kvasinka také velmi dobře roste při teplotě 37 °C, což je teplota blízká lidskému tělu.

*S. boulardii* podporuje správnou funkci střev. Používá se primárně při střevních infekcích, jelikož je schopna inhibovat růst některých patogenních mikroorganismů. Potlačuje rozvoj *Candidy albicans*, *Salmonelly Typhimurum* nebo *Yersinie enterocolitiky*. Pokud je *S. boulardii* podávána společně s léky, tak zvyšuje úspěšnost léčby žaludeční infekce *Helicobacter pylori*.

Cíl práce je testovat různá kultivační média, kombinaci teplot a dalších vnějších faktorů k optimalizaci kultivačních podmínek pro daný mikroorganismus.

Hypotézou bylo, že kultivační podmínky budou ovlivňovat růst testovaného mikroorganismu. Hypotéza byla potvrzena. Při kultivaci *S. boulardii* při různých kultivačních podmínkách bylo stanoveno, že nejvhodnější je aerobní kultivace na médiu Wilkins-Chalgren s mupirocinem. Výsledek kultivace tohoto média byl  $9,81 \pm 0,39$  log KTJ/g. Pokud se hodnotilo pouze kultivační médium, tak nebyl žádný statisticky významný rozdíl mezi médiem Wilkins-Chalgren s mupirocinem, extraktem z ječného sladu a oxytetracyklinem. Při kultivaci zkumavek se vzorky při teplotách 30 a 37 °C bylo zjištěno, že kvasinky vykazovaly větší nárůst při teplotě 30 °C. Přístup kyslíku při růstu měl také vliv na počet kolonií tvořících jednotek. Každé kultivační médium vykazovalo větší nárůst při aerobní kultivaci.

**Klíčová slova:** *Saccharomyces boulardii*; selektivní médium; probiotikum; kultivace; doplněk stravy

# Optimization of cultivation conditions for the determination of the yeast *Saccharomyces boulardii*

## Summary

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* is from the most part genetically similar to *S. cerevisiae*. Though *S. boulardii* has different morphological, physiological and metabolic characteristics. The yeast was found in 1923 by French microbiologist H. Boulard and was patented as a probiotic in 1947. *S. boulardii* is not able to form ascospores and is also not able to metabolise galactose as carbon source. *S. boulardii* is used as a probiotic because it can survive extreme pH conditions in stomach and duodenum. This yeast grows well in 37 °C which is temperature similar to human body. *S. boulardii* support intestinal function. The yeast is primarily used for gastrointestinal infections because it can inhibit some of pathogenic microorganisms. It can inhibit growth of *Candida albicans*, *Salmonella* Typhimurum or *Yersinia enterocolitica*. If the probiotic is used together with medication than it can increase the effectivity of *Helicobacter pylori* treatment.

The aim of this thesis is to test different cultivation media, combination of temperature and other outside factors for optimalization of cultivation conditions for given microorganism.

The hypothesis was that cultivation conditions will influence growth of tested microorganism. The hypothesis has been confirmed. Because of cultivation of *S. boulardii* in different cultivation conditions it was determined that the best medium is Wilkins-Chalgren with mupirocin. The result for cultivation of this media was  $9,81 \pm 0,39$  log CFU/g. In case there was only the medium as factor, then there was no statistical difference in media Wilkins-Chalgren + mupirocin, malt extract and oxytetracycline medium. Through cultivation of test tubes in temperatures 30 and 37 °C it was determined that the yeast grew better in 30 °C. The oxygen also had effect on number of colonies forming units. Every medium had higher CFU if the cultivation was aerobic.

**Keywords:** *Saccharomyces boulardii*; selective medium; probiotic; cultivation; food supplement

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce .....	2
3	Literární rešerše .....	3
3.1	Probiotické mikroorganismy .....	3
3.2	Rod <i>Saccharomyces</i> .....	3
3.3	Druh <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	4
3.4	Rozdíl mezi <i>S. cerevisiae</i> a <i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> .....	5
3.5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> .....	6
3.6	Metabolismus <i>S. cerevisiae</i> a <i>S. boulardii</i> .....	7
3.7	Genom <i>S. boulardii</i> .....	8
3.8	Metody stanovení <i>S. boulardii</i> .....	9
3.8.1	Selektivní kultivační média .....	9
3.8.2	Vitální barvení preparátu a stanovení pod mikroskopem .....	10
3.8.3	Biochemické testy .....	10
3.8.4	ELISA imunologický test .....	11
3.8.5	Sekvenování DNA .....	12
3.9	Kultivační podmínky <i>S. boulardii</i> .....	13
3.9.1	Vliv pH .....	13
3.9.2	Vliv teploty .....	13
3.9.3	Rozdílné zdroje uhlíku .....	15
3.9.4	Rozdílné zdroje dusíku .....	15
3.9.5	Vliv obsahu NaCl .....	16
3.9.6	Vliv obsahu etanolu .....	16
3.9.7	Vliv obsahu žlučových solí .....	17
3.9.8	Vliv přítomnosti antibiotických látek .....	17
3.10	Mechanismus účinku v lidském těle .....	18
3.10.1	Deaktivace toxinů .....	19
3.10.2	Adheze <i>S. boulardii</i> .....	20
3.10.3	Vliv na imunitu hostitele .....	20
3.10.4	Vliv <i>S. boulardii</i> na enzymatické procesy .....	21
3.10.5	Interakce <i>S. boulardii</i> s mikroorganismy .....	22
3.10.6	Vliv na trávení střeva .....	23
3.11	<i>S. boulardii</i> v klinické medicíně .....	23
3.12	Probiotické přípravky <i>S. boulardii</i> .....	24
3.13	Negativní účinky .....	24
3.14	Budoucí využití <i>S. boulardii</i> .....	25
4	Metodika .....	27

<b>4.1</b>	<b>Použité vzorky .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2</b>	<b>Příprava preparátu .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>Kultivační média .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>Kultivační podmínky .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5</b>	<b>Počítání kolonií .....</b>	<b>29</b>
<b>4.6</b>	<b>Metoda MALDI-TOF MS .....</b>	<b>29</b>
<b>4.7</b>	<b>Vytvoření izolátů .....</b>	<b>30</b>
<b>4.8</b>	<b>Konfirmační metoda .....</b>	<b>31</b>
<b>4.9</b>	<b>Zpracování dat .....</b>	<b>31</b>
4.9.1	Zpracování dat z Petriho misek .....	31
4.9.2	Zpracování dat z kultivace zkumavek .....	32
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Výsledky plotnové kultivační metody .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2</b>	<b>Statistické zpracování dat z kultivace na plotnách .....</b>	<b>34</b>
<b>5.3</b>	<b>Výsledky confirmace na MALDI-TOF MS.....</b>	<b>37</b>
<b>5.4</b>	<b>Výsledky kultivace ve zkumavkách a statistické zpracování.....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>41</b>
<b>6.1</b>	<b>Kultivace na Petriho miskách .....</b>	<b>41</b>
<b>6.2</b>	<b>Kultivace ve zkumavkách.....</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>46</b>



# 1 Úvod

*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* uváděná také jako *Saccharomyces boulardii* je probiotická kvasinka nejčastěji vyžívající se při výskytu infekčních onemocnění trávicího systému. Je volně prodávána v lékárnách, ale je možné ji také sehnat na online internetových obchodních portálech nebo také webových stránkách prodávajících výživové doplňky. Pro stanovování počtu kvasinek v prodávaném výrobku není v ČSN stanovena norma zahrnující metodu kultivace této kvasinky. Metoda a podmínky kultivace zahrnují složení kultivačního média, teplotu, délku kultivace a zda se vzorek nechává růst bez přístupu nebo s přístupem kyslíku. *S. cerevisiae* var. *boulardii* se od *S. cerevisiae* odlišuje některými geny, ale také produkovanými metabolity. Pozitivní vliv *S. boulardii* na organismus zahrnuje zlepšení funkce střevní epiteliální bariéry, produkci antimikrobiálních látek nebo podporu imunitního systému. *S. boulardii* také s patogeny konkurují o zdroje a prostor ve střevě. Ovšem kvasinka se běžně nedokáže dlouhodobě uchytit ve střevě člověka. Přesto má mnoho benefitů. Může pomoci potlačit například bakterii *Clostridium difficile*, jež způsobuje infekční průjemové onemocnění. Ovšem *S. boulardii* se nepoužívá jenom na podporu léčby průjemových onemocnění. Tato kvasinka prokázala pozitivní vliv i při léčbě několika dalších problémů způsobených ve střevech člověka. *S. boulardii* má pozitivní účinky například při léčbě idiopatických střevních zánětů. Příčina schopnosti *S. cerevisiae* var. *boulardii* pozitivně působit na lidské tělo je umožněna také morfologií a fyziologií. Díky své zesílené buněčné stěně vykazuje vysokou odolnost při průchodu velmi kyselým prostředím žaludku. Zároveň její metabolická aktivita člověku přináší další benefity jako zvýšení obsahu nenasycených mastných kyselin s krátkým řetězcem. Dokáže také inaktivovat některé toxiny, které jsou produkovány patogenními mikroorganismy. *S. boulardii* je na rozdíl od mnoha ostatních druhů probiotik schopná dobře odolávat podmínkám lidského těla. Její odolnost a životaschopnost je výhodou při průchodu probiotika žaludkem. Ovšem i přes všechny její benefity může mít v některých případech *S. boulardii* také negativní vliv. Byly popsány případy přemnožení této kvasinky, které vedly k rozvoji fungémie.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem práce bude testovat různá kultivační média, kombinaci teplot a dalších vnějších faktorů k optimalizaci kultivačních podmínek pro daný mikroorganismus.

Hypotéza: Kultivační podmínky budou ovlivňovat růst testovaného mikroorganismu.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Probiotické mikroorganismy

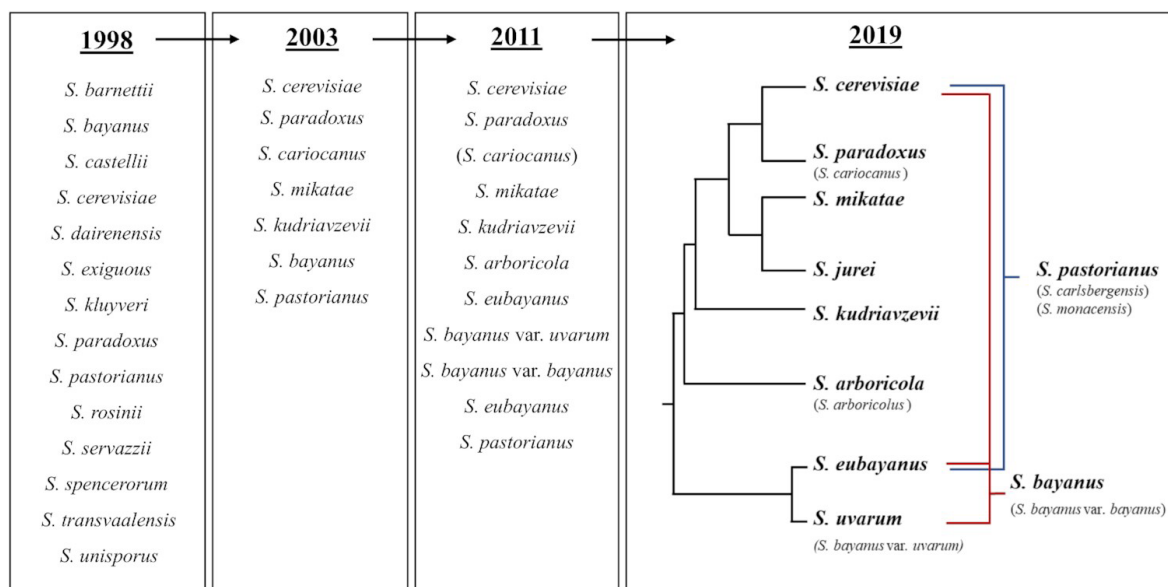
Je několik různých definic probiotik, které jsou vzájemně podobné. Původní definice zní, že probiotikum je živý mikroorganismus, jehož příjem může mít pozitivní vliv na prevenci nebo léčbu různých zdravotních problémů (Czerucka et al. 2007). Novou definici vydala v roce 2013 organizace IASPP, což je Mezinárodní organizace pro probiotika a probiotika. Dle této definice jsou probiotika živé mikroorganismy, které hostiteli přinášejí zdravotní benefity v případě, že jsou podávána v dostatečném množství (Hill et al. 2014).

Slovo probiotika pochází ze starořečtiny a původně výraz probiotika znamenaly „pro život“. Z hlediska mikroorganismů využívaných jako probiotika jsou nejvíce rozšířené rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* nebo *Pediococcus*. Mezi některé další mikroorganismy používané pro svoje probiotické účinky se řadí *Streptococcus thermophilus*, *Escherichia coli* NISSLE 1917 a pak také kvasinka *Saccharomyces boulardii*. Nezáměrná konzumace probiotických mikroorganismů probíhá již po dobu několika tisíce lety. Příjem probiotik probíhal spolu s konzumací fermentovaných potravin, a to především fermentovaných mléčných výrobků (Maftai et al. 2024).

Současně jsou výrobky se *S. boulardii* volně dostupné v lékárnách v ČR jako léčivý přípravek a je možné je zakoupit na internetu také jako doplněk stravy. Léčiva jsou v ČR regulována Státním úřadem pro kontrolu léčiv (SÚKL). Doplněk stravy patří v české legislativě do kategorie potravin a kontroluje je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI).

### 3.2 Rod *Saccharomyces*

Rod *Saccharomyces* byl v roce 1870 popsán M. Reessem a zahrnuje fermentující kvasinky (Alsammar & Delneri 2020). Předpokládá se, že rod *Saccharomyces* vznikl zhruba před 10–20 miliony lety (Hittinger 2013). Primárně obsahoval kvasinky používané v technologických procesech výroby fermentovaných potravin jako je výroba piva, vína a kynutého těsta. Vývoj a rozšíření relativně nedávné technologie sekvenování DNA způsobil přesnější stanovení vzájemné příbuznosti. Rod *Saccharomyces* tak byl taxonomicky přeskupen a upraven. Některé druhy byly sjednoceny do jednoho druhu a následně byly rozděleny do jednotlivých kmenů. Současně rod *Saccharomyces* zahrnuje osm druhů, kterými jsou *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. eubayanus* a *S. uvarum*. Taxonomické změny rodu *Saccharomyces* jsou zobrazené na obrázku č. 1 (Alsammar & Delneri 2020).



Obrázek č. 1 Vývoj taxonomie rodu *Saccharomyces*. Zdroj: Alsammar & Delneri (2020).

Momentálně se do tohoto rodu řadí kromě technologicky využívaných domestikovaných kvasinek a jejich kříženců také několik druhů divokých kvasinek a jejich divokých kmenů. Právě schopnost sexuálního rozmnožování kromě typického asexuálního pučení vedla v rámci rodu ke vzniku mnoha hybridů využívaných v průmyslu. Tyto používané kmeny jsou přesně definované a některé z nich mají dlouhou tradici využití třeba v pivovarnictví. Například hybrid *S. pastorianus* je kříženec *S. cerevisiae* se *S. eubayanus* a využívá se pro výrobu piva typu ležák. Naopak v přírodě žijící kvasinky se vyskytují nejhojněji v blízkosti stromů, na jejich kůře, listech, v okolí exsudátů nebo na také v zemině a rozkládající se organické vrstvě (Alsammar & Delneri 2020). Většina kvasinek patřících do rodu *Saccharomyces* mají rozmezí ideálních teplot pro jejich růst mezi 22 a 30 °C (Ansari et al. 2021). V trávicí soustavě člověka se z mikroorganismů patřících do hub vyskytuje kromě rodu *Saccharomyces* také *Malassezia* nebo *Candida*. Rod *Saccharomyces* je v tlustém střevě v průměru zastoupen ze všech hub nejpočetněji a to z 5-65 % (Sen & Mansell 2020).

### 3.3 Druh *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je eukaryotický mikroorganismus s širokým využitím v mnoha biotechnologických procesech. Řadí se mezi vřeckovýtrusné houby, které se nazývají také askomycety. Buňka kvasinky má 16 chromozomů, které zahrnují zhruba 6000 různých genů. *S. cerevisiae* dokáže pomocí fermentace produkovat etanol a oxid uhličitý (Parapouli et al. 2020). V roce 1996 se podařilo sekvenovat kompletní genom a kvasinka *S. cerevisiae* se stala prvním kompletně osekvenovaným eukaryotickým organismem. Kompletní popsání genetické informace vedlo ke studiu funkce jednotlivých genů a následně jejich transkripcí. *S. cerevisiae* se využívá jako modelový organismus, jelikož je u něj přítomná většina mechanismů typických pro eukaryota a také je dostupné velké množství informací a studií. Dosud se jedná o nejvíce zmapovaný a prostudovaný eukaryotický organismus, což bylo podpořeno zejména rozsáhlým využíváním této kvasinky (Nielsen & Jewett 2008).

Tradiční využití *S. cerevisiae* je v potravinářství, kdy se již tisíce let používá pro výrobu alkoholu a také pro přípravu kynutého těsta na výrobu chleba. Momentálně má *S. cerevisiae* využití ve velkém množství nových technologiích. Rozšíření ve způsobech využití *S. cerevisiae* bylo umožněno schopností člověka rekombinovat geny, což znamená vnášet geny jiných organismů do genomu buňky mikroorganismu. Kvasinka se využívá v medicíně pro produkci specifických proteinů, jakými je třeba inzulin nebo pro produkci látek využívaných pro výrobu vakcín. Využití s potenciálem pro další rozšíření je produkce biopaliv jako je bioetanol. *S. cerevisiae* se uplatňuje také pro produkci některých chemických látek například kyseliny mléčné,  $\beta$ -karotenu nebo artemisininu, který se používá na výrobu léku proti malárii. Tradiční použití *S. cerevisiae* je pro produkci pálenek, piva a vína. (Nielsen & Jewett 2008).

Výhody využívání *S. cerevisiae* v moderních biotechnologických procesech spočívají v její odolnosti vůči vlivům vnějšího prostředí, rychlému rozmnožování, schopnosti jednoduché sporulace, nízké patogenitě a malé velikosti genomu. *S. cerevisiae* je považována za mikroorganismus, který je poměrně efektivně schopen přeměňovat energetický substrát na výsledný produkt. Na trhu je ovšem vysoký tlak pro objev nových druhů kmenů, které by měly lepší technologické vlastnosti jako nižší energetické nároky, vyšší odolnost vůči stresovým podmínkám, efektivnější metabolismus nebo příjemnější senzorycké vlastnosti pro výrobu alkoholických nápojů. Kromě jednotlivých kmenů *S. cerevisiae* se dále na trhu využívá množství hybridů, které vznikly křížením s dalšími druhy rodu *Saccharomyces*. Specifičtí kříženci a hybridy se využívají pro produkci vína a odlišní naopak v pivovarnickém průmyslu (Onyema et al. 2023).

Pro studium a analýzy v laboratořích se využívá pouze úzké množství kmenů kvasinky *S. cerevisiae*, neboť vlivem působení laboratorních podmínek dochází k selekčnímu tlaku. Běžně na světě se v přirozeném prostředí vyskytuje velká variabilita kvasinek s odlišnými vlastnostmi. Podmínky v laboratoři vytvářejí prostředí, které vede k prosazení pouze některých kvasinek z celé genetické variability druhu (Jouhten et al. 2016).

Buňka kvasinky *S. cerevisiae* produkuje do jejího okolí různé druhy metabolitů nebo peptidů. Tyto látky mohou ovlivňovat ostatní mikroorganismy. Etanol je jednou z produkovaných toxických látek pro část mikroorganismů. Buňka jeho produkcí zajišťuje sníženou konkurenceschopnost ostatních mikroorganismů. *S. cerevisiae* pro stejný účel produkuje dále také aromatické alkoholy nebo některé enzymy. Druhým způsobem snížení konkurence v prostředí je přímý kontakt kvasinky s mikroorganismem, kdy je kvasinka takto schopna zničit některé další druhy. Na druhou stranu je *S. cerevisiae* schopna s některými druhy navázat také benefiční vztah. Rozvoji takového vztahu je podmíněn vhodnými podmínkami prostředí. Existuje i interakce kvasinek druhu *S. cerevisiae* mezi sebou, kdy ke komunikaci využívají některé metabolity (Jouhten et al. 2016).

### **3.4 Rozdíl mezi *S. cerevisiae* a *S. cerevisiae* var. *boulardii***

*S. cerevisiae* var. *boulardii* byla dříve řazena jako samostatný druh odlišný od *S. cerevisiae*. Následné analýzy genomu zjistily mezi oběma kvasinkami blízkou příbuznost. Její správné taxonomické označení je *S. cerevisiae* var. *boulardii*, ale je uváděna také jako *S. boulardii*. Pod jménem *S. boulardii* je také prodávána jako probiotikum. *S. boulardii* je

jednou z variant řazenou do druhu *S. cerevisiae*. Sdílí 99 % společné sekvence genomu a také podobný karyotyp. Obě kvasinky mají ovšem některé rozdílné fyziologické funkce, některé odlišné produkované metabolity a jinak snášejí vlivy okolního prostředí. *S. cerevisiae* dokáže produkovat spory, dále využívat galaktózu jako zdroj uhlíku, přecházet do haploidní formy nebo produkovat enzym  $\alpha$ -glukosidázu štěpící disacharidy a škrob na glukózu. Žádné z těchto výše uvedených charakteristik neplatí pro *S. boulardii* (Pais et al. 2020).

