

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Enterální výživa jako růstové médium pro střevní bakterie**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Monika Štemberková**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Enterální výživa jako růstové médium pro střevní bakterie" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala panu prof. Ing. Vojtěchu Radovi, CSc. za odborné vedení diplomové práce, vstřícnost, ochotu, užitečné rady i materiály k vypracování této práce. Dále děkuji zaměstnancům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za pomoc a poskytnutý materiál během pracování na praktické části.

# Enterální výživa jako růstové médium pro střevní bakterie

## Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo testovat růst střevních bakterií v enterální výživě a enterální výživě s lysozymem. Hypotézou bylo, že enterální výživy budou působit jako prebiotika tzn. podporovat růst probiotických bakterií, zatímco potenciálně patogenní mikroorganismy budou potlačeny. Enterální výživa s lysozymem bude inhibovat růst klostridií.

Střevní mikrobiota je složitý ekosystém, který je důležitý v homeostáze gastrointestinálního traktu. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při konzumaci v dostatečném množství, mají prospěšný účinek na zdraví hostitele. Prebiotika jsou nestrávitelné složky potravin, které pozitivně ovlivňují zdraví člověka, podporují růst probiotických mikroorganismů. Enterální výživa je používána pro navození remise u léčby Crohnovy choroby. Crohnova choroba je chronické zánětlivé onemocnění střev. Lysozym je antimikrobiální enzym, hydrolyticky štěpí  $\beta$ -(1,4) glykosidickou vazbu N-acetylmuramové kyseliny a N-acetylglukosaminu v buněčné stěně bakterií.

Testování růstu střevních bakterií bylo prováděno v mikrotitrační destičce. Do 90  $\mu$ l enterální výživy, enterální výživy s lysozymem nebo W-Ch bujónu bylo napipetováno 10  $\mu$ l naředěných bakterií. Mikrotitrační destička byla kultivována anaerobně po dobu 24 hodin, při teplotě 37 °C. Po 24 hodinách byly bakterie naočkovány do Petriho misek s Wilkins-Chalgren agarem se sójovým peptonem. Misky byly kultivovány po dobu 48 hodin za anaerobních podmínek. *Escherichia coli* byla očkovaná do Petriho misek na agar a kultivována po dobu 24 hodin při 37 °C. Narostlé kolonie byly přepočítány na log KTJ/g a hodnoty byly statisticky vyhodnoceny.

V nejnižších počtech roste v enterálních výživách s lysozymem i bez lysozymu *B. animalis* subsp. *lactis* (DAN a BB12). V enterálních výživách nejlépe rostly bakterie rodu *Escherichia*. V enterálních výživách s lysozymem nejlépe rostly bakterie rodu *Lactobacillus*. Ve Wilkins-Chalgren bujónu nejlépe rostly bakterie rodu *Escherichia*. Přídavek lysozymu (100 mg/l) neinhibuje růstu bakterií. Na závěr lze konstatovat, že enterální výživy nevykazovaly prebiotický účinek.

**Klíčová slova:** enterální výživa, lysozym, střevní bakterie, bifidobakterie, klostridie

# Enteral feeding as a growth medium for intestinal bacteria

## Summary

The aim of master's thesis was to test the growth of intestinal bacteria in enteral feeding and enteral feeding with lysosyme. The hypothesis was that enteral feeding will act as a prebiotics, supporting the growth of probiotics bacteria while potentially pathogenic microorganisms will be suppressed. Enteral feeding with lysosyme will inhibit the growth of clostridia.

Intestinal microbiota is complex ecosystem that is important in the homeostasis of the gastrointestinal tract. Probiotics are live microorganisms which they have beneficial effect on the host health. Prebiotics are indigestible components of foods that positively affect on human health. Prebiotics selectively stimulate the growth probiotic microorganisms. Enteral feeding is indicated for the inducing remission of patients with Crohn's disease. Crohn's disease is chronic inflammatory bowel disease. Lysosyme is an antimicrobial enzyme that hydrolyses the  $\beta$ -(1,4) linkage between N-acetylmuramic acid and N-acetylglukosamine in bacterial cell wall.

The growth of intestinal bacteria was tested in the microtitre plates. Enteral feeding, enteral feeding with lysozyme, Wilkins-Chalgren broth (90  $\mu$ l) was inoculated with 10  $\mu$ l suspension of bacteria. The microtitre plate was incubated in anaerobic condition at 37 °C for 24 hours. After 24 hours bacteria were inoculated to the Petri dishes containing Wilkins-Chalgren agar with soya peptone. Petri dishes were cultivated anaerobically at 37 °C for 48 hours. *Escherichia coli* was cultivated aerobically at 37 °C for 24 hours. Number of bacteria was expressed in log CFU/g and was statistically analysed.

The strains of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (DAN and BB12) had the lowest growth in enteral feeding with and without lysosyme. The strains of *Escherichia coli* had the highest growth in enteral feeding. Lactobacilli had the highest growth in enteral feeding with lysosyme. *E. coli* had the highest growth in Wilkins-Chalgren broth. The lysosyme (100 mg/l) doesn't inhibit the growth of bacteria. It could be concluded that enteral feedings seems not to be prebiotics.

**Keywords:** enteral feeding, lysosyme, intestinal bacteria, bifidobacteria, clostridia

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2 CÍL A HYPOTÉZA</b> .....	<b>2</b>
<b>3 LITERÁRNÍ REŠERŠE</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1 Střevní mikrobiota</b> .....	<b>3</b>
3.1.1 Definice a funkce .....	3
3.1.2 Historie.....	3
3.1.3 Vývoj mikrobioty.....	4
3.1.4 Rod <i>Clostridium</i> .....	5
<b>3.2 Probiotika</b> .....	<b>6</b>
3.2.1 Definice a funkce .....	6
3.2.2 Historie.....	7
3.2.3 Probiotické bakterie .....	7
3.2.4 Formy.....	11
<b>3.3 Prebiotika</b> .....	<b>12</b>
3.3.1 Definice.....	12
3.3.2 Požadavky na prebiotika a jejich účinky .....	12
3.3.3 Prebiotické sacharidy .....	13
3.3.4 Mateřské mléko a kojenecká výživa .....	15
<b>3.4 Enterální výživa</b> .....	<b>17</b>
3.4.1 Obecně .....	17
3.4.2 Typy enterálních výživ .....	18
3.4.3 Příklady přípravků EV .....	19
3.4.4 Použití enterální výživy .....	21
3.4.5 Crohnova choroba.....	22
3.4.6 Crohnova choroba a enterální výživa .....	23
<b>3.5 Antimikrobiální látky</b> .....	<b>24</b>
3.5.1 Obecně .....	24
3.5.2 Lysozym.....	24
3.5.3 Látky kravského mléka .....	25
3.5.3.1 Laktoferin .....	26

3.5.3.2	Laktoperoxidasa-thiokyanát-hydrogen peroxidový systém .....	26
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>28</b>
4.1	Použité kultury .....	28
4.2	Použité enterální výživy .....	29
4.3	Použitá media .....	29
4.4	Testování růstu střevních bakterií v enterální výživě.....	31
4.5	Stanovení koncentrace lysozymu difuzní metodou .....	34
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>35</b>
5.1	Růst bakterií v enterálních výživách .....	35
5.2	Růst bakterií v enterálních výživách s lysozymem.....	37
5.3	Růst bakterií ve Wilkins-Chalgren bujónu se sójovým peptonem .....	38
5.4	Růst rodu <i>Bifidobacterium</i> .....	39
5.4.1	Porovnání růstu bifidobakterií .....	40
5.5	Růst rodu <i>Clostridium</i> .....	41
5.5.1	Porovnání růstu klostridií.....	41
5.6	Růst rodu <i>Lactobacillus</i> .....	42
5.6.1	Porovnání růstu laktobacilů .....	43
5.7	Růst rodu <i>Escherichia</i> .....	44
5.7.1	Porovnání růstu <i>E. coli</i> .....	44
5.8	Porovnání různých bakterií .....	45
5.9	Růst <i>E. coli</i> v enterálních výživách s lysozymem a tweenem 80 .....	46
5.10	Růst kombinace bifidobakterií a <i>E. coli</i> v EV s lysozymem.....	47
5.11	Stanovení lysozymu difuzní metodou .....	47
<b>6</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>ZDROJE .....</b>	<b>54</b>

# 1 ÚVOD

Střevní mikrobiota člověka je složitý ekosystém, který je klíčovým prvkem v homeostáze gastrointestinálního traktu. Přirozená mikrobiota je významná pro fyziologický, anatomický a imunitní vývoj hostitele. Stimuluje imunitní systém a tím brání před kolonizací potenciálně patogenními mikroorganismy. Vývoj střevní mikrobioty ovlivňuje délka těhotenství, vlastní průběh porodu, výživa novorozence (kojení, umělá výživa), vnější prostředí a léky (antibiotika).

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při konzumaci v dostatečném množství, mají prospěšný účinek na zdraví hostitele. Hlavním úkolem probiotik je udržení normální (zdravé) střevní mikrobioty, ochrana proti infekcím, stimulace imunitního systému. Mezi probiotické rody patří *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*. Dále se využívá rod *Bifidobacterium*, nepatogenní *Escherichia coli*, *Bacillus* sp. nebo kvasinka rodu *Saccharomyces*. Výrobky obsahující prebiotika i probiotika se nazývají synbiotika.

Prebiotika jsou nestravitelné složky potravin, které pozitivně ovlivňují zdraví hostitele, selektivně stimulují růst a aktivitu probiotických mikroorganismů v trávicím traktu. Vyskytují se v mateřském mléce, ovoci i zelenině. Rozdělují se na fruktooligosacharidy a inulin, laktulosu, galaktooligosacharidy, sójové oligosacharidy, izomaltooligosacharidy, xylooligosacharidy.

Enterální výživa (EV) je potravina pro zvláštní lékařské účely, která je určena k popíjení nebo podávání sondami či striemi. Indikuje se u pacientů s Crohnovou chorobou, k navození remise. Crohnova choroba je chronické recidivující zánětlivé onemocnění střev. Typickými příznaky jsou bolesti břicha, průjmy, podvýživa. Patogeneze nemoci je zřejmě založena na selhání mechanismů symbiózy střevní mikrobioty a střevního slizničního imunitního systému u geneticky predisponovaných osob.

Antimikrobiální látky jsou takové sloučeniny, které působí proti mikroorganismům (bakteriím, virům, plísním, prvokům). Lysozym je hydrolytický enzym (muramidasa), který v roce 1922 objevil Alexander Fleming. Antimikrobiální účinek lysozymu spočívá v tom, že narušuje buněčnou stěnu zejména grampozitivních bakterií. Hydrolyticky štěpí  $\beta$ -(1,4) glykosidickou vazbu N-acetylmuramové kyseliny a N-acetylglukosaminu v peptidoglykanové vrstvě buněčných stěn.



## 2 CÍL A HYPOTÉZA

Cílem této diplomové práce je testovat schopnost střevních bakterií (*Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*) růst v enterálních výživách. Budou použity enterální výživy Fresubin, Fortini a Modulen IBD. Modulen IBD je speciální enterální výživa používaná při léčbě Crohnovy choroby. Dále budou enterální výživy obohaceny o antimikrobiální enzym lysozym a bude sledováno, jak ovlivní růst bakterií. Lysozym působí antimikrobiálně zejména proti grampozitivním bakteriím.

Hypotézou je, že různé bakterie (bifidobakterie, klostridie, laktobacily, koliformní bakterie) budou růst v enterální výživě odlišně. Přídavek lysozymu bude inhibovat klostridie, zatímco bifidobakterie nebudou ovlivněny.

## 3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

### 3.1 Střevní mikrobiota

#### 3.1.1 Definice a funkce

Střevní mikrobiota člověka je složitý ekosystém, který je klíčovým prvkem v homeostáze gastrointestinálního traktu (Tap et al., 2009). Střevní mikrobiotu člověka tvoří 400–500 druhů mikroorganismů, v počtu až  $10^{14}$  bakteriálních buněk a hmotnosti zhruba 1000 gramů. Sender et al. (2016) upravili poměr mezi bakteriálními a tělními buňkami na hodnotu 1. Lidské tělo tedy tvoří  $3 \times 10^{13}$  tělních buněk a  $4 \times 10^{13}$  bakteriálních buněk (Sender et al., 2016). Striktní anaerobové tvoří až 97 % bakterií z celkové populace. V trávicím traktu se vyskytují zejména rody: *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Peptococcus*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* a *Escherichia* (Golgin, 1992).

Přirozená mikrobiota je důležitým faktorem pro fyziologický, anatomický a imunitní vývoj hostitele. Stimuluje imunitní systém a tím brání před kolonizací potenciálně patogenními mikroorganismy. Mikroorganismy napomáhají při procesu trávení, během fermentace v tlustém střevě vznikají mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které slouží jako výživa pro střevní buňky. Další funkcí střevní mikrobioty je produkce vitamínů nebo ochrana před alergiemi z potravin (Berg, 1996; Gibson and Roberfroid, 1995).

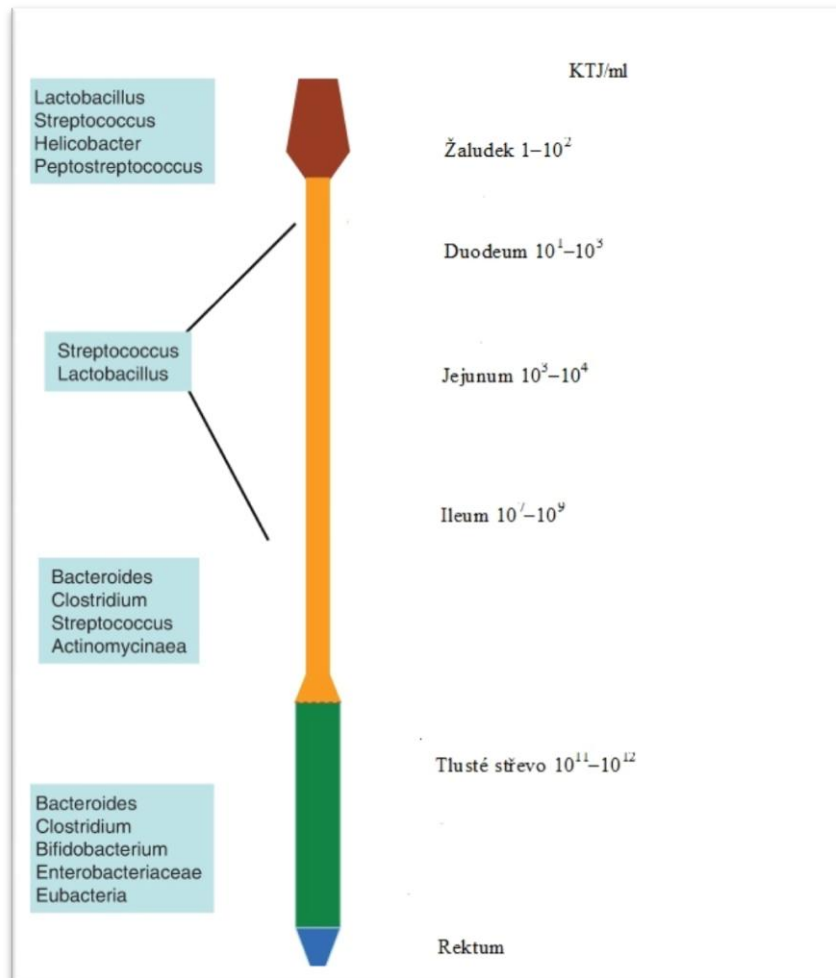
#### 3.1.2 Historie

Výzkumy spojené se střevní mikrobiotou nastaly ve 2. polovině 19. století, na kterých se významně podíleli Robert Koch, Louise Pasteur a Theodor Escherich. Louise Pasteur připravoval půdy pro pěstování mikroorganismů. Vysvětlil proces kvašení a vynalezl metodu konzervace-pasterizaci. Robert Koch je zakladatelem lékařské mikrobiologie, objevitel původců nemocí, jako je tuberkulóza nebo cholera (Zbořil et al., 2005).

Rakousko-německý pediater Theodor Escherich popsal v roce 1885 bakterii, která se dnes nazývá *Escherichii coli*, tento okamžik se považuje za počátek studia fyziologie trávicího traktu. Studoval složení střevní mikrobioty u dětí ve spojitosti s nemocemi, které způsobují bakterie. Escherich zkoumal význam mateřského mléka a zdůrazňoval důležitost kojení. Zjistil, že v kravském mléce je vysoký obsah sodíku, proto není kravské mléko vhodné jako kojenecká výživa (Shulman et al., 2007).

Francouzský lékař Henry Tissier (1906) porovnával stolici zdravých dětí a dětí trpících průjmem. Děti trpící průjmem měly ve stolici málo bifidobakterií, zatímco zdravé děti jich měly velké množství. Proto navrhl, aby se dětem s průjmem dávaly tyto bakterie, které pomohou obnovit jejich zdravou střevní mikrobiotu.

Obrázek 1 Osídlení trávicího traktu (dle Korecka and Arulampalam, 2012)



### 3.1.3 Vývoj mikrobioty

Vývoj střevní mikrobioty ovlivňuje délka těhotenství, vlastní průběh porodu, výživa novorozence (kojení, umělá výživa), vnější prostředí, léky typu antibiotik (Oozeer et al., 2013).

Plod dítěte je do porodu sterilní. Gastrointestinální trakt novorozence je osídlován v průběhu porodu, závisí tedy na osídlení traktu matky. U dětí porozených přirozeně z počátku převažují fakultativně anaerobní bakterie (*Escherichia coli*, *Enterococcus*), které vytvoří prostředí vhodné pro striktně anaerobní bakterie (Yoshiota et al., 1991). Po porodu

císařským řezem dochází ke kolonizaci komenzálními bakteriemi později než u dětí porozených normálně (Thomas and Greer, 2010).

U dětí kojených převládají bifidobakterie a laktobacily. U dětí na umělé výživě je skladba bakterií pestřejší, vyskytují se klostridie, enterobakterie, bakteroidy, veilonelly (Gibson and Roberfroid, 1995).

Zhruba ve 2 letech věku se střevní mikrobiota začíná podobat mikrobiotě dospělých lidí (viz obrázek 1). U dospělých lidí se vyskytují rody *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, grampozitivní koky, koliformní bakterie, methanogenní bakterie, sulfát redukující bakterie (Gibson and Roberfroid, 1995).

### 3.1.4 Rod *Clostridium*

Bakterie rodu *Clostridium* jsou grampozitivní, anaerobní nebo aerotolerantní, sporulující tyčinky, některé produkují toxiny. Přirozeně se vyskytují v půdě, v gastrointestinálním traktu člověka i zvířat, vodě, mléce nebo medu. Některé druhy jsou proteolytické, jiné sacharolytické a při anaerobním štěpení tvoří máselnou kyselinu a velké množství plynů, jako je oxid uhličitý nebo vodík (Wells and Wilkins, 1996).

*Clostridium tetani* produkuje toxin tetanospasmin, který způsobuje tetanus. Do těla se dostávají spory otevřenými ranami. Při tetanu dochází ke svalovému ztuhnutí a křečím. *Clostridium botulinum* produkuje neurotoxin botulotoxin, který blokuje uvolňování acetylcholinu a následně tak dochází k ochabnutí svalů. Zdrojem botulotoxinu jsou špatně zpracované konzervy. *Clostridium difficile* produkuje toxin A (enterotoxin) a toxin B (cytotoxin). Způsobuje průjmy až pseudomembranózní kolitidy (Wells and Wilkins, 1996).

V trávicím traktu lidí se vyskytuje *Clostridium butyricum*, produkuje kyselinu máselnou, která má proliferativní účinek na slizniční buňky střev. Byl považován za nepatogenní, do doby než se objevily případy kojeneckého botulismu. Může přispívat i k nekrotizující enterokolitidě (Rockova et al., 2011).

Nepatogenní *C. butyricum* MIYAIRI kmen 588 byl v Japonsku schválen pro humánní klinické použití, proti průjmu. Antagonisticky působí proti *Candida albicans*, *Clostridium difficile*, enterotoxické *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. a *Helicobacter pylori* (Takahashi et al., 2004). V ČR se používá pro drůbež a prasata, jako doplněk do krmiv a probiotický preparát Miya-Gold<sup>®</sup> S, který obsahuje spory *C. butyricum*.

