

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Rostlinné a bakteriální polysacharidy jako možné
kryo – a lyo-protektivní látky pro dlouhodobou konzervaci
a vývoj nových probiotik či synbiotik**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Veronika Ryšavá

Obor studia: Výživa a potraviny

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

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Rostlinné a bakteriální polysacharidy jako možné kryo – a lyo-protektivní látky pro dlouhodobou konzervaci a vývoj nových probiotik či synbiotik" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu doc. Ing. Jiřímu Killerovi, Ph.D. z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR za odborné vedení a cenné rady při zpracovávání této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině za velkou podporu během studií.

Rostlinné a bakteriální polysacharidy jako možné kryo – a lyo-protektivní látky pro dlouhodobou konzervaci a vývoj nových probiotik či synbiotik

Souhrn

V dnešní době, kdy je více nežli jasné, jak významnou roli hraje mikrobiom ve zdraví člověka, stoupá zájem o probiotické preparáty. Tyto doplňky stravy se nejčastěji podávají ve formě kapslí a tablet. Efektivnějším způsobem, tedy kromě každodenní konzumace fermentovaných potravin či nápojů, je podání tzv. synbiotik, které kromě probiotických mikroorganismů obsahují také živiny pro tyto bakterie. Během procesu konzervace je vhodné využití látek, které zvyšují jejich životaschopnost – kryoprotektiv resp. lyoprotektiv.

Nové látky s potenciálním kryo – a lyoprotektivním účinkem jsou předmětem vědeckého zkoumání. Při dlouhodobé konzervaci potenciálně probiotických kmenů by takový účinek mohly mít i rostlinné, resp. bakteriální polysacharidy.

Cílem této diplomové práce byl průzkum potenciálního kryo(lyo)protektivního účinku rostlinných a bakteriálních polysacharidů, konkrétně guarové a xanthanové gumy. Tyto dvě sloučeniny se již běžně využívají v potravinářském průmyslu jako zahušťovadla a stabilizátory. Kromě toho vykazují i prebiotický účinek. Pro účely tohoto výzkumu bylo vybráno několik probiotických bakterií: *Bifidobacterium bifidum*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *Ruminococcus gnavus*, *Blautia luti*, *Blautia provensis* a *Bifidobacterium longum*. U uvedených kmenů byla sledována vitalita buněk a následně byla porovnávána s pozitivní (25% glycerol v případě mrazení, 5% rekonstituované sušené mléko v případě lyofilizace) a negativní kontrolou (kultura bez přidaných látek).

Ačkoliv v případě lyofilizovaných vzorků *Bifidobacterium bifidum* a *Bacteroides thetaiotamicron* se životaschopnost buněk po celou dobu experimentu (180 dní) významně neměnila, převážná většina námi testovaných kmenů však nevykazovala vyšší počty vitálních buněk v přítomnosti guarové či xanthanové gumy.

S ohledem na dostupné informace z odborné literatury, a především z výsledků praktické části této práce nelze potvrdit, že by námi vybrané polysacharidy měly kryo(lyo)protektivní účinek. Získané poznatky by však mohly být nápomocné v budoucnu při dalších výzkumech v této oblasti.

Klíčová slova: probiotika, kryoprotektiva, lyoprotektiva, dlouhodobá konzervace bakterií, lyofilizace, mrazení, fyziologická intestinální mikrobiota

Plant and bacterial polysaccharides as possible cryo – and lyo-protective substances for long-term conservation and development of new probiotics or synbiotics

Summary

Nowadays, when it is more than clear how the microbiome plays a role in human health, interest in probiotic preparations is increasing. These dietary supplements are most often given in the form of capsules and tablets. A more effective way, in addition to the daily consumption of fermented foods or drinks, is the consumption of so-called synbiotics, which, in addition to probiotic microorganisms, also contain nutrition for these bacteria. During the process of using substances, which preservation of their viability is appropriate – cryoprotectant or lyoprotectant.

New substances with a potential cryo – and lyoprotective effect are the subject of the scientific research. In the long-term preservation of potentially probiotic strains, plant or bacterial polysaccharides.

We focused on potential cryo(lyo)protective effects of plant and bacterial polysaccharides, specifically guar and xanthan gum. These two compounds are already commonly used in the food industry as thickeners and stabilizers. In addition, they also have a prebiotic effect. Several probiotic strains were selected for the purposes of this research: *Bifidobacterium bifidum*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *Ruminococcus gnavus*, *Blautia luti*, *Blautia provensis* and *Bifidobacterium longum*. Cell vitality was monitored for the mentioned strains and subsequently compared with a positive (25% glycerol in the case of freezing, 5% reconstituted skimmed milk in the case of lyophilization) and a negative control (culture without added substances).

Although in the case of lyophilized samples of *Bifidobacterium bifidum* and *Bacteroides thetaiotamicron*, cell viability did not change significantly throughout the experiment (180 days), the vast majority of the strains that we tested did not show higher numbers of vital cells in the presence of guar or xanthan gum.

From the point of view of the available thesis and researches, and above all from the results of our experiment, it cannot be confirmed that the polysaccharides we selected had a cryo(lyo)protective effect. Therefore, these assumptions can be applied in future research.

Keywords: probiotics, cryoprotectants, lyoprotectants, long-term preservation of bacteria, lyophilization, freeze-drying, physiological intestinal microbiota

Obsah

1	Úvod	7
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Probiotika	9
3.1.1	Účinky probiotik	9
3.2	Prebiotika	11
3.2.1	Druhy prebiotik	11
3.2.2	Synbiotika.....	17
3.2.3	Parabiotika.....	17
3.2.4	Postbiotika.....	17
3.2.5	Psychobiotika	17
3.3	Legislativa	18
3.4	Kritéria	19
3.5	Mikroorganismy používané jako probiotické	21
3.5.1	Charakteristika vybraných mikroorganismů s probiotickým potenciálem	21
3.5.2	Dostupné probiotické preparáty	23
3.6	Hledání nových probiotických kmenů	25
3.6.1	Probiotika nové generace	27
3.7	Vliv mikrobiomu na zdraví člověka	30
3.8	Dysbióza střevního mikrobiomu	32
3.9	Metody dlouhodobé konzervace mikroorganismů	34
3.9.1	Sušení	34
3.9.2	Sprejové sušení.....	34
3.9.3	Lyofilizace.....	35
3.9.4	Kryokonzervace	38
4	Materiál a metody	41
4.1	Zvolené bakteriální kmeny	41
4.2	Příprava a složení růstového média	42
4.3	Rekonstituce kultur	42
4.4	Stanovení původních počtů bakterií	43
4.5	Příprava potenciálních lyo(kryo) protektivních roztoků	43
4.6	Příprava směsi bakteriálních kultur a roztoků potenciálně lyo(kryo) protektivních látek před konzervací	44

4.7	Počty vitálních buněk v časových intervalech	45
5	Výsledky	46
5.1	Počty vitálních buněk u zmrazených kultur vybraných mikroorganismů	46
5.1.1	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	47
5.1.2	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	48
5.1.3	<i>Ruminococcus gnavus</i>	49
5.1.4	<i>Blautia luti</i>	50
5.1.5	<i>Blautia provensensis</i>	51
5.1.6	<i>Bifidobacterium longum</i>	52
5.2	Počty vitálních buněk u lyofilizovaných kultur vybraných mikroorganismů.....	53
5.2.1	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	54
5.2.2	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	55
5.2.3	<i>Ruminococcus gnavus</i>	56
5.2.4	<i>Blautia luti</i>	57
5.2.5	<i>Blautia provensensis</i>	58
5.2.6	<i>Bifidobacterium longum</i>	59
5.3	Statistické porovnání zvolených konzervačních technik.....	60
6	Diskuze.....	61
7	Závěr	66
8	Seznam literatury	67
9	Zdroje obrázků	75
10	Seznam tabulek, obrázků a grafů	76
11	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	77

1 Úvod

Role fyziologické mikrobioty intestinálního traktu člověka ve zdraví a nemoci je intenzivně studována od druhé poloviny minulého století. Stovky relevantních studií potvrzují či naznačují podstatný vliv nenarušené mikrobioty intestinálního traktu s dominancí grampozitivních rodů *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Blautia* na lidské zdraví. Při různých, nejen intestinálních, onemocněních dochází téměř vždy k tzv. dysbióze, resp. ke kvantitativnímu a kvalitativnímu narušení fyziologické intestinální mikrobioty doprovázené často prevalencí některých gramnegativních (*Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Pasteurella*, *Klebsiella* či *Fusobacterium*) a grampozitivních rodů (*Streptococcus*) bakterií.

Již od začátku výzkumů byly tudíž tendence nastolit rovnováhu intestinální mikrobioty. Jako nadějně se zdálo a zdá být využití nepatogenních zástupců fyziologické mikrobioty (především zástupci rodu *Bifidobacterium* a čeledi *Lactobacillaceae*), kteří kromě prokazatelných pozitivních zdravotních přínosů vykazují rovněž příhodné technologické vlastnosti (dobrý růst v kulturačních médiích, rezistence vůči nepříznivým podmínkám výroby: aerotolerance, genetická stabilita apod.). Ty jsou souhrnně označovány jako tzv. probiotika: „živé mikroorganismy schopné, pokud jsou aplikovány v dostatečném množství živých buněk, zajistit zdravotní přínos hostiteli“. Pomineme-li specifická probiotika (ústní či kožní), definici mohou splňovat pouze ty rody (druhy) nepatogenních mikroorganismů (hlavně bakterií) vyskytující se ve zdraví přirozeně v intestinálním traktu ve vysokém počtu. Z nejhodněji distribuovaných probiotik uvedené požadavky splňují pouze některé taxony bifidobakterií. Laktobacily, třebaže jsou součástí většiny dostupných probiotik a jsou hojně diskutovány, daná kritéria nespĺňují. Jde o tzv. allochtonní bakterie intestinálního traktu člověka, které představují minoritní zastoupení fyziologické mikrobioty s neschopností trvalého osídlení intestinálního traktu.

To je jeden z důvodů, proč se badatelé po celém světě snaží hledat alternativní probiotika zahrnující jiné zástupce fyziologické mikrobioty intestinálního traktu. Za mnohem vhodnější formu podání probiotik jsou považována tzv. synbiotika, resp. současné podání probiotik a prebiotik vykazující v důsledku synergický efekt. Prebiotika jsou nejčastěji vybrané oligosacharidy či polysacharidy procházející v nezměněné podobě trávicím traktem do střev, kde selektivně podporují růst a/nebo aktivitu některých zástupců fyziologické mikrobioty. Nejčastější formou podání probiotik a synbiotik, kromě kysaných mléčných produktů, jsou kapsle, tablety a pilulky obsahující lyofilizované (zjednodušeně „vysušené mrazem“) bifidobakterie a/nebo laktobacily. Výzkum zaměřený na možnou aplikaci zmrazených probiotik či synbiotik aktuálně probíhá. Je známo či se předpokládá, že některá prebiotika mohou rovněž zlepšit technologické vlastnosti probiotik zahrnující např. zvýšení počtu živých buněk v průběhu lyofilizace či mrazení. Předmětem této práce je snaha zjistit, zda v potravinářství hojně používané vybrané rostlinné a bakteriální polysacharidy mohou zvýšit počet životaschopných buněk zástupců fyziologické mikrobioty (*Bifidobacterium* sp., *Blautia* sp., *Bacteroides* sp., *Ruminococcus* sp.) v průběhu lyofilizace, mrazení a následném skladování, což v důsledku může vést k vývinu nových forem probiotik či synbiotik.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Na typových a čerstvých izolátech bifidobakterií a jiných zástupců fyziologické mikrobioty intestinálního traktu testovat možný kryoprotektivní a/nebo lyoprotektivní efekt guarové gumy a xanthanu, v potravinářství hojně používaný rostlinný, resp. bakteriální polysacharid jakožto zahušřovadlo, plnidlo a stabilizátor. Výsledky počtu vitálních buněk (jako KTJ – kolonie tvořící jednotky) následně porovnat s pozitivní (25% glycerol v případě mrazení, 5% rekonstituované sušené mléko v případě lyofilizace) a negativní kontrolou (kultury bez přídavných látek).

Hypotéza: V potravinářství často používané rostlinné a bakteriální polysacharidy v podobě guarové gumy a xanthanu působí jako kryoprotektivní a/nebo lyoprotektivní látky a zvyšují vitalitu buněk používaných probiotik a jiných potenciálně probiotických rodů intestinálních bakterií v průběhu a po kryokonzervaci a/nebo lyofilizaci. Nově vyvinuté metody by mohly být využity jako nástroj pro vývoj nových forem probiotik či synbiotik.

3 Literární rešerše

3.1 Probiotika

Slovo probiotické pochází z řeckého „pro bios“ - v překladu pro život. Tento pojem poprvé použil vědec Werner Kollath již v roce 1953 (McFarland, 2015). Definice tohoto slova se postupem času vyvíjela a měnila. Avšak i před samotným pojmenováním probiotik byly tyto mikroorganismy hojně využívány a konzumovány ve formě fermentovaných potravin, ať už v pivu, vínu nebo v mléčných výrobcích jako jsou nejrůznější sýry, kefir či kumys. Nejaktuálnější definici vydaly Organizace pro výživu a zemědělství a Světová zdravotnická organizace (FAO/WHO):

„Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství poskytují zdravotní přínos pro hostitele.“

Jedná se o mono, častěji však o směsné kultury mikroorganismů, které v lidském těle zlepšují složení střevní mikrobioty (Gaucher et al., 2019). Probiotika jsou dostupná nejen v každodenně konzumovaných potravinách, ale také ve formě pilulek, prášků, nebo jsou obsažena v kojenecké výživě (Sanders 2003). Existuje i řada tzv. funkčních potravin, které jsou záměrně obohacovány o probiotické bakterie (Saeed et al., 2022). Mikrobiální dysbióza ve střevech je pak spojována s řadou střevních onemocnění. Může mít i nemalý vliv na duševní pohodu a hraje roli při výskytu obezity a dalších onemocnění (Gaucher et al., 2019). Tomuto tématu se však bude věnovat samostatná kapitola.

Lidský intestinální systém je kolonizován více než 500 druhy mikroorganismů, obsahuje téměř 10^{14} bakteriálních buněk, dále je kolonizován viry, kvasinkami i protozoa (Govender et al., 2014).

Samotná probiotika by měly být izolované mikroorganismy lidského původu. Velice podstatné je množství, které je podávané, neboť bakterie musí překonat kyselé prostředí žaludku a odolat působení žlučových solí a jiných možných inhibujících látek (Salminen et al., 1996).

Probiotika jsou tedy přesně definované mikroorganismy, které se mohou přidávat do potravin či potravinových doplňků (Binda et al. 2020).

Pro patrný terapeutický nebo fyziologický účinek uvádí Sarowska et al. (2013) doporučený příjem minimálně v rozmezí 10^6 – 10^9 KTJ (kolonii tvořících jednotek) na den.

3.1.1 Účinky probiotik

Důkazů o významné roli probiotik v lidské výživě, ať už při jejich preventivním použití nebo cíleném při nejrůznějších potížích, neustále přibývá (Sanders, 2003). Bylo prokázáno, že probiotika (i prebiotika) mění, modifikují a obnovují již existující střevní flóru. Usnadňují také funkci střevního prostředí (Pandey et al., 2015). Bakterie, které sídlí v našem těle a tvoří náš střevní mikrobiom, vykazují řadu aktivit a mají nemalý podíl na našem zdraví. Výsledky řady studií ukazují, že jsou důležité nejen pro naše správné trávení, ale také snižují

výskyt zánětlivých onemocnění střev, potlačují patogenní mikroorganismy a napomáhají vstřebávání živin (Saeed et al., 2022). Marttinen et al. (2020) pak také uvádí, že složení mikrobiomu může mít pozitivní vliv na fyzický výkon, zejména u sportovců.

Velice významné jsou jejich imunomodulační vlastnosti, avšak konkrétní imunitní mechanismy zůstávají do značné míry nedefinované. To hlavně z toho důvodu, že tyto mechanismy mohou být v lidském těle jen omezeně sledovány, většina studií je tedy prováděna na zvířatech (Oleskin & Shenderov 2019). Thomas (2016) však poukazuje na skutečnost, že tyto imunomodulační mechanismy, které se ukázaly například u *Lactobacillus casei* Shirota se liší podle toho, jaké další bakterie nebo buněčné složky jsou ve střevu přítomny.

Probiotika mohou modulovat metabolismus ve střevě tak, že snižují hladiny toxigenních nebo karcinogenních metabolitů (Thomas 2016).

Některé studie uvádějí, že mohou napomáhat v prevenci výskytu alergií. Také mohou redukovat intoleranci laktózy (D'Silva, 2011). Probiotika byla popsána jako terapeutická alternativa ke snížení některých neurologických a psychiatrických onemocnění (Gomaa, 2020). Mohajeri et al. (2018) uvádějí, že probiotika obsahující *Lactobacillus helveticus* a *Bifidobacterium longum* prokázala příznivé psychologické účinky u zdravých lidských dobrovolníků s významnými zlepšeními v několika globálních testech, včetně snížení psychologických symptomů, deprese a úzkosti.

Přestože jsou probiotika pro lidský organismus velmi přínosná, jejich podávání může nést i některé nežádoucí účinky. Jak uvádějí Newman & Arshad (2020), ty se však ve většině případů týkají pacientů, kteří mají nějakým způsobem poškozenou střevní bariéru, akutní kolitidu nebo je jim dlouhodobě zaveden katetr. V těchto případech mohou i bakterie, které nejsou virulentní, způsobit infekci. Zawistowska-Rojek & Tyski (2018) zdůrazňují, že možná neznalost určité aktivity probiotických mikroorganismů by také mohla vést k nežádoucím účinkům. Proto je nezbytné využívat takové kmeny, které jsou dostatečně probádané. Je nezbytné, aby používaná probiotika splňovala řadu kritérií, tomu bude věnována celá kapitola.

3.2 Prebiotika

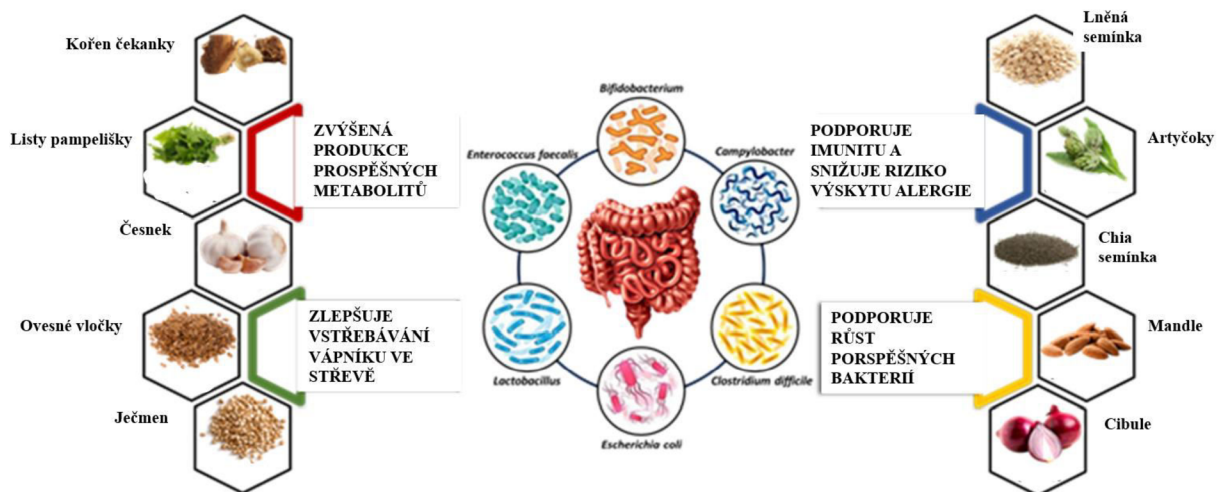
Prebiotika jsou skupinou živin, které jsou degradovány střevní mikrobiotou. Slouží jako substrát pro probiotika (Davani-Davari et al., 2019). Nejaktuálnější definice prebiotik tedy zní:

„Prebiotika jsou definována jako selektivně fermentované složky, které umožňují specifické změny ve složení a/nebo aktivitě gastrointestinální mikroflóry, což přináší pro organismus zdravotní přínos.“

(Davani-Davari et al., 2019).

Nestravitelné sacharidy, jako je vláknina a rezistentní škrob, nejsou enzymaticky degradovány v tenkém střevě. Spíše putují do tlustého střeva, kde podléhají fermentaci rezidentními mikroorganismy. Vláknina je tedy dobrým zdrojem sacharidů dostupných pro mikrobiom, kterou mohou využít k tomu, aby hostiteli poskytla energii a zdroj uhlíku. Pokud jde o jejich účinky na specifické bakteriální rody, mnoho studií naznačuje, že strava bohatá na nestravitelné sacharidy nejkonzistentněji zvyšuje střevní bifidobakterie a bakterie mléčného kvašení (Singh et al., 2017).

Kromě jejich účinků na složení mikrobioty, a pravděpodobně částečně zprostředkovaných těmito účinky, prebiotika také produkují pozoruhodné posuny v metabolických a imunitních markerech. Několik skupin například pozorovalo snížení prozánětlivého cytokinu IL-6 (Singh et al., 2017).



Obrázek č. 1. Schématické znázornění zdrojů a funkcí prebiotik (Převzato dle Kaur et al., 2021).

3.2.1 Druhy prebiotik

Od doby, kdy byla pochopena role střevní mikrobioty v metabolismu, roste den ode dne význam složek potravy, jako je vláknina a prebiotika, která ovlivňují modulaci mikrobioty. Zatímco všechny prebiotické složky jsou považovány za vlákninu, ne každá vláknina je považována za prebiotikum. Zatímco fruktooligosacharidy (FOS),

galaktooligosacharidy (GOS), inulin a galaktany jsou považovány za prebiotika, ostatní fermentovatelné sacharidy mohou být považovány za kandidátní prebiotické složky na základě *in vitro* a preklinických studií (Tekin & Dincer 2023).

Nejčastěji přijímaná prebiotika jsou inulin, laktulóza, FOS, GOS a oligosacharidy mateřského mléka (HMO – human milk oligosaccharides). Existuje stále rostoucí seznam potenciálních prebiotik, ačkoli důkazy o nich, zejména u lidí, nejsou zatím tak dobře známy jako u FOS a GOS (Míguez et al. 2016).

Trávením prebiotik komenzálními organismy vznikají metabolické vedlejší produkty, jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) butyrát, propionát a acetát. SCFA slouží ke zlepšení bariérové funkce střeva prostřednictvím mnoha mechanismů, včetně poskytování energie pro enterocyty (Newman & Arshad 2020). V Evropě se nejčastěji jako prebiotika konzumují fruktooligosacharidy (FOS) přirozeně se vyskytující v nejrůznějších druzích zeleniny jako jsou česnek, cibule, pórek nebo chřest (Govender et al., 2014). Jedná se o lineární řetězce fruktózy.

Oligosacharidy jsou cukry složené z několika monosacharidových jednotek (2–10). V přírodě jsou běžně dostupné a jedná se především o složky rostlin, ale i živočišných produktů (Belorkar & Gupta, 2016). Jsou důležité pro podporu růstu bifidobakterií ve střevech kojenců, pomáhají předcházet průjmům a také napomáhají vývoji nervové soustavy. To je důvod, proč se prebiotické oligosacharidové složky běžně přidávají do kojenecké výživy, obvykle v množství mezi 0,3 a 0,8 g na porci (Thomas, 2016). Oligosacharidy, které se však v současnosti přidávají do kojenecké výživy jsou strukturálně odlišné od oligosacharidů přirozeně se vyskytujících v mateřském mléce (Musilová et al., 2014).

Mezi selektivní prebiotika patří například oligosacharidy nacházející se v HMO. Můžeme je nalézt jako volné oligosacharidy nebo v konjugované formě s proteiny případně lipidy. Schopností využívat HMO je známý především kmen *B. longum* subsp. *infantis* (Thomson et al., 2017).

Psyllium

Vláknina získaná z osemení jitrocele vejčitého se hojně využívá v potravinářství jako zahušňovací či stabilizátor. Skládá se z vysoce rozvětveného a gelotvorného arabinoxylanu, polymeru bohatého na arabinózu a xylózu, který je omezeně stravitelný. Vytváří slizy, které váží asi 40x více vodu ve střevě a tím zvyšuje objem stolice – intestinální peristaltika je stimulována – dochází ke zrychlenému střevnímu průchodu. Konzumace psyllia nevede ke vzniku střevních plynů. Studie ukazují, že jeho pozitivní vliv na mikrobiom spočívá především ve zvýšení hladiny SCFA v tlustém střevě (Jalanka et al. 2019).

Fruktooligosacharidy

Lze je rozdělit na přírodní a syntetické. Zástupcem přírodních FOS je inulin, naproti tomu nejčastěji využívaným syntetickým FOS je laktulóza.

- *Inulin*

Inulin je zásobní polysacharid rostlin patřící do skupiny fruktanů. Přirozeně se vyskytuje v tisících rostlinných druzích, včetně pšenice, cibule, banánů, česneku a čekanky. Jeho chemická struktura je charakteristická dlouhými řetězci uhlovodíků. Inulin využívají zejména bifidobakterie, avšak i mnoho dalších mikroorganismů je schopno metabolizace tohoto substrátu. Jsou jimi například *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides vulgatus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Clostridium butyricum*. Prebiotika spolu s těmito prospěšnými mikroorganismy potlačují potenciálně škodlivé a patogenní mikroorganismy ve střevě, čímž ovlivňují skladbu mikrobioty ve prospěch bifidobakterií, stimulují imunitní systém, modulují endokrinní funkce, chrání před střevní infekcí, snižují pH ve střevě a pomáhají při absorpci vápníku, hořčíku a tvorbě vitaminů skupiny B. Obecně fruktany inulinového typu významně zvyšují absorpci Ca a Mg. Tím pádem chrání před rozvojem symptomů spojených s deficitem některé z těchto minerálních látek a pomáhají překonat příznaky osteopenie.