Buněčná stěna obou kvasinek má odlišnou tloušťku, ale má naopak velmi podobnou strukturu. Stěna obou kvasinek se skládá z několika vrstev. Buněčná stěna *S. boulardii* je tlustší než buněčná stěna *S. cerevisiae*. Stěna *S. boulardii* má v průměru šířku větší než 175 nm oproti stěně *S. cerevisiae*, jejíž průměrná šířka je mezi 150–175 nm. Šířka buněčné stěny se liší v několika od sebe odlišných vrstvách. Není tedy silnější pouze jedna vrstva. Rozdíl obou stěn je v tloušťce vnitřní části složené z chitinu, dále ve vrstvě  $\beta$ -glukanu a úplně poslední ve vrstvě mannoproteinů, které jsou v kontaktu s okolím (Hudson et al. 2016).

Při analýze karyotypu obou kvasinek pomocí gelové elektroforézy bylo zjištěno, že *S. boulardii* je možné odlišit pomocí fragmentů s délkou 200 a 740 bp. Lišil se také počet vzniklých pruhů při analýze pomocí gelové elektroforézy. *S. cerevisiae* vytváří od 12 do 14 pruhů na rozdíl od *S. boulardii*, pro kterou je typických pruhů 13 (Fietto et al. 2004).

*S. cerevisiae* a *S. boulardii* se odlišují také optimální teplotou pro růst. *S. boulardii* nejlépe roste při 37 °C v porovnání se *S. cerevisiae*, jejíž optimum je 30 °C. *S. boulardii* je také obecně odolnější k vyšším teplotám (Pais et al. 2020). Zásadním rozdílem mezi oběma kvasinkami je jejich odlišný vliv na lidský organismus. Na rozdíl od *S. boulardii* nebyly u *S. cerevisiae* prokázány jakékoliv významné probiotické účinky (Pais et al. 2021).

### 3.5 *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*

*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* je eukaryotní kvasinka řazená do rodu *Saccharomyces*. Vyznačuje se svými probiotickými účinky (Shu et al. 2020). Podle Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) dohlížejícího na trh v USA je *Saccharomyces boulardii* řazena do GRAS, což je databáze látek nebo mikroorganismů všeobecně považovaných za bezpečné (Yang et al. 2019).

Kvasinka *S. boulardii* byla poprvé objevena roku 1923, kdy ji izoloval francouzský mikrobiolog Henri Boulard ze dvou druhů ovoce. Kvasinka byla izolována z liči a z mangostany lahodné (Hossain et al. 2020). V roce 1947 si firma Biokodex Laboratories nechala patentovat tuto variantu jako probiotikum (Pais et al. 2021). Současně je *S. boulardii* jediná široce rozšířená probiotická kvasinka. Mezi nejvíce užívané probiotické mikroorganismy patří ovšem některé druhy bakterií patřící do rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Khatri et al. 2013).

Buňka *S. boulardii* má elipsoidní tvar a také má typickou ztluštělou buněčnou stěnou. Ansari et al. (2023) uvádí, že její rozměry jsou na šířku 2-3  $\mu\text{m}$  a na délku mezi 2,5 až 10,5  $\mu\text{m}$ . Buněčná stěna je robustní a její hmotnost je kolem 30 % suché váhy buňky. Rozmnožování *S. boulardii* a její neschopnost tvorby askospor viz výše. Kompletní sekvence genomu *S. boulardii* byla popsána až v roce 2014 (Batista et al. 2014). Celkem se skládá z 6000 genů DNA a dalších 275 tRNA. Z hlediska nutriční hodnoty je kvasinka dobrým zdrojem

některých minerálů a vitaminů. Obsahuje thiamin (B<sub>1</sub>), riboflavin (B<sub>2</sub>), kobalamin (B<sub>12</sub>) a biotin (B<sub>7</sub>). Kvasinka je také schopna snížit obsah kyseliny fytové, která se řadí mezi antinutriční látky. Na druhou stranu je *S. boulardii* schopna relativně jednoduše akumulovat některé těžké kovy, mezi kterými jsou olovo, kadmium, arzen nebo rtuť (Abid et al. 2022).

### 3.6 Metabolismus *S. cerevisiae* a *S. boulardii*

Kvasinky jsou chemotrofní mikroorganismy, tedy získávají energii ve formě ATP rozkladem vazeb organických chemických sloučenin. Metabolismus kvasinek rodu *Saccharomyces* může probíhat jak za aerobních, tak anaerobních podmínek. Za přístupu kyslíku u nich probíhá takzvaný respirační a bez přístupu kyslíku probíhá naopak fermentační metabolismus. Glukóza je hlavním zdrojem pro získání uhlíku v obou typech metabolismu. Některé druhy jsou schopné využívat také alternativní zdroje uhlíku. Při přístupu kyslíku se glukóza štěpí při glykolýze za vzniku pyruvátu a ATP a redukci kofaktoru NADH. Dále je v mitochondriích pyruvát zbaven karboxylové skupiny za vzniku Acetyl-CoA, který následně vstupuje do Krebsova cyklu. Následkem metabolických pochodů Krebsova cyklu je vznik CO<sub>2</sub> a redukované koenzymy NADH a FADH<sub>2</sub>. Aerobní metabolismus je energeticky výhodnější. Při anaerobních podmínkách dochází k fermentaci cukrů. Úplně na začátku zpravidla dochází během glykolýzy k rozkladu glukózy na pyruvát. V první fázi se od pyruvátu oddělí karboxylová skupina za vzniku acetaldehydu. Ten je v dalším kroku redukován na ethanol. Při těchto dvou krocích je NADH redukován na NAD. Kromě fermentace glukózy může docházet také k fermentaci cukrů s pěti uhlíky v pentózovém cyklu. Prvním krokem pentózového cyklu je přeměna z glukózy-6-fosfátu na 6-fosfoglukonolakton a získání NADPH. Odštěpením karboxylové skupiny se získá ribulóza-5-fosfát a NADPH. Pentózový cyklus má význam z důvodu získání NADPH a vzniku cukrů s pěti uhlíky. Získané pentózy jsou v buňce nezbytné pro syntézu nukleové kyseliny a nukleotidů (Feldmann 2012).

Metabolismus *S. cerevisiae* se řadí mezi fakultativně aerobní fermentující kvasinky a konkrétní metabolický děj závisí na podmínkách okolního prostředí. Závisí jak na koncentraci kyslíku v prostředí buňky, ale také na typu vstupních energetických substrátů. Glykolýza probíhá v podmínkách bez přístupu kyslíku v rychlejším tempu, jelikož anaerobní metabolismus generuje nižší energetický zisk. *S. cerevisiae* má různé adaptační metabolické mechanismy na rozdílné vnější podmínky. Jedním z popsáných jevů metabolismu *S. cerevisiae* je takzvaný Pasteurův efekt, při kterém kvasinky za anaerobních podmínek spotřebovávají daleko více glukózy v porovnání se spotřebou glukózy při růstu za aerobních podmínek. Pasteurův jev je nutný pro zachování dostatku energie, jelikož energetická výtěžnost je nižší za anaerobních podmínek. Umožňuje tak souběžně šetření glukózy a nejvyšší možný energetický zisk. Odlišný jev je popsán naopak při dostatečné koncentraci glukózy a ostatních živin. Bez ohledu na aerobní nebo anaerobní podmínky, tak při předpokladu dostatku glukózy převažuje fermentace. Inhibice buněčné respirace v důsledku vysoké koncentrace glukózy se nazývá Crabtreeho efekt a vyskytuje se hlavně u kvasinek druhu *S. cerevisiae*. Crabtree efekt (glukózová represe, negativní Pasteurův efekt) je jev, při němž za přítomnosti glukózy (v koncentracích nad 0,3%) dochází k inhibici syntézy i aktivity respiračních enzymů, enzymů glukoneogeneze a hydrolytických enzymů umožňujících utilizaci jiných zdrojů uhlíku. Dalším

adaptačním metabolickým systémem je adaptace na nedostatek glukózy při aerobních podmínkách. V první fázi růstu má kvasinka dostatečný přístup glukózy a za aerobních podmínek ji fermentuje za vzniku ethanolu a oxidu uhličitého. V té další fázi dojde ke spotřebování většiny glukózy. Pokud glukóza již přestane být dostupná, tak se kvasinky dostanou do stresového stavu a jsou nuceny využívat alternativní zdroj energie. Tento jev je známý pod názvem diauxie. Kvasinka tedy začne oxidovat přítomný etanol. Pro přechod z jednoho substrátu na druhý dojde k potlačení funkce mnoha enzymů, které jsou součástí metabolismu primární živiny tedy glukózy (Feldmann 2012).

Na rozdíl od *S. cerevisiae* var. *boulardii* dokáže *S. cerevisiae* jako zdroj uhlíku zpracovávat také galaktózu. To se ovšem děje pouze, pokud není dostupný žádný vhodnější zdroj energie. Pokud je pro *S. cerevisiae* dostupná například glukóza tak dochází k potlačení exprese GAL genů, které vedou k syntéze enzymů galaktosidáz štěpící galaktózu. *S. cerevisiae* dokáže štěpit disacharidy maltózu pomocí enzymu maltáza za vzniku dvou molekul glukózy a dále sacharózu enzymem invertáza na produkty glukózu a fruktózu. Kromě monosacharidů dokáže *S. cerevisiae* využívat také disacharidy maltózu a sacharózu. Další uhlíkaté zdroje jako ostatní disacharidy, pentózy, mastné kyseliny, organické kyseliny nebo biopolymery jsou metabolizovány pouze některými kvasinkami. Všechny druhy kvasinek mohou tyto chemické sloučeniny využít jako zdroje uhlíku pouze pokud byly předem štěpeny jinými organismy. Část kvasinek dokáže metabolizovat také alkoholy, a to primárně ethanol případně metanol (Feldmann 2012).

*S. boulardii* produkuje různé metabolické látky. Těmi jsou na příklad organické kyseliny, aminokyseliny, sacharidy, nukleosidy a různé bioaktivní molekuly. Tyto metabolické látky jsou produkovány v odlišném poměru. Nejvíce zastoupené byly organické kyseliny a jejich deriváty, které činily 60 %. Druhou nejčastější složkou byly heterocyklické sloučeniny s obsahem 20,3 %. Dále následovaly fenolové sloučeniny a nukleosidy. Některé bioaktivní látky se známou funkcí jsou 2-(prop-2-enoylamino)octová kyselina ovlivňující chuť potravin, N-methylalanin potlačující množení virů a růstu rakovinných buněk, para-aminobenzoová kyselina s antibakteriálními účinky, vitamin niacin (B<sub>3</sub>), 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina podporující ochranu neuronů a používaná také jako léčivo při epilepsii nebo tyrozol podporující antioxidační aktivitu a pomáhající inhibovat patogeny vyskytující se v trávicí soustavě. Kromě těchto bioaktivních sloučenin produkuje *S. boulardii* ještě mnoho dalších s různými funkcemi (Fu et al. 2022).

### 3.7 Genom *S. boulardii*

Jelikož obě kvasinky *S. boulardii* a *S. cerevisiae* mezi sebou sdílí celkem 99 % genetické informace, tak se jejich genom odlišuje pouze v několika oblastech. Vývojově neblíží příbuzenský vztah *S. boulardii* je ke kmenům *S. cerevisiae* používaných jako vinných kultur. *S. boulardii* sdílí se *S. cerevisiae* celkem zhruba 3100 proteinů, které mají podobnou funkci a jsou odvozené od společného předka. Také napříč kmeny *S. boulardii* existuje vysoká podobnost v produkováných proteinech a tyto kmeny obsahují proteiny, které jsou společnými ekvivalenty. V oblasti exonů se genetická informace *S. cerevisiae* od genetické informace *S. boulardii* odlišuje ve více než 16 000 bodech vedoucí při translaci ke změně aminokyseliny.



Změna nukleotidu je způsobena buď substitucí, delecí nebo insercí nukleotidu a pokud proběhla v exonu (Hudson et al. 2016).

*S. boulardii* má také odlišný karyotyp od *S. cerevisiae*, jelikož je pro ni typická trisomie IX chromozomu. Naopak má méně genů spojených s odolností vůči výskytu mědi (Edwards-Ingram et al. 2004). Obě kvasinky se liší v obsahu genetické informace některých chromozomů. Rozdíly byly nalezeny v počtu genů na chromozomech I, VII a XII. Předpokládá se, že by některé rozdílné geny měly být zodpovědné za syntézu proteinů spojených s reakcí kvasinky na stres (Pais et al. 2020).

Pro *S. boulardii* je typická trisomie IX chromozomu, tedy že se tento chromozom vyskytuje v buňkách ve třech kopiích. Velkost genomu *S. boulardii* se pohybuje kolem 11,5 Mb. *S. boulardii* má také 2-mikronový plazmid, který je velmi podobný plazmidu *S. cerevisiae*. Tento plazmid má velikost 6318 páru bazí. Kmeny *S. boulardii* mohou obsahovat kolem 5140 odlišných proteinů, což dohromady vytváří proteom kvasinky. Proteom je soubor všech proteinů jednoho druhu. Z těchto 5140 proteinů je 200 unikátních právě pro každý jednotlivý kmen *S. boulardii*. Způsob rozmnožování kvasinky je určen dvěma alelami na jednom lokusu. Tyto alely se označují MAT $\alpha$  a MATa. Jedna z těchto dvou alel se odlišuje od adekvátní alely na lokusu *S. cerevisiae*. Právě tato odlišnost by mohla být důvod, proč nedokáže *S. boulardii* vytvářet spory, a také proč se kvasinka vyskytuje pouze v diploidní formě. Všechny ostatní geny *S. boulardii* kódující sporulaci nebo také geny zajišťující rozmnožovací cyklus zahrnující meiózu a mitózu jsou totožné se *S. cerevisiae*. Je tedy možné, že *S. boulardii* nemůže sporulovat z důvodu výskytu mutací na lokusech MAT (Khatri et al. 2017).

Dalším rozdílem mezi kvasinkami *S. cerevisiae* a *S. boulardii* je, že *S. boulardii* během evoluce přišla o některé Ty elementy typické pro rod *Saccharomyces*. Ty elementy jsou části genomu. Jsou to retrotranspozony vyskytující se u kvasinek druhu *S. cerevisiae*. Ty elementy mají za funkci pomocí reverzní transkripce replikovat RNA a následně ji vložit do DNA buňky. Genetická informace kvasinek rodu *Saccharomyces* se nejvíce odlišuje právě v oblasti Ty elementů nebo také telomer chromozomů (Edwards-Ingram et al. 2004). Právě Ty elementy Ty1, Ty3 a Ty4 u *S. boulardii* úplně chybí. *S. boulardii* naopak nepřišla o Ty elementy Ty2 a Ty5 (Ansari et al. 2021).

### 3.8 Metody stanovení *S. boulardii*

Spolehlivé stanovení přítomnosti *S. cerevisiae* var. *boulardii* je zásadní pro stanovení deklarovaných účinků v léčivech, probiotických doplňcích stravy a také v potravinách. Z důvodu, že *S. boulardii* je zařazená pod druh *S. cerevisiae*, tak jsou obě kvasinky ve svých vlastnostech velmi podobné. Jejich spolehlivé rozlišení není tedy jednoduché.

#### 3.8.1 Selektivní kultivační média

V případě rozboru vzorku v potravinářství nebo v klinické medicíně není možné předpokládat, že ve vzorku nejsou přítomné další mikroorganismy například bakterie nebo spory plísní. Proto je vhodné vytvořit selektivní tlak znevýhodňující bakterie a plísně. Tohoto se docílí přidáním antibiotik oxytetracyklinu nebo chloramfenikolu v koncentraci 100 ppm

do kultivačního média pro kultivaci kvasinek. Další možností potlačení růstu bakterií je okyselení živné půdy kyselinou vinnou na pH o hodnotě 3,5. Při takto nízkém pH již bakterie nejsou schopny růst. Kultivační média vhodná pro kultivaci kvasinek jsou například médium s ječným extraktem (MAE), médium s tryptonem, glukózou a s kvasničným extraktem (TGY) nebo médium s dichloranem, bengálskou červení a chloramfenikolem (DRBC) (Ansari et al. 2021).

Pro potvrzení, že se jedná přesně o *S. boulardii* je nutné izolát ze selektivního kultivačního média dále analyzovat jinými metodami. Selektivní kultivační média fungují pouze pro preselekcii kvasinek. Selektivní média lze tedy využít pro kvantitativní stanovení kvasinek nebo v případě homogenního vzorku obsahujícího pouze *S. boulardii* pro kvantitativní stanovení *S. boulardii* ve vzorku (Ansari et al. 2021).

### 3.8.2 Vitální barvení preparátu a stanovení pod mikroskopem

Pro odlišení živých buněk od mrtvých se v mikrobiologii používá barvení preparátů. Pokud je obarvená buňka živá, tak barvivo neprochází z důvodu principu semipermeability přes cytoplazmatickou membránu. Živá buňka má proto světlou nebo průhlednou barvu. U mrtvých buněk dochází vlivem poškození cytoplazmatické membrány k průniku barviva dovnitř buňky, kde se barvivo hromadí. Pod mikroskopem mají mrtvé buňky tmavou barvu. V mikroskopu se spočítá poměr živých a mrtvých buněk. Jako barvivo se pro stanovení kvasinek nejčastěji využívá metylenová modř. Tento druh stanovení se nejčastěji využívá v praxi během technologických procesů, jelikož je nezbytné mít rychle výsledky. Zápor je, že takto obarvený vzorek již není možno využít ke další kultivaci. Kromě metylenové modře existují také různá další barviva. Některá z nich jsou také na fluorescenční bázi (Ansari et al. 2021).

### 3.8.3 Biochemické testy

V případě analýzy pomocí biochemických testů již lze identifikovat konkrétní rod nebo druh a v některých případech i kmen. Při biochemických testech se testuje schopnost štěpení velkého množství různorodých chemických látek a také schopnost produkce konkrétních metabolitů. Testy obsahují různé substráty s rozdílnými zdroji uhlíku a dusíku. Dále je zjišťováno, jestli mikroorganismus produkuje fermentované cukry, zda rozkládá močovinu nebo jestli je schopen redukovat H<sub>2</sub>S. (Hossain et al. 2020; Ansari et al. 2021). Výsledky biochemického testování *S. boulardii* jsou v tabulce č. 1. Testovaný kmen *S. boulardii* byl schopen redukovat H<sub>2</sub>S za vzniku černohnědých kolonií (Hossain et al. 2020).

Tabulka č. 1 Zdroj: Zainab M. AL Zubaidy et al. (2014).

Testy		Výsledky
Využití zdroje uhlíku	Glukóza	+
	Fruktóza	+
	Sacharóza	+
	Galaktóza	+/-
	Rafinóza	+
	Laktóza	-
	Škrob	+
Využití zdroje dusíku	Pepton	+
	Asparagin	+
	Síran amonný	+
	Dusičnany	-
Produkce kyselin		+
Rozklad močoviny		-
Produkce esterů		+
Cykloheximidová rezistence		-

### 3.8.4 ELISA imunologický test

Zkratka ELISA vychází z anglického názvu enzyme-linked immunosorbent assay. Tato metoda je založená na reakci antigenu s protilátkou. Na protilátku je navázán enzym, který štěpí substrát a test je vytvořen tak, že při rozštěpení substrátu dochází ke změně barvy. Výhoda této analýzy je, že je rychlá a poměrně nenákladná. Existuje několik druhů ELISA testu v závislosti na principu vázání protilátek s enzymem. Některé z metod lze využít při kvantitativní analýze vzorku. Kvantifikace výsledku probíhá detekcí intenzity zbarvení. ELISA metody se využívají primárně ve zdravotnictví (Shah & Maghsoudlou 2016).

Ansari et al. (2021) uvádí, že nebylo provedeno mnoho studií na využití imunologických testů pro detekci kvasinek v potravinářských vzorcích. V článku Middelhoven & Notermans (1988) byly popsány některé imunogenní polysacharidy produkované různými druhy kvasinek. Tyto polysacharidy jsou z naprosté většiny druhově specifické pro reakci s protilátkou a lze je tedy využít pro detekci pomocí ELISA testu. Konkrétně byly použity dva typy metod. První použitá metoda kompetitivní, kdy je vzorek kultivován se specifickými protilátkami. V případě přítomnosti antigenu ve vzorku dojde k vytvoření komplexu antigen-protilátka. Následně se komplexy antigen-protilátka přemístí na destičku s volnými antigeny, které jsou na ní pevně připojené. V případě, že ve vzorku byl přítomen antigen, tak se již vyvázal do komplexu a nedojde k jeho navázání na destičku. Naopak pokud se v analyzovaném vzorku nevyskytovaly žádné antigeny, tak dojde k navázání protilátek z roztoku na antigeny nanesené na destičce. Před dalším krokem se destička omyje puřem. Na destičce zůstanou pouze pevně připojené komplexy antigen-protilátka, které indikují, že v původním analyzovaném vzorku se antigen nenacházel. Dalším krokem je přidání enzymu navázaného na druhý typ protilátek. Druhý typ protilátek se specificky váže na první typ protilátek vyskytujících se v komplexu antigen-

protilátka pevně připojených na destičce. Destička se znovu omyje puřrem. Výsledek je, že pokud se při analýze nezmění barva reakcí substrátu, tak se v analyzovaném vzorku antigen vyskytoval. Pokud dojde enzymatickou reakcí ke změně barvy substrátu, tak je to důkaz, že se ve vzorku antigen nevyskytuje. Druhá metoda analýzy ELISA použité v experimentu s kvasinkami je metoda sendvičová. Při této metodě se používá destička s pevně přichycenými protilátkami. Následně se na destičku přidá testovaný vzorek. Pokud se ve vzorku vyskytuje antigen, tak dojde k vytvoření komplexu antigen-protilátka. Následně se destička omyje puřrem a odplaví veřkeré volné nenavázané antigeny. V dalřím kroku se přidá druhá protilátka a dojde k navázání na antigen z druhé strany. Znovu se destička promyje a přidá se poslední typ protilátek s enzymem, které se naváží na druhý typ protilátek. Pokud analyzovaný vzorek obsahoval antigen, tak v posledním kroku proběhla enzymatická reakce a dořlo je změně barvy. V článku je uvedeno, že pro kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je možné použít obě metody detekce ELISA. Při zjiřřování přítomnosti antigenů jednobuněčných buněk kmene bazidiomycety v některých případech testy ELISA prokázaly shodu, i když se ve vzorku reálně vyskytovala kvasinka kmene askomycet. K tomuto dořlo u analýzy ELISA v jednom z případů testování kvasinky rodu *S. cerevisiae*.

