

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Schopnost bifidobakterií využít umělá sladidla a  
cukerné alkoholy jako jediný zdroj energie**

**Diplomová práce**

**Bc. Hana Stachová**

**Výživa a potraviny (NUTRIM)**

**doc. Ing. Šárka Musilová, Ph.D.**

**© 2022 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Schopnost bifidobakterií využít umělá sladidla a cukerné alkoholy jako jediný zdroj energie" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Šárce Musilové, Ph.D. za věcné připomínky, trpělivost a odborné vedení při dokončování této práce. Dále bych také chtěla poděkovat Ing. Haně Šubrtové Salmonové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při vypracování praktické části této práce. Mé poděkování také náleží Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky za uskutečnění praktické části této práce v jejich laboratoři. Na závěr bych chtěla poděkovat svému příteli a své rodině za obrovskou podporu a pomoc v průběhu celého studia.

# Schopnost bifidobakterií využít umělá sladidla a cukerné alkoholy jako jediný zdroj energie

## Souhrn

Obsah této práce byl zaměřen na testování schopnosti bifidobakterií využít umělá sladidla a cukerné alkoholy jako jediný zdroj energie. Předpokladem práce bylo, že schopnost metabolizovat tyto látky budou mít pouze některé druhy bifidobakterií a že tato vlastnost bude kmenově specifická.

Obecně jsou umělá sladidla velmi kontroverzním tématem ve vědecké komunitě a společnosti. Stále není natolik průkazné, zda role umělých sladidel v lidské výživě má pozitivní či negativní vliv na střevní mikrobiotu a zdraví lidského organismu obecně.

Praktická část práce probíhala v *in vitro* podmínkách, kdy bylo otestováno celkem 48 kmenů rodu *Bifidobacterium* pomocí makrodiluční a mikrodiluční metody. Jako substráty pro růst bifidobakterií sloužily 4 umělá sladidla (acesulfam K, aspartam, sacharin, sukralóza) a 4 cukerné alkoholy (erythritol, isomalt, sorbitol, xylitol), které se v koncentraci 1,5 g/l přidávaly do API 50 CHL média. Pro kontrolu nárůstu bifidobakterií byla použita i pozitivní kontrola se substrátem v podobě glukózy a negativní kontrola bez substrátu. Kultivace bifidobakterií probíhala při teplotě 37 °C po dobu 24 až 48 hodin. Vyhodnocení experimentu se lišilo podle použité metody. U obou metod se hodnotila optická denzita a pH. Měření optické denzity však u každé metody probíhalo odlišně. U makrodiluční metody byla vyhodnocena optická denzita pomocí McFarlandovy zákalové stupnice, u mikrodiluční metody byla vyhodnocena pomocí přístroje Tecan Infinite M200.

Z výsledku bylo patrné, že u makrodiluční metody umělo využít daný substrát 10 kmenů bifidobakterií a u mikrodiluční metody 12 kmenů bifidobakterií z celkového počtu 48 testovaných kmenů. Nejčastěji metabolizované byly cukerné alkoholy sorbitol a isomalt. Z umělých sladidel to byly acesulfam K a aspartam. Ostatní sladidla (erythritol, sacharin, sukralóza a xylitol) nebyly metabolizovány bifidobakteriemi, čímž se potvrdila část hypotézy, že testovaná sladidla metabolizovaly jen některé druhy bifidobakterií.

Vlastnost bifidobakterií využít různá umělá sladidla a cukerné alkoholy se potvrdila i u různých kmenů jednoho druhu bifidobakterií. Např. 3 kmene u druhu *B. catenulatum*. Kmen *B. catenulatum* D1 a *B. catenulatum* D16 byly schopné využít sorbitol v makrodiluční metodě. *B. catenulatum* D36 kromě sorbitolu dokázalo v této metodě využít i isomalt. Z těchto výsledků lze vyvodit potvrzení zbylé části hypotézy, že schopnost metabolizovat testovaná sladidla je u bifidobakterií kmenově specifická.

Z hlediska informací z odborné literatury shromážděných v této práci a z výsledků praktické části této práce nelze zcela s jistotou říct, zda schopnost metabolizovat umělá sladidla a cukerné alkoholy má pozitivní či negativní vliv na střevní mikrobiotu a lidské zdraví. Lze tedy tyto domněnky aplikovat v budoucnu při dalším výzkumu v této oblasti.

**Klíčová slova:** Bifidobakterie, probiotika, syntetická sladidla, cukerné alkoholy, intestinální mikrobiota, organické kyseliny

# The Ability of Bifidobacteria to Utilize Artificial Sweeteners and Sugar Alcohols as a Sole Energy Source

## Summary

The aim of this thesis was focused on testing the ability of bifidobacteria to utilize artificial sweeteners and sugar alcohols as the only source of energy. The premise of the work was that only some species of bifidobacteria will have the ability to metabolize these substances and that this property will be strain specific.

In general, artificial sweeteners are controversial topic in the scientific community and society. It is still not clear whether the role of artificial sweeteners in human nutrition has a positive or negative effect on the intestinal microbiota and the human health.

The experiment of the thesis took place *in vitro* when a total of 48 strains of the genus *Bifidobacterium* were tested using macrodilution and microdilution methods. Four artificial sweeteners (acesulfame K, aspartame, saccharin, sucralose) and four sugar alcohols (erythritol, isomalt, sorbitol, xylitol) were used as substrates for the growth of bifidobacteria, which were added to API 50 CHL medium at concentration of 1.5 g / l. The positive control with substrate in the form of glucose and the negative control without substrate were also used to control the growth of bifidobacteria. The bifidobacteria were cultivated at 37 ° C for 24 to 48 hours. The evaluation of the experiment differed according to used method. Both methods were evaluated for optical density and pH. However, the measurement of optical density was different for each method. For the macrodilution method, the optical density was evaluated using the McFarland scale, for the microdilution method it was evaluated using the Tecan Infinite M200.

The results showed that in the macrodilution method 10 bifidobacterial strains could utilize the given substrate and in the microdilution method 12 bifidobacterial strains out of the total number of 48 tested strains could utilize the substrates. The most metabolized sugar alcohols were sorbitol and isomalt, the most metabolized artificial sweeteners were acesulfame K and aspartame. Other sweeteners (erythritol, saccharin, sucralose, xylitol) were not metabolised by bifidobacteria, confirming part of the hypothesis that the tested sweeteners were metabolized only by some species of bifidobacteria.

The ability of bifidobacteria to utilize different artificial sweeteners and sugar alcohols has also been confirmed in different strains of one species of bifidobacteria. E.g., 3 strains in *B. catenulatum*. *B. catenulatum* D1 and *B. catenulatum* D16 were able to utilize sorbitol in the macrodilution method. In addition to sorbitol, *B. catenulatum* D36 was able to utilize isomalt in this method. From these results, it is possible to confirm the rest of the hypothesis that the ability to metabolize the tested sweeteners is strain-specific in bifidobacteria.

From the point of view of the information gathered in this thesis and from the results of our experiment, it is not possible to say with certainty whether the ability to metabolize artificial sweeteners and sugar alcohols has a positive or negative effect on the intestinal microbiota and human health. Therefore, these assumptions can be applied in future research.

**Keywords:** Bifidobacteria, probiotics, artificial sweeteners, sugar alcohols, intestinal microbiota, organic acids

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Lidský mikrobiom a mikrobiota.....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Mikrobiota dutiny ústní .....	10
3.1.2 Mikrobiota gastrointestinálního traktu .....	11
<b>3.2 Rod <i>Bifidobacterium</i>.....</b>	<b>12</b>
3.2.1 <i>Bifidobacterium adolescentis</i> .....	14
3.2.2 <i>Bifidobacterium angulatum</i> .....	15
3.2.3 <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	15
3.2.4 <i>Bifidobacterium breve</i> .....	16
3.2.5 <i>Bifidobacterium catenulatum</i> .....	17
3.2.6 <i>Bifidobacterium dentium</i> .....	17
3.2.7 <i>Bifidobacterium faecale</i> .....	18
3.2.8 <i>Bifidobacterium gallicum</i> .....	18
3.2.9 <i>Bifidobacterium longum</i> .....	18
3.2.10 <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> .....	19
3.2.11 <i>Bifidobacterium scardovii</i> .....	20
<b>3.3 Sladidla.....</b>	<b>20</b>
3.3.1 Umělá sladidla .....	21
3.3.1.1 Acesulfam K.....	22
3.3.1.2 Aspartam .....	22
3.3.1.3 Sacharin .....	23
3.3.1.4 Sukralóza .....	24
3.3.2 Cukerné alkoholy.....	24
3.3.2.1 Isomalt .....	25
3.3.2.2 Erythritol .....	26
3.3.2.3 Sorbitol .....	27
3.3.2.4 Xylitol.....	27
<b>3.4 Interakce mezi střevní mikrobiotou a umělými sladidly .....</b>	<b>28</b>
<b>4 Metodika .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Příprava médií.....</b>	<b>31</b>
4.1.1 Substráty .....	31
4.1.2 Příprava penicilínek na makrodiluční metodu.....	32
4.1.3 Příprava vialek na mikrodiluční metodu.....	33

<b>4.2</b>	<b>Příprava kultur bifidobakterií k zaočkování.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3</b>	<b>Příprava inokula.....</b>	<b>35</b>
4.3.1	Příprava inokula pro makrodiluční metodu .....	35
4.3.2	Příprava inokula pro mikrodiluční metodu .....	36
<b>4.4</b>	<b>Kultivace bifidobakterií a způsob vyhodnocení .....</b>	<b>37</b>
4.4.1	Vyhodnocení u makrodiluční metody.....	37
4.4.2	Vyhodnocení u mikrodiluční metody .....	37
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1</b>	<b>Způsob vyhodnocení makrodiluční metody.....</b>	<b>38</b>
5.1.1	Vyhodnocení výsledků makrodiluční metody .....	39
<b>5.2</b>	<b>Způsob vyhodnocení mikrodiluční metody .....</b>	<b>41</b>
5.2.1	Vyhodnocení výsledků mikrodiluční metody.....	41
5.2.2	Srovnání výsledků makrodiluční a mikrodiluční metody .....	43
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>50</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>56</b>
<b>10</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Strava patří mezi nejdůležitější faktory, které ovlivňují lidské zdraví. Díky globalizaci a ekonomickému růstu mnohých zemí postupem času došlo ke změně stravovacích návyků. Obecně se energetický příjem zvýšil spolu se zvýšenou konzumací živočišných tuků a energeticky bohatých potravin. Oproti tomu se snížil příjem vlákniny (Pang et al. 2021).

Nedílnou součástí lidské stravy představují sacharidy. Z hlediska energetického metabolismu člověka jsou velmi významné hlavně cukry, které se používají již po staletí jako součást potravin, na které dosáhne většina obyvatel naší planety. Právě přebytek cukru je příčinou mnoha moderních nepřenositelných onemocnění, jako jsou např. metabolický syndrom, obezita, diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění, velmi častý zubní kaz a jiné (Di Rienzi & Britton 2020).

Vzhledem k rostoucím trendům nadváhy i obezity se klade větší důraz na vyváženou stravu a energetickou restrikcii. Jednou ze strategií, jak snížit příjem energie, je zdržet se cukrů a nahradit je umělými sladidly, které mají sladkou chuť a jejich kalorický obsah je zanedbatelný (Pang et al. 2021).

Velký počet lidí si myslí, že umělá sladidla jsou „zdravější“ variantou cukru (Ebrahimzadeh et al. 2018). Stále tu jsou ale bezpečnostní a zdravotní přínosy konzumace umělých sladidel, a ty zůstávají předmětem mnohých diskusí ve vědecké komunitě i ve společnosti obecně (Pang et al. 2021). Jejich použití je spojováno s narušenou homeostázou glukózy, přírůstkem hmotnosti a změněným gastrointestinálním mikrobiomem (Turner et al. 2020).

Právě souvislost mezi cukrem a nemocemi jsou částečně způsobené střevní mikrobiotou, ve které mohou působit různé druhy mikroorganismů (probiotické, patogenní). Proto jakákoli změna konzumace cukrů či umělých sladidel, vytvoří nové střevní prostředí, ve kterém se selektují nové mikrobiální kmeny a ty poté mají vliv i na hostitele (Di Rienzi & Britton 2020).



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

Umělá sladidla a cukerné alkoholy stále častěji nacházejí uplatnění v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, jako náhražka cukrů. Zdravotní rizika spojená s jejich konzumací jsou velice kontroverzním tématem. Jedním z těchto aspektů je i vliv na složení mikrobioty trávicího traktu. Jednou z nejvýznamnějších skupin mikroorganismů, které pozitivně ovlivňují zdravotní stav hostitele, jsou bifidobakterie. Předpokládáme, že pouze některé druhy bifidobakterií budou mít schopnost tyto látky metabolizovat, a že tato vlastnost bude kmenově specifická.