Další vlastností inulinu je schopnost nahradit tuk například v náplních, mléčných výrobcích, mražených dezertech a dresincích (Carlson et al., 2017; Kaur & Gupta, 2002).

- *Laktulóza*

Tento nevstřebatelný cukr, který je kromě své prebiotické vlastnosti využíván k léčbě zácpy. Povětšinou se vyrábí metodou chemické izomerace, která může být provedena dvěma způsoby: prvním z nich je katalytická izomerace. Přeměna laktózy v laktulózu může být provedena za použití kyselin (kyselina citronová a sírová), zásad (triethylamin, hydroxid sodný) nebo amfoterních katalyzátorů (hydroxyly, sulfáty). Druhým způsobem je elektrochemická izomerace. Tato metoda šetří energii a činidla, jelikož sama dokáže vygenerovat vysokou zásaditost v reakčním médiu (Sitanggang et al., 2016).

Jako prebiotikum laktulóza podporuje růst bakterií prospěšných hostiteli především, je-li podávána v sublaxativních dávkách (tzn. v dávkách, kterými není dosaženo laxativního účinku) hraje svou roli jako bifidogenní faktor, příznivě působí především na růst bifidobakterií a také laktobacilů (Bouhnik et al., 2004).

Galaktooligosacharidy

Galaktooligosacharidy (GOS) jsou nestravitelné oligosacharidy s význačnými prebiotickými vlastnostmi. Jsou obvykle definovány jako směs látek získaných z laktózy, které obsahují 3 až 10 monosacharidových jednotek. Jedna z těchto jednotek je obvykle terminální glukóza a zbývající jednotky tvoří galaktóza. Kromě prebiotické funkce stimulují absorpci vápníku a dalších minerálních látek. Využívají se jako prevence zácpy nebo rakoviny tlustého střeva (Čurda et al., 2020).

Průmyslová výroba GOS obvykle vychází z koncentrovaného roztoku laktózy nebo permeátu syrovátky, následuje enzymová reakce. Po reakci však směs obsahuje značné množství monosacharidů a nezreagované laktózy, proto obvykle následuje purifikační krok. Ten může být založený na ošetření aktivním uhlím, vylučovací nebo kation výměnné chromatografii, dále nanofiltraci či fermentací. Ve velkovýrobě se využívá kontinuální chromatografie s pohyblivým ložem (SMB). Purifikace může zahrnovat odbarvení a demineralizaci. Komerční produkty jsou ve formě sirupu nebo prášku a obsahují obvykle 30 až 70 % GOS v sušině (Čurda et al. 2020).

Rezistentní škrob

Škrob se skládá z amylozy, která má lineární strukturu vazby α 1-4 a typicky tvoří 15–20 % škrobu, a amylopektinu, větší rozvětvené molekuly s vazbami α 1-4 a α 1-6. Byly definovány dvě základní struktury krystalického škrobu jako typy A a B obsahující amylopektin v různých poměrech. Zatímco škroby typu A se nacházejí v zrnech, škroby typu B se nacházejí v hlízách a potravinách bohatých na amylozu. Existuje také třetí typ, nazývaný „typ C“, který se vyskytuje v luštěninách.

Podle nutričních vlastností se škrob dělí do tří hlavních tříd: rychle stravitelný škrob, pomalu stravitelný škrob a rezistentní škrob. Zatímco rychle stravitelný škrob je α -amylázou hydrolyzován na dextriny do 20 minut po konzumaci, pomalu stravitelný škrob je hydrolyzován do 20–120 minut po konzumaci. Rezistentní škrob není po 120 minutách hydrolyzován v tenkém střevě zdravých jedinců, ale může být fermentován v tlustém střevě. Podle podrobné analýzy existujících studií se však výsledky liší od jedné studie k druhé a neexistuje jednoznačný konsenzus o použití rezistentních odrůd škrobu jako prebiotik (Tekin & Dincer 2023).

Xylooligosacharidy

XOS jsou nově vznikající prebiotika s dobře viditelnými a konzistentními zdravotními přínosy a skládají se z oligomerů cukru složených z jednotek xylózy, které se přirozeně vyskytují v ovoci, zelenině, mléce, medu a bambusových výhoncích. XOS se běžně vyrábí z lignocelulózových materiálů obsahujících xylan různými chemickými metodami, přímou enzymatickou hydrolýzou nebo kombinací obou úprav (Carlson et al., 2017). Carlson et al. (2017) zjistili, že fermentace XOS má za následek menší produkci plynu než u inulinových produktů a více plynu než u β -glukanových produktů.

β – glukany

Jedná se o polysacharidy, které jsou tvořeny molekulami glukózy spojenými β – glykosidickou vazbou. Jedná se o heterogenní látky.

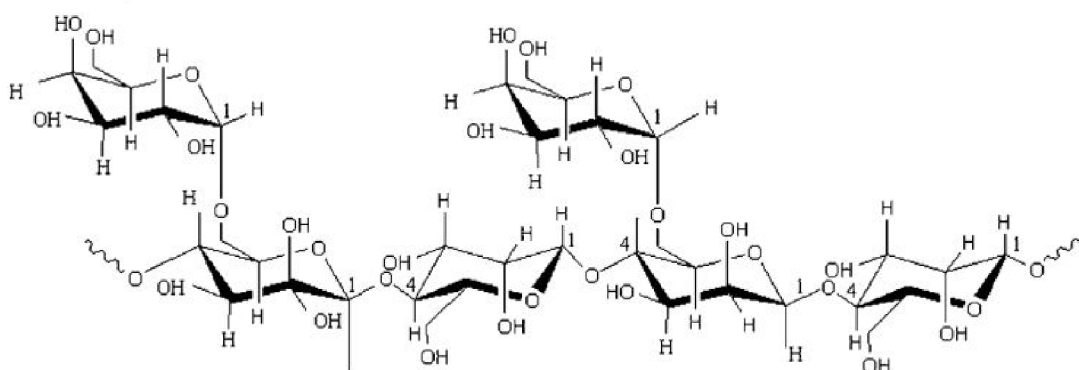
β – glukany patří k jedné z dietních vlákninových frakcí, kterým je připisována řada zdraví prospěšných vlastností, včetně prevence a léčby některých trávicích onemocnění a podpory imunitního systému. Snižují koncentraci cholesterolu a glukózy v krvi, což redukuje riziko kardiovaskulárních onemocnění a cukrovky. Kromě svých účinků na hladiny

lipidů a metabolismus glukózy vykazuje β – glukan také antioxidační vlastnosti tím, že zachycuje reaktivní formy kyslíku. Tímto snižuje riziko onemocnění, včetně aterosklerózy a zmiňovaných kardiovaskulárních onemocnění (Ciecierska et al., 2019). Jedná se o polysacharid složený z D-glukózy s β – glykosidickými vazbami, přítomné buď v lineárních řetězcích v zrnech, jako je oves a ječmen (až 7 %), nebo v buňkách pekařských kvasnic, buněčných stěnách hub a některých mikroorganismech (Carlson et al., 2017). Navíc ve studii Da Silva Guedes et al. z roku 2019 bylo prokázáno, že je možné využít β -glukany také jako kryoprotektivum pro probiotické laktobacily.

Guarová guma

Jedná se o rozpustnou vlákninu získávanou z endospermu bobů *Cyamopsis tetragonolobus L.* Tato bobovitá rostlina se pěstuje především ve střední Asii. Guarová guma je složená hlavně z galaktózy a manózy v přibližném poměru 1:2. Kostrou sloučeniny je lineární řetězec β - 1,4 vázaných manózových zbytků, ke kterým jsou galaktózové zbytky připojeny při každé druhé manóze (obr. č. 2). Její nejvýznamnější vlastností je schopnost rychlé hydratace, tvorba vodíkových vazeb, za vzniku viskózního roztoku. Díky tomu je využívána jako jeden z nejčastějších zahušťovadel (v potravinářství označována kódem E412) a stabilizátorů v potravinářství, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Její využití v potravinách je velmi široké. Například v nápojích odolává kyselému pH, přidáním do mléka při výrobě sýrů zvyšuje výtěžnost syřeniny a zlepšuje výslednou konzistenci sýrů, v pekařských výrobcích zvětšuje objem těsta a jeho následnou viskozitu. Najdeme jej v řadě zálivek, omáček a podobných výrobcích. Do potravin se přidává také pro své prebiotické účinky (Mudgil et al., 2014). Předpokládá se, že částečně hydrolyzovaná guarová guma (PHGG) prospívá zdraví hostitelů změnou střevní mikroflóry a stimulací produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA). Zůstává však nejasné, které bakterie fermentují PHGG v lidském těle střeva. Také se udává, že PHGG zvyšuje vstřebávání některých minerálních látek a snižuje hladinu cholesterolu v krvi (Ohashi et al., 2015).

Vykazuje účinky nejen prebiotické, ale také má pozitivní vliv na hladinu glykémie a lipidemie. Navozuje pocit sytosti a má pozitivní účinek při prevenci zácpy (Yasukawa et al., 2019). Ve studii Wei et al. (2020) guarová guma vykazovala pozitivní vliv na růst bifidobakterií a *Clostridium Butyricum*.



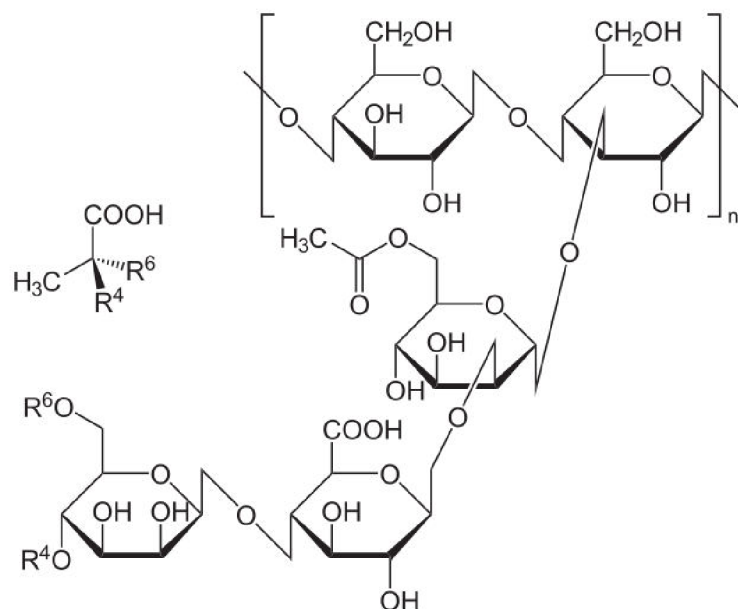
Obrázek č. 2. Chemická struktura guarové gummy (převzato od Mudgil et al. 2014).

Xanthanová guma

Xanthanová guma (v potravinářství označována kódem E415) je komplexní polysacharid s jedinečnými reologickými vlastnostmi, které prokázaly její použití jako rozšířený stabilizátor a zahušťovadlo.

Vyrábí se fermentací sacharidů za pomoci bakterie *Xanthomonas campestris*. Tyto bakterie se přirozeně nacházejí na listech zeleniny. Komerčně se vyrábí z čisté kultury bakterií aerobním „kvašením“. Je tvořen dvěma glukózovými jednotkami, dvěma manóзовými jednotkami a jednou jednotkou kyseliny glukuronové (Sworn, 2009). Výsledný produkt se vyčistí pomocí alkoholu, vysuší a roztřepe na prášek (Ostrowski et al., 2022). Jak xanhtan, tak guarová guma se využívají jako náhradní pojivo do bezlepkových potravin (Mudgil et al., 2014).

Málo je však známo o přímé interakci xanthanu se střevní mikroflórou, která hraje ústřední roli při trávení jiných, chemicky odlišných polysacharidů (Ostrowski et al., 2022).



Obrázek č. 3. Chemická struktura xanthanové gummy (převzato od Sworn, 2009).

3.2.2 Synbiotika

Synbiotika jsou preparáty, které jsou tvořeny probiotiky i prebiotiky. Jejich kombinace pak může poskytovat mnohem více zdravotních benefitů nežli samotná probiotika/prebiotika. Očekáváme od nich synergický účinek, od toho je také odvozen jejich název. Jejich výhoda spočívá v tom, že poskytují probiotikům snazší průchod horní částí trávicího traktu, následně podporují jejich implementaci ve střevech a to tak, že stimuluje růst a/nebo aktivují metabolismus žádoucích bakterií (Zhang et al., 2010). Kromě toho prebiotická složka podporuje i mikroorganismy, které se již ve střevech nacházejí (Pandey et al., 2015).

3.2.3 Parabiotika

Na složení mikrobioty se mohou podílet i neživotaschopné mikrobiální buňky zvané parabiotika. Jako u již zmíněných skupin však účinek závisí na dostatečném množství (Cuevas-González et al., 2020).

3.2.4 Postbiotika

Postbiotika obsahují kromě neživých mikrobiálních buněk také jejich fragmenty a metabolity, proto se někteří autoři přiklánějí spíše k názvu metabiotika (Cuevas-González et al., 2020). Jejich výhoda spočívá v delší době skladovatelnosti, nežli tomu je u probiotik (Oleskin & Shenderov, 2019; Vinderola et al., 2022).

3.2.5 Psychobiotika

Jako psychobiotika se označují probiotika i některá prebiotika jako například inulin, která jsou schopná produkovat neuroaktivní látky, které mají pozitivní vliv na centrální nervovou soustavu. Řada studií se zabývá komunikačním systémem mikrobiom – hostitel, který by mohl fungovat oboustranně – tedy možnost produkce neuroaktivních látek oběma směry, nicméně prozatím nebyla prokázána (Oleskin & Shenderov, 2019). Obousměrná signalizace mezi střevní mikrobiotou (střevem) a mozkiem probíhá prostřednictvím neuronálních drah, které kromě oběhového systému zahrnují jak centrální, tak střevní nervový systém. Ten zahrnuje zapojení osy hypotalamus–hypofýza–nadledviny, regulátory imunitního systému, hormony, bakteriální metabolity, jako jsou SCFA a neurotransmitery (Mohajeri et al., 2018).

3.3 Legislativa

Definice pojmu probiotikum dle právních předpisů České republiky prozatím neexistuje, čehož bývá často zneužíváno. Častým příkladem je uvádění na výrobcích přívlástek „probiotický“ i přestože není jejich probiotický účinek doložen nebo vědecky prokázán. Dalším častým nedostatkem je chybné uvádění množství živých mikroorganismů, především před koncem minimální trvanlivosti (Binda et al., 2020).

Probiotické potraviny spadají pod nutraceutika a upravuje je tedy zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně některých souvisejících zákonů. Jsou definovány jako potraviny, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu.

Vyhláška Ministerstva zdravotnictví 57/2018 Sb. stanovuje požadavek na složení a způsob označování a užití doplňků stravy. Co se týká označování takových doplňků, na obalu je nutné uvést:

- označení „doplňek stravy“
- kategorie živin/látek charakterizující výrobek
- údaj o množství vitamínů, minerálních látek nebo jiných látek s výživovým nebo fyziologickým účinkem
- doporučená denní dávka (DDD)
- nežádoucí účinky při překročení DDD
- skladování mimo dosah dětí
- nejedná se o náhradu pestré stravy
- upozornění na nevhodnost pro děti, mládež, těhotné a kojící ženy, pro osoby užívající hypolipidemika a osoby s onemocněním ledvin, jater

Od roku 2002 jsou stanoveny i pokyny pro označování probiotických doplňků stravy:

- označení rodu, druhu a kmene nesmí spotřebitele uvádět v omyl
- minimální počet životaschopných probiotických mikroorganismů na konci doby spotřeby
- množství denní dávky, která zaručí účinnost probiotického výrobku
- pravdivost a vědecká podloženost zdravotních tvrzení

3.4 Kritéria

Aby mohly být probiotické kmeny bakterií využity v potravinářství, ať už přidávány přímo do potravin nebo využívány jako probiotické/synbiotické preparáty, je nezbytné, aby splnily řadu podmínek. Mezinárodní vědecká asociace probiotik (ISAPP) vydala roku 2018 prohlášení dle kterého musí probiotika:

- být charakterizovány na kmenovou úroveň
- být bezpečná pro použití, pro které jsou zamýšleny
- bezpečnost musí být ověřena alespoň jednou pozitivní klinickou zkouškou na lidech provedenou podle obecně uznávaných vědeckých standardů
- ve výrobku zůstat živá po celou dobu jeho trvanlivosti.

Kmeny bakterií jsou voleny na základě jejich funkčních vlastností, a především zmiňované bezpečnosti. Důležitou podmínkou pro jejich užití je, aby bylo možné je kultivovat ve velkém množství a následně zapracovat do výrobků v rámci jejich průmyslové výroby (Szajewska et al., 2016). Mezi klíčová kritéria, která kvalifikují mikroorganismy jako probiotické patří požadavek, aby kmeny byly živé a plně charakterizované. To je důvod, proč fermentované potraviny s nedefinovanými mikrobiálními konsorciemi a fekální transplantace nejsou považovány za probiotické (Thomas, 2016).

Dalším neméně důležitým kritériem pro to, aby byl kmen/rod označen za probiotický je, aby splňoval následující vlastnosti:

- odolnost vůči žaludeční kyselosti
- odolnost vůči žlučovým kyselinám
- adherence k hlenu a/nebo lidským epiteliálním buňkám a buněčným liniím
- antimikrobiální aktivita proti potenciálně patogenním bakteriím nebo houbám
- schopnost redukovat adhezi patogenu k povrchům
- aktivita hydrolázy žlučových solí
- dobrý růst v kultivačních médiích
- genomová stabilita (Gupta & Garg, 2009; Fijan 2014).

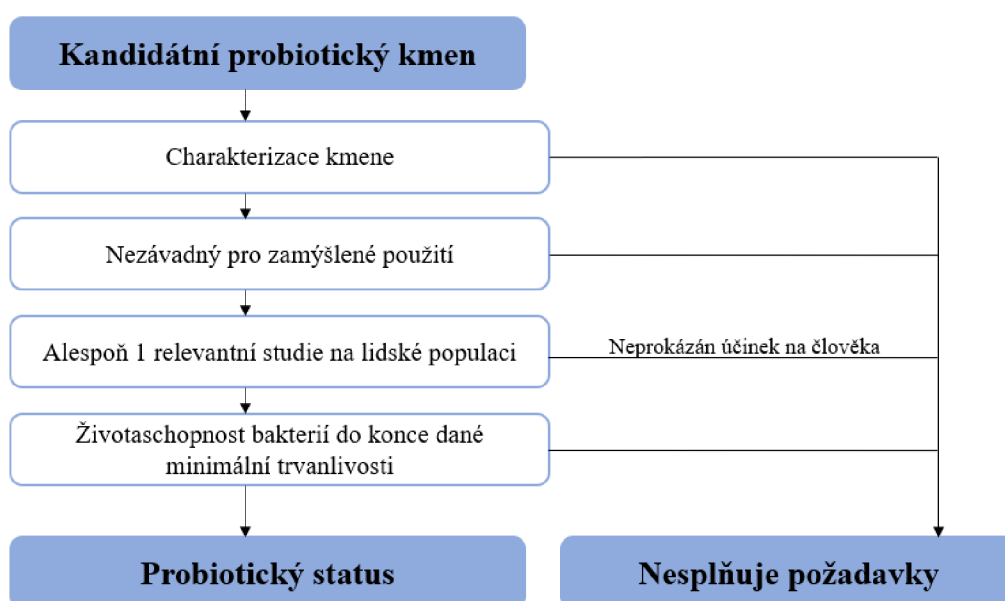
D'Silva (2011) uvádí, že při výběru nových probiotických bakterií je nutné kromě výše uvedených kritérií také zohlednit, že některé mikroorganismy nejsou pro potravinářský průmysl příliš vhodné, a to z toho důvodu, že mohou pozměňovat sensorické vlastnosti výrobku – tedy přinést mu nevhodnou strukturu, případně zápach.

Klíčovou součástí správné charakterizace probiotik je správná identifikace a pojmenování kmenů. Probiotický kmen by měl být pojmenován podle aktuálně platné bakteriální nomenklatury (Parker et al., 2018). Aktualizovaný seznam prokaryotických jmen s postavením ve fylogenezi je k dispozici na <http://www.bacterio.net/> (Parte, 2018).

Identifikace probiotických mikroorganismů znamená určit, zda kmen patří do zavedeného, pojmenovaného rodu a druhu, případně poddruhu. Protože některé probiotické aktivity mohou být specifické pro daný kmen, dále je vyžadována správná typizace kmene.

Správné označení kmene se proto skládá ze dvou hlavních částí: oficiální rodová, druhová (a poddruhová) jména podle nomenklaturních a taxonomických pravidel, za nimiž následuje označení kmene, které je často katalogové číslo mezinárodně uznávané sbírky mikroorganismů a/nebo komerční označení kmene (McFarland, 2015).

Ideální probiotikum by nemělo být ovlivněno současně podávanými léky nebo antibiotiky. Například *Saccharomyces boulardii* je kvasinka, kterou lze užívat současně jako perorální antibiotika, protože na něj působí pouze antimykotické léky a ne antibiotika (McFarland, 2015).



Obrázek č.4. Rozhodovací strom k určení, zda kandidátní probiotikum splňuje kritéria (převzato dle Binda et al. 2020).

3.5 Mikroorganismy používané jako probiotické

Jako probiotické kultury jsou obvykle používány bakterie, které přirozeně obývají lidský trávicí trakt. Nejpoužívanější jsou bakterie rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* a to z toho důvodu, že mají dlouhou historii bezpečného používání v potravinářském průmyslu (Thomas, 2016; Rada, 2010).

Zdravotní přínosy byly prokázány především u specifických probiotických kmenů následujících rodů: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* (Fijan, 2014). Probioticky působí i některé kmeny *E. coli*, ze sporulujících bakterií pak kmeny z rodů *Bacillus*, z kvasinek je to například *Saccharomyces boulardii* (Salminen et al., 2016).

3.5.1 Charakteristika vybraných mikroorganismů s probiotickým potenciálem

Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* zahrnuje různé grampozitivní fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní tyčinkovité bakterie. Jsou hlavní částí skupiny bakterií mléčného kvašení (včetně mnoha rodů dříve klasifikovaných do rodu *Lactobacillus*, dále zástupci rodů *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a *Leuconostoc*), kteří dokážou přeměnit hexózoové, pentózoové a jiné cukry na kyselinu mléčnou, a tím vytvořit kyselé prostředí, které inhibuje růst potenciálně patogenních gramnegativních bakterií.

Rod *Lactobacillus* patří do kmene Firmicutes, třídy Bacilli, řádu Lactobacillales a čeledi *Lactobacillaceae*. Jedná se o nepohyblivé grampozitivní nesorotvorné bakterie mléčného kvašení. Jsou schopny fermentovat laktózu a glukózu za vzniku kyseliny mléčné, kyseliny octové, etanolu a oxidu uhličitého. Vzhledem k hlavnímu metabolickému produktu, kyselině mléčné, dávají přednost kyselejšímu prostředí (pH pod 4). Teplota, při které dosahují optimálního růstu, se pohybuje v rozmezí 15 až 45 °C (Hill et al., 2018).

Některé laktobacily se používají k výrobě jogurtů, sýrů, kysaného zelí, nakládané zeleniny, zákysu, vína a dalších fermentovaných produktů. Ve všech případech jsou cukry metabolizovány na kyselinu mléčnou; tím vytváří nepřátelské prostředí pro mikroorganismy, které mohou potenciálně potravinu zkažit a umožňuje tak konzervaci potravin.

Studie ukázaly, že některé kmeny laktobacilů jsou účinné v prevenci průjmu souvisejícího s užíváním antibiotik. Laktobacily jsou běžně vybírány jako probiotika, protože vykazují mnoho zásadních vlastností, jako je vysoká tolerance vůči kyselinám a žluči, schopnost přilnout ke střevnímu povrchu, odolnost vůči nízkému pH, žaludeční šťáva, inhibice potenciálně patogenních druhů – antimikrobiální aktivita a mnoho dalších (Fijan, 2014).

Ovlivňují také tvorbu zánětlivých cytokinů, čímž ovlivňují atopickou senzitivitu. Tato imunomodulace je však kmenově specifická. Tyto účinky vykazují bakterie rodu *L. acidophilus* (Govender et al., 2014).

Je nutné také připomenout, že v nedávné době probíhala změna nomenklatury rodu *Lactobacillus*, ze kterého bylo vytvořeno 23 nových rodů, mezi které byly rovněž přeřazeny již zavedené probiotické druhy (Zheng et al., 2020).

Enterococcus

Spolu s laktobacily jsou odolnější vůči žaludečním kyselinám oproti bifidobakteriím. Avšak jejich probiotická aktivita není tak výrazná jako u porovnávaných druhů. Často se využívají při léčbě infekce salmonelou, případně při gastroenteritidě (Govender et al., 2014).