### 3.8.5 Sekvenování DNA

Sekvenování genetické informace organismu je jedna z metod pro přesné zařazení a určení rodu, druhu a kmene. Sekvenovat lze buď celý genom nebo jenom jeho určité části. Stanovování sekvence celé DNA je zdlouhavé a náročné na čas i vybavení. K identifikaci organismu se používají různé části genomu v závislosti na metodě. Pro identifikaci kvasinek se může využívat část DNA kódující ribozomální podjednotku. Tato část DNA se nazývá 28S nrDNA a používá se k identifikaci u eukaryotických organismů z důvodu specifčnosti. Podobně se využívá pro identifikaci kvasinek také úsek DNA nazývaný ITS. Další metodou je rep-PCR, což je metoda spočívající v opakovaném nakopírování určité genetické sekvence, která se vyskytuje a opakuje na mnoha místech v DNA. Tato sekvence se po namnožení v určitých místech rozřtěpí. Každý druh má odlišnou délku a počet rozřtěpených kusů DNA. Segmenty jsou tedy specifické pro každý jednotlivý druh. Následně se využívá elektroforéza pro vyřřídění jednotlivých segmentů v elektrickém poli podle pohyblivosti a délky řetězce. Tato metoda se jeřřtě označuje jako tak zvané zjiřřování otisku prstu DNA organismu (Gopalakrishnan & Winston 2019). Další způsob identifikace kvasinky *S. boulardii* je možný také podle konkrétních Ty elementů nacházejících se na určitých místech v genomu. U *S. boulardii* kmenů Biokodex a Unique-28 bylo identifikováno celkem 15 Ty elementů (Khatri et al. 2017).

Následně po sekvenování DNA pěti kmenů kvasinky *S. boulardii* byly porovnány jednotlivé sekvence s dalšími dvěma záznamy sekvencí DNA z databáze. Bylo zjiřřováno, jak se od sebe jednotlivé DNA sekvence liřří a jaký to má vliv na probiotické účinky. Kompletní sekvenování bylo provedeno u vzorků Biokodex a Unique28. U ostatních třří vzorků Kirkman, Unisankyo a EDRL byla sestavena pouze hrubá verze genomu. Sekvence kmenů Biokodex a Unique28 byla provedena přibližně ve 200 opakováních a následně byl sestaven kompletní genom těchto dvou vzorků. Následně porovnáním obou kmenů Biokodex a Unique28 bylo

zaznamenáno, že genom získaný ze vzorků Biokodex je na jedné telomeře kratší o 0,02 Mbp (Khatri et al. 2017).

Kromě genetické informace získané z chromozomů kvasinky byla získána také sekvence plazmidu 2-micron. Tento plazmid se vyskytuje u druhu *S. cerevisiae* a také u jeho varianty *S. boulardii*. Je to malý DNA kruhový plazmid, který se v buňce vyskytuje zhruba v 40-60 kopiích. Tento plazmid byl získán také ze vzorků EDRL, Kirkman a Unisankyo (Chan et al. 2013; Khatri et al. 2017).

Kvasinka *S. boulardii* není schopná sporulace. Genom kvasinky byl porovnán v programu BLASTp. Tento program je schopen přiřazovat jednotlivé sekvence genomu k sekvencím aminokyselin vyskytujících se v jednotlivých proteinech. Dřívější studie zjistily, že neschopnost kvasinky vytvořit spory může být způsobena některým z genů CDC16, DMC1 nebo MND2. Kvasinka *S. boulardii* není schopná sporulace i přesto, že má z naprosté většiny totožný genom spolu s kvasinkou *S. cerevisiae*, která sporulace schopná je. Dále byly prozkoumány takzvané MAT lokusy, které mají vliv na sporulaci. U *S. boulardii* kmene Biokodex je v porovnání s kvasinkou *S. cerevisiae* v tomto konkrétním místě změna. Biokodex má navíc sedm bází a dalších osm je změněných. Došlo tedy v tomto místě k mutaci, která může být příčinou neschopnosti *S. boulardii* vytvářet spory (Khatri et al. 2017).

### 3.9 Kultivační podmínky *S. boulardii*

#### 3.9.1 Vliv pH

Základem úspěšného použití probiotika je jeho rezistence k pH vyskytujícím se v trávicím traktu. V žaludku může pH dosahovat hodnot mezi 1–2. Naopak v tenkém střevě je hodnota pH v rozmezí 6–7,5 v závislosti na měřené části střeva. K zvýšení pH v tenkém střevě dochází vlivem sekrece slinivky břišní. Nízké pH v žaludku funguje jako obrana před vniknutím patogenních mikroorganismů do trávicího traktu a jejich následným namnožením v organismu (Yamamura et al. 2023). *S. boulardii* dokáže přežít rozmezí hodnot pH 2,0–8,0 (Hossain et al. 2020). Ideální pH pro růst *S. boulardii* v médiu je 5,5, kdy při tomto pH dochází k největší produkci biomasy (Du et al. 2012).

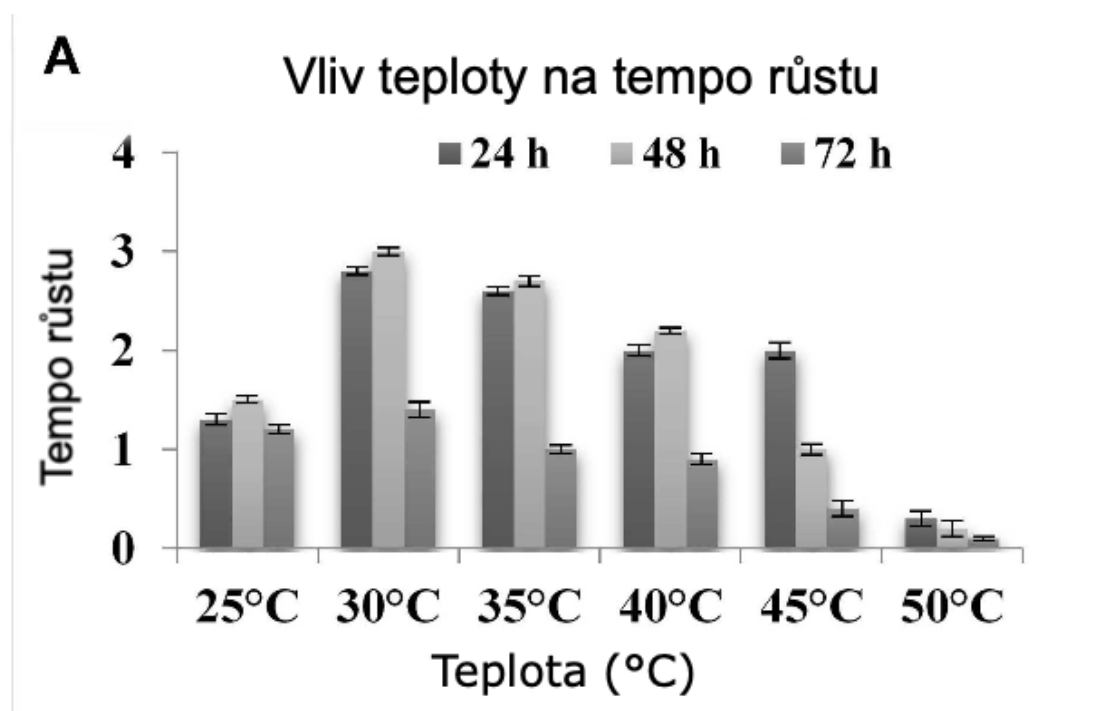
Fietto et al. (2004) zjišťoval odolnost *S. boulardii* a *S. cerevisiae* ve simulovaném intestinálním prostředí. Pro experiment bylo použito pH 8,0 a bylo zjištěno, že obě kvasinky jsou při tomto pH zhruba stejně rezistentní. Po celou dobu experimentu, který trval 60 minut, byla životaschopnost obou kvasinek blízká 100 %. Ve druhém experimentu byly obě kvasinky vystaveny simulaci kyselého žaludku, tedy pH o hodnotě 2,0. Při vystavení kyselému prostředí nedošlo v prvních 10 minutách mezi oběma kvasinkami k žádným rozdílům. Odlišnost v odolnosti vůči pH se projevila až kolem 15. minuty. V kyselém prostředí došlo po 60 minutách experimentu u *S. cerevisiae* k poklesu životaschopnosti na 30 %. Oproti tomu kvasinka *S. boulardii* je daleko odolnější vůči nízkému pH. Po 60 minutách v simulovaném prostředí žaludku bylo stále 75 % kvasinek životaschopných.

#### 3.9.2 Vliv teploty

Veškeré fyziologické procesy buňky jsou závislé na teplotě okolí. Teplota totiž ovlivňuje rychlost metabolických procesů uvnitř buňky. Se vzrůstající teplotou roste rychlost

přeměny látek, rychlost množení buněk a při vyšší teplotě dochází ke zrychlení metabolismu, což vede také k dřívějšímu úmrtí buňky. Na teplotě jsou závislé hlavně všechny procesy enzymů. V případě, že by byla teplota příliš vysoká, tak může docházet k denaturaci enzymů a tím k ukončení jejich funkčnosti. Naopak při velmi nízké teplotě je metabolismus kvasinek zpomalen a dochází ke zpomalení jejich růstu. Optimální teplota pro kultivaci *S. boulardii* byla stanovena na 37 °C. Při kultivaci o teplotě vyšší než 41 °C již k rapidnímu snižování počtu živých kvasinek (Shu et al. 2020). Hossain et al. (2020) popisuje, že izoláty *S. boulardii* mají schopnost přežít až do teploty 45 °C. Ovšem při takto vysoké teplotě je jejich životnost krátkodobá a po 72 hodině rapidně klesá tempo jejich růstu (viz graf č. 1). Naopak teplota 25 °C není dostatečně vysoká pro rychlé pomnožení.

Du et al. (2012) popisuje, že po inokulaci média při 30 °C je *S. boulardii* zhruba 4 hodiny v lag fázi. Následně při teplotě 30 °C dochází v časovém rozmezí mezi 6 a 24 hodinou k logaritmickému množení buněk. Naopak mezi 24 a 30 hodinou dochází k ustanovení rovnováhy, takže rozmnožování a umírání buněk probíhá zhruba ve stejném poměru. Hossain et al. (2020) uvádí, že bod tepelné smrti pro kvasinky *S. boulardii* je mezi 55–56 °C. Bod tepelné smrti znamená, že daný mikroorganismus není schopen přežít tuto teplotu po dobu vyšší než 10 minut.



Graf.: č. 1 Vliv teploty na tempo růstu *S. boulardii*. Zdroj: Hossain et al. (2020)

Také bylo zaznamenáno, že hodnota pH po kultivaci *S. boulardii* v médiu je provázaná s hodnotou pH. S rostoucí teplotou je kvasinkami snižováno pH média, což je způsobeno zrychleným metabolismem kvasinek (Shu et al. 2020).

Teplota má vliv na metabolickou aktivitu, čehož se využívá k prodloužení trvanlivosti pro lidskou spotřebu. K tomu se využívá různá technologická úprava probiotického přípravku *S. boulardii*, což následně ovlivňuje teplotu potřebnou pro její skladování. Pokud by předepsaná teplota nebyla dodržena, tak by mohlo dojít k snížení životaschopnosti kvasinek.

Nízká životaschopnost by způsobila snížení nebo úplné vyrušení účinnosti přípravku a jeho benefitů. Jsou dva typy technologické úpravy kvasinek pro použití do kapslí. Prvním způsobem je sušení buněk za použití tepla. Druhý způsob je sušení za použití mrazu, což se nazývá lyofilizace. Při výrobě preparátu za použití tepla je nutné jej po celou dobu skladovat v lednici při teplotě kolem 4 °C. Skladování při vyšší teplotě by způsobilo, že preparát by po otevření rychle degradoval. Při úpravě pomocí lyofilizace je možné preparát skladovat až 1 rok při pokojové teplotě, ovšem skladování při nízké teplotě je lepší (Hossain et al. 2020).

### 3.9.3 Rozdílné zdroje uhlíku

Jako zdroj uhlíku dokáže *S. boulardii* využívat glukózu, fruktózu, sacharózu, rafinózu nebo škrob (Ansari et al. 2021). *S. boulardii* není schopná využívat laktózu a také není reálně schopna metabolizovat galaktózu, i když není vyloučena její zanedbatelné zpracování. V genomu *S. boulardii* jsou obsažené veškeré geny pro metabolizaci galaktózy, ovšem v jednom bodu došlo k mutaci, která způsobila poškození enzymu fosfoglukomutázy. Tato mutace je zodpovědná za to, že kvasinka nemůže galaktózu zpracovávat v množství, které by zajistilo normální životní procesy v buňce (Liu et al. 2018).

Yang et al. (2019) uvádí, že přítomnost glukózy, sacharózy nebo maltózy v kultivačním médiu má velmi příznivý vliv pro růst. Opačný výsledek byl zaznamenán u laktózy, galaktózy nebo rozpustného škrobu. Pro tento experiment bylo použito YPD médium, které v 1000 ml destilované vody obsahuje 10 g peptonu, 10 g kvasnicového extraktu a 20 g glukózy. Jako kontrola bylo použité médium bez glukózy a následně se jednotlivé zdroje uhlíku přidávaly vždy v koncentraci 2 %. V případě, že byly přidány 2 % glukózy, tak bylo stanoveno  $1.93 \times 10^8$  KTJ/ml. Po přidání maltózy bylo stanoveno  $1.89 \times 10^8$  KTJ/ml živých buněk. Zvýšení koncentrace glukózy ze 2 na 5 % způsobilo, že se počet kvasinek zvýšil o 24 %.

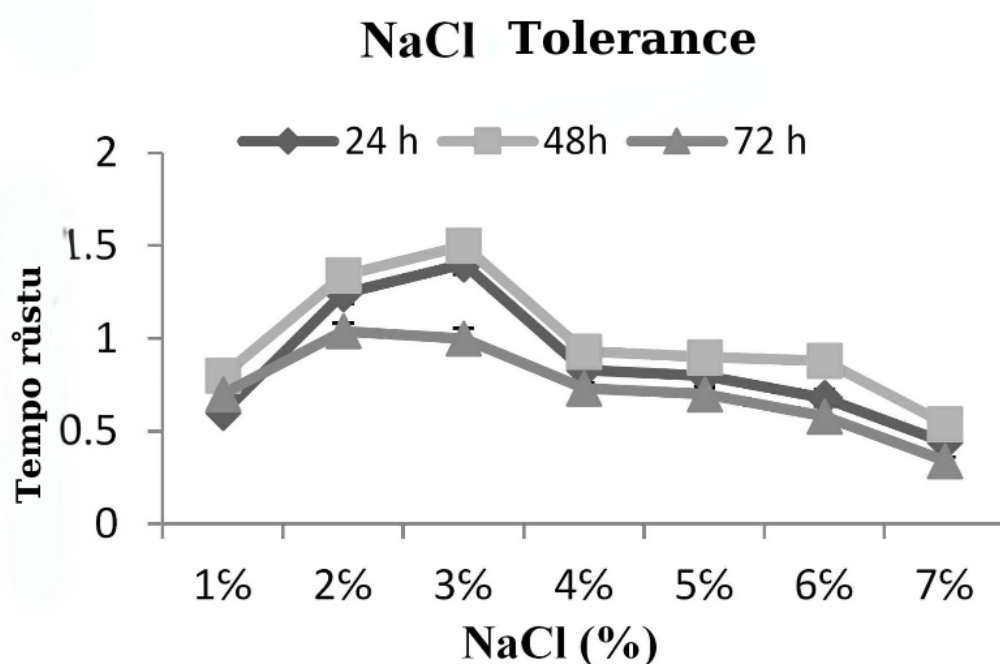
### 3.9.4 Rozdílné zdroje dusíku

V mikrobiologii je možné použít velké množství různých zdrojů dusíku. Lze použít jak organické, tak anorganické zdroje. Některé zdroje dusíku se dále řadí podle substrátů, ze kterých jsou získány. Do organických zdrojů se řadí trypton, kasein, kvasnicový extrakt, pepton, sójový pepton, hovězí extrakt nebo sladové mléko obsahující sladový ječmen, pšeničnou mouku a sušené plnotučné mléko. Mezi anorganické zdroje dusíku patří síran amonný, močovina, hydrogencitrát diamonný, citrát triamonný, dusičnan amonný, chlorid amonný nebo dusičnan draselný. (Yang et al. 2019) popisuje, že při použití média YPD složeného z peptonu 10 g/1000 ml, kvasnicového extraktu 10 g/1000 ml, glukózy 20 g/1000 ml a 1000 ml destilované vody. Na stanovení využitelnosti dusíku bylo použito YPD médium bez obsahu zdroje dusíku, což bylo použito jako kontrola. Na tomto médiu byla zjištěna koncentrace kvasinek *S. boulardii* zhruba  $0,6 \cdot 10^8$  KTJ/ml. Následně se použilo YPD médium bez dusíku, do kterého se přidali organické zdroje dusíku o koncentraci 1 %. Byly použity kvasnicový extrakt, pepton, sójový pepton, trypton, pepton z kaseinu, hovězí extrakt a sladové mléko. Nejlepší výsledek organického zdroje dusíku byl zjištěn při použití kvasnicového extraktu, kdy bylo zjištěno  $1,45 \cdot 10^8$  KTJ/ml. Následoval dusík ve formě peptonu s koncentrací kvasinek  $1,36 \cdot 10^8$  KTL/ml. Při přidání zdroje dusíku v koncentraci 2 % byly zaznamenány ještě vyšší koncentrace *S. boulardii*. Jako nejlépe využitelné organické zdroje dusíku z výše zkoumaných

sloučenin byly kvasnicový extrakt> pepton> hovězí extrakt> sladové mléko> trypton> sójový pepton a kaseinový pepton (Yang et al. 2019).

### 3.9.5 Vliv obsahu NaCl

Vliv vysokého obsahu NaCl v médiu spočívá ve změně osmotického tlaku. Pokud je v okolí buňky vysoká koncentrace NaCl, tak to vede k úniku vody z kvasinky směrem ve prospěch vyšší koncentrace iontů. *S. boulardii* je schopná přežít a růst i při koncentraci soli 8 %. Ovšem při takto vysoké koncentraci NaCl je již velmi snížena životaschopnost buněk. Viz graf č. 2 kvasinka *S. boulardii* je schopná dobře růst ještě při 3 % obsahu soli (Hossain et al. 2020).



Graf č. 2 Tolerance růstu *S. boulardii* v chloridu sodném; zdroj: Hossain et al. (2020)

### 3.9.6 Vliv obsahu etanolu

Přítomnost vyšší koncentrace etanolu v médiu má na buňku negativní efekt, jelikož snižuje fluiditu membrány. Fluidita je schopnost pohybování membrány buňky, přičemž narušení této schopnosti vede k možným porušení její celistvosti. Narušení membrány může následně způsobit potlačení růstu jedince a případně až smrt (Ramírez-Cota et al. 2021).

Kvasinka *S. boulardii* toleruje obsah etanol až do koncentrace 20 %. Ovšem při takto vysoké koncentraci etanolu dochází ke zpomalení začátku fermentace. Schopnost fermentace kvasinek byla vyhodnocena podle objemu vyprodukovaného plynu, který je zjišťován umístěním skleněné trubičky do zkumavky dnem vzhůru. Při koncentraci etanolu 20 % byla produkce plynu zaznamenána až při 24 hodině od začátku experimentu. Ovšem přítomnost 20 % etanolu v médiu znamenal, že během 60 hodin nedošlo k maximální produkci plynu. Při koncentraci etanolu 16 % byla produkce plynu zaznamenána již po 12 hodině. K plnému



zaplnění skleněné trubičky indikující množství produkovaného plynu došlo až při 60 hodině. (Du et al. 2012).

Podle Ramírez-Cota et al. (2021) tolerance etanolu záleží také na teplotě v okolním prostředí. Při teplotě 28 °C byla kvasinka *S. boulardii* schopná růst v koncentracích 6 a 8 % etanolu. V případě, že teplota kultivace byla 37 °C, tak kvasinka nebyla schopná růst v koncentraci vyšší než 4 % etanolu. Tento experiment ovšem trval pouze 12 hodin. Nižší teplota 28 °C znamenala, vyšší rezistenci vůči etanolu. Proti negativním vlivům způsobeným vysokým obsahem etanolu v okolním prostředí se *S. boulardii* dokáže bránit ztluštěním její buněčné stěny. Tento princip byl zkoumán u 6 % etanolu. Změna šířky stěny kvasinky byla porovnána oproti kvasinkám rostoucím v prostředí bez obsahu etanolu. Šířka buněčné stěny v 0 % etanolu byla 177 nm a oproti tomu prostředí s 6 % etanolu vedlo ke ztluštění na 246 nm. Rozdíl v přítomnosti etanolu znamenal nárůst stěny přibližně o 40 %.

### 3.9.7 Vliv obsahu žlučových solí

Žlučové soli jsou soli žlučových kyselin. Vylučují se společně se žlučí do tenkého střeva, kde napomáhají neutralizovat natrávenou potravu přicházející ze žaludku. Žluč kromě žlučových kyselin obsahuje také cholesterol, fosfolipidy a barvivo biliverdin (Hossain et al. 2020). Žlučové soli při styku s buňkou poškozují buněčnou membránu a způsobují tak narušení vnitřního prostředí buňky. Vyvíjejí tedy antimikrobiální aktivitu, proti které se některé mikroorganismy brání sekrecí enzymu štěpící žlučové soli. *S. boulardii* je jedním z mikroorganismů, u které byla popsána schopnost produkce těchto enzymů (Fu et al. 2022). *S. boulardii* je schopna růst i v médiu s obsahem 2 % žlučových solí (Hossain et al. 2020).