## 3.2 Probiotika

### 3.2.1 Definice a funkce

Fuller roku 1989 definuje probiotika jako živé mikroorganismy přidávané do potravin, které příznivě ovlivňují zdraví hostitele tím, že zlepšují rovnováhu jeho střevní mikrobioty. Později byla definice upravena a říká, že probiotika jsou živé mikroorganismy, které při konzumaci v dostatečném množství, mají prospěšný účinek na zdraví hostitele (Guarner and Schaafsma, 1998).

Hlavním úkolem probiotik je udržení normální (zdravé) střevní mikrobioty. Jejich fungování spočívá v tom, že tvoří antimikrobiální látky, konkurují patogenním mikroorganismům o živiny a ochraňují tak organismus proti infekcím (Fuller, 1991). Mohou zmírňovat intoleranci na laktosu a snižovat cholesterol. Celkově tak stimulují imunitní systém. Používají se při léčbě průjmu a v prevenci proti střevním onemocněním (Holzapfer and Schillinger, 2002; Kaur et al., 2002). Dále mohou mít pozitivní účinky na léčbu vaginálních infekcí, které způsobuje *Candida* (Sanders, 1998).

Probiotické mikroorganismy produkují vitamíny skupiny B a vitamín K. Kmeny, které mají prokázané příznivé účinky, mohou být konzumovány ve vysokém počtu (Holzapfer and Schillinger, 2002).

Požadované vlastnosti pro probiotika dle Fullera (1989):

1. Kmen, který má příznivý vliv na hostitele.
2. Kmen, který je nepatogenní a netoxický.
3. Přítomný jako životaschopné buňky ve velkém množství.
4. Schopnost přežívání ve střevě, odolnost vůči nízkému pH a organickým kyselinám.
5. Stabilní a životaschopný i po delší době skladování.

Účinky na zdraví dle Schrezenmeira a Vrese (2001):

- Snížení infekce, kterou způsobuje *Helicobacter pylori*.
- Snížení příznaků alergií.
- Prevence před zácpou.
- Úleva od syndromu dráždivého střeva.
- Pozitivní účinky v metabolismu minerálních látek.
- Prevence rakoviny.

- Snížení cholesterolu a plazmatických triglyceridů.

### 3.2.2 Historie

Za zakladatele nauky o probiotikách je považován ruský mikrobiolog Ilja Iljič Mečnikov, díky své koncepci antibiocy. Mečnikova „optimistická studie o prodlužování věku“ poukazuje na příznivé účinky bakterií z jogurtu na lidské zdraví, což mělo být důvodem dlouhověkosti lidí na Balkáně. Bakterie z jogurtu potlačovaly růst hnilobných bakterií (Mečnikov, 1907). V roce 1908 získal Mečnikov Nobelovu cenu za medicínu, za výzkum imunitního systému, konkrétně za objev fagocytózy.

Termín probiotika poprvé použili až roku Lilly a Stilwell až roku 1965. Věnovali se testování růstu mikroorganismů, přičemž zjistili, že látka produkovaná jedním mikroorganismem ovlivňuje růst druhého mikroorganismu. Toto začali porovnávat s antibiotiky. Parker v roce 1974 použil termín probiotika ve vztahu mezi mikroorganismy se zvířaty a lidmi (Hamilton-Miller et al., 2003).

### 3.2.3 Probiotické bakterie

Mezi probiotika řadíme bakterie mléčného kvašení, konkrétně rody *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*. Dále se využívá rod *Bifidobacterium*, nepatogenní *Escherichia coli*, *Bacillus* nebo kvasinka *Saccharomyces*. Nejvíce se používají bakterie rodu *Lactobacillus* spp. a *Bifidobacterium* spp, které jsou také nejvíce prozkoumané. Nejčastěji používaným laktobacilem je *Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus*, označovaný jako *Lactobacillus* GG (Fric, 2007; Rolfe, 2000).

#### **Rod *Lactobacillus***

Laktobacily jsou grampozitivní, mikroaerofilní nebo anaerobní, nesporulující tyčinky. Jejich optimální teplota růstu je 35–40 °C při pH 5,5–6,0 (Gomes and Malcata, 1999). Tyto bakterie poprvé vyizoloval Moro ze stolice roku 1900, označil je *Bacillus acidophilus* (Kulp and Rettger, 1924). Vyskytují na rostlinách, materiálu rostlinného původu, ve zkvašených nebo zkažených potravinách nebo i v trávicím traktu živočichů (Jay et al., 2005).

Cukry (glukosu) využívají jako zdroj uhlíku a přeměňují ji na jeden nebo více produktů, dělí se tedy na homofermentativní a heterofermentativní. Homofermentativní bakterie tvoří z jednoduchých cukrů kyselinu mléčnou (> 85 %). Produkty heterofermentativních bakterií jsou mléčná kyselina, octová kyselina, oxid uhličitý, etanol

a těkavé kyseliny. Nezastupitelnou roli mají při výrobě potravin, kde je potřeba mléčné kvašení, zejména u mléčných kysaných výrobků, kysané zeleniny, fermentovaných masných produktů, ale také při výrobě pečiva (Tannock, 2004).

Nejčastěji využívané probiotické bakterie rodu *Lactobacillus* jsou druhy:

- *Lactobacillus acidophilus*,
- *Lactobacillus casei*,
- *Lactobacillus gasseri*,
- *Lactobacillus johnsonii*,
- *Lactobacillus rhamnosus*,
- *Lactobacillus reuteri* (Ouwehand et al., 2002).

### **Rod *Streptococcus***

Streptokoky jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní bakterie kulatého tvaru, tvoří řetězky, netvoří spory. Optimálně roste při teplotách 37–42 °C. Běžně se vyskytují v gastrointestinálním traktu člověka a zvířat. V mlékárenství se používají do mlékařských kultur, na výrobu jogurtu.

Probiotické účinky má nepatogenní kmen *Streptococcus salivarius* K12, který by mohl být využit v zubním lékařství, jako ochrana před zubním kazem (Wescombe et al., 2009). Zubní kazy jsou způsobovány kmenem *Streptococcus mutans*, který dokáže *Streptococcus salivarius* inhibovat (Walker et al., 2016). Jako probiotikum je možná kombinace streptokoků s laktobacily. Ústní probiotika snižují množství kvasinek rodu *Candida* v ústech. Při testování *Streptococcus salivarius* M18 u dětí došlo ke snížené tvorbě zubního plaku (Burton et al., 2016).

### **Rod *Enterococcus***

Enterokoky jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující kokovité bakterie. Jejich optimální teplota růstu je 37 °C. Přirozeně se vyskytují v syrovém mléce, v gastrointestinálním traktu člověka i zvířat, na rostlinném materiálu. Probiotické streptokoky jsou kmeny *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis*. Používají se v léčbě průjmu nebo při léčbě antibiotiky, dále u syndromu dráždivého tračníku. Také mají vliv na snížení cholesterolu v krvi a na zlepšení imunity (Franz et al., 2011).

*Enterococcus faecium* se v mlékařství používá jako netradiční startovací kultura při výrobě sýrů. Tento enterokok při testování odolnosti v gastrointestinálním prostředí vykazuje vysokou odolnost (Santos et al., 2015).

Nami et al. (2014) izolovali bakterie z vaginálního traktu zdravých žen a zjistili, že *Enterococcus durans* přežívá v prostředí trávicího traktu a mohl by kolonizovat střevní epitel. Tento kmen inhibuje mnoho patogenních mikroorganismů a je citlivý na širokou škálu antibiotik.

### **Rod *Lactococcus***

Laktokoky jsou grampozitivní bakterie, fakultativně anaerobní, tvoří spory. Kokovité bakterie tvoří diplokoky nebo řetízky. Optimální teplota růstu je 30 °C. Přirozeně se vyskytují v mléce a na rostlinném materiálu, jsou součástí vaginální mikrobioty. V mlékárenství se používají jako smetanová kultura. Probiotický kmen *Lactococcus lactis* je odolný vůči nízkému pH a žluči (Kimoto, 2002).

*Lactococcus lactis* produkuje bakteriocin nisin, který má antimikrobiální aktivitu. Tento laktokok má schopnost přilnout k vaginálnímu epitelu (Gao et al., 2011).

### **Rod *Bifidobacterium***

Bifidobakterie jsou grampozitivní nepravidelné tyčinky, přísně anaerobní a nesporulující. Poprvé byli vyizolováni z dětské stolice francouzským lékařem Henrym Tissierem v roce 1899. Tyto bakterie pojmenoval jako *Bacillus bifidus* (Jay et al., 2005). V roce 1920 byly přejmenovány na *Lactobacillus bifidus*. Od roku 1963 se používá rodové jméno *Bifidobacterium* (Biavati and Mattarelli, 2006).

Přirozeně se vyskytují v gastrointestinálním traktu a pochvě, jsou indikátorem fekálního znečištění. V potravinářství se používají při výrobě mléčných kysaných výrobků (Gomes and Malcata, 1999). Optimální teplota pro růst je 35–39 °C a pH 6,5–7. Cukry zkvašují na octovou a mléčnou kyselinu, v poměru 3 : 2 (Biavati and Mattarelli, 2006).

Jako probiotika se nejčastěji používají:

- *Bifidobacterium bifidum*,
- *Bifidobacterium breve*,
- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*,



- *Bifidobacterium longum* (Biavati and Mattarelli, 2006).

### **Rod *Escherichia***

*Escherichia coli* jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie. Typický je tvar krátkých tyčinek bez spor. Optimální teplota růstu je 37 °C. Běžně se vyskytují v trávicím traktu lidí i zvířat, je ukazatelem fekálního znečištění. Patogenní kmeny způsobují průjemy a infekce močových cest. Probiotický kmen *Escherichia coli* Nissle 1917 byl vyizolován Alfrédem Nisslem v roce 1917 ze stolice vojáka, který bojoval v balkánské válce a jako jediný odolal úplavici-shigelóze (Nissle, 1918).

*Escherichia coli* Nissle 1917 inhibuje bakterie jako je *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica* a *Vibrio cholerae*. Používá se při zánětlivém onemocnění střev, účinná a bezpečná je u pacientů s ulcerózní kolitidou (Kruis et al., 2004). Dále se může používat při léčbě Crohnovy choroby, kdy tento probiotický kmen vykazuje silný inhibiční účinek proti patogenní adherent-invazivní *E. coli* (AIEC), která je u pacientů s Crohnovou chorobou přítomna ve střevech ve vysokém počtu (Boudeau, 2003).

Tobolky s probiotickým kmenem *Escherichia coli* Nissle 1917 jsou dostupné pod názvem Mutaflor® nebo Colifant Newborn.

### **Další probiotické mikroorganismy**

Probiotické účinky mají některé kmeny z rodu *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus clausii*). Do probiotických výrobků se používají spory těchto bakterií. Jsou schopny kolonizovat trávicí trakt, mají imunostimulační a antimikrobiální aktivitu (Duc et al., 2014).

Probiotický účinek *Propionibacterium freudenreichii* je založen na produkci kyseliny propionové, bakteriocinů a vitamínu B12. *Propionibacterium freudenreichii* může mít vliv na prevenci rakoviny, právě díky produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem. Propionát zvyšuje vstřebávání vápníku z tlustého střeva (Chukwu et al., 2014).

Kvasinka *Saccharomyces boulardii* se používá při léčbě průjmu, které způsobuje *Clostridium difficile*, dále v léčbě s antibiotiky, zánětlivých onemocnění střev nebo při syndromu dráždivého tračníku. Vhodná je na cestovní průjemy. *S. boulardii* může působit proti různým střevním patogenům, jako je *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *Shigella* a *E. coli* (Czerucka et al., 2007).

*Saccharomyces boulardii* má specifické probiotické účinky, jedná se spíše o imunobiotické účinky. Imunobiotikum podporuje zdraví prostřednictvím aktivace slizniční imunity (Clancy, 2003). V lékárnách je dostupný probiotický přípravek pod názvem Nekadyl nebo Nekadex.

### 3.2.4 Formy

Probiotické bakterie najdeme v mnoha potravinách, ve kterých proběhlo mléčné kvašení a neproběhlo zde tepelné ošetření (jogurty, jogurtová mléka, kefíry, kysané zelí, kvašené mošty).

Pokud však budeme chtít samostatné probiotické mikroorganismy, jsou k dostání v lékárně nejčastěji ve formě kapslí. Některé kapsle lze vysypat do jogurtu nebo nápoje, nedoporučují se ale v kombinaci s džusem.

Pro děti jsou pak k dispozici varianty v kapkách (BioGaia ProTectis®), prášky na rozpuštění ve vodě (Nutrolin-B prášek pro přípravu sirupu®), cucavé pastilky (Swiss LAKTOBACÍLKY dětské třešňové pastilky®) nebo medvídci s příchutí bílé čokolády (Biopron MÉĎA®).

Podle výzkumů vykazují bakteriální kultury nízkou životaschopnost, nejsou odolné vůči nízkému pH v žaludku a trávicím enzymům. Nejlepší formou probiotik jsou lisované lyofilizované buňky. Jejich výhodou je, že mají nízkou vodní aktivitu, díky níž se zachová životaschopnost bakterií. Tableta se rozkládá pomaleji a bakterie se dostanou až do tlustého střeva (Klayraung et al., 2009).

Probiotické kultury používané při výrobě jogurtů příp. jogurtových nápojů nejsou lidského původu, jedná se o druh *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* označované jako Bifidus Actiregularis® nebo BB12. Tyto bakterie jsou technologicky vhodné, odolné vůči skladování, ale nekolonizují trávicí trakt v dostatečném počtu dlouhodobě. Zatímco probiotické tablety obsahují lyofilizované bakteriální kultury lidských kmenů, druhy *B. longum*, *B. breve* a *B. bifidum*. Tyto bakterie jsou snadno lyofilizovány a mají schopnost kolonizovat trávicí trakt lidí. Jejich použití ve formě živých kultur do mléčných výrobků je nevhodné, nejsou odolné vůči skladování (Rada, 1997).

## **3.3 Prebiotika**

### **3.3.1 Definice**

Prebiotika jsou nestravitelné složky potravin, které pozitivně ovlivňují zdraví hostitele, selektivně stimulují růst a aktivitu probiotických mikroorganismů v trávicím traktu. Poprvé termín prebiotika použili Gibson a Roberfroid roku 1995. Chemicky se jedná o sacharidy, které se přirozeně vyskytují v mléce, ovoci a zelenině.

Prebiotika mají v podstatě stejný cíl jako probiotika, a tím je zlepšit zdraví hostitele prostřednictvím modulace střevní mikrobioty, přičemž mechanismus účinku je ovšem odlišný (FAO, 2002).

Prebiotika v kombinaci s probiotiky jsou součástí výrobků označovaných jako synbiotika. Prebiotická složka podporuje růst probiotických bakterií, jedná se tedy o synergický efekt (Schrezenmeir and Vrese, 2001). Příkladem může být jogurt Activia s vlákninou od Danone.

### **3.3.2 Požadavky na prebiotika a jejich účinky**

#### **Požadavky**

Prebiotika nesmí být hydrolyzována ani absorbována v horní části trávicího traktu, musí být tedy odolné vůči nízkému pH žaludku a trávicím enzymům. Dále musí být fermentována střevní mikrobiotou, substrátem pro jednu nebo více zdraví prospěšných bakterií (bifidobakterií, laktobacilů). Také musí mít schopnost pozitivně ovlivnit mikrobiotu tlustého střeva a tím zlepšit zdravotní stav i pohodu organismu (Collins and Gibson, 1999; Roberfroid, 2007).

Při fermentaci prebiotik v tlustém střevě tvoří bakterie krátké mastné kyseliny (acetát, propionát, butyrát), které jsou zdrojem energie pro kolocyty. Tyto kyseliny hrají významnou roli v metabolismu a imunitě organismu (Kellow et al, 2014).

#### **Účinky**

Prebiotika jsou považována za prevenci proti rakovině tlustého střeva, díky tomu, že mají antiadhezní schopnost a zamezují tak vazbu patogenů na kolocyty. Dále ovlivňují stolicí (frekvence, změkčení, snížení pH), tudíž působí preventivně proti zácpě. Snižují hladinu

cholesterolu a lipidů v krvi, celkově modulují imunologické procesy v trávicím traktu (Sýkora, 2011).

Zkoumán je i efekt prebiotik na nemoci, jako je obezita, glukosova tolerance, dyslipidemie nebo i onemocnění jater. Prebiotika snižují postprandiální koncentraci glukosy a insulinu, je tedy možný vliv na snížení příjmu energie, a tím snižování hmotnosti. Pozitivní vliv mohou mít na prevenci osteoporosy. (Kellow et al., 2014).

### **3.3.3 Prebiotické sacharidy**

Prebiotika se většinou skládají z glukosy, fruktosy nebo galaktosy.

Používaná prebiotika:

- Fruktooligosacharidy a inulin
- Laktulosa
- Galaktooligosacharidy
- Sójové oligosacharidy
- Izomaltooligosacharidy
- Xylooligosacharidy

#### **Fruktooligosacharidy a inulin**

Fruktooligosacharidy a inulin jsou polymery D-fruktosy spojené vazbou  $\beta$ -2-1, na konci molekuly je napojena glukosa pomocí vazby  $\alpha$ -1-2. Inulin má stupeň polymerace vyšší než 20. Typickým zdrojem je čekanka (tab. 1), pro vysoký obsah inulinu je vhodná pro diabetiky. Inulin z čekanky má prokázaný bifidogenní účinek (Roberfroid, 1997).

Fruktooligosacharidy se získávají enzymatickou hydrolyzou inulinu. Při výrobě se používá enzym  $\beta$ -fruktosidasa, který produkuje mikroskopická houba *Aspergillus niger* (Roberfroid, 2007). Inulin se získává extrakcí horkou vodou z kořenů čekanky. Inulin lze připravit synteticky ze sacharosy, pomocí enzymu fruktosyltransferasa (Franck, 2002). Komerčně jsou fruktooligosacharidy dostupné jako Raftilose® nebo Raftiline® (Gibson and Roberfroid, 2005).

Dle vyhlášky č. 54/2004 Sb. je povoleno přidávat do kojenecké výživy fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy v množství 0,8 g na 100 ml výživy, v poměru 90 % oligogalaktosyl-laktosy a 10 % oligofruktosyl-sacharosy.

**Tabulka 1 Zdroje fruktooligosacharidů a inulinu (dle Vlková et al., 2011)**

<b>Zdroj</b>	<b>% množství oligosacharidů v čerstvé hmotě</b>
Čekanka obecná	16,2
Slunečnice topinambur	17–20,5
Česnek kuchyňský	16
Pór zahradní	10
Cibule kuchyňská	2–4,5
Banán	0,3–0,5
Smetánka lékařská	12–15

### **Laktulosa**

Laktulosa se vyrábí izomerizací laktosy, pomocí enzymu  $\beta$ -galaktosidasy. Tvorba v mléce je ovlivňována dobou a teplotou ošetření a pH (Olano and Corzo, 2009). U dětí se používá na změkčování stolice (Gregora, 2004). Dále bývá používána jako veterinární léčivo. Jako projímadlo určené lidem je k dostání pod názvem Laktulosa Biomedica nebo Lactulosa Sandoz®.

### **Galaktooligosacharidy**

Galaktooligosacharidy se vyskytují zejména v kravském a mateřském mléce. Jedná se o polymery odvozené od laktosy, obvykle jsou složeny z 3 až 5 sacharidových jednotek. Vyrábějí se ze syrovátky enzymaticky, pomocí  $\beta$ -galaktosidasy. Trans-galaktooligosacharidy jsou směsí oligosacharidů, která vzniká pomocí enzymatické transgalaktosilace (Roberfroid, 2007).

Galaktooligosacharidy inhibují růst nežádoucích bakterií, např. klostridií (Rycroft et al., 2001). Využívají se v potravinářství, kde zvyšují viskozitu výrobků a inhibují retrogradaci škrobu. Dále jako konzervační látky, díky schopnosti snižovat vodní aktivitu, a tím zabránit mikrobiální kontaminaci výrobku (Rudolfovská and Čurda, 2005). Komerčně jsou dostupné jako produkt Vivinal®. Dále v produktu Oligomate od firmy Yakult, který podporuje růst bifidobakterií (Shigehisa et al., 2015).