E. faecium se běžně vyskytuje v GIT člověka i zvířat. Je obsažen v řadě mléčných výrobků. Působí antibakteriálně především vůči listerii a klostridiím (Yerlikaya, & Akbulut 2019). Může se však jednat o bakterii oportunitně patogenní. Rizikem je z důvodu vyvinuté rezistence na antibiotika. Výzkum, který sledoval rozvoj antibiotické rezistence na jednotkách intenzivní péče zaznamenal, že převážná většina infekcí, která se vyskytla ve spojení se zavedením přístroje (například ventilátory, močové katetry atd.) byly způsobeny právě rezistencí *E. faecium* na vankomycin a ampicilin (Gilmore et al., 2014).

E. durans je rovněž obsažena v mléčných výrobcích. Rovněž vykazuje antimikrobiální aktivitu, a navíc také aktivitu antioxidační. Podle Pieniz et al. (2014) je tento druh schopný bioakumulace selenu. Často se využívá jako doplněk krmiva zvířat. Některé studie uvádějí, že mohou produkovat protizánětlivé látky (Carasi et al., 2017).

Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou klasifikovány do kmene Firmicutes a řádu Lactobacillales. Náleží pak do kmene Actinobacteria a řádu Bifidobacteriales.

Poprvé byly popsány roku 1900, kdy jej Tissiere izoloval ze vzorku stolice kojeneho dítěte. Tento rod je charakterizován jako grampozitivní, nepohyblivý a nesporulující. Jsou typické pro svůj tvar písmene „X“. Většina bifidobakterií je obligátně anaerobní – přítomnost kyslíku je pro ně letálním faktorem. Je běžnou součástí lidského mikrobiomu, nalézá se také v odpadních vodách, ústní dutině, je součástí vaginální mikrobioty nebo GIT ptáků a hmyzu (Alessandri et al. 2019). Výsledným produktem metabolismu sacharidů bifidobakterií jsou kyselina mléčná a octová. Tím dochází ke snížení pH ve střevě. Kyselé pH pak potlačuje růst bakterií, které jsou patogenní případně hnilobné (O'Callaghan & van Sinderen 2016).

Přítomnost různých druhů bifidobakterií se s věkem jedince vyvíjí. Zatímco v dětství převládají druhy *Bifidobacterium (B.) breve*, *B. bifidum* a *B. longum* v pozdějším věku se jedná především o *B. catenulatum*, *B. adolescentis* a také *B. longum* (Arbolea et al. 2016).

3.5.2 Dostupné probiotické preparáty

Vytlačilová (2022) se ve své diplomové práci zabývala, zda probiotické preparáty splňují deklarované množství mikroorganismů a zda má expirace vliv na složení těchto preparátů. Vypracovala přehled dostupných výrobků, které lze zakoupit na českém trhu.

V diplomové práci (Vytlačilová 2022) bylo zjištěno, že probiotické preparáty, ač byly skladovány podle pokynů výrobce, v polovině případů nesplňovaly deklarované množství mikroorganismů. Nevyhovující výrobky se v deklarovaném a zjištěném množství lišily o 1 až 2 řády. Počet vitálních bakterií po skončení minimální trvanlivosti rychle klesal.

Následná tabulka představuje testovaných 17 vzorků. Samozřejmě preparátů existuje vícero, toto jsou však ty, které lze zakoupit v kamenných lékárnách.

Tabulka č. 1. Přehled probiotických preparátů (převzato dle Vytlačilová 2022).

Název produktu	Deklarované druhy mikroorganismů
Biopron Premium	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Swiss Nature Via Laktobacilky	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i>
APO-Lactobacillus	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Edenpharma Probiotika plus kolostrum	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>
ProbioFlora	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
GYNIMUN dual protect	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Medpharma Lactobacillus acidophilus +2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Enterococcus faecum</i>
Lactoseven	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Generica Probius Premium	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i>
NeoZen Probian	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i>
GS Laktobacily Antibio 40	<i>Pediococcus acidolactici</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> ssp <i>paracasei</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Walmark Biopron LAKTOBACILKY	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Linex Forte	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
Laktobacily SWISS Imunit	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>
ProbioLact	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus sporogenes</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> biofilm
Cemio Laktobacily 7+	<i>Pediococcus acidolactici</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>paracasei</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Walmark Laktobacily Complex	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium breve</i>

3.6 Hledání nových probiotických kmenů

Řada využívaných probiotických kmenů nevykazuje schopnost perzistovat po delší dobu v GIT, nebo se v něm u některých lidských jedinců vůbec nenachází – v případě suplementace tedy pouze organismem projde. Nejčastěji tomu tak je u laktobacilů, laktokoků, leukonostoků či enterokoků, tedy typických bakterií mléčného kvašení, které nenáleží do skupiny autochtonních mikroorganismů intestinálního traktu člověka. Jejich genom, metabolismus a fenotypové vlastnosti zkrátka nejsou adaptovány primárně na lidský intestinální trakt. Tyto důvody vedou k hledání nových probiotických kmenů splňující veškerá kritéria probiotik (Marcial-Coba et al., 2018).

Je důležité poukázat na skutečnost, že příznivý účinek probiotik lze prokázat pouze studiiemi *in vivo*. Přestože studie *in vitro* nebo zvířecí modely nemohou prokázat probiotický účinek, lze je použít k charakterizaci možného mechanismu působení probiotik, stanovení bezpečnosti probiotických mikroorganismů nebo zprostředkování dalších znalostí o probiotických kmenech. Studie *in vitro* tedy poskytují první krok při hodnocení probiotik pro použití v potravinách a měly by po nich následovat dvojité zaslepené, randomizované, placebem kontrolované studie na lidech (Fijan, 2014).

Identifikaci druhů lze provést technikami hybridizace DNA-DNA. Identifikaci kmene lze dále provádět různými reprodukovatelnými molekulárními metodami nebo pomocí jedinečných fenotypových znaků.

Příklady molekulárních metod jsou:

- gelová elektroforéza s pulzním polem
- náhodně amplifikovaná polymorfní DNA

Mezi fenotypové znaky pro identifikaci kmene patří:

- schopnost fermentace řady cukrů
- detekce finálních fermentačních produktů získaných z využití glukózy (Fijan, 2014).

Standardní metodou při zjišťování fylogeneze prokaryot je již po dlouhou dobu analýza sekvenace genu pro ribozomální rRNA malé podjednotky ribozomu 16S rRNA. Jedná se totiž o evolučně konzervativní úsek, který ale obsahuje i variabilní části, díky kterým od sebe lze odlišit bakterie až na druhovou úroveň. A to za předpokladu, že používáme spolehlivé referenční sekvence. Sekvenci získanou pak porovnáme s dostupnými knihovny, které pokrývají téměř celou známou bakteriální diverzitu. Konečná validace druhu je však provedena až dle kurátorské databáze. Další metodou při identifikaci bifidobakterií je sekvenace jiných fylogenetických markerů, jako je například gen kódující threonin-tRNA ligázu, který je distribuován v bifidobakteriálních genomech (Killer et al. 2018a). Dalším identifikačním a fylogenetickým markerem čeledi *Bifidobacteriaceae* je gen *pyrG*, jenž má vyšší rozlišovací schopnost mezi kmeny a druhy než gen 16S rRNA (Binda et al., 2020; Killer et al. 2018b).

Sekvenování amplikonu 16S rRNA však primárně poskytuje informace o mikrobiální identitě a nikoli funkci jako samotného probiotika. Aby bylo možné prozkoumat funkce

mikrobiomu, mnoho výzkumníků se obrátilo na metagenomický přístup (Shotgun sequencing), ve kterém je sekvenován celý bakteriální genom. Přes vyšší náklady a komplikovanější požadavky na bioinformatiku poskytuje metagenomika informace jak o mikrobiální identitě, tak o složení genů. Vědět, které geny jsou kódovány bakteriemi přítomnými ve vzorku, umožňuje výzkumníkům lépe porozumět jejich roli v lidském zdraví. Díky snížení nákladů na sekvenování nové generace, vylepšeným protokolům přípravy vzorků a většímu množství bioinformatických nástrojů dostupných pro metagenomickou analýzu bude tato technika účinným nástrojem pro studium funkčnosti mikrobiot (Singh et al., 2017).

„Zlatým standardem“ pro identifikaci kmene je sekvenování celého genomu (WGS) včetně jakýchkoli extrachromozomálních elementů. Plně sekvenovaný genom umožňuje identifikaci mikrobů na úroveň druhu a kmene. Mít kompletní genomovou sekvenci má mnoho výhod, protože umožňuje robustní a přesné specifické výsledky. Také usnadňuje vyhledávání přítomnosti nebo nepřítomnosti rizikových faktorů. Kromě toho pomůže identifikovat možné plazmidy, časté u některých bakterií mléčného kvašení, které by mohly být důležité pro probiotickou aktivitu (Binda et al., 2020).

Zatímco WGS je preferovaná metoda, jiné typizační metody mohou umožnit srovnání jednotlivých kmenů. Multi-locus sekvenční typizace nebo již zmíněná gelová elektroforéza s pulzním polem umožňují srovnání kmenů, ale ne *de novo* identifikaci druhu nebo rodu. Identifikaci by měly přednostně provádět specializované akreditované laboratoře, které mohou přistupovat k požadovaným referenčním databázím a používat aktuální ověřené a kalibrované metody a zařízení. Je třeba také zdůraznit, že u probiotických směsí je důležité, aby každý jednotlivý kmen ve směsi byl správně identifikován, zvláště když každý (ne)může být způsobilý pro status probiotika (Binda et al., 2020; McFarland, 2015).

Další rozpoznávací metodou je genetická daktyloskopie (genomic fingerprints) umožňující rozpoznání bakterií na úrovni druhu, nebo dokonce i kmene. Tato metoda se užívá zejména u bifidobakterií. Mezi fingerprintové metody patří například RAPD (random amplified polymorphic DNA), neboli testy s náhodnou zesílenou polymorfní DNA. Tato technika je založena na použití primerů o délce sekvence 9–10 bází, které hybridizují na komplementární nebo částečně komplementární sekvence v cílových sekvencích chromozomální DNA při nízkých teplotách, které mohou být použity k zahájení amplifikace bakteriálního genomu. RAPD umožňuje diferenciaci mezi kmeny v rámci stejného druhu (Fanedl et al., 1998; Ventura et al., 2004).

Zatímco klinické výsledky jsou pro tvrzení o faktické probiotické funkčnosti nezbytné, testování vlastností považovaných za důležité pro probiotickou účinnost by mohla naznačovat možné mechanismy, které jsou základem pozorovaných klinických nálezů. Takovými charakteristikami mohou být přežití na příslušných místech těla, produkce kyseliny mléčné nebo jiných mastných kyselin s krátkým řetězcem, adheze ke stěnám střevního epitelu, interakce s imunitními buňkami člověka, dále pak odolnost vůči trávicím enzymům, žluči nebo kyselinám (Binda et al., 2020).

Již Sanders (2003) uvádí, že tyto charakteristiky nejsou důležitým kritériem pro probiotickou účinnost.

Je důležité, že pro potvrzení probiotického statusu není dostatečným důkazem fenotypová charakterizace buněk. Takové testy sice mohou poskytnout indikaci funkčnosti nebo být užitečné při počátečních screeningových strategiích, ale nejsou ověřenými biomarkery probiotické funkčnosti (Binda et al., 2020).

S příchodem novějších nástrojů k detekci nekultivovatelných mikroobů (75 %–95 % mikroobů v tlustém střevě nelze pěstovat ve standardních kultivačních médiích) je lepší porozumět dynamice mikrobiomu, jeho vývoji. The Human Microbiome Project, využívající metagenomickou analýzu (sekvenování DNA bakterií), identifikoval více jak 40 000 druhů bakterií v tlustém střevě, které se nacházejí v mikrobiomu zdravých jedinců. Tyto novější nástroje umožňují výzkumníkům soustředit se na to, jak je mikrobiota měněna rušivými faktory, jako je např. expozice antibiotik nebo výskyt chronického onemocnění a také na způsoby různých probiotických kmenů, které mohou tuto rovnováhu napravit nebo obnovit (McFarland, 2015).

3.6.1 Probiotika nové generace

Jako probiotika nové generace jsou označovány mikroorganismy, které byly izolovány z trávicího traktu, mají tedy zvýšenou schopnost trávicí trakt kolonizovat, a svým působením specificky ovlivňovat konkrétní patologický jev nebo fyziologický stav. Jejich výhoda spočívá v tom, že na rozdíl od běžně používaných probiotik se nezaměřují na podporu zdravé střevní mikrobioty, ale přímo ovlivňují konkrétní fyziologické funkce (Satokari, 2019). Některé obligátně anaerobní bakterie, které se hojně vyskytují v GIT zdravých jedinců, lze považovat za potenciální probiotika nové generace. Tato skupina nových, domněle prospěšných mikroobů zahrnuje druhy jako *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium halii* anebo *Bacteroides thetaiotaomicron* (Marcial-Coba et al., 2018).

Blautia je rod anaerobních bakterií s probiotickými vlastnostmi, které se hojně vyskytují ve výkalech a střevech savců. Na základě fenotypových a fylogenetických analýz byly některé druhy rodů *Clostridium* a *Ruminococcus* překlasifikovány do rodu *Blautia*, takže do tohoto rodu nyní spadá přibližně 20 nových druhů s platnými publikovanými názvy. Rozsáhlý soubor výzkumů se v poslední době zaměřuje na probiotické účinky tohoto rodu, jako je biologická transformace a její schopnost regulovat zdraví hostitele a zmírňovat metabolický syndrom. Konkrétně u *Blautia luti* byl zaznamenán protizánětlivý účinek, obzvláště u jedinců trpících obezitou (Liu et al., 2021).

Bacteroides thetaiotaomicron, běžně se vyskytující v mikrobiomu člověka, je významný pro svoji schopnost degradovat nestravitelné polysacharidy a předpokládá se, že hydrolyzuje glykosidy. Některé studie uváděly jeho zvýšené množství do spojitosti s obezitou, nicméně se ukázalo, že naopak napomáhá rozkladu tuků a urychluje oxidaci mastných kyselin v tukových buňkách, a tím má vliv na snížené hromadění tuku, oddaluje rychlost přibírání na váze a snižuje stupeň obezity. Nicméně tato bakterie může být

i oportunním patogenem – byla izolována ve vzorcích odebraným pacientům s cholesteatomem a meningitidou (Wang et al., 2021).

Ruminococcus gnavus je taktéž střevní bakterie, která je schopna degradovat mucin a hraje klíčovou roli v časně kolonizaci střeva. Má také vliv na vývoj imunity. Zvyšuje hladinu butyrátu ve střevě (Ahn et al., 2022).

Dále sem patří *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* a *Eubacterium hallii*, které metabolizují dietární vlákninu a jako hlavní producenti SCFA poskytují energetické zdroje pro enterocyty (buňky tlustého střeva) a ve střevě mají protizánětlivé účinky (Hiippala et al., 2018).

F. prausnitzii patří do kmene Firmicutes. Často je popisována jako grampozitivní bakterie ve tvaru dlouhé tyčinky, která je přítomna ve střevním traktu zdravých dospělých a tvoří přibližně 5 % celkové fekální mikrobioty. Její absence značí dysbiózu se sklonem k zánětlivým onemocněním a obezitě. Její (ne)přítomnost se využívá jako biomarker pro identifikaci adolescentů s obezitou a ulcerózní kolitidou (Zhang et al., 2022).

Nedávno byly objeveny účinky druhů *Bacteroides*, které by měly produkovat imunomodulační molekuly. Konkrétně druh *Bacteroides fragilis* vykazuje protinádorové a protizánětlivé účinky. *B. fragilis* jsou dlouhé, tyčinkovité, gramnegativní bakterie, které jsou často přenášeny z matky na dítě během vaginálního porodu (Zhang et al., 2022).

Bacteroides thetaiotaomicron spolu s *Prevotella copri*, *Christensenella minuta* a *Parabacteroides goldsteinii* ovlivňují inzulinovou rezistenci a mohou tak působit proti obezitě (Hiippala et al., 2018).

Eubacterium hallii je grampozitivní bakterie, která patří do kmene Firmicutes a má u dospělého člověka zastoupení přibližně 3 %. Vykazuje pozitivní účinek na metabolismus specifických sloučenin, rozkládá toxické látky a chrání tlusté střevo (Zhang et al., 2022).

Akkermansia muciniphila, jako zástupce kmene Verrucomicrobia, může být nejprestižnější bakterií mezi probiotiky nové generace. Příznivě působí při metabolických onemocněních a posiluje bariérovou funkci GIT (Hiippala et al., 2018). Snížení *A. muciniphila* ve střevě byla pozorována u hostitelů s obezitou, u hostitelů se zánětlivým onemocněním střev (hlavně ulcerózní kolitidou) a jedinců s metabolickou poruchou (Fu et al., 2019).

Roseburia sp. je grampozitivní, obligátní anaerob s mírně zakřivenou tyčinkovitou strukturou. Patří do řádu Clostridiales a ve střevním traktu zdravého člověka je přibližně zastoupena v rozmezí 3–15 %. Mikrobiota jedinců s kardiovaskulárním onemocněním obsahuje méně této bakterie (Zhang et al., 2022).

Probiotika nové generace zahrnují mnoho kmenů, které mají různé specifické účinky a mohou pomoci léčit řadu výše zmíněných onemocnění. Nicméně je zapotřebí dalších studií, které objasní přesné mechanismy účinku probiotik nové generace. Nezbytné je rovněž provedení klinických testů a splnění legislativních požadavků, aby bylo možné probiotika nové generace používat jako léčiva či terapeutika.

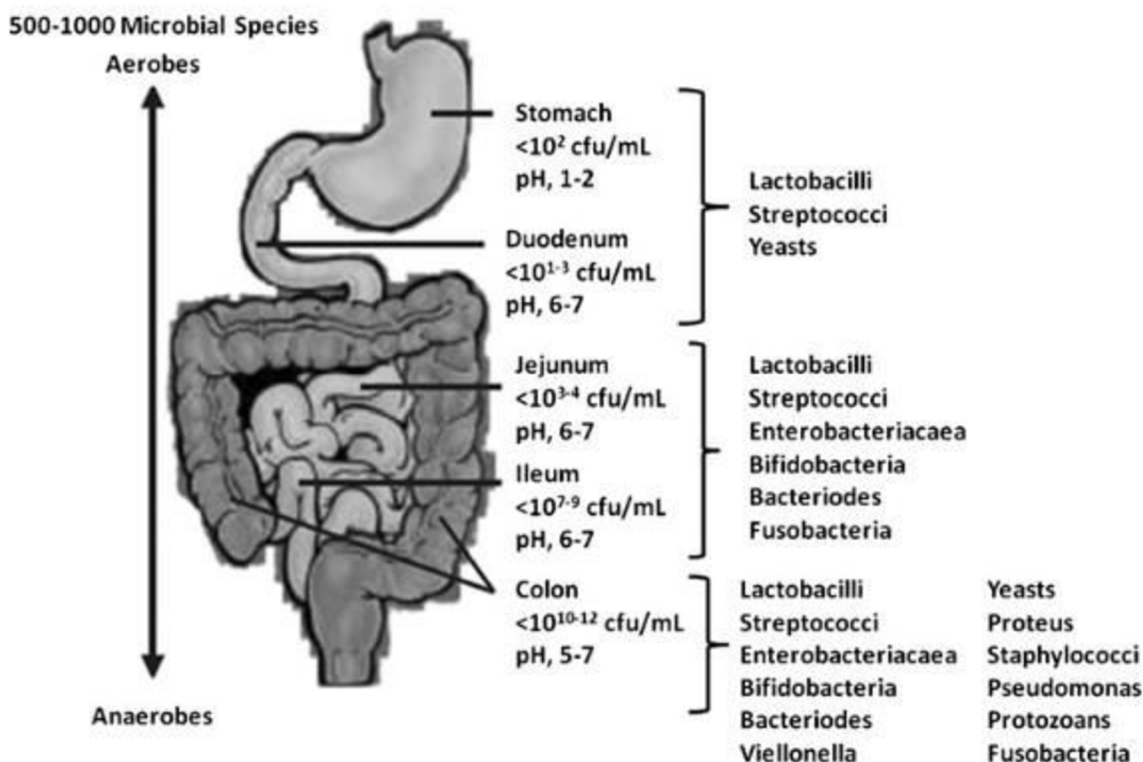
V souvislosti s tématem této diplomové práce je nutné poznamenat, že je známo velmi málo o technologických charakteristikách výše zmíněných potenciálních probiotik nové generace. Ty v zásadě zahrnují fenotypové vlastnosti ovlivňující přežívání buněk během procesů vedoucích k finálním produktům, resp. lyofilizace, mrazení a sušení. Tudíž předmět výzkumu zahrnutý v této práci je vysoce aktuální a žádoucí (Yadav et al., 2022; Zhang et al., 2022).

3.7 Vliv mikrobiomu na zdraví člověka

Lidský gastrointestinální mikrobiom je nezbytný pro udržení lidského zdraví. Je dynamický a mění se prostorově a časově a ve vztahu ke zdravotnímu stavu jedince. (Ruan et al., 2020). Střevní mikrobiota má v lidském těle mnoho významných funkcí, včetně podpory ochrany před patogeny kolonizací povrchů sliznic a tvorbou různých antimikrobiálních látek, posiluje imunitní systém, hraje zásadní roli při trávení a správném fungování metabolismu (Gomaa 2020).

Mikrobiální kolonizace začíná ihned po narození, a to fakultativními anaeroby, jako jsou například laktobacily, enterokoky a enterobakterie. Poté následují anaerobní mikroorganismy, včetně *Bifidobacterium*, *Bacteroides* a *Clostridium*, což má za následek postupné snižování poměru fakultativních anaerobů k přísným anaerobům (Vlasova et al., 2016). Zdá se, že kojení hraje významnou roli při tvorbě raného mikrobiomu s převahou druhů *Bifidobacterium* a *Bacteroides*. Kojení má dlouhodobé pozitivní účinky na fyziologickou mikrobiotu a její účinky (Ruan et al. 2020).

Jen střevní mikrobiota zahrnuje 10^{14} mikroorganismů, včetně bakterií, virů, hub a prvoků. Bakterie mezi nimi představují nejlépe prostudovanou skupinu. Dva celkově převládající kmeny bakterií v GIT člověka jsou grampozitivní *Firmicutes* a gramnegativní *Bacteroidetes*. Zastoupení jednotlivých kmenů v částech GIT je zobrazeno na obr. č.5.



Obrázek. č. 5. Zastoupení mikroorganismů v GIT člověka (převzato od Govender et al., 2014).

Nedávno se ukázalo, že mikrobiotu lze efektivně rozdělit do různých enterotypů, z nichž každý je obohacen o určité bakteriální rody, ale zdá se, že všechny sdílejí vysokou funkční uniformitu. Tato uniformita existuje bez ohledu na několik vlastností hostitele, jako je věk, pohlaví, index tělesné hmotnosti a národnost. Většina mikroorganismů sídlí v distálnějších částech trávicího traktu, kde jejich biomasa přesahuje 10^{11} buněk na gram obsahu. Mikroorganismy v distálním střevě přispívají ke zdraví hostitele prostřednictvím biosyntézy vitamínů a esenciálních aminokyselin a také vytvářením důležitých metabolických vedlejších produktů ze složek potravy, které zůstaly nestrávené tenkým střevem. Vedlejší produkty SCFA, jako je butyrát, propionát a acetát, působí jako hlavní zdroj energie pro buňky střevního epitelu, a proto mohou posílit slizniční bariéru. Také mají ve střevě přímý protizánětlivý účinek.

Akutní změna diety – například diety, která je výhradně živočišného nebo rostlinného původu – změní mikrobiální složení během pouhých 24 hodin od zahájení, s návratem na výchozí hodnoty do 48 hodin po přerušení diety. Několik studií naznačuje, že strava s vysokým obsahem tuků zvyšuje celkovou anaerobní mikroflóru a počet bakterií *Bacteroides* (Singh et al., 2017). Při konzumaci výhradně rostlinné stravy, respektive rostlinných proteinů došlo k nárůstu bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* a snížilo se zastoupení rodu *Bacteroides* a *Clostridium perfringens*. U stravy živočišné naopak došlo k nárůstu bakterií rodu *Bacteroides*, ale také *Ruminococcus*, *Bilophila* a *Alistipes* a k poklesu bakterií rodu *Bifidobacterium* (Singh et al., 2017).

Střevní mikrobiom zvířat krměných stravou s vysokým obsahem tuků nebo cukrů je navíc náchylnější k narušení cirkadiálního rytmu. (Singh et al., 2017).

Studie také naznačují, že ohromující systémový stres a zánět – jako jsou například ty vyvolané těžkým popáleninovým poraněním – mohou také způsobit charakteristické akutní změny ve střevní mikrobiotě během jediného dne od trvalého poškození (Singh et al., 2017).

Studie INFANTMET zkoumající kojené děti odhalila rozdíly na úrovni kmene u dětí narozených císařským řezem ve srovnání s přirozeným porodem, které mizí do 24. týdne věku (Rodriguez et al., 2015). Ve stáří se mikrobiota opět mění, často se zvýšením hladin *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Eubacteria* a fakultativních anaerobů a sníženými hladinami *Bacteroides*, *Bifidobacterium* a SCFA (Thomas, 2016).

Hlavním rozdílem mezi tenkým a tlustým střevem je struktura hlenové vrstvy. Vnitřní vrstva hlenu fyzicky vylučuje bakterie a obsahuje imunitní efekторы, které se zaměřují na mikrobiotu. Naproti tomu vnější vrstva hlenu tzv. mucinová, je volná a slouží jako kolonizační místo pro četné mikroby. Mikroby, kteří upřednostňují dietní škroby a živiny, sídlí v lumen tlustého střeva. Organismy, které mohou využívat mucin, jako je *Akkermansia*, *Ruminococcus* a některé druhy *Bacteroides*, sídlí ve vnější vrstvě střevního hlenu. Například proteobakterie a aktinobakterie se nacházejí blíže konečníku (Singh et al., 2017).

