

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



Stanovení *Lactobacillus casei* v probiotických potravinách
Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Eva Popelářová Ph.D.

Autor práce: Ladislav Adámek

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Stanovení *Lactobacillus casei* v probiotických potravinách vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze, dne

.....

Rád bych poděkoval své vedoucí bakalářské práce Ing. Evě Popelářové Ph.D. za odborné vedení a věcné připomínky k této práci.

Velké poděkování patří také Ing. Šárce Ročkové za vedení při praktické části bakalářské práce a její ochotu a věnovaný čas při konzultacích.

Souhrn

Dnešní uspěchaný životní styl, spolu s dalšími faktory, jako je charakter stravy, užívání léků (např. antibiotik) či některá onemocnění, může mít negativní vliv na složení a správnou funkci střevní mikroflóry, což může vyvolat poruchy střevní činnosti. V současné době se dostávají do podvědomí lidí ve větší míře probiotické potraviny. Tyto potraviny obsahují bakterie prospěšné pro lidský organismus. Jde především o zástupce z rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*. Vhodné složení probiotických mikroorganismů v potravě umožňuje obnovu střevní mikroflóry a zvýšení obranné reakce organismu.

Cílem bakalářské práce bylo stanovení počtu živých buněk bakterie *Lactobacillus casei* v probiotických výrobcích a potravinách. Byla použita různá selektivní média a izolované kolonie byly identifikovány pomocí biochemických testů API 50 CHL.

Ke stanovení *Lactobacillus casei* v mléčných výrobcích byla použita živná média Rogosa, MRS - B a MRS - LP. Při stanovení *Lactobacillus casei* v probiotických tabletách média MRS, M - RTLV, MRS - V. Jako kontrola růstu bakterií na těchto agarech byly použity sbírkové kultury: *L. casei* 1752, *L. casei* Shirota, *L. casei* Danone, *L. casei*, *L. paracasei subsp. paracasei* (Yakult), *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Živné půdy MRS - B a MRS - LP byly schopny spolehlivě inhibovat růst startovacích kultur v mléčných výrobcích (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*). Tato média lze použít k vyčíslení obsahu *Lactobacillus casei* pokud se vyskytuje ve výrobku společně jen se základní startovací kulturou. Při kultivaci s *Lactobacillus acidophilus* nelze tyto dvě bakterie spolehlivě odlišit.

U agaru M - RTLV byla potvrzena jeho schopnost selektovat bakterie *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus* od většiny laktobacilů a bifidobakterií.

Živná půda MRS - V měla selekční schopnost založenou na vysoké teplotě kultivace a přídavku antibiotika Vancomycinu. Její inhibiční schopnost se nepotvrdila.

V bakalářské práci použitý biochemický test API 50 CHL nebyl vhodný pro identifikaci *Lactobacillus casei*. Při identifikaci sbírkových kultur API 50 CHL byly všechny kmeny *Lactobacillus casei* určeny jako *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*. Při identifikaci bude lépe využít jiný biochemický nebo genetický test.

Obsah probiotické bakterie *Lactobacillus casei* v testovaných tabletách se pohyboval v rozmezí 10^6 až 10^9 KTJ. Jednotlivé druhy tablet se v obsahu probiotické bakterie statisticky významně lišily. Vzorky č. 2, 4, 7 vykazovaly nižší nárůst *Lactobacillus casei* než je deklarováno výrobcem. Obsah se však pohyboval nad 10^6 KTJ což je stále v souladu s vyhláškou Ministerstva zemědělství.

Nižší nárůst na živné půdě mohl být způsoben selekčními vlastnostmi půdy, která nevytvořila zcela ideální podmínky pro růst *Lactobacillus casei*.

Obsah *Lactobacillus casei* v testovaných mléčných výrobcích se pohyboval v rozmezí 10^4 až 10^7 KTJ. U vzorku č. 10 byl obsah bakterie menší než 10^6 KTJ a nesplňoval vyhláškou stanovené minimum. U ostatních vzorků byl nárůst vyrovnaný a hodnoty na jednotlivých médiích se statisticky významně nelišily.

Pro další určování počtu živých buněk *Lactobacillus casei* v probiotických výrobcích by bylo zajímavé vyzkoušet živnou půdu LC – agar jak navrhuje Ravula a Shah (1998).

Klíčová slova: *Lactobacillus casei*, probiotika, trávicí trakt, M – RTLV agar, API 50 CHL

Summary

Today's fast-paced and hurried lifestyle along with other factors such as types of food, pharmaceutical drug administration (e.g. antibiotics) or some types of diseases can negatively influence composition and function of gut microflora leading to intestinal disorders. People are more aware of probiotic foods nowadays. Probiotic foods are any foods that contain live bacteria beneficial for human digestive system. The most common of these are *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Streptococcus*. Right composition of probiotic microorganisms in food can bring significant health benefits including regeneration of the gut microflora and enhancement of the immune system.

The aim of this work was to enumerate total numbers of live *Lactobacillus casei* bacteria cells in probiotic products and foods. Various selective mediums were used and isolated colonies were identified using API 50 CHL biochemical tests.

Rogosa, MRS - B and MRS - LP growth mediums were used to identify *Lactobacillus casei* in dairy products. MRS, M - RTLV and MRS - V growth mediums were used to identify *Lactobacillus casei* in probiotic tablets. Following bacteria cultures were used as bacteria growth control: *L. casei* 1752, *L. casei* Shirota, *L. casei* Danone, *L. casei*, *L. paracasei subsp. paracasei* (Yakult), *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*.

MRS - B and MRS - LP growth mediums were able to reliably inhibit starter cultures in dairy products (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*). These growth mediums are suitable to be used to enumerate number of *Lactobacillus casei* if there is only starter culture present in the product. When there is also *Lactobacillus acidophilus* present in the culture, it is impossible to reliably differentiate these two bacteria.

M - RTLV agar was evaluated to be suitable to select *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus* bacteria from most of other *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

MRS - V growth medium with Vancomycin antibiotics added, cultivated at high temperature is suitable for enumeration. Its ability to inhibit the growth was not confirmed.

API 50 CHL biochemical test used in this work was not suitable for *Lactobacillus casei* identification. All *Lactobacillus casei* strains were identified as *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* when API 50 CHL growth medium was used.

Number of *Lactobacillus casei* probiotic bacteria in tested tablets ranged between 10^6 to 10^9 CFU. Each type of tablet showed significant statistical difference in number of probiotic bacteria. Growth of samples No. 2, 4, 7 was lower than was declared by manufacturer. The number was still over 10^6 CFU according to Ministry of Agriculture regulation.

Lower growth on growth medium could be caused by selective quality of medium that did not create ideal conditions for *Lactobacillus casei* growth.

Number of *Lactobacillus casei* in tested dairy products ranged between 10^4 to 10^7 CFU. Number of probiotic bacteria in sample No. 10 was lower than 10^6 CFU and therefore it didn't meet the minimum number determined by regulation. Growth of all other samples was balanced and individual medium figures didn't significantly differ.

It would be interesting to try LC - agar as growth medium for further *Lactobacillus casei* live cells enumerating as suggested by Ravula and Shah (1998).

Key words: *Lactobacillus casei*, probiotics, gastrointestinal tract, M – RTL V agar, API 50 CHL

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární rešerše	2
2.1. Gastrointestinální trakt	3
2.1.1. Mikroflóra v jednotlivých částech trávicího traktu	3
2.1.2. Střevní mikroflóra v průběhu života	6
2.2. Funkční potraviny	7
2.2.1. Probiotika	8
2.2.1.1. Historie probiotik	8
2.2.1.2. Definice probiotik	9
2.2.1.3. Formy probiotik	11
2.2.2. Prebiotika	12
2.2.3. Synbiotika	13
2.3. Používané bakteriální kmeny	13
2.3.1. Rod <i>Bifidobacterium</i>	13
2.3.2. Rod <i>Streptococcus</i>	15
2.3.3. Rod <i>Lactococcus</i>	16
2.3.4. Rod <i>Lactobacillus</i>	17
2.3.4.1. Význam laktobacilů	19
2.3.4.2. Kultivační vlastnosti	20
2.3.4.3. Metody identifikace	20
2.3.4.3.1. <i>Lactobacillus casei</i>	21
2.3.4.3.2. Kultivace <i>Lactobacillus casei</i>	22
3. Cíl práce	24
4. Materiál a metody	25
4.1. Odběr vzorků	25
4.1.1. Charakteristika vzorků	26

4.2.	Mikrobiologický rozbor	27
4.2.1.	Stanovení počtu mikroorganismů	27
4.2.2.	Příprava ředící řady	28
4.2.3.	Stanovení počtu <i>Lactobacillus casei</i>	28
4.2.4.	Sbírkové kultury	29
4.2.5.	Složení a příprava kultivačních médií	29
4.3.	Pracovní postup	32
4.3.1.	Inokulace živné půdy	32
4.3.2.	Kultivace	32
4.3.3.	Vyhodnocení po kultivaci	33
4.3.4.	API	33
4.3.4.1.	Příprava izolátu pro API 50 CH	34
5.	Výsledky	35
5.1.	Výsledky kultivací	35
5.2.	Výsledky API 50 CHL	38
6.	Diskuze	40
7.	Závěr	44
8.	Seznam literatury	45
9.	Seznam použitých zkratk	49
10.	Samostatné přílohy	50

1. Úvod

Dnešní uspěchaný životní styl, spolu s dalšími faktory, jako je charakter stravy, užívání léků (např. antibiotik) či některá onemocnění, může mít negativní vliv na složení a správnou funkci střevní mikroflóry, což může vyvolat poruchy střevní činnosti.

Do popředí zájmu spotřebitelů se proto v současné době dostávají ve větší míře probiotické potraviny. Probiotické potraviny obsahují bakterie prospěšné pro lidský organismus. Jde především o zástupce z rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

Při správném složení probiotických kmenů dochází k obnově střevní mikroflóry a zvýšení obranné reakce organismu. Dnes je popsáno mnoho pozitivních účinků probiotických bakterií na náš organismus, ale jen málo z nich je skutečně podloženo dlouhodobým výzkumem. Mezi pozitivní účinky patří např. zlepšení zažívání, pravidelnost stolice, zvýšení odolnosti proti průniku infekcí, posílení intestinální mikroflóry při tlumení alergických reakcí, zlepšení kvality života pacientů se zánětlivým onemocněním střev, zmírnění symptomů intolerance laktózy. V současné době se o probiotikách mluví také jako o pomocníkovi proti vzniku rakoviny tlustého střeva. Rakovina tlustého střeva je dnes velmi rozšířená a vhodnou stravou se jí dá předejít.

Probiotické bakterie jsou v potravině ve formě životaschopných buněk, kterých je k jejich účinku potřeba velké množství. Bakterie musí být schopné projít trávicím traktem a odolat kyselému prostředí žaludku. V místě působení musí být schopné se množit. Vyhláškou Ministerstva zemědělství je určeno, že probiotické výrobky musí obsahovat nejméně 10^6 KTY bakterií v 1 ml nebo 1 g. Toto minimum je nutné u výrobků sledovat a dodržovat teploty skladování a správnou přepravu. Při porušení teplotního rozmezí u daného výrobku během dopravy od výrobce ke spotřebiteli může totiž dojít k poklesu počtu bakterií a ke znehodnocení výrobku.

Zájem lidí a vědců o probiotika bude nejspíše i v budoucnu stoupat. K lidem se informace o probiotických bakteriích dostávají především od výrobců, z reklamy a jiných médií. Mnoho výrobců se tyto bakterie snaží přidávat do velkého množství svých produktů, jako jsou např. zakysané mléčné výrobky, ovocné šťávy, jogurtové nápoje, salámy.

Je důležité funkci těchto bakterií i nadále zkoumat a zjišťovat jejich přínos pro lidský organismus.

2. Literární rešerše

Mikrobiologie představuje souhrn věd, které se zabývají studiem mikroorganismů. Jako mikroorganismy označujeme jednobuněčné nebo vícebuněčné organismy viditelné pouze mikroskopicky, které jsou schopny tvořit samostatné funkční jednotky. Z hlediska své struktury jsou mikroorganismy značně heterogenní skupinou, jejich společným znakem jsou velmi malé rozměry jejich těl, od několika desetin mikrometrů (μm) po několik desetin milimetrů (odtud název – *mikros* znamená řecky malý). Mezi mikroorganismy řadíme viry, bakterie, sinice (cyanobakterie), archea, prvoky, některé houby a řasy. Viry nemají buněčnou strukturu; bakterie, archea a sinice mají prokaryotický typ buňky, kdežto houby, řasy a prvoci mají eukaryotický typ buněk.

Mikroorganismy se uplatňují v mnoha oblastech, studiem jejich činnosti se proto zabývá řada specializovaných oborů.

Potravinářská mikrobiologie má dlouholetou tradici, zejména pak mlékařská mikrobiologie, která je základem mlékárenského průmyslu. Významná je i mikrobiologie masného, konzervářského, pekařského, mlynářského a kvasného průmyslu a dalších výrob. Důležitou složkou potravinářské mikrobiologie je mikrobiologie zkoušení potravin a jejich surovin včetně vody, mikrobiologická kontrola čistoty provozů a obalů sledujících kvalitu, trvanlivost a hygienickou nezávadnost potravin (Čechová a Janalíková, 2007).

Mikrobiologie má úzký vztah k některým dalším biologickým disciplínám, zejména pak ke genetice, molekulární biologii a biochemii. Sledování metabolismu mikroorganismů umožnilo vysvětlit průběh většiny důležitých biochemických reakcí, které jsou společné většině organismů.

Člověk již odpradávně využíval životní činnosti mikroorganismů k vlastnímu životu a uměl jejich činnost řídit, aniž měl tušení o jejich existenci. Výroba alkoholických nápojů, kysaných nápojů z mléka, výroba sýrů, octa, chleba a kyselého zelí, konzervace potravin, zpracování kůží, máčení lnu a jiné lidské činnosti založené na činnosti mikroorganismů jsou staré téměř jako lidstvo samo (Čechová a Janalíková, 2007).