### **Sójové oligosacharidy**

Sójové oligosacharidy jsou sacharidy tzv. rafinosové řady (rafinosa, stachyosa, verbaskosa), které jsou obsaženy v luštěninách. Použití sóji a i ostatních luštěnin pro výrobu potravin je omezeno antinutričními faktory (inhibitor trypsinu, nadýmání), které lze omezit tepelnou přípravou. Stachyosu lze odbourat naklíčením či namočením (East et al., 1972). Sójové oligosacharidy stimulují růst bakterií rodu *Bifidobacterium* (Hopkins et al., 1998).

### **Izomaltooligosacharidy**

Isomaltooligosacharidy jsou izomery glukosy spojené vazbou  $\alpha$ -1-6. Mají bifidogenní účinek, při zvýšení počtu bifidobakterií vzniká více mléčné kyseliny a méně plynů (Rycroft et al., 2001). Komerčně jsou dostupné pod názvem VitaFiber™.

### **Xylooligosacharidy**

Xylooligosacharidy jsou izomery xylosy spojené vazbou  $\beta$ -1-4. Xylooligosacharidy s laktulosou zvyšují počet bifidobakterií (Rycroft et al., 2001). V kombinaci s probiotiky jsou komerčně dostupné pod názvem Bretbach® Febico.

#### **3.3.4 Mateřské mléko a kojenecká výživa**

Mateřské mléko je nejlepší kojenecká výživa, poskytuje optimální výživu, ale i bioaktivní složky, které jsou důležité pro správný vývoj imunity, metabolický i kognitivní vývoj dítěte. Podle některých studií mohou být přítomny v mléce probiotické bakterie. Výživa mateřským mlékem může mít potenciální roli při snižování rizika chronických onemocnění (obezita, alergie, kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus) v dospělém věku (Oozeer et al., 2013).

Složení mateřského mléka ve 100 ml (Ballard and Morrow, 2013; Svačina et al., 2013):

- 87,5 g voda
- 0,9–1,2 g bílkoviny ( $\alpha$ -laktalbumin, laktoferin, sekreční imunoglobulinu IgA, kasein, lysozym, sérový albumin)
- 3,2–3,6 g tuky ( palmitová a olejová kys.)
- 6,7–7,8 g sacharidy (laktosa, oligosacharidy)
- oligosacharidy – 1,2–1,4 g
- minerální látky (sodík, draslík, vápník, hořčík, fosfáty, železo, zinek, jód)
  - 16 mg sodík

- 53 mg draslík
- 31 mg vápník
- vitamíny (A, B, C, D, E)

Skladba bílkovin mateřského mléka v 1 ml (Svačina et al., 2013; Ročková et al., 2013):

- laktoferin – 1,5 mg
- $\alpha$ -laktalbumin – 2,6 mg
- albumin – 0,5 mg
- lysozym – 0,1 mg
- Ig A – 1 mg

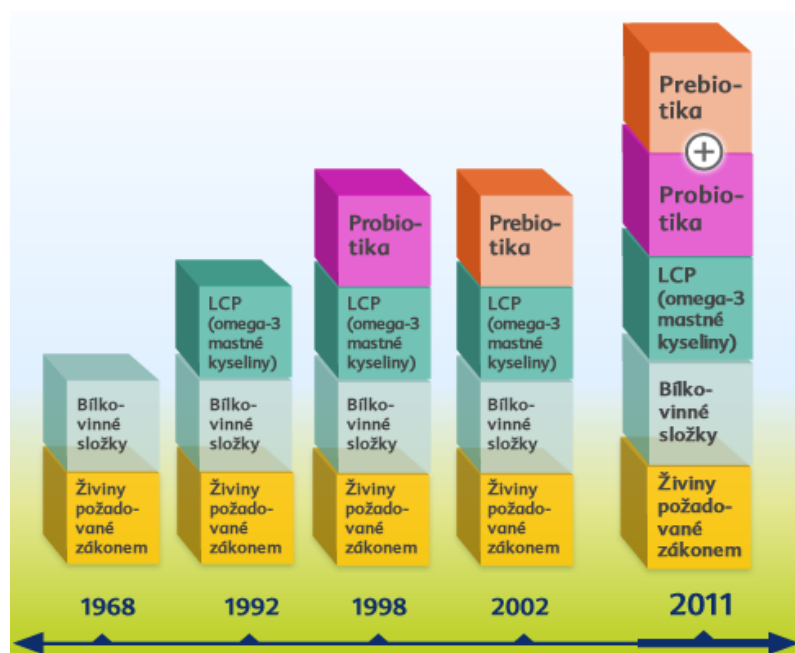
Prebiotický účinek mateřského mléka tvoří celý komplex faktorů, jako je nízká koncentrace bílkovin, fosfátů, přítomnost laktoferinu, laktosy, nukleotidů nebo oligosacharidů. Oligosacharidy jsou v mléce v množství 12–14 g/l, což je v porovnání s mlékem kravským 10 ti násobek. Proto je také nutné dětskou výživu o oligosacharidy obohacovat (Coppa, 2006).

Oligosacharidy mateřského mléka (N-acetylglukosamin, glukosy, galaktosy, fukosové oligomery, sialová kyselina) a některé glykoproteiny podporují růst bifidobakterií. Bifidogenní účinek má nízký obsah bílkovin a snížená pufrací schopnost mléka. Laktoferin a některé lipidy inhibují růst nežádoucích mikroorganismů (patogenní *Escherichia coli*), ale zároveň laktoferin podporuje růst prospěšných bakterií jako je *Bifidobacterium bifidum* (Collins and Gibson, 1999, Coppa et al., 2006).

Kojenecká výživa se vyrábí z kravského mléka, které se obohacuje prebiotickou vlákninou podobnou prebiotikům mateřského mléka. Přípravky jsou komerčně známé jako Nutrilon, Omneo, Sunar komplex. Dále je možno upravovat bílkoviny a snižovat množství fosfátů, tím se docílí prebiotickému efektu a dojde tak k ovlivnění růstu probiotických bakterií. Takto upravený výrobek je komerčně známý jako Beba 1 Start (Gregora, 2004).

Dle vyhlášky č. 54/2004 Sb. je povoleno následující složení počáteční kojenecké výživy: energetická hodnota (250–295 kJ/100 ml), bílkoviny (0,45–0,7 g/100 kJ), taurin (> 2,9 mg/100 kJ), cholin (1,7–12 mg/100 kJ), tuky (1,05–1,4 g/100 kJ), fosfolipidy (> 2 g/l), inositol (1–10 mg/100 kJ), sacharidy (2,2–3,4 g/100 kJ), minerální látky, vitamíny, nuklotidy. Obrázek č. 2 ukazuje historický vývoj kojenecké výživy HiPP.

Obrázek 2: Historie vývoje HiPP kojenecké výživy (HiPP, 2017)



### 3.4 Enterální výživa

#### 3.4.1 Obecně

Enterální výživa (EV) je potravina pro zvláštní lékařské účely, která je určena k popíjení (per os) nebo podávání sondami či stomiemi. Do žaludku se výživa podává nasogastrickou sondou nebo gastrostomií, vytvořenou endoskopicky (PEG-perkutánní endoskopická gastrostomie) nebo chirurgicky. Do tenkého střeva je výživa podávána nasojejunální sondou nebo výživnou jejunostomií, zavádí se endoskopicky (PEJ-perkutánní endoskopická jejunostomie) nebo chirurgicky, jako výživná nebo nutritivní jejunostomie (Grofová, 2009).

Enterální výživa je definovaná jako podávání bilancovaných roztoků do trávicího traktu, které obsahují vodu, cukry, tuky, bílkoviny, ionty, vitamíny, stopové prvky. Základní indikací pro použití enterální výživy je, že pacient není schopen jíst, ale má funkční trávicí trakt. Použití enterální výživy zamezí rozvoji malnutrice a umožní léčbu nemoci (Dastyh, 2012).

Enterální výživou se doplňují do organismu nedostatky energie a důležité živiny. Používá se jako primární terapie při léčbě Crohnovy choroby (Goulet, 2010). Důležitá je u pacientů, u kterých hrozí podvýživa a při vlastní léčbě, pro indukci a udržení remise (Donnellan, 2013).



Nejpohodlnější je enterální výživa k popíjení (sipping), ale aby byla pokryta denní potřebná dávka živin, v případě úplné enterální výživy, je nutno vypít zhruba 2 litry přípravku, což je schopno jen asi pouze 10 % pacientů (Dastych, 2012).

Tekuté přípravky enterální výživy jsou na trhu od farmaceutických firem Fresenius (Fresubin), Nestlé (Modulen IBD), Nutricia (Nutridrink, Fortini). Bohušovická mlékárna vyrábí enterální výživu pod názvem NutrilaC. K dostání jsou různé sladké příchutě (jahoda, banán, broskev, oříšek, čokoláda, káva, forma džusu) nebo je nápoj bez příchuti. Slaná příchut' v ČR úspěch neměla (Grofová, 2009).

### **3.4.2 Typy enterálních výživ**

Enterální výživy dělíme podle velikosti molekul živin na oligomerní a polymerní.

- **Oligomerní**

Zdrojem bílkovin jsou dipeptidy a tripeptidy vzniklé hydrolytickým rozkladem bílkovin (mléčné, vaječné). Cukry jsou ve formě nízkomolekulových maltodextrinů, monosacharidů a disacharidů. Tuky jsou směsí omega 3 a omega 6 esenciálních mastných kyselin a triglyceridů se středním řetězcem, vyrobené z kokosového oleje nebo oleje ze světlice barvířské. Minerální látky, stopové prvky a vitamíny se do enterálních výživ dávkuje podle denních dávek. Cena je 3 krát vyšší než u polymerních enterálních výživ. Jsou vhodné pro pacienty s poruchou digesce a absorpce ve formě sond do žaludku i tenkého střeva (Dastych, 2012).

- **Polymerní**

Polymerní enterální výživy mohou obsahovat mléčné bílkoviny (kasein, syrovátkové), vaječný bílek, vaječný albumin, sójový protein. Cukry jsou ve formě škrobu, maltodextrinu nebo sacharosu. Zdrojem tuku může být olej (kukuřičný, slunečnicový, sójový), máslo, hovězí lůj. Polymerní enterální výživy neobsahují laktosu a lepek. Mohou obsahovat vlákninu. Mohou být obohaceny o omega 3 kyseliny, arginin, glutamin, pak se jedná o imunomodulační enterální výživu. Aplikují se do žaludku a tenkého střeva sondou (Dastych, 2012).

Enterální výživy dle podávané dávky (Dastych, 2012):

1. Doplnková: 300–600 kcal/den
2. Doplnková noční: 1000 kcal/den
3. Úplná: 2000–2500 kcal/den

V tabulce 2 je přehled enterálních výživ podle obsahu energie a bílkovin.

**Tabulka 2: Enterální výživy dle obsahu energie a bílkovin (dle Grofová, 2009)**

Typ přípravku	Obsah energie na 200 ml	Obsah bílkovin na 200 ml
Izokalorický	200 kcal	7,6–8 g
Hyperkalorický	300–400 kcal	11–18 g
Protein plus	200–250 kcal	18–20 g
Multifibre	300 kcal, s obsahem vlákniny	12 g
Speciální (hojení ran)	250 kcal, s vyšším obsahem Zn, vit. A, E, C	20 g (3 g argininu)
Fat free	180–300 kcal	8–8,8 g
Lipidová emulze	900 kcal	0 g

\*200 ml je obvyklý objem 1 lahvičky

### 3.4.3 Příklady přípravků EV

#### Fresubin Original Drink

Fresubin Original Drink (příchuť vanilková) je nutričně kompletní 1kcal/ml tekutá výživa určená k popíjení. Bez vlákniny, lepku, klinicky bez laktosy. Energetická hodnota výrobku je 420 kJ. Obsah bílkovin je 3,8 g, sacharidů 13,8 g a 3,4 g tuků (ve 100 ml). Objem balení je 200 ml. Dávkování: celková výživa 7–8 lahviček, doplnková výživa 2–3 lahvičky. Výrobce Fresenius.

**SLOŽENÍ:** voda, maltodextrin, mléčné bílkoviny, rostlinné oleje, sacharosa, sójová bílkovina, aroma, citronan draselný, chlorid draselný, emulgátory (sójový lecitin, E471), hydrogenfosforečnan draselný, chlorid hořečnatý, vit. C, regulátory kyselosti (E332, E330, E530), cholin hydrogentartarát, stabilizátor (E415), síran železnatý, síran zinečnatý, fosforečnan vápenatý, niacin, vit. E, kyselina pantotenová, chlorid manganatý, síran měďnatý, vit. B<sub>2</sub>, vit. B<sub>6</sub>, fluorid sodný, betakaroten, vit. B<sub>1</sub>, vit. A, kyselina listová, chlorid chromitý, jodid draselný, molybdenan sodný, seleničnan sodný, vit. K<sub>1</sub>, biotin, vit. B<sub>3</sub>, vit. B<sub>12</sub>.

### **Fresubin Energy Fibre Drink**

Vysokokalorická kompletní výživa s vlákninou určená k popíjení. Bez lepku a bez laktosy. Výživa určená k dietnímu postupu pro pacienty s rizikem podvýživy. Energetická hodnota výrobku je 630 kJ. Obsah bílkovin je 5,6 g, sacharidů (2 g vlákniny), 18,8 g a 5,8 g tuků (ve 100 ml). Objem balení je 200 ml. Dávkování: při doplňkové výživě 2-3 lahvičky/den, při plné výživě 5-7 lahviček/den. Výrobce Fresenius.

SLOŽENÍ: voda, maltodextrin, mléčné bílkoviny, rostlinné oleje, sacharosa, inulin, sojová bílkovina, ovesná vláknina, tuky se středně dlouhými řetězci (MCT), škroby, ochucovadla, glukosový sirup, regulátory kyselosti ( E332, E170, E530), resistantní škroby, emulgátory (E322, E471), cholintartarát, vitamíny, minerály, stopové prvky a ostatní živné látky.

### **Modulen IBD**

Modulen<sup>®</sup> je nutričně kompletní potravina určená k dietnímu postupu pro pacienty s Crohnovou nemocí. Vhodná jako jediný zdroj výživy během aktivní fáze Crohnovy choroby a/nebo během fáze remise u podvyživených pacientů. Modulen<sup>®</sup> IBD má neutrální příchut', podává se přímo do úst po malých doušcích, nebo je možné ho podávat pomocí hadičky. V mnoha klinických studiích Modulenu<sup>®</sup> IBD bylo prokázáno, že snižuje zánět střev a podporuje hojení sliznice. 100 ml výživy má energetickou hodnotu 414 kJ, obsah bílkovin je 3,6 g, sacharidů 11 g a tuků 4,6 g. Obsah balení je 400 gramů. Výrobce Nestlé.

SLOŽENÍ: glukosový sirup, kasein (z mléka), sacharosa, mléčný tuk, triglyceridy se středně dlouhými řetězci (MCT tuky), minerální látky (citronan draselný, fosforečnan vápenatý, citronan sodný, uhličitan vápenatý, chlorid hořečnatý, hydroxid draselný, chlorid draselný, síran železnatý, síran zinečnatý, oxid hořečnatý, síran manganatý, síran měďnatý, molybdenan sodný, jodid draselný, chlorid chromitý, selenan sodný), kukuřičný olej, emulgátor (sojový lecitin), vitamíny (C, E, niacin, kyselina pantothenová, B6, B1, A, B2, kyselina listová, K, biotin, D, B12), dvojjvinan cholinu. Bez lepku. Baleno v ochranné atmosféře.

### **Fortini Neutral (dříve NutriniDrink)**

Fortini Neutral je nutričně kompletní vysokoenergetická tekutá výživa s mléčnou bílkovinou a s vlákninou pro děti od 1 roku věku. 100 ml výživy má energetickou hodnotu

640 kJ, obsah bílkovin je 3,4 g, sacharidů 18,8 g (1,5 g vlákniny) a tuků 6,8 g. Objem balení je 200 ml. Výrobce Nutricia.

**SLOŽENÍ:** voda, maltodextrin, glukosový sirup, rostlinné oleje, mléčné bílkoviny, vláknina (sojové polysacharidy, inulin, oligofruktosa, rezistentní škrob, arabská guma, celulóza), emulgátor (sojový lecitin), citronan tridraselný, fosforečnan vápenatý, chlorid hořečnatý, hydrogenfosforečnan didraselný, chlorid vápenatý, cholin chlorid, karotenoidy (obsahuje sóju,  $\beta$ -karoten, lutein, lykopen), L-askorban sodný, chlorid draselný, hydroxid draselný, taurin, mléčnan železnatý, síran zinečnatý, L-karnitin, nikotinamid, DL- $\alpha$ -tokoferylacetát, glukonan měďnatý, retinyl acetát, seleničitan sodný, síran manganatý, D-biotin, cholekalciferol, D-pantothenát vápenatý, thiamin hydrochlorid, chlorid chromitý, riboflavin, pyridoxin hydrochlorid, kyselina pteroylmonoglutamová (kyselina listová), jodid draselný, fluorid sodný, molybdenan sodný, fytomenadion, kyanokobalamin.

#### **3.4.4 Použití enterální výživy**

U pacientů, kteří jsou na enterální výživě, může v kombinaci s metabolickým stresem a léky docházet k dysbióze. Dochází ke změně složení střevní mikrobioty, počty bakterií dominantních rodů se snižují, zvyšuje se však počet potenciálně patogenních mikroorganismů. U pacientů se obvykle vyskytuje průjem. Vhodné je podávat probiotickou *Saccharomyces boulardi*, která působí preventivně proti průjmu a zvyšuje produkci krátkých mastných kyselin ve střevě (Schneider, 2010).

Laktobacily a bifidobakterie v kombinaci s enterální výživou mohou působit proti patogenním bakteriím, jako je *E. coli* nebo *Salmonella* (Whelan, 2007). Pacienti užívající enterální výživu mají variabilní střevní mikrobiotu. V případě těch, u kterých se vyskytují průjmy je vyšší počet klostridií a nižší počet bifidobakterií (Whelan et al., 2009). Pozitivně mohou působit i prebiotika. Fruktooligosacharidy v kombinaci s enterální výživou zvyšují počet bifidobakterií v tlustém střevě (Whelan, 2007).

ESPEN (Společnost klinické výživy a intenzivní metabolické péče) doporučuje indikaci enterální výživy u pacientů s Crohnovou chorobou jako prevenci a léčbu podvýživy, pro zlepšení růstu a vývoje u dětí a mladistvých, pro zlepšení kvality života, při léčbě akutní fáze nemoci, jako perioperační výživu, při udržování remise u chronicky aktivní choroby. U dospělých lidí ve fázi aktivní nemoci se samostatná léčba enterální výživou indikuje pouze v případech, že není možná kortikoterapie. Doporučuje se kombinace léků a enterální výživy.

U dětí je enterální výživa léčbou první volby (Grofová, 2007). V tabulce 3 jsou příklady dalších onemocnění, kdy je enterální výživa indikována.

**Tabulka 3: Indikace enterální výživy (dle Nutricia, 2016)**

Děti	Dospělí
Zpomalení růstu, podvýživa	Malnutrice
Alergie na bílkovinu kravského mléka	Sarkopenie (ztráta svalové hmoty)
Cystická fibróza (dysfunkce exokrinních žláz)	Dysfagie (porucha polykání)
Neurologická onemocnění (roztroušená skleróza)	Chirurgická léčba nádorů hlavy a krku
Nádorová onemocnění	Operace nádoru trávicího traktu
Poruchy trávení a vstřebávání	Vážný úraz
Zánětlivá onemocnění střev, syndrom krátkého střeva	
Intenzivní péče	
Vrozené srdeční vady	

### 3.4.5 Crohnova choroba

Crohnova choroba je chronické recidivující zánětlivé onemocnění střev. Typickými příznaky jsou bolesti břicha, průjemy a podvýživa. U čtvrtiny lidí se nemoc projevuje již v dětství. Patogeneze nemoci je zřejmě založena na selhání mechanismů symbiózy střevní mikrobioty a střevního slizničního imunitního systému u geneticky predisponovaných osob. Vliv může mít složení střevní mikrobioty nebo i strava. Kojení může mít ochranný význam, strava s hodně tuky naopak negativní (Day and Lopez, 2015).

Lékaři Crohn, Ginzburg a Oppenheimer roku 1932 studovali tuto nemoc u 14 pacientů. Příznaky nemoci byly podobné ulcerózní kolitidě, pacienti trpěli průjmem, horečkou a úbytkem hmotnosti. Docházelo u nich ale k zánětu střevní stěny, a to zejména illea, poškozeny byly ale všechny vrstvy stěny. Ve střevě se tvoří píštěle, trhliny, vředy, může dojít k zúžení střeva. Nemoc má dvě stádia, stádium klidu (remise) a stádium vzplanutí (relaps).