Cílem diplomové práce bylo testování schopnosti bifidobakterií metabolizovat vybraná umělá sladidla a cukerné alkoholy jako zdroj energie.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Lidský mikrobiom a mikrobiota

Mikroorganismy často žijí v různých formách společenství. Dokážou žít i v těsném spojení se složitějšími organismy jako jsou lidé, zvířata či rostliny (Liang et al. 2018). Tyto mikroorganismy jsou vzájemně propojeny různými vztahy mezi samotnými mikroorganismy či mezi mikroorganismem a hostitelem. Jedná se o symbiotické, komenzální či patogenní vztahy mikroorganismů (Lee et al. 2021). Pojem mikrobiota tedy představuje mikrobiální komunitu osídlující hostitele. Pokud budeme mít na mysli mikrobiotu včetně všech mikrobiálních genů definujeme tím již mikrobiom. Mikrobiom je tedy mikrobiální společenství spolu s mikrobiálním genomem (Liang et al. 2018). Mikrobiom může být také považován za samostatný orgán či jako druhý, velmi variabilní genom organismu (Shahriar et al. 2020). Počet mikroorganismů na kůži a v lidském těle násobně převyšuje počet lidských buněk (Lee et al. 2021).

Lidský mikrobiom se dělí na 4 hlavní části – orální, gastrointestinální, vaginální a kožní mikrobiom. V každé této oblasti se vyskytují jedinečné druhy mikroorganismů a jako celek mají jedinečné funkce (Nichols et al. 2019).

Diverzita mikroorganismů je v jednotlivých mikrobiomech rozdílná. Diverzita kožního a vaginálního mikrobiomu je velmi nízká oproti diverzitě gastrointestinálního mikrobiomu (Liang et al. 2018). Právě složení a funkce daného mikrobiomu ovlivňují hostitele různými způsoby. Může docházet ke zvyšování metabolismu potravy, vytvoření ochranné bariéry proti patogenním mikroorganismům či poskytování různých prospěšných metabolitů hostiteli. Na druhou stranu může být mikrobiom spojován i s různými druhy onemocnění a poruch. Jde např. o syndrom dráždivého tračníku, rakovinu tlustého střeva, různá bakteriální onemocnění, vaginózy či atopické dermatitidy (Lee et al. 2021).

Během posledních desetiletí bylo vynaloženo úsilí identifikovat a pochopit roli mikrobiomu v lidském zdraví a při onemocnění (Lee et al. 2021). Objev vztahu lidského mikrobiomu s nemocemi vytváří jedinečnou možnost léčby, ale i přesto je stále potřeba poznat spoustu nevyjasněných informací (Nichols et al. 2019).

#### 3.1.1 Mikrobiota dutiny ústní

Dutina ústní je neustále vystavena požitým a inhalovaným mikroorganismům. Stabilní teplota (35-37 °C) a pH (sliny – 6,5 až 7) poskytují ideální prostředí pro růst mikroorganismů (Lee et al. 2021).

Z hlediska lokace mikroorganismů dělíme dutinu ústní na 3 oblasti.

První oblast zahrnuje kolonizaci sliznice. Ta se sestává z tváří, dásní a jazyku. Tato část orálního mikrobiomu je nejméně kolonizovaná. Zdravá sliznice dutiny ústní je kolonizována rody bakterií jako jsou *Streptococcus*, *Rothia*, *Eubacterium*. Patogenními bakteriemi mohou být např. rody *Tannerella*, *Prevotella* či *Porphyromonas*, které jsou zodpovědné za halitózu (zápach z úst) (Nichols et al. 2019).

Druhou a zároveň nejrozmanitější oblastí jsou sliny. I přestože se sliny neustále tvoří a neustále je člověk polyká, tak je v nich složení mikroorganismů relativně stabilní. Díky

různému složení slin různých jedinců může být i tato část mikrobiomu velmi variabilní. Většina kmenů této oblasti je podobná kmenům ve střevech. Jsou to např. kmeny Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria a Actinobacteria.

Poslední oblastí orálního mikrobiomu jsou zuby. Zuby svojí tvrdostí a pevností jsou ideálním prostředím pro tvorbu biofilmů, v tomto případě zubního plaku. Zde jsou nejrozšířenější kmeny Firmicutes a Actinobacteria. Právě zubní plak je zodpovědný za vznik řady běžných ústních poruch a onemocnění. Jde například o častý zubní kaz, záněty dásní či záněty periodontia (ozubice). Na zubním kaze se podílí nejčastěji *Streptococcus mutans*. Dále také rody *Viellonella*, *Prevotella* i *Bifidobacterium*, které byly pozorovány ve větším množství u dětí s mnohočetnými kazy. Těmto bakteriím vyhovuje nízké pH, které je většinou v dutině ústní způsobeno bakteriální přeměnou přijatých cukrů ze stravy na slabé kyseliny. Tyto kyseliny poté demineralizují zubní sklovinu, která se stává náchylnější k infekcím a vzniku zubního kazu. Bylo také pozorováno, že i malé množství cukru (2 kg za rok) má vliv na vznik zubního kazu. (Nichols et al. 2019).

Orální mikrobiom je ovlivňován mnoha aspekty životního stylu jedince. Jedná se hlavně o dietu, užívání tabáku, alkoholu, antibiotik, vystavení organismu stresu, těhotenství a další (Lee et al. 2021).

### 3.1.2 Mikrobiota gastrointestinálního traktu

Vědci vědí již od konce 50. let, že bakterie přítomné v gastrointestinálním traktu (GIT) ovlivňují, jak se metabolizují léky, toxické látky i metabolity hostitele. Přesto se přesunula významná pozornost na mikrobiom gastrointestinálního traktu až v posledních letech (Nichols et al. 2019).

Lidský gastrointestinální trakt je obýván rozmanitou mikrobiotou, která se nachází na střevech i uvnitř střev (Liang et al. 2018) a uvádí se, že obsahuje až 100 triliónů různých bakterií (Ahmad et al. 2020).

Role střevní mikrobioty ve fyziologii člověka je výrazná. Různorodost mikrobioty je dána genotypem hostitele a ovlivnitelnými faktory jako jsou výživa a životospráva organismu obecně. Strava ovlivňuje metabolické pochody mikroorganismů v gastrointestinálním traktu a také jeho složení (Shahriar et al. 2020).

Osídlení gastrointestinálního traktu mikroorganismy začíná již v žaludku a končí hojně tlustým střevem a distálním úsekem gastrointestinálního traktu. Přibližně z 90% střevní mikrobioty dospělého člověka dominují bakteriální kmeny Bacteroidetes a Firmicutes. Další kmeny jako jsou Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria či Cyanobacteria představují bakteriální menšinu (Ahmad et al. 2020).

Kritický okamžik pro kolonizaci gastrointestinálního mikrobiomu nastává během prvních 3 let života. Složení mikrobiomu u kojenců má značné rozdíly a má na nich vliv i samotný mikrobiom matky (ústa, kůže, vagína, GIT, mateřské mléko). Tento mateřský mikrobiom se během raného života přemístí do gastrointestinálního traktu dítěte, kde slouží jako základ střevního mikrobiomu dítěte. Bakteriální diverzita je ovlivněna i způsobem porodu (přirozený porod nebo porod císařským řezem), první stravou (mateřské mléko nebo umělá výživa) a užíváním antibiotik (Dreyer & Liebl 2018).

Obecně bylo zjištěno, že novorozenci, kteří se narodili císařským řezem, jsou kolonizováni bakteriemi převážně z kůže a úst matky a z okolního prostředí operačního sálu (Dreyer & Liebl 2018). Novorozenci, kteří přišli na svět přirozeným vaginálním porodem, jsou kolonizováni bakteriemi z porodních cest a z gastrointestinálního traktu matky. Bifidobakterie velmi často kolonizují kojence tímto způsobem, a to je také důvod, proč byly bifidobakterie podobné těm mateřským, izolovány ze stolic kojenců (Jensen et al. 2016).

Dalším faktorem je výživa kojenců. Přirozené kojení je klíčovým bodem v kolonizaci gastrointestinálního traktu kojenců. Složení mateřského mléka (oligosacharidy, lysozym, laktoferin, protilátky atd.) podporují a stimulují kolonizaci prospěšných bakterií ve střevech kojence (Jensen et al. 2016). Nedávné studie odhalily, že mateřské mléko není sterilní a obsahuje probiotické bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Dále také rody *Streptococcus* a *Staphylococcus*. Dá se tedy říct, že mateřské mléko je vlastně forma přirozeného synbiotika, jelikož obsahuje probiotika i prebiotika (Cukrowska et al. 2020). Přirozeně kojené děti mají snížený relativní výskyt rodu *Lactococcus* ve srovnání s dětmi, které jsou krmeny umělou výživou. S mikrobiotou také souvisí podávání antibiotik v kojeneckém a raném věku k eradikaci patogenních bakterií. Bohužel tento krok není specifický pro bakterie a způsobuje poškození i bakteriím, které působí příznivě. Vlivem antibiotik na gastrointestinální mikroorganismy může dojít k rozvoji imunitně zprostředkovaných onemocnění jako je astma, zánětlivá onemocnění střev atd. (Jensen et al. 2016).

V dnešní době existuje několik strategií, jak dopomoci k obnovení rovnováhy střevní mikrobioty. Léčba se specializuje hlavně na podávání probiotik, prebiotik a synbiotik, bakteriofágovou terapii či transplantaci fekální mikrobioty (Gomaa 2020).

Probiotika jsou příznivě působící živé mikroorganismy, které se podávají za účelem zlepšení zdraví jedince. Nejčastěji se používají bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, z kvasinek jde převážně o *Saccharomyces boulardii*. Mezi hlavní příznivě působící funkce probiotických bakterií patří syntéza vitamínů B a K, snížení pH díky produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem, antimikrobiální aktivita proti patogenním mikroorganismům produkcí bakteriocinu, metabolizace karcinogenních látek či stimulace imunitní odpovědi organismu (Gomaa 2020). Mastné kyseliny s krátkým řetězcem tvořené střevní mikrobiotou se mohou pomocí Citrátového cyklu dále přeměnit na glukózu využitelnou hostitelem (Payne et al. 2012). Probiotika lze použít i v případě dysbiózy, ke které může docházet po antibiotické terapii. Probiotika mohou být konzumována ve formě různých kapslí a pilulek, či přírodně v kombinaci s jídlem, např. jogurt a další fermentované mléčné výrobky (Gomaa 2020).

Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy, které podporují růst prospěšných mikroorganismů v lidském těle. (Liang et al. 2018). Důležitými vlastnostmi prebiotik jsou odolnost vůči žaludečním kyselinám a trávicím enzymům, nesmí se vstřebávat v horních částech trávicího traktu, musí být fermentované střevními bakteriemi a podporovat růst prospěšných mikroorganismů.

Synergická kombinace probiotik a prebiotik se nazývá synbiotika (Gomaa 2020).

### 3.2 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* se řadí do kmene Actinobacteria a spolu s dalšími rody tvoří čeleď *Bifidobacteriaceae* (Turroni et al. 2019). Název rodu *Bifidobacterium* označuje morfologii

větvení bakterií. Pojem „*bifidus*“ pochází z latiny a znamená rozštěp na dvě části (Lim & Shin 2020). U morfologie bifidobakterií je často typický nepravidelný tyčinkový tvar s větvením, které připomíná tvar písmene Y nebo V. Jejich morfologie může být ale i variabilní s malými pravidelně tvarovanými buňkami (Mattarelli & Biavati 2014).

Rod *Bifidobacterium* se skládá celkově ze 106 taxonů (Parte et al. 2020), které se vyskytují v různých ekologických nikách (Turroni et al. 2019). Jde např. o gastrointestinální trakt savců, ptáků a hmyzu či je lze najít i v odpadních vodách, kam se dostávají z fekální kontaminace (Mattarelli & Biavati 2014). V tlustém střevě tvoří přibližně 4 % střevní mikrobioty a vyskytují se v koncentracích  $10^8$ - $10^9$  buněk/g střevního obsahu (Mattarelli & Biavati 2014).

Poprvé byly bifidobakterie izolované ze zdravých kojených dětí roku 1900 Tissierem. Bifidobakterie jsou grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé anaerobní tyčinky (Mattarelli & Biavati 2014). Velmi často působí jako sacharolytický komenzál v gastrointestinálním traktu, kde rozkládá nestrávené zbytky stravy hostitele (Bottacini et al. 2018). Některé druhy bifidobakterií dokážou tolerovat kyslík v přítomnosti nebo nepřítomnosti CO<sub>2</sub>.

Jejich výsledek v katalázovém testu je negativní a mezi hlavní metabolity, které tvoří, řadíme octovou a mléčnou kyselinu v poměru 3:2 (Mattarelli & Biavati 2014), které pomáhají při trávení a usnadňují vstřebávání živin (Yakoob & Pradeep 2019). Právě mastné kyseliny s krátkým řetězcem působí jako životně důležitý zdroj energie pro kolonocyty (Finney et al. 2007). Dále produkují i různé chemické látky jako jsou enzymy či vitamíny skupiny B. Z vitamínů například thiamin, biotin, kyselina listová, kobalamin a riboflavin (Yakoob & Pradeep 2019).

Hojně se bifidobakterie využívají jako probiotika, kdy v lidském zdraví jsou prevencí střevních infekcí, stimulují imunitní systém, snižují hladinu cholesterolu v krvi, dokonce i snižují riziko nádorových onemocnění v gastrointestinálním traktu (Yakoob & Pradeep 2019). Ačkoliv mají bifidobakterie pozitivní zdravotní přínos pro lidského hostitele, existuje stále nedostatek znalostí o molekulárních mechanismech, které vysvětlují probiotické vlastnosti bifidobakterií (O'Callaghan & van Sinderen 2016).