Tyto bakterie se však nenachází pouze ve střevech. Například v dutině ústní bylo nalezeno více než 1000 taxonů. Šest hlavních kmenů *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* a *Fusobacteria*, tvoří 96 % taxonů (Ruan et al., 2020).

3.8 Dysbióza střevního mikrobiomu

Složení střevní mikrobioty je ovlivněno mnoha faktory, především stravou, věkem, genetika hostitele, užívání některých léků anebo například i životní styl. Změny ve složení a funkci střevní mikrobioty mají přímý vliv na lidské zdraví a hrají důležitou roli ve výskytu několika nemocí (Gomaa, 2020). Zatímco definici zdravé gastrointestinální mikrobioty nelze přesně identifikovat, jeho rysy ano. Zahrnují relativně větší biologickou rozmanitost a relativně velké množství specifických kmenů a rodů (Ruan et al. 2020). Zdravá lidská mikrobiota se skládá z více než 30 bilionů mikroorganismů, zahrnující kromě bakterií také viry (bakteriofágy a lidské viry) a kvasinky (Ruan et al., 2020). Nejvíce probádanou skupinou jsou však bakterie (Singh et al., 2017). Jak víme, užívání antibiotik má na mikrobiom velmi negativní vliv. Dokonce i krátké cykly antibiotik nebo antibiotika v lidských zdrojích potravy mohou způsobit dlouhodobé změny mikrobiálních kolonií v našem střevě (Newman & Arshad 2020).

Co se týká faktoru typu stravování, Singh et al. (2017) uvádějí řadu případů pozměněné mikrobioty vlivem zvoleného dietního opatření či výživového směru. Například příjem živočišných bílkovin pozitivně koreluje s celkovou mikrobiální diverzitou, zvyšuje četnost mikroorganismů tolerantních ke žluči, jako jsou *Bacteroides*, *Alistipes* a *Bilophila*, a snižuje zastoupení *Roseburia*. Zdá se, že dieta s vysokým obsahem nasycených tuků zvyšuje počty celkové anaerobní mikroflóry a relativní množství bakterií *Bacteroides* a *Bilophila*. V literatuře se běžně uvádí, že jak stravitelné, tak nestravitelné sacharidy obohacují zástupce rodu *Bifidobacterium* a potlačují klostridie, zatímco pouze nestravitelné sacharidy jsou uváděny jako prospěšné pro obohacení o bakterie rodu *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* a *Roseburia*.

Mezi lidským tělem a jeho mikrobiomem existuje komplexní symbióza, jejíž narušení může mít na oba systémy neblahé dopady. Výsledná dysbióza může být nepříznivá a může být spojena s rozvojem nejrůznějších onemocnění. Existuje dlouhý seznam patologických stavů spojených se změnou střevní mikrobioty včetně:

- syndrom dráždivého tračníku
- zánětlivé onemocnění střev
- onemocnění jater
- metabolické choroby: obezita, diabetes mellitus II. typu
- kardiovaskulární onemocnění
- choroby související s narušením imunity
- onkologická onemocnění
- neurologické a psychiatrické onemocnění – úzkostné stavy, deprese
- poruchy autistického spektra.

Studie zkoumající složení a roli střevního mikrobiomu u různých chorobných stavů odhalily souvislosti se zánětlivými střevními onemocněními (IBD), zánětlivými kožními onemocněními, jako je lupénka a atopická dermatitida, revmatoidní artritida, diabetes mellitus II. typu, obezita a ateroskleróza. Například pacienti s IBD mají tendenci mít menší bakteriální diverzitu a také nižší počet *Bacteroides* a *Firmicutes* – což může společně přispívat ke

sníženým koncentracím butyrátu pocházejícího z mikroorganismů (Gomaa 2020). Stále však není jasné, zda jsou tyto změny ve složení mikrobiomu příčinou nebo důsledkem změny funkce epitelu a výskytu výše uvedených onemocnění (Ruan et al., 2020).

Řada nemocí je spojována s narušenou nebo aberantní střevní mikrobiotou (tj. takovou, která se liší od mikrobioty zdravých lidí), což se projevuje:

- nízkou diverzitou
- odlišnými poměry hlavních kmenů ve střevě (*Firmicutes: Bacteroidetes*)
- vyšší hladinou gramnegativních střevních bakterií
- nižší hladinou laktobacilů a/nebo bifidobakterií.

Střevní mikrobiota pacientů s diabetem typu II. byla funkčně charakterizována markery spojenými s diabetem, které vykazovaly obohacený membránový transport cukrů a aminokyselin s rozvětveným řetězcem. Obezita byla charakterizována změněným poměrem *Bacteroides: Firmicutes* s větším relativním výskytem *Firmicutes*. Kromě toho studie zahrnující transplantaci mikrobioty z obézních do GIT myši ukázaly, že obézní fenotyp je přenosný a může být podporován mikrobiotou, která má zvýšenou schopnost získávat energii z hostitelské stravy (Singh et al., 2017).

Srovnání rozmanitosti mikrobiomu mezi různými jedinci vedlo k identifikaci jejich asociace s různými patologickými stavy. Mnoho takových studií popisuje souvislosti mezi přítomností/nepřítomností řady mikrobiálních druhů a onemocnění, a navíc pomáhá vytvářet hypotézy spojující dysbiózu a etiologii různých patologických stavů (Gomaa, 2020).

Variabilita mikrobiomu může být ovlivněna nejen stravou a užíváním antibiotik, ale také socioekonomickým statutem a geografii. Dysbióza může být také následkem rozrůstající se westernizací stravy (Gaucher et al., 2019).

Porod císařským řezem také negativně ovlivňuje proces kolonizace ve střevě. A konečně, střevní bakterie mohou být narušeny řadou faktorů, které se běžně vyskytují během života:

- stresem
- nevhodnou dietou
- infekcí
- procesem stárnutí

(Gomaa, 2020).

K nastolení rovnováhy mikrobiomu se kromě zmíněných synbiotik, psychobiotik apod. (viz kapitola 3.2.), využívá transplantace fekální mikroflóry, která spočívá v přenosu fekální mikrobioty zdravého jedince do GIT pacienta. Případně se využívá fágové terapie, kdy se za pomoci bakteriofágů, které vpraví svoji DNA (či RNA) do nežádoucích bakterií, a tak ji postupně usmrtí (Gomaa, 2020).

Podávání specifických bakteriálních kmenů by mohlo řešit zřetelné rozdíly v profilech mikrobioty tlustého střeva související s onemocněními střev. V poslední době se zájem o probiotický výzkum rozšířil z klasických probiotických druhů *Lactobacillus*

a *Bifidobacterium* na cílenější manipulaci s hostitelskou střevní mikrobiotou pomocí personalizovaných probiotických terapií využívajících funkčně důležité přísné anaerobní střevní mikroby (Bircher et al., 2018).

3.9 Metody dlouhodobé konzervace mikroorganismů

Metody dlouhodobé konzervace mikroorganismů jsou používány v mezinárodních sbírkách mikroorganismů, ale hojně rovněž v interních sbírkách výzkumných, potravinářských či průmyslových laboratoří či obecně všude tam, kde je třeba uchovat ve vitálním stavu mikroorganismy po delší čas. Existují v zásadě tři hlavní kategorie těchto metod: zmrazování, sušení a kombinace obou předchozích, resp. lyofilizace. Tyto metody umožňují uchovávat za daných podmínek mikrobiální buňky ve víceméně neměnném fyziologickém, metabolickém, fenotypovém a genotypovém stavu. Lze se často setkat s pojmy anabióza či kryptobióza, resp. s metabolickým stavem, který je dosažen v odezvě na nežádoucí environmentální podmínky.

3.9.1 Sušení

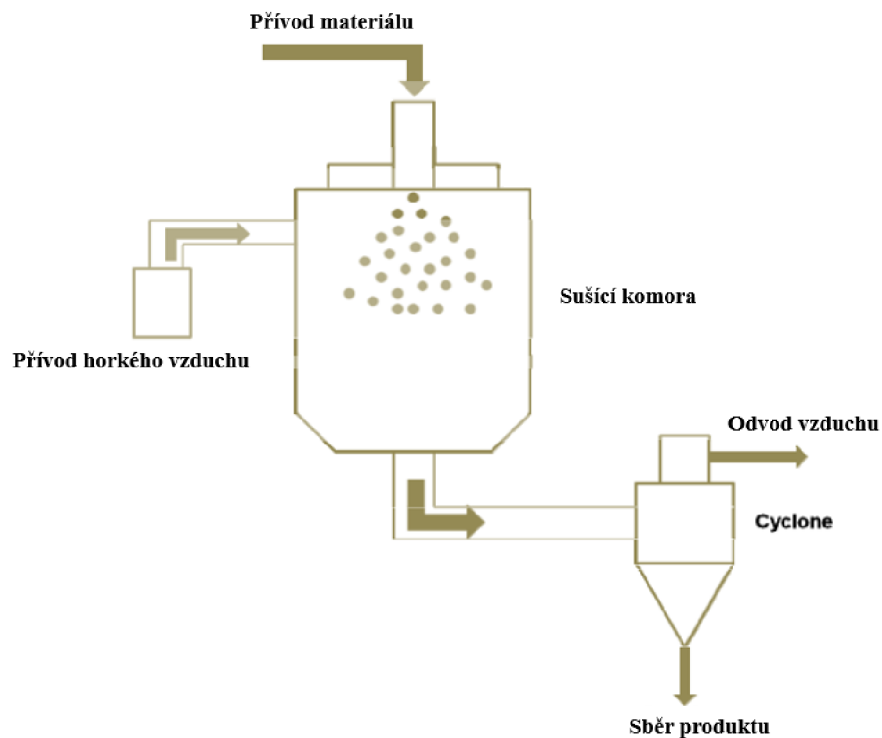
Desikace neboli sušení se využívá především pro dlouhodobé skladování hlavně termotolerantních bakterií mléčného kvašení. Výhodou této metody jsou nízké investiční a údržbové náklady, časová nenáročnost a možnost nepřetržité práce. Mezi nevýhody patří drastická dehydratace buněk, protože při ní může docházet k tranzici-transformaci fosfolipidů. Během sušení je důležité předcházet prudkým změnám osmotického tlaku, proto je nezbytné využití tzv. osmoprotektantů, které mohou zapříčinit úplnou dehydrataci buněk (Iaconelli et al., 2015).

3.9.2 Sprejové sušení

Sprejové sušení se skládá hlavně ze tří fází: objemová kapalina je **atomizována** (přeměněna na drobné kapičky), tyto kapky jsou pak **vystaveny horkému vzduchu** o teplotě řádově 200 °C, kdy dochází k disperzi částic sušícího plynu a splynutí s atomizovanou částí. V poslední fázi se **oddělí sušící plyn** pomocí centrifugy (Huang et al., 2017; Sollohub & Cal 2010).

V současnosti se tato metoda využívá například při přípravě doplňků stravy s probiotickými bakteriemi, výrobě sušených potravin (sušené mléko, instantní káva), ke stabilizaci a výrobě farmaceutik (léky s inhalační aplikací apod.) (Sollohub & Cal 2010).

Ve srovnání s lyofilizací představuje sušení rozprašováním nižší specifické náklady na energii a vyšší produktivitu. Přetrvávají však problémy spojené s používáním sušení rozprašováním za účelem produkce životaschopných kultur, zejména s citlivými probiotickými kmeny (Huang et al., 2017).



Obrázek č.6. Schéma sprejového sušení (převzato dle Munin & Edwards-Lévy 2011).

3.9.3 Lyofilizace

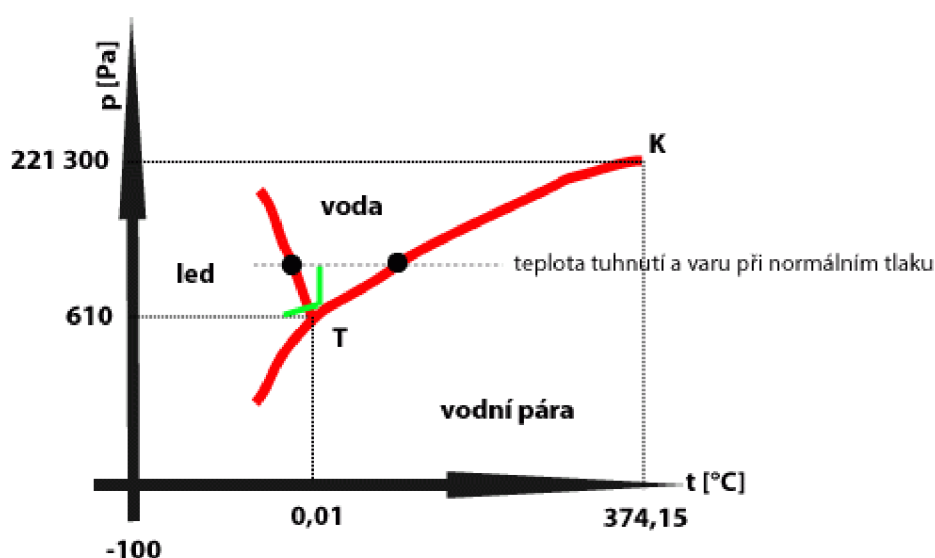
Lyofilizované probiotické bakterie jsou široce používány jako ideální forma aplikace probiotik do gastrointestinálního traktu člověka. Důvodem, proč se tato forma stala hojně využívanou je, že i přes některé negativní účinky procesu lyofilizace si bakteriální buňky zachovávají svou životaschopnost, a to hlavně díky nízkému obsahu vody díky čemuž jsou takové buňky výrazně stabilnější (Govender et al., 2014; Saeed et al., 2022). U většiny bakteriálních kmenů může řádně lyofilizovaná bakteriální kultura v plynotěsné ampulce ve vakuu stále odhalit životaschopnou kulturu po 30 a více letech skladování (Peiren et al., 2016). Také se ukázalo, že lyofilizace neovlivňuje schopnost probiotických bakterií chránit střevní systém před patogenními bakteriemi (Govender et al., 2014). Konzervace bakterií mléčného kvašení lyofilizací se dlouhodobě používá pro skladování funkčních doplňků stravy či startérů (Bodzen et al., 2021).

Lyofilizace spočívá v odstranění vody z bakteriálních buněk sublimací pod hodnotami trojného bodu vody (obr. č. 7). Proces lyofilizace odstraní z bakteriální buňky intracelulární vodu, dokud se nedosáhne aktivity vody $a_w \leq 0,2$, čímž se sníží nebo přeruší jejich metabolická aktivita (Bodzen et al., 2021). Proti ostatním metodám sušení, které spočívají v odstraňování vlhkosti odpařením, tj. přechodem vody z fáze kapalné do plynné, je

lyofilizace charakteristická odstraněním vody sublimací, tj. přechodem z pevného skupenství přímo do plynného. K tomuto přechodu je nutné připravit vhodné fyzikální podmínky.

Samotný proces se skládá ze tří kroků: **mražení**, které je hlavním kritickým krokem pro udržení životaschopnosti bakterií během lyofilizace, **sublimace** (první krok sušení) a krok **sekundárního sušení**. Během zmrazování se v extracelulárním médiu tvoří led. Vyšší koncentrace rozpuštěné látky je v buňkách než v extracelulárním médiu. Tento rozdíl v osmotickém tlaku způsobuje odtok vody z buňky a její dehydrataci. Během mražení se tvoří ledové krystaly v závislosti na rychlosti zchlazování, která způsobují mechanická kryoporanění na buněčných strukturách. Osmotický stres je generován zvýšenou koncentrací elektrolytů v nezmrzlé frakci vody, dochází k poškození buněk. Navíc zvýšení poměru povrch/objem buňky v důsledku rychlé rychlosti ochlazování způsobuje deformace membrány, jako je její smršťování (Bodzen et al., 2021; Marcial-Coba et al., 2018).

K vysušení dochází prostřednictvím sublimace ledu ve vakuu. Pevný materiál – tedy led se oddělí a je odpařen. U první fáze sušení je nezbytné, aby probíhala pomalu, pokud by tomu tak nebylo, došlo by k zmiňovanému poškození buněk. Během zmrazovací fáze se voda přemění na led, obvykle zachycený v amorfní matici **lyoprotektantu**, látky, která chrání buňky během zmrazování, sušení a skladování. Amorfní lyoprotektant by měl zmrznout pod svou teplotou skelného přechodu (T_g'), aby byl zajištěn pevný produkt ve stabilním sklovitém stavu (Peiren et al., 2016).

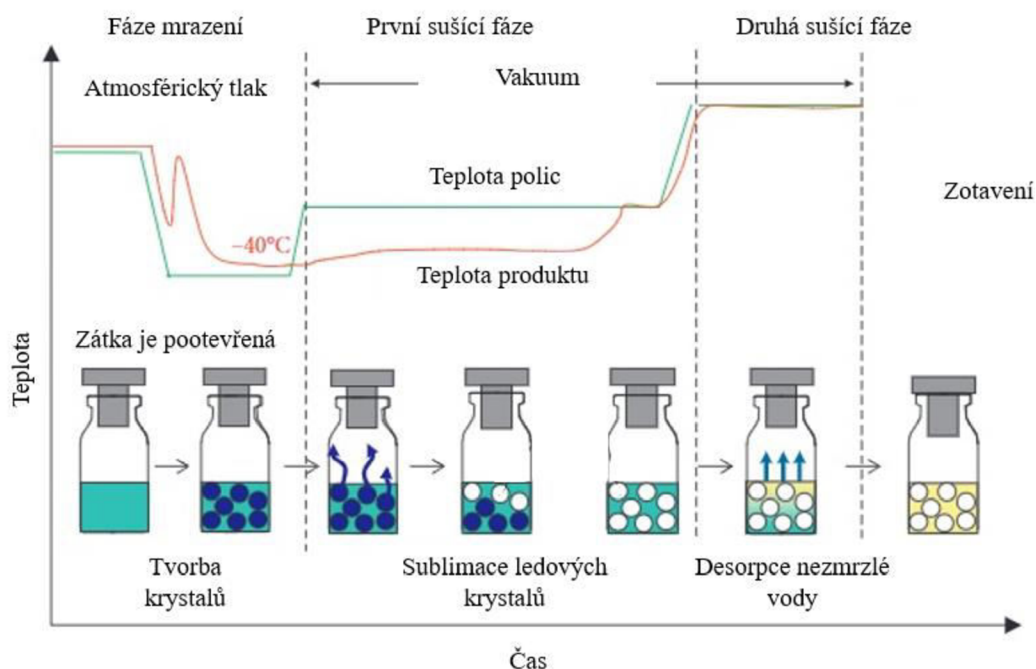


Obrázek č. 7.Fázový diagram vody (převzato dle Magda Králová).

Kromě toho musí být sublimace dokončena dříve, než teplota produktu dosáhne bodu tání ledu (0 °C). Proto musí být nárůst teploty na policích řízen, aby se zabránilo kolapsu nebo roztavení produktu. Po sublimaci je vázaná voda z produktu odstraněna během sekundárního sušení, které zahrnuje mírné zvýšení teploty. Sekundární sušení je dokončeno při dosažení nízkých hodnot a_w produktu (obvykle pod 0,2) (Bodzen et al., 2021).

Tato metoda však není příliš vhodná pro kryolabilní bakterie, jako je například *L. delbrueckii*. Takové bakterie mají odlišnou membránovou strukturu, která ovlivňuje odolnost buněk vůči nízkým teplotám. Vhodnou alternativou je v tomto případě tzv. nízkoteplotní vakuové sušení (LTVD) u kterého je používán nižší rozsah teplot (Bircher et al., 2018).

Alternativou ke kryo(lyo)ochraně je použití **mikroenkapsulace**, která se také používá k ochraně probiotických bakterií během lyofilizace. Mikroenkapsulace pomocí polysacharidů nebo systémů na bázi proteinů se ukázala být mnohem účinnější při ochraně bakterií během lyofilizace a skladování ve srovnání s tradiční kryo(lyo)ochranou. Při enkapsulaci jsou buňky zabaleny do mikroenkapsulační membrány, která je tvořena různými polysacharidy a slouží jako ochrana před nepříznivými vlivy okolního prostředí. Zároveň je propustná pro metabolity a živiny. Je velice efektivní ochranou probiotických bakterií při samotné lyofilizaci, jejich skladování i proti prostředí trávicího traktu (Bircher et al., 2018). Zachycení mikroorganismů v obalu (enkapsulace) resp. v jakýchsi mikrokuličkách je účinná metoda, která potenciálně zvyšuje jejich životaschopnost a stabilitu (Afzaal et al., 2020).



Obrázek č. 8. Schéma lyofilizace (převzato od Kawasaki et al., 2019).

Lyoprotektanty

Ukázalo se, že probiotika přežívají ve větším množství, když jsou před procesem lyofilizace zmrazena na teploty nižší jak $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté uchovávána v chladničce při teplotě $7\text{ }^{\circ}\text{C}$. To je docíleno použitím právě lyo(kryo)protektiv. Tyto látky brání intracelulární tvorbě ledu v buňkách bakterií a tím zabraňují snížení jejich životaschopnosti při vystavení nízkým teplotám (Bircher et al., 2018). Hlavní úlohou lyoprotektantů je stabilizace lipidové dvojvrstvy za podmínek absence vody (Fenster et al., 2019).

Dle studie Bodzna et al. (2021) je jedním z lyoprotektiv umožňujících zachovat životaschopnost bakterií během lyofilizace, sacharóza. Obecně disacharidy poskytují dobrou odolnost proti mrznutí. Využívá se také zmiňovaných prebiotik jako jsou FOS, konkrétně inulin nebo odstředěné mléko (Schwab et al., 2007).

Použití lyoprotektivní směsi s vysokým obsahem vázané vody je tak pro potravinářský průmysl slibnou strategií pro zlepšení přežití bakterií mléčného kvašení při dlouhodobém skladování (Fenster et al., 2019).

Hlavním rozdílem mezi lyoprotektantem a kryoprotektantem spočívá v tom, že lyoprotektanty chrání buňky před negativními vlivy zmrazování (tak jako kryoprotektivum) a současně sušení. Lyoprotektanty musí tedy vykazovat rovněž osmoprotektivní funkci (Marcial-Coba et al., 2018).

Proces sušení zvyšuje kontakt buněčných povrchů se vzdušným kyslíkem. Může vyvolat tvorbu intracelulárních reaktivních forem kyslíku, což způsobí poškození buněčných proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Tento účinek může být zvláště škodlivý pro kmeny obligátně anaerobních probiotik nové generace, které jsou velmi citlivé na kyslík, neb vykazují fermentativní způsob metabolismu. U těchto bakterií se jako lyoprotektivní látky často využívají cukerné alkoholy, jako např. sorbitol a mannitol, disacharidy sacharóza, trehalóza a laktóza nebo mléčné proteiny. Nicméně lyoprotektivní účinek se mezi kmeny liší v závislosti na povaze použitých sloučenin. Proto je stále zájem o identifikaci nových alternativních lyoprotektiv (Marcial-Coba et al., 2018).

3.9.4 Kryokonzervace

Kryokonzervace neboli jednoduše zmrazení, za účelem uchování životaschopnosti po delší čas, je metoda založená na bázi snižující se teploty, při které se zpomalí a zablokují životní funkce. Přitom ovšem zároveň nedochází k usmrcení buněk. Jedná se v podstatě o historicky nejstarší způsob biologické konzervace. Tento proces, podobně jako jiné konzervační procesy bakteriálních buněk, reverzibilně zabrání projevům životaschopného stavu. Voda se procesem zmrazení stane pro bakterie nevyužitelnou. Tato metoda zajišťuje dlouhověkost buněk po určité časové období, přičemž zůstávají zachovány genotypové a fenotypové charakteristiky.

Kryokonzervaci lze provádět několika způsoby. Nejefektivnější je pomocí kapalného dusíku. Ze všech metod umožňuje nejnižší teplotu ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), která spolehlivě zachovává

životaschopnost bakterií. Přestože uchování bakterií v tekutém dusíku zajistí životaschopnost buněk řádově na desítky let, značnou nevýhodou této metody jsou její relativně vysoké náklady.

Kritická teplota je závislá na řadě faktorů, nicméně zdá se, že teplota – 70 °C je dostatečná, aby zachovala vitalitu většiny bakterií po delší čas (roky, možná desítky let). Zmrazení na teplotu -20 °C se využívá nejčastěji na časové období do 2 let. Většinou vykazuje horší míru přežití, a to hlavně kvůli tomu, že se začnou tvořit ledové krystalky, které narušují mikrobiální stěnu a cytoplazmatickou membránu. Je nezbytné, aby zmrazovací zařízení byly vybaveny poplašným zařízením, které striktně zaznamenává zvýšení teploty – pokud dojde k rozmrazení, velice pravděpodobně dojde ke snížení životaschopnosti (Tedeschi & De Paoli 2011). To, v jaké fázi růstu bakterií je vhodné je konzervovat, se liší napříč druhy. Tedeschi & De Paoli (2011) uvádějí, že buňky ve stacionární fázi jsou rezistentní vůči poškození zmrazením a rozmrazením.