2.1. Gastrointestinální trakt

V odborné literatuře je často uváděn termín mikrobiální ekosystém člověka. Je tím míněno kvalitativní i kvantitativní složení mikroflóry na různých místech trávicího ústrojí a výskyt různých biogenních a abiogenních faktorů ve stejných lokalitách a vzájemné ovlivňování těchto faktorů a mikroflóry. Jako eubióza je označováno normální mikrobiální osídlení určitého biotypu v příslušné části trávicí trubice. To znamená, že mikrobiocenóza je se svým hostitelem v rovnováze. Jestliže se ovšem jakýmkoliv způsobem změní prostředí, dochází také ke změnám v mikrobiálním osídlení (Hrubý a Turek, 1989).

Mikroflóra trávicí trubice, jak již bylo naznačeno, je velice komplexní ekosystém, ve kterém existuje řada vzájemných vazeb. Pro jejich vymezení se nejčastěji používají termíny:

- Symbióza - označuje vztah, kdy mikroby jsou ve společné, velice úzké vzájemně výhodné asociaci v každém momentu jejich soužití, což v trávicí trubici nastává velmi omezeně.
- Mutualismus - termín postihuje vzájemně výhodnou asociaci.
- Komensalismus - výhodná asociace pouze pro jednoho účastníka bez škodlivého vlivu na druhého.
- Parasitismus - asociace, kdy jeden z účastníků žije na úkor druhého (Voříšek, 1989).

Důležitou funkcí mikrobiální populace v gastrointestinální trubici je zvýšení odolnosti hostitele k bakteriálním onemocněním trávicí soustavy. Tato situace je způsobena především tím, že patogenní mikroorganismy musí soutěžit s indigenní mikroflórou. Obecně je možno konstatovat, že při eubióze, tj. rovnovážném vztahu mezi živočichem a jeho tělesnou mikroflórou, přítomnost mikroorganismů přináší svému hostiteli v této oblasti především výhody (Voříšek, 1989).

2.1.1. Mikroflóra v jednotlivých částech trávicího traktu

Celkový počet mikroorganismů v trávicím traktu zahrnuje 400 – 500 mikrobiálních druhů. Je velmi obtížné stanovit tzv. normální fyziologickou mikroflóru trávicího traktu. Trávicí trakt má totiž poměrně širokou variabilitu nejen kvantitativní, ale zejména kvalitativní. Trávicí trakt se liší v jednotlivých geografických oblastech, je ovlivněn stravovacími návyky, vyvíjí se během lidského života (Zbořil, 2005).

Z klinického hlediska je normální fyziologická mikroflóra definovatelná jako soubor mikroorganismů, které mohou být přítomny v digestivním traktu zdravého člověka. To však neznamená, že za určitých okolností (např. imunokompromitace pacienta v důsledku choroby či léčby) se nemůže uplatnit jejich patogenní potenciál (Zbořil, 2005).

Kvantitativní rozložení bakteriální mikroflóry trávicího traktu je charakterizováno aborálním růstem mikroorganismů;

- žaludek a duodenum $10^1 - 10^3$ / ml mikroorganismu;
- jejunum a ileum $10^4 - 10^8$ / ml mikroorganismu;
- kolon $10^{10} - 10^{12}$ / ml mikroorganismu.

Kvalitativní zastoupení v jednotlivých oddílech;

- žaludek a duodenum - laktobacily, streptokoky, kvasinky;
- jejunum a ileum - laktobacily, koliformní bakterie, streptokoky, bakteroidy, bifidobakterie, fusobakterie;
- kolon - bakteroidy, bifidobakterie, streptokoky, eubakterie, fusobakterie, koliformní bakterie, klostridia, veillonely, laktobacily, proteus, stafylokoky, pseudomonády, kvasinky (Zbořil, 2005).

Tab. 1: Lidská gastrointestinální flóra podle Salminen et al. (2004)

	žaludek	jejunum	ileum	kolon
celkové množství bakterií (ml)	0- 10^3	0- 10^5	10^3 - 10^9	10^{10} - 10^{12}
aeroby nebo fakultativní anaeroby				
koliformní bakterie	0- 10^2	0- 10^3	10^2 - 10^7	10^4 - 10^{10}
streptokoky aerobní	0- 10^3	0- 10^4	10^2 - 10^6	10^5 - 10^{10}
stafylokoky	0- 10^2	0- 10^3	10^2 - 10^5	10^4 - 10^9
laktobacily	0- 10^3	0- 10^4	10^2 - 10^5	10^6 - 10^{10}
plísň/kvasinky	0- 10^2	0- 10^2	10^2 - 10^4	10^4 - 10^6
anaeroby				
bakteroidy	ojediněle	0- 10^3	10^3 - 10^7	10^{10} - 10^{12}
bifidobakterie	ojediněle	0- 10^3	10^3 - 10^8	10^8 - 10^{11}
streptokoky anaerobní	ojediněle	0- 10^3	10^2 - 10^6	10^{10} - 10^{12}
klostridie	ojediněle	ojediněle	10^2 - 10^4	10^6 - 10^{11}
eubakterie	ojediněle	ojediněle	ojediněle	10^9 - 10^{12}

Z přehledu vyplývá, že probíhá postupná proměna mikrobiálního ekosystému od převahy aerobů orálně k převaze anaerobů v aborálních oddílech. Jejich vzájemný poměr ukazuje tabulka č. 2 (Zbořil, 2005).

Tab. 2: Proměna mikrobiálního ekosystému

oddíl GIT	anaeroby : aeroby
tenké střevo	1 : 1
orální kolon	100 : 1
aborální kolon	1000 : 1

G. Gibson a M. Roberfroid nabízejí jiné schéma kvantitativní a kvalitativní struktury mikroflóry trávicího traktu s ohledem na potenciální patogenní efekt. Rozlišují bakterie na potenciálně patogenní a projektivní. Potenciálně patogenní jsou v jejich pojetí ty, které se mohou stát zdrojem oportunní infekce buď přímo, nebo prostřednictvím svých toxinů, pokud kvantitativně přerůstají uvedené množství. Do druhé skupiny autoři zařadili mikroorganismy, u nichž jsou známy projektivní vlivy, a jsou proto základem probiotik. Toto pojetí je z hlediska definice probiotik významné (Tab. 3) (Zbořil, 2005).

Tab. 3: Rozdělení mikroflóry trávicího traktu s ohledem na patogenní efekt (Zbořil, 2005)

Průměrný kvantitativní výskyt v trávicím traktu (10^x ml)	Bakterie s patogenním potenciálem	Bakterie s projektivními vlivy
10^2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
10^2	<i>Vibrionaceae</i>	
10^2	Stafylokoky	
10^2	Klostridie	
10^6	Veilonely	
10^6	Enterobakterie	Enterobakterie
10^6	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
10^8		Laktobacily
10^{10}	Sulfbakterie	
10^{10}	anaerobní grampozitivní koky	anaerobní grampozitivní koky
10^{10}	Metanogeny	Metanogeny
10^{10}		Eubakterie
10^{10}		Bifidobakterie
10^{11}	Bakteroidy	Bakteroidy

2.1.2. Střevní mikroflóra v průběhu života

Nováková a kol. (2009) uvádí, že brzy po porodu dochází u novorozenců k ustanovení intestinální flóry. Optimální flóra novorozenců a kojenců je složena z rozmanitých bakteriálních kmenů, je stabilní a její součástí jsou převážně probiotické bakterie. Složení bakteriální flóry má velký význam pro zdraví, a to jak v časném dětském věku, tak i v pozdějších obdobích.

Vzájemná komunikace mezi bakteriemi, které kolonizují střevo a mezi intestinálním epitelem, umožňuje správnou regulaci střevní imunity a zánětlivé odpovědi. Tato interakce imunitního systému a bakterií je nutná proto, aby došlo ke správnému rozvoji imunitních funkcí (Nováková a kol., 2009).

Při správném osídlení střeva probiotickými bakteriemi dochází k:

- podpoře bariérové funkce sliznice
- podpoře motility střeva
- regulaci osídlení patogenními bakteriemi
- podpoře dozrávání a vyvážení imunitního systému
- modulaci střevního zánětu

Nesprávné osídlení střevní sliznice vhodnými bakteriemi s převahou probiotických kmenů je v kojeneckém věku spojeno s rizikem rozvoje řady onemocnění, mezi něž patří především průjemová a alergická onemocnění.

Bronský (2009) uvádí, že zdrojem osídlení střeva novorozence mohou být bakterie přítomné v mateřském mléce matky. Jsou popisovány zejména stafylokoky, streptokoky, laktokoky, enterokoky, laktobacily a bifidobakterie. V odborných publikacích stojí proti sobě několik názorů na zdroj těchto bakterií - od teorie kontaminace z okolní kůže či úst kojence až po patofyziologické teorie transportu bakterií krevním řečištěm.

Rada a kol. (2009) získali výsledky, které udávají, že mateřské mléko není primárním zdrojem bifidobakterií pro kojence. Neexistuje ani žádné uspokojivé vysvětlení jakou cestou by se měly bifidobakterie, popř. bakterie mléčného kvašení do mateřského mléka dostat. Mateřské mléko uvnitř mléčné žlázy je sterilní, jako je tomu i u ostatních savců. Bifidobakterie jsou v mateřském mléku tedy s největší pravděpodobností přítomny jako sekundární kontaminace, přičemž jako jeho hlavní zdroj se jeví sám novorozenec, v případě že má plně vyvinutou střevní flóru s obsahem bifidobakterií.

Kalač (2003) uvádí, že u dospělých jedinců je trávicí trakt osídlen četnými a různorodými bakteriemi. Nejběžnější jsou bakteroidy, bifidobakterie, eubakterie, laktobacily a klostridia. Z dosud dílčích výzkumných poznatků bylo zjištěno, že ve vyšším věku, zejména po 65. roku, se složení mikroflóry tlustého střeva nepříznivě mění. Klesá počet i relativní zastoupení žádoucích bifidobakterií i dalších mléčných bakterií a vzrůstá počet i role bakterií zdravotně problematických, zejména enterobakterií. Mnoho přítomných bakterií však dosud nebylo identifikováno (Kalač, 2003).

2.2. Funkční potraviny

Konec 20. století přinesl ve výživě obyvatelstva hospodářsky vyspělých zemí novou situaci. Poprvé v historii došlo ke kvantitativnímu nasycení a podařilo se - i když ne u všech jednotlivců - zajistit i kvalitativní stránku výživy. Dostatek kvalitních potravin se stal samozřejmostí. Nemalá část populace se však s touto situací nedokázala zcela vyrovnat. Bohaté společnosti se potýkají s obezitou. Přes kvalitní lékařskou péči roste výskyt tzv. civilizačních chorob. Na statisticky průkazné vztahy mezi složením potravy a jednotlivými chorobami poukazují stovky epidemiologických studií (Kalač, 2003).

Potravina může mít 3 funkce: (1) dodávání energie ve formě sacharidů, lipidů, tuků; (2) dává nám radost a můžeme vnímat její příjemnou vůni, barvu a chuť; (3) má přínos pro zdraví.

Termín funkční potravina byl vytvořen japonskými vědci v roce 1970 a evropskou vědeckou komunitou zaveden v roce 1980 (Guo, 2009).

Funkční potraviny tvoří přechodnou skupinu mezi běžnými potravinami a léky. Funkční potraviny bývají také označovány jako nutriceutika, designer foods nebo medical foods (Kalač, 2003). Tyto potraviny se mají konzumovat běžně jako součást stravy. Jde o potravinu, která má kromě výživové hodnoty příznivý účinek na zdraví konzumenta, jeho fyzický či duševní stav (Guo, 2009). Rozdíl mezi funkčními potravinami a léky spočívá také v tom, po jaké době se projeví jejich příznivé účinky. U léků to jsou dny až měsíce, u funkčních potravin to však mohou být až desítky let (Vlková a kol., 2009).

Legislativa se u mladé a bouřlivě se rozvíjející problematiky funkčních potravin a nutraceutik rodí pomalu. Její sjednocení v rámci Evropské unie je nedořešeno. Přitom musí být legislativně vymezeno zejména:

- které potraviny mohou být deklarovány jako funkční,
- které prokázané zdravotní přínosy mohou být deklarovány na obalech,
- co deklarovat na obalech – které účinné složky jsou přítomny a v jakém obsahu (Kalač, 2003).

2.2.1. Probiotika

2.2.1.1. Historie probiotik

Flemingovo zjištění, že některé metabolické produkty plísně *Penicillium* omezují růst patogenních mikroorganismů vedlo k zavedení termínu antibiotický (anti = proti, bios = život).

Přibližně v roce 1960 byl zaveden termín probiotický. Probióza označuje symbiotickou asociaci dvou organismů žijících společně a poskytujících si vzájemně výhody. K přesnějšímu vymezení termínu probiotikum přispěli Lilley a Stilwell, kteří pozorovali zlepšený růst určitých mikroorganismů, jsou-li kultivovány v prostředí, ve kterém byly původně pěstovány jiné mikroorganismy (Voříšek, 1989).

Vlastní slovo probiotický je složeno ze dvou řeckých slov znamenajících pro a život a tím je tedy kontrastem vůči antibiotický.

Historicky na probiotický vliv poprvé upozornil Mečnikov při studiu stimulace tkáňových a krevních buněk. V roce 1907 publikoval Mečnikov teorii o pozitivním vlivu pravidelné konzumace jogurtů (*Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*) na dlouhověkost obyvatel v horských oblastech Bulharska, což souviselo, podle jeho názoru, s omezením rozkladu bílkovin ve střevě mléčnými bakteriemi a tím i snížení výskytu toxických látek. Zřejmě se jedná zároveň i o první upozornění na pozitivní vliv mléčných bakterií na organismus (Voříšek, 1989)

V roce 1930 byla japonským vědcem Minoru Shirota izolována bakterie mléčného kvašení ze stolice zdravého dítěte. O pět let později byl vyroben první fermentovaný mléčný nápoj k podpoře zdraví s kmenem, který izoloval a byl pojmenován Yakult (Goktepe et al., 2006).

2.2.1.2. Definice probiotik

Probiotika byla definována, jako živé mikroorganismy, které při požití v dostatečném množství poskytují zdravotní přínos hostiteli, což znamená, že bakterie musí splňovat určitá kritéria, aby byly považovány za probiotika (Jardine, 2009).

Probiotické mikroorganismy by měli:

- Být lidského původu.
- Nepatogenní v přírodě.
- Odolné proti zničení při zpracování.
- Odolné proti zničení žaludečními kyselinami a žlučí.
- Mít schopnost přilnout je střevní epitelové tkáni.
- Být schopni kolonizovat gastrointestinální trakt.
- Být schopni produkovat antimikrobiální látky.
- Mít schopnost modulovat imunitní reakce.
- Mít schopnost ovlivnit metabolickou aktivitu (Guo, 2009).

Rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* jsou nejčastější probiotické bakterie, ale například kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* a některé kmeny *Escherichia coli* jsou také používána jako probiotika (Sungsoo Cho a Finocchiaro, 2010). Dalšími používanými rody jsou *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Lactococcus*. Důvodem jejich využití je dlouhodobá zkušenost s těmito bakteriemi v mlékárenském průmyslu, při produkci siláže, dále jejich relativně snadná kultivace a v drtivé většině nepatogenní charakter. Na místo původně používaných mlékárenských kultur se nyní upřednostňují bakterie izolované z trávicího traktu (Vlková a kol., 2009).

Probiotika lze nalézt ve formě potravin nebo potravinových doplňků. Potenciální zdravotní přínos probiotik se může měnit v závislosti na typu použitých kultur (Sungsoo Cho a Finocchiaro, 2010).

Většina druhů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* jsou obecně považovány za bezpečné a to hlavně na základě empirických pozorování:

- Laktobacily mají dlouhou historii bezpečného užívání, zejména v kysaných mléčných výrobcích.
- Bifidobakterie a v menší míře laktobacily jsou hlavní součástí normální mikroflóry trávicího traktu lidí.
- I přes jejich vysoký počet ve střevech jsou bifidobakterie a laktobacily velmi zřídka spojovány s nemocí (Saarela, 2011).

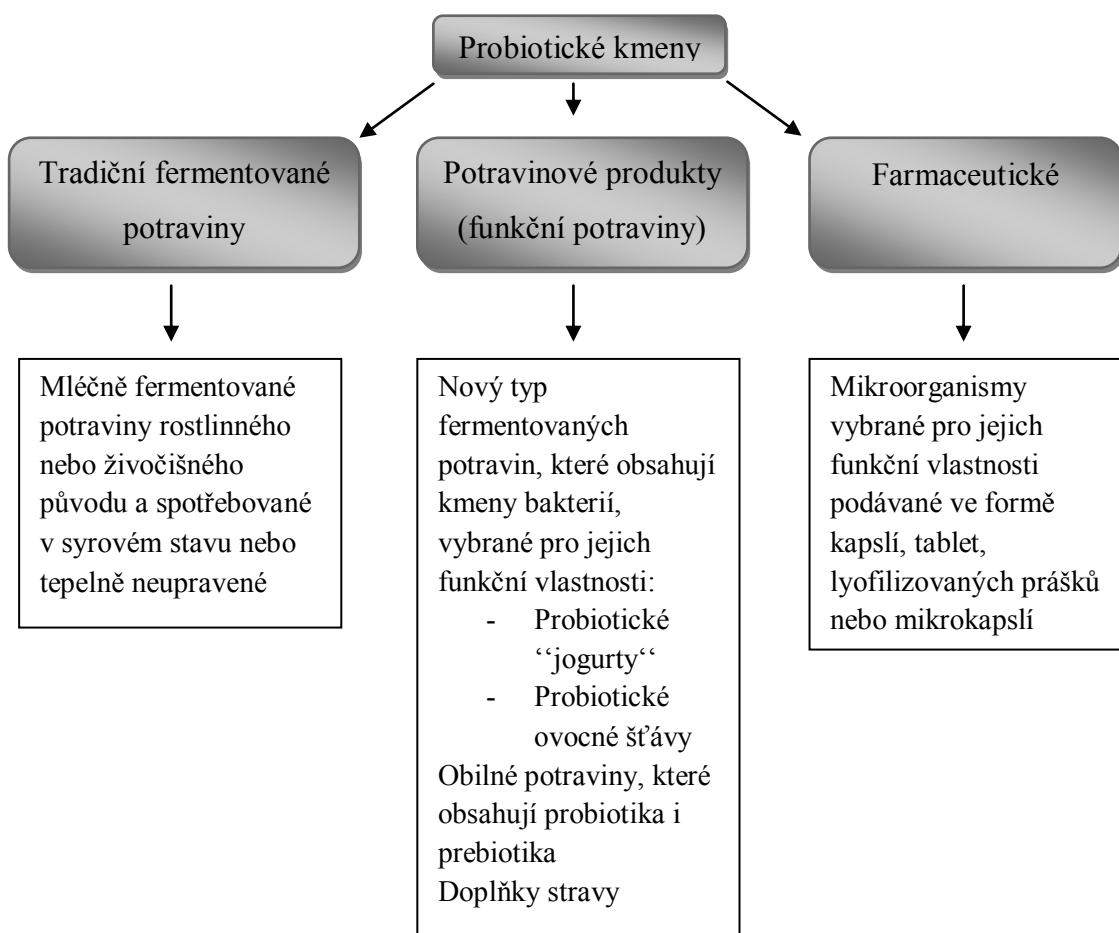
Dokumentované zdravotní účinky probiotik jsou:

- Nižší frekvence a trvání průjmů souvisejících s antibiotiky (*Clostridium difficile*), rotavirovými infekcemi, chemoterapiemi a v menší míře s cestovními průjmy.
- Stimulace humorální a buněčné imunity.
- Snížení nepříznivých metabolitů např. amonia a prekancerózních enzymů v tlustém střevě (Jardine, 2009).

Nedostatečně zdokumentované jsou účinky probiotik v prevenci proti rakovině, zlepšení ústní mikroflóry, prevenci zubního kazu a v boji proti srdečním chorobám (De Verse a Schrezenmeir, 2008).

2.2.1.3. Formy probiotik

Probiotika (jak je znázorněno na schématu) jsou k dispozici a můžou být podávány v různých formách, zahrnující zejména kvašené potraviny a farmaceutické výrobky, které mohou být ve formě kapslí, mikrokapslí nebo rozpustných prášků. Z celkového trhu s funkčními potravinami tvoří probiotické potraviny 60 - 70 %. Pokračující nárůst je pozorován u mléka a mléčných výrobků typu probiotických potravin, ale i u fermentovaných výrobků, které mléko neobsahují, např. ovocné a zeleninové šťávy a maso. S ohledem na širokou škálu možnosti využití probiotických kmenů u potravin se dá předpokládat, že vývoj těchto produktů bude i v budoucnu nadále probíhat (Goktepe et al., 2006).



2.2.2. Prebiotika

Prebiotika jsou nestravitelné složky potravin, které příznivě ovlivňují hostitele selektivní stimulací růstu nebo aktivací metabolismu určitého druhu bakterií podporujících zdraví v zažívacím traktu, a tím zlepšují střevní rovnováhu (Guo, 2009).

Prebiotika jsou již dlouhou dobu součástí lidské stravy (Saarela, 2007).

Prokázalo se, že řada oligosacharidů funguje jako prebiotika – má bifidogenní vlastnosti. Po konzumaci oligosacharidů dochází k nadměrnému růstu bifidobakterií a ke snížení počtu ostatních bakterií, např. *Clostridium perfringens*, fusobakterií a bakteroidů. Studie zabývající se vlivem oligosacharidů na patogenní mikroorganismus *C. perfringens* se prováděly na mladých dospělých jedincích, kteří mají endogenní bifidobakterie. Další prospěšnou vlastností bifidogenních oligosacharidů je zvýšení biomasy výkalů (hmotnost a četnost stolice) (Kvasničková, 2000).

Nejdůležitější oligosacharidy používané ve výživě jako prebiotika jsou galaktos-oligosacharidy, fruktany typu inulin, isomalto-oligosacharidy, laktulóza, oligosacharidy vyráběné ze sojových bobů, xylo-oligosacharidy, cyklodextriny (Sungsoo Cho a Finocchiaro, 2010).

Fruktanové látky jsou přirozenou součástí jedlých rostlin. Kromě toho, některá prebiotika jako polydextróza, byly používány, jako složky potravin po celá desetiletí (Saarela, 2011). Všechna prebiotika jsou dosud nestravitelné sacharidy, lišící se velikostí od malých alkoholických cukrů, disacharidů, oligosacharidů až na polysacharidy (Guo, 2009). Pokud nestravitelný sacharid podporuje růst veškeré mikroflóry tlustého střeva (bez selektivní stimulace určitého mikrobiálního druhu) působí jako tzv. "colonic food" (potravina pro tlusté střevo) (Kvasničková, 2000).

Definovaná kritéria prebiotik:

- Prebiotikum by nemělo být hydrolyzováno ani absorbováno v horní části gastrointestinálního traktu.
- Prebiotikum má upravit mikroprostředí střeva směrem ke zdravějšímu složení.
- Prebiotikum by mělo být selektivní substrát pro jednu nebo více potenciálně prospěšných bakterií v tlustém střevě. Kolonizace probiotickými kmeny by měla být rozšířena a zvýšena o současné podání prebiotik.
- Prebiotikum má mít celkově pozitivní vliv na zdraví a celkovou pohodu příslušného jedince (Guo, 2009).

2.2.3. Synbiotika

Produkty, které obsahují jak probiotika tak prebiotika se nazývají synbiotika. Synbiotika pracují na zlepšení střevní mikroflóry (Sungsoo Cho a Finocchiaro, 2010). Příznivě ovlivňují hostitele, zlepšením přežití probiotických bakterií, které mají k dispozici substrát pro fermentaci. Tím se zesiluje jejich šance prosadit se v konkurenci s přirozenou mikroflórou (Jardine, 2009).

Název vznikl z pozorovaného jevu synergismu, což znamená, že zdravotní přínos kombinace obou účinných složek je větší než součet přínosu každé z nich aplikované samostatně.

Pro synbiotika platí údaje uvedené pro jejich jednotlivé složky. Přednostně se doporučují pro kojence a starší jedince. U nekojených dětí pomáhají zlepšovat skladbu mikroflóry střevního traktu. U lidí ve věku kolem 55 let začíná poměrně rychle klesat četnost bifidobakterií. Obě skupiny jsou citlivé vůči infekčním onemocněním a synbiotika mohou pomoci tuto dispozici zmírnit (Kalač, 2003). Synbiotika jsou však mnohem víc než jen směs prebiotika a probiotik. Jak název napovídá, existuje mezi těmito dvěma složkami synergie, a proto nebude jakákoli směs nazývána synbiotikum (Saarela, 2007)

2.3. Používané bakteriální kmeny

Bifidobacterium, *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Lactobacillus* jsou rody bakterií nejčastěji používané jako probiotika. Popis jednotlivých rodů je uveden v následujících oddílech.

2.3.1. Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie byly izolovány poprvé ze stolice kojenců již v roce 1900 v Německu a byly označeny jako *Bacillus bifidus*. Mezi lékaři a výživáři vzbudily značný ohlas (Maxa a Rada, 1996). Organismus byl později reklasifikován na *Lactobacillus bifidus*. V roce 1924 Orla – Jensen navrhl samostatný rod *Bifidobacterium*. Ale až v roce 1974 byly tyto organismy skutečně reklasifikovány jako bifidobakterie a to díky použití moderních nástrojů, které zdůrazňují jejich jedinečné metabolické cesty (Jardine, 2009).

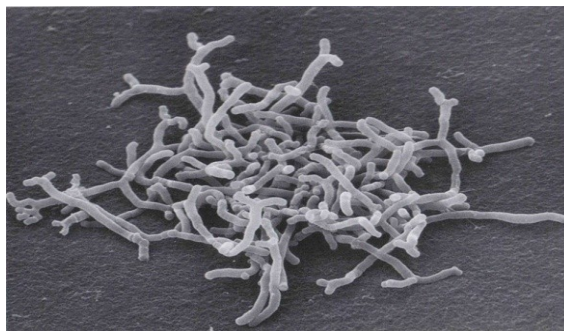
Tento rod se řadí mezi grampozitivní bakterie a je součástí kmene *Actinobacteria*, třída *Actinobacteria*, podtřída *Actinobacteridae*, řád *Bifidobacteriales*, čeleď *Bifidobacterium*. Podle DSMZ německé sbírky mikroorganismů je v současnosti do rodu *Bifidobacterium* zahrnuto 29 druhů (Kun Lee a Salminen, 2009).

Mikroorganismy rodu *Bifidobacterium* jsou nesporolující, nepohyblivé. Mohou tvořit krátké tyčinky, ale i středně dlouhé tyčinky různě tvarované, rozvětvené nebo větvící se. Lze je nalézt jednotlivě, v řetízcích, v agregátech do písmene V nebo vedle sebe palisádovitě seskupené buňky. Jsou striktně anaerobní, i když některé druhy tolerují nízké koncentrace kyslíku (Kun Lee a Salminen, 2009). Například *B. animalis subs. lactis* je charakteristický tím, že dokáže tolerovat 10 % kyslíku (Jardine, 2009). Jejich optimální růst je v rozmezí 37 až 41 °C, hraniční teploty jsou v rozmezí 25 až 28 °C (minimum) a 43 až 45 °C (maximum). Jejich optimální hodnota pH pro růst je 6,5 až 7,0; nerostou při pH 5,0 až 4,5 a 8,0 až 8,5 (Görner a Valík, 2004).

Charakteristická je tvorba acetátu a laktátu (v poměru 3:2) ze sacharidů, za současné produkce malého množství etanolu, sukcinátu a mravenčanu (Šilhánková, 2008).

Bifidobakterie se vyskytují v trávicím traktu drobných i velkých zvířat. Nejvyšší počty jsou nalézány ve výkalech kojenců, kde se nachází převážně druhy *B. infantis*, *B. breve* a *B. longum* (Obr. 1), zatím co u dospělých převládají *B. adolescentis* a *B. longum* (Maxa a Rada, 1996). Gastrointestinální trakt člověka obsahuje pestrou mikroflóru s odhadovaným počtem mikroorganismů mezi 10^{13} - 10^{14} z nich většina jsou anaerobní a nacházejí se v tlustém střevě. Jedná se o velice složité prostředí, a zatím co některé druhy bakterií v něm žijí trvale, jiné se do těla dostávají prostřednictvím jídla a jen zažívacím traktem prochází. Zdraví dospělí lidé mají v zažívacím traktu 3-6 % bifidobakterií z původní mikroflóry (Jardine, 2009).