Nejčastěji se používají jako probiotika druhy *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum* a *B. animalis* subsp. *lactis* (Mattarelli & Biavati 2014). Jako vhodná prebiotika se používají inulin a fruktooligosacharidy, které stimulují jejich životní pochody (Payne et al. 2012).

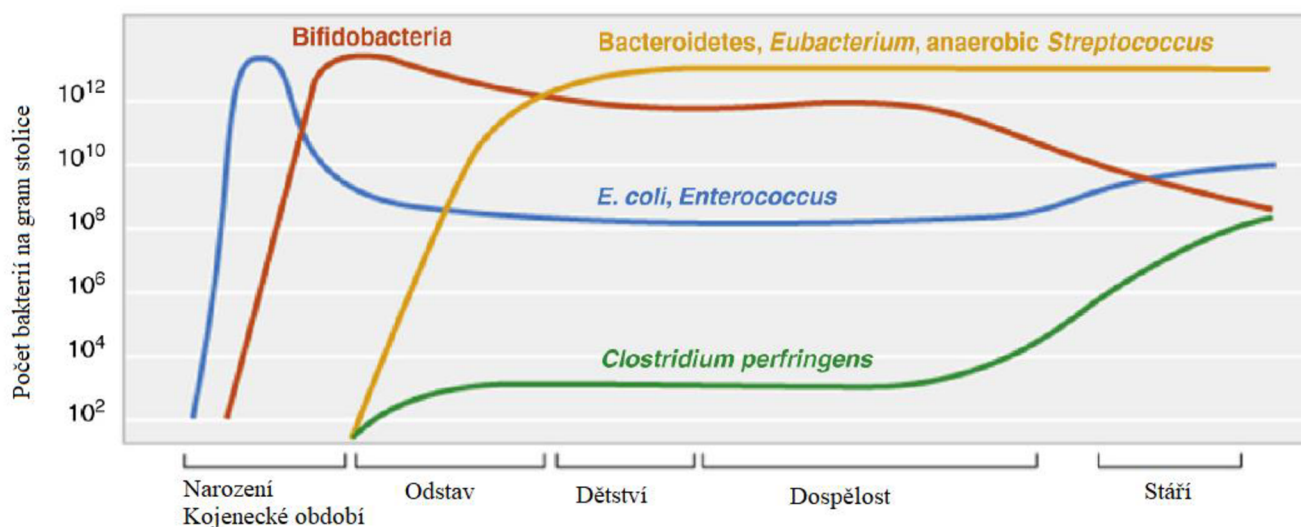
Přítomnost různých druhů bifidobakterií se mění s věkem a v různých věkových etapách jsou přítomné v gastrointestinálním traktu člověka odlišné bifidobakterie (Arboleya et al. 2016). U dospělých se nejčastěji vyskytují druhy jako *Bifidobacterium adolescentis* a *B. catenulatum*. Druhy jako *B. bifidum*, *B. breve* či *B. longum* subsp. *infantis* se nejčastěji nalézají ve stolici kojených dětí (Turroni et al. 2019). Bifidobakterie se nacházejí v lidské stolici a to z 25 % dospělé a 80 % kojenecké stolice (Yakoob & Pradeep 2019).

Bohužel nelze přesně uvést absolutní rozdělení bifidobakterií v gastrointestinálním traktu u kojenců a dospělých lidí, jelikož je jejich přítomnost ovlivněna odlišným složením mikrobioty a je do značné míry ovlivněna právě stravou hostitele. I přes tyto odlišnosti je možné dosáhnout stejného či podobného druhu bifidobakterií (např. *B. adolescentis*) a to při přenosu z matky na dítě (Turroni et al. 2019).

Kojení jako důležitý postnatální faktor pomáhá formovat dětskou mikrobiotu během prvního roku života. Bifidobakterie jsou schopné využít oligosacharidy mateřského mléka (Stuivenberg et al. 2022), které jsou důležité pro střevní mikrobiotu kojence. Oligosacharidy mateřského mléka nejsou přístupné pro střevní enzymy, jelikož je střevní enzymy nedokážou rozštěpit. To je důvod, proč jsou tyto oligosacharidy schopné dostat se do tlustého střeva, kde slouží jako substrát právě bifidobakteriím. Bifidobakterie jsou pak schopné využívat tento substrát a bránit kolonizaci patogenů (Thomson et al. 2018).

Přechod střevní mikrobioty z kojence na dospělého mezi 1. a 2. rokem života je ovlivněn omezením kojení a následným zvýšeným příjmem pevné stravy, která podporuje rozvoj ostatních mikroorganismů ve střevě. V tomto přechodovém období dochází k úbytku bifidobakterií, ale i přesto jsou stále dominantními členy střevní mikrobioty. Po odstavení počet bifidobakterií klesá (Turroni et al. 2018).

Různé nemoci jako obezita, diabetes mellitus či alergie jsou spojeny s nižším počtem bifidobakterií v různých fázích života. V průběhu dospělosti tento pokles bývá relativně stabilní a poté se počet bifidobakterií ve stáří opět snižuje (Arboleya et al. 2016). Starší lidé vykazují nárůst počtu enterobakterií, klostridií, streptokoků či enterokoků (viz Obr. 1). Jedním z důvodů může být časté používání antibiotik či prostý pobyt v nemocničním prostředí (Mattarelli & Biavati 2014). Pokles druhové rozmanitosti ve střevech je dán procesem stárnutí, který je spojen i se sníženou adhezí ke střevní sliznici (Arboleya et al. 2016).



**Obrázek 1** Změny gastrointestinální mikrobioty v průběhu lidského života. Rod *Bifidobacterium* převažuje nejvíce u kojenců a s postupem času jejich množství v gastrointestinálním traktu klesá (Sarkar & Pitchumoni 2016).

### 3.2.1 *Bifidobacterium adolescentis*

*B. adolescentis* (Reuter, 1963) patří mezi významné bifidobakterie, které specificky nalézáme ve stolici dospělých jedinců, ale lze je nalézt i v odpadních vodách (Mattarelli & Biavati 2014).

Jedná se o krátké zakřivené tyčinky, které mohou být rozvětvené (viz Obr. 2). Kolonie jsou konvexní o průměru 2-3 mm a jejich konzistence může být měkká až pastovitá. Hlavními

produkty fermentace jsou octová a mléčná kyselina. *B. adolescentis* nebylo schopno fermentovat erythritol, naopak sorbitol byl fermentován (Reuter 1971).

Mezi jejich vlastnosti se uvádí schopnost metabolizovat glykany pocházející ze stravy, zejména škroby, oligosacharidy i polysacharidy (Duranti et al. 2016).

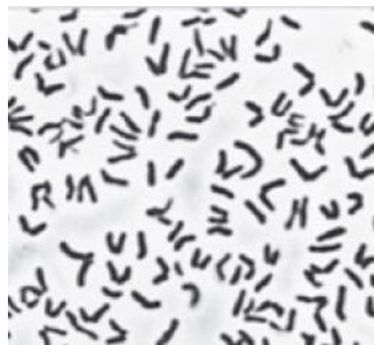


**Obrázek 2** Morfologie *B. adolescentis* (Biavati & Mattarelli 2012).

### 3.2.2 *Bifidobacterium angulatum*

*B. angulatum* (Scardovi & Crociani, 1974) tvoří charakteristické V tvary nebo palisádové uspořádání podobné korynebakteriím (viz Obr. 3), kde není patrné větvení. Poprvé byla tato bakterie izolovaná z exkrementů dospělých lidí, později byla nalezena i v odpadních vodách (Mattarelli & Biavati 2014). Oproti *B. longum* a *B. adolescentis* je *B. angulatum* méně obvyklá bifidobakterie v lidské střevní mikrobiotě (Zakharevich et al. 2019).

Vzhled povrchu kolonií je hladký s celými okraji a mají měkkou konzistenci. Bývají lesklé, kruhové s porcelánově bílou barvou. Optimální teplota pro růst je od 39 do 40 °C. Počáteční optimální pH je od 6,5 do 6,9. Hlavními produkty fermentace glukózy jsou L-mléčná a octová kyselina v poměru 1:2,2. U 5 ze 6 testovaných kmenů nebyl sorbitol fermentován (Scardovi & Crociani, 1974).



**Obrázek 3** Morfologie *B. angulatum* (Biavati & Mattarelli 2012).

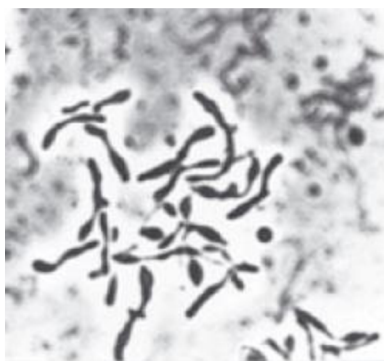
### 3.2.3 *Bifidobacterium bifidum*

*B. bifidum* (Tissier, 1900) je první objevenou bifidobakterií, kterou popsal Tissier. Ten také aplikoval rodová a druhová jména na základě charakteristického vzhledu bifidobakterií. Tato bakterie byla izolována z exkrementů kojenců a uvádí se jako typový druh rodu *Bifidobacterium* (Mattarelli & Biavati 2014).

Buňky mají variabilní vzhled. Charakteristické bývají amforovité buňky (viz Obr. 4). *B. bifidum* nedokáže fermentovat sorbitol (Biavati & Mattarelli 2012).

Jedná se o bakterii, která dokáže inhibovat bakterii *Helicobacter pylori* v žaludku. Kombinace *Lactobacillus acidophilus* a *B. bifidum* snižuje tělesnou hmotnost u obézních lidí (Yakoob & Pradeep 2019).

*B. bifidum* společně s *B. breve* se řadí mezi nejčastěji sdílené bifidobakterie mezi matkou a dítětem. Tyto bifidobakterie jsou poté schopny přetrvat ve střevě kojence až jeden rok (Turrone et al. 2019).

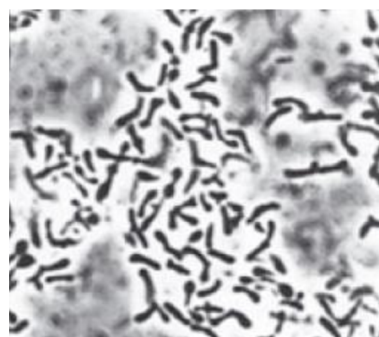


**Obrázek 4** Morfologie *B. bifidum* (Biavati & Mattarelli 2012).

#### 3.2.4 *Bifidobacterium breve*

*B. breve* (Reuter, 1963) je bakterie, která má nejtenčí a nejkratší buňky mezi bifidobakteriemi, které se nacházejí v lidském střevě (Mattarelli & Biavati 2014). Jejich tvar může být i rozvětvený (viz Obr. 5). Kolonie jsou konvexní, mají hladký nebo lehce zvlňný, celistvý povrch. Průměr kolonií bývá přibližně 2-3 mm a mají pastovitou konzistenci. Konečnými produkty bývá octová a mléčná kyselina. Neumí fermentovat sorbitol, naopak erythritol ano (Reuter 1971). Jedná se o běžného člena dětské mikrobioty střev (Turrone et al. 2019) a poprvé byla tato bifidobakterie izolovaná právě z kojenecké stolice (Mattarelli & Biavati 2014).

Dále hraje významnou roli v obraně sliznice hostitele a pomáhá při prevenci infekčních onemocnění. Také se jedná o antialergický kmen. Perorální podávání zmírňuje bariérové změny způsobené oxidačním stresem na kůži nebo UV zářením (Yakoob & Pradeep 2019).



**Obrázek 5** Morfologie *B. breve* (Biavati & Mattarelli 2012).



### 3.2.5 *Bifidobacterium catenulatum*

*B. catenulatum* (Scardovi & Crociani, 1974) je bakterie, která byla poprvé objevena ve výkalech dospělých jedinců, později se našla i v odpadních vodách a ve vaginální mikrobiotě. Tato bakterie obdobně jako *Bifidobacterium pseudocatenulatum* je blíže příbuzná *B. adolescentis* na základě příbuznosti DNA (Mattarelli & Biavati 2014).

Jednotlivé buňky mají zřetelné větvení a mívají 3 až 4 globulární prvky uspořádané do řetězců, kde distální konce těchto řetězců se zužují (viz Obr. 6). Kolonie jsou hladké, konvexní, lesklé a jemné. Mají celé okraje a krémovou až bílou barvu. Optimální teplota je pro *B. catenulatum* 39 až 41 °C a optimální pH od 6,5 do 6,9. Z glukózy fermentují konečné produkty ve formě mléčné a octové kyseliny v poměru 1:2,15. Většina testovaných kmenů v této studii (85 %) fermentovala sorbitol, ale ne mannitol. Obdobně tomu bylo u *B. adolescentis* (Scardovi & Crociani 1974).

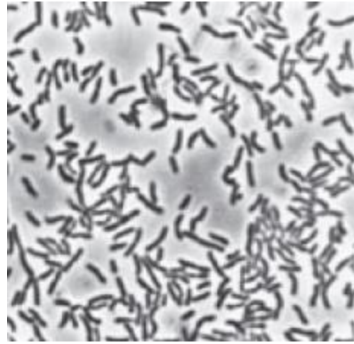


**Obrázek 6** Morfologie *B. catenulatum* (Biavati & Mattarelli 2012).

### 3.2.6 *Bifidobacterium dentium*

*B. dentium* (Scardovi & Crociani, 1974) je bakterie, která byla poprvé izolována z lidského zubního plaku. Později byla objevena i v lidských výkalech a vaginální mikrobiotě. Většina bifidobakterií se dá považovat za přínosné pro lidské zdraví. *B. dentium* je tedy ale výjimkou a považuje se za oportunního patogena, neboť se pojí s rozvojem zubního kazu (Mattarelli & Biavati 2014).