Miyamoto-Shinohara et al. (2008) ve své studii zkoumali míru přežití kryokonzervovaných bakterií. Po 20 letech ověřovali jejich aktivitu. Celkově vykazovaly nižší míru přežití gramnegativní bakterie, pravděpodobně z důvodu tenčí peptidoglykanové vrstvy. Čím tenčí tato vrstva peptidoglykanu je, tím pravděpodobněji dojde k jejímu prasknutí během procesu sušení. Dalším faktorem, který snižoval míru přežití, byla pohyblivost bakterií. Ty, které mají bičíky, měly také sníženou míru přežití.

Bircher et al. (2018) uvádějí, že co se týče striktně anaerobních bakterií, metoda kryokonzervace je daleko šetrnější nežli lyofilizace.

Mechanismy poškození buněk zmrazováním lze jednoduše rozdělit do dvou skupin podle průběhu teplot, za nichž vznikají, na ty způsobené tzv. chladovým šokem a ty způsobené mrazem. Aby se těmto poškozením zamezilo (případně se minimalizovaly), ke kulturám bakterií se přidávají protektivní látky, které buňky chrání před těmito jevy (Fu et al., 2019).

Kryoprotektivní látky

Kryoprotektivní látky, často přidávané do buněčné suspenze, slouží k ochraně mikroorganismů před poškozením během mrazení, skladování a rozmrazování. Kryoprotektanty jednoduše zvýšením celkové koncentrace všech rozpuštěných látek v systému snižují množství ledu vytvořeného při jakékoli dané teplotě, ale aby byly biologicky přijatelné, musí být schopny proniknout do buněk a mít nízkou toxicitu. Mnoho sloučenin má takové vlastnosti, včetně glycerolu, dimethylsulfoxidu, ethandiolu a propandiolu (Pegg, 2007). Nutno ovšem podotknout, že výše zmíněné penetrující kryoprotektanty mohou při zvýšené koncentraci a při vystavení bakteriálních kultur jejich působení po delší čas působit toxicky. Je tedy nutné u těchto kryoprotektantů dodržovat doporučená technologická pravidla a postupy. Kryoprotektivní látky jsou tříděny buď podle molekulové hmotnosti či podle (ne)schopnosti proniknout skrz buněčnou stěnu či rovněž cytoplazmatickou membránu (Marcantonini et al., 2022). Existují dva typy kryoprotektivních látek: penetrační a extracelulární.

Penetrační kryoprotektanty vstupují do buněk, zpomalují intracelulární zmrazení, minimalizují účinky roztoku, mění vlastnosti kapalin a zvyšují teplotu tzv. membránového skelného přechodu, což má za následek sníženou tvorbu intracelulárního ledu. V zásadě náleží mezi nízkomolekulární látky. Nejvýznamnějšími penetračními protektanty jsou glycerol a DMSO, tj. dimethylsulfoxid. DMSO se však nedoporučuje pro podávání *in vivo*, jelikož může být pro buňky toxický již při nízkých koncentracích. Glycerol zabraňuje vodíkové vazbě mezi molekulami vody a tím zabraňuje vzniku intracelulární krystaly ledu při zmrazování. V literatuře je za účelem skladování bakteriálních kultur doporučováno zmrazovat je v rozmezí 15-25 % glycerolu (Bircher et al., 2018)

Mezi **nepenetrující kryoprotektanty** se většinou řadí látky s vysokou molekulovou hmotností jako dextran, polyglykol, inulin, sójový pepton, albumin, sušené mléko a další (Tedeschi & De Paoli 2011). Tyto látky přilnutím k mikrobiálnímu povrchu buňku zpevní prostřednictvím interakce s membránovými lipidy, čímž napomáhá zmírnit stres způsobený náhlou změnou prostředí a chrání před zvýšeným povrchovým tlakem (Bircher et al., 2018), (Fu et al., 2019).

Wang et al. (2021) použili jako kryoprotektivum směs sójových polysacharidů, arabské gumy a trehalózy. U *L. plantarum* tak bylo dosaženo 90,52 % míry přežití. Sójové polysacharidy mohou sloužit jako zdroj dietní vlákniny a lze je tedy použít i jako funkční složka v potravinářských aplikacích. Kromě toho pocházejí z bezpečného zdroje a mají vhodné fyzikální vlastnosti, včetně vysoké rozpustnosti a stability. Jejich výsledky také ukazují, že účinnost kombinace 2 kryoprotektantů byla dostatečná a mnohem efektivnější než při užití kombinací 3 až 4 kryoprotektantů.

Smíchání bakterií s kryoprotektivní látkou by mělo probíhat při pokojové teplotě – snadněji tak pronikne do buněk. Po 15 minutách už následuje samotné zmrazení. Pokud by takto smíchaný vzorek zůstal při pokojové teplotě déle než 60 minut, mohla by protektivní látka působit na buňky toxicky. Dalším důležitým parametrem je rychlost zchlazení. Ta ovlivňuje rychlost tvorby a velikosti krystalků. Efektivní rovnoměrná rychlost zmrazování je 1 °C/min. V momentě, kdy zmrazování dosáhne teploty přibližně -30 °C, pak už může být samotný proces rychlejší. Při rozmrazování je vhodné zvolit rychlejší způsob, například vodní lázeň o teplotě 37 °C nežli samovolné rozmrazení. Zlepší se tím rychlost regenerace buněk (Tedeschi & De Paoli 2011). Kryoprotektanty je dle Fu et al. (2019) vhodné využít i při sprejovém sušení.

4 Materiál a metody

4.1 Zvolené bakteriální kmeny

Pro účely této diplomové práce byly použity kultury uvedené v tab. č. 2. Všechny jsou součástí interní sbírky mikroorganismů Laboratoře anaerobní mikrobiologie ÚŽFG AV ČR, v.v.i., kde byla tato diplomová práce zhotovena. Níže uvedené kmeny byly izolovány ze 2 zdravých jedinců obou pohlaví ve věku 38, resp. 32 let. K tomuto účelu byla využita čerstvá bioptická tkáň výstelky tlustého střeva. Ta byly okamžitě po vyjmutí vložena do zkumavky obsahující anaerobní modifikované BHI médium (složení níže). Anaerobní atmosféra byla zajištěna vytěsněním kyslíku pomocí směsi plynů (N₂: 75%, CO₂: 20% a H₂: 5%). Po dekadickém naředění byly bakteriální kmeny izolovány za anaerobních podmínek (Anaerogen; Oxoid, Anglie) v anaerostatu (Oxoid, Anglie) z modifikovaného TPY (Killer et al., 2018b) agaru (kmeny B, 23K, 2K), krevního (Carl Roth GmbH, Německo) agaru (kmeny K2 a K4) a MRS agaru (Oxoid, Anglie). Pro účely identifikace byla zvolena komparativní 16S rDNA genová analýza. Téměř celé sekvence 16S rDNA genů byly amplifikovány pomocí dvojice primerů fP1 (5' → 3': CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) - rP2 (5' → 3': CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT) (Forster et al. 1996). Vlastní analýza, resp. výpočet similarity (%) 16S rDNA genů s nejbližšími příbuznými taxony, byla provedena pomocí aplikace a databáze EzBioCloud (Yoon et al. 2017). Níže uvedené druhy byly klasifikovány na základě similarity $\geq 99.7\%$ s příslušnými typovými kmeny. Délka porovnávaných 16S rDNA sekvencí byla v rozmezí 1385-1438 nukleotidů.

Tabulka č. 2. Použité kmeny se sbírkovými čísly použity pro účely diplomové práce

Použité kmeny	Sbírková čísla	Označení kmene
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	EVAV2	B
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	(2/K/MTPY4)	23K
<i>Ruminococcus gnavus</i>	(1/K/TPY3)	2K
<i>Blautia luti</i>	(UC1/3/KA4)	K2
<i>Blautia provensensis</i>	(UC1/1/KA3)	K4
<i>Bifidobacterium longum</i>	(UC1/1/MRS5)	K3

4.2 Příprava a složení růstového média

V níže uvedené tabulce č. 3 je uvedeno složení upraveného BHI média, které bylo nově navrženo pro tuto práci.

Tabulka č. 3.Složení BHI média

Složky	množství (g/L)
BHI (brain heart infusion)	37
Glukóza	8
Beef extract	2
Kvasničný extrakt	3
Sójový pepton	3
KH ₂ PO ₄ 3 g	3
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1
Cystein x HCl	0,5

Všechny složky byly smíchány a rozpuštěny v destilované vodě. Poté bylo médium vloženo do vroucí vodní lázně na 20 minut. Médium bylo dávkováno po 9 ml do penicilínek, které byly následně probublány směsí plynů N₂, CO₂ a H₂ v poměru 70:25:5. Tím se zajistila anaerobní atmosféra. Následně byly lahvičky uzavřeny gumovou a hliníkovou zátkou. Ampulky s připraveným růstovým médiem byly sterilovány v autoklávu při 107 °C po dobu 50 minut.

4.3 Rekonstituce kultur

Zmrazené kultury byly rekonstituovány do upraveného BHI média.

Před samotnou rekonstitucí bylo kontrolována hodnota pH, která se pohybovala v rozmezí 6,7 – 7,2. Anaerobní podmínky byly zajištěny vytěsněním atmosférického O₂ pomocí směsi plynů N₂, CO₂ a H₂ v poměru 70:25:5. Toto médium bylo využito nejen pro rekonstituci, ale také pro kultivaci zvolených kmenů. V případě použití pro kultivaci bylo k upravenému BHI přidáno 14 g/L agarů.

4.4 Stanovení původních počtů bakterií

Před založením samotného pokusu jsme zjišťovali původní počty mikroorganismů pro určení počtu životaschopných buněk. Kultury kmenů byly kultivovány v upraveném BHI médiu po dobu 36 hodin při 37 °C, což odpovídá pozdní logaritmické fázi růstové křivky při vsádkové kultivaci.

Médium bylo použito stejné jako je uvedeno v tabulce č.3. Pouze byl přidán agar (14 g/mL). Do sterilních lahvíček s 9 mL upraveného BHI média (opět hermeticky uzavřené) byl aplikován 1 ml rekonstituované bakteriální kultury. Následně byla vytvořena ředící řada (celkem ředění 10^{-8}). Poté jsme aplikovali 0,5 mL na dno Petriho misek a zalili upraveným BHI médiem. Každý vzorek byl z důvodu stanovení co možná nejpřesnějšího množství vitálních buněk zaočkován ve 3 kopiích. Misky byly vloženy do anaerostatu spolu s vyvíječem anaerobní atmosféry (AnaeroGen; Oxoid, Anglie) a ponechány 48-72 hodin při 37 °C. Po kultivaci byly spočítány na příslušných ředěních kolonie narostlé ze životaschopných buněk a převedeny na hodnoty dekadického logaritmu. Hodnoty ze 3 kopií byly zprůměrovány.

4.5 Příprava potenciálních lyo(kryo) protektivních roztoků

Vzhledem k silné viskozitě guarové gumy (Organis, Česko) a xanthanu (Wolfberry, Česko) a možné aplikaci pro výrobu nových forem probiotik (synbiotik) byly použity roztoky o nízké koncentraci (v obou případech 0,5%; w/v). Po důkladném promíchání v destilované vodě bylo u roztoků upraveno pH (6,5) pomocí koncentrovaného roztoku NaOH (5M). Anaerobní atmosféra byla vytvořena směsí plynů, jak je uvedeno výše. Tyto sterilní roztoky byly smíchány s čerstvými kulturami do poloviční koncentrace.

4.6 Příprava směsi bakteriálních kultur a roztoků potenciálně lyo(kryo) protektivních látek před konzervací

U každého uvedeného kmene v tabulce č.4 byla provedena lyofilizace i mrazení. Pro lyofilizaci se všechny experimentální varianty (tedy G, X, C+, C-) připravily ve 2 kopiích. U mrazení jsme připravili kopii pouze jednu. V připravených hermeticky uzavřených penicilínkách (pomocí gumové zátky a hliníkového uzávěru) bylo injekční stříkačkou aplikováno po 1 ml potenciálně kry(lyo)protektivní látky. Jako pozitivní kontrola bylo u lyofilizace použito 5 % rekonstituované sušené mléko a u mrazení 25% glycerol, opět v množství 1 ml. Pro přehlednost jsou všechny varianty zaznamenány i do následující **Tabulky č. 4.**

Tabulka č. 4 Seznam vzorků při zakládání pokusu

KMEN	OZNAČENÍ	ZPŮSOB KONZERVACE	
		LYOFILIZACE	MRAZENÍ
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	EVAV2	G (guarová guma; 0,5 % w/v)	G (guarová guma; 0,5 % w/v)
		X (xanthanová guma; 0,5 w/v)	X (xanthanová guma; 0,5 w/v)
		K+ (5 % sušené mléko)	K+ (25 % glycerol)
		K- (samostatná kultura)	K- (samostatná kultura)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	23K	G (guarová guma; 0,5 % w/v)	G (guarová guma; 0,5 % w/v)
		X (xanthanová guma; 0,5 w/v)	X (xanthanová guma; 0,5 w/v)
		K+ (5 % sušené mléko)	K+ (25 % glycerol)
		K- (samostatná kultura)	K- (samostatná kultura)
<i>Ruminococcus gnavus</i>	2K	G (guarová guma; 0,5 % w/v)	G (guarová guma; 0,5 % w/v)
		X (xanthanová guma; 0,5 w/v)	X (xanthanová guma; 0,5 w/v)
		K+ (5 % sušené mléko)	K+ (25 % glycerol)
		K- (samostatná kultura)	K- (samostatná kultura)
<i>Blautia luti</i>	K2	G (guarová guma; 0,5 % w/v)	G (guarová guma; 0,5 % w/v)
		X (xanthanová guma; 0,5 w/v)	X (xanthanová guma; 0,5 w/v)
		K+ (5 % sušené mléko)	K+ (25 % glycerol)
		K- (samostatná kultura)	K- (samostatná kultura)
<i>Blautia provvensensis</i>	K4	G (guarová guma; 0,5 % w/v)	G (guarová guma; 0,5 % w/v)
		X (xanthanová guma; 0,5 w/v)	X (xanthanová guma; 0,5 w/v)
		K+ (5 % sušené mléko)	K+ (25 % glycerol)
		K- (samostatná kultura)	K- (samostatná kultura)
<i>Bifidobacterium longum</i>	K3	G (guarová guma; 0,5 % w/v)	G (guarová guma; 0,5 % w/v)
		X (xanthanová guma; 0,5 w/v)	X (xanthanová guma; 0,5 w/v)
		K+ (5 % sušené mléko)	K+ (25 % glycerol)
		K- (samostatná kultura)	K- (samostatná kultura)

Vzorky určené pro sledování možného kryoprotektivního efektu byly vloženy do mrazničky s nastavenou teplotou – 20 °C.

Co se týká sledování lyoprotektivního efektu, postup byl následující: po rychlém zmrazení byla v co možná nejkratším časovém období u kopií vzorků bakteriálních kultur odstraněna gumová zátka s hliníkovým uzávěrem a nahrazena speciální lyofilizační zátkou, jež byla ihned zakryta (kvůli minimalizaci kontaminace zvenčí) sterilním, dvojitým, aluminiovým obalem. Po výměně zátky byly vzorky bezprostředně uloženy do mrazáku. Nejdříve při teplotě -65 °C a po krátké aklimatizaci na nízkou teplotu byly přendány do mrazáku o teplotě -80 °C, kde byly před samotnou lyofilizací ponechány minimálně 2 hodiny.

Byl použit lyofilizátor „Freeze Dryer LYO GT2“. Poté byly vzorky v co nejkratším čase (minimalizace průniku vzduchu, respektive vzdušné vlhkosti) hermeticky uzavřeny hliníkovým uzávěrem a uskladněny v chladničce.

4.7 Počty vitálních buněk v časových intervalech

Po lyofilizaci a kryokonzervaci byly měřeny počty vitálních buněk s následným časovým odstupem: 24 hodin, 30, 90, 150 a 180 dní.

K lyofilizátům jsme vždy přidali 2 mL média a rozmíchali. Následně jsme odebrali 1 mL do sterilní lahvičky s 9 mL média (tak jako je uvedeno v kapitola příprava médií). V ředění jsme pokračovali odebráním 2 mL do další sterilní lahvičky. Vzorek se vždy řádně promíchal a následovalo ředění opět po 1 mL. Mrazené vzorky jsme nechali rozmraznout při pokojové teplotě a řádně je promíchali. Postup ředění je stejný jako u lyofilizátů – s výjimkou negativní kontroly, kdy byl z mrazeného vzorku odebrán pouze 0,5 mL a z prvního ředění se následně odebraly 2 mL. Další stupně ředění se opět odebíraly po 1 mL. Při přípravě ředících řad byly použity kalibrované, sterilní 1ml stříkačky s jehlou.

Z ředících řad bylo aplikováno 0,5 ml suspenze na dno sterilních Petriho misek, přelito anaerobním, sterilním BHI agarem a kultivováno po dobu 48 hodin při 37 °C v anaerostatu s přísádkem vyvíječe anaerobní atmosféry. Po kultivaci byla hodnocena typická morfologie buněk příslušných bakteriálních kmenů.

Vždy byly zvoleny 3 nezávislé kopie Petriho misek, u nichž byly detekovány počty a stanoveny směrodatné odchylky. Vyhodnocení bylo provedeno graficky s porovnáním negativních a pozitivních kontrolních vzorků.

5 Výsledky

5.1 Počty vitálních buněk u zmrazených kultur vybraných mikroorganismů

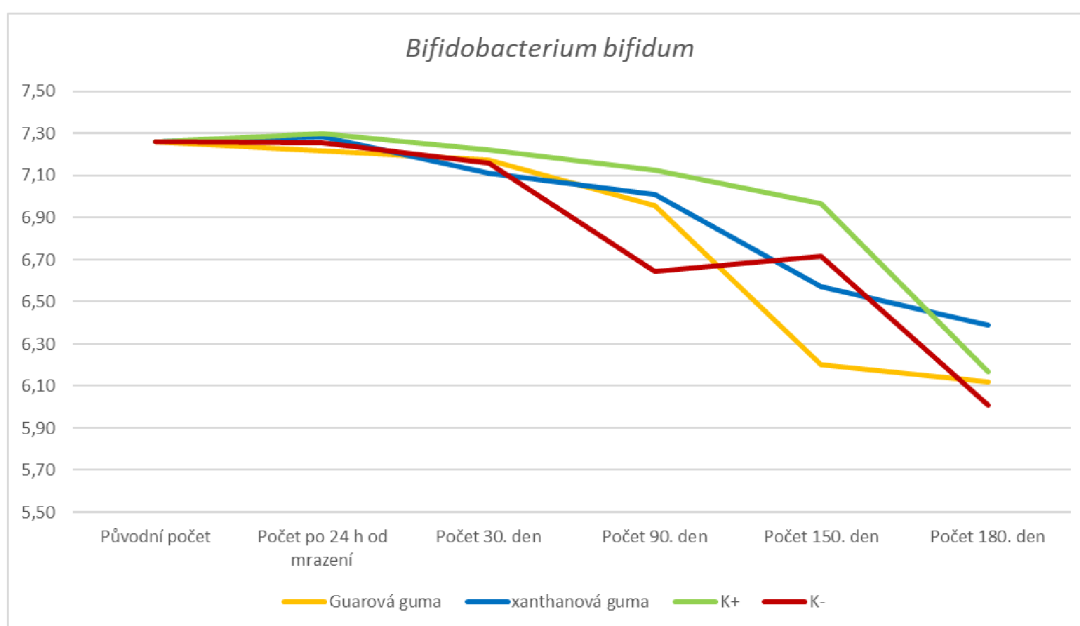
V tabulce č. 5 níže jsou uvedeny výsledné počty námi testovaných kultur, které byly zmrazeny za přítomnosti 2 potenciálních kryoprotektivních roztoků. Tabulka rovněž obsahuje výsledné počty u pozitivních a negativních kontrol.

Tabulka č. 5. Počty vitálních buněk (\pm – směrodatná odchylka) u zmrazených kultur v daných časových intervalech

Kmen	Experimentální varianta	Počet (log KTJ/mL) původní kultury	Počet po 24 h od mrazení	Počet 30. den	Počet 90. den	Počet 150. den	Počet 180. den
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	G (guarová guma)	7,26 \pm 0,02	7,21 \pm 0,03	7,15 \pm 0,03	6,92 \pm 0,05	6,21 \pm 0,02	6,11 \pm 0,01
	X (xanthanová guma)		7,23 \pm 0,04	7,1 \pm 0,01	6,99 \pm 0,02	6,6 \pm 0,04	6,32 \pm 0,05
	K+		7,22 \pm 0,06	7,16 \pm 0,04	7,09 \pm 0,05	6,94 \pm 0,03	6,2 \pm 0,04
	K-		7,22 \pm 0,03	7,16 \pm 0,02	6,69 \pm 0,04	6,6 \pm 0,1	5,99 \pm 0,03
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 23K	G (guarová guma)	8,84 \pm 0,03	8,67 \pm 0,01	8,11 \pm 0,02	7,93 \pm 0,04	7,83 \pm 0	<1
	X (xanthanová guma)		8,74 \pm 0,11	8,26 \pm 0,02	7,64 \pm 0,01	7,18 \pm 0,12	<1
	K+		8,74 \pm 0,02	8,01 \pm 0,08	7,42 \pm 0,1	<1	<1
	K-		8,67 \pm 0,03	8,25 \pm 0,01	7,71 \pm 0,03	7,15 \pm 0,13	<1
<i>Ruminococcus gnavus</i> 2K	G (guarová guma)	6,69 \pm 0,03	<1	<1	<1	<1	<1
	X (xanthanová guma)		<1	<1	<1	<1	<1
	K+		5,13 \pm 0,14	5,19 \pm 0,04	<1	<1	<1
	K-		<1	<1	<1	<1	<1
<i>Blautia luti</i> K2	G (guarová guma)	6,8 \pm 0,08	5,16 \pm 0,13	<1	<1	<1	<1
	X (xanthanová guma)		4,78 \pm 0,13	<1	<1	<1	<1
	K+		5,86 \pm 0,13	<1	<1	<1	<1
	K-		<1	<1	<1	<1	<1
<i>Blautia provvensensis</i> K4	G (guarová guma)	7,41 \pm 0,02	7,01 \pm 0,08	5,87 \pm 0,01	4,17 \pm 0,55	<1	<1
	X (xanthanová guma)		6,9 \pm 0,06	5,77 \pm 0,31	6,26 \pm 0	4,18 \pm 0,1	<1
	K+		7,16 \pm 0,01	6,03 \pm 0,03	6,06 \pm 0,1	5,31 \pm 0,1	<1
	K-		6,18 \pm 0,03	<1	<1	<1	<1
<i>Bifidobacterium longum</i> K3	G (guarová guma)	6,42 \pm 0,02	<1	<1	<1	<1	<1
	X (xanthanová guma)		<1	<1	<1	<1	<1
	K+		5,52 \pm 0,27	<1	<1	<1	<1
	K-		<1	<1	<1	<1	<1

Z tabulky č.5 je patrné, že kryoprotektivní účinek zvolených rostlinných, resp. bakteriálních polysacharidů nebyl potvrzen. Vitalita buněk *Bifidobacterium bifidum* jako jediná byla zachována až do posledního dne pokusu. U *Bacteroides thetaiotaomicron* sice došlo k prodloužení vitality, avšak počty s časem poměrně rychle klesaly. Životnost zbylých bakteriálních kmenů klesala velmi rychle. V následující kapitole budou data zaznamenána v grafech.

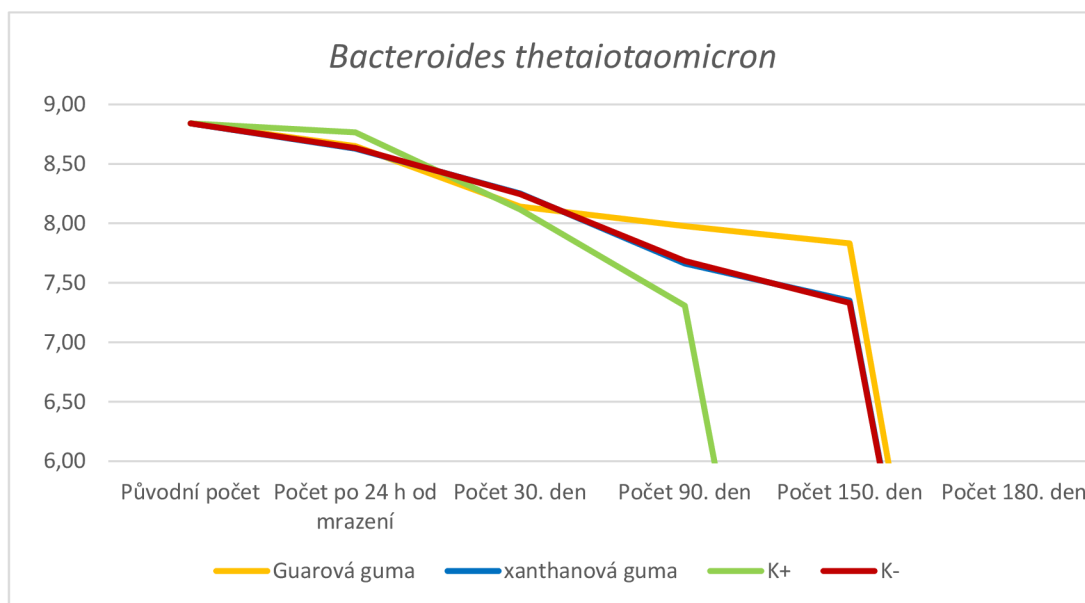
5.1.1 *Bifidobacterium bifidum*



Graf č. 1. Graf logaritmů životaschopných bakterií buněk *Bifidobacterium bifidum* v časových odstupech po kryokonzervaci

Z uvedeného grafu nevyplývá kryoprotektivní účinek ani jednoho z použitých roztoků. Vitalita sice byla přinejmenším zachována, nicméně životnost mikroorganismů výrazně poklesla a v porovnání s kontrolami zde není výrazný rozdíl.