### 3.9.8 Vliv přítomnosti antibiotických látek

Různé studie se rozcházejí ve výsledcích o náchylnosti *S. boulardii* na přítomnost antibiotických látek. Czerucka et al. (2007) popisuje, že kvasinky mají určitou přirozenou odolnost vůči antibiotickým látkám. Také uvádí argument pro použití kvasinek jako probiotik při léčbě antibiotiky. Hlavní výhodou je, že nemůže dojít k horizontálnímu přenosu genů kódujících rezistenci z bakterií na kvasinky. Naopak mezi bakteriemi je horizontální přenos genů relativně častý. Při používání probiotických bakterií se může stát, že se rezistence na antibiotika bude přenášet také na patogenní bakterie (Czerucka et al. 2007).

Hossain et al. (2020) uvádí, že *S. boulardii* je rezistentní vůči antibiotikům imipenem, ampicillin a amikacin. Při experimentu k náchylnosti na výskyt antibiotik byly použity standardní koncentrace doporučené výrobcem a následně byla sledována velikost inhibiční zóny. Výsledek rozměrů inhibiční zóny byl porovnán s informacemi od výrobce a následně byl mikroorganismus rozřazen do skupin, rezistentní, částečně citlivý a citlivý. Částečná citlivost byla prokázána na chloramfenicol, rifampicin a vancomycin. *S. boulardii* byla po vystavení antibiotikům cefotaxime, ciprofloxine, erythromycin, kanamyci, gentamicin a metronidazole klasifikována jako citlivá.

Ve studii Chelliah et al. (2021) bylo testováno celkem 30 různých antibiotických látek s šesti rozdílnými kmeny *S. boulardii*. Autoři zjistili, že všechny testované kmeny byly rezistentní vůči všem testovaným antibiotikům. Pro testování byly použity standardní koncentrace a rezistence byla prokázána v porovnání s testováním těchto antibiotik

s patogenními mikroorganismy. Celkem 30 použitých antibiotik zahrnuje látky s různými principy potlačení růstu mikroorganismů, kterými je potlačení buněčné stěny, nukleové kyseliny nebo syntézy proteinů v buňce.

### 3.10 Mechanismus účinku v lidském těle

Jakýkoliv požitý mikroorganismus, který se živý dostane do tlustého střeva interaguje s již vyskytujícími se mikroorganismy. Mikrobiom zastává v organismu několik důležitých funkcí. Velmi důležitou funkcí je obrana organismu před rozmnožením patogenních bakterií. Druhou funkcí je podpora správné funkce buněk epitelu ve střevě. Poslední třetí funkcí je podpora funkce imunitního systému. Pro člověka benefiční mikroorganismy mají několik různých mechanismů účinku, kterými ovlivňují organismus a zabraňují rozvoji patogenů. Mikrobiom je velmi komplexní systém a všechny způsoby účinku a interakce nejsou známy. Konkrétně u *S. boulardii* jsou známy pouze některé mechanismy účinku (Pais et al. 2020).

Probiotika jsou mikroorganismy upravená pro příjem člověka a mají za cíl zlepšit funkci mikrobioty tlustého střeva. Probiotické mikroorganismy mohou mít na tělo pozitivní efekt třeba produkcí konkrétních metabolitů, což se považuje za přímý vliv na organismus. Produkované metabolity přímo ovlivňují střevní mikrobiotu. Naopak nepřímý vliv probiotik nepůsobí konkrétně na mikrobiotu, ale na sliznici epitelu nebo imunitní systém člověka. Podpora těchto částí organismu pak může mít následně vliv na mikrobiotu střeva (Pais et al. 2020).

Přijem určitého minimálního množství kvasinky *S. boulardii* může mít pro člověka zdravotní benefity. Ovšem pro adekvátní účinky je nutné identifikovat přesně konzumovanou variantu a kmen, jelikož samotná *S. cerevisiae* tyto benefity neposkytuje. Rozdíl ve vlivu na zdraví *S. boulardii* a *S. cerevisiae* je způsoben právě rozdílným metabolismem obou kvasinek (Vanhee et al. 2010).

Pro zařazení mezi probiotika musí mikroorganismus splňovat několik kritérií. Nejdůležitějším kritériem je zdravotní nezávadnost. Dále je nutné, aby mikroorganismus dokázal přežít průchod žaludkem a horní částí tenkého střeva. *S. boulardii* dokáže dobře odolávat nízkému pH. Ovšem i přes schopnost kvasinky přežít nějakou dobu v trávicím traktu dojde k jejímu úplnému vyloučení během 3-7 dní od podání probiotického přípravku (Kim et al. 2022). Autoři Lazo-Vélez et al. (2018) uvádějí, že k vyloučení *S. boulardii* dochází v průběhu 14 dní od okamžiku, kdy se přerušila suplementace. Takto krátká doba záchytu buněk ve stolici znamená, že kvasinka není schopna trávicí trakt dlouhodobě osídlit. K vyloučení dochází proto, že se kvasinka není schopná uvnitř těla dlouhodobě rozmnožovat a také zde nedokáže udržovat svoji metabolickou aktivitu. Zjistilo se, že byla *S. boulardii* schopna osídlit střevo člověka po podávání antibiotik nebo také schopna byla osídlit střevo u myši bez jakékoliv jiné střevní mikrobioty. Předpoklad tedy je, že *S. boulardii* je potlačena jinými střevními mikroorganismy z důvodu, že jim není schopna dlouhodobě konkurovat. Pokud není přijímaná dávka probiotika dostatečně velká nebo pokud kvasinky v podaném přípravku nemají vysokou životnost, tak může dojít k vyloučení těchto kvasinek z trávicího traktu ještě před projevením pozitivního účinku (Kim et al. 2022).

### 3.10.1 Deaktivace toxinů

Probiotika mohou potlačit růst patogenů konkurencí o živiny a prostor. Příjem probiotických mikroorganismů může vést ve střevě v některých případech také ke snížení pH, což způsobuje zhoršení podmínek růstu patogenů. Antimikrobiální aktivita probiotika může být způsobena také produkcí chemických látek, který působí nepříznivě na patogenní mikroorganismy. Mezi látky se schopností potlačení růstu patogenů se řadí některé organické kyseliny, bakteriociny, peroxid vodíku, diacetyl nebo některé aminy. Pozitivní vliv probiotik na hostitelský organismus může být způsoben dále působením na toxiny vyprodukované patogeny. Některé kmeny *S. boulardii* jsou schopné potlačit přímo rozvoj a pomnožení *E. coli* ve střevě pomocí snížení pH (Pais et al. 2020). Kvasinka *S. boulardii* je také schopná potlačit funkci toxinů *Escherichia coli* pomocí zásadité fosfatázy. Tento enzym je schopen pomocí odstranění fosfátové skupiny z povrchu inaktivovat lipopolysacharidové endotoxiny bakterie *E. coli* (Buts et al. 2006).

*S. boulardii* má také schopnost potlačení toxinu bakterie *Clostridium difficile*. Tento patogen *S. boulardii* je schopná produkovat 54-kDa proteázu štěpící toxiny A a B. Tyto dva toxiny jsou produkovány právě *C. difficile*. Rozvoj bakterie způsobuje infekční zánětlivé průjemy. Toxin A působí zánětlivě a také způsobuje nekrózu buněk střevního epitelu. *S. boulardii* je schopná snížit samotnou produkci toxinu pomocí vylučování chemických látek, které jeho produkci potlačují. Kromě vlivu na toxin *S. boulardii* ovlivňuje také reakci organismu na infekci pomocí sekrece faktorů, které mají následně vliv na imunitní systém (Kelesidis & Pothoulakis 2012).

Naopak u bakterie *Vibrio cholerae* funguje mechanismus potlačení produkovaného toxinu pomocí samotné stěny buňky kvasinky *S. boulardii*. Kvasinka obsahuje proteine 120-kDa, který funguje jako receptor. *S. boulardii* se dokáže přes tento receptor přichytit na 84-kDa toxin cholery a způsobí zablokování jeho funkce. Následkem blokace tohoto receptoru není *V. cholerae* schopna aktivovat v lidském těle enzym adenylátcyklázu. Toxicky působí pouze opakovaná aktivace tohoto enzymu, jelikož způsobuje neřízenou sekreci iontů a zároveň blokuje jejich zpětnou absorpci. Což vede k naprosté dysbalanci elektrolytů a způsobuje průjem a následnou dehydrataci (Brandão et al. 1998).

Kvasinka je schopná částečně pomoci chránit organismus proti průběhu gastrointestinálního antraxu, což je onemocnění způsobené nebezpečnou bakterií *Bacillus anthracis*. Rozvoj onemocnění je způsoben pozřením potravy kontaminované spory. Při požití spory v trávicím traktu mohou spory vyklíčit a následně produkovat toxin. Včasná diagnostika bývá obtížná, jelikož se projevuje nespecifickými symptomy gastroenteritidy. Později vznikají v tenkém střevě vředy. Rozvoj bakterie *Bacillus anthracis* ve střevě může způsobit vznik lézí, které mohou i po vyléčení zanechat zjizvenou a poškozenou tkáň. *S. boulardii* je schopná produkovat proteázy, které štěpí toxin produkovaný bakterií *B. anthracis*. Kromě štěpení toxinu zlepšuje *S. boulardii* správnou funkci střevní bariéry a zabraňuje rozvoji trvalého poškození sliznice gastrointestinálního traktu (Pontier-Bres et al. 2015).

### 3.10.2 Adheze *S. boulardii*

Adheze mikroorganismu ve střevě je velmi důležitá vlastnost, bez které mikroorganismus v hostiteli nedokáže přetrvat. Před adherencí potenciálně patogenních mikroorganismů brání hostitele produkovaný mucin, který funguje jako zábrana proti jejich přichycení a rozvoji v trávicím traktu. Některé benefiční mikroorganismy jsou schopné se na mucin navázat pomocí speciálně produkovaných látek, které se následně na mucin připojí. Ovšem například *S. boulardii* postrádá zásadní schopnost se ve střevě ve větší míře přichytit. V trávicím traktu se kvasinky *S. boulardii* vyskytuje v průměru pouze několik dní a následně dojde k jejich vyloučení (Pais et al. 2020).

V případě myši chovaných bez jakékoli mikrobioty byla *S. boulardii* ve stolici detekovatelná ještě 10 dní po jednorázové aplikaci. Ovšem v případě přítomnosti mikrobioty došlo k vypuzení *S. cerevisiae* již v průběhu pěti dnů. (Edwards-Ingram et al. 2007). Mechanismus adheze patogenů se využívá také k jejich vyloučení. *S. boulardii* je totiž schopná některé zdravé škodlivé patogeny navázat na svojí buněčnou stěnu. Následně se v řádu několika dní s vyloučením kvasinky vylučuje také onen patogen. Stejná funkce byla potvrzena také u *S. cerevisiae*, kdy dokázala kvasinka pomocí proteinů v buněčné stěně takto navázat třeba bakterie *E. coli*, *Salmonella enterica* sérotyp Typhimurium nebo sérotyp Typhi. Adheze patogenních mikroorganismů na buněčnou stěnu kvasinek je ovlivněna také přítomností žlučových solí, které snižují jejich schopnost vázání se na buňku kvasinky (Pais et al. 2020).

### 3.10.3 Vliv na imunitu hostitele

Ve střevě organismu funguje intestinální epiteliální bariéra jako obrana před patogenními mikroorganismy a cizopasníky. Tato bariéra se skládá z navzájem na sebe navazujících buněk epitelu, které jsou společně propojeny spoji (Terciolo et al. 2019). Při příjmu probiotických látek dochází k interakci těchto mikroorganismů s touto bariérou a zároveň s mikrobiotou trávicí soustavy. Jejich vzájemné interakce ovlivňuje imunitní systém hostitele. Aktivace imunitního systému patogeny je způsobena narušením spoju epiteliálních buněk na sliznici střeva. Imunitní systém následně reaguje vytvořením zánětlivé reakci a patogenní mikroorganismy eliminuje (Semin et al. 2021).

Probiotické mikroorganismy mohou ve střevě zasahovat do funkce imunitního systému několika způsoby. Zprv probiotika mohou ovlivnit imunitní systém pomocí produkce metabolických látek, které následně působí na buňky epitelu střeva. Zadruhé probiotika mohou působit na některé skupiny bílých krvinek jako jsou monocyty, makrofágy a lymfocyty. *S. boulardii* má modulační schopnost na imunitní systém a dokáže lokálně buď ovlivnit nebo také potlačit zánětlivou reakci organismu. *S. boulardii* je schopná podpořit produkci imunoglobulinů IgA a IgM a také cytokinů. Kromě toho *S. boulardii* také podporuje aktivitu fagocytů (Pais et al. 2020; Ansari et al. 2021).

Klinické studie potvrdily, že *S. boulardii* má při aplikaci pozitivní účinky na akutní a chronické onemocnění střev. *S. boulardii* ovlivňuje imunitní systém organismu, jelikož bylo u myši zjištěno, že po jejím podání byla zvýšená hladina sekrečního komponentu imunoglobulinu. Také se zvýšila hladina séra imunoglobulinu G. Ovšem k vlivu na imunitní systém dochází v případě, že se kvasinka dostane do přímého kontaktu s buňkami epitelu střeva, a tedy i do kontaktu s Peyerovými pláty. Právě tyto pláty jsou součástí imunitního systému

střeva. Ve zdravém střevě nemusí dojít ke kontaktu *S. boulardii* s buňkami imunitního systému a to znamená, že je vliv na imunitní systém pouze omezený. U myši stoupla koncentrace antigenů až 10 dnů po podání první dávky (Bagherpour et al. 2018).

Při rané fázi rozvoji infekce rodu *Salmonella* dochází v trávicím ústrojí z důvodu přítomnosti *S. boulardii* ke zvýšení produkce cytokinu interferonu gamma, který je zodpovědný za stimulaci makrofágů. Současně dochází přítomností kvasinky k potlačení cytokinu IL-10, který funguje jako inhibitor makrofágů. S průběhem infekce naopak tento vliv kvasinky klesá a dochází zpět k vyrovnaní do normálního stavu (Stier & Bischoff 2016).

V případě nákazy *Clostridium perfringens* může docházet jedincům s oslabeným trávicím systémem k rozvoji infekce. Ve studii byly ptačí makrofágy vystaveny na 6 hodin vlivům kvasinky *S. boulardii*. Následně se tyto makrofágy nechaly po dobu 3 hodin infikovat *C. perfringens*. U makrofágů dříve vystavených *S. boulardii* došlo ke zvýšené expresi genů CD80, CD83 nebo CD197, a naopak došlo k potlačení genu CD40. Následně tyto makrofágy vykazovaly zvýšenou schopnost fagocytózy a baktericidity vůči bakterii *C. perfringens* (Wang et al. 2020).

Kvasinka *S. boulardii* má také modifikační vliv na transkripční faktory NF- $\kappa$ B. Transkripční faktor je protein, který má schopnost ovlivňovat expresi DNA. NF- $\kappa$ B je skupina proteinových látek s podobnými účinky. NF- $\kappa$ B faktory ovlivňují zejména expresi genů souvisejících s imunitním systémem, a se zánětlivými procesy (Liu et al. 2017). V případě léčby chemoterapeutikem 5-fluorouracil může dojít k poškození sliznice trávicího traktu. Toto léčivo je používáno k léčbě kolorektálního karcinomu nebo rakoviny prsu. Pokud takto dojde k poškození sliznice ve střevě, tak se to označuje jako intestinální mukozitida. Vzniklý zánět využívá například NF- $\kappa$ B faktory a také další signální dráhy. Při zánětu následně dojde ke zvýšení hladiny těchto faktorů. U myši bylo při výzkumu vlivu kvasinky *S. boulardii* na expresi faktoru NF- $\kappa$ B zjištěno, že následkem podání probiotické kvasinky došlo ke snížení faktoru NF- $\kappa$ B o 73,3 %. Dále se ve střevě myši měřila hladina faktoru NF- $\kappa$ B, kdy po podání chemoterapeutika a *S. boulardii* došlo ke snížení obsahu NF- $\kappa$ B. To znamená, že by se mohla *S. boulardii* používat pro zlepšení průběhu zánětu střeva u osob léčených chemoterapeutikem 5-fluorouracil (Justino et al. 2020).

Další látkou se schopností modulace imunitní odpovědi ve střevě je  $\beta$ -glukan. Je jednou ze sloučenin, která je zodpovědná za schopnost modulovat imunitní odpověď ve střevě.  $\beta$ -glukan se nachází v buněčné stěně některých mikroorganismů a také většiny hub. Vyskytuje se tedy i ve stěně *S. boulardii*. Rozvětvená molekula  $\beta$ -glukan se dokáže vázat, při nalámání na menší části, na některé receptory buněk imunitního systému. Zároveň byl v klinických testech prokázán modulační vliv  $\beta$ -glukanu na neutrofilní granulocyty, což je jedna ze skupin bílých krvinek (Stier & Bischoff 2016; Singh & Bhardwaj 2023).

#### **3.10.4 Vliv *S. boulardii* na enzymatické procesy**

Mikrobiom trávicí soustavy má vliv na procesy přeměny živin v trávicím traktu. Probiotika jsou schopna tyto přeměny podpořit ve směru, který je výhodnější pro člověka. Mají vliv z hlediska pozitivního působení na zdraví případně umožňují lepší využitelnost živin (Pais et al. 2020). Výhodou je, že samotná buňka kvasinky *S. boulardii* je velmi odolná vůči působení enzymů vyskytujících se v trávicím traktu (Ansari et al. 2021).

Buňka *S. boulardii* do prostředí vylučuje několik vlastních enzymů, které mají za funkci podporovat přijímání živin kvasinkou. Ovšem produkcí těchto enzymů dochází také ke zvýšení dostupnosti živin také pro člověka. Kvasinka produkuje velmi výkonnou sacharázu, která štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu. Také produkuje 54-kDa proteázu, která štěpí proteiny a má schopnost inaktivovat některé toxiny. Další enzym umožňuje štěpit peptidickou vazbu v místě leucinu. *S. boulardii* produkuje také enzym fosfatázu. Při zjišťování vlivu *S. boulardii* na trávicí trakt člověka nebylo zaznamenáno, že by kvasinka způsobila jakékoliv morfologické změny sliznice střeva (Moré & Vandenplas 2018).

*S. boulardii* je také schopna působit na enzymy trávicího traktu pomocí stimulace kartáčového lemu sliznice střeva. Tedy ovlivňuje produkci enzymů člověka. Konkrétně v tenkém střevě podporuje aktivitu sacharázy, laktázy, maltázy, izomaltázy, glukoamylázy, N-aminopeptidázy a některých dalších enzymů. Kvasinka aktivitu enzymů pravděpodobně ovlivňuje produkcí polyaminů. Princip funkce polyaminů je způsoben vlivem na expresi genů hostitele, což může podporovat syntézu trávicích enzymů (Pais et al. 2020). Konkrétně enzym N-aminopeptidáza je zinek metaloprotein patřící do M1 skupiny enzymů. Tento enzym v sobě váže molekulu zinku a funguje jako katalyzátor hydrolýzy peptidů z jejich dusíkatého konce. Bylo zjištěno, že *S. boulardii* má vliv na aktivitu tohoto enzymu, kdy nejvyšší vliv byl zjištěn při neutrálním až mírně zásaditém pH prostředí. Mechanismus účinku ještě není přesně znám, ale přítomnost kvasinky zvýšila u myši aktivitu enzymu ve sliznici střeva o 24 % v lačníku a 34 % v kyčelníku (Buts et al. 2002).

### 3.10.5 Interakce *S. boulardii* s mikroorganismy

Mikrobiom je velmi komplexní dynamický systém, ve kterém spolu neustále interagují bakterie, kvasinky a lidský organismus. Metabolické procesy kvasinek ve střevě člověka jsou ovlivňovány aktivitou některých ostatních mikroorganismů. Konkrétně růst a rozvoj kvasinek druhu *S. cerevisiae* je inhibován přítomností kyseliny mléčné a kyseliny octové. Tyto dvě kyseliny jsou produkovány bakteriemi mléčného kvašení označovanými zkratkou BMK. Kromě potlačení růstu *S. cerevisiae* mají tyto dvě kyseliny vliv také na produkci etanolu, která se vlivem jejich přítomnosti u kvasinek snižuje (Ansari et al. 2021).

Kromě některých patogenů cílících na trávicí soustavu člověka ovlivňuje *S. boulardii* také některé další mikroorganismy vyskytující se v potravinách. Například má kvasinka vliv na snížení tvorby spor u druhu plísně *Aspergillus parasiticus*. Tento efekt byl zjištěn ve vzorcích arašídových oříšků. *S. boulardii* není jediným probiotickým mikroorganismem s tímto efektem, jelikož všechna probiotika vykazují u plísní schopnost inhibice tvorby spor. Aplikace kombinace kvasinky *S. boulardii* a probiotické bakterie *Lactobacillus delbrueckii* vykazala ještě lepší výsledky než samotná aplikace kvasinky (Ansari et al. 2021).

*S. boulardii* potlačuje rozvoj mikroorganismů *Candida albicans*, *Salmonella Typhimurium* a *Yersinia enterocolitica* (McFarland 2010).

V případě rozvoje infekce žaludeční bakterií *Helicobacter pylori* dochází k poškození žaludeční stěny. Běžnou léčbou proti bakterii *H. pylori* jsou antibiotika a také léky potlačující funkci protonové pumpy. V žaludku funguje protonová pumpa pro udržení nízkého pH. Ovšem léčba antibiotiky není v některých případech úspěšná a zároveň způsobuje nepříjemné vedlejší účinky. Spolu s klasickou léčbou byl zkoumán vliv probiotik na průběh léčby a projevy

vedlejších účinků. Při současném podávání běžně používané léčby skládající se z amoxicillinu, tinidazolu a omeprazolu ve 35,3 % došlo k vyléčení infekce. Ve druhé skupině byla společně s léčivem podána také *S. boulardii*. K eliminaci *H. pylori* došlo v 44,8 % případů. Kvasinka také pomáhala mírnit intenzitu vedlejších účinků (Cárdenas et al. 2020).