U Crohnovy choroby nebyl dosud zjištěn žádný specifický patogen, který by onemocnění způsoboval. Avšak bylo prokázáno, že složení střevní mikrobioty je abnormální., dochází k přemnožení fakultativně anaerobních bakterií a snížení počtu prospěšných bifidobakterií a laktobacilů. Toxické metabolity bakterií v tlustém střevě mohou vést k vyvolání imunologického útoku na střevní mikrobiotu (Walton et al., 2016).

Monitorování aktivity zánětu je prováděno stanovením kalprotektinu ze stolice. Kalprotektin je významný senzitivní nespecifický diagnostický marker zánětlivých onemocnění. Má antibakteriálními, antiproliferačními a regulačními vlastnosti. Tvoří 60 % všech bílkovin obsažených v cytosolu neutrofilů. Koncentrace u zánětlivých onemocnění je zvýšená díky agregaci neutrofilů na sliznici postiženého střeva. Pokud dojde k remisi onemocnění, hodnoty kalprotektinu se sníží (Costa et al., 2005).

Složení střevní mikrobioty v porovnání se zdravou populací se liší v počtech zejména u *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Ruminococcus gnavus*. Počty bakterií *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium adolescentis* jsou u pacientů s Crohnovou chorobou nižší, naopak u *Ruminococcus gnavus* jsou vyšší (Joossens et al., 2011).

#### **3.4.6 Crohnova choroba a enterální výživa**

K navození remise nemoci se používá enterální výživa, které pomáhá optimalizovat výživu a podporuje hojení střevní sliznice, pozitivně ovlivňuje také kosti (Donnellan et al., 2013). K indukci remise pomocí enterální výživy dochází u 80–85 % dětských pacientů (Kaakoush et al., 2015). Podle Cochranu jsou kortikosteroidy účinnější než enterální výživa pro indukci remise aktivní Crohnovy choroby (Zachos et al., 2007). Kortikoidy mají ale řadu nežádoucích účinků, jako je řídnutí kostí nebo metabolické komplikace spojené s diabetem, jejich užívání nemusí vést k hojení střevní sliznice (Rutgeerts, 2001).

Mechanismus účinku enterální výživy při léčbě Crohnovy choroby není úplně přesně objasněn, dochází ke změně střevní mikrobioty a zvýšení bariérové funkce sliznice. Enterální výživa má protizánětlivý účinek, dochází ke snížení hladiny prozánětlivých cytokinů ve střevní sliznici (Day and Lopez, 2015).

Nejnovější poznatky potvrzují, že enterální výživa ve formě perorální nebo přes nasogastrickou sondou pomáhá navozovat remisi u dětí s Crohnovou chorobou. Dochází ke změně střevního mikrobiomu, snižuje se počet bakterií rodu *Bacteroides* a mění se množství produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (Berntson et al., 2016).

Walton et al. (2016) zjistili, že u pacientů s Crohnovou chorobou na enterální výživě po dobu 2 týdnů dochází ke snížení produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem a také potencionálně toxických metabolitů, jako jsou 1-propanol, 1-butanol, methylestery

a ethylestery mastných kyselin s krátkým řetězcem. Tento mechanismus může vysvětlovat účinnost enterální výživy při léčbě.

Během léčby pomocí enterální výživy se mění zastoupení bakterií *Firmicutes*. Při sledování jednoho z pacientů, došlo ke snížení množství bakterií *Erysipelotrichaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* a *Peptostreptococcaceae* a zlepšení jeho zdravotního stavu. Následně došlo k mírnému zhoršení, zvyšují se počty *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* a *Peptostreptococcaceae*, poté se *Lachnospiraceae* a *Peptostreptococcaceae* snižují a dochází ke zlepšení stavu (Kaakoush et al., 2015).

Pokud není možná enterální výživa, pacient trpí syndromem krátkého tračníku nebo intolerancí enterální výživy, je indikována parenterální výživa. Parenterální výživa je podávání živin přímo do krevního řečiště. Její použití u léčby není příliš vhodné a hlavně není účinnější než enterální výživa. V praxi může být použita kombinace orální, enterální a parenterální výživy, aby bylo dosaženo, co nejlepšího účinku (Donnellan et al., 2013).

### **3.5 Antimikrobiální látky**

#### **3.5.1 Obecně**

Antimikrobiální látky jsou takové sloučeniny, které působí proti bakteriím, virům, plísním nebo prvokům (Ganz, 2003). Pokud tyto látky pouze zastavují rozmnožování mikroorganismů, jedná se o látky mikrobistatické. V případě usmrcování buněk se jedná o látky mikrobicidní. Látky s antimikrobiální aktivitou jsou původu rostlinného i živočišného.

V rostlinách jsou to fenolové sloučeniny, terpenoidní látky nebo heterocyklické dusíkaté sloučeniny. Příkladem rostlin s obsahem antimikrobiálních látek je česnek, cibule, hřebíček, skořice, máta nebo hroznové víno (Vlková et al., 2009). Antimikrobiální účinek máty peprné je vyšší proti grampozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*) než proti gramnegativní *Escherichia coli* (Singh et al., 2015).

#### **3.5.2 Lysozym**

Lysozym je hydrolytický enzym (muramidasa), který v roce 1922 objevil Alexander Fleming. Jeho objevení byla nehoda, kdy spadla kapka nosního hlenu na plotnu s agarem, kde byly naočkovány bakterie. Antimikrobiální účinek lysozymu spočívá v tom, že narušuje buněčnou stěnu zejména grampozitivních bakterií. Hydrolyticky štěpí  $\beta$ -(1,4) glykosidickou

vazbu N-acetylmuramové kyseliny a N-acetylglukosaminu v peptidoglykanové vrstvě buněčných stěn (Callewaert and Michiels, 2010).

V živočišné říši existují 3 typy lysozymu - C, G, I. Typ C se přirozeně vyskytuje ve vaječném bílku, ale i u člověka v tělních tekutinách, např.: v mateřském mléce, slinách, slzách, krvi nebo moči (tabulka 4). Je tedy součástí přirozeného imunitního systému člověka i ostatních savců. Lysozym vaječného bílku je tvořen 129 aminokyselinami, označuje se jako kuřecí nebo také konvenční. Typ G se vyskytuje v husích vejcích, ale může být i u lidí. Typ I se nachází u bezobratlých (Callewaert and Michiels, 2010). Lysozym vaječného bílku a lidský se liší pořadím aminokyselin, shodují se z 60 % (Peter et al., 1989).

Obsah lysozymu v mlékách savců se liší, zralé mateřské mléko může obsahovat až 400 mg/l, obvykle se jedná o hodnoty nižší, do 100 mg/l. Kravské mléko obsahuje pouze 0,13 mg/l a kozí mléko 0,25 mg/l lysozymu (Maga et al., 2006; Ročková et al., 2013).

**Tabulka 4** Koncentrace lysozymu (dle Taylor et al., 2002; Svačina et al., 2013; Vidal et al., 2005)

Zdroj	Koncentrace lysozymu mg/l
Vaječný bílek	2200–4500
Mateřské mléko	< 100
Kravské mléko	0,1
Sliny	55,53 ± 30,35
Krevní sérum	0,64 ± 0,15
Moč	0,17 ± 0,22

V potravinářství se používá jako konzervant s označením E 1105 (Směrnice 95/2/ES). Jeho maximální povolené množství není stanoveno (*quantum satis*). V mlékárenství se používá při výrobě tvrdých sýrů jako prevence před *Clostridium tyrobutyricum*. Dále se používá ve vinařství ke stabilizaci vín.

### 3.5.3 Látky kravského mléka

V kravském, ale i lidském mléce se vyskytují látky, které mají vliv na obranu organismu před potenciálně patogenními mikroorganismy. Mezi tyto látky můžeme počítat látky bílkovinné povahy, jako je laktoferin nebo laktoperoxidasa, která je součástí laktoperoxidasa-thiokyanát-hydrogen peroxidového systému. Dále jsou v mléce obsaženy triglyceridy a fosfolipidy, které jsou v organismu štěpeny za vzniku produktů, které mohou mít antimikrobiální a antivirový účinek (Van Hooijdonk et al., 2000).



### 3.5.3.1 Laktoferin

Laktoferin je transportní glykoprotein, který v organismu váže volné železo. Přirozeně se vyskytuje v mléce, krvi, tělních tekutinách člověka i ostatních savců. Je součástí neutrofilních leukocytů. Množství obsažené v mléce závisí na fázi laktace, nejvyšší koncentrace je v kolostru (Farnaud and Evans, 2003).

Laktoferin působí protizánětlivě, imunomodulačně, antibakteriálně, antivirálně, antimykoticky a antiparasitálně. Díky antioxidantním vlastnostem může mít i protinádorový účinek (Brock, 2002). Antimikrobiální aktivita je dána schopností vázat železo, potenciálním patogenům tak chybí esenciální živiny (Farnaud and Evans, 2003).

Laktoferin je schopen se navázat na receptory hostitelské buňky, kterou bakteriální a virové buňky používají ke vstupu do organismu. Jeho podávání předčasně narozeným dětem by mohlo zamezit propuknutí závažných nemocí (Embleton et al., 2013). V testech na myších byl pozorován bakteriostatický účinek proti bakteriím rodu *Clostridium* (Teraguchi et al., 1995). V medicíně se používá při léčbě hepatitidy C a proti *Helicobacter pylori*.

### 3.5.3.2 Laktoperoxidasa-thiokyanát-hydrogen peroxidový systém

Laktoperoxidasa patří mezi oxidoreduktasy. Přirozeně se vyskytuje v mléce, slzách nebo slinách, je velmi odolná vůči proteolýze (Thomas et al., 1994). Má bakteriostatický a bakteriocidní účinek. Používá se do zubních past, protože je účinná proti plaku a proti zánětům (Van Hooijdonk et al., 2000). Ve 26 vzorcích mateřského mléka byl stanoven průměrný obsah laktoperoxidasy  $0,77 \pm 0,38$  mg/l (Shin et al., 2001).

Laktoperoxidasa je součástí laktoperoxidasa-thiokyanát-hydrogen peroxidového systému. Tento systém je důležitý obranný mechanismus kravského mléka. Inhibuje růst stafylokoků, streptokoků, ale i koliformních bakterií. Laktoperoxidasa je produktem epitelových buněk mléčné žlázy, koncentrace v mléce dosahuje až 35 mg/l, závisí na fázi laktace. Thiokyanát je přijímán ze zeleného krmení (luštěniny) a hydrogen peroxid tvoří bakterie (Toman et al., 2009).

Mechanismus systému spočívá v tom, že laktoperoxidasa v přítomnosti hydrogen peroxidu oxiduje thiokyanát na hypothiokyanát, který destruuje buněčnou membránu bakterií. Předpokládá se, že hypothiokyanátový ion oxiduje bakteriální enzymy a jiné proteiny, které mají SH- skupiny v buněčné membráně, čímž dojde k narušení transportních vlastností (Thomas et al., 1994; Toman et al., 2009). Dochází tak ke ztrátě pH gradientu a úniku draselných kationtů, dále také k inhibici transportu rozpuštěných látek, zejména aminokyselin nebo glukosy (García-Graells, 2000).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Použité kultury

Bakterie používané pro rozborů jsou ze sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, jedná se o čtyři druhy střevních bakterií. Čisté kultury se uchovávají zmražené s glycerinem (20% v/v).

Pro rozborů byly použity následující bakterie:

#### 1) rod *Bifidobacterium*

- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 1 (DAN)
- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 2 (BB12)
- *Bifidobacterium bifidum* 1 (BM)
- *Bifidobacterium bifidum* 2 (JKM)
- *Bifidobacterium bifidum* 3 (JOV)
- *Bifidobacterium longum* 1 (TP1)
- *Bifidobacterium longum* 2 (BV)

DAN a BB12 byly vyizolovány z jogurtů, BM a BV pochází z probiotik, JKM, JOV a TP1 jsou střevní bakterie kojenců.

#### 2) rod *Clostridium*

- *Clostridium* 1 (ŠIM1)
- *Clostridium* 2 (FW2)
- *Clostridium* 3 (KA)
- *Clostridium* 4 (T2)
- *Clostridium* 5 (FJJW2)
- *Clostridium* 6 (CM14)

Všechny klostridie jsou izoláty ze stolice kojenců.

#### 3) rod *Lactobacillus*

- *Lactobacillus gasseri* (RU)
- *Lactobacillus paracasei* (SH)
- *Lactobacillus paracasei* (JA)
- *Lactobacillus paracasei* (AM)
- *Lactobacillus rhamnosus* (MJ)

- *Lactobacillus paracasei* (FE)
- *Lactobacillus rhamnosus* (FJ)

*Lactobacillus paracasei* (SH) je izolát z mléčného výrobku, ostatní laktobacily jsou izoláty ze stolice kojenců.

#### 4) rod *Escherichia*

- *Escherichia coli* (EC1)
- *Escherichia coli* Nissle 1917 (EC2)
- *Escherichia coli* (EC3)
- *Escherichia coli* (EC4)
- *Escherichia coli* (EC5)

*Escherichia coli* EC1, EC3, EC4, EC5 jsou izoláty ze stolice, *E. coli* Nissle 1917 (EC2) byla vyizolována z probiotika.

## 4.2 Použité enterální výživy

Pro rozборы byly použity sterilní enterální výživy značek Modulen IBD, Fresubin a Fortini. Podrobnější složení je uvedeno v kapitole 3.4.3. Produkty Fortini Multi Fibre a Fresubin Energy Fibre Jahoda obsahují prebiotickou složku.

1. Modulen IBD, výrobce Nestlé, šarže 23010346AD, trvanlivost do 31. 10. 2014
2. Fresubin Original Vanilka, výrobce Fresenius, šarže 29KF1122, trvanlivost do 06/2017
3. Fortini Multi Fibre, výrobce Nutricia, šarže L100613233, trvanlivost do 08. 08. 2017
4. Fresubin Energy Fibre Jahoda, výrobce Fresenius, šarže 29KE1007, trvanlivost do 05/2017
5. Fresubin Neutral, výrobce: Fresenius, šarže: 29HC0491, trvanlivost do 06/2015

## 4.3 Použitá media

Pro ředění množství bakterií byl použit ředící roztok. Kontrola růstu bakterií v destičce byla sledována v mediu Wilkins-Chalgren (W-Ch) bujón. Wilkins-Chalgren bujón byl také používán pro přeočkovávání bakterií. Pro stanovení počtu bakterií byl použit agar Wilkins-Chalgren se sójovým peptonem. U selektivního stanovení bifidobakterií byl W-Ch agar obohacen o mupirocin a octovou kyselinu. Bakterie *E. coli* byly selektivně stanoveny na agaru MacConkey nebo TBX agaru.

### **Ředící roztok**

- 1) Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 5 g tryptonu, 5 g živného bujónu (Nutrientbroth No. 2), 2,5 g kvasničného autolyzátu (Oxoid) a 0,25 g cysteinu (Sigma).
- 2) Sypké komponenty byly rozmíchány v 1 litru destilované vody, následně bylo pipetou přidáno 0,5 ml tweenu 80.
- 3) Úprava pH na 7 přidavkem 1 M NaOH.
- 4) Do penicilínek bylo napipetováno 9 ml roztoku pomocí automatické pipety.
- 5) Penicilínky byly dány do vodní lázně, následně probublány CO<sub>2</sub> a hermeticky uzavřeny pomocí špuntu a hliníkového víčka. Došlo tak k vytvoření anaerobního prostředí.
- 6) Sterilizace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

### **Wilkins-Chalgren bujón se sójovým peptonem**

- 1) Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 33 g Wilkins-Chalgren bujónu, 0,5 g cysteinu (Sigma) a 5 g sójového peptonu.
- 2) Sypké komponenty byly rozmíchány v 1 litru destilované vody, pipetou bylo přidáno 1 ml tweenu 80.
- 3) Úprava pH na 7 přidavkem 1 M NaOH.
- 4) Do penicilínek bylo napipetováno 9 ml roztoku pomocí automatické pipety.
- 5) Penicilínky byly dány do vodní lázně, následně probublány CO<sub>2</sub> a hermeticky uzavřeny pomocí špuntu a hliníkového víčka.
- 6) Sterilizace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

### **Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem**

- 1) Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 4,3 g Wilkins-Chalgren agaru, 0,05 g cysteinu (Sigma) a 0,5 g sójového peptonu.
- 2) Sypké komponenty byly smíchány se 100 ml destilované vody a 0,1 ml tweenu 80.
- 3) Baňka s agarem byla uzavřena pomocí alobalu.
- 4) Sterilizace v Papinově hrnci po dobu 60 minut.
- 5) Temperace agaru ve vodní lázni na teplotu 48 °C.

### **Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, mupirocinem a octovou kyselinou**

Pro selektivní stanovení bifidobakterií bylo připraveno 100 ml Wilkins-Chalgren agaru se sójovým peptonem. Po vytemperování na teplotu 48 °C bylo přidáno antibiotikum mupirocin (10 mg) a 0,1 ml octové kyseliny.

### **MacConkey agar**

- 1) Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 5,2 g připravené sypké směsi.
- 2) K sypké směsi bylo přidáno 100 ml destilované vody.
- 3) Erlenmeyerova baňka s agarem byla uzavřena pomocí alobalu.
- 4) Sterilizace v Papinově hrnci po dobu 60 minut.
- 5) Temperace agaru ve vodní lázni na teplotu 48 °C
- 6) Nalítí agaru na Petriho misky, případně před očkováním bakterií nechat vyschnout povrch misek.

### **TBX agar**

- 1) Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 3,66 g agaru.
- 2) Sypká směs byla smíchána se 100 ml destilované vody.
- 3) Baňka byla uzavřena pomocí alobalu.
- 4) Sterilizace při 121 °C po dobu 15 minut.
- 5) Temperace na teplotu 48 °C.
- 6) Nalítí agaru na misky, po utužení použití k rozboru.

TBX agar byl použit pro izolaci *Escherichia coli* (EC5) ze stolice kojence.

Všechny komponenty používané do medií jsou od firmy Oxoid UK.

## **4.4 Testování růstu střevních bakterií v enterální výživě**

Z čisté rozmražené kultury bakterií bylo přeočkováno 0,3–0,5 ml roztoku do Wilkins-Chalgren bujónu. Bakterie byly kultivovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C v termostatu. Následně byla zkontrolována čistota kultury, pomocí fázově kontrastního mikroskopu Nikon ECLIPSE E200.

Kultura bakterií byla naředěna pomocí desítkového ředění, z důvodu počítatelného množství kolonií. Narostlá kultura (ředění 10<sup>0</sup>, cca 10<sup>8</sup>/ml) byla zředěna v ředícím roztoku tak, že bylo nabráno 1 ml roztoku bakterií a dána do penicilínky s 9 ml ředícího roztoku, takto

naředěný roztok měl koncentraci v 1 ml cca  $10^7$  bakterií (ředění  $10^{-1}$ ). Z tohoto roztoku byl opět nabrán 1 ml a dán do dalšího ředícího roztoku, tento roztok měl koncentraci cca  $10^6$  (ředění  $10^{-2}$ ), takto bylo pokračováno až do koncentrace cca  $10^1$  bakterií v 1 ml (ředění  $10^{-7}$ ). K rozborům bylo využito ředění  $10^{-3}$  (do mikrotitrační destičky),  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  (na rozbor 0 hodin).

### **Rozbor 0 hodin:**

#### 1. Bifidobakterie, klostridie, laktobacily

Z ředění  $10^{-7}$  bylo odebráno 0,5 ml roztoku do Petriho misky, přelito W-Ch agarem a důkladně rozmícháno. Stejným způsobem byla zaočkována i druhá miska, poté bylo očkováno ředění  $10^{-6}$  (také do 2 misek). Důležitá je aseptická práce, aby nedošlo ke kontaminaci z vnějšího prostředí. Petriho misky byly uzavřeny do anaerostatu, kde bylo vytvořeno anaerobní prostředí (Anaerogen). Kultivace probíhala v termostatu při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 48 hodin. Po 48 hodinách byly ručně spočítány narostlé kolonie, případně pod mikroskopem byla zkontrolována čistota kolonií. Počty kolonií byly přepočítány na log KTJ/g.