Jedná se o štíhlé tyčinky, které se na distálních koncích větví. U *B. dentium* se nevyskytují globulární prvky (viz Obr. 7). Obecná morfologie je podobná jako u *B. longum*. Povrch kolonií je lesklý, krémové až bílé barvy. Mají zvlňené či celistvé okraje a často bývají měkké a vystouplé. Naopak ve stáří bývají ploché. Optimální teplota pro růst je mezi 39 až 41 °C a optimální pH od 6,5 do 6,9. Konečnými produkty fermentace glukózy jsou mléčná a octová kyselina v poměru 1:2,5. Přibližně 90 % testovaných kmenů nebylo schopno fermentovat sorbitol (Scardovi & Crociani 1974).



**Obrázek 7** Morfologie *B. dentium* (Biavati & Mattarelli 2012).

### 3.2.7 *Bifidobacterium faecale*

*B. faecale* (Choi et al, 2014) je krátká bakterie, která má tvar Y a byla izolovaná z lidských výkalů. Povrch kolonií je hladký, mírně konvexní a bílé barvy. Buňky rostou v rozmezí teplot 30 až 42 °C a při pH od 5,0 do 7,0. Hlavní produkty fermentace jsou mléčná a octová kyselina v poměru 1:1,57. *B. faecale* je schopno fermentovat xylitol na kyseliny, ale není schopno fermentovat erythritol a D-sorbitol na kyseliny (Choi et al. 2014).

### 3.2.8 *Bifidobacterium gallicum*

*B. gallicum* (Lauer, 1990) byla poprvé izolována z lidských exkrementů (Mattarelli & Biavati 2014). Jedná se o krátké tyčinky se zaoblenými konci (viz Obr. 8). Bývají většinou uspořádané v párech nebo krátkých řetězcích, když se pěstují v tekuté kultuře. Vzhled kolonií je neprůhledný, kulatý, celistvý, bělavý a má měkkou konzistenci. Optimální růst je při 37 až 39 °C a optimální pH od 6,0 do 7,0. U čerstvých kultur vzniká slabý octový zápach. Hlavním fermentačním produktem jsou octová a L-mléčná kyselina, dále vzniká také různé množství etanolu. Sorbitol není fermentován (Lauer 1990).



**Obrázek 8** Morfologie *B. gallicum* (Biavati & Mattarelli 2012).

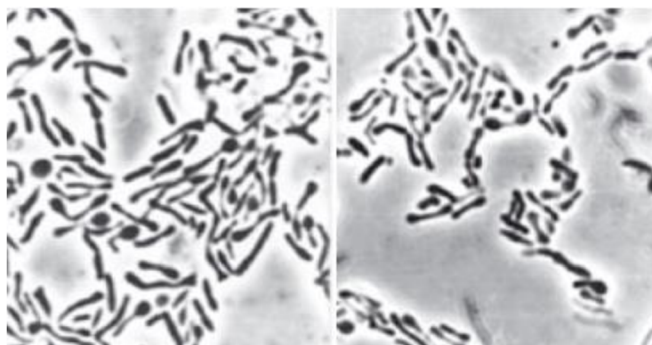
### 3.2.9 *Bifidobacterium longum*

*B. longum* (Reuter, 1963). Jedná se o nejběžnější druh střevních mikroorganismů u dospělých i kojenců po celou dobu lidského života. Tento druh byl uznán za bezpečný Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA – Food and Drug Administration) i Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA – European Food Safety Authority) (Zhang et al. 2019).

Jedná se o dlouhé, zakřivené tyčinky, které mohou být dále i nafouklé, kyjovité, ve tvaru činky nebo rozvětvené (viz Obr. 9). Poprvé byl izolován ze střeva dospělého jedince. Kolonie se jeví jako konvexní, celistvé o průměru 2-5 mm. Povrch kolonií je měkký, vlhký a lesklý či slizký. Konečnými produkty jsou octová a mléčná kyselina. Nedokážou fermentovat erythritol ani sorbitol (Reuter 1971).

*B. longum* bylo spojeno se změnami hojnosti v gastrointestinálním traktu člověka, které mohou mít vliv na onemocnění jako je Crohnova choroba či na alergické reakce. Právě významný rozdíl v množství této bifidobakterie byl pozorován mezi zdravými dětmi, které měly 30,3 % bifidobakterií tohoto druhu a dětmi s alergickými obtížemi, u kterých bylo pouze 11,1 % bifidobakterií tohoto druhu. Obdobně tomu je u Crohnovy choroby, kdy pacienti s touto nemocí mají nižší hladiny *B. longum*. Jako probiotikum je *B. longum* účinné proti autoimunitním onemocněním (zánětlivá onemocnění střev), metabolickému syndromu i proti poruchám mozku a střev (Zhang et al. 2019).

V současné době jsou do tohoto druhu zařazeny 4 poddruhy. *B. longum* subsp. *infantis* a *B. longum* subsp. *longum* byly izolovány z lidských exkrementů, krve, telecích exkrementů a vody (Zhang et al. 2019).



**Obrázek 9** Morfologie *B. longum* subsp. *longum* (vlevo), *B. longum* subsp. *infantis* (vpravo) (Biavati & Mattarelli 2012).

*B. longum* subsp. *longum* patří mezi první bifidobakterie, které byly kompletně sekvenované. To pomohlo objasnit metabolickou diverzitu a poznatky o dalších členech rodu *Bifidobacterium* (Mattarelli & Biavati 2014).

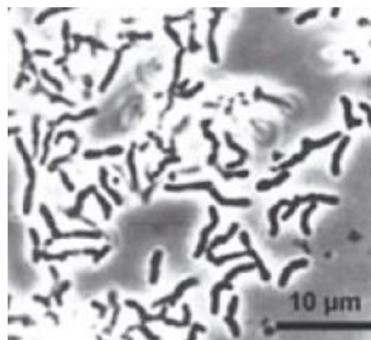
Zbylé 2 poddruhy *B. longum* subsp. *suis* a *B. longum* subsp. *suillum* byly izolovány z exkrementů telat a prasat (Zhang et al. 2019).

### 3.2.10 *Bifidobacterium pseudocatenulatum*

*B. pseudocatenulatum* (Scardovi et al., 1979) je bakterie, která byla poprvé izolována z kojeneckých výkalů. Spolu s *B. catenulatum* si jsou blízce příbuzné. Dále můžeme tuto bakterii nalézt v odpadních vodách, ve výkalech dospělých lidí i kojenců (nezávisle na podávané formě mateřské formule) či u kojenných telat (Mattarelli & Biavati 2014).

Jedná se o nepravidelné tyčinky často uspořádané do párů. Občas se vyskytují s mnohem variabilnějším tvarem (viz Obr. 10). Vzhled kolonií je hladký, lesklý a jemný, konvexní s celými okraji. Bývají krémové až bílé barvy. Optimální teplota pro růst je při 39-41 °C. Optimální pH pro růst je od 6,5 do 6,9. Konečnými produkty fermentace glukózy jsou L-mléčná

a octová kyselina v poměru 1:2. Sorbitol bylo schopno fermentovat 50 % kmenů *B. pseudocatenulatum* izolovaných z kojeneckých výkalů (Scardovi et al. 1979).

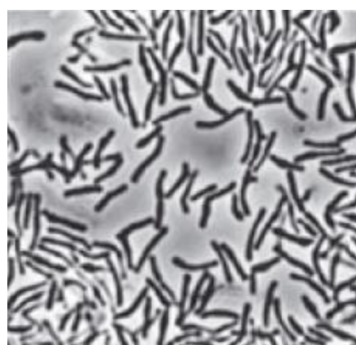


**Obrázek 10** Morfologie *B. pseudocatenulatum* (Biavati & Mattarelli 2012).

### 3.2.11 *Bifidobacterium scardovii*

*B. scardovii* (Hoyles et al., 2002) je bakterie, která je pojmenována podle V. Scardovi, který se podílel na znalostech o bifidobakteriích. Jedná se o tyčinky, které mohou být i zakřivené (viz Obr. 11). Povrch kolonií je lesklý, konvexní s hustým bílým středem. Konečné produkty fermentace glukózy jsou octová a L-mléčná kyselina. Sorbitol není fermentován na kyseliny (Hoyles et al. 2002).

Tento druh byl izolován z lidské krve (Mattarelli & Biavati 2014).



**Obrázek 11** Morfologie *B. scardovii* (Biavati & Mattarelli 2012).

## 3.3 Sladidla

Sladidla jsou látky, které dodávají potravinám sladkou a plnou chuť (Aiello 2020).

Obecně se tedy sladidla dělí na přírodní a umělá. Jako přírodní sladidla můžeme uvést například glukózu, fruktózu, galaktózu, sacharózu, laktózu a maltózu, která se běžně vyskytují v ovoci, medu a mléčných výrobcích (Aiello 2020). Umělá sladidla jsou dále klasifikována podle obsahu kalorií na výživná (cukerné alkoholy) a nevýživná (ostatní umělá sladidla) (Pang et al. 2021).

Sacharóza a produkty, které ji obsahují se vyznačují rychlým vstřebáním glukózy v krvi. Nadměrná konzumace cukru, tedy sacharózy, může vést k řadě zdravotních problémů (např. metabolické a hormonální poruchy, diabetes mellitus 2. typu, kardiovaskulární onemocnění atd.). Kvůli tomuto důvodu je nadměrný příjem cukru celosvětovým problémem v oblasti

veřejného zdraví. Zvýšené povědomí o potravinách, rostoucí obavy spotřebitelů o jejich vlastní zdraví či rostoucí prevalence obezity a dalších onemocnění vede ke zvýšené pozornosti potravin se sníženým obsahem cukru. V důsledku toho roste poptávka po přírodních sladidlech s nízkou kalorickou hodnotou a přijatelnou chutí, které by mohly nahradit sacharózu. Kromě přírodních sladidel začali lidé omezovat příjem cukrů s použitím alternativních sladidel (Pielak et al. 2019).

Alternativní sladidla mohou konzumovat jak lidé s diabetem, tak i běžná populace. Přidávají se jako přísady do mnoha nízkokalorických potravin jako jsou nealkoholické nápoje, mléčné výrobky, práškové nápojové směsi, pečivo, cukrovinky a dezerty, džemy či želé a žvýkačky. Lze je také použít jako stolní sladidlo doma, v jídelnách či restauracích (Ruiz-Ojeda et al. 2019).

Bezpečnost umělých sladidel pro lidskou spotřebu v Evropě byla vyhodnocena a potvrzena EFSA a sbírkou Codex Alimentarius. Uvádí se tedy, že konzumace umělých sladidel a cukerných alkoholů je bezpečná pro lidskou spotřebu a nezpůsobuje nádorová onemocnění, ani jiné zdravotní problémy. V tomto případě se ale počítá s tím, že denní přípustná dávka (ADI – Acceptable Daily Intake) daného sladidla nepřekročí danou mez (Ruiz-Ojeda et al. 2019). Schválení umělých sladidel a obecně potravinářských přídatných látek je založeno na důkladné charakterizaci nebezpečí a rizik. Následuje stanovení ADI a maximální povolené úrovně (MPL – maximum permitted level) v potravinách. Než však budou sladidla povolena v potravinách, musí být podrobeny široké škále testů navržených k vyhodnocení potenciálního rizika pro spotřebitele, kde se posuzuje, jak daná látka v těle reaguje a zda nevyvolává toxické účinky (Sardarodiyani & Hakimzadeh 2016).

V Evropské unii bylo prozatím uznáno 11 nevyživných umělých sladidel pro lidskou konzumaci – acesulfam K, advantam, aspartam, aspartam-acesulfamová sůl, cyklamová kyselina a její sodné a vápenaté soli, neohesperidin dihydrochalkon, neotam, sacharin, steviolglykosidy, sukralóza a thaumatin. Výživných umělých sladidel bylo uznáno 8 – sorbitol, mannitol, isomalt, polyglycitolový sirup, maltitol, laktitol, xylitol a erythritol (Ruiz-Ojeda et al. 2019).

### **3.3.1 Umělá sladidla**

Umělá sladidla jsou látky, které se přidávají do potravinářských výrobků a nápojů jako přídatné látky (Liu et al. 2021), které musí být uvedeny na spotřebitelském obalu formou E kódu (Ruiz-Ojeda et al. 2019). Jedná se o různé chemické látky, které bývají 30-13 000x sladší než sacharóza (Pang et al. 2021). Velkou výhodou je tedy fakt, že mají vysokou sladivost a nízkou kalorickou hodnotu (Ruiz-Ojeda et al. 2019), a proto se označují jako nevyživná sladidla, která slouží jako náhrada kalorických sladidel v potravinách po celém světě (Ahmad et al. 2020).

Umělá sladidla se metabolizují odlišným způsobem než běžné sacharidy, a to právě kvůli jejich odlišným vlastnostem. Proto se dá říct, že každé sladidlo je jedinečné a může odlišně ovlivnit i vnímanou chuť potravin, do kterých se přidává (Pang et al. 2021).