### 3.10.6 Vliv na tráveninu střeva

Kvasinka *S. boulardii* má vliv na rychlost průchodu tráveniny střevem u osob se syndromem dráždivého tračníku. Toto onemocnění se projevuje bolestí břicha, roztažením střeva a také netypickou frekvencí vyprazdňování. Rozvoj nemoci je způsoben mnoha faktory od genetické zátěže, zánětu střeva, dysbiózy, až po narušení komunikace centrální nervové soustavy se střevem. Konkrétně serotonin přímo ovlivňuje motilitu střev, jelikož ovlivňuje přenos signálu mezi trávicí a centrální nervovou soustavou. Proto se u myši zkoumal vliv *S. boulardii* na serotoninové transportéry. Po 14 dnech od ukončení suplementace byly myši vypreparovány a zjišťovala se exprese serotoninové mRNA. Zároveň se u myši shromažďovala data o frekvenci defekace a o obsahu vody ve stolici. Výsledně kvasinka u myši snížila frekvenci defekace a obsah vody ve stolici. *S. boulardii* působí tak, že zvyšuje činnost serotoninových transportérů skrze EGF receptor ve stěně epitelu buněk střeva. Stejný princip zvýšení aktivity serotoninových transportérů je pravděpodobným mechanismem při vlivu na průběh onemocnění syndromu dráždivého tračníku (Gu et al. 2022).

*S. boulardii* působí také na hladinu mastných kyselin s krátkým řetězcem označovaných anglickou zkratkou SCFA Short-chain fatty acids. Označení mastné kyseliny s krátkým řetězcem zahrnuje primárně kyselinu octovou, kyselinu propionovou a kyselinu máselnou. Následkem nemoci je možné, že přirozený obsah SCFA v lidském střevě může být snížený. Bylo zjištěno, že příjem *S. boulardii* po oslabení následkem nemoci může pomoci s navrácením hladiny SCFAs na běžnou hladinu. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem mají na organismus benefiční vliv, jelikož podporují správnou funkci buněk střevního epitelu. SCFAs jsou také součástí komplexních fyziologických a metabolických procesů v tkáni jater, svalů nebo mozku (Pais et al. 2020).

## 3.11 *S. boulardii* v klinické medicíně

*S. boulardii* má v klinické medicíně využití v široké škále diagnóz. Používá se jak při akutních infekcích trávicího traktu, tak při některých chronických onemocněních. Jedna ze studií u dětí zkoumala vliv preventivního podání *S. boulardii* na pravděpodobnost vzniku průjmu následkem antibiotické léčby. Konkrétně byl použit přípravek Enterol obsahující pouze *S. boulardii*. Probiotikum bylo podáváno dětem kolem jednoho roku v dávkách 1–2 tablety denně. Kapsle byly podávány v závislosti na váze dítěte po dobu 5 dnů. Průjem vzniklý následkem příjmu antibiotik je způsoben narušením ustáleného mikrobiomu střeva, což napomáhá rozvoji některých patogenů jako například *Clostridium difficile*. U dětí se výskyt tohoto typu průjmu pohybuje mezi 6,2–80 % v závislosti na státě. Symptomy rozvoje střevní dysbalance způsobeném příjmem antibiotik zahrnují kromě průjmu také některé další příznaky jako zvýšenou teplotu, nechut, ospalost, letargii, ochablost, zvracení, dehydrataci, nadýmání, plynatost nebo řídkou stolici. Po podání Enterolu se zlepšily příznaky u 99,2 % dětí, ale u 0,8 % došlo ke zvýšení nechuti k jídlu. Příjem Enterolu měl benefiční efekt na redukcii intenzity

symptomů a také na časový průběh. Dřívější meta analýza prokázala u dětí a dospělých vlivem užívání *S. boulardii* snížení rizika vzniku průjmu o 53 % (Begaydarova R. Kh. et al. 2017).

*S. boulardii* je vyžívána při léčbě Crohnovy choroby. Studie s celkem 165 pacienty, z čehož bylo 80 z nich s Crohnovou chorobou neprokázala že by kvasinka byla schopná předcházet opětovnému projevu příznaků. Crohnova choroba totiž prochází klidovými fázemi nemoci nebo naopak fázemi s projevem symptomů (Bourreille et al. 2013). I když nebyl prokázán pozitivní vliv *S. boulardii* proti zabránění opětovnému rozvoji příznaků Crohnovy choroby, tak kvasinka přináší pro osoby s tímto onemocněním jiné benefity. Z důvodu postižení střevního epitelu totiž vede Crohnova choroba u 65–70 % pacientů k úbytku hmotnosti, u 25–80 % dochází ke snížení koncentrace albuminu a anémií trpí 60–80 % nemocných osob. *S. boulardii* pomáhá podporovat správnou funkci střevní stěny a měla vliv na zlepšení absorpce živin. Po 6 měsících od začátku užívání probiotické kvasinky byla zjištěna vyšší průměrná hmotnost pacientů, vyšší hladina hematokritu a zvýšená hladina krevního cholesterolu (Oh et al. 2020).

### 3.12 Probiotické přípravky *S. boulardii*

Jeden z kmenů kvasinky *S. boulardii* byl patentován v roce 1947. Od objevení bylo nalezeno několik dalších podobných probiotických kmenů. *S. boulardii* byla již od objevu předmětem mnoha studií zkoumajících benefiční vlivy příjmu na různé zdravotní problémy trávicího traktu. Z celkového počtu 53 klinických studií byly benefiční účinky potvrzeny ve 43 z nich, což odpovídá 81 %. Při studiích bylo sledováno, jestli došlo u osob ke zlepšení potíží gastrointestinálního traktu (McFarland 2010).

Světová gastrointestinální organizace doporučuje konzumovat probiotické přípravky s koncentrací  $5 \times 10^9$  KTJ v případě některých konkrétních diagnóz trávicího traktu. Světová zdravotnická organizace (WHO) spolu s Organizací pro výživu a zemědělství (FAO) doporučují přípravky s minimální koncentrací  $10^6$ – $10^7$  životaschopných buněk na 1 gram přípravku (Lazo-Vélez et al. 2018).

Na trhu se vyskytuje mnoho přípravků, které se prodávají s obsahem *S. boulardii*. Bylo zjištěno, že kvalita jednotlivých přípravků není rovnocenná. Ve studii ze Spojených států amerických bylo zjištěno, že až 93 % přípravků koupených na internetu nemělo uvedeno správné informace na obalu. Celkem 57 % vzorků obsahovalo kontaminanty. Obdobná studie testovala 58 vzorků z Evropy, Velké Británie, Asie a Japonska. Bylo zjištěno, že méně, než polovina testovaných vzorků obsahovala stanovenou koncentraci kvasinky. Necelá třetina dokonce obsahovala jiný kmen *S. boulardii*, než který byl uveden na obalu přípravku (McFarland 2010).

### 3.13 Negativní účinky

Probiotika obsahující *S. boulardii* se v nemocničním prostředí používají jako prevence před rozvojem infekce *Clostridium difficile*. Ovšem v některých případech byl po podání přípravku s obsahem *S. boulardii* zaznamenán rozvoj fungémie, což je infekce způsobená kvasinkou. Jako fungémie je označován stav, kdy dojde k průniku do krevního řečiště nebo pokud dojde k rozvoji infekce v některém z orgánů. Rizikovými faktory pro rozvoj infekce jsou



centrální žilní katetr, plná parenterální výživa, pobyt na jednotce intenzivní péče, aplikace nebo příjem antibiotik nebo potlačený imunitní systém (Fadhel et al. 2019).

Symptomy fungémie způsobené *S. boulardii* jsou totožné se symptomy candidózy způsobené kvasinkami rodu *Candida*. Projevuje se bílým povlakem na cévnatce a sítnici oka. Dochází také k zánětu hltanu, což je projevuje žlutobílým povlakem. Pacienti mají také různé nespecifické symptomy jako zvýšenou teplotu, nechutenství nebo zvýšené noční pocení. Pro léčbu se používají účinná antimykotika flukonazol, itraconazol nebo voriconazole (Enache-Angoulvant & Hennequin 2005). Ve studii u 46 pacientů monitorovali průběh onemocnění způsobené *S. boulardii*. Zjistilo se, že po týdnu od diagnózy zemřelo 22 % pacientů. Celkem byla fungémie fatální pro 37 % pacientů, což bylo evidováno čtyři týdny od stanovení infekce (Rannikko et al. 2021).

V retrospektivní studii bylo analyzováno 16 404 osob, u kterých byla podána *S. boulardii*. K rozvoji fungémie došlo pouze u 18 z nich, což odpovídá 0,11 % (Wombwell et al. 2021). Ze zprávy při zkoumání fungémie způsobené rodem *Saccharomyces* bylo zjištěno, že u 43 % pacientů rozvoji infekce předcházela příjem *S. boulardii*. Ovšem odlišení *S. boulardii* od *S. cerevisiae* je poměrně obtížné a nákladné. V praxi v mnoha případech také nedochází k podrobnějšímu testování. Proto je následně jako původce infekce často uvedena *S. cerevisiae* nebo pouze rod *Saccharomyces* (Rannikko et al. 2021).

### 3.14 Budoucí využití *S. boulardii*

*S. boulardii* je jako nepatogenní mikroorganismus potenciálně dobrým mikroorganismem pro další vývoj. Jedním aspektem pro budoucí lepší využití *S. boulardii* je zlepšení technologických postupů výroby a zpracování. Lepší technologická úprava mikroorganismů vede ke zlepšení účinnosti probiotik, prodloužení jejich životaschopnosti nebo k jejich aplikaci do funkčních potravin. Jelikož má *S. cerevisiae* rozsáhlé využití v pekařství, pivovarnictví nebo vinařství, tak existuje potenciál pro použití *S. boulardii* namísto *S. cerevisiae*. Pro konzumenty by to znamenalo zdravotní benefity a také preventivní ochranu před rozvojem některých patogenních mikroorganismů trávicího traktu. *S. boulardii* by mohla najít uplatnění také pro využití při zpracování jogurtů nebo sýrů. Pro výrobu kozího sýru byla vyzkoušena směs bakterií mléčného kvašení spolu s kvasinkou *S. boulardii*. Výsledný produkt vykazoval lepší vlastnosti při skladování a zároveň také pozitivní sensorické hodnocení. Ovšem aplikace do netypických výrobků by mohla ovlivnit sensorické vlastnosti. Tomu by mohlo být předcházeno použitím mikrokapsulace pro oddělení kvasinky od potravin. (Lazo-Vélez et al. 2018).

Další z možností pro budoucí výzkum kvasinek je využití jako nosiče terapeutických látek. V lékařství má *S. boulardii* velký potenciál vývoj nosičů, které by umožnily do střeva transport terapeutických proteinů. Interakce kvasinky ve střevě, kde se vyskytuje zánět nebo u kterého došlo k napadení různými patogeny je poměrně dobře prostudovaná. Ovšem interakce kvasinky ve zdravém střevě jsou prostudované značně méně. Pokud by se měla *S. boulardii* využívat jako nosič terapeutických proteinů, tak je nezbytné, aby se byla schopná dostat k antigen prezentujícím buňkám a přes ně aktivovat imunitní systém střeva. Rizikem využití *S. boulardii* jako nosiče terapeutických proteinů je, že by při kontaktu buněk imunitního systému s kvasinkou mohlo dojít k imunitní reakci nejenom proti antigenu terapeutické látky,

ale také proti samotné kvasince. Pokud by se spustila imunitní reakce těla proti *S. boulardii*, tak by byla kvasinka organismem zničena. Druhou nevýhodou je, že po imunitní reakci na *S. boulardii* by mohlo po opakovaném podání přípravku s kvasinkou docházet k následnému zánětu (Hudson et al. 2016).

Mikroorganismy v trávicí soustavě člověka přijímají živiny buď z natrávené potravy, dále živiny z molekul a látek vylučovaných střevním epitelem hostitelského organismu nebo mohou metabolizovat mucin. Mezi mikroorganismy je vysoká konkurence o zdroje živin, což má negativní vliv na *S. boulardii*. Mucin, což je hlen produkovaný epitelem buněk, by mohl být potenciální zdroj živin pro *S. boulardii*. Některé mikroorganismy rodu *Bacteroides* nebo také bakterie *Bifidobacterium bifidum* jsou schopné mucin rozkládat. Ovšem *S. boulardii* metabolizaci mucinu není přirozeně schopna. Studie vytvořila uměle kmen *S. boulardii*, který je schopen metabolizovat L-fukózu. L-fukóza je monosacharid a je jednou ze stavebních jednotek mucinu. Z bakterie *E. coli* byly přeneseny geny pro rozklad L-fukózy do genomu *S. boulardii*. Předpoklad je, že *S. boulardii* by měla jako zdroj uhlíku mucin, který není využívaný velkým množstvím mikroorganismů trávicího traktu. A tím by tedy kvasinka nemusela konkurovat většině bakterií vyskytujících se ve střevech a měla větší schopnost se v trávicím traktu setrvat delší dobu, což by zvýšilo její účinnost jako probiotika. (Kim et al. 2022).

## 4 Metodika

V poslední době je kvasinka *Saccharomyces boulardii* přidávána hojně do probiotických doplňků stravy. Pokud probiotikum obsahuje další mikroorganismy, může být obtížné ji selektivně stanovit. Standardy na kultivační stanovení *Saccharomyces boulardii* nejsou vyvinuty. Pomocí kultivační deskové metody budou testována různá kultivační média a kombinace teplot k selektivnímu stanovení kvasinky *Saccharomyces boulardii*.

Kvasinka *Saccharomyces boulardii* se používá jako probiotikum v mnoha běžně dostupných lécích nebo doplňcích stravy. Ovšem tato kvasinka nemá zavedenou normu pro její testování. Pro získání dat ke stanovení vlivu odlišných kultivačních podmínek *Saccharomyces boulardii* byly použity různé probiotické preparáty.

### 4.1 Použité vzorky

Probiotika s obsahem kvasinky *S. boulardii* se v ČR prodávají vyrobené jako léčivý přípravek pouze pod značkou Enterol. Ostatní vzorky byly sehnány buď v zahraničí, na internetu nebo se prodávají jako výživové doplňky. První vzorek je Enterol od výrobce Biocodex. Obsahuje *S. boulardii* CNCM I-745. Vzorek Enterolu byl zakoupen v České republice. Druhý vzorek je doplněk stravy ATB komplex compliflora. Obsahuje směs *S. boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*. Vzorek byl koupen v ČR. Jako výrobce je uveden Pamex Pharmaceuticals GmbH. Třetím vzorkem je výživový doplněk značky ezyleaf od výrobce Mega Nutrition Ltd. Tento vzorek byl zakoupen na internetu. Čtvrtým vzorkem je fairvital Saccharomyces Boulardii od výrobce fairvital. Ezyleaf obsahuje *S. boulardii* DBVPG 6763 a byl zakoupen na internetu. Pátým vzorkem je léčivý přípravek značky Yomogi výrobce Ardeypharm GmbH. Tento vzorek obsahuje *Saccharomyces boulardii* registrovanou pod registračním názvem *S. cerevisiae* HANSEN CBS 5926. Tento vzorek byl zakoupen v Rakousku. Šestým vzorkem je výživový doplněk Bio-Kult *S. boulardii* zakoupený v ČR. Vzorek je vyroben společností ADM Protexin Ltd. Tento vzorek obsahuje *S. boulardii* CNCM-3799. Sedmým vzorkem je Enteris výživový doplněk výrobce Lesaffre et Compagnie. Tento vzorek obsahuje *S. boulardii* CNCM I-3799 a byl pořízen v Polsku. Osmým vzorkem je léčivý přípravek Ultra Levura obsahující *S. boulardii* CNCM I-745. Výrobce je společnost Biocodex. Vzorek byl pořízen ve Španělsku.

Tabulka číslo 2: Přehled osmi testovaných probiotických přípravků

Přípravek	Výrobce	Místo koupě	Kmen <i>S. boulardii</i>	Další mikroorganismy
Enterol	Biokodex	Česká republika	CNCM I-745	–
ATB complex compliflora	Pamex Pharmaceuticals GmbH	Česká republika	neuvedeno	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103, <i>Bifidobacterium lactis</i> DSM 10140
ezyleaf SACCHAROMYCES BOULARDII	Mega Nutrition Ltd	online	neuvedeno	–
fairvital Saccharomyces Boulardii	fairvital b.v.	online	DBVPG 6763	–
Yomogi	Ardeypharm GmbH	Rakousko	<i>S. boulardii</i> ( <i>S. cerevisiae</i> HANSEN CSB 5926)	–
Bio-Kult	ADM Protexin Ltd.	Česká republika	CNCM-3799	–
Enteris	Lesaffre et Compagnie	Polsko	CNCM I-3799	–
Ultra Levura	Biocodex	Španělsko	CNCM I-745	–

## 4.2 Příprava preparátu

Asepticky byl odvážen 1 g vzorku, který byl následně rozpuštěn ve zkumavce v 9 ml fyziologického roztoku. Následně se vzorek řádně homogenizoval. Dále byl odebrán 1 ml ze zkumavky z prvního ředění a vložen do druhé zkumavky a homogenizován. Celý proces byl opakován až do 9. ředění, čímž došlo k vytvoření ředící řady. Na jednotlivé Petriho misky bylo napipetováno vždy po 1 ml vzorku ze zkumavek od 4. do 9. ředění.

## 4.3 Kultivační média

Pro zjištění nejlepších kultivačních podmínek kvasinky *S. boulardii* bylo použito celkem pět pevných živných médií s rozdílným složením, které byly kultivovány aerobně a anaerobně. Prvním použitým médiem byl Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) s přidavkem peptonu 5 g/l, cysteinu 0,5 g/l, Tweenu 1 ml/l a antibiotika mupirocinu v koncentraci 100 mg/l. Wilkins-Chalgren agar obsahuje 10 g/l tryptonu, 10 g/l želatinového peptonu, 5 g/l kvasnicového extraktu, 1 g/l glukózy, 5 g/l chloridu sodného, 1 g/l L-argininu, 1 g/l pyruvátu sodného,

0,5 mg/l vitamínu K a 5 mg/l heminu a 10 g/l agaru. Druhé použité kultivační médium bylo z kvasnicového extraktu (Millipore), které je složené z agaru 15 g/l, 5 g/l peptidů živočišného původu a 3 g/l kvasnicového extraktu. Třetí použitou živnou půdou je agar s extraktem ječného sladu (Millipore). Ten obsahuje 15 g/l agaru, 30 g/l extraktu z ječného sladu a 5 g/l houbového peptonu. Čtvrté médium Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract agar (Millipore) se selektivním OGYE doplňkem SRO73A (Millipore) v koncentraci 10 ml na 500 ml média, což odpovídá 100 mg/l média Oxytetracyclinu. Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract agar (OGYE) obsahuje 5 g/l kvasnicového extraktu, 20 g/l glukózy, 12 g /l agaru a OGYE antibiotický suplement. Posledním použitým agarem bylo GKCH s chloramfenikolem. GKCH je agar s obsahem 20 g/l glukózy, 5 g/l kvasničného extraktu, 15 g/l agaru a 0,1 g/l chloramfenikolem. Celkem bylo testováno 8 rozdílných vzorků. Celkem 7 vzorků obsahovalo čistou kulturu *Saccharomyces boulardii* a 1 vzorek byl směsný s obsahem *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis* a *Saccharomyces boulardii*. Tento vzorek byl kromě všech výše zmíněných médií kultivován také na Rogosa agaru pro stanovení *Lactobacillus* spp. Použitá kultivační média byla připravena podle návodu na obalu nebo podle specifikací na webových stránkách dodavatele.

#### 4.4 Kultivační podmínky

Po aseptické aplikaci 1 ml naředěného vzorku z ředící řady na Petriho misku byly misky zalaty kultivačním médiem a důkladně promíchány. Všechny vzorky se následně nechaly kultivovat při 30 °C po dobu 3 dnů. Kultivace za anaerobních podmínek probíhala v anaerostatu. Aerobně kultivované misky byly vloženy do polouzavřeného plastového sáčku. Všechny Petriho misky byly kultivovány dnem vzhůru.

#### 4.5 Počítání kolonií

Po třech dnech kultivace byly spočítány dvě až tři po sobě jdoucí počítatelná ředění. Byly spočítány všechny okem viditelné kolonie. Kvasinky *Saccharomyces* vytváří kolonie smetanové barvy s lesklým povrchem a v případě růstu na povrchu mají pravidelný kulatý tvar. V případě, že kolonie roste uvnitř agaru, tak může tvořit také nepravidelný tvar. Byl kultivován jeden směsný vzorek s obsahem *S. boulardii*, *L. rhamnosus* a *B. animalis* ssp. *lactis*. U tohoto vzorku se kromě médií na kvasinky kultivovalo také médium Rogosa, které je uzpůsobené pro růst bakterie rodu *Lactobacillus*. Jelikož bakterie rodu *Bifidobacterium* nerostou za aerobních podmínek, tak nedošlo k jejich nárůstu při kultivaci za přítomnosti kyslíku. Při kultivaci za anaerobních podmínek se dále kolonie identifikovaly pomocí přístroje MALDI-TOF MS a následně byl určen poměr jednotlivých kolonií.