Bifidobakterie lze kultivovat na speciálních mediích za anaerobních podmínek. Typické médium pro kultivaci (TPY) obsahuje: tryptikázu, fyton, glukózu, kvasniční autolyzát a soli manganu, železa, zinku a vápníku také Tween 80, cystein hydrochlorid a agar; pH 6,5. Identifikace rodu se uskutečňuje na základě mikroskopického obrazu buněk, tvaru kolonií a růstu na specifických mediích. Identifikace jednotlivých druhů bifidobakterií vyžaduje plynovochromatografické dělení a identifikaci fermentačních produktů glukózy (Görner a Valík, 2004).



Obr. 1. *Bifidobacterium longum*

www.jpkc.njau.edu.cn

2.3.2. Rod *Streptococcus*

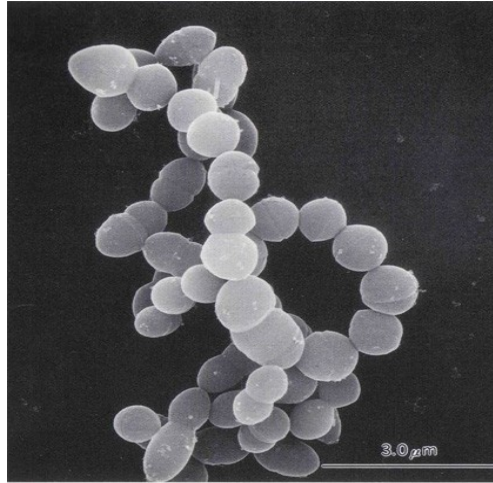
V taxonomii Streptokoků se často užívají dva klasifikační systémy. Nejnovějším klasifikačním systémem rodu *Streptococcus* je rozdělení, které navrhli Schilfer a Kilpper-Bälz. Jede o rozdělení rodu *Streptococcus* na: pyrogení streptokoky, orální streptokoky, jiné streptokoky, enterokoky a mléčné streptokoky (Tab. 4). Pro potravinářskou mikrobiologii je ale z taxonomického hlediska důležitější, že uvedení autoři navrhli skupinu enterokoků a skupinu mléčných streptokoků povýšili na samostatné rody: *Enterococcus* a *Lactococcus* (Görner a Valík, 2004).

Jedná se o grampozitivní mikroorganismy, které netvoří spory. Buňky jsou kulaté nebo vejcovité o průměru méně než 2 µm. V tekutém médiu jsou uspořádány v párech, krátkých nebo delších řetězcích, většinou nepohyblivé. Většinou fakultativně anaerobní, kataláza – negativní. Fermentují sacharidy hlavně na kyselinu mléčnou, ale netvoří významné množství plynů. Některé druhy fermentují i organické kyseliny (malonová, citronová) a aminokyseliny (serin, arginin). Neredukují dusičnany na dusitany.

Streptokoky se nacházejí na mukózních membránách úst, v dýchacím, zažívacím, urogenitálním traktu, na pokožce zvířat, lidí a v přírodě (Görner a Valík, 2004).

Tab. 4: Rozdělení potravinářsky významných streptokoků (Görner a Valík, 2004)

Jiné streptokoky	<i>Streptococcus acidominimus</i> , <i>S. equinus</i> , <i>S. alactolyticus</i> , <i>S. thermophilus</i> (Obr. 2), <i>S. saccharolyticus</i> , <i>S. suis</i> , <i>S. porcinius</i>
Enterokoky	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. malodorans</i> , <i>E. mundtii</i>
Mléčné streptokoky (<i>Lactococcus</i>)	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. hordniae</i> , <i>L. raffinolactis</i> , <i>L. garvieae</i> , <i>L. plantarum</i>

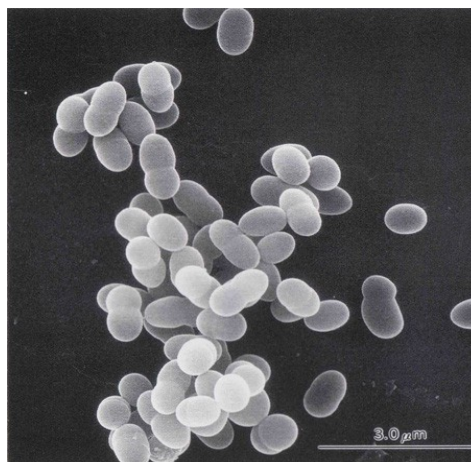


Obr. 2. *Streptococcus thermophilus*

www.jpkc.njau.edu.cn

2.3.3. Rod *Lactococcus*

Laktokoky se řadí mezi homofermentativní bakterie mléčného kvašení. Jsou to grampozitivní, fakultativně anaerobní koky, vyskytující se ve dvojicích nebo řetězcích. Jsou široce rozšířeny v přírodě, zejména tam, kde dochází ke spontánnímu kvašení biologického materiálu (mléko, rostliny) (Vlková a kol., 2009). Optimální růstová teplota je 37 °C (Sedláček, 2007). V mlékárenském průmyslu je nejdůležitější *Lactococcus lactis* (Šilhánková, 2008). *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Obr. 3) jsou součástí mikroflóry základních smetanových kultur, tvoří převážně kyselinu mléčnou (Zadrazil, 2002). Některé kmeny *Lactococcus lactis* produkují bakteriocin nizin, který inhibuje rozvoj řady grampozitivních bakterií. Tento bakteriocin se používá při konzervaci potravin (Šilhánková, 2008).



Obr. 3. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

www.jpkc.njau.edu.cn

2.3.4. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je největší skupinou mezi bakteriemi mléčného kvašení, v současné době zahrnuje více než 120 druhů a 20 poddruhů. Jsou zahrnuty v kmeni *Firmicutes*, třídě *Bacilli*, řád *Lactobacillales*, čeleď *Lactobacillaceae* (Kun Lee a Salminen, 2009).

Rod byl poprvé popsán v roce 1901 Beijerinckem (Görner a Valík, 2004). V roce 1919 laktobacily roztřídil Orla-Jensen do tří skupin (termobakterie, streptobakterie, betabakterie) a to podle jejich růstové teploty a podle morfologických a fenotypových rysů (Tab. 5) (Plocková a Březina, 1988).

Podle Görnera a Valíka (2004) jsou laktobacily rozděleny do tří skupin podle jejich fenotypových vlastností a zkvašování cukrů (Tab. 6).

Laktobacily jsou grampozitivní, netvoří spory, neprodukují katalázu. Jsou to anaerobní nebo mikroaerofilní bakterie, které běžně produkují kyselinu mléčnou jako svůj hlavní metabolit. Jsou saprofytní a velmi zřídka patogení (Sungsoo Cho a Finocchiaro, 2010).

Tab. 5: Třídění laktobacilů podle Orla-Jensena (Plocková a Březina, 1988)

Skupina	Druh	Fermentace
<i>Thermobacterium</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>	Homofermentativní
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
	<i>Lactobacillus delbrüeckii</i>	
<i>Streptobacterium</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	Homofermentativní
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	<i>Lactobacillus leichmanii</i>	
<i>Betabacterium</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Heterofermentativní
	<i>Lactobacillus brevis</i>	

Tab. 6: Rozdělení laktobacilů podle Görnera a Valíka (2004)

Skupina I	Skupina II	Skupina III
<i>L. delbrüeckii</i> ssp. <i>delbrüeckii</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. bifermetas</i>
<i>L. delbrüeckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. bavaricus</i> (<i>L. sake</i>)	<i>L. brevis</i>
<i>L. delbrüeckii</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>	<i>L. buchneš</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>pseudoplantarum</i>	<i>L. confusus</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	<i>L. divergens</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. fructivorans</i>
<i>L. yamanashiensis</i>	<i>L. maltaromaticus</i>	<i>L. halotolerans</i>
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. kandleri</i>
	<i>L. sake</i> (<i>L. bavaricus</i>)	<i>L. kefir</i>
		<i>L. reuteri</i>
		<i>L. sanfrancisciscensis</i>
		<i>L. viridescens</i>

Skupina I: obligátně homofermentativní laktobacily. Hexózy fermentují skoro výlučně na kyselinu mléčnou (>90 %) podle Embden-Meyer-Hofových metabolických drah; pentózy a glukonáty nefermentují. Tato skupina obsahuje všechny termobakterie v Orla-Jensenovém pojetí jako i další novější popsané druhy.

Skupina II: fakultativně heterofermentativní laktobacily. Hexózy fermentují skoro výlučně na kyselinu mléčnou podle Embden-Meyer-Hofových metabolických drah, některé druhy produkují při nedostatku glukosy kyselinu octovou, etanol, a kyselinu mravenčí. Pentózy fermentují pomocí indukované fosfoketolázy. Tato skupina obsahuje všechny streptobakterie v Orla-Jensenovém pojetí jako i novější popsané druhy laktobacilů.

Skupina III: obligátně heterofermentativní laktobacily. Hexózy fermentují na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou a CO₂. Pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou. Tato skupina obsahuje v Orla-Jensenovém pojetí heterofermentativní plyn tvořící laktobacily s původním pojmenováním betabakterie a další později popsané druhy (Görner a Valík, 2004).

2.3.4.1. Význam laktobacilů

Laktobacily se nachází ve fermentovaných rostlinných a živočišných materiálech, méně v trávicím traktu lidí a zvířat, v půdě (Sungsoo Cho a Finocchiaro, 2010). Mnoho druhů laktobacilů lze nalézt jen v jedné nebo několika málo lokalitách, zatímco jiné druhy jsou méně specializované a vyskytují se na více místech (Jardine, 2009). Laktobacily upřednostňují mezofilní až termofilní teploty. Některé kmeny druhů *L. viridescens*, *L. sake*, *L. curvatus*, *L. plantarum* rostou (i když pomalu) při nízkých teplotách blízkých bodu mrazu. Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou všeobecně acidotolerantní až acidofilní. Při fermentaci sacharidů tvorbou kyselin snižují kyselost prostředí až pod pH 4,0. Kyselina mléčná a octová jsou v kyselém prostředí málo disociované a v tomto stavu působí spolu se sníženým pH inhibičně až mikrobicidně na ostatní mikroorganismy v prostředí, s výjimkou jiných bakterií mléčného kvašení a kvasinek. Tato vlastnost laktobacilů se užitečně uplatňuje v potravinářské technologii a v intestinálním traktu lidí a zvířat mají také pozitivní vliv (*L. acidophilus* a jiné) (Görner a Valík, 2004).

Pro probiotickou aplikaci jsou zajímavé druhy, které přežijí a potenciálně i mohou kolonizovat gastrointestinální trakt. V lidském orogastrointestinálním traktu se laktobacily nacházejí v dutině ústní, v žaludku a ve střevech. Typické (do probiotik řazené) produkty jsou fermentované jogurty, jogurtové nápoje, sýry. Dalšími probiotickými potravinami jsou zmrzlinové krémy, ovocné džusy, cereální nápoje. V Evropě je *L. rhamnosus* pravděpodobně nejpoužívanější probiotickou bakterií v široké škále potravin. K dalším používaným laktobacilům patří *L. casei* (Obr. 4), *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* a *L. acidophilus* (Jardine, 2009).

Některé druhy a kmeny laktobacilů produkují bakteriociny. Syntéza bakteriocinů je řízená druhem plazmidů, tj. kruhovými DNA, které nesou informaci pro syntézu bakteriocinů. Bakteriocin je bílkovina, která devitalizuje citlivé kmeny většinou stejného bakteriálního druhu. *L. acidophilus* produkuje lactocin B, který má velmi úzké aktivační spektrum působící jenom na několik homofermentativních druhů blízkých *L. acidophilus*. Podobně bakteriociny z *L. fermentum* a lactocin LP 27 izolovaný z *L. helveticus* jsou aktivní jen vůči laktobacilům.

Laktobacily jsou citlivé vůči většině antibiotik působících na grampozitivní bakterie. *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* se v jogurtové kultuře spolu se *Streptococcus thermophilus* využívá na zjištění přítomnosti inhibičních látek, mezi nimi antibiotik v mléce (Görner a Valík, 2004).

2.3.4.2. Kultivační vlastnosti

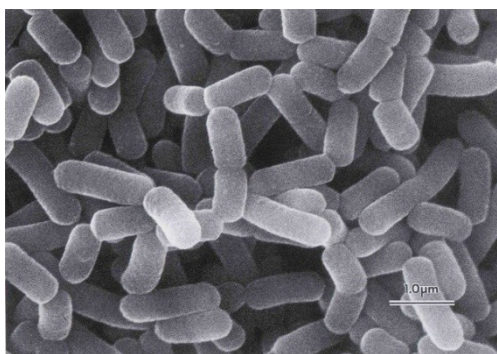
Na živném mediu tvoří různě dlouhé, zpravidla rovné tyčinky, které se často spojují do řetízků (Sungsoo Cho a Finocchiaro, 2010). Kolonie na agarových médiích mívají průměr 2 až 5 mm s pravidelným okrajem, jsou vystouplé, hladké, lesklé. Zjevně slizovité kolonie tvoří jen *L. confusus*. Laktobacily rostou nejlépe v slabě kyselých médiích s počáteční hodnotou pH 6,4 až 4,5. Růst se zastavuje, když pH dosahuje 4,0 až 3,6. Zvýšený obsah CO₂ růst stimuluje. Většina roste při nejlépe při mezofilních teplotách s horní hranicí asi 40 °C. Laktobacily při růstu v běžných médiích netvoří charakteristický pach. V poživatinách ovšem přispívají k tvorbě jejich charakteristických a pachových vlastností tvorbou těkavých látek jako acetaldehydu, diacetylu, kyseliny octové, aminokyselin, a v sýrech i H₂S. Vedle fermentovaných sacharidů laktobacily vyžadují pro svůj růst také nukleotidy, aminokyseliny a vitaminy skupiny B. Požadavkům laktobacilů na komplexicitu média běžně vyhovuje živná půda obsahující fermentovatelný sacharid, pepton, masový extrakt a kvasničný autolyzát. Další růstové faktory (jako rajčatová šťáva, mangan, estery kyseliny octové a olejové jmenovitě Tween 80) působí na růst mnohých druhů stimulačně nebo jsou pro ně nepostradatelné (Görner a Valík, 2004).

Podle ČSN 560094 se pro stanovení bakterií rodu *Lactobacillus* používají kultivační agary Rogosa a MRS.