#### 2. *Escherichia coli*

Z ředění  $10^{-7}$  bylo očkováno 0,1 ml roztoku bakterií na misku s tuhým Wilkins-Chalgren agarem, následně byl roztok rozetřen kličkou po celé ploše agaru. Stejným způsobem byla zaočkována i druhá miska, poté bylo očkováno ředění  $10^{-6}$  (také do 2 misek). Misky byly kultivovány za aerobních podmínek v termostatu při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 24 hodin. Následně byly spočítány narostlé kolonie a pod mikroskopem zkontrolována čistota. Počty kolonií byly přepočítány na log KTJ/g.

### **Rozbor v mikrotitrační destičce**

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno růstové medium. Pro 1 kmen 4 jamky s 90  $\mu\text{l}$  enterální výživy, 2 jamky s 90  $\mu\text{l}$  bujónu a 2 jamky s 90  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku.

Enterální výživa byla použita buď čistá, nebo byla obohacena o lysozym. Lysozym byl připraven ze sypkého prášku rozpuštěného v API mediu na koncentraci 1000 mg/l. Roztok lysozymu byl přefiltrován pomocí stříkačkového filtru, kvůli riziku kontaminace. Enterální výživa Modulén IBD byla připravena podle návodu na obale, smícháním 2,37 g suché směsi do 10 ml sterilní destilované vody.

Do připravených kultivačních medií bylo mikropipetou pipetováno 10 µl kultury (cca 10<sup>3</sup> KTJ/ml). Destička byla uzavřena, dána do anaerostatu a bylo vytvořeno anaerobní prostředí (Anaerogen). Kultivace pro všechny bakterie (bifidobakterie, klostridie, laktobacily, *E. coli*) probíhala stejně, tj. při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin v termostatu. Po 24 hodinách byla mikrotitrační destička otevřena a využita k rozboru 24 hodin.

V destičce, ve které byly bifidobakterie a laktobacily, bylo změřeno pH (pomocí pH papírků a Reflektoquantu) a množství mléčné kyseliny (pomocí Reflektoquantu). V případě klostridií a *E. coli* bylo změřeno pouze pH (pH papírkem a na Reflektoquantu).

### **Rozbor 24 hodin**

Z jamek mikrotitrační destičky, ve které byly enterální výživy a Wilkins-Chalgren bujón, bylo odpipetováno 10 µl do zkumavek s bujónem, odtud bylo klasicky provedeno desítkové ředění do ředících roztoků. Do Petriho misek bylo napipetováno 0,5 ml roztoku, přelito agarem a rozmícháno. Byly očkovány 3 ředění ve 2 opakováních. Ředění byla zvolena podle zákalu a pH. Při růstu bakterií dochází ke koagulaci enterální výživy.

Misky s bifidobakteriemi, klostridiemi a laktobacily byly uzavřeny do anaerostatu, vytvořeno anaerobní prostředí (Anaerogen) a kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Po 48 hodinách byly spočítány narostlé kolonie, které byly prohlédnuty pod mikroskopem.

Misky pro stanovení *E. coli* byly očkovány roztěrem v množství 0,1 ml. Kultivace probíhala za aerobních podmínek v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Množství kolonií bylo přepočítáno na log KTJ/g (kolonii tvořících jednotek na 1 gram). Výsledky byly dále statisticky vyhodnoceny.

### **Testování enterální výživy s tweenem 80**

Enterální výživa s lysozymem pro růst *Escherichia coli* byla obohacena o tween 80 v koncentraci 5 ml/l. Tween 80 má detergentní účinek a měl by být schopen narušit vnější membránu a umožnit lysozymu přístup k peptidoglykanové vrstvě buněčné stěny

Rozbor byl prováděn stejným způsobem jako testování růstu v čisté výživě nebo výživě obohacené o lysozym. Množství kolonií bylo přepočítáno na log KTJ/g a výsledky byly statisticky vyhodnoceny.



## **Testování společného růstu bifidobakterií a *Escherichia coli* v 1 výživě**

Narostlé kultury *Bifidobacterium bifidum* JOV a probiotická *Escherichia coli* Nissle 1917 byly smíchány v poměru 10 ml bifidobakterií a 0,1 ml *E. coli*. Bakterie byly naočkovány do enterálních výživ obohacených o lysozym (100 mg/l) do mikrotitrační destičky. Postup byl stejný jako předchozí rozbory.

Kultivace bakterií probíhala pro bifidobakterie v agaru Wilkins-Chalgren se sójovým peptonem s mupirocinem a octovou kyselinou, za anaerobních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Růst *E. coli* byl stanoven na agaru MacConkey roztěrem, za aerobních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Následně byly narostlé kolonie spočítány a statisticky vyhodnoceny.

### **4.5 Stanovení koncentrace lysozymu difuzní metodou**

Množství lysozymu v různých vzorcích bylo stanoveno pomocí difuzní metody. V této metodě se používá bakterie citlivá na lysozym, *Micrococcus luteus*. Na misky byl napipetován 1 ml bifipufu, do kterého byla nanesena kolonie čerstvě narostlého mikrokoka. Suspenze byla přelita agarem Wilkins-Chalgren se sójovým peptonem, agar musí na misce dostatečně ztuhnout. Po utužení byly do agaru vytvořeny jamky, do kterých byly napipetovány připravené vzorky a standardy v množství 50 µl, podle nichž byla vytvořena kalibrační křivka.

Během inkubace po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C lysozym difunduje z jamek do agaru a dochází tak k lýze buněk. V agaru se vytvoří inhibiční zóny, které byly změřeny a zaneseny do kalibrační křivky. Koncentrace lysozymu byla spočítána podle exponenciální rovnice. Standardy byly použity v koncentracích 10, 20, 100 a 1000 mg/l.

## 5 VÝSLEDKY

V této diplomové práci byl sledován růst střevních bakterií (bifidobakterií, klostridií, laktobacilů a *E. coli*) v různých enterálních výživách, následně byly enterální výživy obohaceny o lysozym (100 mg/l), jako kontrolní medium byl použit Wilkins-Chalgren bujón. Počty narostlých kolonií byly převedeny na hodnoty log KTJ/g. Hodnoty byly statisticky vyhodnoceny v programech Statgraphics Centurion (Multiple range tests) a Microsoft Office Excel 2007 (t-test). Dále byla naměřena hodnota pH a případně množství vyprodukované mléčné kyseliny po 24 hodinách kultivace.

### 5.1 Růst bakterií v enterálních výživách

Pro porovnání růstu sedmi bifidobakterií v enterální výživě s lysozymem byla použita čistá enterální výživa, která byla již testována v bakalářské práci. Hodnoty růstu se statisticky významně liší mezi jednotlivými kmeny i mezi druhy enterálních výživ. Nejnižší růst byl sledován u BB12 ve Fresubinu Jahoda, nejlépe rostl kmen BV ve Fortini Neutral (tab. 5).

Celkem bylo testováno šest klostridií na čtyřech enterálních výživách. Naměřené hodnoty růstu bakterií u Fortinu Netral, Fresubin Neutral a Jahoda byly použity z bakalářské práce. Hodnoty po porovnání s nově testovaným Modulnem IBD se statisticky významně liší mezi kmeny i mezi druhy enterálních výživ (tab. 5). Nejvyšší růst byl sledován u KA v Modulnu IBD, nejnižší růst pak u FJJW2 ve Fresubinu Neutral.

Ve skupině sedmi laktobacilů ve čtyřech enterálních výživách se hodnoty růstu statisticky významně liší, jak mezi kmeny, tak mezi druhy enterálních výživ. Nejvyšší růst v čisté enterální výživě byl sledován u AM ve Fortini Neutral, naopak nejnižší hodnota byla u SH ve Fresubinu Neutral. Modulen IBD podporuje nejlépe růst laktobacilů, počty bakterií neklesly pod 9 log KTJ/g (tab. 5).

Růst *E. coli* byl sledován u pěti kmenů na čtyřech enterálních výživách. Růst v enterální výživě se statisticky významně liší mezi kmeny i mezi enterálními výživami. Nejméně rostl kmen EC1 ve Fortini Neutral, který ale zároveň rostl nejlépe ve Fresubinu Vanilka. Celkový růst byl v počtech téměř  $10^9$  KTJ/g (tab. 5).

**Tabulka 5: Růst bakterií v enterálních výživách**

	<b>MODULEN IBD</b>	<b>FORTINI NEUTRAL</b>	<b>F. NEUTRAL/ VANILKA*</b>	<b>FRESUBIN JAHODA</b>
<b>DAN</b>	5,18±0,01 <sup>1B</sup>	5,42±0,05 <sup>2A</sup>	5,57±0,03 <sup>2B</sup>	5,46±0,15 <sup>2B</sup>
<b>BB12</b>	5,01±0,04 <sup>2A</sup>	5,30±0,00 <sup>3A</sup>	4,92±0,13 <sup>2A</sup>	4,30±0,00 <sup>1A</sup>
<b>BM</b>	7,81±0,22 <sup>1E</sup>	8,38±0,01 <sup>2C</sup>	8,44±0,01 <sup>23F</sup>	8,63±0,07 <sup>3C</sup>
<b>JKM</b>	7,40±0,02 <sup>1D</sup>	7,47±0,09 <sup>1B</sup>	7,47±0,12 <sup>1D</sup>	9,00±0,10 <sup>2E</sup>
<b>JOV</b>	7,37±0,01 <sup>1D</sup>	8,26±0,01 <sup>3C</sup>	7,83±0,05 <sup>2E</sup>	8,57±0,06 <sup>4C</sup>
<b>TP1</b>	6,75±0,02 <sup>1C</sup>	8,93±0,01 <sup>4D</sup>	7,09±0,02 <sup>2C</sup>	8,65±0,05 <sup>3C</sup>
<b>BV</b>	7,47±0,00 <sup>1D</sup>	9,15±0,15 <sup>4E</sup>	8,34±0,00 <sup>2F</sup>	8,79±0,03 <sup>3D</sup>
<b>ŠIM1</b>	9,06±0,29 <sup>3D</sup>	8,13±0,01 <sup>12B</sup>	8,06±0,02 <sup>1A</sup>	8,39±0,03 <sup>2C</sup>
<b>FW2</b>	7,98±0,02 <sup>1B</sup>	9,11±0,03 <sup>2E</sup>	8,00±0,06 <sup>1A</sup>	8,00±0,01 <sup>1A</sup>
<b>KA</b>	6,53±0,04 <sup>1A</sup>	8,26±0,02 <sup>4C</sup>	8,01±0,05 <sup>2A</sup>	8,19±0,00 <sup>3B</sup>
<b>T2</b>	8,54±0,16 <sup>12C</sup>	8,39±0,02 <sup>1D</sup>	8,37±0,01 <sup>1B</sup>	8,77±0,19 <sup>2D</sup>
<b>FJJW2</b>	9,18±0,21 <sup>2D</sup>	8,41±0,02 <sup>1D</sup>	9,24±0,03 <sup>2D</sup>	9,04±0,04 <sup>2E</sup>
<b>CM14</b>	8,09±0,06 <sup>2B</sup>	8,01±0,05 <sup>1A</sup>	8,54±0,01 <sup>3C</sup>	8,09±0,00 <sup>2AB</sup>
<b>RU</b>	9,33±0,03 <sup>3B</sup>	9,35±0,07 <sup>3D</sup>	8,03±0,12 <sup>1A</sup>	8,77±0,10 <sup>2B</sup>
<b>SH</b>	9,36±0,00 <sup>2BC</sup>	9,41±0,03 <sup>4D</sup>	9,53±0,00 <sup>3E</sup>	9,29±0,03 <sup>1D</sup>
<b>JA</b>	9,17±0,02 <sup>4A</sup>	8,62±0,02 <sup>1C</sup>	8,76±0,00 <sup>2C</sup>	9,11±0,04 <sup>3C</sup>
<b>AM</b>	9,38±0,05 <sup>4C</sup>	7,84±0,06 <sup>1A</sup>	8,28±0,00 <sup>2B</sup>	9,26±0,04 <sup>3D</sup>
<b>MJ</b>	9,49±0,01 <sup>4E</sup>	7,90±0,28 <sup>1AB</sup>	9,22±0,02 <sup>3D</sup>	8,57±0,01 <sup>2A</sup>
<b>FE</b>	9,42±0,01 <sup>3D</sup>	7,93±0,03 <sup>1AB</sup>	9,43±0,03 <sup>1E</sup>	9,02±0,05 <sup>2C</sup>
<b>FJ</b>	9,49±0,00 <sup>3E</sup>	8,06±0,02 <sup>1B</sup>	8,07±0,12 <sup>1A</sup>	8,72±0,02 <sup>2B</sup>
<b>EC1</b>	9,20±0,03 <sup>2C</sup>	8,65±0,08 <sup>1B</sup>	9,45±0,01 <sup>2C</sup>	9,24±0,04 <sup>3C</sup>
<b>EC2</b>	9,43±0,05 <sup>3E</sup>	8,91±0,04 <sup>1D</sup>	9,41±0,03 <sup>2B</sup>	9,03±0,04 <sup>3C</sup>
<b>EC3</b>	9,05±0,05 <sup>3B</sup>	8,39±0,07 <sup>1A</sup>	8,80±0,00 <sup>3B</sup>	9,00±0,04 <sup>2A</sup>
<b>EC4</b>	8,78±0,06 <sup>12A</sup>	8,76±0,03 <sup>1C</sup>	8,82±0,07 <sup>2A</sup>	8,86±0,00 <sup>12A</sup>
<b>EC5</b>	9,28±0,00 <sup>2D</sup>	9,35±0,01 <sup>3E</sup>	9,02±0,02 <sup>3D</sup>	9,37±0,06 <sup>1B</sup>

Pozn.: Tabulka je rozdělena na 4 kategorie: bifidobakterie (BB12–BV), klostridie (ŠIM1–CM14), lactobacily (RU–FJ), *E. coli* (EC1–EC5). Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka. Indexy: číslice vyjadřují odlišnost v řádcích, písmena vyjadřují odlišnost ve sloupcích (hladina významnosti  $p < 0,05$ ). \* U *E. coli* byla místo Fresubinu Neutral použita výživa Fresubin Vanilka.

## 5.2 Růst bakterií v enterálních výživách s lysozymem

U sedmi bifidobakterií byl sledován růst ve čtyřech enterálních výživách obohacených o lysozym (100 mg/l). Hodnoty růstu bakterií se statisticky významně liší mezi kmeny i mezi druhy enterálních výživ. Nejnižší růst byl zaznamenán u BB12 v Modulenu IBD, nejvyšší růst byl u BM ve Fresubinu Neutral (tab. 6).

Růst klostridií byl sledován celkem u šesti kmenů ve čtyřech enterálních výživách. Hodnoty se statisticky významně liší mezi kmeny i mezi druhy enterálních výživ. Nejnižší růst byl sledován u FW2 ve Fortini Neutral, nejvyšší u FJJW2 ve Fresubinu Neutral (tab. 6). U Fresubinu Jahoda byla testována navíc ještě vyšší koncentrace lysozymu (200 mg/l), hodnoty se oproti koncentraci 100 mg/l statisticky neliší.

Růst laktobacilů byl testován u sedmi kmenů na čtyřech enterálních výživách s lysozymem (100 mg/l). Hodnoty růstu se statisticky významně liší, jak mezi kmeny, tak mezi druhy enterálních výživ (tab. 6). Laktobacily neměly problém ve výživách růst ve vysokých počtech. Nejnižší růst byl sledován u RU v Modulenu IBD, nejvyšší růst byl u SH v Modulenu IBD.

Růst v enterální výživě s lysozymem byl testován u pěti *E. coli* v pěti enterálních výživách. Hodnoty se statisticky významně liší mezi kmeny i mezi druhy výživ. Růst *E. coli* byl v hodnotách  $10^9$  KTJ/g. Nejnižší růst byl sledován u EC2 ve Fortini Neutral, nejvyšší pak u EC5 ve Fortini Neutral (tab. 6).

**Tabulka 6: Růst bakterií v enterálních výživách s lysozymem**

	MODULEN IBD	FORTINI NEUTRAL	FRESUBIN NEUTRAL	FRESUBIN JAHODA	F. JAHODA/ VANILKA*
DAN	4,48±0,05 <sup>2B</sup>	4,34±0,04 <sup>1A</sup>	5,34±0,04 <sup>3A</sup>	5,48±0,06 <sup>4A</sup>	NT
BB12	4,18±0,08 <sup>1A</sup>	4,68±0,10 <sup>2B</sup>	6,64±0,04 <sup>4B</sup>	5,35±0,12 <sup>3A</sup>	NT
BM	8,66±0,30 <sup>2F</sup>	8,21±0,02 <sup>1E</sup>	8,94±0,04 <sup>2F</sup>	8,16±0,06 <sup>1B</sup>	NT
JKM	7,93±0,01 <sup>1D</sup>	8,85±0,06 <sup>4G</sup>	8,35±0,01 <sup>2DE</sup>	8,60±0,12 <sup>3C</sup>	NT
JOV	7,88±0,04 <sup>2D</sup>	7,00±0,03 <sup>1D</sup>	8,46±0,02 <sup>4E</sup>	8,17±0,24 <sup>3B</sup>	NT
TP1	8,33±0,01 <sup>1E</sup>	8,69±0,13 <sup>2F</sup>	8,25±0,00 <sup>1D</sup>	8,83±0,05 <sup>3C</sup>	NT
BV	6,77±0,04 <sup>1C</sup>	6,80±0,02 <sup>1C</sup>	6,80±0,04 <sup>1C</sup>	8,23±0,21 <sup>2B</sup>	NT
ŠIM1	8,97±0,04 <sup>3D</sup>	8,24±0,07 <sup>1D</sup>	8,39±0,03 <sup>2C</sup>	8,50±0,03 <sup>3B</sup>	8,56±0,08
FW2	8,23±0,00 <sup>2B</sup>	6,80±0,06 <sup>1A</sup>	8,25±0,03 <sup>3B</sup>	9,21±0,01 <sup>3E</sup>	8,14±0,04
KA	7,23±0,02 <sup>2A</sup>	7,98±0,02 <sup>3B</sup>	8,29±0,05 <sup>4B</sup>	6,97±0,06 <sup>1A</sup>	6,27±0,02
T2	8,25±0,02 <sup>2B</sup>	8,16±0,00 <sup>1CD</sup>	8,94±0,04 <sup>3D</sup>	8,95±0,02 <sup>3C</sup>	8,53±0,15
FJJW2	9,21±0,02 <sup>2E</sup>	8,71±0,07 <sup>1E</sup>	9,39±0,02 <sup>3E</sup>	9,15±0,01 <sup>2D</sup>	8,94±0,00
CM14	8,72±0,01 <sup>3C</sup>	8,08±0,01 <sup>2C</sup>	7,72±0,08 <sup>1A</sup>	8,93±0,02 <sup>4C</sup>	8,63±0,02
RU	8,15 ± 0,01 <sup>1A</sup>	9,24 ± 0,07 <sup>3C</sup>	8,31 ± 0,17 <sup>1A</sup>	8,56 ± 0,09 <sup>2B</sup>	NT
SH	9,78 ± 0,03 <sup>3F</sup>	9,34 ± 0,05 <sup>1C</sup>	9,51 ± 0,05 <sup>2E</sup>	9,47 ± 0,04 <sup>2D</sup>	NT
JA	9,14 ± 0,04 <sup>2C</sup>	9,49 ± 0,03 <sup>3D</sup>	8,43 ± 0,05 <sup>1A</sup>	9,16 ± 0,05 <sup>2C</sup>	NT
AM	9,43 ± 0,01 <sup>3D</sup>	8,39 ± 0,08 <sup>1A</sup>	9,20 ± 0,00 <sup>2C</sup>	9,19 ± 0,07 <sup>2C</sup>	NT
MJ	8,95 ± 0,05 <sup>2B</sup>	8,57 ± 0,11 <sup>1B</sup>	9,35±0,01 <sup>3D</sup>	8,63 ± 0,01 <sup>1B</sup>	NT
FE	9,61 ± 0,05 <sup>3E</sup>	9,64 ± 0,04 <sup>3E</sup>	9,51±0,01 <sup>2E</sup>	9,43 ± 0,01 <sup>1D</sup>	NT
FJ	9,41 ± 0,01 <sup>4D</sup>	9,27 ± 0,06 <sup>3C</sup>	8,67±0,05 <sup>2B</sup>	8,40 ± 0,02 <sup>1A</sup>	NT
EC1	9,11±0,06 <sup>3C</sup>	8,60±0,04 <sup>1AB</sup>	9,32±0,05 <sup>4B</sup>	8,64±0,05 <sup>1A</sup>	8,90±0,05 <sup>2B</sup>
EC2	9,07±0,01 <sup>3C</sup>	8,54±0,08 <sup>1A</sup>	8,89±0,08 <sup>2A</sup>	8,56±0,05 <sup>1A</sup>	9,07±0,00 <sup>3C</sup>
EC3	8,84±0,03 <sup>2B</sup>	8,69±0,07 <sup>1B</sup>	8,93±0,02 <sup>2A</sup>	8,59±0,10 <sup>1A</sup>	8,70±0,04 <sup>1A</sup>
EC4	8,68±0,06 <sup>1A</sup>	8,70±0,02 <sup>1B</sup>	8,98±0,22 <sup>2A</sup>	8,83±0,05 <sup>12B</sup>	8,86±0,08 <sup>12B</sup>
EC5	9,35±0,05 <sup>3D</sup>	9,52±0,05 <sup>2C</sup>	9,19±0,01 <sup>4C</sup>	9,05±0,11 <sup>1C</sup>	9,09±0,08 <sup>12C</sup>

Pozn.: Tabulka je rozdělena na 4 kategorie: bifidobakterie (BB12–BV), klostridie (ŠIM1–CM14), lactobacily (RU–FJ), *E. coli* (EC1–EC5). Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka. Indexy: číslice vyjadřují odlišnost v řádcích, písmena vyjadřují odlišnost ve sloupcích (hladina významnosti  $p < 0,05$ ). \* U klostridií byl testován přídatek 200 mg/l lysozymu do EV Fresubin Jahoda, *E. coli* byla navíc testována ve Fresubinu vanilka. NT- netestováno.