#### 4.6 Metoda MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS je metoda, která umožňuje rychlou identifikaci mikroorganismů. Název metody pochází z anglického Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI), Time Of Flight (TOF) a Mass Spectrometry (MS). Název vychází z principu funkce přístroje. Tato metoda využívá výkonný laser pro ionizaci molekul metabolitů získaných z mikrobiální kultury. Upravený vzorek se následně nanese na speciální kovovou destičku. Před analýzou

vzorku je nutné provést několik dalších kroků v závislosti na typu vzorku. Destička se vloží do přístroje, kde probíhá ionizace. Vzniklé ionizované molekuly mají rozdílný podíl hmotnosti a náboje. Následně jsou tyto molekuly hnané trubičkou, kde dochází k jejich rozdělení. Měří se doba jejich letu a následně dochází k identifikaci jednotlivých metabolitů na detektoru. Jako detektor se používá hmotnostní spektrometr. Jako metabolity se nejčastěji pro identifikaci využívají proteiny, jelikož mnoho z nich je druhově specifických. Výsledky analýzy identifikovaných metabolitů se porovnávají s rozsáhlou databází naměřených hodnot. Nakonec přístroj vytiskne protokol, který znázorňuje pravděpodobnost identifikovaného mikroorganismu (Elbehiry et al. 2022).

Pro analýzu vzorků na přístroji MALDI-TOF MS byly vzorky připravovány dvěma způsoby. První způsob je uzpůsoben pro odebrání přímo narostlých kolonií z Petriho misky. Prvně se plastovou špičkou opatrně odebere narostlá kolonie bez nabrání jakékoli části agaru. Následně se tato kolonie opatrně krouživým pohybem rozetře na políčko kovové destičky MALDI-TOF. Po zaschnutí se kolonie překryje 1  $\mu$ l 70% kyselinou mravenčí. Následně se opět nechá zaschnout a dále se překryje 1  $\mu$ l matricí. Před měřením na přístroji MALDI-TOF MS musí být políčka na kovové destičce zaschlé. Druhý způsob nanášení vzorku na destičku zahrnuje extrakci, která je vhodná primárně pro kvasinky. Do mikrozkušavky o objemu 1 ml se napipetuje 300  $\mu$ l destilované vody, do které se nanese vybraná kolonie z Petriho misky. Následně se obsah nechá minimálně jednu minutu vortexovat. Přidá se 900  $\mu$ l etanolu a znovu se vše promíchá. Na centrifúze se mikrozkušavka po dobu 2 minut odstředí a následně se slije supernatant. Po opětovném odstředění se pipetou odsaje zbytek etanolu. Peleta se nechá několik minut schnout při pokojové teplotě. K peletě se přidá 1 až 80  $\mu$ l 70 % kyseliny mravenčí a vzorek se řádně promíchá. Přidané množství závisí na velikosti odebrané kolonie. V dalším kroku se přidá stejné množství 100% acetonitrilu jako kyseliny mravenčí a opětovně se vše promíchá. Vzorky se odstředí alespoň po dobu 2 minut při nejvyšších otáčkách. Odebere se 1  $\mu$ l supernatantu, který se nanese na MALDI-TOF destičku a nechá zaschnout. Posledním krokem je změření na přístroji MALDI-TOF MS.

## 4.7 Vytvoření izolátů

Pro konfirmaci kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* bylo nutné vytvořit ze vzorků izoláty. Z Petriho misky byla sterilně odebrána jedna kolonie, která se následně přenesla do penicilinové lahvičky s Wilkins-Chalgren bujónem a sójovým peptonem, který se označuje jako WSP bujón. Na výrobu 1 litru bujónu se používá 33 g Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth (Oxoid), 1 ml Tweenu 80 (Scharlab), 0,5 g cysteinu (Sigma-Aldrich s.r.o.) a 5 g sójového peptonu (Oxoid). Je nezbytné následně upravit pH do rozmezí 7,0–7,2. Penicilinová lahvička se nechala kultivovat ve 37 °C, dokud nebyl na dně lahvičky znatelný zákal. Následně byl každý izolát zkontrolován pod mikroskopem, jestli nedošlo ke kontaminaci. Čisté izoláty byly následně zamrazeny po přidání pufru s glycerinem určeného pro zamražení.

## 4.8 Konfirmační metoda

Konfirmace přítomnosti kvasinky *S. boulardii* byla provedena pomocí metody rozlišující schopnost využívat galaktózu, což je jednoduchý cukr. *S. cerevisiae* je schopna galaktózu využívat na rozdíl od *S. boulardii*, která galaktózu prakticky nemetabolizuje. Pro potvrzení *S. boulardii* byla použita pozitivní kontrola získaná z databáze kultur. Jako negativní kontrola byla použita kvasinka *S. cerevisiae*. Samotné kultivační médium neobsahovalo žádný cukr, tedy nemohly v něm kvasinky růst. Pro přípravu média o objemu 1 litr je nutné přidat 5 g tryptonu (Oxoid), 5 g Nutrient Broth n. 2 (Oxoid), dále 2,5 g kvasnicového extraktu (Oxoid), 0,25 g cysteinu (Sigma-Aldrich s.r.o.) a 0,5 ml Tweenu 80 (Scharlab). Jednotlivé vzorky byly kultivovány ve třech zkumavkách. Cukr se následně přidával zvlášť do první a druhé zkumavky. První zkumavka obsahovala glukózu o koncentraci 2 g/l. Druhá zkumavka obsahovala galaktózu o koncentraci 2 g/l. Třetí zkumavka byla použita jako kontrola a neobsahovala žádný cukr. Do každé zkumavky byl pipetou sterilně aplikován 1 ml izolátu konkrétního vzorku. Následně byly všechny zkumavky homogenizovány. Každý vzorek se kultivoval aerobně ve dvou teplotách, a to ve 30 a v 37 °C. Výsledek nárůstu a pomnožení kvasinky byl změřen na denzitometru od firmy McFarland. První měření proběhlo po zaočkování a další v intervalu 24 hodin po dobu tří dnů. Před změřením byly zkumavky vždy promíchány na vortexu. Na konci měření byla znovu zkontrolováno, zda se ve zkumavkách nenachází kontaminace.

Tabulka č. 3: Použité kultivační médium (zkumavky)

Médium	Složení	Koncentrace cukru
Ředící médium s glukózou	5 g/l trypton, 5 g/l Nutrient Broth n. 2, 2,5 g/l kvasnicový extrakt, 0,25 g/l cystein a 0,5 ml/l Tween 80	2 g/l glukózy
Ředící médium s galaktózou		2 g/l galaktózy
Ředící médium bez cukru		Bez cukru

## 4.9 Zpracování dat

### 4.9.1 Zpracování dat z Petriho misek

Kolonie na Petriho miskách byly spočítány podle možností na dvou až třech po sobě jdoucích ředění. Následně byla vypočítaná koncentrace nárůstu podle vzorce  $P = [(P1 + P2)/11] \times F$  (KTJ/g). P1, P2 je počet kolonií na dvou po sobě jdoucích počitatelných plotnách. F je převrácená hodnota vyššího ředění a KTJ – kolonie tvořící jednotka.

Výsledné koncentrace nárůstu kolonií byly převedeny na hodnotu logaritmu, takže bylo zajištěno normální rozložení dat.

#### 4.9.2 Zpracování dat z kultivace zkumavek

Při měření obsahu zkumavek na optickém denzitometru je nutné data upravit tak, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků. Jelikož se do zkumavek dávala inokulační dávka 1 ml izolátu daného druhu probiotika, tak bylo nezbytné změřit hodnotu po inokulaci. Data musela být upravena tak, že od hodnot nárůstu biomasy byla odečtena hodnota získaná po inokulaci. Tato úprava dat zajistila získání čistého nárůstu *S. boulardii* ve zkumavkách po 24, 48 a 72 hodinách. Statisticky se zpracovávala následně už pouze data čistého nárůstu kvasinky.



## 5 Výsledky

### 5.1 Výsledky plotnové kultivační metody

Tabulka č. 4: Aerobní kultivace; průměr hodnot Log (KTJ/g) ± směrodatná odchylka.

Probiotika\Média	GKCH	Extrakt z ječného sladu	Oxytetracyklin	Wilkins-Chalgren + MUP	Kvasnicový extrakt
BIOKULT	9,81 ± 0,04	9,43 ± 0,57	9,77 ± 0,04	9,84 ± 0,04	10,07 ± 0,02
COMPLIFLORA	9,19 ± 0,02	9,76 ± 0,04	9,00 ± 0,34	9,52 ± 0,07	9,74 ± 0,01
ENTERIS	10,09 ± 0,14	9,98 ± 0,03	9,89 ± 0,06	10,07 ± 0,11	10,02 ± 0,01
ENTEROL	9,85 ± 0,01	9,97 ± 0,08	9,94 ± 0,06	10,00 ± 0,14	9,56 ± 0,67
ENZYLEAF	9,40 ± 0,04	9,38 ± 0,03	8,38 ± 0,03	9,93 ± 0,49	8,74 ± 1,13
FAIRVITAL	9,73 ± 0,04	9,85 ± 0,02	8,32 ± 0,47	9,22 ± 0,52	9,57 ± 0,53
ULTRA LEVURA	10,11 ± 0,00	10,16 ± 0,03	10,09 ± 0,00	10,11 ± 0,03	10,19 ± 0,01
YOMOGI	10,31 ± 0,02	10,39 ± 0,03	10,26 ± 0,03	10,32 ± 0,00	10,38 ± 0,02

Tabulka č. 5: Anaerobní kultivace; průměr hodnot Log (KTJ/g) ± směrodatná odchylka.

Probiotika\Média	GKCH	Extrakt z ječného sladu	Oxytetracyklin	Wilkins-Chalgren + MUP	Kvasnicový extrakt
BIOKULT	8,53 ± 0,47	9,64 ± 0,17	9,77 ± 0,00	9,83 ± 0,06	8,46 ± 0,23
COMPLIFLORA	7,79 ± 0,21	9,64 ± 0,04	9,35 ± 0,01	9,49 ± 0,07	9,07 ± 0,07
ENTERIS	9,13 ± 0,76	9,12 ± 1,11	9,85 ± 0,04	9,86 ± 0,01	8,31 ± 0,98
ENTEROL	9,16 ± 0,20	10,00 ± 0,30	9,98 ± 0,08	10,03 ± 0,21	0,00 ± 0,00
ENZYLEAF	9,23 ± 0,44	9,62 ± 0,36	8,69 ± 0,30	9,29 ± 0,03	0,00 ± 0,00
FAIRVITAL	6,17 ± 5,35	9,75 ± 0,12	6,28 ± 5,44	9,19 ± 0,06	0,00 ± 0,00
ULTRA LEVURA	9,35 ± 0,47	9,74 ± 0,02	10,09 ± 0,04	9,97 ± 0,28	9,67 ± 0,00
YOMOGI	9,88 ± 0,46	9,85 ± 0,49	9,18 ± 0,11	10,26 ± 0,04	0,00 ± 0,00

## 5.2 Statistické zpracování dat z kultivace na plotnách

Tabulka č. 6: F-test všech faktorů

F-test rovnosti rozptylů; Log (KTJ/g) alfa = 0,05000					
Efekt	Suma čtverců (SS)	Stupně volnosti	Průměr čtverců (MS)	F	p
Intercept	19631,59	1	19631,59	23784,93	0,000000
Přípravek	108,06	7	15,44	18,70	0,000000
Médium	237,51	4	59,38	71,94	0,000000
AE/ANAE	122,19	1	122,19	148,04	0,000000
Přípravek*Médium	222,69	28	7,95	9,64	0,000000
Přípravek*AE/ANAE	58,25	7	8,32	10,08	0,000000
Médium*AE/ANAE	238,38	4	59,60	72,20	0,000000
Přípravek*Médium*AE/ANAE	179,74	28	6,42	7,78	0,000000
Error	132,06	160	0,83		

Nulová hypotéza byla stanovena tak, že u žádných z efektů neexistuje statisticky významný rozdíl rozptylů. Výsledkem F-testu bylo, že u všech efektů byla hodnota  $p < 0,05$ . Byla zamítnuta nulová hypotéza, jelikož bylo zjištěno, že každého ze sledovaných faktorů byl statisticky významný rozdíl u alespoň jednoho měření.

Tabulka č. 7: Homogenní skupiny;  $\pm$  směrodatná odchylka.

Číslo médiá	Tukeyův HSD test; Log (KTJ/g) Homogenní skupiny, alfa = 0,05000				
	Médium	Log (KTJ/g)	1	2	3
5	Kvasnicový extrakt	7,110370 $\pm$ 4,20			****
1	GKCH	9,232869 $\pm$ 1,51		****	
3	Oxytetracyklin	9,302964 $\pm$ 1,51	****	****	
2	Extrakt z ječného sladu	9,767624 $\pm$ 0,43	****		
4	Wilkins- Chalgren + MUP	9,807376 $\pm$ 0,39	****		

Tento typ statistického zpracování dat zobrazuje skupiny podle jejich vzájemné podobnosti. Skupiny měření, u kterých jsou uvedené hvězdičky, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl. Kultivační médium s kvasnicovým extraktem je jediné kultivační médium, jehož výsledek se statisticky odlišuje od všech ostatních druhů kultivačních médií.

Tabulka č. 8: Tukeyův test. Vliv probiotického přípravku na podobnost

Tukeyův HSD test; Log (KTJ/g) Homogenní skupiny, alfa = 0,05000						
Přípravek	Log (KTJ/g)	1	2	3	4	5
FAIRVITAL	7,808479				****	
EZYLEAF	8,264802				****	****
ENTEROL	8,847994	****				****
YOMOGI	9,084170	****	****			
COMPLIFLORA	9,254892	****	****	****		
BIOKULT	9,513831	****	****	****		
ENTERIS	9,631025		****	****		
ULTRA LEVURA	9,948732			****		

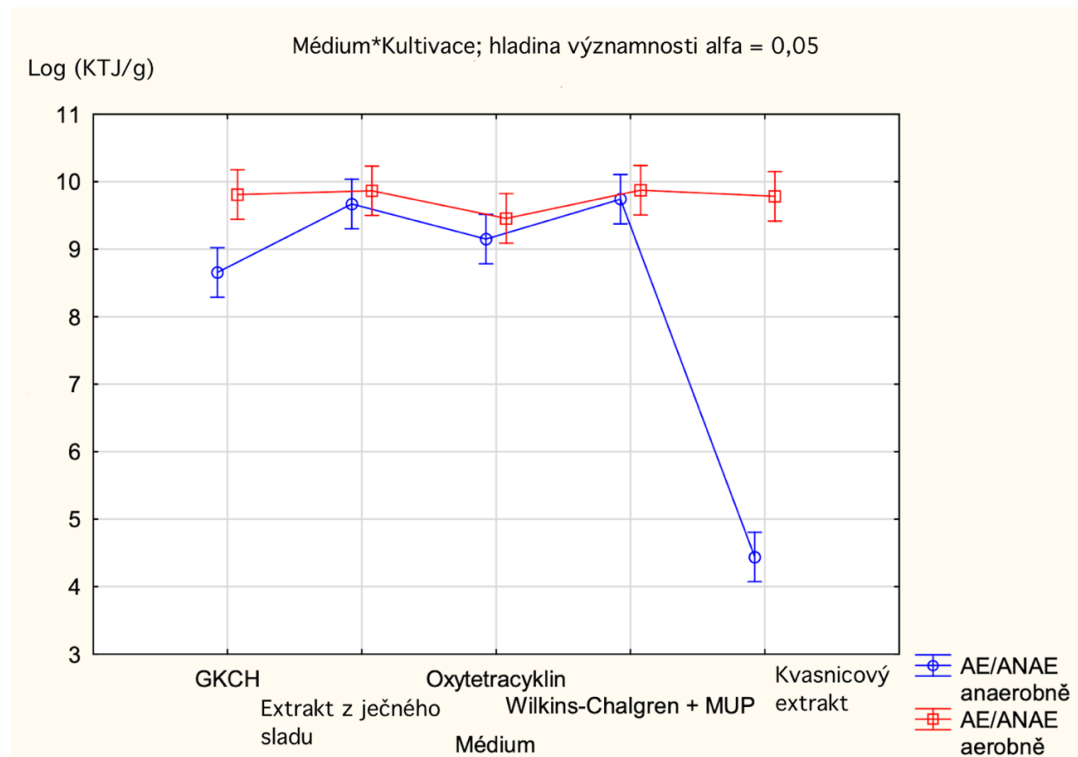
Z analýzy vyplývá, že testované vzorky byly na základě statisticky významných rozdílů rozděleny do pěti skupin.

Tabulka č. 9: Tukeyův test. Rozdělení podle druhu média a aerobní nebo anaerobní kultivace.

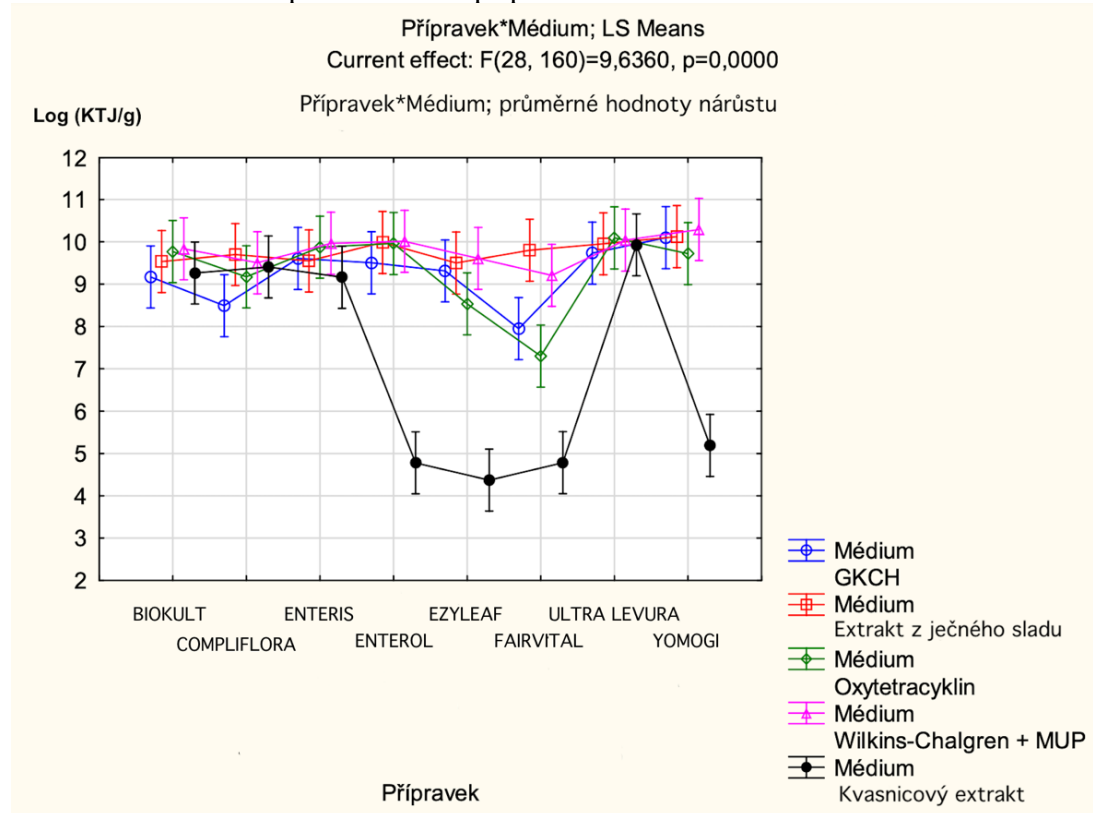
Tukeyův HSD test; Log (KTJ/g) Homogenní skupiny, alfa = 0,05000					
Médium	Kultivace	Log (KTJ/g)	1	2	3
Kvasnicový extrakt	anaerobně	4,44			****
GKCH	anaerobně	8,66		****	
Oxytetracyklin	anaerobně	9,15	****	****	
Oxytetracyklin	aerobně	9,46	****	****	
Extrakt z ječného sladu	anaerobně	9,67	****		
Wilkins-Chalgren + MUP	anaerobně	9,74	****		
Kvasnicový extrakt	aerobně	9,78	****		
GKCH	aerobně	9,81	****		
Extrakt z ječného sladu	aerobně	9,87	****		
Wilkins-Chalgren + MUP	aerobně	9,87	****		

Při testování vlivu kultivačního média a aerobního nebo anaerobního prostředí byly výsledky rozděleny do tří skupin. Kultivace na kvasnicovém agaru při anaerobních podmínkách se statisticky liší od všech dalších kombinací. Ovšem při aerobní kultivaci na stejném médiu je výsledek nárůstu kvasinky srovnatelný s většinou ostatních médií.

Graf č. 3: Znázornění vlivu médií a anaerobní/aerobní kultivace.



Graf č. 4: Vliv druhu probiotického přípravku a kultivačního média na růst kvasinek.



### 5.3 Výsledky confirmace na MALDI-TOF MS

Z důvodu, že v databázi mikroorganismů MALDI-TOF na České zemědělské univerzitě v Praze nebyla v roce 2023 uložena kvasinka *S. cerevisiae* var. *boulardii*, tak ji nebylo možné přesně potvrdit. Ovšem databáze obsahuje kvasinku *S. cerevisiae*. Při analýzách tedy bylo potvrzeno zařazení jednotlivých testovaných probiotických přípravků do rodu *Saccharomyces* a druhu *cerevisiae*.

### 5.4 Výsledky kultivace ve zkumavkách a statistické zpracování

Tabulka č. 10: Tukeyův test. Analýza statisticky významného rozdílu mezi dobou kultivace biomasy po 24, 48 a 72 hodin od zaočkování. Hladina významnosti alfa = 0,0500.