Současná popularita umělých sladidel je založena na tom, že spotřebitelé dávají větší pozornost tomu, jak snížit jejich energetický příjem. K tomu jsou umělá sladidla vhodná a jsou proto používány ke kontrole váhy a případně obezity (Liu, Zhang et al. 2021). Toto je také

důvod, proč došlo v posledních desetiletích k nárůstu potravinářských výrobků s obsahem umělých sladidel na trhu. I přestože mnoho národních úřadů schválilo umělá sladidla za bezpečná a dobře tolerovaná, stále existuje mnoho sporů o jejich účincích na lidské zdraví. Některé dlouhodobé kohortové studie upoutaly pozornost spojitostí mezi konzumací umělých sladidel a snížením rizika vzniku onemocnění diabetu mellitu 2. typu. Na druhou stranu observační studie přinesly opačné závěry. Jiné longitudinální kohortové studie odhalily i souvislost mezi konzumací umělých sladidel a rizikem hypertenze, mrtvice a kardiovaskulárních příhod (Pang et al. 2021).

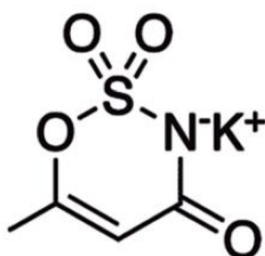
### 3.3.1.1 Acesulfam K

Jedná se o bílý krystalický prášek, rozpustný ve vodě, který nemá žádnou kalorickou hodnotu. Byl objeven v roce 1967 (Ebrahimzadeh et al. 2018).

Jeho denní přípustná dávka je 15 mg/kg tělesné hmotnosti za den (Ruiz-Ojeda et al. 2019). Acesulfam K má 200x vyšší sladivost než sacharóza (More et al. 2021). Sladkost acesulfamu K je vnímána rychle a nepřetrává déle než vlastní chuť potraviny, do které je přidáván. Organoleptické vlastnosti jsou ovlivněny potravinami, ve kterých je konzumován. Při nízkých koncentracích je sladká chuť čistá, zatímco při vyšších koncentracích může být patrná vedlejší chuť (Klug & von Rymon Lipinski 2012).

V praxi se často používá k zamaskování hořké chuti aspartamu v kombinaci s dalšími sladidly (např. sukralóza). Lze jej použít při vaření a pečení, jelikož je tepelně stabilní a díky jeho stabilitě je používán jako sladidlo v mražených pokrmech, pečených potravinách, sladkostech, nápojích i pastilkách proti kašli (More et al. 2021). Jako aditivum se označuje kódem E950 na spotřebitelských obalech (Ruiz-Ojeda et al. 2019).

Z chemického hlediska (viz Obr. 12) jde o organickou kyselinu kombinovanou s draselnou solí (K v názvu sladidla). V lidském těle neovlivňuje příjem draslíku a ani se nemetabolizuje (More et al. 2021), proto je málo pravděpodobné, že se by dostal do dolních partií gastrointestinálního traktu a ovlivnil tak střevní mikrobiotu. Po konzumaci je tedy acesulfam K rychle vstřebán v GIT a poté vyloučen v nezměněné podobě převážně močí (85 %) a stolicí v menším množství (15 %) (Khan et al. 2020).



**Obrázek 12** Chemická struktura acesulfamu K (Ruiz-Ojeda et al. 2019).

### 3.3.1.2 Aspartam

Aspartam byl objeven v roce 1965 a jeho denní přípustná dávka je 0-40 mg/kg hmotnosti za den. Jde o bílou látku bez pachů, která není teplotně stabilní. To je také důvod, kvůli kterému

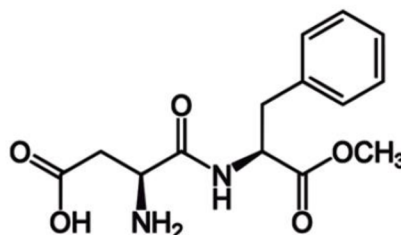
ho nelze použít při vaření. Další nevýhodou je, že se rozkládá v tekutinách během jejich skladování (Ebrahimzadeh et al. 2018).

Sladivost aspartamu je 200x vyšší než u sacharózy. Na rozdíl od ostatních umělých sladidel má aspartam kalorickou hodnotu 4 kcal/g. Přesto díky jeho vysoké sladivosti se používá ve velmi malých množstvích, kdy je kalorický příjem téměř zanedbatelný (Pang et al. 2021).

Vzhledem k jeho čistotě a sladké chuti je aspartam používán ve více než 6000 různých druzích potravinových výrobků, jako jsou např. mražené dezerty, žvýkácké multivitaminy, stolní sladidla a další (More et al. 2021).

Z chemického hlediska se jedná o syntetický metyl ester dipeptidu, který je tvořený asparagovou kyselinou a fenylalaninem, jak je znázorněno na Obrázku 13 (Khan et al. 2020). Po příjmu je aspartam v GIT rychle metabolizován na asparagovou kyselinu, fenylalanin a metanol v poměru 50:40:10 (Ebrahimzadeh et al. 2018). Tyto hydrolyzované složky jsou v organismu metabolizovány jejich normálními cestami. Metanol je metabolizován v játrech, zatímco asparagová kyselina a fenylalanin se využívají jako volné aminokyseliny, které mohou sloužit pro syntézu bílkovin, či jsou dále vylučovány (Pang et al. 2021).

Díky přítomnosti fenylalaninu v aspartamu nemůže být konzumován lidmi, kteří trpí fenylketonurií (Khan et al. 2020) a proto výrobci potravin musí informaci o obsahu fenylalaninu uvádět na obalech potravin (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008). Aspartam se na spotřebitelských obalech označuje pod kódem E951 (Ruiz-Ojeda et al. 2019).



**Obrázek 13** Chemická struktura aspartamu (Ruiz-Ojeda et al. 2019).

### 3.3.1.3 Sacharin

Jedno z prvních umělých sladidel, které bylo v historii objeveno, byl právě sacharin. Poprvé byl syntetizován v roce 1879 Remsenem a Fahlbergem (Tandel 2011).

Spotřeba sacharinu vzrostla v období 1. světové války, kdy docházelo k výraznému poklesu zemědělské produkce a cukr byl na příděl. Po 1. světové válce se spotřeba sacharinu opět zvýšila a po 2. světové válce začala jeho spotřeba exponenciálně růst. Právě s rostoucí popularitou sacharinu v minulém století, začala být dostupná řada dalších umělých sladidel (Lewis & Tzilivakis 2021).

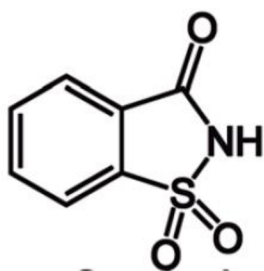
Sladivost sacharinu je přibližně 300x sladší než sacharóza. Intenzita sladivosti závisí na koncentraci a složení roztoku. Sacharin má mírně nahořklou kovovou pachů, která se v praxi maskuje přidáním jiných sladidel. ADI je u sacharinu udávána v množství 5 mg/kg tělesné hmotnosti (Mahmood & Al-Juboori 2020).

Lze ho nalézt v potravinách jako aditivum – stolní sladidla, džusy, džemy, žvýkačky, různé dezerty a cukrovinky (More et al. 2021), ale také v kosmetice, zubní pastě či ústní voďe

a v léčivech (Mahmood & Al-Juboori 2020). Sacharin se jako aditivum označuje na obalech potravin pod kódem E954 (Ruiz-Ojeda et al. 2019).

Z chemického hlediska se jedná o sulfonamidový derivát toluenu (viz Obr. 14), který se vyskytuje ve sodíkové nebo draselné formě, popř. ve formě kyseliny. Sacharin se rozkládá při teplotách vyšších než 380 °C a uvolňuje toxické výpary (oxidy dusíku a síry) (Mahmood & Al-Juboori 2020).

Po konzumaci sacharinu je 85-95 % absorbováno a jako nezměněná látka vyloučen močí. Zbývající část sacharinu (5-15 %) prochází trávicím traktem a je vyloučen v nezměněné formě stolicí (Pang et al. 2021).



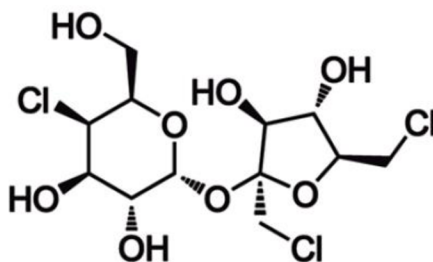
**Obrázek 14** Chemická struktura sacharinu (Ruiz-Ojeda et al. 2019).

#### 3.3.1.4 Sukralóza

Jedná se o syntetickou molekulu vytvořenou substitucí 3 hydroxylových skupin v molekule sacharózy za 3 chloridové atomy (viz Obr. 15) (More et al. 2021). Toto umělé sladidlo bylo objeveno v roce 1976 britskými vědci (Tandel 2011).

Sladivost sukralózy je až 600x větší než sacharóza (Shahriar et al. 2020). I přestože je sukralóza velmi podobná sacharóze, tak nemá žádnou kalorickou hodnotu, a to z důvodu její špatné absorpce v lidském těle (More et al. 2021).

Většina zkonzumované sukralózy (65-95 %) je vyloučena v nezměněné formě výkaly a pouze zanedbatelné množství je absorbováno (Ebrahimzadeh et al. 2018).



**Obrázek 15** Chemická struktura sukralózy (Ruiz-Ojeda et al. 2019).

### 3.3.2 Cukerné alkoholy

Cukerné alkoholy (polyoly) jsou nízko stravitelné sacharidy, které se získávají substitucí aldehydové skupiny za hydroxylovou skupinu. Přírodně se vyskytují v malém množství v ovoci, některých druzích zeleniny a hub. Přidávají se jako aditiva do potravin za účelem zlepšení technologických vlastností potravin, a proto také musí být uvedeny na spotřebitelských



obalech formou E kódu (Grembecka 2015). Většina polyolů se nachází ve formě krystalických látek nebo tekutých sirupů (More et al. 2021).

Mezi cukerné alkoholy řadíme hydrogenované monosacharidy jako jsou sorbitol či mannitol, dále také hydrogenované disacharidy (isomalt, maltitol, laktitol) a směsi hydrogenovaných mono-, di- nebo oligosacharidů (Grembecka 2015).

I přestože pro ně nebyla stanovena ADI, jsou známé pro jejich projímavé účinky, nadýmání a plynatost při nadměrné konzumaci (Grembecka 2015). Pokud obsah polyolů v potravině je vyšší než 10 %, musí být na obalu uvedeno upozornění: „Nadměrná konzumace může vyvolat projímavé účinky“ (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008; Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1169/2011).

Sladivost cukerných alkoholů bývá obvykle nižší, než je sladivost monosacharidů (Grembecka 2015). Bývají přibližně z 25-100 % stejně sladké jako cukr (Ruiz-Ojeda et al. 2019). To je důvod, proč je lze používat jako objemová sladidla, kdy se přidávají do potravin v totožném množství jako cukry. Velmi často se používají v kombinaci s ostatními sladidly k dosažení požadované úrovně sladkosti a chuti.

Obecně jsou schopny tedy fungovat jako sladidla, dále ovlivňují texturu výrobku, konzervaci, zadržují vlhkost či mají schopnost chladivého pocitu v dutině ústní. Mohou také působit jako prebiotika nebo činidla proti tvorbě zubního kazu (Grembecka 2015).

Díky nízké kalorické hodnotě mohou pomoci při snížení energie a redukci hmotnosti. Jejich konzumace totiž nevyvolává zvýšení glykémie nebo sekrece inzulínu, a proto jsou doporučovány pacientům s diabetem. V důsledku nižší nutriční hodnoty bývá jejich absorpce ve střevech pomalejší a neúplná. Část neabsorbovaných cukerných alkoholů je fermentována střevní mikrobiotou za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem a plyny (Grembecka 2015).

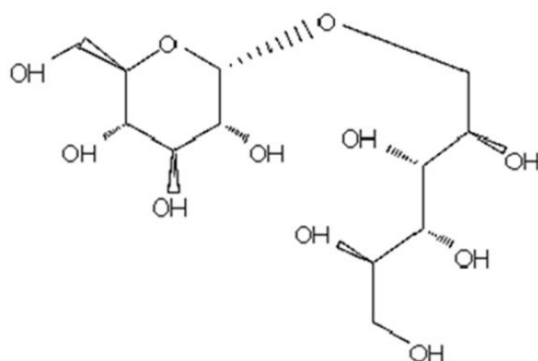
Pro spotřebitele je také důležité možné riziko nesnášenlivosti u polyolů, kdy příznaky intolerance závisí na stupni malabsorpce, osmotické aktivitě daného cukerného alkoholu a zda byla překročena fermentační kapacita tlustého střeva (Finney et al. 2007).

### 3.3.2.1 Isomalt

Isomalt byl objeven v 60. letech a jde o bílou, krystalickou látku, která krystalizuje pomaleji než sacharóza a je bez zápachu. Chemická struktura isomaltu se skládá ze dvou izomerických disacharidových alkoholů – gluko-mannitol a gluko-sorbitol (viz Obr. 16).

Jedná se o látku, která je tepelně rezistentní, díky čemuž si zachovává sladkou chuť i při vysokých teplotách. Sladivost isomaltu se pohybuje okolo 45-65 % sladivosti sacharózy. Sladivost ovlivněna převážně koncentrací, teplotou a formou isomaltu (Grembecka 2015).