2.3.4.3. Metody identifikace

Spolehlivá identifikace bakteriálních druhů a kmenů a správné pojmenování jsou hlavní cíle taxonomické studie, ale také má významné důsledky pro průmyslovou aplikaci bakterií. Morfologie, gramovo barvení a biochemické testy se tradičně používají jako hlavní metody pro klasifikaci druhů laktobacilů; tyto metody se dnes pořád používají. Laktobacily byly rozděleny podle svých fenotypových a biochemických charakteristik do tří skupin. Fenotypové analýzy jsou časově náročné a vyžadují technické dovednosti. Navíc jak je všeobecně známo kmeny a druhy laktobacilů mají širokou fenotypovou variabilitu. Mnoho studií dnes zdůrazňuje, že je fenotypová klasifikace nevyhovující. Fenotypové testy jako např. API 50 CH dnes slouží jen jako doplňkové testy (Kun Lee a Salminen, 2009).

Singh et al. (2009) uvádí, že s rozvojem molekulární biologie vznikly nové metody pro správnou identifikaci a charakterizaci laktobacilů a nahradily tak těžkopádné fenotypové metody. Metody molekulární jsou velmi rychlé, spolehlivé a opakovatelné. Jde především o genetické sondy, gelovou elektroforézu v pulzním poli (PFGE), polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP), restriční analýzu amplifikované rDNA (ARDRA), náhodnou amplifikaci polymorfní DNA (RAPD), elektroforézu v denaturačním gradientu (DGGE), polymerázovou řetězovou reakci (PCR).



Obr. 4. *Lactobacillus casei*

www.jpkc.njau.edu.cn

2.3.4.3.1. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei je široce rozšířen v přírodě, izolován z mnoha mléčných výrobků, siláží a trávicích taktů mnoha druhů zvířat. *L. casei* má široké rozmezí pH a teploty v kterém dokáže růst. Nejčastější použití *Lactobacillus casei* je průmyslové, zejména v mléčných produktech. Bylo nalezeno mnoho kmenů *L. casei* a byly studovány aspekty jejich biologické aktivity (Sungsoo Cho a Finocchiaro, 2010).

Perdigon et al. (1995) uvádí, že mléčné výrobky obsahující bakterie mléčného kvašení zejména *Lactobacillus casei* mohou inhibovat růst karcinomu střeva přes zvýšenou aktivitu IgA, T buněk a makrofágů.

Matsuzaki (1998) prokázal, že *Lactobacillus casei* kmen *Shirota* účinně brání růstu nádorových buněk v dutině hrudní a výrazně prodlužuje dobu přežití u myši. *L. casei Shirota* vyvolává v dutině hrudní myši výrobu několika cytosinů, jako jsou IFN - gama, IL - beta a TNF - alfa což má za následek inhibici růstu karcinomu.

Erdogruľ a Erbilir (2005) zjistili, že *Lactobacillus casei* je rezistentní vůči velkému množství antibiotik např. ampicilin, vancomycin, oxacilin, cephalothin, cefodizime, tobramycin.

2.3.4.3.2. Kultivace *Lactobacillus casei*

Vinderola a Reinheimer (2000) vybírali skupinu kultivačních medií pro stanovení *L. casei*, když se objeví spolu s *L. acidophilus*, bifidobakteriemi a bakteriemi mléčného kvašení ve fermentovaných výrobcích.

Lithium - propionát MRS - agar (LP - MRS) a žlučový MRS - agar (B - MRS) byly použity jako selektivní nebo diferenciální medium. Všechny kmeny probiotických bakterií testované v této studii, vytvořily stejné kolonie, na médiích, které jsou popsána výše: *L. casei* tvořil kolonie bílé, krémové na obou médiích s průměrem v rozmezí 1,7 - 2,4 mm (LP - MRS agar) a od 0,9 na 1,3 mm (B - MRS agar), *L. acidophilus* tvořil na B - MRS agar nepravidelné světle hnědé kolonie v rozmezí průměru 0,9 - 1,5 mm. Bifidobakterie na LP - MRS agaru tvořily malé kulaté kolonie v rozmezí 0,7 až 1,2 mm v průměru. Tato media jsou schopna inhibovat růst bakterií mléčného kvašení, které jsou obsaženy ve startovací kultuře. Agar B - MRS, je užitečný pro selektivní růst *L. casei* a *L. acidophilus* nebo pro diferenciální výčet, pokud se tyto bakterie objeví společně ve fermentovaných mléčných výrobcích.

Ravula a Shah (1998) vyvinuli selektivní medium LC - agar pro stanovení *L. casei* z jogurtů a kysaných mléčných výrobků, které mohou obsahovat kmeny jogurtových bakterií (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*), probiotických bakterií (*Lactobacillus acidophilus*, bifidobakterie) a *L. casei*.

Živné médium LC - agar (složení: pepton 10 g; kvasniční extrakt 1 g; Lab Lemco 4 g; dihydrogen fosforečnan draselný 2 g; sodium acetát 3 g; triamonium citrát 1 g, síran hořečnatý 0,2 g; síran manganatý 0,05 g; hydrolysát kaseinu 1 g; tween 80 1 g; agar 15 g; bromkresolová zeleň 6 ml; destilovaná voda 1000 ml) u kterého je pH upraveno na 5,1 se steriluje 15 minut při 121 °C. Poté se přidá 10 ml membránově filtrovaného sterilního roztoku 10% D (-) ribosy na 90 ml media (1 % konečné koncentrace) těsně před naléváním agaru. Inkubuje se při 27 °C 72- 96 hodin za anaerobních podmínek. Růstu *Streptococcus thermophilus* je zabráněno hodnotou pH. *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* netvoří kolonie, protože není schopen kvasit ribózu jako zdroj uhlíku. Bifidobakterie taktéž netvořily kolonie na LC - agaru. *L. casei* na agaru kolonie tvořil. LC - agar se dá použít jako selektivní medium pro *Lactobacillus casei*.

Sakai et al. (2010) vyvinuli nové selektivní médium M - RTLV agar pro rozlišení *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus paracasei* od *Lactobacillus rhamnosus*, založený na rozdílu zkvasitelnosti L - rhamnosy s přidavkem antibiotik vankomycin, metronidazol a redoxního indikátoru 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chlorid (TTC).

Bakterie, které na M - RTLV agaru kvasí cukr (rhamnosa) a produkují kyselinu mléčnou, budou mít kolonie bílé nebo světle červené, protože indikátor TTC je v kyselém prostředí potlačen. Kolonie, které cukr nekvasí, tvoří červené kolonie v důsledku působení TTC. *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus paracasei* tvoří na agaru červené kolonie. *Lactobacillus rhamnosus* tvoří kolonie bílé, někdy světle růžové (samostatné přílohy obr. 4, 5). M - RTLV agar je schopen rozlišit *L. casei*, *L. paracasei* nebo *L. rhamnosus* od většiny bifidobakterií a laktobacilů.

Pomocí tohoto média není možno odlišit *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. sakei*, protože tyto bakterie na médiu tvoří kolonie podobné koloniím *L. casei*.

3. Cíl práce

Lactobacillus casei je probiotická bakterie, která je velmi často využívána v probiotických výrobcích.

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení počtu živých buněk *Lactobacillus casei* v potravinách a probiotických produktech. Pro tyto účely byla testována různá selektivní média. Izolované kmeny byly identifikovány pomocí biochemických testů (API).

4. Materiál a metody

4.1. Odběr vzorků

Vzorky pro mikrobiologický rozbor a selektivní stanovení probiotické bakterie *Lactobacillus casei* byly nakupovány v maloobchodní síti. Byly použity především probiotické kapsle, ale i kysané mléčné výrobky od různých výrobců a různého složení. Použité vzorky kysaných mléčných výrobků obsahují pouze bakterii *Lactobacillus casei*. V probiotických kapslích se vyskytují i jiné druhy bakterií působících pozitivně na náš gastrointestinální trakt. Tento fakt je nutné zohlednit při selektivním stanovení.

Celkem bylo použito 7 vzorků probiotických tablet a 3 vzorky mléčných výrobků vždy po dvou opakováních. Z každého vzorku byl odebrán 1 ml (1 g) k vlastnímu rozboru. Vzorky byly kultivovány na různých médiích. Pro ověření účinnosti selektivní půdy byly vzorky kolonií podrobeny testu API 50 CH.

U vzorků byly zjišťovány tyto znaky:

- celkový počet laktobacilů
- u všech vzorků počet probiotických bakterií *Lactobacillus casei*
- u některých vzorků počet probiotických bakterií *Lactobacillus rhamnosus*

4.1.1. Charakteristika vzorků

V tabulkách č. 7, 8, 9 je uveden přehled výrobků, které byly použity pro vlastní rozbor, s jejich složením a dalšími údaji.

Tab. 7: Hlavní charakteristika vzorků probiotických tablet (název, složení)

Číslo vzorku	Název výrobku	Složení výrobku (deklarované obsah bakterií)
1	Childern dophilus	<i>L. acidophilus</i> 20 %, <i>L. casei</i> 20 % , <i>L. rhamnosus</i> 20 % , <i>B. bifidum</i> 10 %, <i>B. longum</i> 15 %, <i>S. thermophilus</i> 15 %
2	APO – Lactobacillus ATB	<i>L. casei</i> 28 % , <i>L. rhamnosus</i> 20 % , <i>L. acidophilus</i> 15 %, <i>B. breve</i> , <i>Lactococcus lactis</i> 5 %, <i>S. thermophilus</i> 5 %, <i>B. bifidum</i> 2 %, <i>B. longum</i> 3 %, <i>L. fermentum</i> 2 %
3	APO – Baby probio	<i>L. rhamnosus</i> 34,07 % , <i>L. acidophilus</i> 20 %, <i>B. breve</i> 18,04 %, <i>B. bifidum</i> 15,03 %, <i>B. infantis</i> 6,91 %, <i>S. thermophilus</i> 5,91 %
4	Probio activ s vit. B	<i>B. longum</i> $9 \cdot 10^8$, <i>B. infantis</i> $9 \cdot 10^8$, <i>B. bifidum</i> $9 \cdot 10^8$, <i>L. casei</i> $9 \cdot 10^8$, <i>L. acidophilus</i> $9 \cdot 10^8$, <i>L. bulgaricus</i> $2,5 \cdot 10^8$
5	Syn Bio	<i>B. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. bifidum</i>
6	Swiss Lactobacily 5 strain dophilus	<i>L. rhamnosus</i> 55 % , <i>B. breve</i> 20 %, <i>L. casei</i> 15 % , <i>L. acidophilus</i> 5 %, <i>B. longum</i> 5 %
7	Liftea dětský probioactiv	<i>B. longum</i> $4,5 \cdot 10^8$, <i>B. infantis</i> $4,5 \cdot 10^8$, <i>B. bifidum</i> $4,5 \cdot 10^8$, <i>L. acidophilus</i> $4,5 \cdot 10^8$, <i>L. casei</i> $4,5 \cdot 10^8$, <i>L. bulgaricus</i> $1,25 \cdot 10^8$

Tab. 8: Hlavní charakteristika vzorků mléčných výrobků

Číslo vzorku	Název výrobku	Složení (obsah bakterií)	Výrobce	Datum expirace
8	Bílý jogurt nízkotučný albert Quality	<i>L. casei</i> , startovací jogurtová kultura	Valašské Meziříčí spol. s.r.o.	9. 8. 2011
9	Bílý jogurt nízkotučný Price	<i>L. casei</i> , startovací jogurtová kultura	Valašské Meziříčí spol. s.r.o.	9. 8. 2011
10	Jogurt nízkotučný - borůvka	<i>L. casei</i> , startovací jogurtová kultura	Valašské Meziříčí spol. s.r.o.	25. 7 2011

Tab. 9: Doplnující údaje k vzorkům probiotických tablet

Číslo vzorku	Výrobce nebo distributor	Datum expirace	Ostatní informace
1	Pharma Agency s.r.o.	15. 7. 2012	50KE131
2	Apotex	31. 3. 2012	LOT 3656
3	CELL Biotech	08. 2012	CZAX 03001
4	Biomedica spol s.r.o.	1. 6. 2013	LO10111
5	Pleurom Bratislava	31. 12. 2011	1020610
6	Swiss Herbal remedies	03. 2013	LOT 41789
7	Biomedica spol s.r.o.	19. 2. 2012	LO1022010

4.2. Mikrobiologický rozbor

4.2.1. Stanovení počtu mikroorganismů

V potravinářské mikrobiologii jsou používány tyto základní metody stanovení počtu mikroorganismů:

- technika stanovení počtu při použití tekutých půd
- technika stanovení počtu při použití tuhých půd
- kultivace na membránových filtrech

V práci byla použita technika stanovení počtu při použití tuhých půd. Metoda je založená v naočkování tekutého vzorku nebo jeho ředění a ředění pevných vzorků do agarové živné půdy, kultivace při optimálních podmínkách a následném vyhodnocení.

K inokulaci živné půdy volíme tyto způsoby:

- zalévání do pevných půd
- roztěr na povrch živné půdy

Při očkování byla použita metoda zalévání do pevných půd. Vzorky se pipetují do Petriho misek v množství (1 ml) a následně se přelévají živnou půdou. Krouživými pohyby miskou v horizontální poloze promícháme agar s napipetovaným vzorkem. Vše je nutné provádět ve sterilním prostředí. Naočkované misky se kultivují dnem vzhůru v termostatu. Po určité době inkubace se vyrostlé kolonie počítají.

4.2.2. Příprava ředící řady

Před vlastním mikrobiologickým rozbohem je nutné si připravit ředící řadu. Ředící řadu používáme k tomu, abychom dosáhli potřebného ředění, které odpovídá počtu mikroorganismů ve vzorku.

Ředící řady jsou sterilní, proto musíme postupovat tak, aby nebyly kontaminovány. Všechny lahvičky je nutné před odběrem ožehnout. Při převádění suspenze z jedné lahvičky do druhé používáme vždy novou sterilní injekční stříkačku s jehlou.

Do první lahvičky v ředící řadě se přenese jehlou 1 ml vzorku a promíchá se. Vznikne tak ředění 10^{-1} . Novou injekční stříkačkou se odebere 1 ml suspenze z ředění 10^{-1} a převede se do nové lahvičky a promíchá se (ředění 10^{-2}). Takto se pokračuje až do ředění 10^{-8} nebo 10^{-9} podle toho, jaký je uvedený obsah kultury ve vzorku.

4.2.3. Stanovení počtu *Lactobacillus casei*

Bakterie *Lactobacillus casei* byla stanovována u různých mléčných výrobků a u probiotických kapslí. Selekcce této bakterie je velmi problematická. Rod *Lactobacillus* je velmi početný a různé laktobacily mají velmi podobné nároky na přežití.