Tukey HSD test				
	Přípravek	Doba	MF-units	1
10	Compliflora	24	0,700000	****
12	Compliflora	72	0,733333	****
11	Compliflora	48	0,766667	****
7	Enterol	24	0,783333	****
8	Enterol	48	0,800000	****
15	Biokult	72	0,800000	****
13	Biokult	24	0,800000	****
29	Enteris	48	0,800000	****
9	Enterol	72	0,800000	****
26	Yomogi	48	0,800000	****
30	Enteris	72	0,816667	****
18	Ultra Levura	72	0,816667	****
24	Ezyleaf	72	0,816667	****
14	Biokult	48	0,833333	****
23	Ezyleaf	48	0,833333	****
27	Yomogi	72	0,850000	****
17	Ultra Levura	48	0,850000	****
20	Fairvital	48	0,850000	****
25	Yomogi	24	0,866667	****
21	Fairvital	72	0,866667	****
22	Ezyleaf	24	0,866667	****
28	Enteris	24	0,866667	****
16	Ultra Levura	24	0,866667	****
19	Fairvital	24	0,883333	****
1	<i>S. boulardii</i> 2019	24	0,900000	****
2	<i>S. boulardii</i> 2019	48	0,950000	****
3	<i>S. boulardii</i> 2019	72	0,966667	****
6	<i>S. cerevisiae</i>	72	1,650000	****
5	<i>S. cerevisiae</i>	48	1,700000	****
4	<i>S. cerevisiae</i>	24	1,700000	****

Neexistuje staticky významný rozdíl při měření růstu zákalu v závislosti na času měření. Hustota biomasy kvasinek byla konzistentní při měření po 24, 48 a 72 hodinách. Dále budou data vyhodnocována bez faktoru doby kultivace ve zkumavkách.

Tabulka č. 11: F-test. Měření statisticky významných rozdílů mezi rozptyly.

Efekt	F-test rovnosti rozptylů; MF-units; alfa = 0,05000				
	Suma čtverců (SS)	Stupně volnosti	Průměr čtverců (MS)	F	p
Intercept	151,6169	1	151,6169	14913,14	0,000000
Přípravek	12,1620	9	1,3513	132,92	0,000000
Teplota	3,3620	1	3,3620	330,69	0,000000
Cukr	153,9361	2	76,9681	7570,63	0,000000
Přípravek*Teplota	0,3747	9	0,0416	4,09	0,000131
Přípravek*Cukr	20,6983	18	1,1499	113,11	0,000000
Teplota*Cukr	5,6403	2	2,8202	277,39	0,000000
Přípravek*Teplota*Cukr	0,9697	18	0,0539	5,30	0,000000
Error	1,2200	120	0,0102		

Při porovnávání faktorů probiotického přípravku, teploty a druhu cukru na růst kultury byly u všech faktorů zjištěny statisticky významné rozdíly. Bylo proto nezbytné provést post-hoc analýzu. V tomto měření byly porovnávány vzorky probiotik s pozitivní kontrolou a s negativní kontrolou. Pozitivní kontrola byla *S. boulardii* a negativní kontrola byla *S. cerevisiae*.

Tabulka č. 12: Tukeyův test. Rozdělení do homogenních skupin podle přípravku.

Přípravek	Tukeyův test; alfa = 0,05000				
	MF-units	1	2	3	4
Compliflora	0,733333		****		
Enterol	0,794444	****	****		
Biokult	0,811111	****	****		
Enteris	0,827778	****	****		
Yomogi	0,838889	****	****	****	
Ezyleaf	0,838889	****	****	****	
Ultra Levura	0,844444	****		****	
Fairvital	0,866667	****		****	
<i>S. boulardii</i> 2019	0,938889			****	
<i>S. cerevisiae</i>	1,683333				****

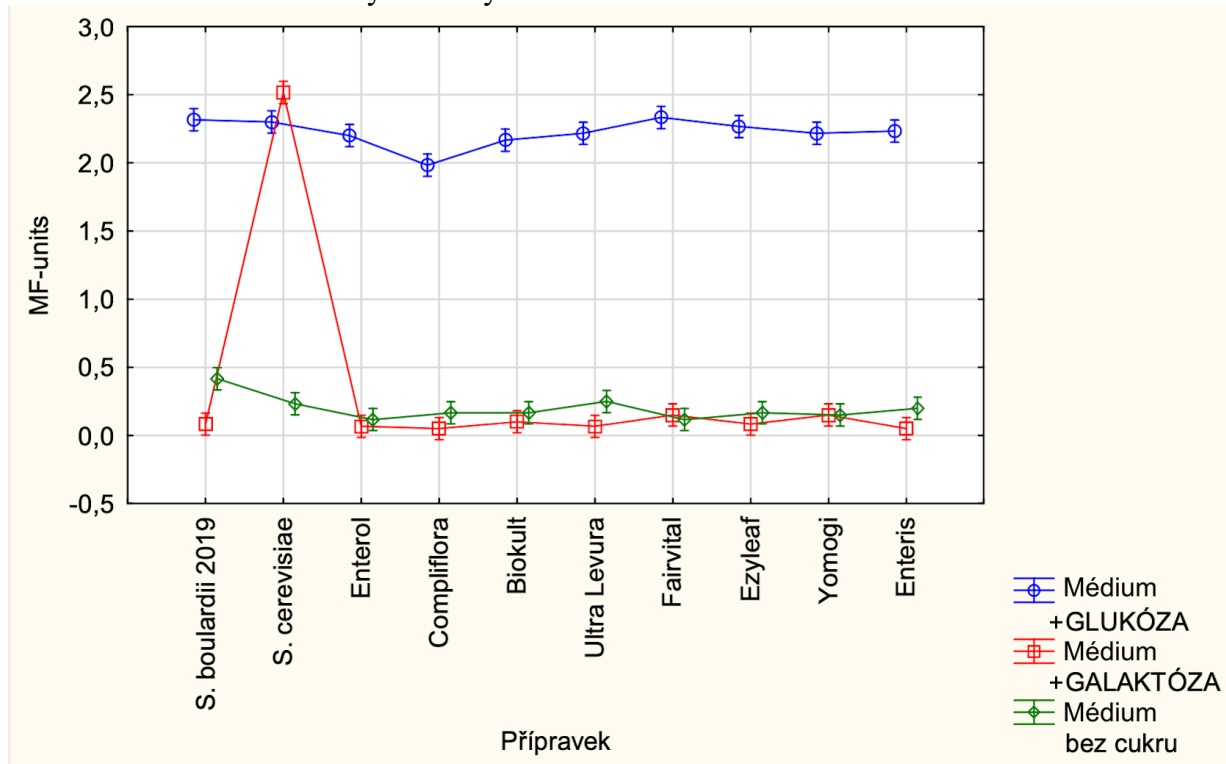
Kvasinka *S. cerevisiae* je statisticky odlišná od všech dalších měření. Jelikož má *S. cerevisiae* jiné vlastnosti, tak dochází k mírnému zkreslení dat. Proto byla následně *S. cerevisiae* ze statistické analýzy odebrána a byly použity pouze vzorky bez *S. boulardii*.

Tabulka č. 13: Homogenní skupiny s faktorem obsah cukru bez *S. cerevisiae*.

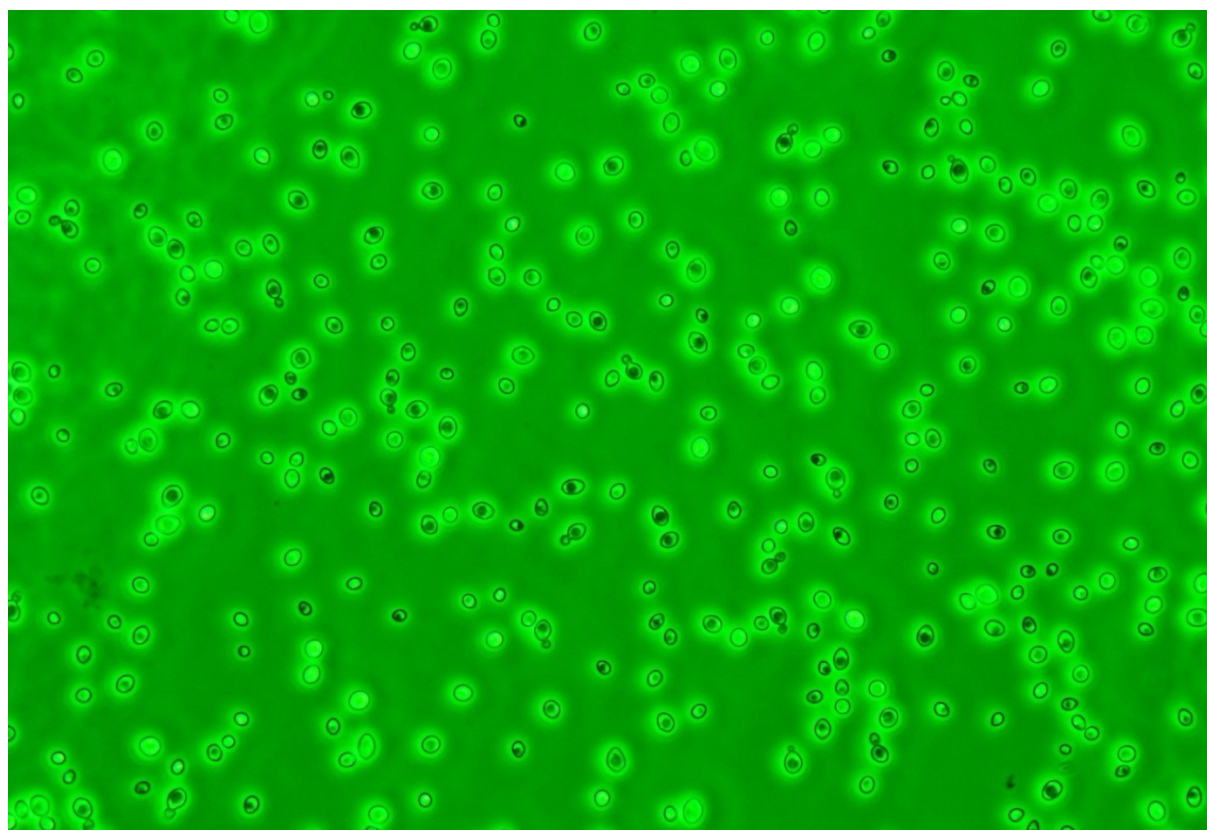
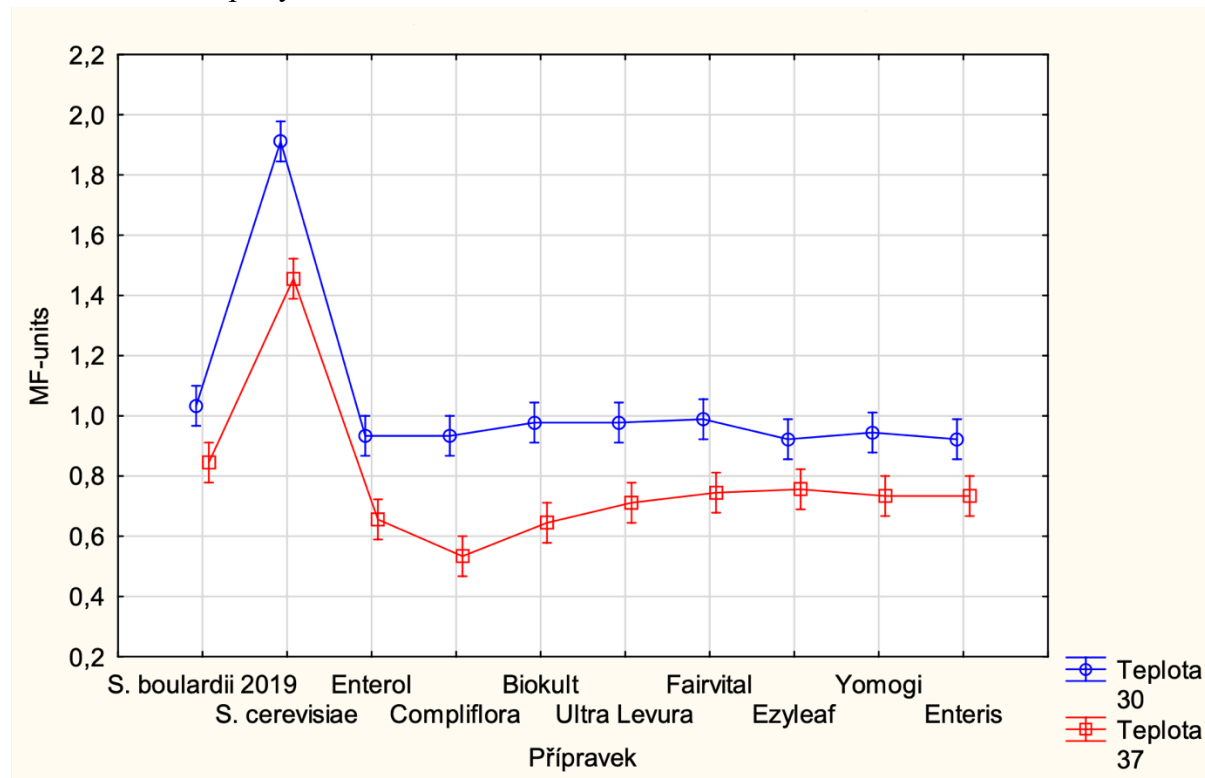
Tukeyův HSD test; alpha = ,05000			
Cukr	Jednotky MF	1	2
GALAKTÓZA	0,088889	****	
bez cukru	0,194444	****	
GLUKÓZA	2,214815		****

V případě měření vzorků obsahujících pouze *S. boulardii* bylo zjištěno, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi nárůstem biomasy v médiu bez cukru a s galaktózou o koncentraci 2 g/l. Prokázalo se, že všechny probiotické přípravky obsahují *S. boulardii*, jelikož kvasinka není schopná využívat galaktózu.

Graf č. 5: Naměřené hodnoty biomasy na denzitometru i s kvasinkou *S. cerevisiae*.



Graf č. 6: Vliv teploty na růst *S. cerevisiae* a *S. boulardii*



Obrázek č. 2: Potvrzení přítomnosti kvasinky v mikroskopu a kontrola kontaminace.



## 6 Diskuze

Zajištění optimálních kultivačních podmínek kvasinky *S. boulardii* je důležité pro její správné stanovení. České technické normy ISO 21527-1 a ISO 21527-2 zahrnutí metodiku horizontálního stanovení kvasinek a plísní v potravinách a krmivech. Ovšem tyto dvě normy neuvádějí metodiku pro konkrétní stanovení kvasinky *S. cerevisiae* var. *boulardii*. V ČSN ISO 21527-1 a ISO 21527-2 je uvedeno pouze stanovení kmenů kvasinky *S. cerevisiae*. Jelikož *S. boulardii* není přímo kmen, ale je to varianta druhu *S. cerevisiae*. To znamená, že momentálně v České republice není technická norma, která by stanovovala v potravinách nebo krmivech metodiku nebo podmínky pro kultivaci kvasinky *S. boulardii*. Při rozboru vzorků s kvasinkou tak může docházet k používání různých typů médií, a tedy dochází k nepřesnostem při porovnávání dat (ČSN ISO 21527-1. 2009; ČSN ISO 21527-2. 2009).

### 6.1 Kultivace na Petriho miskách

Kvasinka *S. boulardii* má využití primárně jako probiotický preparát. Ke stanovení optimální kultivace mikroorganismů zasahuje mnoho faktorů. Studie věnující se problematice kultivace kvasinky *S. boulardii* zahrnují faktory jako jsou teplota, pH, aerobní nebo anaerobní kultivace, inokulační dávka, rychlost třepání, zdroj uhlíku a jeho koncentrace, zdroj dusíku a jeho koncentrace, obsah NaCl, obsah etanolu a obsah dalších složek v kultivačním médiu. Také jsou publikovány studie testující použití *S. boulardii* namísto *S. cerevisiae*. Potenciál použití *S. boulardii* je v potravinářství nebo při zpracovávání vedlejších produktů. Dále byly publikovány studie se zaměřením na využití k fermentaci různých substrátů. Nejčastěji je v těchto případech používáno tekuté médium nebo nedefinovaný substrát. Jelikož různé studie provádějí výzkum v odlišných podmínkách, tak je těžké následně porovnat jejich výsledky.

Ve výsledcích práce vyšlo, že v některých případech vedlo použití kvasnicového kultivačního média při anaerobní kultivaci k úplné inhibici nárůstu *S. boulardii*. Ovšem v případě aerobní kultivace docházelo i na tomto médiu k nárůstu kolonií i přes to, že médium obsahuje pouze 5 g/l peptidů živočišného původu, 3 g/l kvasnicového extraktu a 15 g/l agaru. Ovšem v médiu nebyl přidán žádný cukr nebo jiný zdroj uhlíku nezbytný pro růst kvasinek. Stejný výsledek byl zaznamenán ve studii Hahn-Hägerdal et al. (2005) týkající se kultivace *S. cerevisiae*, kdy v médiu s obsahem 10 g/l kvasnicového extraktu a 20 g/l peptonu také došlo k nárůstu biomasy. Výsledná optická hustota v tomto médiu byla po 24 hodinách změřena na denzitometru a její hodnota byla mezi 3–4. Vysvětlením nárůstu kolonií na médiu bez přidaného cukru je, že v kvasnicovém extraktu může být obsažen nějaký zbytkový cukr. Kvasnicový extrakt může také eventuálně obsahovat laktát, který je také zdrojem uhlíku.

Článek se zabýval vlivem obsahu a koncentrace uhlíkatého zdroje na růst *S. boulardii*. Přičemž byl sledován nárůst *S. boulardii* v odpadní vodě po zpracování rýže. Ve studii měřili růst *S. boulardii* na čtyřech typech kultivačních médií. První médium obsahovalo pouze odpadní vodu z rýže parboiled. Druhé médium obsahovalo odpadní rýžovou vodu a 1 % sacharózy. Třetí médium obsahovalo rýžovou vodu a 3 % sacharózy. Čtvrté bylo složeno z rýžové vody a 1,5 % glycerolu. Kultivace probíhala dva dny ve třepačce při 28 °C. Nejhorší výsledek byl zjištěn u média obsahujícího pouze odpadní vodu ze zpracování rýže. Již během osmi hodin došlo k přechodu kvasinky do stacionární fáze a po 48 hodinách byla koncentrace

kolem  $120 \times 10^6$  KTJ/ml. Rýžová voda s 1,5 % glycerolu vykazovala druhý nejhorší výsledek s koncentrací po 48 hodinách kolem  $180 \times 10^6$  KTJ/ml. Vzorky s 1 a 3 % sacharózy měly koncentraci kolem  $210 \times 10^6$  KTJ/ml respektive  $240 \times 10^6$  KTJ/ml (Gaboardi et al. 2018). S tímto článkem je možné porovnat zkoumaná média kvasnicového extraktu, GKCH a oxytetracyklin. Rozdíl mezi médii byl primárně v obsahu cukru, kvasnicový extrakt žádnou přidanou glukózu neobsahoval. Na rozdíl od kultivační médií CKCH a oxytetracyklinu, která obsahují 2 % glukózy. Dalším rozdílem je obsah antibiotika, které by ovšem mělo mít na kultivaci *S. boulardii* zanedbatelný vliv. U kultivačního média s kvasnicovým extraktem byla průměrná hodnota  $1,29 \times 10^7$  KTJ/g. Oxytetracyklin médium obsahovalo  $2,01 \times 10^9$  KTJ/g a GKCH mělo  $1,71 \times 10^9$  KTJ/g. Tedy koncentrace na kvasnicovém agaru je o zhruba o dva řády nižší. Znamená to, že obsah sacharidů výrazně podporuje růst kvasinky. Trend výsledků při porovnání média s cukrem a bez cukru je v souladu s výše uvedeným článkem.

Při zkoumání vlivu druhu probiotického přípravku jako faktoru na růst *S. boulardii* bylo zjištěno, že vzorky probiotické kvasinky vykazovaly koncentrační rozdíl až dvou řádů. Všechny výsledky koncentrací jednotlivých přípravků byly přepočítané na navážku 1 gramu a zprůměrovány. Při porovnávání jednotlivých výsledků z kultivace bylo zjištěno, že nejmenší množství živých kvasinek bylo v preparátu fairvital s hodnotou  $1,3 \times 10^7$  KTJ/g. Vzorky ezyleaf a Enterol vykazovaly o řád vyšší počet. ezyleaf obsahoval  $1,84 \times 10^8$  KTJ/g a Enterol měl  $7,05 \times 10^8$  KTJ/g. Kultivací vzorku Yomogi byla stanovena koncentrace *S. boulardii*  $1,23 \times 10^9$  KTJ/g. Vzorek Compliflora obsahuje  $1,8 \times 10^9$  KTJ/g. U přípravku Biokult bylo stanoveno  $3,27 \times 10^9$  KTJ/g. Nejvyšší koncentraci kvasinek měl vzorek Ultra Levura s obsahem  $8,89 \times 10^9$  KTJ/g. Všechny stanovené přípravky splňovaly doporučení Světové zdravotnické organizace (WHO) a Organizace pro výživu a zemědělství (FAO), což je  $10^6$ – $10^7$  KTJ/g. Naopak doporučení Světové gastrointestinální organizace nebylo možno splnit požitím jedné tablety žádného z testovaných preparátů. Organizace doporučuje při některých diagnózách příjem alespoň  $5 \times 10^9$  KTJ. Doporučení nemůže být splněno příjmem jedné tablety, jelikož všechny testované tablety mají váhu nižší než jeden gram. Jedna tableta vzorku Ultra Levura váží pouze 250 mg. Pro splnění limitu by bylo nezbytné přijmout více než dvě tablety Ultra Levury (Lazo-Vélez et al. 2018).