### 5.3 Růst bakterií ve Wilkins-Chalgren bujónu se sójovým peptonem

Wilkins-Chalgren bujón se sójovým peptonem byl použit jako kontrolní medium pro sledování růstu bakterií. V tabulce 7 jsou uvedeny hodnoty v počátku růstu (0 hodin) a po 24 hodinách kultivace, dále jsou uvedeny hodnoty pH po 24 hodinách. Všem bakteriím toto medium prospívá a rostou zde ve vysokých počtech, tj. v počtech  $10^9$  KTJ/g. U bifidobakterií

byla naměřena hodnota pH po kultivaci okolo 5, u klostridií byla hodnota pH > 6. U skupiny laktobacily byla naměřena hodnota pH < 5. Růst všech kmenů *E. coli* u všech kmenů byl > 9 log KTJ/g, hodnota pH je okolo 6,5.

**Tabulka 7: Růst bakterií ve Wilkins-Chalgren bujónu**

	<b>0 HODIN</b>	<b>24 HODIN</b>	<b>pH</b>
<b>DAN</b>	4,38 ± 0,07	8,93 ± 0,03	5,20
<b>BB12</b>	5,08 ± 0,03	8,89 ± 0,21	4,70
<b>BM</b>	4,53 ± 0,05	9,07 ± 0,03	5,00
<b>JKM</b>	4,87 ± 0,04	9,06 ± 0,01	4,90
<b>JOV</b>	5,17 ± 0,06	8,86 ± 0,02	5,10
<b>TP1</b>	4,57 ± 0,04	9,29 ± 0,04	4,60
<b>BV</b>	4,67 ± 0,01	9,30 ± 0,00	4,80
<b>ŠIM1</b>	4,01 ± 0,06	8,85 ± 0,02	6,00
<b>FW2</b>	4,40 ± 0,05	9,33 ± 0,01	6,50
<b>KA</b>	2,97 ± 0,19	8,57 ± 0,06	6,50
<b>T2</b>	4,22 ± 0,07	9,36 ± 0,01	6,60
<b>FJJW2</b>	4,28 ± 0,26	9,43 ± 0,01	6,80
<b>CM14</b>	3,43 ± 0,08	9,10 ± 0,02	6,10
<b>RU</b>	4,37 ± 0,04	8,73 ± 0,19	4,10
<b>SH</b>	4,65 ± 0,03	9,33 ± 0,24	4,40
<b>JA</b>	4,98 ± 0,01	9,29 ± 0,00	4,40
<b>AM</b>	4,67 ± 0,05	9,35 ± 0,01	4,80
<b>MJ</b>	4,72 ± 0,01	9,38 ± 0,04	4,60
<b>FE</b>	4,96 ± 0,02	9,42 ± 0,09	4,75
<b>FJ</b>	4,39 ± 0,08	9,14 ± 0,05	4,60
<b>EC1</b>	4,37 ± 0,05	9,44 ± 0,01	6,40
<b>EC2</b>	4,37 ± 0,10	9,77 ± 0,05	6,50
<b>EC3</b>	4,52 ± 0,19	9,49 ± 0,04	6,50
<b>EC3</b>	4,78 ± 0,00	9,56 ± 0,04	6,80
<b>EC5</b>	4,89 ± 0,11	9,50 ± 0,01	6,60

Pozn.: Tabulka je rozdělena na 4 kategorie: bifidobakterie (BB12–BV), klostridie (ŠIM1–CM14), laktobacily (RU–FJ), *E. coli* (EC1–EC5). Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka.

#### **5.4 Růst rodu *Bifidobacterium***

Tabulka 8 ukazuje naměřené hodnoty pH a mléčnou kyselinu po kultivaci v enterální výživě s lysozymem. Hodnota pH u bifidobakterií byla naměřena v rozmezí 4,8–6,95. Nejvyšší množství mléčné kyseliny bylo naměřeno u JKM ve Fresubinu Neutral. U čisté enterální výživy se hodnota pH pohybovala od 5,00 do 6,95 (tab. 9).

**Tabulka 8: Hodnoty pH (mléčná kyselina v mg/l) v EV s lysozymem po kultivaci**

	DAN	BB12	BM	JKM	JOV	TP1	BV
<b>MODULEN IBD</b>	6,90 (335)	6,75 (245)	6,60 (275)	5,55 (575)	5,45 (495)	6,00 (170)	6,55 (195)
<b>FORTINI NEUTRAL</b>	6,80 (320)	6,35 (165)	5,00 (235)	4,90 (640)	6,40 (290)	5,00 (520)	6,30 (300)
<b>FRESUBIN NEUTRAL</b>	6,95 (255)	6,30 (255)	4,80 (470)	4,90 (1325)	5,10 (1040)	5,70 (430)	5,10 (1060)
<b>FRESUBIN JAHODA</b>	5,80 (413)	5,95 (493)	5,10 (850)	5,10 (780)	5,50 (770)	6,30 (733)	5,10 (955)

**Tabulka 9: Hodnoty pH v čisté EV po kultivaci**

	DAN	BB12	BM	JKM	JOV	TP1	BV
<b>MODULEN IBD</b>	6,60	6,80	6,95	5,95	5,90	6,80	6,65
<b>FORTINI NEUTRAL</b>	6,40	6,40	5,80	5,10	6,20	6,50	6,50
<b>FRESUBIN NEUTRAL</b>	6,30	6,80	5,20	5,20	5,10	6,60	5,00
<b>FRESUBIN JAHODA</b>	6,50	6,70	5,10	5,00	6,00	6,60	6,30

#### 5.4.1 Porovnání růstu bifidobakterií

Jednotlivé hodnoty růstu bifidobakterií byly porovnány ve všech výživách s lysozymem a v čistých výživách a bylo zjištěno, že se hodnoty statisticky liší pouze u kmene BV. Růst bifidobakterií zvířecího původu se statisticky liší od lidských bifidobakterií (tab. 10). Růst bifidobakterií zvířecího původu (DAN, BB12) se neliší v jednotlivých enterálních výživách s lysozymem a bez lysozymu. Stejně tak se neliší růst bifidobakterií lidského původu ve výživách s lysozymem a bez lysozymu (tab. 11).

**Tabulka 10: Porovnání růstu ve výživách s a bez lysozymu**

	EV s lysozymem	EV bez lysozymu
<b>DAN</b>	4,91 ± 0,50	5,41 ± 0,14
<b>BB12</b>	5,21 ± 0,92	4,88 ± 0,36
<b>BM</b>	8,49 ± 0,32	8,32 ± 0,31
<b>JKM</b>	8,43 ± 0,34	7,84 ± 0,67
<b>JOV</b>	7,88 ± 0,55	8,01 ± 0,45
<b>TP1</b>	8,52 ± 0,24	7,86 ± 0,95
<b>BV</b>	7,15 ± 0,62*	8,44 ± 0,63*
<b>DAN, BB12</b>	5,06 ± 0,76 <sup>a</sup>	
<b>BM-BV</b>	8,10 ± 0,69 <sup>b</sup>	

Pozn.: Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka ve všech výživách. Indexy: \* hodnoty se statisticky liší v řádcích, písmena vyjadřují odlišnost ve sloupci (hladina významnosti  $p < 0,05$ ).

**Tabulka 11: Porovnání růstu zvířecích a lidských bifidobakterií v čisté enterální výživě a s lysozymem**

		<b>MODULEN IBD</b>	<b>FORTINI NEUTRAL</b>	<b>FRESUBIN NEUTRAL</b>	<b>FRESUBIN JAHODA</b>
<b>DAN, BB12</b>	<b>EV -L</b>	4,33 ± 0,15	4,51 ± 0,17	5,99 ± 0,65	5,42 ± 0,07
	<b>EV</b>	5,10 ± 0,08	5,36 ± 0,06	5,25 ± 0,33	4,88 ± 0,58
<b>BM- BV</b>	<b>EV -L</b>	7,91 ± 0,64	7,91 ± 0,85	8,16 ± 0,72	8,40 ± 0,27
	<b>EV</b>	7,36 ± 0,34	8,44 ± 0,59	7,83 ± 0,51	8,73 ± 0,15

Pozn.: Tabulka je rozdělena na 2 kategorie: DAN, BB12 - bakterie zvířecího původu, BM–BV - bakterie lidského původu. Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka. Hodnoty se statisticky neliší (hladina významnosti  $p < 0,05$ ). EV-enterální výživy, EV-L-enterální výživy s lysozymem.

## 5.5 Růst rodu *Clostridium*

U klostridií byla měřena hodnota pH po kultivaci v enterální výživě s lysozymem (tab. 12), hodnoty se pohybují v rozmezí 4,40–6,45. V tabulce 13 jsou zaznamenány naměřené hodnoty pH v čisté enterální výživě, hodnoty se pohybují okolo 5.

**Tabulka 12: Hodnoty pH v EV s lysozymem po kultivaci**

	<b>ŠIM 1</b>	<b>FW2</b>	<b>KA</b>	<b>T2</b>	<b>FJJW2</b>	<b>CM14</b>
<b>MODULEN IBD</b>	4,90	5,50	6,45	5,10	5,20	5,20
<b>FORTINI NEUTRAL</b>	4,90	5,50	6,45	5,10	5,20	5,20
<b>FRESUBIN NEUTRAL</b>	4,60	5,30	5,10	5,10	5,60	5,20
<b>FRESUBIN JAHODA</b>	4,40	5,40	5,70	5,10	5,40	5,10
<b>F. JAHODA 200 mg/l</b>	4,30	5,10	6,60	5,00	5,20	5,00

**Tabulka 13: Hodnoty pH v EV po kultivaci**

	<b>ŠIM 1</b>	<b>FW2</b>	<b>KA</b>	<b>T2</b>	<b>FJJW2</b>	<b>CM14</b>
<b>MODULEN IBD</b>	5,20	5,40	5,60	5,10	5,20	5,20
<b>FORTINI NEUTRAL</b>	4,50	5,20	4,90	5,10	5,00	5,00
<b>FRESUBIN NEUTRAL</b>	4,90	5,30	5,10	4,70	5,00	5,50
<b>FRESUBIN JAHODA</b>	4,70	5,00	4,90	4,80	5,10	5,20

### 5.5.1 Porovnání růstu klostridií

Hodnoty růstu průměru jednotlivých kmenů klostridií ve všech enterálních výživách s lysozymem a bez lysozymu se statisticky neliší (tab. 14). Růst všech klostridií se statisticky neliší v jednotlivých výživách s a bez lysozymu (tab. 15).



**Tabulka 14: Porovnání růstu ve výživách s lysozymem a bez lysozymu**

	EV s lysozymem	EV bez lysozymu
<b>ŠIM1</b>	8,53 ± 0,27	8,41 ± 0,39
<b>FW2</b>	8,12 ± 0,86	8,27 ± 0,48
<b>KA</b>	7,62 ± 0,54	7,75 ± 0,71
<b>T2</b>	8,58 ± 0,37	8,52 ± 0,16
<b>FJJW2</b>	9,12 ± 0,25	8,97 ± 0,33
<b>CM14</b>	8,36 ± 0,49	8,18 ± 0,21

Pozn.: Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka růstu jednotlivých kmenů ve všech výživách. Hodnoty se statisticky neliší (hladina významnosti  $p < 0,05$ ).

**Tabulka 15: Porovnání růstu všech klostridií ve výživách s lysozymem a bez lysozymu**

	MODULEN IBD	FORTINI NEUTRAL	FRESUBIN NEUTRAL	FRESUBIN JAHODA
<b>EV-L</b>	8,44 ± 0,65	8,00 ± 0,58	8,50 ± 0,53	8,62 ± 0,77
<b>EV</b>	8,23 ± 0,88	8,39 ± 0,5	8,37 ± 0,44	8,41 ± 0,38

Pozn.: Hodnoty jsou průměry růstu všech klostridií (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka. Hodnoty se statisticky neliší (hladina významnosti  $p < 0,05$ ). EV-enterální výživy, EV-L-enterální výživy s lysozymem.

## 5.6 Růst rodu *Lactobacillus*

V enterální výživě s lysozymem se naměřená hodnota pH pohybuje v hodnotách od 4,00 do 5,35 (tab. 16). Nejvyšší množství mléčné kyseliny bylo naměřeno u FE ve Fresubinu Jahoda (tab. 17). Podobně je tomu v čisté enterální výživě, hodnota pH se pohybuje od 3,95 do 5,80 a nejvyšší naměřená hodnota mléčné kyseliny byla naměřena u FJ ve Fresubinu Neutral (tab. 18 a 19).

**Tabulka 16: Hodnoty pH v EV s lysozymem po kultivaci**

	RU	SH	JA	AM	MJ	FE	FJ
<b>MODULEN IBD</b>	5,30	4,40	4,70	5,00	5,30	4,45	4,90
<b>FORTINI NEUTRAL</b>	4,05	4,00	4,05	4,75	4,85	4,00	4,75
<b>FRESUBIN NEUTRAL</b>	5,00	4,30	4,85	4,70	5,00	4,90	4,85
<b>FRESUBIN JAHODA</b>	4,20	5,00	5,00	5,70	4,60	4,15	5,35

**Tabulka 17: Mléčná kyselina v EV s lysozymem po kultivaci (v mg/l)**

	RU	SH	JA	AM	MJ	FE	FJ
<b>MODULEN IBD</b>	4950	4740	4710	2830	1280	3550	2350
<b>FORTINI NEUTRAL</b>	2680	3030	3220	2580	2350	4220	2700
<b>FRESUBIN NEUTRAL</b>	4110	6000	2390	4030	5260	4010	6000
<b>FRESUBIN JAHODA</b>	5780	6220	8440	4100	6220	8280	3480

**Tabulka 18: Hodnoty pH v čisté EV po kultivaci**

	RU	SH	JA	AM	MJ	FE	FJ
<b>MODULEN IBD</b>	4,50	4,40	5,00	5,30	5,20	4,60	5,30
<b>FORTINI NEUTRAL</b>	4,00	3,95	4,00	4,75	4,75	4,00	4,60
<b>FRESUBIN NEUTRAL</b>	4,90	4,45	4,80	4,95	4,60	4,85	4,85
<b>FRESUBIN JAHODA</b>	5,20	5,10	4,70	5,80	5,50	5,00	5,30

**Tabulka 19: Mléčná kyselina v čisté enterální výživě po kultivaci (v mg/l)**

	RU	SH	JA	AM	MJ	FE	FJ
<b>MODULEN IBD</b>	4340	5750	5200	2160	2090	4060	2440
<b>FORTINI NEUTRAL</b>	3150	5060	3580	2040	2470	5300	2510
<b>FRESUBIN NEUTRAL</b>	4240	5560	2830	2810	4700	5860	5900
<b>FRESUBIN JAHODA</b>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

### 5.6.1 Porovnání růstu laktobacilů

Hodnoty růstu jednotlivých bakterií ve všech enterálních výživách s lysozymem a bez lysozymu se statisticky neliší (tab. 20).

**Tabulka 20: Porovnání růstu ve výživách s lysozymem a bez lysozymu**

	EV s lysozymem	EV bez lysozymu
<b>RU</b>	8,57 ± 0,42	8,87 ± 0,54
<b>SH</b>	9,53 ± 0,16	9,40 ± 0,09
<b>JA</b>	9,06 ± 0,39	8,92 ± 0,23
<b>AM</b>	9,05 ± 0,39	8,69 ± 0,65
<b>MJ</b>	8,88 ± 0,31	8,80 ± 0,62
<b>FE</b>	9,55 ± 0,08	8,95 ± 0,61
<b>FJ</b>	8,94 ± 0,42	8,59 ± 0,59

Pozn.: Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka jednotlivých kmenů ve všech výživách. Hodnoty se statisticky neliší (hladina významnosti  $p < 0,05$ ).

Hodnoty všech testovaných laktobacilů v enterální výživě s lysozymem a bez lysozymu byly zprůměrovány a porovnány na jednotlivých výživách. Bylo zjištěno, že se hodnoty statisticky liší pouze u výživy Fortini Neutral (tab. 21).

**Tabulka 21: Porovnání růstu na jednotlivých výživách**

	<b>MODULEN IBD</b>	<b>FORTINI NEUTRAL</b>	<b>FRESUBIN NEUTRAL</b>	<b>FRESUBIN JAHODA</b>
<b>EV-L</b>	9,21 ± 0,50	9,13 ± 0,44*	9,00 ± 0,48	8,98 ± 0,41
<b>EV</b>	9,38 ± 0,10	8,44 ± 0,64*	8,76 ± 0,60	8,96 ± 0,26

Pozn.: Hodnoty jsou průměry všech testovaných bakterií (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka. \*Hodnoty se statisticky liší ve sloupci (hladina významnosti  $p < 0,05$ ). EV-enterální výživy, EV-L-enterální výživy s lysozymem.

## 5.7 Růst rodu *Escherichia*

U testovaných enterálních výživ s lysozymem byla po kultivaci měřena hodnota pH, které se pohybovala od 4,8 do 5,55 (tab. 22). V tabulce 23 jsou naměřené hodnoty pH po kultivaci v čistých enterálních výživách. Hodnota pH se pohybovala od 5,0 do 5,8.

**Tabulka 22: Hodnoty pH v EV s lysozymem po kultivaci**

	<b>EC1</b>	<b>EC2</b>	<b>EC3</b>	<b>EC4</b>	<b>EC5</b>
<b>MODULEN IBD</b>	5,50	5,40	5,45	5,15	5,40
<b>FORTINI NEUTRAL</b>	5,15	5,15	5,15	4,90	5,10
<b>FRESUBIN NEUTRAL</b>	5,25	5,10	5,55	4,90	4,80
<b>FRESUBIN JAHODA</b>	5,05	5,15	5,10	5,00	5,10
<b>FRESUBIN VANILKA</b>	5,30	5,10	5,30	5,30	5,30

**Tabulka 23: Hodnoty pH v čisté EV po kultivaci**

	<b>EC1</b>	<b>EC2</b>	<b>EC3</b>	<b>EC4</b>	<b>EC5</b>
<b>MODULEN IBD</b>	5,80	5,80	5,80	5,80	5,40
<b>FORTINI NEUTRAL</b>	5,20	5,00	5,00	5,20	5,20
<b>FRESUBIN VANILKA</b>	5,10	5,00	5,10	5,10	5,30
<b>FRESUBIN JAHODA</b>	5,30	5,30	5,00	5,20	5,00

### 5.7.1 Porovnání růstu *E. coli*

Byly porovnány růsty *E. coli* v enterálních výživách s lysozymem a v čisté formě. Hodnoty růstu jednotlivých kmenů se statisticky neliší v průměrech enterálních výživ s a bez lysozymu (tab. 24). Při porovnání všech kmenů v enterální výživě, s lysozymem a bez lysozymu, bylo zjištěno, že se hodnoty liší pouze u enterální výživy Fresubin Jahoda (tab. 25).