Při stanovení *Lactobacillus casei* z mléčných výrobků deklarujících pouze přítomnost této probiotické bakterie byly použity živné půdy MRS - LP, MRS - B, Rogosa.

Při stanovení *Lactobacillus casei* z probiotických tablet, které obsahují široké spektrum bakterií, byla použita selekční živná půda M - RTLV pro *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*. Dále byla použita živná půda MRS - V. Pro stanovení celkového počtu laktobacilů byla použita živná půda MRS.

4.2.4. Sbírkové kultury

V této práci byly použity také sbírkové kultury Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky: *L. casei* 1752, *L. casei* Shirota, *L. casei* (Danone), *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* (Yakult), *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

U těchto kultur byla ověřována jejich možnost růstu na všech použitých živných médiích. Dále byly některé z těchto čistých kultur identifikovány pomocí biochemického testu API 50 CHL.

4.2.5. Složení a příprava kultivačních médií

Ředící řada

Složení:	trypton	5 g
	živný bujón	5 g
	kvasniční extrakt	2,5 g
	tween 80	0,5 ml
	cystein	0,25 g

Přesně navážené množství 12,75 g bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a následně rozvařeno. Po rozvaření je nutná úprava pH 1 M roztokem NaOH. Živný roztok s upraveným pH se anaerobně plní do skleněných lahvíček typu penicilínka po 9 ml. Následuje sterilace při 120 °C 15 minut.

Živé médium Wilkins - Chalgren bujón se sojovým peptonem

Složení:	trypton	10 g
	pepton	10 g
	kvasniční extrakt	5 g
	pyruvát sodný	1 g
	menadione	0,0005 g
	haemin	0,005 g

Bylo naváženo 33 g Wilkins – Chalgren bujónu a přidáno:

	soja peton	0,5 g
	cystein	0,05 g
	tween 80	0,1 ml

Přesně navážené množství bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a následně rozvařeno. Živný roztok se anaerobně plní do skleněných lahvíček typu penicilínka po 9 ml. Následuje sterilace při 120 °C 15 minut.

MRS agar

Složení:	peton	10g
	hovězí extrakt	8 g
	kvasniční extrakt	4 g
	D (+) glukosa	20 g
	tween 80	1 ml
	citran amonný	2 g
	octan sodný	5 g
	heptahydrát síranu hořečnatého	0,2 g
	tetrahydrát síranu manganatého	0,05 g
	dihydrogen fosforečnan draselný	2 g
	agar	10 g

Přesně navážené množství agaru 65,25 g bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a následně sterilováno při 120 °C 15 minut.

MRS - B agar

Složení agaru je stejné jako u agaru MRS. K přesně naváženému množství MRS agaru 65,25 g je přidán 1,5 g žluče. Agar se žlučí se rozpustí v 1000 ml destilované vody a nechá se rozvařit. Po rozvaření se přidávkem kyseliny octové upravuje pH agaru na 5,6. Sterilace probíhá 15 minut při 120 °C. Po sterilaci pH klesne na 5,4.

MRS - LP agar

Složení agaru je stejné jako u agaru MRS. K přesně naváženému množství MRS agaru 65,25 g jsou přidány 2 g chloridu litného a 3 g propionátu sodného. Agar s přidávanými chemikáliemi se rozpustí v 1000 ml destilované vody. Sterilace probíhá 15 minut při 120 °C.

Rogosa agar

Složení:	trypton	10 g
	kvasniční extrakt	5 g
	glukosa	20 g
	tween 80	1 ml
	octan sodný	17 g
	citran amonný	2 g
	dihydrogenfosforečnan draselný	6 g
	síran hořečnatý	0,575 g
	síran manganatý	0,12 g
	síran železitý	0,034 g
	agar	20 g

Přesně navážené množství 62 g se rozpustí v 1000 ml destilované vody. Po rozvaření se upravuje pH agaru kyselinou octovou na pH 5,4. Agar nesterilujeme.

M - RTLV agar

Složení:	pepton	10 g
	kvasniční extrakt	5 g
	dihydrogenfosforečnan draselný	6 g
	citran amonný	2 g
	tween 80	1 ml
	octan sodný	25 g
	agar	20 g
	vancomycin hydrochlorid	10 mg
	metronidazol	10 mg
	2, 3, 5 triphenyltetrazolium chlorid TTC	30 mg
	L – rhamnose	20 g
	solný roztok	5 ml
	destilovaná voda	950 ml

Složení solného roztoku:

	síran hořečnatý	11,5 g
	sulfát železitý	0,68 g
	síran manganatý	2,4 g
	destilovaná voda	100 ml

Všechny složky se naváží a rozpustí v destilované vodě. pH agaru se upraví na pH 6 roztokem 1 M HCl. Roztok L - rhamnosy, vancomycinu, metronidazolu a TTC se steriluje filtrací a do vzniklého agaru se přidávají před zaléváním Petriho misek. Agar se steriluje 30 minut.

MRS - V agar

Složení agaru je stejné jako u agaru MRS. Přesně navážené množství 65,25 g se rozpustí v 1000 ml destilované vody. Před zaléváním Petriho misek se přidává do agaru antibiotikum Vancomycin v koncentraci 1 mg na 1000 ml. Živná půda se steriluje 15 minut při 120 °C. Antibiotikum se steriluje filtrací.

Všechny živné půdy byly před použitím zchlazeny na 45 - 50 °C.

4.3. Pracovní postup

4.3.1. Inokulace živné půdy

Z ředící řady byla vybrána potřebná ředění na stanovení počtu mikroorganismů. Z každého ředění bylo asepticky převedeno 0,5 ml u Petriho misek s průměrem 60 mm (1 ml v případě Petriho misky s průměrem 90 mm) do Petriho misky. Očkování bylo provedeno od nejvyššího ředění do nejnižšího vždy ve dvou opakováních. Po zaočkování byly všechny misky zality živnou půdou, která byla po sterilaci zchlazena na 45 - 50 °C. Krouživým pohybem byla suspenze s živnou půdou promíchána. Po zatuhnutí byly Petriho misky otočeny a kultivovány v termostatu.

4.3.2. Kultivace

Kultivace na různých živných médiích probíhala po dobu 72 hodin při různé teplotě a při různých prostředí kultivace.

Tab. 10: Kultivační podmínky

Živná půda	Teplota kultivace	Čas kultivace	Prostředí kultivace
MRS	37 °C	72 hodin	Aerobně
MRS - LP	37 °C	72 hodin	Aerobně
MRS - B	37 °C	72 hodin	Aerobně
Rogosa	37 °C	72 hodin	Aerobně
M - RTLV	37 °C	72 hodin	Anaerobně
MRS - V	43 °C	72 hodin	Anaerobně
MRS - V	37 °C	72 hodin	Anaerobně

4.3.3. Vyhodnocení po kultivaci

Desková metoda vychází z předpokladu, že z jedné životaschopné buňky vyroste jedna kolonie, bylo tak možné stanovit počet životaschopných buněk v 1 ml vzorku. Byly spočítány kolonie na vhodných ředěních na všech živných půdách. U jednotlivých kolonií byl zhodnocen tvar, profil, povrch, barva, okraje. Každá kolonie ze všech živných médií byla zkontrolována pod mikroskopem. Nereprezentativní Petriho misky byly vyřazeny.

U některých vzorků byla odebrána čistá kolonie typická pro určitý rod. Kolonie byla asepticky převedena do tekutého kultivačního média W + sp a kultivována 24 hodin při 37 °C. Následně byla podrobena druhové identifikaci pomocí API 50 CH.

4.3.4. API

API 50 CH je standardizovaný systém spojující 50 biochemických testů ke studiu sacharidového metabolismu mikroorganismů. API 50 CH se používá ve spojení s API 50 CHL Medium pro identifikaci rodu *Lactobacillus*.

Tento test se skládá z 50 mikrozkušavek používaných ke studiu fermentace substrátu patřících do třídy sacharidů a jejich derivátů (heterosis, polyalkoholy, uronové kyseliny). Fermentační testy se očkují bakteriální suspenzí v API 50 CHL Medium, který substráty rehydratují. Při inkubaci bakterie fermentují látky v mikrozkušavkách, což se projeví změnou barvy zkumavky. V první zkumavce není žádná aktivní látka z důvodu negativní kontroly.

4.3.4.1. Příprava izolátu pro API 50 CH

Do připraveného a popsáno inkubačního boxu bylo vloženo všech 5 testovacích proužků. Každý testovací proužek má 10 očíslovaných zkumavek.

Po kontrole čistoty izolátu pod mikroskopem byl celý obsah zkumavky s izolátem asepticky převeden do sterilní plastové zkumavky. Zkumavka byla odstředována v centrifuze 10 minut. Po odstředění byl roztok ze zkumavky odstraněn a sediment se promývá 1 ml BifiPufu. Sediment s 1 ml BifiPufu byl vložen opět do centrifugy a odstředován 10 minut. Po odstředění se znovu opakovalo promývání.

Poté se do 5 ml suspenzního média přidává vzniklý roztok až do dosažení 2. zákalového stupně podle standardu. Dvounásobné množství roztoku, které je potřebné pro dosažení 2. zákalového stupně, bylo přidáno do 10 ml inokulačního média pro API 50 CHL. Médium je nutné promíchat. Poté bylo inokulum plněno do připravených mikrozkumavek a ty se zakápnuty parafínovým olejem.

Celý box se kultivoval při 37 °C 48 hodin a vždy po 24 hodinách byla vyhodnocena fermentace. Výsledky se zapisují do výsledkové tabulky.

Hodnocení testu se provádí v identifikačním softwaru apiweb.

5. Výsledky

5.1. Výsledky kultivací

Při stanovení bylo použito 7 druhů probiotických tablet a 3 mléčné výrobky viz. tab. č. 7, 8, 9. Tyto výrobky byly kultivovány na různých médiích.

Tabulka č. 11 uvádí výsledky kultivace vzorků probiotických tablet na selektivních živných půdách. Agar MRS je selektivní pro bakterie rodu *Lactobacillus*. Živné médium M - RTLV agar by mělo být selektivní pro bakterie *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*. Tyto probiotické bakterie se na základě fermentace rhamnosy barevně odlišily. *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus paracasei* tvoří na tomto médiu červené kolonie a *Lactobacillus rhamnosus* kolonie bílé až světle růžové. V tabulce jsou proto uvedeny hodnoty zvlášť.

Tab. 11: Výsledky kultivace probiotických tablet (log KTJ/g)

Číslo vzorku	Název vzorku	Živné médium		
		MRS	M - RTLV LC	M - RTLV LR
1	Childern dophilus	-	-	-
2	APO – Lactobacillus ATB	7,89 ± 0,02 ^a	7,54 ± 0,02 ^c	7,19 ± 0,06 ^a
3	APO – Baby probio	8,42 ± 0,03 ^c	Neobsahuje	8,22 ± 0,05 ^b
4	Probio activ s vit. B	8,89 ± 0,03 ^d	6,59 ± 0,06 ^a	Neobsahuje
5	Syn Bio	8,39 ± 0,02 ^c	8,07 ± 0,05 ^d	Neobsahuje
6	Swiss Lactobacily 5 strain dophilus	9,82 ± 0,06 ^e	9,82 ± 0,03 ^e	9,70 ± 0,08 ^c
7	Liftea dětský probioactiv	8,12 ± 0,12 ^b	7,43 ± 0,003 ^b	Neobsahuje

Hodnoty ve sloupcích s různými indexy se statisticky významně liší.

Pro srovnání byla použita analýza rozptylu.

LC - nárůst *Lactobacillus casei* na živné půdě M - RTLV

LR - nárůst *Lactobacillus rhamnosus* na živné půdě M - RTLV

Vzorek č. 1 nebyl statisticky vyhodnocen z důvodu malého počtu opakování. U toho vzorku byly z živné půdy M - RTLV izolovány kolonie a ty dále podrobeny identifikaci na API 50 CHL testu.

Na všech médiích rostly selektované bakterie v rozmezí 10⁶ až 10⁹ KTJ. Obsahy bakterií ve výrobcích se statisticky významně lišily. Vzorky č. 2, 4, 7 vykazovaly nižší nárůst *Lactobacillus casei* než je deklarováno výrobcem.

Při hodnocení probiotických tablety byla také použita živná půda MRS - V. Po kultivaci na této půdě bylo zjištěno, že nepůsobí dostatečně selektivně. Při identifikaci kolonií bylo zjištěno více druhů bakterií.

V tabulce č. 12 jsou uvedeny hodnoty z kultivace mléčných výrobků. Vzorky byly kultivovány na selektivních půdách pro stanovení bakterií rodu *Lactobacillus*. Živné půdy MRS - LP a MRS - B jsou selektivní pro růst *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus acidophilus*. Tato media jsou schopné inhibovat růst bakterií mléčného kvašení, které jsou obsaženy ve startovací kultuře.

Tab. 12: Výsledky kultivace mléčných výrobků (log KTJ/g)

Číslo vzorku	Název vzorku	Živné médium		
		Rogosa	MRS - LP	MRS - B
8	Bílý jogurt nízkotučný albert Quality	7,11 ± 0,06 ^a	7,11 ± 0,01 ^a	7,12 ± 0,05 ^a
9	Bílý jogurt nízkotučný Price	7,28 ± 0,09 ^a	7,33 ± 0,03 ^a	7,37 ± 0,02 ^a
10	Jogurt nízkotučný – borůvka	5,17 ± 0,06 ^b	4,99 ± 0,03 ^a	5,13 ± 0,04 ^b

Hodnoty v rádcích s různými indexy se statisticky významně liší. Pro srovnání byla použita analýza rozptylu.

Bakterie rostly na médiích v rozmezí 10^4 až 10^7 KTJ. Hodnoty mezi jednotlivými médii se statisticky významně liší jen u vzorku č. 10. U vzorku č. 10 byl obsah probiotické bakterie *Lactobacillus casei* velmi nízký. U ostatních vzorků se hodnoty mezi médii statisticky nelišily.