Další studie porovnávala rozbor 15 různých probiotik. Jako inhibiční faktor byl použit chloramfenikol o koncentraci 0,025 %, což odpovídá 250 mg/l kultivačního média. Kultivace probíhala po dobu 48 hodin a při 37 °C. Byly prováděny mimo jiných také stanovení vzorků Enterol a Ultra Levura. Byly porovnány dvě metody. První metodou byla průtoková cytometrie. Tato metoda umožňuje stanovení počtu buněk pomocí jejich průtoku přes membránu, kde dochází na prosvícení laserovým paprskem. Výsledně odražené rozptýlené světlo se analyzuje. Druhou metodou byla klasické stanovení na plotnách se SAB médiem, což je Sabouraud Dextrose Agar. Vyšší počet buněk byl ve všech případech stanoven pomocí průtokové cytometrie. Konkrétně u vzorku Enterol byla hodnota  $3,55 \times 10^{10}$  KTJ/g oproti kultivaci s  $9,33 \times 10^9$  KTJ/g. U vzorku Ultra Levura bylo stanoveno  $1,2 \times 10^{10}$  KTJ/g buněk průtokovou cytometrií a  $5 \times 10^9$  KTJ/g kultivací (Vanhee et al. 2010). Hodnota stanovení Enterolu pomocí kultivační metody byla v této studii zhruba o jeden řád vyšší než při analýze Enterolu. Rozdíl může být způsoben jak odchylkou při zpracování vzorku, tak odlišnými skladovacími podmínkami probiotického přípravku. Výsledek stanovení probiotika Ultra Levura byl odpovídající.

Ve studii Lei et al. (2016) studuje optimalizaci kultivačního média pro růst *S. boulardii*. Ve této studii jsou zkoumány čtyři faktory, což jsou sacharóza, extrakt z ječného sladu, telecí krevní sérum a citran sodný. K zjištění výsledku byl použit statistický model dle Box-Behnkena. Výsledkem této studie je, že optimální médium pro kultivaci *S. boulardii* obsahuje 36,28 g/l sacharózy, 6,38 g/l extraktu z ječného sladu, 5,69 g/l telecího krevního séra a 5,3 g/l citranu sodného. Při porovnání s optimálním kultivačním médiem *S. cerevisiae* bylo zjištěno, že kromě odlišného poměru obě kvasinky preferují také některé odlišné ingredience. Hlavní složkou optimálního média pro stanovení *S. cerevisiae* byla sacharóza s 115,5 g/l, 10 g/l síranu amonného  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 25 g/l kvasnicového extraktu. Tento výsledek podtrhuje rozdílnost těchto dvou kvasinek.

Médium Wilkins-Chalgren vykázalo nejlepší výsledek pro kultivaci kvasinky *S. boulardii*. Vysvětlením může být, že se jedná o bohaté médium, které zároveň obsahuje prekurzory pro biosyntézu jako je pyruvát. Přidáním metabolických prekurzorů se snižuje energetická zátěž buňky, což může mít pozitivní vliv na její růst a rozmnožování (Hahn-Hägerdal et al. 2005).

## 6.2 Kultivace ve zkumavkách

Při kultivaci *S. boulardii* ve zkumavkách se zjišťovala schopnost růstu na kultivačním médiu s přidavkem galaktózy. Výsledek měl za prvé potvrdit přítomnost *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Tato kvasinka totiž není schopná galaktózu efektivně využít, a tedy v těchto podmínkách efektivně růst. Za druhé tato část experimentu měla za cíl sledovat a porovnávat růst na médiu bez jakéhokoliv cukru, na médiu s glukózou nebo na médiu s galaktózou. Třetím sledovaným parametrem byl růst během 30 a 37 °C. Při porovnání s negativní kontrolou *S. cerevisiae* a s pozitivní kontrolou *S. boulardii* 2019 jednoznačně vyšlo, že všechny testované probiotické vzorky nejsou schopny růst na médiu s galaktózou. Tímto se potvrdila přítomnost *S. boulardii* ve všech testovaných probiotikách. Také se potvrdilo, že *S. boulardii* na galaktóze lépe roste ve 30 °C než ve 37 °C. Stejný závěr byl zjištěn také ve studii (Liu et al. 2018).

Naopak odlišný výsledek v porovnání se studii byl zaznamenán při hodnocení vlivu teploty na růst kvasinky. Výsledkem bylo, že všechny kultivované kvasinky rostly lépe při 30 °C než při 37 °C. Ovšem všeobecně se v odborných článcích uvádí, že optimální teplota růstu *S. boulardii* je 37 °C. Shu et al. (2020) uvádí, že nejvyšší počet živých kvasinek a nejvíce vyprodukované biomasy se vyskytuje při teplotě 37 °C. Ovšem článek autorů (Hossain et al. 2020) znázorňuje v grafu, že nejvíce kvasinky rostly při 30 °C. Autoři Du et al. (2012) zase uvádějí, že nejvyšší produkce biomasy *S. boulardii* je při 32 °C.

Bylo by vhodné v budoucnu provést podrobnější studii, která by se zabývala kultivační teplotou. Tato studie by také mohla upřesnit dalších možné faktory ovlivňující růst kvasinky *S. boulardii* při teplotách 30 a 37 °C.

## 7 Závěr

Kvasinka *S. boulardii* je probiotický mikroorganismus, který se využívá pro podporu léčby při gastrointestinálních infekcích, jelikož je schopna potlačit růst některých patogenních mikroorganismů. Probiotikum je možné také používat jako prevenci například při cestování do zahraničí. *S. boulardii* vykazuje mnoho benefitů, ale již bylo popsáno několik případů rozvoje nebezpečné fungémie.

V práci bylo provedeno testování různých kultivačních podmínek pro podporu růstu *S. boulardii*. Testovanými faktory byla skladba kultivačního média, růst v aerobních a anaerobních podmínkách, teplota a také schopnost využití glukózy a galaktózy. Bylo otestováno celkem pět tuhých médií v aerobních a anaerobních podmínkách. Testovaná média obsahovala různé poměry živin. Zároveň bylo do některých z nich přidáno antibiotikum jako inhibiční faktor. V druhé části byly vzorky kultivovány ve zkumavkách při různé teplotě. Zároveň byla testována schopnost kvasinky růst v médiu s glukózou, galaktózou nebo úplně bez cukru.

Kultivační médium s nejlepším výsledkem je Wilkins-Chalgren s mupirocinem. Ovšem u médií Wilkins-Chalgren, extrakt z ječného sladu a oxytetracyklin nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl. Kultivace při aerobních podmínkách vykazovala lepší výsledky než kultivace při anaerobních podmínkách. Zároveň probiotikum s nejvyšším obsahem živých buněk byla Ultra Levura. Kultivované vzorky rostly lépe při 30 °C než při 37 °C.

## Přílohy

Příloha č. 1: Přehled použitých kultivačních médií (Petriho misky).

Médium	Složení	Přídavek	Inhibiční faktor
Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar (Oxoid)	10 g/l trypton, 10 g/l želatinový pepton, 5 g/l kvasnicový extrakt, 1 g/l glukóza, 5 g/l chlorid sodný, 1 g/l L-arginin, 1 g /l pyruvát sodný, 0,5 mg/l vitamin K a 5 mg/l hemin a 10 g/l agar	pepton 5 g/l, cystein 0,5 g/l, Tween 80 1 ml/l	100 mg/l mupirocin (Oxoid)
Kvasnicový extrakt (Millipore)	5 g/l peptidy živočišného původu, 3 g/l kvasnicový extrakt a 15 g /l agar		
Extrakt z ječného sladu (Millipore)	30 g/l extrakt z ječného sladu a 5 g/l houbový pepton a 15g/l agar		
Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract (Millipore)	5 g/l kvasnicový extrakt, 20 g/l glukóza a 12 g /l agar		100 mg/l oxytetracyklin (Milipore)
GKCH (MILCOM a.s.)	5 g/l kvasničného extraktu, 20 g/l glukózy, 15 g/l agaru		100 mg/l chloramfenikol (již v tekutém médiu)

## 8 Literatura

*Literatura byla generována pomocí volně dostupného citačního manažeru Mendeley - <https://www.mendeley.com/download-desktop/>*

- Abid R, Waseem H, Ali J, Ghazanfar S, Ali GM, Elsbali AM, Alharethi SH. 2022, May 1. Probiotic Yeast *Saccharomyces*: Back to Nature to Improve Human Health. MDPI.
- Alsammar H, Delneri D. 2020, March 16. An update on the diversity, ecology and biogeography of the *Saccharomyces* genus. Oxford University Press.
- Ansari F, Alian Samakkhah S, Bahadori A, Jafari SM, Ziaee M, Khodayari MT, Pourjafar H. 2021. Health-promoting properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy products. Taylor and Francis Ltd.
- Bagherpour G, Ghasemi H, Zand B, Zarei N, Roohvand F, Ardakani EM, Azizi M, Khalaj V. 2018. Oral administration of recombinant *Saccharomyces boulardii* expressing ovalbumin-CPE fusion protein induces antibody response in mice. *Frontiers in Microbiology* **9**. Frontiers Media S.A.
- Batista TM, Marques ETA, Franco GR, Douradinha B. 2014. Draft genome sequence of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* strain ATCC MYA-796. *Genome Announcements* **2**. American Society for Microbiology.
- Begaydarova R. Kh., Izteleuova A. M., Omarova G. M., Talipbekova Kh. D., Atakishiyeva V. R. 2017. Role of Enterol (*Saccharomyces boulardii*) in prevention and treatment of antibiotic associated diarrhea in children. *МЕДИЦИНА И ЭКОЛОГИЯ* **85**:44–49. Karaganda. Available from <https://repoz.qmu.kz/handle/123456789/178> (accessed March 2, 2024).
- Bourreille A et al. 2013. *Saccharomyces boulardii* does not prevent relapse of crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **11**:982–987.
- Brandaño RL et al. 1998. Intracellular Signal Triggered by Cholera Toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* **64**:564–568.
- Buts J-P, De Keyser N, Stilmant C, Sokal E, Marandi S. 2002. *Saccharomyces boulardii* Enhances N-Terminal Peptide Hydrolysis in Suckling Rat Small Intestine by Endoluminal Release of a Zinc-Binding Metalloprotease. *Pediatric Research* **51**:528–534.
- Buts JP, Dekeyser N, Stilmant C, Delem E, Smets F, Sokal E. 2006. *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation. *Pediatric Research* **60**:24–29.

- Cárdenas PA, Garcés D, Prado-Vivar B, Flores N, Fornasini M, Cohen H, Salvador I, Cargua O, Baldeón ME. 2020. Effect of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 as complementary treatment of *Helicobacter pylori* infection on gut microbiome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **39**:1365–1372. Available from <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03854-3>.
- Chan KM, Liu YT, Ma CH, Jayaram M, Sau S. 2013. The 2 micron plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*: A miniaturized selfish genome with optimized functional competence. *Plasmid* **70**:2–17. Academic Press Inc.
- Czerucka D, Piche T, Rampal P. 2007. Review article: Yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **26**:767–778.
- Du L, Hao R, Xiao D, Guo L, Gai W. 2012. Research on the characteristics and culture conditions of *Saccharomyces boulardii*. Pages 594–598 *Advanced Materials Research*.
- Edwards-Ingram L, Gitsham P, Burton N, Warhurst G, Clarke I, Hoyle D, Oliver SG, Stateva L. 2007. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:2458–2467.
- Edwards-Ingram LC, Gent ME, Hoyle DC, Hayes A, Stateva LI, Oliver SG. 2004. Comparative genomic hybridization provides new insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genome Research* **14**:1043–1051.
- Elbehiry A et al. 2022. How MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology Contributes to Microbial Infection Control in Healthcare Settings. *Vaccines* **10**. MDPI.
- Enache-Angoulvant A, Hennequin C. 2005. Invasive *Saccharomyces* Infection: A Comprehensive Review. *Invasive Saccharomyces Infection • CID:1559*. Available from <https://academic.oup.com/cid/article/41/11/1559/356155>.
- Fadhel M, Patel S, Liu E, Levitt M, Asif A. 2019. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a critically ill patient with acute cholangitis and long term probiotic use. *Medical Mycology Case Reports* **23**:23–25. Elsevier B.V.
- Feldmann H., editor. 2012. *Yeast: Molecular and Cell Biology* second. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Available from <https://www.wiley.com/en-us/Yeast%3A+Molecular+and+Cell+Biology%2C+2nd+Edition-p-9783527332526> (accessed November 11, 2023).
- Fietto JLR, Araújo RS, Valadão FN, Fietto LG, Brandão RL, Neves MJ, Gomes FCO, Nicoli JR, Castro IM. 2004. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Canadian Journal of Microbiology* **50**:615–621.
- Fu JJ, Liu J, Wen XP, Zhang G, Cai J, Qiao Z, An Z, Zheng J, Li L. 2022. Unique Probiotic Properties and Bioactive Metabolites of *Saccharomyces boulardii*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* DOI: 10.1007/s12602-022-09953-1. Springer.

- Gaboardi G, Gil de los Santos D, Mendes L, Centeno L, Meireles T, Vargas S, Griep E, de Castro Jorge Silva A, Moreira AN, Conceição FR. 2018. Bioremediation and biomass production from the cultivation of probiotic *Saccharomyces boulardii* in parboiled rice effluent. *Journal of Environmental Management* **226**:180–186. Academic Press.
- Gopalakrishnan R, Winston F. 2019. Whole-Genome Sequencing of Yeast Cells. *Current protocols in molecular biology* **128**:e103. NLM (Medline).
- Gu Y, Wang C, Qin X, Zhou B, Liu X, Liu T, Xie R, Liu J, Wang B, Cao H. 2022. *Saccharomyces boulardii*, a yeast probiotic, inhibits gut motility through upregulating intestinal serotonin transporter and modulating gut microbiota. *Pharmacological Research* **181**. Academic Press.
- Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Larsson CU, Gorwa-Grauslund M, Görgens J, van Zyl WH. 2005, November 10. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use.
- Hill C et al. 2014. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **11**:506–514. Nature Publishing Group.
- Hittinger CT. 2013. *Saccharomyces* diversity and evolution: A budding model genus. *Trends in Genetics* **29**:309–317.
- Hossain MN, Afrin S, Humayun S, Ahmed MM, Saha BK. 2020. Identification and Growth Characterization of a Novel Strain of *Saccharomyces boulardii* Isolated From Soya Paste. *Frontiers in Nutrition* **7**. Frontiers Media S.A.
- Hudson LE, McDermott CD, Stewart TP, Hudson WH, Rios D, Fasken MB, Corbett AH, Lamb TJ. 2016. Characterization of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the healthy mucosal immune system. *PLoS ONE* **11**. Public Library of Science.
- Jouhten P, Ponomarova O, Gonzalez R, Patil KR. 2016. *Saccharomyces cerevisiae* metabolism in ecological context. *FEMS Yeast Research* **16**:1–8. Oxford University Press.
- Justino PFC, Franco AX, Pontier-Bres R, Monteiro CES, Barbosa ALR, Souza MHLP, Czerucka D, Soares PMG. 2020. Modulation of 5-fluorouracil activation of toll-like/MyD88/NF- $\kappa$ B/MAPK pathway by *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 probiotic. *Cytokine* **125**. Academic Press.
- Kelesidis T, Pothoulakis C. 2012. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* **5**:111–125.



- Khatri I, Akhtar A, Kaur K, Tomar R, Prasad GS, Ramya TNC, Subramanian S. 2013. Gleaning evolutionary insights from the genome sequence of a probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Gut Pathogens* **5**.
- Khatri I, Tomar R, Ganesan K, Prasad GS, Subramanian S. 2017. Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Scientific Reports* **7**. Nature Publishing Group.
- Kim J, Cheong YE, Yu S, Jin YS, Kim KH. 2022. Strain engineering and metabolic flux analysis of a probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* for metabolizing l-fucose, a mammalian mucin component. *Microbial Cell Factories* **21**. BioMed Central Ltd.
- Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R. 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research* **14**:1068–1079. Blackwell Publishing Ltd.
- Lazo-Vélez MA, Serna-Saldívar SO, Rosales-Medina MF, Tinoco-Alvear M, Briones-García M. 2018, October 1. Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in food processing: a review. John Wiley and Sons Inc.
- Lei Z, Chen H, Huang D, Zhai Y, Shu G. 2016. OPTIMIZATION OF MEDIUM COMPOSITIONS FOR *SACCHAROMYCES BOULARDII* BY BOX-BEHNKEN DESIGN **17**:405–416.
- Liu J-J et al. 2018. A Mutation in PGM2 Causing Inefficient Galactose Metabolism in the Probiotic Yeast *Saccharomyces boulardii*. *Applied and Environmental Microbiology* **84**:1–12.
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. 2017. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2**. Springer Nature.
- Maftai NM, Raileanu CR, Balta AA, Ambrose L, Boev M, Marin DB, Lisa EL. 2024. The Potential Impact of Probiotics on Human Health: An Update on Their Health-Promoting Properties. *Microorganisms* **12**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
- McFarland L V. 2010. Systematic review and meta-analysis of *saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology* **16**:2202–2222. Baishideng Publishing Group Co.
- Middelhoven WJ, Notermans S. 1988. SPECIES-SPECIFIC EXTRACELLULAR ANTIGEN PRODUCTION BY ASCOMYCETOUS YEASTS, DETECTED BY ELISA. *J. Gen. Appl. Microbiol* **34**:15–26.
- Moré MI, Vandenplas Y. 2018. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 Improves Intestinal Enzyme Function: A Trophic Effects Review. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology* **11**. SAGE Publications Ltd.
- Nielsen J, Jewett MC. 2008. Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **8**:122–131.

- Oh GM, Moon W, Seo K Il, Jung K, Kim JH, Kim SE, Park MI, Park SJ. 2020. Changes in the Crohn's Disease Activity Index and Safety of Administering *Saccharomyces Boulardii* in Patients with Crohn's Disease in Clinical Remission: A Single Hospital-based Retrospective Cohort Study. *The Korean journal of gastroenterology* = *Taehan Sohwagi Hakhoe chi* **76**:314–321. NLM (Medline).
- Onyema VO, Amadi OC, Moneke AN, Agu RC. 2023. A Brief Review: *Saccharomyces cerevisiae* Biodiversity Potential and Promising Cell Factories for Exploitation in Biotechnology and Industry Processes – West African Natural Yeasts Contribution. *Food Chemistry Advances* **2**:1–12. Elsevier Ltd.
- Pais P, Almeida V, Yilmaz M, Teixeira MC. 2020. *Saccharomyces boulardii*: What makes it tick as successful probiotic? *Journal of Fungi* **6**:1–15. MDPI AG.
- Pais P, Oliveira J, Almeida V, Yilmaz M, Monteiro PT, Teixeira MC. 2021. Transcriptome-wide differences between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*: Clues on host survival and probiotic activity based on promoter sequence variability. *Genomics* **113**:530–539. Academic Press Inc.
- Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra AS, Hatziloukas E. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology* **6**:1–31. AIMS Press.
- Pontier-Bres R, Rampal P, Peyron JF, Munro P, Lemichez E, Czerucka D. 2015. The *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 strain shows protective effects against the *B. anthracis* LT toxin. *Toxins* **7**:4455–4467. MDPI AG.
- Ramírez-Cota GY, López-Villegas EO, Jiménez-Aparicio AR, Hernández-Sánchez H. 2021. Modeling the Ethanol Tolerance of the Probiotic Yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 for its Possible Use in a Functional Beer. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **13**:187–194. Springer.
- Rannikko J et al. 2021. Fungemia and other fungal infections associated with use of *saccharomyces boulardii* probiotic supplements. *Emerging Infectious Diseases* **27**:2103–2109. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
- Semin I, Ninnemann J, Bondareva M, Gimaev I, Kruglov AA. 2021. Interplay Between Microbiota, Toll-Like Receptors and Cytokines for the Maintenance of Epithelial Barrier Integrity. *Frontiers in Medicine* **8**. Frontiers Media S.A.
- Sen S, Mansell TJ. 2020. Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genetics and Biology* **137**. Academic Press Inc.
- Shah K, Maghsoudlou P. 2016. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine* **77**:C98–C101.
- Shu G, Yang X, Chen L, Huang D, Lei Z, Chen H. 2020. STATISTICAL OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS FOR SACCHAROMYCES

BOULARDII VIA CENTRAL COMPOSITE DESIGN. Universitatea “Vasile Alecsandri” din Bacau **21**:227–242.

- Singh RP, Bhardwaj A. 2023.  $\beta$ -glucans: a potential source for maintaining gut microbiota and the immune system. *Frontiers in Nutrition* **10**. Frontiers Media S.A.
- Stier H, Bischoff SC. 2016. Influence of *saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on the gut-associated immune system. *Clinical and Experimental Gastroenterology* **9**:269–279. Dove Medical Press Ltd.
- Terciolo C, Dapoigny M, Andre F. 2019. Beneficial effects of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on clinical disorders associated with intestinal barrier disruption. *Clinical and Experimental Gastroenterology* **12**:67–82. Dove Medical Press Ltd.
- Vanhee LME, Goemé F, Nelis HJ, Coenye T. 2010. Quality control of fifteen probiotic products containing *Saccharomyces boulardii*. *Journal of Applied Microbiology* **109**:1745–1752.
- Wang B, Hussain A, Zhou Y, Zeng Z, Wang Q, Zou P, Gong L, Zhao P, Li W. 2020. *Saccharomyces boulardii* attenuates inflammatory response induced by *Clostridium perfringens* via TLR4/TLR15-MyD88 pathway in HD11 avian macrophages. *Poultry Science* **99**:5356–5365. Elsevier Inc.
- Wombwell E, Bransteitter B, Gillen LR. 2021. Incidence of *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in hospitalised patients administered *Saccharomyces boulardii* probiotic. *Mycoses* **64**:1521–1526. John Wiley and Sons Inc.
- Yamamura R, Inoue KY, Nishino K, Yamasaki S. 2023. Intestinal and fecal pH in human health. *Frontiers in Microbiomes* **2**. Frontiers Media SA.
- Yang X, Shu G, Lei Z, Du G, Liu Z, Cao J. 2019. Effect of Carbon Sources, Nitrogen Sources and Prebiotics on Growth of *Saccharomyces Boulardii*. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology* **23**:101–108. Walter de Gruyter GmbH.