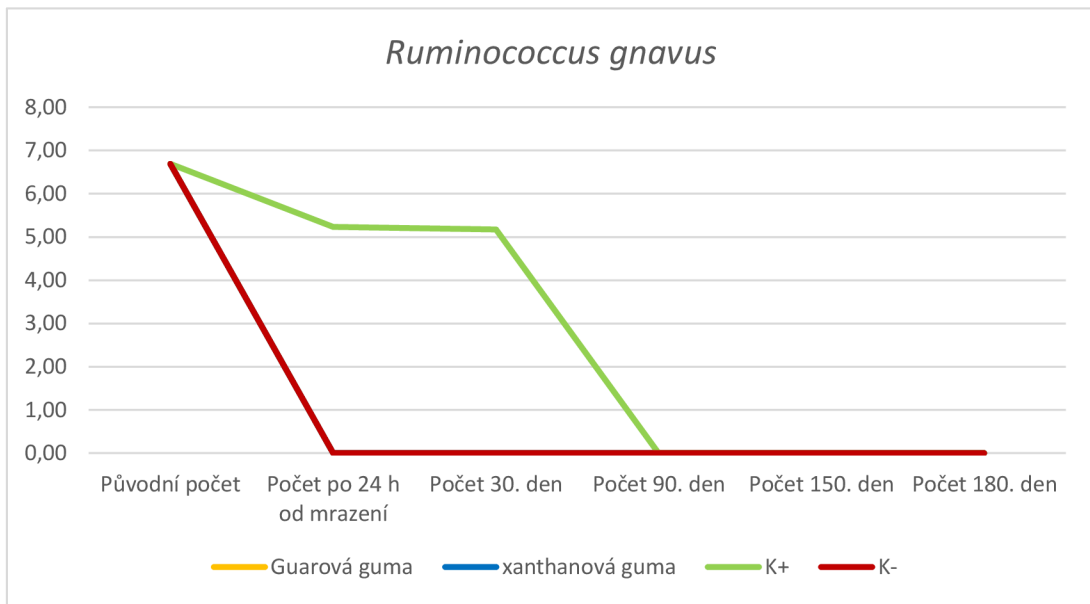
5.1.2 *Bacteroides thetaiotaomicron*



Graf č. 2. Graf logaritmu životoschopných bakterií buněk *Bacteroides thetaiotaomicron* v časových odstupech po kryokonzervaci

Co se týká kmene *Bacteroides thetaiotaomicron*, rovněž zde nebyl prokázán kryoprotektivní účinek. Guarová guma měla v tomto případě nejvyšší hodnoty životoschopnosti. Pokud ale pozitivní kontrola vykazovala nižší vitalitu nežli kontrola negativní, je zřejmé, že zde mohla nastat chyba v přípravě vzorků.

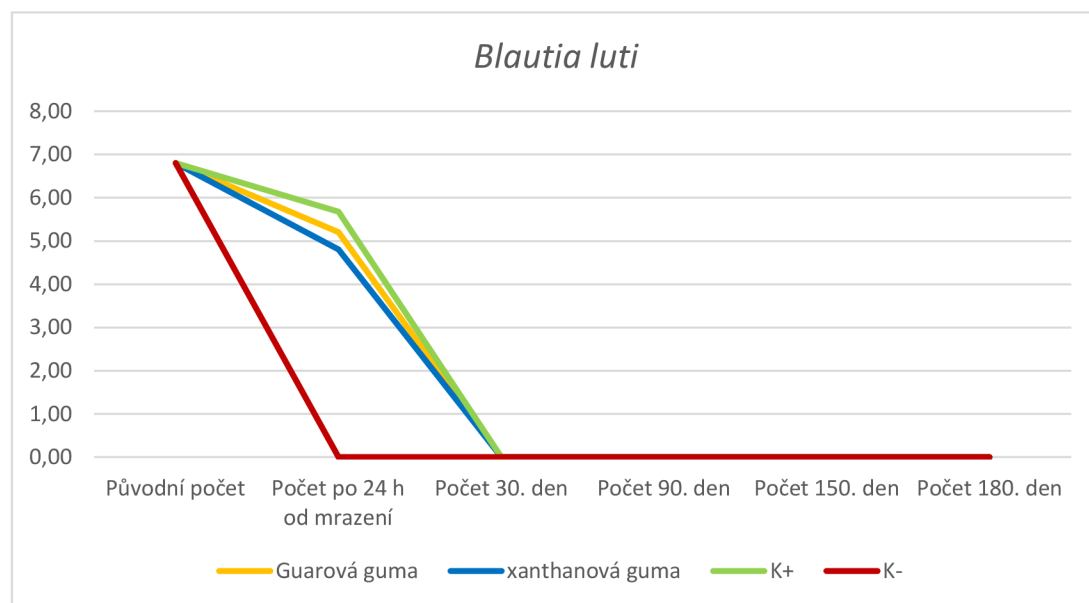
5.1.3 *Ruminococcus gnavus*



Graf č. 3. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Ruminococcus gnavus* v časových odstupech po kryokonzervaci

U *Ruminococcus gnavus* životaschopnost vykazovaly pouze buňky vzorku pozitivní kontroly. Pravděpodobně, obzvláště v případě této bakterie, nebyly vhodně zvolené podmínky. Dalším faktorem, který mohl zkreslit výsledky je fakt, že *R. gnavus* je poměrně citlivý, co se týče samotného procesu konzervace.

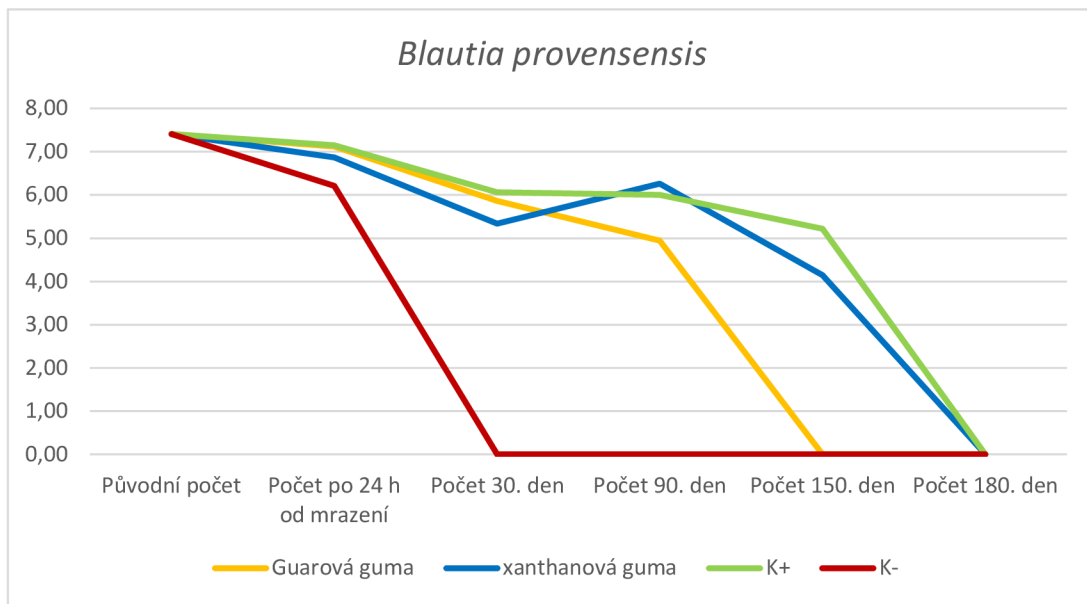
5.1.4 *Blautia luti*



Graf č. 4. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Blautia luti* v časových odstupech po kryokonzervaci

U kmene *Blautia luti*, obdobně jako u většiny kryokonzervovaných vzorků, nedošlo k potvrzení kryoprotektivního účinku zvolených polysacharidů. Zde došlo k poměrně velkému poklesu vitality již po 24 hodinách od konzervačního procesu. 30. den pak nebyly kultivovány žádné vitální buňky.

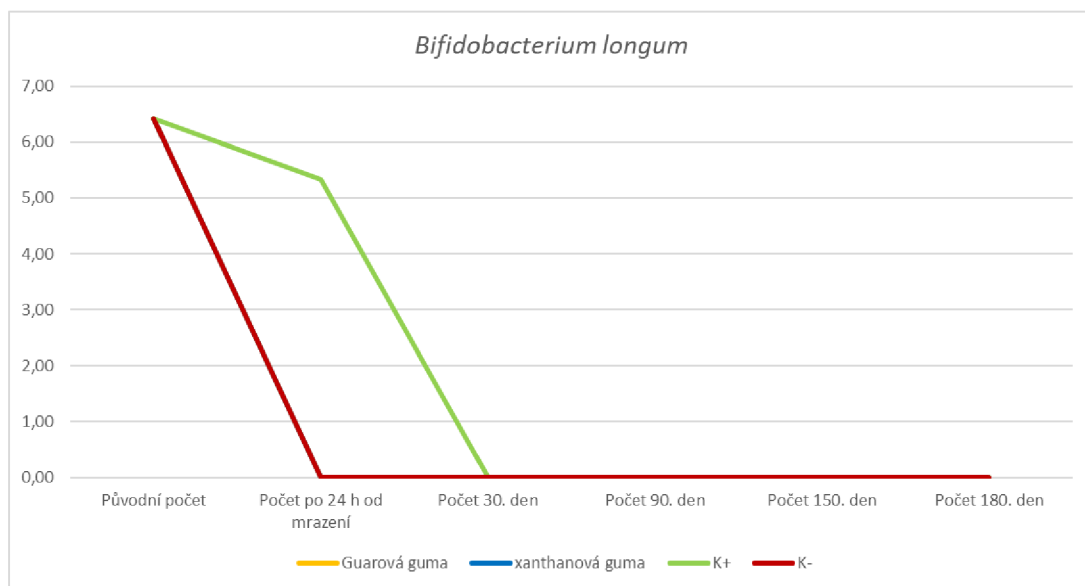
5.1.5 *Blautia provvensensis*



Graf č. 5. *Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk Blautia provvensensis v časových odstupech po kryokonzervaci*

Rovněž zde nelze hovořit o prokázání kryoprotektivního účinku. Nicméně u kmene *Blautia provvensensis* by se dalo hovořit o pozitivní účinku na mikroorganismy – křivka guarové gummy má podobné hodnoty jako pozitivní kontrola.

5.1.6 *Bifidobacterium longum*



Graf č. 6. Graf logaritmů životaschopných bakterií buněk *Bifidobacterium longum* v časových odstupech po kryokonzervaci

Životaschopnost *Bifidobacterium longum* je obdobná jako u kmene *R. gnavus* – vitalita byla zaznamenána pouze u kontrolní kontroly.

5.2 Počty vitálních buněk u lyofilizovaných kultur vybraných mikroorganismů

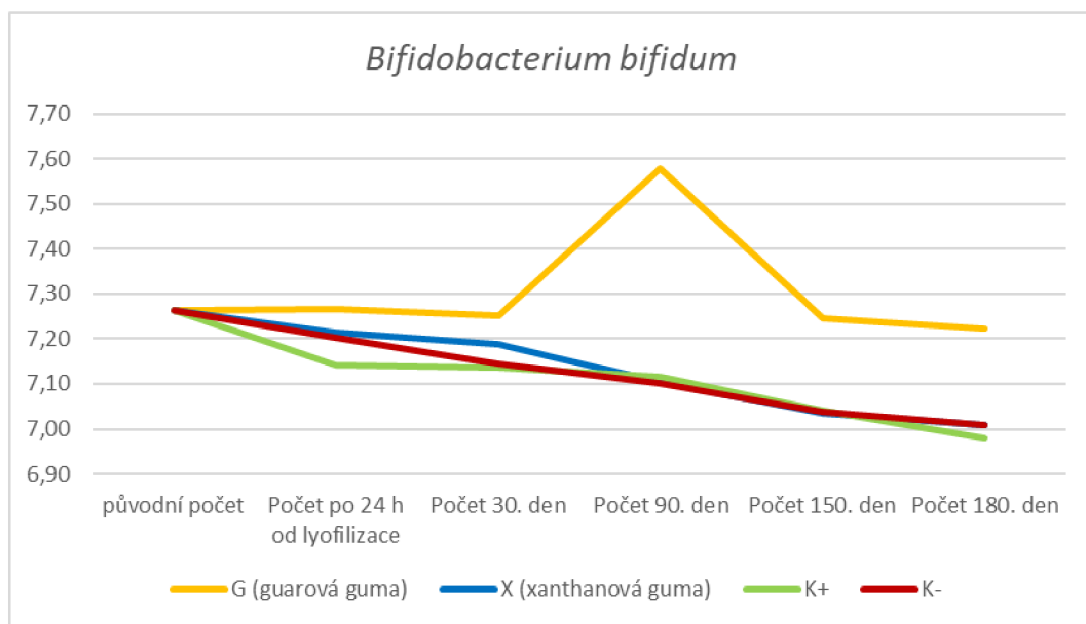
V tabulce č. 6 níže jsou uvedeny výsledné počty námi testovaných kultur, které byly lyofilizovány za přítomnosti 2 potenciálních kryoprotektivních roztoků. Tabulka rovněž obsahuje výsledné počty u pozitivních a negativních kontrol.

Tabulka č. 6. Počty vitálních buněk (\pm – směrodatná odchylka) u lyofilizovaných kultur v daných časových intervalech

Kmen	Experimentální varianta	Počet (log KTJ/mL) původní kultury	Počet po 24 h od lyofilizace	Počet 30. den	Počet 90. den	Počet 150. den	Počet 180. den
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	G (guarová guma)	7,26 \pm 0,02	7,27 \pm 0,02	7,25 \pm 0,02	7,58 \pm 0,49	7,25 \pm 0,01	7,22 \pm 0,03
	X (xanthanová guma)		7,21 \pm 0,01	7,19 \pm 0,02	7,1 \pm 0,04	7,03 \pm 0,04	7,01 \pm 0,04
	K+		7,14 \pm 0,02	7,14 \pm 0,02	7,12 \pm 0,02	7,04 \pm 0,01	6,98 \pm 0,03
	K-		7,2 \pm 0,03	7,14 \pm 0,01	7,1 \pm 0,02	7,04 \pm 0,04	7,01 \pm 0,01
<i>Bacteroides thetaiotaomicron 23K</i>	G (guarová guma)	8,84 \pm 0,03	8,35 \pm 0,06	8,21 \pm 0,04	7,37 \pm 0,49	7,31 \pm 0,04	7,14 \pm 0,02
	X (xanthanová guma)		8,38 \pm 0,07	8,2 \pm 0,06	7,79 \pm 0,02	7,7 \pm 0,02	7,49 \pm 0,09
	K+		8,08 \pm 0,07	5,97 \pm 0,49	5,41 \pm 0,37	4,28 \pm 0,31	<1
	K-		8,33 \pm 0,09	7,84 \pm 0,05	7,35 \pm 0,23	7,14 \pm 0,01	<1
<i>Ruminococcus gnavus 2K</i>	G (guarová guma)	6,69 \pm 0,03	6,51 \pm 0,04	5,92 \pm 0,11	<1	<1	<1
	X (xanthanová guma)		6,62 \pm 0,05	6,08 \pm 0,13	<1	<1	<1
	K+		6,39 \pm 0,07	5,74 \pm 0,14	<1	<1	<1
	K-		6,25 \pm 0,16	5,8 \pm 0,09	<1	<1	<1
<i>Blautia luti K2</i>	G (guarová guma)	6,8 \pm 0,08	6,51 \pm 0,15	6,47 \pm 0,02	6,44 \pm 0,14	6,39 \pm 0,13	<1
	X (xanthanová guma)		6,69 \pm 0,1	6,51 \pm 0,05	6,24 \pm 0,17	5,77 \pm 0,15	<1
	K+		6,53 \pm 0,13	5,15 \pm 0,18	6,01 \pm 0,06	5,91 \pm 0,02	<1
	K-		6,42 \pm 0,08	6,16 \pm 0,13	6,04 \pm 0,29	5,79 \pm 0,08	<1
<i>Blautia provvensensis K4</i>	G (guarová guma)	7,41 \pm 0,02	7,14 \pm 0,01	5,78 \pm 0,05	5,24 \pm 0,03	5,18 \pm 0,13	<1
	X (xanthanová guma)		7,09 \pm 0,04	6,42 \pm 0,1	6,01 \pm 0,05	5,79 \pm 0,03	<1
	K+		6,73 \pm 0,04	6,16 \pm 0,03	6,02 \pm 0,05	5,64 \pm 0,04	<1
	K-		6,66 \pm 0,07	5,34 \pm 0,09	5,19 \pm 0,1	4,97 \pm 0,03	<1
<i>Bifidobacterium longum K3</i>	G (guarová guma)	6,42 \pm 0,02	4,98 \pm 0,04	4,45 \pm 0,06	<1	<1	<1
	X (xanthanová guma)		4,75 \pm 0,05	4,42 \pm 0,11	<1	<1	<1
	K+		4,18 \pm 0,03	4,02 \pm 0,08	<1	<1	<1
	K-		4,22 \pm 0,05	3,87 \pm 0,11	<1	<1	<1

Z tabulky je patrné, že u procesu lyofilizace, je možný potenciál lyoprotektivního účinku využitých polysacharidů, pouze však u dvou zvolených kmenů. Z celkového počtu 6 testovaných bakterií nestačí k jasnému průkazu lyoprotektivních účinků. V následujících kapitolách budou data opět vynesena do grafické podoby.

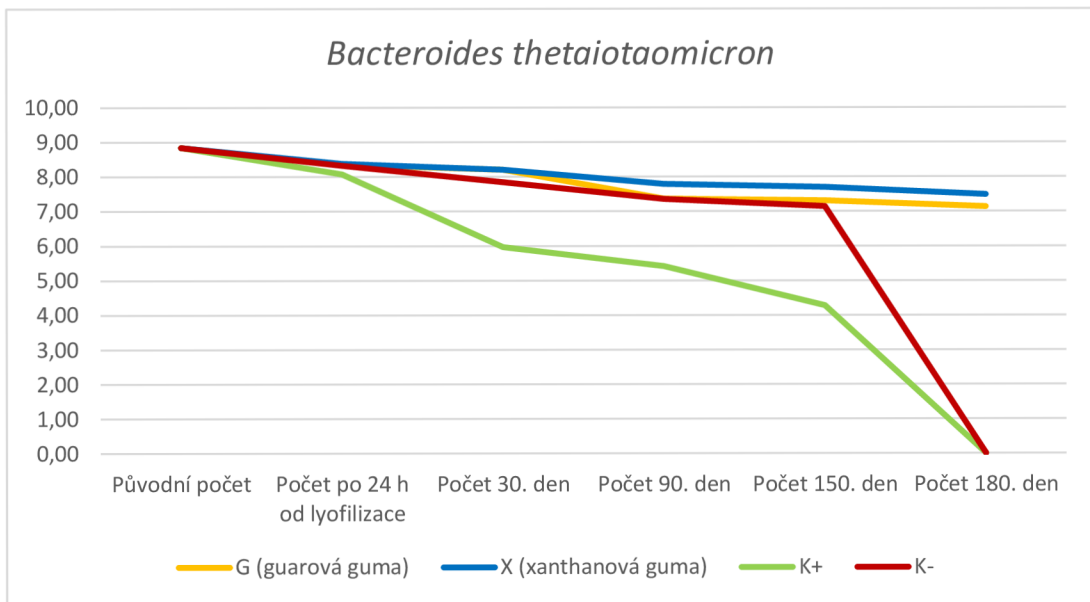
5.2.1 *Bifidobacterium bifidum*



Graf č. 7. Graf logaritmů životaschopných bakterií buněk *Bifidobacterium bifidum* v časových odstupech po lyofilizaci

U *B. bifidum* zůstala životaschopnost buněk ošetřených guarovou gumou téměř nezměněna. Nicméně xanthanová guma vykazuje poměrně stejné výsledky jako negativní kontrola. Pravděpodobně samotný způsob konzervace – lyofilizace je významným faktorem výsledné vitality.

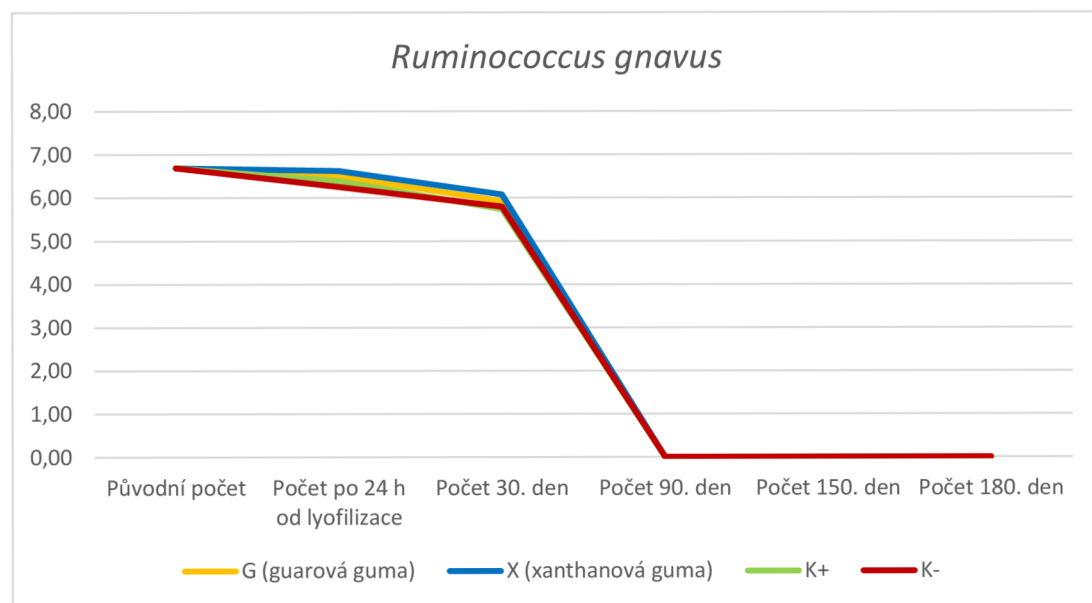
5.2.2 *Bacteroides thetaiotaomicron*



Graf č. 8. Graf logaritmů životaschopných bakterií buněk *Bacteroides thetaiotaomicron* v časových odstupech po lyofilizaci

U kmene *Bacteroides thetaiotaomicron* vykazovaly nejlepší vitalitu buňky právě s přidavkem potenciálních lyoprotektiv. Sice došlo k poklesu oproti počátečnímu počtu (přibližně o celý jeden řád), ale i tak byly výsledky příznivější nežli u pozitivní kontroly.

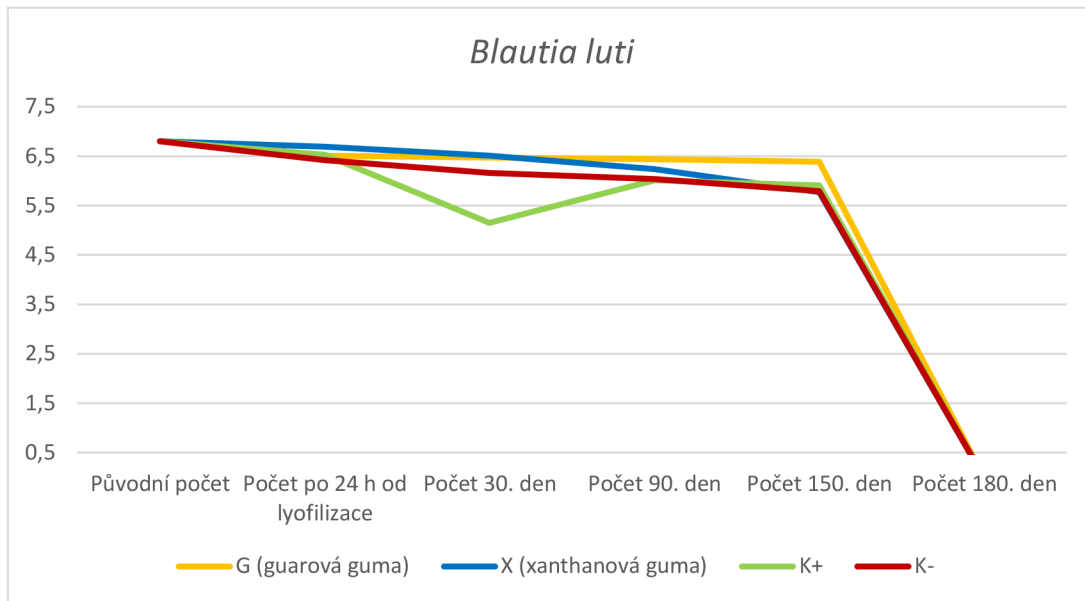
5.2.3 *Ruminococcus gnavus*



Graf č. 9. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Ruminococcus gnavus* v časových odstupech po lyofilizaci

Kmen *R. gnavus* všechny varianty vzorků vykazovaly vitalitu pouze do 30. dne testování. Mezi jednotlivými variantami nebyly významné rozdíly. Ani tady nebyl lyoprotekční efekt znatelný.