Díky vlastnosti maskování hořké pachuti se používá v kombinaci s nenutričními sladidly. Používá se převážně jako sladidlo, dále je možné ho využít jako lešticí činidlo, plnidlo či protispékavá látka. Mezi další vlastnosti lze uvést, že nezvyšuje hladinu glukózy v krvi, ani inzulín, není kariogenní. Dále bylo zjištěno, že zubní pasty obsahující isomalt zvyšují remineralizaci zubů. To je také důvod, proč můžeme řadit produkty slazené isomaltem mezi látky bezpečné pro zuby (Grembecka 2015).



**Obrázek 16** Chemická struktura isomaltu (Grembecka 2015).

ADI u isomaltu nebyla specifikována. Ovšem při konzumaci velkého množství isomaltu může docházet k projímavým účinkům, hlavně u tekuté potravy s přídatkem isomaltu. I přesto jsou tyto účinky ovlivněny individuální citlivostí jedince a frekvencí konzumace.

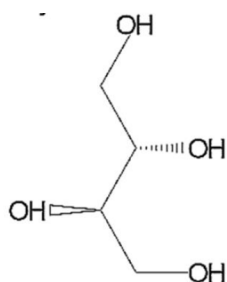
V Evropě se používá od 80. let 20. století ve formě výživových doplňků, kapkách proti kašli, pastilek, bonbónech, žvýkačkách, ale i v pečivu. Na spotřebitelských obalech se označuje kódem E953.

Isomalt je pomalu stráven a absorbován v horní části trávicího traktu (10 %). Část isomaltu, která se neabsorbuje (90 %) je fermentována střevní mikrobiotou v tlustém střevě (Grembecka 2015).

### 3.3.2.2 Erythritol

Erythritol je čtyřuhlíkatý cukerný alkohol (viz Obr. 17) produkovaný fermentací glukózy a sacharózy pomocí *Trichosporonoides mega-chiliensis*. Sladivost erythritolu se pohybuje kolem 60-80 % sacharózy.

Lze jej vyrobit i pomocí enzymatické hydrolýzy kvasnou fermentací, při které se používá pšeničný a kukuřičný škrob (More et al. 2021).



**Obrázek 17** Chemická struktura erythritolu (Grembecka 2015).

Tento polyol se vyznačuje vysokou teplotní stabilitou a stabilitou v kyselém či alkalickém prostředí. Neúčastní se Maillardovy reakce a jedná se o nehygroskopickou látku. Mezi jeho vlastnosti řadíme nekariogenní účinky, bývá bez pachutí a s mírným chladičným účinkem v ústech. Nezvyšuje hladinu glykémie a je vhodný v kombinaci s ostatními sladidly, protože dokáže maskovat nežádoucí pachutě ostatních sladidel.

Přírozně se nachází v malých množstvích v zelenině, ovoci (melouny, broskve), houbách i fermentovaných potravinách (víno, pivo, saké, sójová omáčka). Co se týká potravin, používá se ve žvýkačkách, cukrovinkách a zmrzlínách. Jako aditivum se na spotřebitelských obalech označuje kódem E968 (Grembecka 2015).

Většina stráveného erythritolu (60-90 %) je rychle absorbována v tenkém střevě a po metabolizaci je vylučována do 24 hodin močí (Grembecka 2015).

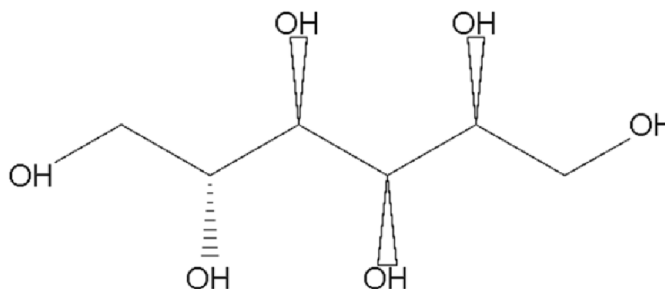
### 3.3.2.3 Sorbitol

Sorbitol neboli D-glucitol je šestiuhlíkatý polyol (viz Obr. 18), který byl objeven francouzským chemikem v plodech jeřábu v roce 1872. Přírozně se vyskytuje převážně v ovoci (jablka, hrušky, broskve, meruňky, nektarinky) i v zelenině. Lze jej také vyrobit hydrogenací z glukózy či sacharózy.

Sladivost sorbitolu se udává kolem 60 % sladivosti sacharózy. Má 20x vyšší rozpustnost ve vodě než mannitol a v ústech vyvolává chladivý pocit. Lze jej použít jako sladidlo, ale také jako změkčovadlo, zvlhčovadlo i texturizační a antikrystalizační činidlo. Sorbitol má nekariogenní vlastnosti a přidává se do různých bonbónů, žvýkaček, mražených dezertů, pečiva i cukrovinek, kde je na spotřebitelských obalech označován kódem E420. Sorbitol je také inertní a stabilní při vysokých teplotách a nepodléhá Maillardově reakci. Nevýhodou je jeho vysoká hygroskopičnost.

ADI pro sorbitol je nespecifikována, a tudíž na něj nejsou kladeny žádné limity v jeho použití. Podobně jako jiné polyoly může při nadměrné konzumaci vyvolat projímavý účinek.

Částečně je absorbován v horní části trávicího traktu. Neabsorbovaná část sorbitolu je metabolizována střevními bakteriemi v tlustém střevě (Grembecka 2015).



**Obrázek 18** Chemická struktura sorbitolu (Grembecka 2015).

### 3.3.2.4 Xylitol

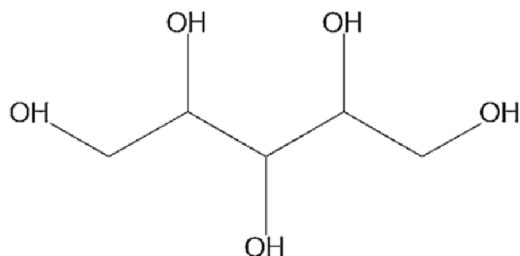
Xylitol je pětiuhlíkatý polyol (viz Obr. 19), který se vyrábí z D-xylózy. Jeho objev se uskutečnil v roce 1891. Od 60. let 20. století se používá jako sladidlo. V přírodě lze najít xylitol v ovoci, zelenině, různých bobulích, ovsu i v houbách. Dále je také produkován v malém množství lidským organismem.

Hlavním substrátem pro jeho výrobu je xylan, který se získává ze dřeva bříz a jiného tvrdého dřeva.

Jedná se o nejsladší polyol, který se rychle rozpouští, je bez zápachu a v ústech vytváří chladivý pocit. Sladivost xylitolu je srovnatelná se sladivostí sacharózy. Je schopný omezit riziko tvorby zubního kazu, jelikož xylitol zvyšuje hodnoty pH v dutině ústní a přispívá tím

k remineralizaci zubů (tvorba komplexů s vápníkem). Xylitol se také využívá jako zdroj energie v infúzní terapii. Dále je používán v potravinách (žvýkačky, bonbóny), léčivech, nutraceutikách. Jako přídatná látka je uváděn pod kódem E967 na obalech potravin.

Xylitol je přibližně z 50 % absorbován v tenkém střevě. Neabsorbovaná část xylitolu (50-75 %) je fermentována nepřímo střevními bakteriemi tlustého střeva či přímo v játrech (Grembecka 2015).



**Obrázek 19** Chemická struktura xylitolu (Grembecka 2015).

### 3.4 Interakce mezi střevní mikrobiotou a umělými sladidly

Střevní mikrobiota a produkty mikrobiální fermentace hrají klíčovou roli v mnoha aspektech lidského zdraví. Kvůli variabilitě stravy jednotlivců je ovlivněno složení mikrobioty, a tedy i celkový zdravotní stav organismu (Pang et al. 2021) z krátkodobého i dlouhodobého hlediska. Rozdíly v absorpci a metabolizaci umělých sladidel nebo jejich složek mohou vést k rozdílům ve schopnosti interagovat se střevní mikrobiotou skrz gastrointestinální trakt (Hughes et al. 2021).

V průřezové studii bylo zjištěno, že umělá sladidla mohou ovlivnit diverzitu střevní mikrobioty, kdy dojde k dysbióze ve střevech a zvýší se poměr bakterií kmenů Firmicutes ku Bacteroidetes u morbidně obézních jedinců. Účinky umělých sladidel na gastrointestinální mikrobiotu nemusí být vždy stejné, jelikož se jednotlivá sladidla odlišně metabolizují. Střevní mikrobiotu mohou tedy přímo ovlivňovat pouze sladidla, která nejsou snadno stravitelná a vstřebatelná, tím pádem se dostávají do tlustého střeva (Pang et al. 2021).

Střevní mikrobiota bývá vystavena evolučnímu tlaku v důsledku naší západní stravy, která postrádá rostlinné polysacharidy. To může být důsledkem dysbiózy a snížené diverzity střevní mikrobioty. Tento tlak je způsobený na jedné straně přizpůsobením mikrobioty „neznámým“ substrátům v podobě umělých sladidel a cukerných alkoholů, na druhé straně je konfrontována s nadměrným množstvím „známého“ substrátu (např. fruktóza jako náhrada za sacharózu) (Payne et al. 2012).

Dalším důležitým bodem je působení umělých sladidel na střevní mikrobiotu z hlediska toxického. Existují bakterie, které umí metabolizovat umělá sladidla jako zdroj energie, na druhou stranu tu jsou bakterie, které to neumí a umělá sladidla pro ně mohou být i toxická. Příkladem takových sladidel jsou sacharin a sukralóza, která nejsou metabolizována organismem hostitele, a i přesto ovlivňují růst určitých bakterií (Suez et al. 2015).

Dle Lobach et al. (2019) studie nízké a bezkalorických sladidel neprokázaly žádný jasný důkaz jakéhokoli nepříznivého účinku na střevní mikrobiotu v dávkách relevantních pro použití u lidí. Tato informace byla vyvrácena, jelikož sladidla jsou strukturálně různorodá a značně se

liši ve farmakokinetice. To je důvod, proč je nevhodné vyvozovat zobecněné závěry ohledně účinků na střevní mikrobiotu a bezpečnost pro tuto různorodou skupinu chemikálií. Příkladem zde může být právě již zmiňovaná sukralóza (Schiffman & Nagle 2019).

U acesulfamu K je krajně nepravděpodobné, že by umělá sladidla mohla mít přímý vliv na střevní mikrobiotu, jelikož pouze malé koncentrace tohoto sladidla se dostanou až do tlustého střeva. Některé studie ale uvádí malé výkyvy ve složení střevní mikrobioty (Plaza-Diaz et al. 2020).

Aspartam se v těle nehromadí a kvůli jeho rychlému trávení se nedostane ani do kontaktu se střevní mikrobiotou v tlustém střevě (Pang et al. 2021). Existují studie, které odhalují možné modifikace mikrobioty v důsledku použití aspartamu. Tyto studie analyzují jednotlivé a kombinované účinky nízkých koncentrací aspartamu spolu s acesulfamem K. Důsledkem byla indukce růstu *Escherichia coli* a exprese některých důležitých genů, které mohou souviset s kolonizací ve střevě. V jiných studiích podávání aspartamu významně zvýšilo růst rodu *Bifidobacterium* a *Blautia coccooides*. Na druhou stranu se snížil poměr *Bacteroides / Prevotella*. Zde je ale důležité zmínit, že sladidlo obsahovalo kromě aspartamu i maltodextrin, takže autoři nestudovali účinek pouze samotného aspartamu (Plaza-Diaz et al. 2020).

Malé procento neabsorbovaného sacharinu je vylučováno stolicí. Proto pouze vysoké koncentrace tohoto sladidla by mohly vést ke změnám složení střevní mikrobioty. Jedna z hlavních studií uvedla, že podání sacharinu v plné ADI zapříčinila změnu ve střevní mikrobiotě. Zde je však potřeba uvést, že toto množství neodpovídá tomu, co se konzumuje při běžné lidské konzumaci sacharinu. V jiné modelové *in vitro* studii vyvolal sacharin zvýšení počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* a způsobil pokles *Firmicutes*, což souviselo s hladinou mastných kyselin s krátkým řetězcem (Plaza-Diaz et al. 2020).

U sukralózy bylo zjištěno, že není pro bakterie výživná, a tudíž je odolná vůči fermentaci gastrointestinální mikrobiotou. Tu mimo jiné ovlivňuje prostřednictvím bakteriostatických účinků (Pang et al. 2021). Nedávná studie ukázala i krátkodobý vliv konzumace sukralózy na kontrolu glykémie a její interakce se střevní mikrobiotou u zdravých jedinců. Výsledkem této studie bylo, že konzumace vysokých dávek sukralózy (ze 75 % ADI) po dobu 7 dnů nezměnila glykémii, inzulínovou rezistenci či střevní mikrobiom na úrovni kmenů. V předchozích studiích na lidech byly publikovány podobné výsledky ohledně kontroly glykémie. Rozdíl byl, že se studovala populace bez a s diabetem (Plaza-Diaz et al. 2020).

Existují studie na lidech i zvířecích modelech ohledně cukerných alkoholů, které dokážou podpořit několik prospěšných bakterií ve střevním traktu. Stále však není známo, jestli k této interakci dochází jednoduše propagací růstu těchto bakterií nebo složitějšími interakcemi (Di Rienzi & Britton 2020).