Ke kontrole růstu bakterií na různých živných médiích byly použity čisté kultury: *L. casei* 1752, *L. casei* Shirota, *L. casei* (Danone), *L. casei*, *L. paracasei subsp. paracasei* (Yakult), *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Tab. 13: Výsledky kultivace čistých kultur na různých živných médiích (log KTJ/g)

Čistá kultura	Živné médium				
	Rogosa	MRS - LP	MRS - B	MRS	M – RTLTV
<i>L. casei</i> 1752	8,52 ± 0,06 ^b	8,78 ± 0,12 ^c	8,88 ± 0,04 ^c	8,85 ± 0,03 ^c	7,67 ± 0,11 ^a
<i>L. casei</i> Shirota	8,19 ± 0,03 ^a	8,83 ± 0,04 ^c	8,89 ± 0,005 ^c	8,87 ± 0,06 ^c	8,49 ± 0,05 ^b
<i>L. casei</i> Danone	9,15 ± 0,04 ^a	9,14 ± 0,08 ^a	9,22 ± 0,04 ^{ab}	9,27 ± 0,03 ^b	9,14 ± 0,02 ^a
<i>L. casei</i>	8,87 ± 0,07 ^b	9,09 ± 0,09 ^c	9,13 ± 0,06 ^c	8,95 ± 0,02 ^b	8,53 ± 0,07 ^a
<i>L. paracasei subsp. paracasei</i>	8,48 ± 0,006 ^a	8,75 ± 0,02 ^b	8,49 ± 0,15 ^a	8,51 ± 0,008 ^a	8,41 ± 0,02 ^a
<i>L. paracasei subsp. paracasei</i> (Yakult)	8,90 ± 0,04 ^{ab}	8,97 ± 0,004 ^b	8,79 ± 0,18 ^a	8,88 ± 0,03 ^{ab}	8,90 ± 0,04 ^{ab}
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	7,10 ± 0,05	0	0	7,60 ± 0,07	0

Vysvětlivky: 0 – nenarostlo

Hodnoty v rádcích s různými indexy se statisticky významně liší.

Pro srovnání byla použita analýza rozptylu a u vzorku *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* T - test.

Nárůst bakterií na různých živných médiích se pohyboval v rozmezí 10⁷ až 10⁹ KTJ. Šest ze sedmi sbírkových kultur tvořilo kolonie na všech testovaných živných půdách. *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* netvořil kolonie na médiích MRS - LP, MRS - B, M - RTLTV. Pro srovnání výsledků *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* byl použit T - test. Jeho hodnoty se statisticky významně liší a roste lépe na médiu MRS. *L. paracasei subsp. paracasei* tvořil velmi vyrovnaný nárůst, který se významně statisticky lišil jen na médiu MRS - LP. *L. casei* Danone tvořil na všech agaroch kolonie v počtu 10⁹ KTJ.

5.2. Výsledky API 50 CHL

U vzorku č. 1 byly izolovány kolonie a ty později identifikovány pomocí API 50 CHL jak je uvedeno v tabulce č. 14. Kolonie byly podrobeny identifikaci z důvodu zjištění spolehlivosti selekce živné půdy M - RTLV.

Kmen byl spolehlivě identifikován, pokud jeho identifikační skóre dosahovalo více než 90 % a pokud byl T index vyšší než 0,75.

Tab. 14: Výsledky identifikace izolovaných kolonií API 50 CHL

Kolonie	Výsledek API	%	T
Bílá kolonie	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99,4	0,79
Červená kolonie	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i> 1	99,8	0,95

Obě kolonie byly spolehlivě identifikovány. Bílá kolonie byla identifikována jako *Lactobacillus rhamnosus*. Červenou kolonii identifikoval API 50 CHL test jako *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*. Ve složení výrobku nebyl *L. paracasei* uveden. Rozdíl ve fermentaci sacharidů *L. casei* a *L. paracasei* je velmi malý (samostatné přílohy tab. 1), rozhodl jsem se proto ověřit možnost identifikace *L. casei* API 50 CHL a použít čisté kultury.

Tabulka č. 15 uvádí výsledky identifikace API 50 CHL sbírkových kultur Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky.

Tab. 15: Výsledky identifikace sbírkových kultur API 50 CHL

Čistá kultura	Výsledek API	%	T
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i> 3	98,9	0,65
<i>L. paracasei subsp. paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i> 3	97,4	0,69
<i>L. paracasei subsp. paracasei</i> (Yakult)	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i> 1	99,5	1,0
<i>Lactobacillus casei</i> Danone	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i> 1	99,9	0,81

Spolehlivě byla identifikována čistá kultura, izolovaná z mléčného výrobku Yakult *L. paracasei subsp. paracasei* s identifikačním skóre 99,5 % a indexem T 1,0 a dále kultura *Lactobacillus casei* Danone kterou API 50 CHL test vyhodnotil jako *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* 1 se skóre 99,9 % a indexem T 0,81.

Sbírková kultura *L. casei* byla identifikována jako *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* s identifikačním skóre 98,9 % a indexem T 0,65. Sbírková kultura *L. paracasei* subsp. *paracasei* taktéž nebyla spolehlivě identifikována.

6. Diskuze

Cílem bakalářské práce bylo stanovení počtu živých buněk *Lactobacillus casei* v potravinách a probiotických produktech. Pro tyto účely byla testována různá selektivní média. Izolované kmeny byly identifikovány pomocí biochemických testů (API).

Sakai et al. (2010) vyvinuli nové selektivní médium M - RTLV agar pro rozlišení *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus paracasei* od *Lactobacillus rhamnosus*. Toto médium je založené na rozdílu zkvasitelnosti L - rhamnosy, přidavku antibiotik vankomycin, metronidazol a redoxního indikátoru 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chlorid (TTC). Na tomto agaru bakterie, které kvasí cukr (rhamnosa) a produkují kyselinu mléčnou, budou mít kolonie bílé nebo světle růžové, protože indikátor TTC je v kyselém prostředí potlačen. Kolonie, které cukr nekvasí, tvoří červené kolonie v důsledku působení TTC. *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus paracasei* tvoří na agaru červené kolonie. *Lactobacillus rhamnosus* tvoří kolonie bílé, někdy světle růžové (samostatné přílohy obr. 4, 5). M - RTLV agar je schopen rozlišit *L. casei*, *L. paracasei* nebo *L. rhamnosus* od většiny bifidobakterií a laktobacilů. Médium není schopné odlišit *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. sakei*.

Výsledky této studie se shodují s mým pozorováním. U vzorku č. 1 byly z nejvyššího ředění izolovány všechny narostlé kolonie. Po kultivaci byly vybrané izoláty identifikovány pomocí API 50 CHL. Červené kolonie byly identifikovány jako *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 1, bílé kolonie jako *Lactobacillus rhamnosus*. Obě kolonie byly identifikovány spolehlivě (samostatné přílohy obr. 1, 2).

Proč API 50 CHL identifikoval *Lactobacillus casei*, který je deklarován na výrobku jako *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 1 může být z různých důvodů.

Buď mohou výrobci dávat do výrobku místo *Lactobacillus casei* *Lactobacillus paracasei*, nebo API 50 CHL nedokáže přesně rozlišit tyto dvě kultury od sebe a identifikuje *L. casei* jako *L. paracasei*. Tyto dvě možnosti byly dále ověřovány.

Pomocí API 50 CHL byly identifikovány 4 sbírkové kultury *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* Danone, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* a *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* izolovaný z mléčného výrobku Yakult. Spolehlivě identifikován byl *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Yakult) a *Lactobacillus casei* Danone. *Lactobacillus casei* Danone API 50 CHL test vyhodnotil jako *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 1 se skóre 99,9 % a indexem T 0,81.

L. casei byl identifikován jako *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* s identifikačním skóre 98,9 % a indexem T 0,65 (samostatné přílohy obr. 3).

Sbírková kultura *L. paracasei subsp. paracasei* taktéž nebyla spolehlivě identifikována. Fermentační profily *L. casei* a *L. paracasei* jsou velmi podobné (samostatné přílohy tab. 1). Domnívám se, že ke spolehlivé identifikaci *L. casei* bude nutné využívat jiné metody např. PCR.

Sakai et al. (2010) testovali na M - RTLV agaru schopnost růstu širokého spektra bakterií. Z bakterií rodu *Lactobacillus* testovali sbírkové kultury *Lactobacillus casei* DSM 20011, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* DSM 5622 a jiné kmeny *Lactobacillus paracasei*.

U dvou stejných sbírkových kultur *Lactobacillus casei* DSM 20011, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* DSM 5622 jsem zjišťoval jejich schopnost růstu na agaru M - RTLV.

Výsledky kultivace byly srovnatelné s výsledky Sakai et al. Na M - RTLV médiu tyto kultury byly schopny růstu. Na agaru jsem testoval dalších 5 sbírkových kultu *L. casei* 1752, *L. casei* Shirota, *L. casei* (Danone), *L. paracasei subsp. paracasei* (Yakult), *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Na této živní půdě byly schopny růst všechny uvedené bakterie až na *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Bakterie na agaru M - RTLV tvořily malé, tmavě červené kolonie.

Všechny sbírkové kultury byly pro kontrolu růstu inokulovány na živnou půdu MRS, umožňující růst všem bakteriím rodu *Lactobacillus*.

Tharmaraj a Shah (2003) uvádějí, že *Lactobacillus rhamnosus* od *Lactobacillus casei* lze selektivně vyčísit na MRS - vancomycin - agaru (MRS - V) inkubovaném při 43 ° C po dobu 72 hodin, protože *L. casei* nemůže růst při této teplotě.

Výsledky, kterých jsem dosáhl, tyto poznatky nepotvrdily. Na živném médiu kultivovaném při těchto podmínkách byl identifikován *L. casei* i jiné bakterie obsažené ve výrobcích. Domnívám se, že některé kmeny *Lactobacillus casei* jsou schopny růst i při vyšších teplotách a jejich selekce pomocí teploty je proto složitá.

Vinderola a Reinheimer (2000) uvádějí ve své práci, že média MRS - B a MRS - LP jsou inhibitory růstu bakterií *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Mé poznatky se shodují s těmito výsledky. Při ověřování možnosti kultivace různých sbírkových kultur na těchto médiích byly schopny růstu jen kmeny *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus paracasei*. Sbírková kultura *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* netvořila žádné kolonie. Živné půdy MRS - B a MRS - LP tedy skutečně inhibují růst bakterií obsažených ve startovací kultuře.

Vinderola a Reinheimer (2000) vybírali skupinu kultivačních medií pro stanovení *L. casei*, když se objeví spolu s *L. acidophilus*, bifidobakteriemi a bakteriemi mléčného kvašení ve fermentovaných výrobcích.

Vinderola a Reinheimer (2000) uvádějí, že lithium - propionát MRS agar a žlučový MRS agar byly použity jako selektivní nebo diferenciální medium. *L. casei* tvořil kolonie bílé, krémové na obou médiích s průměrem v rozmezí 1,7 - 2,4 mm (MRS - LP agar) a od 0,9 na 1,3 mm (MRS - B agar), *L. acidophilus* tvořil na MRS - B agar nepravidelné světle hnědé kolonie v rozmezí průměru 0,9 - 1,5 mm. Tato media jsou schopná inhibovat růst bakterií mléčného kvašení, které jsou obsaženy ve startovací kultuře. Agar MRS - B je užitečný pro selektivní růst *L. casei* a *L. acidophilus* nebo pro diferenciální výčet pokud se tyto bakterie objeví společně ve fermentovaných mléčných výrobcích.

Ve své práci jsem zkoušel na tyto dvě média naočkovat výrobek se složením: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum*, *B. longum*, *S. thermophilus*. Růst *S. thermophilus* byl inhibován vlastnostmi těchto médií a růst bifidobakterií byl potlačen kultivací při aerobních podmínkách. Při identifikaci kolonií na agaru MRS - B nebyly znát žádné rozdíly v barvě kolonií. Všechny kolonie byly bílé barvy. Rozdíl by mohl být pouze ve velikosti každého druhu, ale to nebylo určováno.

Tato živná média byla použita pro výčet *Lactobacillus casei* z mléčných výrobků, které obsahovaly jen *Lactobacillus casei*.

Obsah probiotické bakterie *Lactobacillus casei* v testovaných tabletách se pohyboval v rozmezí 10^6 až 10^9 KTJ. Jednotlivé druhy tablet se v obsahu probiotické bakterie statisticky významně lišily. Vzorke č. 2, 4, 7 vykazovaly nižší nárůst *Lactobacillus casei* než je deklarováno výrobcem. Obsah se však pohyboval nad 10^6 KTJ což je stále v souladu s vyhláškou Ministerstva zemědělství.

Nižší nárůst na živné půdě mohl být způsoben selekčními vlastnostmi půdy, která nevytvořila zcela ideální podmínky pro růst *Lactobacillus casei*.

Obsah *Lactobacillus casei* v testovaných mléčných výrobcích se pohyboval v rozmezí 10^4 až 10^7 KTJ. U vzorku č. 10 byl obsah bakterie menší než 10^6 KTJ a nesplňoval vyhláškou stanovené minimum. U ostatních vzorků byl nárůst vyrovnaný a hodnoty na jednotlivých médiích se statisticky významně nelišily.

Pro další určování počtu živých buněk *Lactobacillus casei* v probiotických výrobcích by bylo zajímavé vyzkoušet živnou půdu LC - agar jak navrhuje Ravula a Shah (1998).

7. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo stanovení počtu živých buněk bakterie *Lactobacillus casei* v probiotických výrobcích a potravinách. K tomu jsem používal různá selektivní média a izolované kolonie byly identifikovány pomocí biochemických testů API 50 CHL.

Ke stanovení *Lactobacillus casei* v mléčných výrobcích byla použita živná média Rogosa, MRS - B a MRS - LP. Při stanovení *Lactobacillus casei* v probiotických tabletách média MRS, M - RTLV, MRS - V. Jako kontrolu růstu bakterií na těchto agaroch jsem použil sbírkové kultury: *L. casei* 1752, *L. casei* Shirota, *L. casei* (Danone), *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* (Yakult), *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Stanovení *Lactobacillus casei* z probiotických potravin, které obsahují velké množství různých bakterií je velmi problematické. U výrobků, které obsahují jen *Lactobacillus casei* se dají použít živné půdy MRS - LP a MRS - B. U výrobků se širokým spektrem bakterií, jako jsou probiotické tablety, se jeví jako nejlepší možnost použití živné půdy M - RTLV agar, která dokáže velké množství bakterií selektovat. V dnes širokém spektru výrobků se vyskytují takové probiotické výrobky obsahující i bakterie, které tyto půdy nejsou schopny selektovat a vyčíslení *Lactobacillus casei* je tak složité. Pro nalezení selektivní půdy pro kultivaci *Lactobacillus casei* je potřeba se i nadále zabývat touto problematikou.