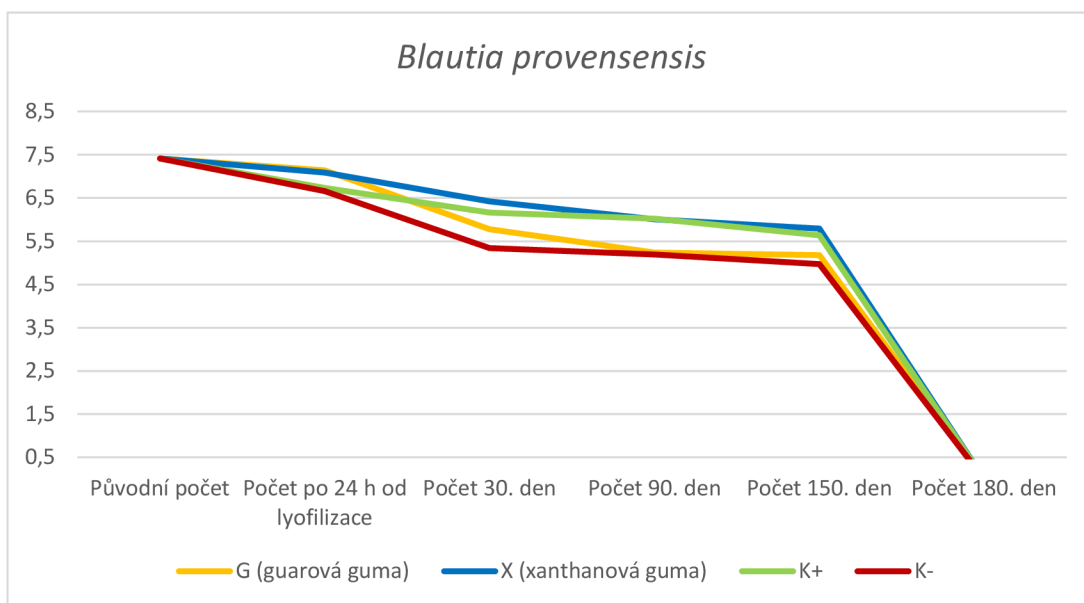
5.2.4 *Blautia luti*



Graf č. 10. Graf logaritmů životaschopných bakterií buněk *Blautia luti* v časových odstupech po lyofilizaci

Blautia luti vykazovala poměrně slibné výsledky. Přestože životaschopnost postupně klesala, prodloužená vitalita je viditelná do 150. dne experimentu. Nicméně je třeba poukázat na fakt, že vitalita u negativní kontroly není příliš odlišná, tudíž je více pravděpodobné, že samotná metoda lyofilizace je zde hlavním faktorem delší životaschopnosti.

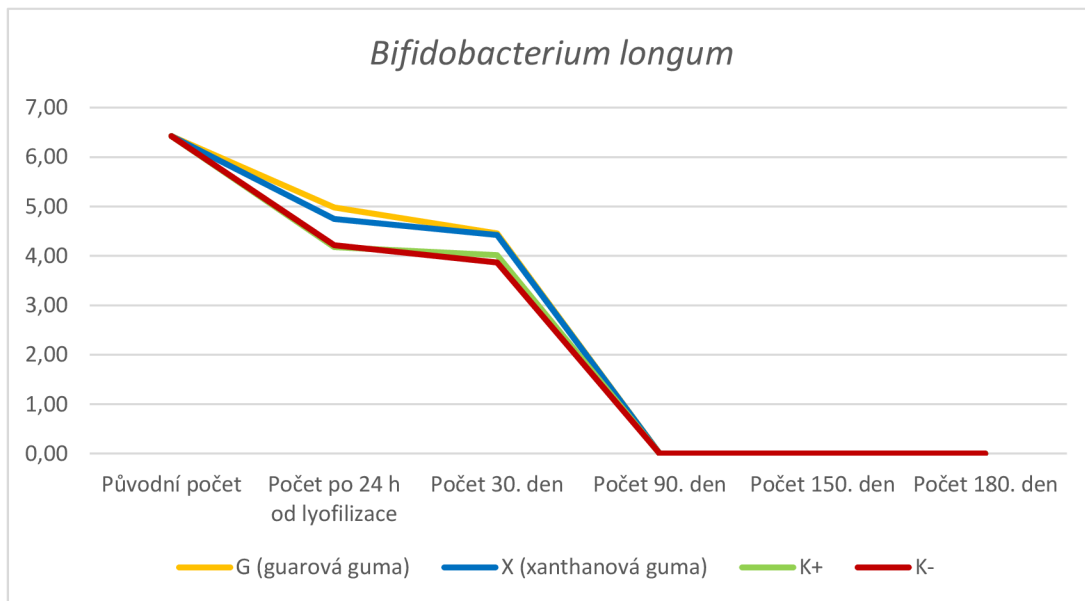
5.2.5 *Blautia provvensensis*



Graf č. 11. Graf logaritmů životaschopných bakterií buněk *Blautia provvensensis* v časových odstupech po lyofilizaci

U *Blautia provvensensis* sice došlo k výraznějším poklesům vitality, přesto počty buněk u xanthanové gummy jsou podobné jako u pozitivní kontroly. Stejně jako u předchozích lyofilizátů, negativní kontrola se příliš neliší od ostatních variant, tudíž nebyl prokázán lyoprotektivní účinek.

5.2.6 *Bifidobacterium longum*



Graf č. 12. Graf logaritmů životaschopných bakterií buněk *Bifidobacterium longum* v časových odstupech po lyofilizaci

V tomto případě, vzhledem k rapidnímu poklesu buněk již po 24 hod od lyofilizace, je velice pravděpodobné, že došlo k narušení anaerobní atmosféry v průběhu přípravy vzorků nebo k poškození během lyofilizace.

5.3 Statistické porovnání zvolených konzervačních technik

V této kapitole následuje statistické vyhodnocení vlivu zvolené konzervační techniky na účinnost potencionálních kryo(lyo)protektantů. V tabulky č. 7 jsou uvedené hodnoty koeficientu r , který udává, míru korelace mezi dvěma veličinami. Jelikož se většina hodnot pohybuje mezi 0,5 a 0,8 (až na výjimky jako *B. bifidum* – G, kde je hodnota velmi nízká nebo naopak negativní kontrola *Bacteroides thetaiotomicron*, kde se hodnota blíží 1) Výsledkem je mírná korelace mezi lyofilizací a mražením.

Tabulka č. 7. Hodnoty korelace

Kmen	Experimentální varianta	Korelace
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	G (guarová guma)	0,222717
	X (xanthanová guma)	0,951039
	K+	0,80173
	K-	0,877737
<i>Bacteroides thetaiotomicron</i> 23K	G (guarová guma)	0,606634
	X (xanthanová guma)	0,690697
	K+	0,849909
	K-	0,999009
<i>Ruminococcus gnavus</i> 2K	G (guarová guma)	0,490552
	X (xanthanová guma)	0,47782
	K+	0,993021
	K-	0,509133
<i>Blautia luti</i> K2	G (guarová guma)	0,715151
	X (xanthanová guma)	0,710054
	K+	0,81006
	K-	0,493549
<i>Blautia provvensensis</i> K4	G (guarová guma)	0,84579
	X (xanthanová guma)	0,638824
	K+	0,643527
	K-	0,818613
<i>Bifidobacterium longum</i> K3	G (guarová guma)	0,624308
	X (xanthanová guma)	0,64014
	K+	0,81533
	K-	0,70334

6 Diskuze

Dlouhodobá konzervace (nejen) probiotických mikroorganismů je důležitá nejen pro skladování probiotických preparátů jako takových, ale také v biomedicínských, biotechnologických odvětvích a výzkumných laboratořích. Efektivní skladování představuje prodloužení životaschopnosti mikroorganismů bez jakékoliv kontaminace a genetického driftu. Zároveň je nesmírně důležité, aby při obnově buněk nedocházelo ke genotypovým a fenotypovým změnám. Za tímto účelem byla popsána řada technik, jak mikroorganismy skladovat při nízké teplotě. Tyto techniky jsou sice osvědčené a hojně se využívají, nicméně nadále je důležité zlepšovat podmínky pro mikroorganismy, aby bylo dosaženo co možná nejvyššího postupu (Tedeschi & De Paoli 2010).

Moderní metody konzervace využívají protektivní látky, díky kterým jsou ztráty vitality buněk snižovány. V průběhu procesu zmrazování kryo(lyo)protektiva redukuje množství krystalků ledu, které mohou buňky nenávratně poškodit a zničit. Lyoprotektiva pak také chrání před prudkými změnami osmotického tlaku, které mohou zapříčinit úplnou dehydrataci buněk. V případě lyofilizace tedy tyto látky chrání buňky nejen při postupném klesání teplot, ale také při sublimační fázi, kde dochází k prudkým změnám osmotického tlaku. Kromě toho se kryo(lyo)protektiva využívají pro svoji schopnost měnit sekundární strukturu proteinů, inaktivovat proteiny a enzymy.

Pro účely této diplomové práce byly testovány potenciální kryo(lyo)protektivní účinky polysacharidů – konkrétně guarové a xanthanové gummy. Vzhledem k tomu, že se jedná o látky běžně využívané v potravinářství, v kombinaci s jejich prebiotickými vlastnostmi by představovaly účinný prostředek aplikace probiotik/synbiotik.

Testovány byly na celkem 6 kmenech, konkrétně 2 bifidobakterií (*B. longum* a *B. bifidum*) a zbylé 4 kmeny jsou v literatuře často nazývány probiotiky nové generace. To jsou takové bakterie, které byly izolovány z trávicího traktu člověka a svým působením specificky ovlivňují konkrétní patologický jev nebo fyziologický stav. Jejich výhoda spočívá v tom, že na rozdíl od běžně používaných probiotik se nezaměřují na podporu zdravé střevní mikrobioty, ale přímo ovlivňují konkrétní fyziologické funkce. V této práci byly využity konkrétně *Bacteroides thetaiotamicron*, *Ruminococcus gnavus* a 2 taxony rodu *Blautia* (*B. luti* a *B. provvensensis*). Účinnost – tedy vliv použitých látek na vitalitu buněk byl sledován po dobu 180. dní. Bohužel s ohledem na výše uvedené výsledky, nebyl prokázán jejich kryoprotektivní účinek. U lyofilizační techniky, sice některé z bakterií vykazovaly vyšší životaschopnost v pokročilé fázi experimentu, nicméně vitalita buněk do konce trvání pokusu se podařila prokázat pouze u *Bifidobacterium bifidum* a *Bacteroides thetaiotamicron*. Co se týká *B. bifidum*, životaschopnost buněk v přítomnosti guarové gummy se téměř nezměnila. Nutno ale podotknout, že u negativní kontroly, také nedošlo k rapidnímu poklesu počtu buněk, tudíž není možné prokázat pozitivní lyoprotektivní účinek guarové gummy, ale dlouhá životaschopnost mohla být zapříčiněna vybranou konzervační metodou jako takovou.

Existuje řada výzkumů, týkajících se nejrůznějších látek a jejich potenciálních protektivních účinků. Avšak v dostupné literatuře nebyl dohledán experiment podobný provedenému v této práci. Ani jeden z námi testovaných polysacharidů doposud

nebyl zkoumán za účelem testování kryoprotektivního účinku. Doposud byly tyto látky zkoumány jako možný prostředek při technice mikroenkapsulace. Jedná se o účinný způsob, jak zvýšit životaschopnost probiotických bakterií. Buňky jsou zabaleny do mikroenkapsulační membrány, která je tvořená různými polysacharidy a slouží jako ochrana před nepříznivými vlivy okolního prostředí. Bylo potvrzeno, že zapouzdřené bakterie mohou přežít lépe než volné buňky během žaludečního tranzitu a drsných podmínek prostředí. Přímo xanthanová guma byla ve výzkumech použita jako potahový materiál těchto kapslí. Konkrétně v kombinaci s alginátem (mikroenkapsulační činidlo) vykazovaly nejvyšší odolnost. Navíc její schopnost udržet mikročástice v suspenzi bez výrazného zvýšení viskozity, tolerance k degradaci enzymy a odolnost vůči kyselinám jsou ideálními vlastnostmi i pro samotné zapouzdření probiotik (Oberoi et al., 2021; Pandey et al., 2016). Tento proces se zdá být velmi účinný, nicméně příprava takto upravených buněk je z technologického i finančního hlediska poměrně náročná.

Xanthan však může dle některých studií interagovat se střevní mikrobiotou tak, že napomáhá trávení polysacharidů. Je také potřeba zmínit, že přestože se jedná o přídatnou látku, její trávení je poměrně jednoduché a závislé na jednom konkrétním rodu. Tím je *Ruminococcus* (Ostrowski et al., 2022). *Ruminococcus gnavus* byl v této práci využit jako jeden z testovaných kmenů. Toto tvrzení by mohlo znamenat, že při smíchání kultury s xanthanem mohlo dojít k určité interakci, která mohla znehodnotit výslednou vitalitu tohoto vzorku.

Wang et al. (2021) zkoumali účinnost makromolekulárních kryoprotektiv a jejich různých kombinací pro udržení bakteriální aktivity. Míra přežití testovaného *Lactiplantibacillus plantarum* AR113 po lyofilizaci byla o 19 % vyšší v přítomnosti sójových polysacharidů nežli u trehalózy, nejlépe účinného mikromolekulárního kryoprotektiva. Kromě toho bylo dosaženo 90,52% míry přežití *L. plantarum* WCFS1 s použitím kombinovaného kryoprotektantu obsahujícího sójový polysacharid a trehalózu. Tyto výsledky ukazují, že makromolekulární a mikromolekulární kryoprotektiva mají podobné působení a že jejich kombinace může mít lepší ochranné účinky. Bircher et al. (2018) testovali kryoprotektivní účinek sacharózy, inulinu v kombinaci s glycerolem. Přidání sacharózy a inulinu zvýšilo životaschopnost a podíl intaktních buněk během lyofilizace všech kmenů. Z těchto důvodů by proto mohlo být vhodné, příští experiment s polysacharidy, které jsme využili zkombinovat s jinými ověřenými kryo(lyo)protektivy.

V následující části budou diskutovány faktory, které mohly ovlivnit či zkreslit naše výsledky.

U lyofilizovaných kultur *Ruminococcus gnavus* a *B. longum* došlo během prvních dní experimentu k poměrně značnému úbytku vitálních buněk. Poškození bakterií způsobené procesem lyofilizace lze připsat dvěma hlavním příčinám: změnám fyzikálních podmínek membránových lipidů, které mají za následek ztrátu integrity bakteriální membrány a inaktivaci citlivých proteinů, což vede ke ztrátě klíčových enzymových aktivit.

Další faktor, který mohl mít za následek zkreslení výsledků je, že některá použitá média byla na místo zmíněné směsi plynů probublána pouze CO₂. Nedostatek směsi N₂, CO₂

a H₂ byl způsobem současnou situací v Evropě. Nicméně tento faktor by neměl být zásadní, jelikož předešlé diplomové práce, které se taktéž zabývaly ověřováním kryoprotektivních účinků, využívaly k zajištění anaerobního prostředí pouze CO₂ a ověřované látky byly úspěšně prohlášeny za kryoprotektivní.

Námi použité BHI médium, které bylo mírně poupraveno, jak je zmíněno v kapitole (4.2) je poměrně univerzální – jeho užití je vhodné ke kultivaci náročných i zcela nenáročných mikroorganismů, včetně aerobních a anaerobních bakterií z mnoha klinických i neklinických materiálů. Otázkou je, zda námi vybrané, poměrně málo prozkoumané kmeny (kromě Bifidobakterií) nevyžadují specifitější podmínky pro růst. Vitalita testovaných mikroorganismů byla monitorována v průběhu času pomocí ředících řad a následné kultivace. Použité médium v hermeticky uzavřených penicilínkách bylo sterilováno v autoklávu. Nicméně v několika případech, z důvodu vyčerpání přístroje, byl použit autokláv novějšího typu. Přestože byla vždy nastavená stejná teplota a čas, po sterilaci v novějším přístroji měla média mírně tmavší barvu, nežli bylo očekáváno. Je dosti možné, že parametry přístroje a odlišná doba poklesu teploty po skončení programu mohla zapříčinit mírnou karamelizaci cukrů v médiu, které pak nebyly využitelné pro mikroorganismy.

Je možné, že po smíchání látek s kulturami byla doba spolupůsobení příliš krátká. V tom případě nemuselo dojít ke kryo(lyo)protektivnímu účinku. Dalším ovlivňujícím faktorem mohla být fáze růstové křivky, v níž se kultury nacházely před vlastním lyofilizačním procesem (Schwab et al., 2007). Stejně jako doba působení, tak fáze růstové křivky nebyly v našem případě monitorovány. Je tedy těžké říci, jak významně mohly tyto faktory účinek ovlivnit.

Průběh lyofilizace může být ovlivněn už v počátku přípravy kultury, kdy je důležitý např. výběr vhodné kultury, typ růstového média, množství a růstová fáze kultur. Podle Tedeschi & De Paoli (2011) bylo prokázáno, že při stacionární fázi kultury je zachována vyšší životaschopnost *B. bifidum* po procesu lyofilizace.

Vzhledem k povaze námi testovaných kultur, bylo nezbytně nutné zajistit anaerobní prostředí, pokud možno ve všech fázích experimentu, tedy od přípravy vzorků po finální kontrolu životaschopnosti. Nicméně zvolená metodika vyžadovala kroky, kdy byla anaerobní atmosféra na krátkou dobu narušena. Při přípravě vzorků na lyofilizační proces byla nezbytná výměna tzv. lyofilizační zátky. Po rychlém zmrazení již smíchaných vzorků se vždy skleněné hermeticky uzavřené lahvičky na okamžik vyjmuly z mrazicího zařízení. Výměna probíhala pouze po nezbytně nutnou dobu, kdy nebylo žádoucí, aby vzorky rozmrzly. Při kontrolních kultivacích se vždy nanese 0,5 ml média s naředěnou kulturou na Petriho misku a neprodleně byl zalit BHI médiem o teplotě max 50 °C. Poté byly vzorky, v co možná nejrychlejší době, vloženy do anaerostatu spolu s vyvíječem anaerobní atmosféry. Přesto je dosti možné, že i takto krátká doba vystavení aerobnímu prostředí bakteriím, které jsou striktně anaerobní, mohla neodvratně buňky poškodit. Před samotnou lyofilizací byly vzorky zmrazeny minimálně po dobu 2 hodin v hlubokomrazícím boxu na - 80 °C.

Lyofilizace je nejšetrnější způsob konzervace řádově až na desítky let, protože si při něm lyofilizované mikroorganismy zachovávají nejvyšší možné množství původních látek,

biochemické vlastnosti a zároveň jsou potlačeny negativní chemické změny včetně oxidace. Ovšem za předpokladu náležitě dodržení procesu lyofilizace.

Na kvalitu procesu může mít vliv i samotný zvolený lyofilizátor. Každý přístroj může mít mírně odlišné uspořádání a teplotu chladících polic, čidel, odlišný sušící výkon apod. Čistota přístroje byla v našem případě zajištěna otřením polic a víka lyofilizátoru ethanolem, a to před každým použitím. Tím se předcházelo případné kontaminaci lyofilizátů, jelikož měly v této fázi zátku, která je pouze částečně nasazena na penicilínku (kvůli sublimačnímu sušení), která byla překrytá vrstvou aluminiové fólie. Pro účely diplomové práce byl použit laboratorní přístroj Freeze Dryer LYO GT2, u kterého je možné nastavit jednotlivé parametry. Zhotovené lyofilizáty byly skladovány po dobu 180 dní v chladničce o teplotě cca 4 °C. Tato teplota je osvědčena, co se týká způsobu skladování lyofilizátů (Bircher et al., 2018; Zhang et al. 2020).

Převážná většina vzorků nevydržela životaschopná do konce experimentu. Tuto mortalitu lze vysvětlit skutečností, že buňky, které byly poškozeny lyofilizací, také podléhají poškození během skladování. To znamená, že postupně dochází k oxidaci lipidů nebo také agregaci proteinů (Bodzen et al., 2021).

Životaschopnost mrazených kultur byla v porovnání s lyofilizací podstatně horší. Některé kmeny, konkrétně *Blautia luti* a *Bifidobacterium longum* nevykazovaly známky vitality již 30. den pokusu. Vzorky obsahující *Ruminococcus gnavus* nebyly vitální již 24 hod po zmrazení. Důvodem je pravděpodobně jejich vysoká citlivost na průběh konzervace jako takové.

Samotné mrazení je velmi často užívaný způsob konzervace, nicméně u něj platí, že čím nižší teplota je použita, tím delší prodloužení životaschopnosti můžeme očekávat. Nejlepší způsobem uchování pomocí zmrazení je využití tekutého dusíku. Jeho cenová náročnost je však rozhodující ukazatel. Jeho využití je sice často možné ve zmiňovaných biomedicínských odvětvích či ve výzkumných laboratořích, nicméně pro běžné každodenní skladování synbiotických preparátů zcela nereálnou možností. A to z toho důvodu, že vyžaduje poměrně značnou investici nejen do samotných mrazících boxů, ale také do vybavení nouzových záložních mrazáků, nouzového záložního napájení a potřebné údržby (Smith et al., 2014). Stejně tak využití mrazících boxů o teplotě – 80°C. Proto byly naše kryokonzervované vzorky skladovány v mrazáku o teplotě – 20 °C. Při testování vitality v časových úsecích pak byly vždy vyjmuty a ponechány při pokojové teplotě rozmraznout. V některých studiích je doporučováno jak zmrazování, tak rozmrazení učinit co možná nejrychleji. Jak již bylo diskutováno, krátká doba spolupůsobení komponent vzorku může ovlivnit výsledky, nicméně studie ukazují, že působení delší nežli 60 minut může na buňky naopak působit toxicky (Tedeschi & De Paoli 2011).

Této metodice předcházelo založení pokusu s vyššími koncentracemi xanthanové a guarové gumy. Původní metodika však nebyla příliš vhodně zvolena, ze dvou hlavních důvodů. První nesrovnalostí bylo množství vzorku ve skleněné lahvičce – pouhý 1 ml. Vzhledem k využitému desítkovému ředění (1 díl vzorku a 9 dílů ředícího roztoku) nebylo možné vždy odebrat přesné množství. V injekční stříkačce se hojně tvořily bubliny, a navíc

viskozita roztoků byla příliš vysoká, a proto bylo obtížné při nabírání vzorku zaručit přesné množství. Samotná koncentrace využitých roztoků mohla být rozhodující pro výsledný efekt.

Domnívám se, že výběr testovaných kmenů mohl mít také značný vliv na konečné výsledky. Konkrétně *Ruminococcus gnavus*, *Bacteroides thetaiotamicron* a do jisté míry i *Blautia provensis* jsou poměrně málo probádané mikroorganismy. Vyskytuje se poměrně malé množství studií, které by využívaly tyto kmeny, natož výzkumy zabývající se kryoprotektivními látkami. U *Bacteroides thetaiotamicron* byla zkoumáno, zda přítomnost potenciálních kryoprotektiv (inulinu a sacharózy v kombinaci s glycerinem) zlepši dobu přežití. Přestože u řady bakterií je výhodné využití kombinace více lyoprotektiv, *B. thetaiotamicron* v tomto případě nejlepší výsledky vykazoval se samotnou sacharózou nežli v kombinaci s glycerolem. (Bircher et al., 2018).

Přestože naše hypotéza nebyla potvrzena, cíl práce pokládám za splněný. V dalším zkoumání účinku xanthanové a guarové gummy by bylo záhodno otestování účinku na stabilnějších kmenech, u kterých je známá odolnější povaha ke konzervačním procesům. Výsledky by také mohly být patrnější v kombinaci s ověřeným lyoprotektivem.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo ověřit, zda námi testované rostlinné a bakteriální polysacharidy mají kryo(lyo)protektivní účinek. Konkrétně byl testován kryo(lyo) potenciál u xanthanové a guarové gumy. Tyto dva polysacharidy se již běžně využívají v potravinářství, a to jako zahušňovadla a stabilizátory. Vzhledem k tomu, že vykazují i prebiotické účinky, jejich využití pro potenciální kryo(lyo)protektivní vlastnosti by mohlo být velmi užitečné při výrobě obzvláště synbiotických preparátů.

Tato hypotéza byla testována na následujících bakteriích: *Bifidobacterium bifidum*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *Ruminococcus gnavus*, *Blautia luti*, *Blautia provensis* a *Bifidobacterium longum*. Testování probíhalo prostřednictvím zjišťování počtu vitálních buněk v různých časových intervalech v průběhu 180 dní, jak v případě kryokonzervace, tak rovněž i u lyofilizace. Tyto výsledky jsme porovnávali s pozitivní (25% glycerol v případě mrazení, 5 % rekonstituované sušené mléko v případě lyofilizace) a negativní kontrolou.

S ohledem na námi získané výsledky byla hypotéza zamítnuta. Rostlinné, resp. bakteriální polysacharidy neměly prokazatelné kryo(lyo)protektivní účinky. Existuje celá řada faktorů, které mohly vést ke zkreslení výsledků. Nejpravděpodobnější je, že testované bakterie byly příliš citlivé k vybrané metodě konzervace, a tak mortalita byla zřejmě způsobena již samotným procesem. Životaschopnost buněk byla obecně horší u zmrazených vzorků nežli u lyofilizovaných. Některé z nich nevykazovaly vitalitu již 30. den experimentu.

Řada výzkumů se zabývá hledáním nových kryo(lyo)protektivních látek. V dostupné literatuře však nebyla dohledána studie s podobnou metodikou. Ani jeden z námi testovaných polysacharidů doposud nebyl zkoumán za účelem testování kryoprotektivního účinku. Doposud byly tyto látky spíše zkoumány jako možný prostředek při technice mikroenkapsulace, ve které mají slibný potenciál.