Jak již bylo zmíněno výše, isomalt je z 90 % metabolizován střevní mikrobiotou, kdy vznikají produkty jako mastné kyseliny s krátkým řetězcem, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> a H<sub>2</sub>. Isomalt není fermentován některými druhy kvasinek a dalšími mikroorganismy vyskytujícími se v přírodě (Grembecka 2015). Ve studii podle Gostner et al. (2006) došlo k novému zjištění ohledně prebiotického účinku isomaltu u zdravých lidí, kdy pomocí 2 nezávislých metod byl pozorován nárůst fekálního počtu bifidobakterií o 47 a 65 %. Tato studie se tak řadí mezi jednu z prvních studií, která prokazuje, že isomalt má také bifidogenní účinky, a to i díky dobrému zdroji butyrátu, který působí jako prebiotikum (Grembecka 2015).

Omezené množství erythritolu, které se dostane do tlustého střeva je fermentováno střevní mikrobiotou do krátkých mastných kyselin a je vyloučen výkaly (More et al. 2021). V nedávné studii potvrdili, že se mastné kyseliny s krátkým řetězcem po konzumaci erythritolu zvýšily, konkrétně šlo o butyrát a valerát. To mohlo zapříčinit možný vliv na střevní mikrobiotu (Plaza-Diaz et al. 2020).

Sorbitol obdobně jako isomalt je částečně metabolizován střevní mikrobiotou za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem a plynů. Při požití vyšších dávek mohou spotřebitelé trpět plynatostí a nadýmáním. Celkově se studie sorbitolu zaměřují spíše na vyvolané symptomy po jeho požití než jeho možným vlivem na lidskou mikrobiotu. I přesto se ale od 30. let minulého století ví, že bakterie jako *E. coli*, *Lactobacillus* spp. či *Streptococcus* spp. dokáží sorbitol metabolizovat (Plaza-Diaz et al. 2020).

Střevní mikrobiota je schopna vytvořit krátké mastné kyseliny a plyny z určité části přijaté dávky xylitolu. Jelikož xylitol může způsobit osmotický průjem při konzumaci vyšších množství, tak se očekává, že tento polyol dokáže měnit střevní mikrobiotu člověka (Plaza-Diaz et al. 2020).

I přes všechny tyto zmíněné studie, stále zůstává plno informací ohledně fermentace umělých sladidel střevní mikrobiotou neprozkoumaných či nedostatečně zdokumentovaných (Payne et al. 2012). Proto by budoucí studie měly omezit matoucí faktory jako jsou kontrola stravy, použití čistých forem umělých sladidel a zkoumání účinků objemových činidel, podávání dávek odpovídající ADI a výběr relevantní zkoumané populace (Hughes et al. 2021).

## 4 Metodika

Praktická část diplomové práce se zabývala testováním schopnosti různých kmenů bifidobakterií metabolizovat umělá sladidla a cukerné alkoholy.

Testování probíhalo v *in vitro* podmínkách pomocí makrodiluční a mikrodiluční metody, kdy se bifidobakterie kultivovaly v tekutém kultivačním médiu (API 50 CHL – bioMérieux) obohaceného zkoumanými substráty umělých sladidel a cukerných alkoholů.

### 4.1 Příprava médií

Aby bylo možné sledovat růst bifidobakterií, bylo potřeba připravit API 50 CHL médium (bioMérieux). Jde o tekuté kultivační médium s indikátorem (fenolová červeň), do kterého byly později přidány substráty ve formě syntetických sladidel a cukerných alkoholů.

K přípravě API 50 CHL média (bioMérieux) byly všechny potřebné složky naváženy (viz Tab. 1) a převedeny do požadovaného množství destilované vody. Výjimkou zde byla fenolová červeň u médií pro mikrodiluční metodu, kde bylo nevhodné použití indikátoru, jelikož by byl ovlivněn výsledek měření pomocí přístroje TECAN Infinite M200.

K úplnému rozpuštění všech látek bylo docíleno zahřátím média a následným vařením po dobu 20 minut. Následovala úprava pH v rozmezí 6,7 – 7,1 pH stupnice. Toho bylo docíleno použitím pH papírků a následnou úpravou pH pomocí 1 M roztoku NaOH na požadovanou hodnotu.

**Tabulka 1** Složení API 50 CHL tekutého média.

Složení média API 50 CHL	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Bakteriologický pepton	10 g
Kvasnicový extrakt	5 g
Tween (Polysorbate 80)	1 ml
Hydrogenfosforečnan draselný	2 g
Octan sodný	5 g
Citronan amonný	2 g
Síran hořečnatý	0,20 g
Síran manganatý	0,05 g
Fenolová červeň	0,17 g

#### 4.1.1 Substráty

Jako hlavní substráty byla použita vybraná syntetická sladidla a cukerné alkoholy, která byla rozdělena do 2 skupin (viz Tab. 2). Konkrétně šlo o acesulfam K, aspartam, isomalt, erythritol, sacharin, sukralóza, sorbitol a xylitol. Dále byla použita bezvodá glukóza k vytvoření pozitivní kontroly a k vytvoření negativní kontroly nebyl v médiu použit žádný substrát.

Všechny substráty byly připraveny o koncentraci 1,5 g substrátu na 1000 ml média. Poté byly substráty převedeny do API média, kde byly úplně rozpuštěny. Výjimkou zde byl sorbitol,

který byl přidán až po sterilizaci API média ve zkumavkách (penicilínkách) či lahvičkách (vialkách).

**Tabulka 2** Seznam testovaných umělých sladidel a cukerných alkoholů

	<b>Název</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Druh</b>
<b>Skupina 1</b>	Acesulfam K	T-string Pardubice	Umělé sladidlo
	Aspartam	T-string Parubice	Umělé sladidlo
	Erythritol	4Slim	Cukerný alkohol
	Isomalt	Special Ingredients	Cukerný alkohol
<b>Skupina 2</b>	Sacharin	buXtrade	Umělé sladidlo
	Sorbitol	Natural Nutrition	Cukerný alkohol
	Sukralóza	Natural Nutrition	Umělé sladidlo
	Xylitol	4Slim	Cukerný alkohol

#### 4.1.2 Příprava penicilínek na makrodiluční metodu

Do 450 ml API média byla přidána požadovaná koncentrace substrátu, s výjimkou sorbitolu. Všechny složky byly rozpuštěny. Pomocí automatické pipety (Eppendorf) bylo napipetováno do každé penicilinky 9 ml média se substrátem. Za použití vodní lázně po dobu 10 minut při 95 °C a použití CO<sub>2</sub> kolony k nasycení média oxidem uhličitým, bylo dosaženo anaerobního prostředí vhodného pro růst bifidobakterií.

Byly připraveny penicilinky s jednotlivými substráty syntetických sladidel a cukerných alkoholů (viz Obr. 20). Dále také pozitivní kontrola, která obsahovala API médium s bezvodou glukózou jako substrátem pro kontrolu růstu bifidobakterií. Jako poslední byly vytvořeny penicilinky s API médiem bez jakéhokoli substrátu, které byly poté využity jako negativní kontrola indikující čistotu práce, médium pro přípravu inokula k inokulaci penicilínek či jako penicilinky bez substrátu pro přidání sorbitolu po sterilizaci.

Takto připravené a vhodně označené penicilinky byly sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. U sorbitolu probíhala sterilizace pomocí membránového filtru (ROTH) o velikosti pórů 0,22 µm. Nejdříve byl vytvořen zásobní roztok o dané koncentraci, z kterého bylo odebráno zanedbatelné množství 0,1 ml a převedeno do každé penicilinky. Tímto způsobem bylo v penicilínce docíleno potřebné koncentrace sorbitolu.



**Obrázek 20** Penicilinky s API médiem a rozpuštěným substrátem.



### 4.1.3 Příprava vialek na mikrodiluční metodu

Na přípravu mikrodiluční metody bylo použito 70 ml API média spolu s naváženým substrátem o dané koncentraci. Vše bylo úplně rozpuštěno ve vialkách a s použitím vodní lázně a CO<sub>2</sub> kolony bylo vytvořeno anaerobní prostředí.

Byly připraveny jednotlivé vialky (viz Obr. 21) se substráty (kromě sorbitolu), vialka s glukózou jako pozitivní kontrola a vialky bez substrátu jako negativní kontrola, médium pro přípravu inokula a vialka pro sorbitol, obdobně jako u penicilinek.

Poté následovala sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. U vialky se sorbitolem byl použit ke sterilizaci stejný membránový filtr jako u makrodiluční metody. Pomocí tohoto filtru bylo přefiltrováno dané množství sorbitolu, které odpovídalo potřebné koncentraci sorbitolu ve vialce.



**Obrázek 21** Vialky s API médiem a rozpuštěným substrátem.

## 4.2 Příprava kultur bifidobakterií k zaočkování

K přípravě zaočkování čerstvé kultury bylo připraveno Wilkins-Chalgren tekuté médium (Oxoid) do penicilinek, které byly předem vysterilizovány při 121 °C. Složení tekutého média je uvedeno v Tabulce 3.

**Tabulka 3** Složení Wilkins-Chalgren tekutého média obohaceného o sojový pepton.

Složení média Wilkins-Chalgren (pH 7-7,2)	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Sójový pepton	5 g
Cystein	0,5 g
Tween (Polysorbate 80)	1 ml
Wilkins-Chalgren bujón	33 g

Do takto připravených penicilínek bylo zaočkováno ve dvou kopiích po 0,4 ml inokula stejného kmene. Protože jsou bifidobakterie hostitelsky specifické, byly pro tento pokus vybrány kmeny, které jsou humánního původu a byly izolovány z trávicího traktu člověka. Testované kmeny bifidobakterií pocházeli z Americké sbírky typových kultur (ATTC – American Type Culture Collection), Belgických koordinovaných sbírek mikroorganismů (BCCM/LMG – Belgian coordinated collections of microorganisms), Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) a soukromé sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky (KMVD) z České zemědělské univerzity v Praze (viz Tab. 4).

Při přípravě čistých kultur bylo potřeba brát ohled na čistotu práce. Následně byly penicilínky kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 až 48 hodin dle použitého kmene bifidobakterií.

Po kultivaci byla ověřena mikroskopická čistota pomocí mikroskopu (Nikon Eclipse E200) a vyloučena případná kontaminace nevhodnými bakteriemi.

**Tabulka 4** Seznam testovaných kmenů bifidobakterií

<b>Kmen</b>	<b>Zdroj</b>	<b>Původ</b>	
<i>B. adolescentis</i>	DSM 20083	Sbírkový kmen	Stolice dospělého
	D2	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	D6	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	D28	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	D51	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	D63	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	B2	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	B9	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
B30	Sbírka KMVD	Stolice dospělého	
<i>B. angulatum</i>	DSM 20098	Sbírkový kmen	Stolice dospělého
<i>B. bifidum</i>	DSM 20082	Sbírkový kmen	Stolice dospělého
	DSM 20456	Sbírkový kmen	Stolice kojence
	DSM 20215	Sbírkový kmen	Stolice dospělého
	ATCC 29521	Sbírkový kmen	Stolice kojence
	B6	Sbírka KMVD	Stolice kojence
<i>B. breve</i>	ATCC 15700	Sbírkový kmen	Stolice kojence
<i>B. catenulatum</i>	D1	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	D16	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	D36	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	B12	Sbírka KMVD	Stolice kojence
	B51	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	B53	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
<i>B. catenulatum</i> subsp. <i>kashiwanohense</i>	DSM 21854	Sbírkový kmen	Stolice kojence
<i>B. dentium</i>	DSM 20436	Sbírkový kmen	Zubní kaz dospělého
<i>B. faecale</i>	LMG 30642	Sbírkový kmen	Stolice kojence

**Tabulka 4** Pokračování

Kmen		Zdroj	Původ
<i>B. gallicum</i>	DSM 20093	Sbírkový kmen	Stolice dospělého
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	ATCC 15707	Sbírkový kmen	Stolice dospělého
<i>B. longum</i>	D3	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	D15	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	D23	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	D26	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	D30	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	D45	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	D50	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	D61A	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
<i>B. longum</i>	D67	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	B1	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
	B3	Sbírka KMVD	Stolice kojence
	B4	Sbírka KMVD	Stolice kojence
	B5	Sbírka KMVD	Stolice kojence
	B7	Sbírka KMVD	Stolice kojence
	B8	Sbírka KMVD	Stolice kojence
	B19	Sbírka KMVD	Stolice kojence
	B20	Sbírka KMVD	Stolice kojence
	B27	Sbírka KMVD	Stolice kojence
B28	Sbírka KMVD	Stolice kojence	
<i>B. pseudocatenulatum</i>	D32	Sbírka KMVD	Stolice dospělého
<i>B. scardovii</i>	DSM 13734	Sbírkový kmen	Lidská krev

Poznámka:

ATCC – Americká sbírka typových kultur

DSM – Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur

LMG (BCCM/LMG) – Belgické koordinované sbírky mikroorganismů

KMVD – Sbírka mikroorganismů Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky na České zemědělské univerzitě v Praze

### 4.3 Příprava inokula

Pro přípravu inokula je důležitá čistota kultury, proto byla práce prováděna za aseptických podmínek a s použitím sterilních nástrojů.

#### 4.3.1 Příprava inokula pro makrodiluční metodu

Na přípravu inokula do penicilínek byly použity penicilínky bez substrátu.