U většiny výrobků byl obsah bakterií srovnatelný s deklarovanou hodnotou na výrobku a splňoval vyhláškou stanovené minimum.

8. Seznam literatury

Bronský, J. 2009. Probiotické kmeny v mateřském mléce. Sborník přednášek IV. Symposia společnosti pro probiotika a prebiotika. IV. 10.

Čechová, L., Janalíková, M. 2007. Obecná mikrobiologie. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Zlín. 190 s. ISBN: 978-80-7318-516-9.

De Verse, M., Schrezenmeir, J. 2008. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics. Advances in biochemical engineering biotechnology. 111. 1 – 66.

Erdogřul, Ö., Erbilir, F. 2005. Isolation and Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various Foods. Turkish Journal of Biology. 30. 39 – 44.

Goktepe, I., Juneja, V.K., Ahmedna, M. 2006. Probiotics in food safety and human health. Taylor and Francis group. USA. p. 494. ISBN: 978-1-57444-514-5.

Görner, F., Valík, L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívatin. Malé Centrum. Bratislava. 528 s. ISBN: 80-967064-9-7.

Guo, M. 2009. Functional foods: principles and technology. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. USA. p. 358. ISBN: 978-1-84569-592-7.

ČSN 560094. Potravinářské výrobky. Stanovení počtu bakterií rodu *Lactobacillus*. 1988. Český normalizační institut. Praha. 8.

Hrubý, S., Turek, B. 1989. Hygienická problematika mikroflóry trávicího ústrojí u člověka. Avicenum. Praha. 136 s. ISBN: 08-067-89.

Jardine, S. 2009. Prebiotics and Probiotics. Leatherhead Food International. United Kingdom. p. 152. ISBN: 978-1905224-52-4.

Kalač, P. 2003. Funkční potraviny- kroky ke zdraví. Dona. České Budějovice. 130 s. ISBN: 80-7322-029-6.

- Krieg, N.R., Holt, J.G. 1986. Bergeys manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore. p. 1599. ISBN: 0-683-07893-3
- Kun Lee, Y., Salminen, S. 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley and Sons. New Jersey. p. 596. ISBN: 978-0-470-13544-0.
- Kvasničková, A. 2000. Sacharidy pro funkční potraviny: Probiotika – Symbiotika - Prebiotika. ÚZPI. Praha. 81 s. ISBN: 80-7271-001.
- Matsuzaki, T. 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. International Journal of Food Microbiology. 41(2). 133 – 40.
- Maxa, V., Rada, V. 1996. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. ÚZPI. Praha. 42 s. ISBN: 80-85120-57-7.
- Nováková, P., Paulová, M., Buriánová, I. 2009. Role probiotických bakterií v kojeneckém věku. Sborník přednášek IV. Symposia společnosti pro probiotika a prebiotika. IV. 9.
- Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G., Gobbato, N. 1995. Immune system stimulation by probiotics. Journal of Dairy Science. 78(7). 1597 – 606.
- Plocková, M., Březina, P. 1988. Mikrobiologie mléka a tuků. VŠCHT. Praha. 228 s.
- Rada, V., Nevoral, J., Flajšmanová, K., Ročková, Š., Grmanová, M., Vlková, E., Nováková, I. 2009. Je mateřské mléko přirozeným zdrojem bifidobakterií?. Sborník přednášek IV. Symposia společnosti pro probiotika a prebiotika. IV. 11.
- Ravula, R.R., Shah, N.P. 1998. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. Biotechnology Techniques. 11. 819 - 822.
- Saarela, M. 2007. Functional dairy products. Woodhead publishing. Cambridge. p. 539. ISBN: 978-1-4200-4398-3.

- Saarela, M. 2011. Functional foods. Woodhead publishing. Cambridge. p. 640.
ISBN: 978-1-84569-690-0.
- Sakai, T., Oishi, K., Asahara, T., Takada, T., Yuki, N., Matsumoto, K., Nomoto, K., Kushiro, A. 2010. M- RTLV agar, a novel selective medium to distinguish *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus*. International Journal of Food Microbiology. 139. 154 - 160.
- Salminen, O., Wright, A., Ouwehand, A. 2004. Lactid acid bacteria, microbiological and functional aspects. Marcel Dekker, Inc. New York. p. 633. ISBN: 0-8247-5332-1.
- Sedláček, I. 2007. Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita. Brno. 270 s.
ISBN: 978-80-210-4207-0.
- Singh, S., Goswami, P., Singh, R., Heller, H.J. 2009. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. LWT – Food Science and Technology. 42. 448 – 457.
- Šilhánková, L. 2008. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Academia. Praha. 363 s.
ISBN: 978-80-200-1703-1.
- Sungsoo Cho, S., Finocchiaro, E.T. 2010. Prebiotics and Probiotics ingredients, Health benefits and food applications. Taylor and Francis group CRC press. USA. p. 435.
ISBN: 978-1-4200-6213-7.
- Tharmaraj, N., Shah, N.P. 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. Journal of Dairy Science. 86. 2288 – 2296.
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. 2000. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, *Bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. International dairy journal. 10. 271 - 275.

Vlková, E., Rada, V., Killer, J. 2009. Potravinářská mikrobiologie. ČZU v Praze. Praha. 168 s. ISBN: 978-80-213-1988-2.

Voříšek, K. 1989. Probiotika a gastrointestinální mikroflóra. ČZU v Praze. Praha. 114 s. ISBN: 80-213-007-8.

Zadrazil, K. 2002. Mlékárenství 1. vydání. ČZU a ISV. Praha. 127 s. ISBN: 80-86642-15-1.

Zbořil, V. 2005. Mikroflóra trávicího traktu- klinické souvislosti. Grada publishing. Praha. 156 s. ISBN: 80-247-0584-2.

9. Seznam použitých zkratk

GIT – gastrointestinální trakt

C. – *Clostridium*

B. – *Bifidobacterium*

E. – *Enterococcus*

S. – *Streptococcus*

L. – *Lactobacillus*

ssp. – subspecies

TTC – 2, 3, 5 – triphenyltetrazolium chlorid

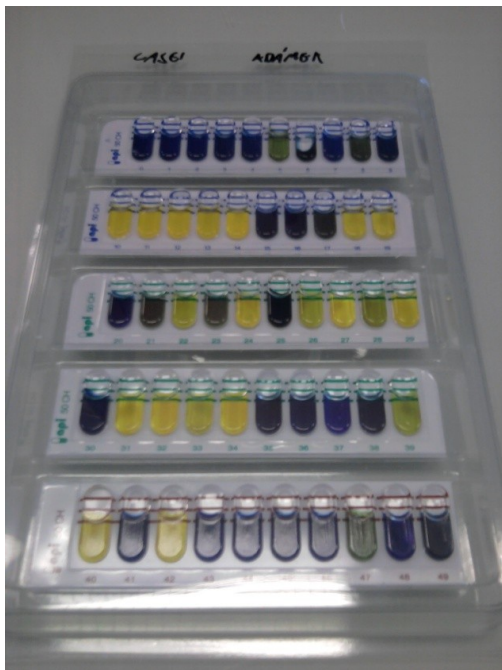
10. Samostatné přílohy

Tab. 1: Fermentační profily bakterií (Krieg a Holt, 1986)

Druh	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>
Amygdalin	+	+	+
Arabinose	-	-	+
Cellobiose	+	+	+
Esculin	+	+	+
Fructose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Gluconate	+	+	+
Lactose	-	+	+
Maltose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Mannose	+	+	+
Melezitose	+	+	+
Melibiose	-	-	-
Raffinose	-	-	-
Rhamnose	-	-	+
Ribose	+	+	+
Salicin	+	+	+
Sorbitol	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Xylose	-	-	-

Výsledky API 50 CHL:

Obr. 1: API 50 CHL červené izolované kolonie z výrobku č. 1



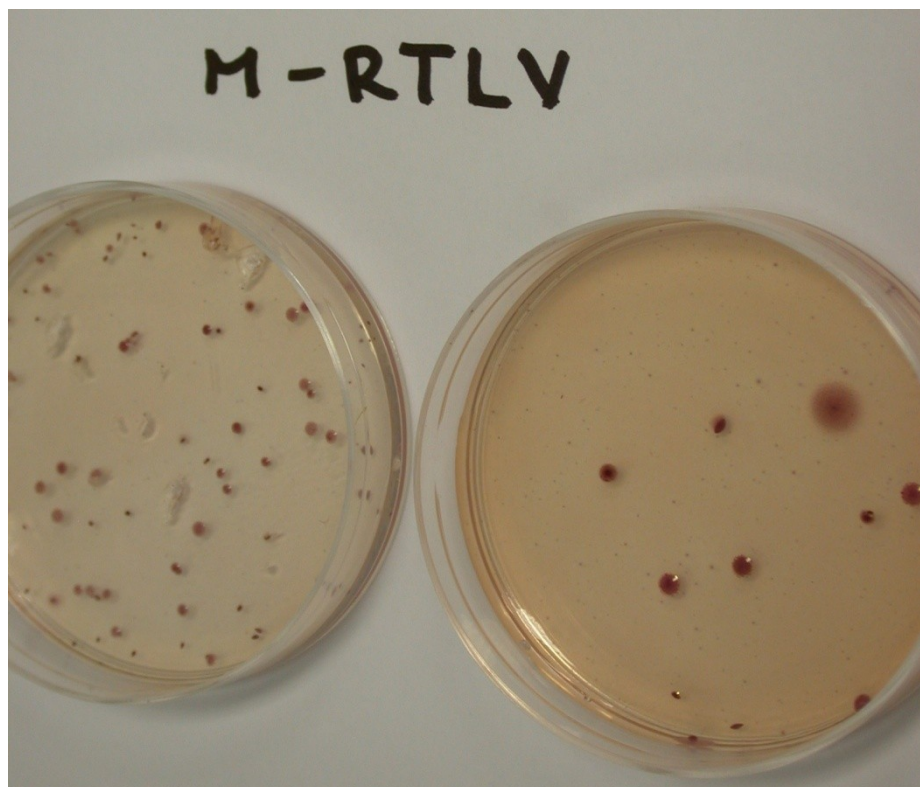
Obr. 2: API 50 CHL bílé izolované kolonie z výrobku č. 1



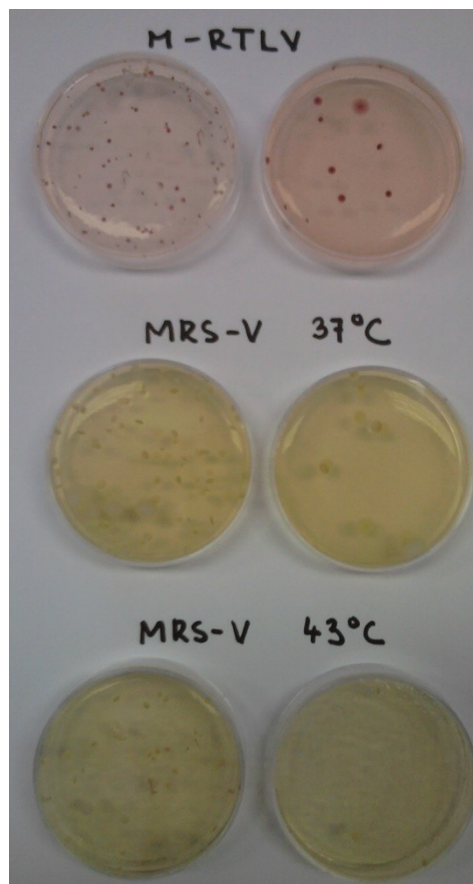
Obr. 3: API 50 CHL sbírkového kmene *L. casei*



Obr. 4: Kultivace na M-RTL V agaru

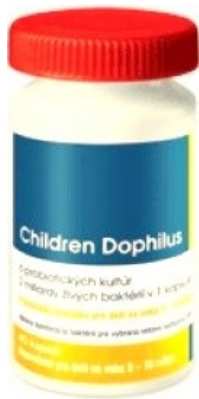


Obr. 5: Kultivace na různých agarech

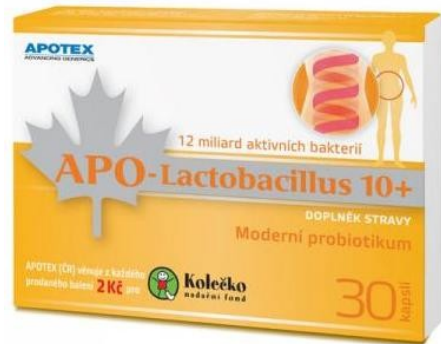


Obrázky použitých výrobků:

Obr. 6: *Children dophilus* vz. č. 1



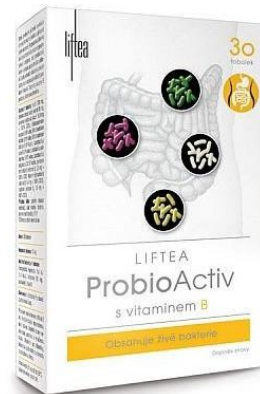
Obr. 7: *APO – Lactobacillus ATB* vz. č. 2



Obr. 8: *APO – Baby probio* vz. č. 3



Obr. 9: *Probio activ s vit. B* vz. č. 4



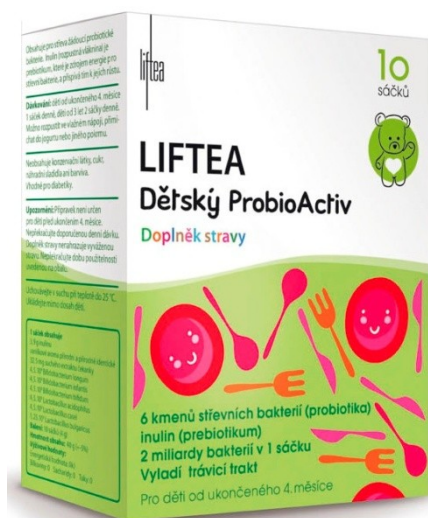
Obr. 10: *Syn bio* vz. č. 5



Obr. 11: *Swiss Lactobacily* vz. č. 6



Obr. 12: Liftea dětský probioactiv vz. č. 7



Obr. 13: Bílý jogurt albert quality vz. č. 8



Obr. 14: Bílý jogurt price vz. č. 9



Obr. 15: Jogurt nízkotučný borůvka vz. č. 10