8 Seznam literatury

- Ahn, J., Lee, S., Kim, B., Nam, M.H., Ahn, Y.K., Park, Y.M., Jeong, S., Park, M.J., Song, K.B., Lee, S., Hong, S., 2022. Ruminococcus gnavus ameliorates atopic dermatitis by enhancing Treg cell and metabolites in BALB/c mice. *Pediatric Allergy and Immunology* 33.. <https://doi.org/10.1111/pai.13678>
- Alessandri, G., Ossiprandi, M. C., MacSharry, J., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2019). Bifidobacterial Dialogue With Its Human Host and Consequent Modulation of the Immune System. *Frontiers in Immunology*, 10. doi:10.3389/fimmu.2019.02348
- Aoun, A., Darwish, F., & Hamod, N. (2020). The Influence of the Gut Microbiome on Obesity in Adults and the Role of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for Weight Loss. *Preventive Nutrition and Food Science*, 25(2), 113–123. doi:10.3746/pnf.2020.25.2.113
- Aponte, M., Murru, N., Shoukat, M., 2020. Therapeutic, Prophylactic, and Functional Use of Probiotics: A Current Perspective. *Frontiers in Microbiology* 11.. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562048>
- Arboleya S, Watkins C, Stanton C, Ross RP., 2016. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Front Microbiol.* Aug 19;7:1204. doi: 10.3389/fmicb.2016.01204. PMID: 27594848; PMCID: PMC4990546.
- Belorkar, S.A., Gupta, A.K., 2016. Oligosaccharides: a boon from nature's desk. *AMB Express* 6.. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0253-5>
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., ... Ouwehand, A. C. (2020). *Criteria to Qualify Microorganisms as "Probiotic" in Foods and Dietary Supplements. Frontiers in Microbiology*, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.01662
- Bircher, L., Geirnaert, A., Hammes, F., Lacroix, C., & Schwab, C. (2018). Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes. *Microbial Biotechnology*, 11(4), 721–733. doi:10.1111/1751-7915.13265
- Bodzen, A., Jossier, A., Dupont, S., Mousset, P.-Y., Beney, L., Lafay, S., Gervais, P., 2021. Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried Lactobacillus strain survival to long-term storage. *BMC Biotechnology* 21.. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00726-2>
- Bouhnik, Y., Attar, A., Joly, F.A., Riottot, M., Dyard, F., Flourié, B., 2004. Lactulose ingestion increases faecal bifidobacterial counts: A randomised double-blind study in healthy humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 58, 462–466. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601829>
- Carasi, P., Racedo, S. M., Jacquot, C., Elie, A. M., Serradell, M. de los Á., & Urdaci, M. C., 2017. Enterococcus durans EP1 a Promising Anti-inflammatory Probiotic Able to Stimulate sIgA and to Increase Faecalibacterium prausnitzii Abundance. *Frontiers in Immunology*, 8, 88. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00088>
- Carlson, J., Erickson, J., Hess, J., Gould, T., Slavin, J., 2017. Prebiotic Dietary Fiber and Gut Health: Comparing the in Vitro Fermentations of Beta-Glucan, Inulin and Xylooligosaccharide. *Nutrients* 9, 1361. <https://doi.org/10.3390/nu9121361>
- Ciecierska A, Drywień ME, Hamulka J, Sadkowski T.. 2019. Nutraceutical functions of beta-glucans in human nutrition. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 70(4):315-324. doi: 10.32394/rpzh.2019.0082. PMID: 31960663.

Cuevas-González, P. F., Liceaga, A. M., & Aguilar-Toalá, J. E. (2020). Postbiotics and Paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International*, 109502. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109502

Čurda Ladislav, Monika Kumherová, Jiří Štětina, 2020. Enzymová syntéza galaktooligosacharidů z laktosy. Ústav mléka, tuků a kosmetiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Mlékařské listy, 183. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2020/veda_183_4.pdf

Da Silva Guedes, J., Pimentel, T. C., Diniz-Silva, H. T., Tayse da Cruz Almeida, E., Tavares, J. F., Leite de Souza, E., Magnani, M. 2019. Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. *LWT*, 108496. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108496

Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S., Berenjian, A., Ghasemi, Y., 2019. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* 8, 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>

D'Silva, Icy., 2011. Recombinant Technology and Probiotics. *International Journal of Engineering and Technology*. 2011, **2011**(3), 288-293. ISSN 0975-4024.

Fanedl L, Nekrep FV, Avguš tin G. 1998. Random amplified polymorphic DNA analysis and demonstration of genetic variability among bifidobacteria isolated from rats fed with raw kidney beans. *Canadian Journal of Microbiology* 44:1094-1101.

Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., Ouwehand, A., 2019. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms* 7, 83.. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030083>

Fijan, S., 2014. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11, 4745–4767.. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>

Forster RJ, Teather RM, Gong J, Deng SJ., 1996. 16S rDNA analysis of *Butyrivibrio fibrisolvens*: phylogenetic position and relation to butyrate-producing anaerobic bacteria from the rumen of white-tailed deer. *Lett Appl Microbiol*. Oct;23(4):218-22. doi: 10.1111/j.1472-765x.1996.tb00069.x. PMID: 8987694.

Fu, X., Liu, Z., Zhu, C., Mou, H., Kong, Q., 2019. Nondigestible carbohydrates, butyrate, and butyrate-producing bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59, S130–S152.. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1542587>

Gaucher, F., Bonnassie, S., Rabah, H., Leverrier, P., Pottier, S., Jardin, J., Briard-Bion, V., Marchand, P., Jeantet, R., Blanc, P., Jan, G., 2019. Benefits and drawbacks of osmotic adjustment in *Propionibacterium freudenreichii*. *Journal of Proteomics* 204, 103400. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103400>

Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, Agudelo Higuera NI, Huycke MM. 2014. "Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment". In Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y (eds.). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary. PMID 24649504

Gomaa, E.Z., 2020. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* 113, 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>

- Govender, M., Choonara, Y.E., Kumar, P., Du Toit, L.C., Van Vuuren, S., Pillay, V., 2014.** A Review of the Advancements in Probiotic Delivery: Conventional vs. Non-conventional Formulations for Intestinal Flora Supplementation. *AAPS PharmSciTech* 15, 29–43. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0027-1>
- Gupta, V., & Garg, R., 2009.** Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3), 202. doi:10.4103/0255-0857.53201
- Hiippala K, Jouhten H, Ronkainen A, Hartikainen A, Kainulainen V, Jalanka J, Satokari R. 2018.** The potential of gut commensals in reinforcing intestinal barrier function and alleviating inflammation. *Nutrients* 10 (8):988.
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., Ross, P. 2018.** The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Front Microbiol*, 10 (9). DOI: 10.3389/fmicb.2018.02107.
- Huang, S., Vignolles, M.-L., Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R., 2017.** Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 1–17. doi: 10.1016/j.tifs.2017.02.007
- Iaconelli C, Lemetais G, Kechaou N, Chain F, Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Gervais P, Beney L., 2015.** Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *J Biotechnol*. Nov 20; 214:17-26.. Epub 2015 Aug 29. PMID: 26325197. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.08.022
- Jalanka, J., Major, G., Murray, K., Singh, G., Nowak, A., Kurtz, C., Silos-Santiago, I., Johnston, J., De Vos, W., Spiller, R., 2019.** The Effect of Psyllium Husk on Intestinal Microbiota in Constipated Patients and Healthy Controls. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 433. <https://doi.org/10.3390/ijms20020433>
- Kaur, N., Gupta, A.K., 2002.** Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences* 27, 703–714. <https://doi.org/10.1007/bf02708379>
- Kawasaki, H., Shimanouchi, T., Kimura, Y., 2019.** Recent Development of Optimization of Lyophilization Process. *Journal of Chemistry* 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/9502856>
- Killer J, Mekadim C, Pechar R, Bunešová V, Mrázek J, Vlková E. 2018b.** Gene encoding the CTP synthetase as an appropriate molecular tool for identification and phylogenetic study of the family Bifidobacteriaceae. *MicrobiologyOpen* 7:e00579.
- Killer J, Mekadim C, Pechar R, Bunešová V, Vlková E. 2018a.** The threonine-tRNA ligase gene region is applicable in classification, typing, and phylogenetic analysis of bifidobacteria. *Journal of Microbiology* 56:713-721.
- Liu, X., Mao, B., Gu, J., Wu, J., Cui, S., Wang, G., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., 2021.** *Blautia*—a new functional genus with potential probiotic properties?. *Gut Microbes* 13, 1875796. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796>
- Marcantonini, G., Bartolini, D., Zatini, L., Costa, S., Passerini, M., Rende, M., Luca, G., Basta, G., Murdolo, G., Calafiore, R., Galli, F., 2022.** Natural Cryoprotective and Cytoprotective Agents in Cryopreservation: A Focus on Melatonin. *Molecules* 27, 3254.. <https://doi.org/10.3390/molecules27103254>
- Marcial-Coba, M. S., Cieplak, T., Cahu, T. B., Blennow, A., Knochel, S., & Nielsen, D. S. S., 2018.** Viability of microencapsulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, storage and in vitro simulated upper gastrointestinal tract passage. *Food & Function*. doi:10.1039/c8fo01331d

- Marttinen, M., Ala-Jaakkola, R., Laitila, A., Lehtinen, M.J., 2020.** Gut Microbiota, Probiotics and Physical Performance in Athletes and Physically Active Individuals. *Nutrients* 12, 2936. <https://doi.org/10.3390/nu12102936>
- Mattarelli P, Biavati B. 2018.** Species in the genus *Bifidobacterium*. Pages 9-48. *The Bifidobacteria and Related Organisms*. Elsevier.
- McFarland LV, 2015.** From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clin Infect Dis*. 2015 May 15;60 Suppl 2:S85-90. doi: 10.1093/cid/civ054. PMID: 25922406.
- Míguez, B., Gómez, B., Gullón, P., Gullón, B., Alonso, J. L. 2016.** Pectic Oligosaccharides and Other Emerging Prebiotics. In *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. InTech. <https://doi.org/10.5772/62830>
- Miyamoto-Shinohara, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T., Nakahara, T., 2008.** Survival of freeze-dried bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology* 54, 9–24. <https://doi.org/10.2323/jgam.54.9>
- Modesto M, Biavati B, Mattarelli P. 2006.** Occurrence of the Family Bifidobacteriaceae in Human Dental Caries and Plaque. *Caries Research* 40:271-276.
- Mohajeri, M.H., Brummer, R.J.M., Rastall, R.A., Weersma, R.K., Harmsen, H.J.M., Faas, M., Eggersdorfer, M., 2018.** The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *European Journal of Nutrition* 57, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1703-4>
- Mudgil, D., Barak, S., Khatkar, B.S., 2014.** Guar gum: processing, properties and food applications—A Review. *Journal of Food Science and Technology* 51, 409–418. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0522-x>
- Musilova, S., Rada, V., Vlkova, E., Bunesova, V. 2014.** Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. *Beneficial microbes*. 5 (3). 273-283.
- Newman, A.M., Arshad, M., 2020.** The Role of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in Combating Multidrug-Resistant Organisms. *Clinical Therapeutics* 42, 1637–1648. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.06.011>
- O’Callaghan, A., & van Sinderen, D., 2016.** Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00925
- Oberoi, K., Tolun, A., Altintas, Z., Sharma, S., 2021.** Effect of Alginate-Microencapsulated Hydrogels on the Survival of *Lactobacillus rhamnosus* under Simulated Gastrointestinal Conditions. *Foods* 10, 1999. <https://doi.org/10.3390/foods10091999>
- Ohashi, Y., Sumitani, K., Tokunaga, M., Ishihara, N., Okubo, T., & Fujisawa, T., 2015.** Consumption of partially hydrolysed guar gum stimulates Bifidobacteria and butyrate-producing bacteria in the human large intestine. *Beneficial Microbes*, 6(4), 451–455. doi:10.3920/bm2014.0118
- Oleskin, A.V., Shenderov, B.A., 2019.** Probiotics and Psychobiotics: the Role of Microbial Neurochemicals. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 11, 1071–1085. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09583-0>

- Ostrowski, M.P., La Rosa, S.L., Kunath, B.J., Robertson, A., Pereira, G., Hagen, L.H., Varghese, N.J., Qiu, L., Yao, T., Flint, G., Li, J., McDonald, S.P., Buttner, D., Pudlo, N.A., Schnizlein, M.K., Young, V.B., Brumer, H., Schmidt, T.M., Terrapon, N., Lombard, V., Henrissat, B., Hamaker, B., Eloie-Fadrosh, E.A., Tripathi, A., Pope, P.B., Martens, E.C., 2022.** Mechanistic insights into consumption of the food additive xanthan gum by the human gut microbiota. *Nature Microbiology* 7, 556–569. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01093-0>
- Pandey, K.R., Naik, S.R., Vakil, B.V., 2015.** Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology* 52, 7577–7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
- Parker, E.A., Roy, T., D'Adamo, C.R., Wieland, L.S., 2018.** Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. *Nutrition* 45, 125–134.e11.. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.06.024>
- Parte, A.C., 2018.** LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68, 1825–1829.. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002786>
- Pegg D.E., 2007.** Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2007; 368:39-57PMID: 18080461. doi:10.1007/978-1-59745-362-2_3
- Peiren, J., Hellemans, A., De Vos, P., 2016.** Impact of the freeze-drying process on product appearance, residual moisture content, viability, and batch uniformity of freeze-dried bacterial cultures safeguarded at culture collections. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 6239–6249.. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7359-1>
- Pieniz, S., Andreazza, R., Anghinoni, T., Camargo, F., & Brandelli, A. 2014.** Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 37, 251–256. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.09.055
- Rada V., 2010.** Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní medicína pro praxi.* 12(2)
- Ruan, W., Engevik, M.A., Spinler, J.K., Versalovic, J., 2020.** Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. *Digestive Diseases and Sciences* 65, 695–705. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06118-4>
- Saeed, F., Afzaal, M., Ahmad, A., Aamir, M., Aziz, M., Aslam, S., Ateeq, H., Hussain, M., 2022.** Enhanced viability of microencapsulated lyophilized probiotics under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Processing and Preservation* 46. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16543>
- Salminen S, Kneifel W, Ouwehand AC., 2016.** Probiotics: Application of probiotics in dairy products: Established and potential benefits. *Reference Module in Food Science.*
- Salminen, S., Isolauri, E., & Salminen, E., 1996.** Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 347–358. doi:10.1007/bf00395941
- Sanders, M. E., 2003.** Probiotics: Considerations for Human Health. *Nutrition Reviews*, 61(3), 91–99. doi: 10.1301/nr.2003.marr.91-99
- Saraf, V.S., Sheikh, S.A., Ahmad, A., Gillevet, P.M., Bokhari, H., Javed, S., 2021.** Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. *Archives of Microbiology* 203, 3793–3802.. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02414-3>

Sarowska J, Choroszy-Król I, Regulska-Iłow B, Frej-Mądrzak M, Jama-Kmiecik A., 2013. The therapeutic effect of probiotic bacteria on gastrointestinal diseases. *Adv Clin Exp Med*. Sep-Oct;22(5):759-66. PMID: 24285463.

Satokari R. 2019. Modulation of gut microbiota for health by current and next-generation probiotics. *Nutrients* 11 (8):1921

Sbírka zákonů České republiky. 1997. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. Česká republika.

Sbírka zákonů České republiky. 2018. Vyhláška č. 58/2018 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin. *Sbírka zákonů České republiky*. Česká republika.

Schwab, C., Vogel, R., & Gänzle, M. G., 2007. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology*, 55(2), 108–114. doi: 10.1016/j.cryobiol.2007.06.004

Singh, R.K., Chang, H.-W., Yan, D., Lee, K.M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T.H., Bhutani, T., Liao, W., 2017. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine* 15. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>

Sitanggang, A. B., Drews, A., & Kraume, M., 2016. Recent advances on prebiotic lactulose production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(9). doi:10.1007/s11274-016-2103-7

Smith, M.T., Berkheimer, S.D., Werner, C.J., Bundy, B.C., 2014. Lyophilized *Escherichia coli*-based cell-free systems for robust, high-density, long-term storage. *BioTechniques* 56, 186–193. <https://doi.org/10.2144/000114158>

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

Sworn, G., 2009. Xanthan gum. *Handbook of Hydrocolloids*, 186–203. doi:10.1533/9781845695873.186

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

Tedeschi, R., & De Paoli, P., 2010. Collection and Preservation of Frozen Microorganisms. *Methods in Biobanking*, 313–326. doi:10.1007/978-1-59745-423-0_18

Tekin, T., Dincer, E., 2023. Effect of resistant starch types as a prebiotic. *Applied Microbiology and Biotechnology* 107, 491–515. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12325-y>

Thomas, L.V., 2016. Probiotics – the journey continues. *International Journal of Dairy Technology* 69, 469–480. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12354>

Thompson, R. S., Roller, R., Mika, A., Greenwood, B. N., Knight, R., Chichlowski, M., Fleshner, M. 2017. Dietary Prebiotics and Bioactive Milk Fractions Improve NREM Sleep, Enhance REM Sleep Rebound and Attenuate the Stress-Induced Decrease in Diurnal Temperature and Gut Microbial Alpha Diversity. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10. doi:10.3389/fnbeh.2016.00240

Ventura M, Van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:205-223.

- Vinderola, G., Sanders, M.E., Salminen, S., 2022.** The Concept of Postbiotics. *Foods* 11, 1077.. <https://doi.org/10.3390/foods11081077>
- Vlasova, A.N., Kandasamy, S., Chattha, K.S., Rajashekara, G., Saif, L.J., 2016.** Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 172, 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.01.003>
- Vytlačilová Lucie, 2022.** Ověření deklarovaných počtů bakterií v probiotických preparátech určených pro lidskou výživu. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze
- Wang, C., Zhao, J., Zhang, H., Lee, Y.-K., Zhai, Q., Chen, W., 2021.** Roles of intestinal bacteroides in human health and diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61, 3518–3536. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1802695>
- Wei, X., Fu, X., Xiao, M., Liu, Z., Zhang, L., & Mou, H., 2020.** Dietary galactosyl and mannosyl carbohydrates: In-vitro assessment of prebiotic effects. *Food Chemistry*, 127179. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127179
- Yadav, M.K., Kumari, I., Singh, B., Sharma, K.K., Tiwari, S.K., 2022.** Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 106, 505–521.. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11646-8>
- Yasukawa, Z., Inoue, R., Ozeki, M., Okubo, T., Takagi, T., Honda, A., Naito, Y., 2019.** Effect of Repeated Consumption of Partially Hydrolyzed Guar Gum on Fecal Characteristics and Gut Microbiota: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, and Parallel-Group Clinical Trial. *Nutrients* 11, 2170. <https://doi.org/10.3390/nu11092170>
- Yerlikaya, O., Akbulut, N., 2019.** Potential use of probiotic *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains in Izmir Tulum cheese as adjunct culture. *Journal of Food Science and Technology* 56, 2175–2185. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03699-5>
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J., 2017.** Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol.* May;67(5):1613-1617. doi: 10.1099/ijsem.0.001755. Epub 2017 May 30. PMID: 28005526; PMCID: PMC556354
- Zawistowska-Rojek, A., Tyski, S., 2018.** Are Probiotic Really Safe for Humans?. *Polish Journal of Microbiology* 67, 251–258. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-044>
- Zhang, H., Cai, L., Zhang, F., Ge, C., & Yang, F. 2020.** Vacuum lyophilization preservation and rejuvenation performance of anammox bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.10.007
- Zhang, H., Duan, Y., Cai, F., Cao, D., Wang, L., Qiao, Z., Hong, Q., Li, N., Zheng, Y., Su, M., Liu, Z., Zhu, B., 2022.** Next-Generation Probiotics: Microflora Intervention to Human Diseases. *BioMed Research International* 2022, 1–12.. <https://doi.org/10.1155/2022/5633403>
- Zhang, M.M., Cheng, J.Q., Lu, Y.R., Yi, Z.H., Yang, P. & Wu, X.T., 2010.** Use of pre-, pro – and synbiotics in patients with acute pankreatitis: a meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 3970-3978

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S., 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70, 2782–2858.. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

9 Zdroje obrázků

Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., ... Ouwehand, A. C. (2020). *Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements.* *Frontiers in Microbiology*, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.01662

Govender, M., Choonara, Y.E., Kumar, P., Du Toit, L.C., Van Vuuren, S., Pillay, V., 2014. A Review of the Advancements in Probiotic Delivery: Conventional vs. Non-conventional Formulations for Intestinal Flora Supplementation. *AAPS PharmSciTech* 15, 29–43. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0027-1>

Gupta, V., & Garg, R., 2009. Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3), 202. doi:10.4103/0255-0857.53201

Kaur, A.P., Bhardwaj, S., Dhanjal, D.S., Nepovimova, E., Cruz-Martins, N., Kuča, K., Chopra, C., Singh, R., Kumar, H., Šen, F., Kumar, V., Verma, R., Kumar, D., 2021. Plant Prebiotics and Their Role in the Amelioration of Diseases. *Biomolecules* 11, 440.. <https://doi.org/10.3390/biom11030440>

Kawasaki, H., Shimanouchi, T., Kimura, Y., 2019. Recent Development of Optimization of Lyophilization Process. *Journal of Chemistry* 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/9502856>

Králová Magda, Techmania Science Center. Under Creative Commons) <http://edu.techmania.cz/cs/veda-v-pozadi/596>

Munin, A., Edwards-Lévy, F., 2011. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* 3, 793–829.. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793>

Mudgil, D., Barak, S., Khatkar, B.S., 2014. Guar gum: processing, properties and food applications—A Review. *Journal of Food Science and Technology* 51, 409–418. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0522-x>

Ruan, W., Engevik, M.A., Spinler, J.K., Versalovic, J., 2020. Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. *Digestive Diseases and Sciences* 65, 695–705. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06118-4>

10 Seznam tabulek, obrázků a grafů

Seznam tabulek

- Tabulka č. 1.** Přehled probiotických preparátů (str. 24)
Tabulka č. 2. Použité kmeny se sbírkovými čísly použity pro účely diplomové práce (str. 41)
Tabulka č. 3. Složení BHI média (str. 42)
Tabulka č. 4 Seznam vzorků při zakládání pokusu (str. 44)
Tabulka č. 5. Počty vitálních buněk (\pm – směrodatná odchylka) u zmrazených kultur v daných časových intervalech (str. 46)
Tabulka č. 6. Počty vitálních buněk (\pm – směrodatná odchylka) u lyofilizovaných kultur v daných časových intervalech (str. 56)
Tabulka č. 7. Hodnoty korelace (str. 60)

Seznam obrázků

- Obrázek č. 1.** Schématické znázornění zdrojů a funkcí prebiotik (str. 11)
Obrázek č. 2. Chemická struktura guarové gumy (str. 15)
Obrázek č. 3. Chemická struktura xanthanové gumy (str. 16)
Obrázek č.4. Rozhodovací strom k určení, zda kandidátní probiotikum splňuje kritéria (str. 20)
Obrázek. č. 5. Zastoupení mikroorganismů v GIT člověka (str. 30)
Obrázek č.6. Schéma sprejového sušení (str. 35)
Obrázek č. 7.Fázový diagram vody (str. 36)
Obrázek č. 8. Schéma lyofilizace (str. 37)

Seznam grafů

- Graf č. 1.** Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Bifidobacterium bifidum* v časových odstupech po kryokonzervaci (str. 47)
Graf č. 2. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Bacteroides thetaiotaomicron* v časových odstupech po kryokonzervaci (str. 48)
Graf č. 3. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Ruminococcus gnavus* v časových odstupech po kryokonzervaci (str. 49)
Graf č. 4. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Blautia luti* v časových odstupech po kryokonzervaci (str. 50)
Graf č. 5. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Blautia proviensensis* v časových odstupech po kryokonzervaci (str. 51)
Graf č. 6. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Bifidobacterium longum* v časových odstupech po kryokonzervaci (str. 52)
Graf č. 7. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Bifidobacterium bifidum* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 53)
Graf č. 8. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Bacteroides thetaiotaomicron* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 55)
Graf č. 9. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Ruminococcus gnavus* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 56)
Graf č. 10. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Blautia luti* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 57)
Graf č. 11. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Blautia proviensensis* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 58)
Graf č. 12. Graf logaritmu životaschopných bakterií buněk *Bifidobacterium longum* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 59)

11 Seznam použitých zkratk a symbolů

16S rRNA – ribozomální rRNA malé podjednotky ribozomu

a_w – aktivita vody

DDD – doporučená denní dávka

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations; Organizace pro výživu a zemědělství

FOS – fruktooligosacharidy

GIT – gastrointestinální trakt

GOS – galaktooligosacharidy

HMO – human milk oligosaccharides; oligosacharidy mateřského mléka

IBD – inflammatory bowel disease; idiopatické střevní záněty

In vitro - „ve zkumavce“ – termín pro pokusy prováděné mimo tělo

In vivo – „v živém“ – termín pro pokusy prováděné v živém organismu

ISAPP – International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics; Mezinárodní vědecká asociace probiotik

KTJ – kolonie tvořící jednotku

LTVD – low temperature vacuum drying; nízkoteplotní vakuové sušení

PHGG – partially hydrolysed guar gum; částečně hydrolyzovaná guarová guma

RAPD – random amplified polymorphic DNA; náhodná amplifikace polymorfní DNA

RNA – ribonukleová kyselina

SCFA – short chain fatty acids; mastné kyseliny s krátkým řetězcem

T_g' - teplota skelného přechodu

WGS – whole genome sequencing; sekvenování celého genomu

WHO – World Health Organization; Světová zdravotnická organizace

XOS – Xylooligosacharidy