**Tabulka 24: Porovnání růstu ve výživách s lysozymem a bez lysozymu**

	EV s lysozymem	EV bez lysozymu
<b>EC1</b>	8,81 ± 0,21	9,14 ± 0,30
<b>EC2</b>	8,81 ± 0,26	9,20 ± 0,23
<b>EC3</b>	8,71 ± 0,09	8,81 ± 0,26
<b>EC4</b>	8,77 ± 0,08	8,81 ± 0,04
<b>EC5</b>	9,25 ± 0,19	9,26 ± 0,14

Pozn.: Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka růstu jednotlivých kmenů ve všech výživách. Hodnoty se statisticky neliší (hladina významnosti  $p < 0,05$ ).

**Tabulka 25: Porovnání růstu na jednotlivých výživách**

	MODULEN IBD	FORTINI NEUTRAL	FRESUBIN JAHODA	FRESUBIN VANILKA
<b>EV-L</b>	9,01 ± 0,23	8,81 ± 0,36	8,73 ± 0,18*	8,92 ± 0,14
<b>EV</b>	9,15 ± 0,22	8,81 ± 0,32	9,10 ± 0,18*	9,10 ± 0,28

Pozn.: Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka růstu všech bakterií. \*Hodnoty se statisticky liší ve sloupcích (hladina významnosti  $p < 0,05$ ). EV-enterální výživy, EV-L-enterální výživy s lysozymem.

## 5.8 Porovnání různých bakterií

V tabulce 26 jsou hodnoty růstu skupin bakterií, které byly porovnány v rámci sloupců. Hodnoty se statisticky liší, respektive růst bifidobakterií se odlišuje od ostatních bakterií (levá strana tabulky). Při rozdělení skupiny bifidobakterií na lidské a animální bylo zjištěno, že se všechny porovnávané skupiny statisticky liší (pravá strana tabulky). Průměry růstu jednotlivých skupin bakterií byly porovnány v rámci řádků, tedy rozdíl na výživách s lysozymem a bez lysozymu a bylo zjištěno, že hodnoty statisticky neliší u žádné skupiny bakterií.

**Tabulka 26: Porovnání bakterií na všech výživách s lysozymem a bez lysozymu**

	EV s lysozymem	EV bez lysozymu	EV s lysozymem	EV bez lysozymu	
<b>Laktobacily</b>	9,08 ± 0,47 <sup>B</sup>	8,89 ± 0,57 <sup>B</sup>	9,08 ± 0,47 <sup>d</sup>	8,89 ± 0,57 <sup>c</sup>	
<b><i>E. coli</i></b>	8,87 ± 0,27 <sup>B</sup>	9,04 ± 0,29 <sup>B</sup>	8,87 ± 0,27 <sup>cd</sup>	9,04 ± 0,29 <sup>c</sup>	
<b>Bifidobakterie</b>	7,23 ± 1,54 <sup>A</sup>	7,25 ± 1,45 <sup>A</sup>	5,06 ± 0,76 <sup>a</sup>	5,15 ± 0,18 <sup>a</sup>	DAN, BB12
			8,10 ± 0,69 <sup>b</sup>	8,09 ± 0,53 <sup>b</sup>	BM-BV
<b>Klostridie</b>	8,39 ± 0,68 <sup>B</sup>	8,35 ± 0,56 <sup>B</sup>	8,39 ± 0,68 <sup>bc</sup>	8,35 ± 0,56 <sup>b</sup>	

Pozn.: Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka všech bakterií jednotlivých skupin ve všech enterálních výživách. Hodnoty se statisticky liší, indexy písmen vyjadřují odlišnost ve sloupcích (hladina významnosti  $p < 0,05$ ).

V tabulce 27 byly porovnány hodnoty růstu bakterií v enterálních výživách s lysozymem s růstem ve Wilkins-Chalgren bujónu a bylo zjištěno, že se hodnoty neliší pouze u laktobacilů, u ostatních bakterií se liší (levá strana). Ovšem při porovnání enterálních výživ bez lysozymu a W-CH bujónu se hodnoty liší ve všech testovaných skupinách (pravá strana).

**Tabulka 27: Porovnání růstu ve výživách s lysozymem s růstem ve Wilkins-Chalgren bujónu**

	EV s lysozymem	W-Ch bujón	EV bez lysozymu	W-Ch bujón
<b>Laktobacily</b>	9,08 ± 0,47	9,23 ± 0,22	8,89 ± 0,57*	9,23 ± 0,22*
<i>E. coli</i>	8,87 ± 0,27*	9,55 ± 0,12*	9,04 ± 0,29*	9,55 ± 0,12*
<b>Bifidobakteri</b>	7,23 ± 1,54*	9,06 ± 0,17*	7,25 ± 1,45*	9,06 ± 0,17*
<b>Klostridie</b>	8,39 ± 0,68*	9,11 ± 0,31*	8,35 ± 0,56*	9,11 ± 0,31*

Pozn.: Tabulka je rozdělena na 2 oddíly. Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka všech bakterií jednotlivých skupin ve všech enterálních výživách. \*Hodnoty se statisticky liší v řádcích (hladina významnosti  $p < 0,05$ ).

Na závěr byly porovnány všechny bakterie testované v enterální výživě s lysozymem, v čisté enterální výživě a ve W-Ch bujónu. Testem ANOVA bylo zjištěno, že hodnoty růstu bakterií statisticky neliší (tab. 28).

**Tabulka 28: Porovnání růstu všech bakterií**

Celkové průměry růstu všech bakterií	
<b>Enterální výživy s lysozymem</b>	8,39 ± 0,72
<b>Enterální výživy</b>	8,38 ± 0,70
<b>Wilkins-Chalgren bujón</b>	9,24 ± 0,19

Pozn.: Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka všech bakterií ve všech enterálních výživách s lysozymem, bez lysozymu a ve Wilkins-Chalgren bujónu se sójovým peptonem. Hodnoty se statisticky neliší (hladina významnosti  $p < 0,05$ ).

## 5.9 Růst *E. coli* v enterálních výživách s lysozymem a tweenem 80

Všechny používané *E. coli* byly testovány v enterální výživě obohacené o lysozym (100 mg/l) a tween 80. Bylo zjištěno, že hodnoty se v rámci sloupců statisticky významně liší (tab. 29). Použití tweenu v kombinaci s lysozymem pro vyvolání antimikrobiálního účinku nebylo prokázáno.

**Tabulka 29: Růst *E. coli* v enterální výživě s lysozymem a tweenem**

	FRESUBIN NEUTRAL	FRESUBIN JAHODA
EC1	9,03±0,01 <sup>B</sup>	9,01±0,06 <sup>B</sup>
EC2	8,93±0,01 <sup>AB</sup>	9,00±0,11 <sup>B</sup>
EC3	8,94±0,08 <sup>AB</sup>	8,84±0,09 <sup>A</sup>
EC4	8,81±0,13 <sup>A</sup>	9,01±0,06 <sup>B</sup>
EC5	9,05±0,15 <sup>B</sup>	9,24±0,04 <sup>C</sup>

Pozn.: Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka. Indexy písmen vyjadřují odlišnost ve sloupcích (hladina významnosti  $p < 0,05$ ).

### 5.10 Růst kombinace bifidobakterií a *E. coli* v EV s lysozymem

Při testování společného růstu bifidobakterií a *E. coli*, bylo zjištěno, že *E. coli* očkované ve 100 × menším množství než bifidobakterie, rostou ve vyšších počtech přibližně o 2 řády (tab. 30).

**Tabulka 30: Růst bifidobakterií s *E. coli***

	JOV	EC2
MODULEN IBD	7,11±0,01 <sup>B</sup>	9,19±0,01 <sup>B</sup>
FORTINI NEUTRAL	6,45±0,13 <sup>A</sup>	8,93±0,09 <sup>A</sup>
FRESUBIN NEUTRAL	7,39±0,01 <sup>C</sup>	8,95±0,01 <sup>A</sup>
FRESUBIN JAHODA	7,94±0,00 <sup>D</sup>	8,96±0,01 <sup>A</sup>

Pozn.: Hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ± směrodatná odchylka. Indexy písmen vyjadřují odlišnost ve sloupcích (hladina významnosti  $p < 0,05$ ).

### 5.11 Stanovení lysozymu difúzní metodou

Stanovení lysozymu difúzní metodou bylo stanoveno u vaječného bílku, u tří vzorků lidských slin a u tří vzorků mateřského mléka. U vzorku stolice nebyla naměřena žádná inhibiční zóna. Inhibiční zóny byly přepočítány a bylo zjištěno, že nejvyšší koncentraci lysozymu obsahuje vaječný bílek (tab. 32).

**Tabulka 31: Standardy lysozymu**

Koncentrace lysozymu (µg/ml)	log y	Inhibiční zóna (mm) x
10	1	7
100	2	13
1000	3	22,5

Pozn.: Hodnoty jsou průměry ze 3 měření.

Koncentrace lysozymu byla vypočítána podle následující rovnice:

$$y = b \cdot a^x$$

$$\log y = ax + \log b$$

$$a = (\log y_2 - \log y_1) / (x_2 - x_1)$$

$$a = (3 - 1) / (22,5 - 7)$$

$$a = 0,129$$

$$\log b = \log y - ax$$

$$\log b = 2 - 0,129 \cdot 13$$

$$\log b = 0,323$$

$$\log y = 0,129x + 0,323$$

Tabulka 32: Zjištěné koncentrace lysozymu v různých vzorcích

Vzorek	Inhibiční zóna (mm)	Koncentrace lysozymu ( $\mu\text{g/ml}$ )
Vaječný bílek	26,5	5514
Sliny 1	14,0	141 $\pm$ 41
Sliny 2	17,5	267 $\pm$ 39
Sliny 3	14,5	172 $\pm$ 72
Mateřské mléko 1	11,0	55
Mateřské mléko 2	7,09	17
Mateřské mléko 3	8,0	23

Pozn.: Hodnoty jsou průměry ze 2 měření.

## 6 DISKUZE

Hypotézou diplomové práce bylo, že různé druhy enterální výživy budou podporovat růst příznivých probiotických bakterií (bifidobakterií a laktobacilů), ale potlačovat růst potenciálně patogenních bakterií (*E. coli*, klostridií). Růst bifidobakterií a klostridií byl částečně sledován v bakalářské práci. Přídavkem antimikrobiálního enzymu lysozymu do enterálních výživ bylo sledováno, zda dojde k inhibici některé ze sledovaných skupin bakterií.

Ze všech sledovaných skupin bakterií vykazuje nejnižší růst v enterálních výživách s lysozymem i v čistých enterálních výživách rod *Bifidobacterium*, hodnoty jsou statisticky významné. Kmeny zvířecího původu rostou v počtech okolo  $10^5$  KTJ/g. Tyto bakterie jsou používány zejména do mléčných fermentovaných výrobků kvůli své technologické odolnosti. V kravském mléce vydrží i po dobu 175 dnů v počtech  $10^6$  KTJ/g, lidské bifidobakterie jsou v nižších počtech již po 3 dnech skladování (Rada, 1997).

Gagnon et al. (2004) testovali pět kmenů bifidobakterií vyizolovaných ze stolice kojenců na odolnost vůči lysozymu, všechny kmeny tolerovaly koncentraci lysozymu do 300 mg/l. Rada et al. (2010) sledovali růst bifidobakterií v přítomnosti lysozymu v koncentraci 400 mg/l, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 1 byl citlivější než ostatní bifidobakterie. Oproti kontrole vykazoval růst přibližně o jeden řád nižší. Podle Kunová et al. (2012) byly bifidobakterie vyizolované ze stolice kojence rezistentní vůči lysozymu. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* byl citlivý na koncentraci lysozymu 400 mg/l. Toto potvrzuje i studie Rockova et al (2011a) kdy byly testovány kmeny DAN a BB12, oba jsou citlivé na koncentraci lysozymu 400 mg/l.

Bifidobakterie zvířecího původu (*B. animalis* subsp. *lactis*) rostly v mateřském mléce výrazněji méně než bifidobakterie lidské, hodnoty jsou strovnatelné s hodnotami růstu v enterální výživě, v počtech přibližně  $10^5$  KTJ/g (Rada et al., 2010). Při testování růstu bifidobakterií v různých mateřských mlékách bylo potvrzeno, že *Bifidobacterium animalis* DAN i BB12 roste v nižších počtech než lidské kmeny bifidobakterií (Rockova et al., 2011a). *Bifidobacterium animalis* není podporován prebiotickým inulinem (Rada et al., 2008). Inulin bývá součástí enterálních výživ, pokud jsou obohaceny o vlákninu. Z testovaných enterálních výživ byly o inulin obohaceny Fortini Neutral a Fresubin Energy Fibre Drink.

*Bifidobacterium bifidum* a *B. longum* vykazují podobný růst v enterální výživě jako v mateřském mléce. Rozdíl růstu těchto bakterií v kravském a v mateřském mléce je zhruba



o řád vyšší v mléce kravském (Rockova et al., 2011b). U bifidobakterií lidského původu bylo zjištěno, že kmen *Bifidobacterium longum* 1 (TP1) roste v různých mateřských mlékách odlišně, v porovnání s enterální výživou i v těch nejvyšších počtech je stále o řád nižší (Rockova et al., 2011a).

Klostridie lidského původu bývají rezistentní na lysozym (400 mg/l). Růst klostridií v enterální výživě s lysozymem i bez lysozymu je srovnatelný s hodnotami růstu v kravském mléce, mateřské mléko tyto bakterie výrazně nepodporuje (Rockova et al., 2011b). Prebiotikum inulin podporuje růst lidských klostridií (Rada et al., 2008).

Enterální výživa jako růstové medium pro bakterie lidského původu je vhodná, bakterie jsou zde schopny růst ve vysokých počtech. Jednoznačně se nedá říci, že by některý z testovaných kmenů rostl nejlépe ze všech, stejně tak žádná z enterálních výživ nepodporovala růst bakterií významně lépe než jiná. V nejvyšších počtech rostly v enterálních výživách bakterie *Escherichia coli* ( $9,04 \pm 0,29$  log KTJ/g), v enterálních výživách s lysozymem bakterie rodu *Lactobacillus* ( $9,08 \pm 0,47$  log KTJ/g). Je výhodné, aby lysozym neinhiboval růst laktobacilů z důvodu probiotického účinku v organismu. Bakterie musí odolávat ochranným bariérám a dostat se do tlustého střeva v dostatečném počtu.

Laktobacily produkovaly v enterální výživě s lysozymem i v čistě enterální výživě kyselinu mléčnou v množství několika gramů (g/l), čím došlo kde snížení pH na hodnoty až okolo 4, což je běžné u mléčných výrobků (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001). Bifidobakterie tvoří více octové kyseliny než mléčné, hodnoty jsou oproti laktobacilům nižší a pH je ale vyšší. Klostridie (*Cl. butyricum*) rozkládají bílkoviny a dochází tak ke zvýšení pH (Pahlow et al., 2003). Toto potvrzuje i sledování pH po kultivaci v enterální výživě, hodnoty jsou  $> 5$ . Podobně je tomu i u *E. coli*, tvorba kyselin nesnižuje pH pod hodnotu 5.

Obecně lze říci, že pro všechny sledované skupiny bakterií je nejlepší růstové medium Wilkins-Chalgren bujón se sójovým peptonem. Avšak hodnoty nejsou statisticky významné. Nejlépe v tomto mediu rostly bakterie *Escherichia coli* ( $9,55 \pm 0,12$  log KTJ/g), vlivem rozkladu bílkovin je hodnota pH  $> 6$ . Wilkins-Chalgren bujón podporuje růst bifidobakterií zvířecího původu, které enterální výživa podporuje nejméně, v počtech cca  $10^9$  KTJ/g.

Děti kojené mateřským mlékem mají zastoupené *E. coli* v počtech  $10^7$ – $10^8$  KTJ/g a bifidobakterie v počtech  $10^9$  KTJ/g (Benno et al., 1984). Tato situace byla simulována do enterální výživy obohacené o lysozym, kde byly použity probiotické kmeny *E. coli*

a bifidobakterií v poměru 1:100. Po kultivaci bylo zjištěno, že se poměr bakterií otočil ve prospěch *E. coli*. Enterální výživa tedy není optimální medium pro zachování fyziologického poměru bakterií ve střevě. I když byla použita *E. coli* Nissle 1917, která se používá jako probiotikum. *E. coli* patří mezi symbiotické bakterie trávicího traktu, ale nikdy by neměl přesáhnout jejich počet nad ty, které jsou zdraví prospěšné (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001).

Enzym lysozym inhibuje růst grampozitivních bakterií, čehož se využívá u stanovení jeho koncentrace v různých vzorcích. Množství lysozymu ve vaječném bílku je v množství několika gramů, právě proto je vaječný bílek i průmyslově využíván jako zdroj lysozymu. U mateřského mléka je množství lysozymu nižší, a to v hodnotách okolo 100 mg/l (Ročková et al., 2013), i když některé studie uvádí hodnoty vyšší. Důležité je, jakou metodou se lysozym stanovuje, difuzní metodou bývá obsah lysozymu nižší než například metodou ELISA (Ročková et al., 2013). Ve slinách je podobné množství ( $56 \pm 30$  mg/l) jako v mateřském mléce (Taylor et al., 1992).

V praktické části bylo zjištěno, že koncentrace lysozymu v mateřském mléce je velmi nízká ( $< 55$  mg/l), vyšší koncentrace byla naměřena ve slinách. V jednom ze vzorků byla koncentrace  $> 200$  mg/l, tento výsledek může být zapříčiněn spíše nepřesností difuzní metody. Koh et al. (2004) stanovovali lysozym u pacientů s lupénkou a zjistili, že tito lidé mají nižší množství lysozymu ve slinách (127,6 mg/l), ve srovnání s kontrolou (180,9 mg/l). Naměřené výsledky tedy odpovídají kontrolní skupině. Slzy obsahují v průměru okolo 1,3 g/l, což je zhruba 10 ti násobek než sliny. Zajímavé je, že koncentrace lysozymu roste v průběhu dne, ale s věkem klesá (Sen and Sarin, 1986). Zvýšené koncentrace lysozymu mohou mít souvislost s onemocněním. Při infekci v ústní dutině, která má souvislost s tvorbou zubního kazu, je zvýšena koncentrace lysozymu i histaminu ve slinách (Dodds et al., 2005).

Přítomnost lysozymu v mateřském mléce je jeden z faktorů ochrany před infekcemi u kojených dětí (Lønnerdal, 2003). Proto byl do enterálních výživ přidáván lysozym o koncentraci 100 mg/l. Na jedné z enterálních výživ byl testován růst klostridií v přítomnosti lysozymu v koncentraci 200 mg/l, avšak nedošlo k inhibici růstu bakterií. Růst bakterií se statisticky neliší oproti růstu bakterií v enterální výživě s lysozymem v koncentraci 100 mg/l.

Kromě sledování růstu v přítomnosti lysozymu u grampozitivních bakterií (bifidobakterie, laktobacily, klostridie) byl sledován i růst u gramnegativních *E. coli*,

koncentrace lysozymu 100 mg/l nezpůsobuje inhibici růstu těchto bakterií. Antimikrobiální aktivita lysozymu by na gramnegativní bakterie mohla fungovat, pokud by došlo k narušení buněčné stěny bakterií. Například laktoferin zvyšuje účinek lysozymu v jeho antimikrobiální aktivitě (Ellison and Giehl, 1991). Některé bakterie obsahují specifické inhibitory, pomocí kterých odolávají působení lysozymu. Testovaná *Escherichia coli*, která je za běžných podmínek odolná vůči lysozymu vaječného bílku, po inaktivaci inhibitoru lysozymu nebyla schopna ve vaječném bílku růst (Deckers et al., 2008).

Do enterálních výživ obohacených o lysozym byl přidán detergent tween 80 v koncentraci 5 ml/l, který by měl narušit vnější membránu a umožnit lysozymu přístup k peptidoglykanové vrstvě buněčné stěny. Po kultivaci bylo zjištěno, že se počet bakterií *E. coli* nesnížil oproti kontrole, tato koncentrace tweenu 80 v kombinaci s lysozymem je tedy neúčinná. Bylo by zajímavé testovat ještě nějakou jinou látku, která by narušila buněčnou stěnu a porovnat, zda se projevil antimikrobiální účinek lysozymu.

Je možné, že koncentrace lysozymu 100 mg/l je opravdu příliš nízká na to, aby se antimikrobiální účinek v *in vitro* podmínkách potvrdil. Rozhodující koncentrace bývá podle studií obvykle vyšší než 400 mg/l. Dále je důležité zmínit, že mateřské mléko obsahuje mnoho dalších látek, které v synergickém efektu napomáhají k antimikrobiálnímu účinku.

## 7 ZÁVĚR

- Ze všech testovaných skupin bakterií rostly v EV i EV s lysozymem v nejnižších počtech bifidobakterie zvířecího původu (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis-DAN*, BB12).
- Žádná z testovaných enterálních výživ nepodporuje růst střevních bakterií výrazně lépe než jiná.
- Žádný z testovaných kmenů střevních bakterií nerostl ve všech enterálních výživách výrazně lépe oproti ostatním.
- V nejvyšších počtech rostly v enterálních výživách bakterie rodu *Escherichia* ( $9,04 \pm 0,29$  log KTJ/g).
- V enterálních výživách s lysozymem rostly nejlépe bakterie rodu *Lactobacillus* ( $9,08 \pm 0,47$  log KTJ/g).
- Ve Wilkins-Chalgren bujónu rostly nejlépe bakterie rodu *Escherichia* ( $9,55 \pm 0,12$  log KTJ/g).
- Přídavek lysozymu v koncentraci 100 mg/l do enterální výživy neinhibuje růst bakterií, ani nepodporuje růst bakterií oproti růstu v čisté enterální výživě.
- Přídavek lysozymu a tweenu 80 v koncentraci 5 ml/l do enterální výživy neinhibuje růst *Escherichia coli*.
- Enterální výživa není vhodné medium pro zachování přirozeného poměru *E. coli* a bifidobakterií.
- Žádná z testovaných enterálních výživ neměla prebiotické účinky.

## 8 ZDROJE

- Ballard, O., Morrow, A. L. 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*. 60 (1). 49-74.
- Benno, Y., Sawada, K., Mitsuoka, T. 1984. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast- fed and bottle- fed infants. *Microbiology and Immunology*. 28 (9). 975-986.
- Berntson, L., Agback, P., Dicksved, J. 2016. Changes in fecal microbiota and metabolomics in a child with juvenile idiopathic arthritis (JIA) responding to two treatment periods with exclusive enteral nutrition (EEN). *Clinical Rheumatology*. 35 (6). 1501-1506.
- Berg, R. D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Mikrobiology*. 4 (11). 430-435.
- Biavati, B., Mattarelli, P. 2006. The Family Bifidobacteriaceae. *The Prokaryotes*. 3. 322-382.
- Boudeau, J., Glasser, A. L., Julien, S., Colombel, J. F., Darfeuille- Michaud, A. 2003. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 18 (1). 45-56.
- Brock, J. H. 2002. The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology*. 80 (1). 1-6.
- Burton, J. P., Drummond, B. K., Chilcott, C. N., Tagg, J. R., Thomson, W. M., Hale, J. D., Wescombe, P. A. 2013. Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Medical Mikrobiology*. 62 (6). 875-884.
- Callewaert, L., Michiels, C. W. 2010. Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*. 35 (1). 127-160.
- Clancy, R. 2003. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 38 (1). 9-12.

- Collins, M. D., Gibson, G. R. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 69 (5). 1052-1057.
- Coppa, G. V., Zampini, L., Galeazzi, T., Gabrielli, O. 2006. Prebiotics in human milk: a review. *Digestive and Liver Disease*. 38. 291-294.
- Costa, F., Mumolo, M. G., Ceccarelli, L., Bellini, M., Romano, M. R., Sterpi, C., Ricchiotti, A., Marchi, S., Bottai, M. 2005. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut*. 54(3). 364-368.
- Crohn, B. B., Ginzburg, L., Oppenheimer, G. D. 1932. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *Journal of the American Medical Association*. 99 (16). 1323-1329.
- Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. 2007. Review article: yeast as probiotics-*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 26 (6). 767-778.
- Dastych, M. 2012. Enterální výživa v klinické praxi. *Interní Medicína*. 14 (4). 152-156.
- Day, A. S., Lopez, R. N. 2015. Exclusive enteral nutrition in children with Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*. 21 (22). 6809-6816.
- Deckers, D., Vanlint, D., Callewaert, L., Aertsen, A., Michiels, C. W. 2008. Role of the lysozyme inhibitor Ivy in growth or survival of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in hen egg white and in human saliva and breast milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (14). 4434-4439.
- Dodds, M. W., Johnson, D. A., Yeh, C. K. 2005. Health benefits of saliva: a review. *Journal of Dentistry*. 33 (3). 223-233.
- Donnellan, C. F., Yann, L. H., Lal, S. 2013. Nutritional management of Crohn's disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 6 (3). 231-242.
- Duc, L. H., Hong, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O., Cutting, S. M. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (4). 2161-2171.

- East, J. W., Nakayama, T. O. M., Parkman, S. 1972. Changes in Stachyose, Raffinose, Sucrose, and Monosaccharides During Germination of Soybean. *Crop Science*. 12 (1). 7-9.
- Ellison 3rd, R. T., Giehl, T. J. 1991. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *Journal of Clinical Investigation*. 88 (4). 1080.
- Embleton, N. D., Berrington, J. E., McGuire, W., Stewart, C. J., Cummings, S. P. 2013. Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 18 (3). 143-149.
- FAO. 2002. WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, 30.
- Farnaud, S., Evans, R. W. 2003. Lactoferrin-a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*. 40 (7). 395-405.
- Franck, A. 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*. 87 (2). 287-291.
- Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 151 (2). 125-140.
- Fric, P. 2007. Probiotics and prebiotics - renaissance of a therapeutic principle. *Central European Journal of Medicine*. 2 (3). 237-270.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66. 365-378.
- Fuller, R. 1991. Probiotics in human medicine. *Gut*. 32 (4). 439.
- Gagnon, M., Kheadr, E. E., Le Blay, G. 2004. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *International Journal of Food Microbiology*. 92 (1). 69-78.
- Ganz, T. 2003. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integrative and Comparative Biology*. 43 (2). 300-304.

- Gao, Y., Lu, Y., Teng, K. L., Chen, M. L., Zheng, H. J., Zhu, Y. Q., Zhong, J. 2011. Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56, a probiotic strain isolated from the vaginas of healthy women. *Journal of Bacteriology*. 193 (11). 2886-2887.
- García-Graells, C., Valckx, C., Michiels, C. W. 2000. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in Milk by Combined Treatment with High Hydrostatic Pressure and the Lactoperoxidase System. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (10). 4173-4179.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota - introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125. 1401-1412.
- Goldin, B. R., Gorbach, S. L. 1992. Probiotics for humans. *Probiotics*. 355-376.
- Gomes, A. M., Malcata, F. X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. 10 (4). 139-157.
- Goulet, O. 2010. Nutrition in paediatric Crohn's disease. *South African Journal of Clinical Nutrition*. 23 (1). 33-36.
- Gregora, M. 2004. *Výživa malých dětí*. Grada Publishing, a.s. Praha. 95 s. 80-247-9022-X.
- Holzapfer, W. H., Schillinger, U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*. 35 (2-3). 109-116.
- Grofová, Z. 2007. ESPEN Guidelines on adult enteral nutrition. *Clinical Nutrition*. 25. 177-360.
- Grofová Z. 2009. Přehled přípravků enterální výživy pro domácí použití. *Medicína pro praxi* 6 (3). 169–171.
- Guarner, F., Schaafsma, G. J. 1998. Probiotics. *International Journal Food Microbiology*. 39. 237-238.
- Hamilton-Miller, J. M. T., Gibson, W., Bruck, W. 2003. Some insights into the derivation and early use so the word 'probiotic'. *British Journal of Nutrition*. 90 (40). 845.
- HiPP. Historie kojenecké výživy [online]. 2017 [cit. 2017-03-25]. Dostupné z <<http://www.hipp.cz/mleko/materske-mleko-a-kojeni/historie-kojenecke-vyzivy/>>.



- Holzapfer, W. H., Schillinger, U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*. 35 (2-3). 109-116.
- Hopkins, M. J., Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. 1998. Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *Journal of Applied Microbiology*. 85 (2). 381-386.
- Chukwu, E. E., Nwaokorie, F. O., Coker, A. O. 2014. Role of anaerobes as probiotic organisms. *International Journal of Food Nutrition and Safety*. 5 (2). 74-97.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. 2005. *Modern Food Microbiology (7th edition)*, Springer Science and Business Media New York. 782. ISBN 0-387-23180-3.
- Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Wandamme, P., Vermeire, S. 2011. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*. 60 (5). 631-637.
- Kaakoush, N. O., Day, A. S., Leach, S. T., Lemberg, D. A., Nielsen, S., Mitchell, H. M. 2015. Effect of exclusive enteral nutrition on the microbiota of children with newly diagnosed Crohn's disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 6 (1). e71.
- Kaur, I. P., Chopra, K., Saini, A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 15 (1). 1-9.
- Kellow, N. J., Coughlan, M. T., Reid, C. M. 2014. Metabolic benefits of dietary prebiotics in human subjects: a systematic review of randomised controlled trials. *British Journal of Nutrition*. 111 (7). 1147-1161.
- Kimoto, H., Kurisaki, J., Tsuji, N. M., Ohmomo, S., Okamoto, T. 1999. Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Letters in Applied Microbiology*. 29 (5). 313-316.
- Klayraung, S., Viernstein, H., Okonogi, S. 2009. Development of tablets containing probiotics: effects of formulation and processing parameters on bacterial viability. *International Journal of Pharmaceutics*. 370 (1). 54-60.
- Koh, D., Yang, Y., Khoo, L., Nyunt, S. Z., Ng, V., Goh, C. L. 2004. Salivary immunoglobulin A and lysozyme in patients with psoriasis. *Annals Academy of Medicine*. 33. 307-310.

- Korecka, A., Arulampalam, V. 2012. The gut microbiome: scourge, sentinel or spectator?. *Journal of Oral Microbiology*. 4.
- Kruis, W., Frič, P., Pokrotnieks, J., Lukáš, M., Fixa, B., Kaščák, M., Kamm, M. A., Weismueller, J. W., Beglinger, C., Wolff, C., Schulze, J. 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*. 53 (11). 1617-1623.
- Kulp, W. L., Rettger, L. F. 1924. Comparative Study of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*. 9 (4). 357.
- Kunová, G., Vidailiac, A., Ročková, Š., Rada, V., Lisová, I. 2012. Testování bifidobakterií na citlivost vůči antimikrobiálním látkám. *Mlékařské listy*. 135. 403-406.
- Lönnerdal, B. 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 77 (6). 1537-1543.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*. 11 (1). 1-17.
- Maga, E. A., Cullor, J. S., Smith, W., Anderson, G. B., Murray, J. D. 2006. Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. *Foodborne Pathogens & Disease*. 3 (4). 384-392.
- Mečnikov, I. 1907. The prolongation of life. *Optimistic Studies*. William. Heineman, London.
- Nami, Y., Abdullah, N., Haghshenas, B., Radiah, D., Rosli, R., Khosroushahi, A. Y. 2014. Probiotic assessment of *Enterococcus durans* 6HL and *Lactococcus lactis* 2HL isolated from vaginal microflora. *Journal of Medical Microbiology*. 63 (8). 1044-1051.
- Nissle, A. 1918. Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Colibakterien. *Medizinische Klinik*. (2). 29-30.
- Nutricia. Naše přípravky [online]. Nutricia Advanced Medical Nutrition. 2016. [cit. 2016-12-28]. Dostupné z <<http://www.nutriciamedical.cz/enteralni-vyziva-k-popijeni-pro-dospele/diagnozy.htm>>.

- Olano, A., Corzo, N. 2009. Lactulose as a food ingredient. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89 (12). 1987-1990.
- Oozeer, R., van Limpt, K., Ludwig, T., Amor, K. B., Martin, R., Wind, R. D., Boehm, G., Knol, J. 2013. Intestinal microbiology in early life: specific prebiotics can have similar functionalities as human-milk oligosaccharides. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 98 (2). 561-571.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82 (1-4). 279-289.
- Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Elferink, S. J. W. H. O., Spoelstra, S. F. 2003. *Microbiology of Ensiling. Agronomy*. 42. 31-94.
- Peters, C. W., Kruse, U., Pollwein, R., Grzeschik, K. H., Sippel, A. E. 1989. The human lysozyme gene. *European Journal of Biochemistry*. 182 (3). 507-516.
- Rada, V. 1997. Effect of *Kluyveromyces marxianus* on the growth and survival of bifidobacteria in milk. *Folia Microbiologica*. 42 (2). 145-148.
- Rada, V., Nevoral, J., Trojanová, I., Tománková, E., Šmehilová, M., Killer, J. 2008. Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in *in vitro* conditions. *Anaerobe*. 14 (4). 205-208.
- Rada, V., Splichal, I., Rockova, S., Grmanova, M., Vlkova, E. 2010. Susceptibility of bifidobacteria to lysozyme as a possible selection criterion for probiotic bifidobacterial strains. *Biotechnology Letters*. 32 (3). 451-455.
- Roberfroid, M. B. 1997. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. In *Dietary Fiber in Health and Disease*. Springer US. 211-219.
- Roberfroid, M. 2007. Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*. 137 (3). 830-837.
- Rockova, S., Nevoral, J., Rada, V., Marsik, P., Sklenar, J., Hinkova, A., Vlkova, E., Marounek, M. 2011a. Factors affecting the growth of bifidobacteria in human milk. *International Dairy Journal*. 21 (7). 504-508.

- Rockova, S., Rada, V., Marsik, P., Vlkova, E., Bunesova, V., Sklenar, J., Splichal, I. 2011b. Growth of bifidobacteria and clostridia on human and cow milk saccharides. *Anaerobe*. 17 (5). 223-225.
- Ročková, Š., Rada, V., Havlik, J., Švejstil, R., Vlková, E., Bunešová, V., Janda, V. Profousová, I. 2013. Growth of bifidobacteria in mammalian milk. *Czech Journal of Animal Science*. 58. 99-105.
- Rolfe, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of Nutrition*. 130. 396-402.
- Rudolfovská, J., Čurda, L. 2005. Prebiotický účinek oligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci. *Chemické listy*. 99. 168-174.
- Rutgeerts P. 2001. Review article: the limitations of corticosteroid therapy in Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 15. 1515–1525.
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., Rastall, R. A. 2001. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*. 91 (5). 878-887.
- Sanders, M. E. 1998. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 8 (5). 341-347.
- Santos, K. M. O. D., Vieira, A. D. S., Salles, H. O., Oliveira, J. D. S., Rocha, C. R. C., Borges, M. D. F., Bruno, L. M., e Melo Franco, B. D. G., Todorov, S. D. 2015. Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46 (1). 237-249.
- Sen, D. K., Sarin, G. S. 1986. Biological variations of lysozyme concentration in the tear fluids of healthy persons. *British Journal of Ophthalmology*. 70 (4). 246-248.
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. 2016. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*. 164 (3). 337-340.
- Shigehisa, A., Sotoya, H., Sato, T., Hara, T., Matsumoto, H., Matsuki, T. 2015. Characterization of a bifidobacterial system that utilizes galacto-oligosaccharides. *Microbiology*. 161 (7). 1463-1470.

- Shin, K., Hayasawa, H., Lönnerdal, B. 2001. Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immunoadsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73 (5). 984-989.
- Shulman, S. T., Friedmann, H. C., Sims, R. H. 2007. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician?. *Clinical Infectious Diseases*, 45 (8). 1025-1029.
- Schneider, S. M. 2010. Microbiota and enteral nutrition. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 34 (1). 57-61.
- Schrezenmeir, J., de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73 (2). 261-264.
- Singh, R., Shushni, M. A., Belkheir, A. 2015. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*. 8 (3). 322-328.
- Směrnice Evropského parlamentu a Rady (ES) ze dne 20. února 1995 o potravinářských přídatných látkách jiných než barviva a náhradní sladidla. Úřední věstník EU. L 61.
- Svačina, Š., Müllerová, D., Bretšnajdrová, A. 2013. *Dietologie pro lékaře, farmaceuty, zdravotní sestry a nutriční terapeutky*. Triton. Praha. 2. vydání. 341 stran. ISBN 978-80-7387-699-9.
- Sýkora, J. 2011. Prebiotika a kojenecká výživa. *Pediatric pro praxi*. 7 (4). 180-183.
- Takahashi, M., Taguchi, H., Yamaguchi, H., Osaki, T., Komatsu, A., Kamiya, S. 2004. The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 infection in mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 41 (3). 219-226.
- Tannock, G. W. 2004. A Special Fondness for Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (6). 3189-3194.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J. P., Ugarte, E., Tamayo, R. M., Nalin, R., Dore, J., Leclerc, M. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*. 11 (10). 2574-2584.

- Taylor, D. C., Cripps, A. W., Clancy, R. L. 1992. Measurement of lysozyme by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Immunological Methods*. 146 (1). 55-61.
- Teraguchi S., Shin K., Ozawa K., Nakamura S., Fukuwatari Y., Tsuyuki S., Namihira H., Shimamura S. 1995. Bacteriostatic effect of orally administered bovine lactoferrin on proliferation of clostridium species in the gut of mice fed bovine milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 61. 501-506.
- Tissier, H. 1906. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *C. R. Soc Biol*. 60. 359-361.
- Thomas, E. L., Milligan, T. W, Joyner, R. E., Jefferson, M. M. 1994. Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infection and Immunity*. 62. 529-535.
- Thomas, D. W., Greer, F. R. 2010. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics*. 126 (6). 1217-1231.
- Toman, M. a kolektiv. 2009. *Veterinární imunologie*. Grada Publishing a.s. Praha. 2 vydání. 392 stran. ISBN: 8024724642.
- Van Hooijdonk, A. C., Kussendrager, K. D., Steijns, J. M. 2000. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *British Journal of Nutrition*. 84 (1). 127-134.
- Vidal, M. L., Gautron, J., Nys, Y. 2005. Development of an ELISA for quantifying lysozyme in hen egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (7). 2379-2385.
- Vlková, E., Rada, V., Killer, 2009. *J. Potravinářská mikrobiologie*. ČZU v Praze. 168 stran. ISBN: 978-80-213-1988-2
- Vyhláška č. 54/2004 Sb., O potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití. *Sbírka zákonů*. 2004, 17, s. 810.
- Walker, G. V., Heng, N. C., Carne, A., Tagg, J. R., Wescombe, P. A. 2016. Salivaricin E and abundant dextranase activity may contribute to the anti-cariogenic potential of the probiotic candidate *Streptococcus salivarius* JH. *Microbiology*. 162 (3). 476-486.

Walton, C; Montoya, M P B; Fowler, D P; Turner, C; Jia, W; Whitehead, R N; Griffiths, L; Waring, R H; Ramsden, D B; Cole, J A; Cauchi, M; Bessant, C; Naylor, S J and Hunter, J O 2016. Enteral feeding reduces metabolic activity of the intestinal microbiome in Crohn's disease: an observational study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 70 (9). 1052-1056.

Wells, C. L., Wilkins, T. D. 1996. Clostridia: sporeforming anaerobic bacilli. *Medical Microbiology*. 4th edition. dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8219/>>.

Wescombe, P. A., Heng, N. C., Burton, J. P., Chilcott, Ch. N., Tagg, J. R. 2009. Streptococcal bacteriocins and the case for *Streptococcus salivarius* as model oral probiotics. *Future Medicine*. 4 (7). 819-835.

Whelan, K. 2007. Enteral-tube-feeding diarrhoea: manipulating the colonic microbiota with probiotics and prebiotics. *Proceedings of the Nutrition Society*. 66 (03). 299-306.

Whelan, K., Judd, P. A., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Preedy, V. R., Taylor, M. A. 2009. Fecal microbiota in patients receiving enteral feeding are highly variable and may be altered in those who develop diarrhea. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 89 (1). 240-247.

Yoshiota, M., Fujita, K., Sakata, H., Muro, K. Iseki, K. 1991. Development of the normal intestinal flora and its clinical significance in infants and children. *Bifidobacteria Microflora*. 10. 11-17.

Zachos, M., Tondeur, M., Griffiths, A. M. 2007. Enteral nutritional therapy for induction of remission in Crohn's disease. *The Cochrane Library*.

Zbořil, V. a kolektiv. 2005. Mikroflóra trávicího traktu: Klinické souvislosti. Grada Publishing a.s. Praha. 156 s. 80-247-0584-2.