6 ml čisté kultury bylo převedeno do sterilních mikrozkušavek (Eppendorf) a bylo odstředěno pomocí centrifugy (Eppendorf) při 14 500 otáček/min. po dobu 2 minut.

Následně byl slit supernatant a pelety byly promyty a resuspendovány bifipufrem ve stejném množství jako byla čistá kultura. Poté byly znovu odstředěny za stejných podmínek.

Supernatant byl znovu odstraněn a pelety byly resuspendovány API médiem bez substrátu z penicilínky ve stejném množství. Takto vzniklo inokulum potřebné k inokulaci penicilínek se substráty.

Do připravených a nadepsaných penicilínek (viz Obr. 22) s API médiem a substráty, pozitivní a negativní kontrolou ve třech opakování, bylo inokulováno 0,3 ml inokula za dodržování aseptických podmínek.



**Obrázek 22** Makrodiluční metoda – použití penicilínek s API médiem a substráty (acesulfam K, isomalt, erythritol, aspartam), pozitivní kontrolou (glukóza) a negativní kontrolou (bez substrátu) ve třech opakováních.

#### 4.3.2 Příprava inokula pro mikrodiluční metodu

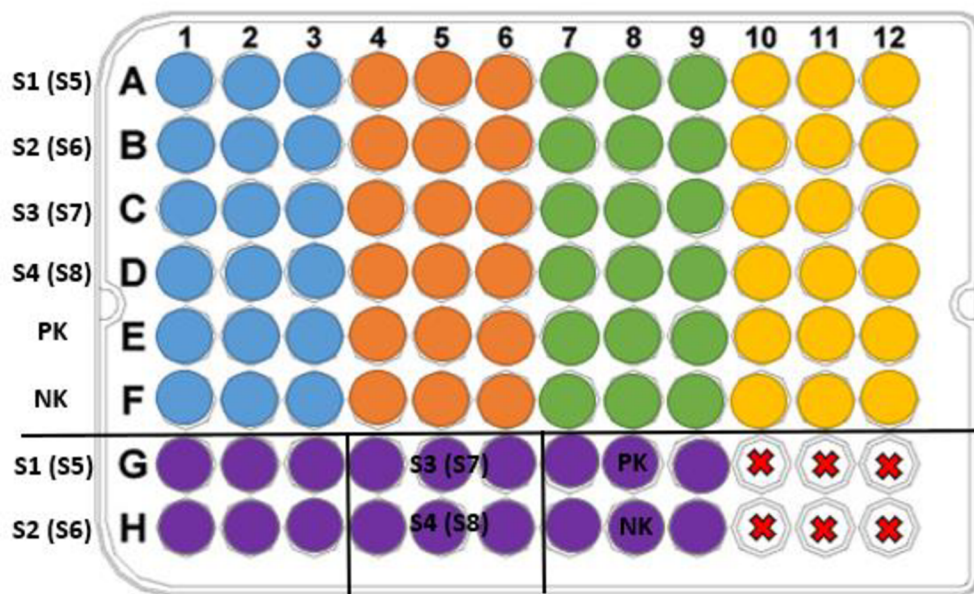
Mikrotitrační destička (96-well typ F) byla předem připravená. Pomocí pipety (Eppendorf) bylo napipetováno do jamek 180  $\mu$ l API média se substráty, pozitivní i negativní kontrola z vialek, ve kterých nebyla přítomna fenolová červená jako barvivo.

Pro přípravu inokula do mikrotitrační destičky bylo použito API médium bez substrátu z vialek. 2 ml čisté kultury byly převedeny do sterilní zkumavky a následně byly odstředěny za stejných podmínek jako u makrodiluční metody.

Následoval stejný postup jako u makrodiluční metody s použitím bifipufu v množství, které odpovídalo objemu použité čisté kultury.

Poté, co bylo připraveno inokulum, byly inokulovány jamky mikrotitrační destičky objemem 20  $\mu$ l pomocí injekční stříkačky.

Jednotlivé rozmístění kmenů a substrátů je znázorněno na Obrázku 23, kdy jednotlivé řádky určovaly substráty, které byly ve třech opakování a bylo testováno naráz 5 různých kmenů bifidobakterií (na obrázku rozlišeny barevně) najednou.



**Obrázek 23** Mikrotitrační destička: Jednotlivé řádky byly označeny zkratkami jednotlivých substrátů: S1 – Acesulfam K, S2 – Isomalt, S3 – Erythritol, S4 – Aspartam (S5 – Xylitol, S6 – Sacharin, S7 – Sukralóza, S8 – Sorbitol), PK – pozitivní kontrola s glukózou, NK – negativní kontrola bez substrátu. Barevně byly označeny různé kmeny.

#### 4.4 Kultivace bifidobakterií a způsob vyhodnocení

U obou metod byla po inokulaci provedena kultivace při 37 °C po dobu 48 hodin.

U mikrodiluční metody byla mikrotitrační destička navíc umístěna do plastového obalu GENbag s generátorem anaerobní atmosféry (bioMérieux).

##### 4.4.1 Vyhodnocení u makrodiluční metody

Po prvních 24 hodinách byla vyhodnocena okometricky barevná změna a stupeň zákalu (optická denzita) pomocí McFarlandovy zákalové stupnice (bioMérieux). Tato stupnice hodnotila intenzitu zákalu podle počtu narostlých buněk v KTJ (kolonie tvořící jednotky).

Po celých 48 hodinách bylo opět provedeno vyhodnocení pomocí McFarlandovy zákalové stupnice (bioMérieux).

Dále byla ověřena čistota jednotlivých vzorků a kontrol pomocí mikroskopu (Nikon Eclipse E200). Nakonec bylo provedeno měření pH u vzorků, které narostly a byly čisté, pomocí pH metru (Hanna Instruments).

##### 4.4.2 Vyhodnocení u mikrodiluční metody

Mikrotitrační destička byla hodnocena pomocí přístroje Tecan Infinite M200 při vlnové délce 420 nm a poté bylo změřeno pH vzorků pomocí pH papírků (ClearTest).

## 5 Výsledky

Výsledky praktické části byly hodnoceny dvěma způsoby podle zvolené diluční metody. V experimentu bylo otestováno 48 druhů a poddruhů bakterií rodu *Bifidobacterium* na 4 umělých sladidlech a 4 cukerných alkoholech spolu s pozitivní a negativní kontrolou. U pozitivní kontroly s glukózou byl vyžadován bakteriální nárůst vždy, jelikož glukóza slouží jako jeden z hlavních zdrojů energie pro bakterie. Naopak nulový nárůst byl vyžadován u negativní kontroly bez substrátu, toto médium obsahovalo minimum zdrojů energie pro bifidobakterie.

V této kapitole jsou uvedeny pouze tabulky a výsledky testovaných kmenů bifidobakterií, u kterých došlo k nárůstu v přítomnosti testovaného umělého sladidla či cukerného alkoholu s kontrolou pomocí pozitivní a negativní kontroly.

Zbylé testované kmeny bifidobakterií, u kterých nedošlo k nárůstu na testovaných umělých sladidlech a cukerných alkoholech, ale byly potvrzeny pozitivní a negativní kontroly, jsou uvedeny v kapitole č. 10 Samostatné přílohy v daných tabulkách.

### 5.1 Způsob vyhodnocení makrodiluční metody

Hodnocení u makrodiluční metody probíhalo vizuálně pomocí McFarlandovy zákalové stupnice (bioMérieux), která se sestávala z 6 různě zakalených standardů, které se vizuálně porovnávaly se zkumavkami (penicílinkami) našeho experimentu.

Každý McFarlandův standard (MFU) představoval specifickou koncentraci KTJ na 1 ml (viz Tab. 5). Pro vizuální porovnání se při stanovení bakteriální denzity použila také Wickerhamova bílá karta s kontrastními černými čarami (Gayathiri et al. 2018), která sloužila k přesnějšímu určení stupně zákalu.

**Tabulka 5** McFarlandova zákalová stupnice (Gayathiri et al. 2018).

McFarlandův standard (MFU)	Přibližná hustota buněk v KTJ
0,5	$1,5 \times 10^8$
1	$3,0 \times 10^8$
2	$6,0 \times 10^8$
3	$9,0 \times 10^8$
4	$12,0 \times 10^8$
5	$15,0 \times 10^8$

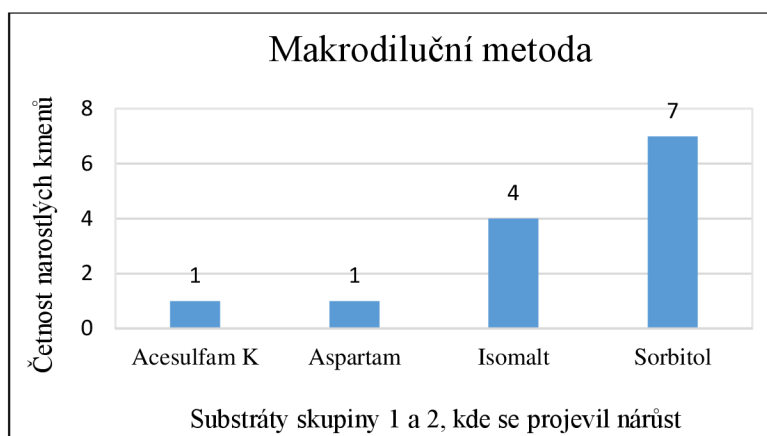
Pro experiment byl zvolen stupeň zákalu 3-5 MFU k potvrzení využití umělých sladidel a cukerných alkoholů jako zdroj energie. Hodnocena byla optická denzita spolu s barevnou změnou indikátoru, která se při nárůstu kmene v substrátu změnila.

Vyhodnocení výsledků u makrodiluční metody probíhalo po 24 a 48 hodinách od začátku kultivace. Po 24 hodinách byl kontrolován pouze nárůst bifidobakterií pomocí McFarlandovy stupnice. Po 48 hodinách byl opět zkontrolován nárůst a poté byla ověřena u narostlých kmenů čistota pomocí mikroskopu (Nikon Eclipse E200). Nakonec se u narostlých kmenů změnilo pH média se substáty, i u pozitivní kontroly pomocí pH metru (Hanna Instruments).

### 5.1.1 Vyhodnocení výsledků makrodiluční metody

Výsledky pro makrodiluční metodu jsou znázorněny v Tabulce 6. Z celkových 48 kmenů byl nárůst potvrzen u 10 kmenů, kdy se potvrdila pozitivní i negativní kontrola a čistota kmenů.

U první testované skupiny substrátů nebyl potvrzen nárůst pouze u erythritolu. U ostatních substrátů byl vždy minimálně jeden kmen, který prokázal nárůst na daném substrátu. Pozitivní kontrola u všech 10 kmenů narostla po 24 hodinách. Negativní kontroly nevykazovaly žádný nárůst po 48 hodinách. *B. longum* D26 jako jediný kmen narostl na substrátu acesulfamu K, a to až po 48 hodinách. Kmeny *B. adolescentis* D6 a *B. dentium* DSM 20436 měly nárůst na substrátu isomalt již po 24 hodinách. Na rozdíl od kmenů *B. adolescentis* D2 a *B. catenulatum* D36, které měly nárůst na isomaltu až po 48 hodinách kultivace. Poslední nárůst u testovaných substrátů skupiny 1 mělo *B. longum* D26 na aspartamu již po 24 hodinách.



**Graf 1** Četnost narostlých kmenů bifidobakterií u makrodiluční metody na substrátech skupiny 1 a 2.

U testovaných substrátů druhé skupiny se projevil nárůst pouze u sorbitolu. U xylitolu, sacharinu a sukralózy nedošlo k žádnému nárůstu. Pozitivní kontroly narostly u všech kmenů již po 24 hodinách a nebyl zaznamenán žádný nárůst po 48 hodinách u negativní kontroly. U kmenů *B. catenulatum* D36, *B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* DSM 21854 a *B. pseudocatenulatum* byl nárůst u sorbitolu již po 24 hodinách kultivace. Naopak zaznamenaný nárůst na sorbitolu až po 48 hodinách byl u kmenů *B. adolescentis* D6, *B. bifidum* DSM 20456, *B. catenulatum* D1 a *B. catenulatum* D16.

Graf 1 naznačuje, který substrát z umělých sladidel a cukerných alkoholů skupiny 1 i 2, byl nejvíce metabolizován testovanými bifidobakteriemi. V tomto případě jde o cukerný alkohol sorbitol, poté s menším počtem kmenů isomalt. Z umělých sladidel šlo o acesulfam K a aspartam se stejnou četností narostlých bifidobakterií.

Vzhledem k různým nárůstům u jednotlivých druhů bifidobakterií lze uvažovat o tom, že vlastnost utilizovat umělá sladidla a cukerné alkoholy je kmenově specifická. Příkladem lze uvést nárůst *B. adolescentis* D2, které narostlo na isomaltu. Oproti tomu jiný druh *B. adolescentis* D6 narostlo na isomaltu a také na sorbitolu. Dále lze uvést kmeny *B. catenulatum* D1 a *B. catenulatum* D16, které narostly na sorbitolu, ale nárůst se nepotvrdil u isomaltu. Jiný druh *B. catenulatum* D36 měl nárůst na isomaltu i sorbitolu.

**Tabulka 6** Výsledky kultivace bifidobakterií u makrodiluční metody

Testované kmeny		Testované substráty sk. 1												Testované substráty sk. 2											
		Acesulfam K		Isomalt		Erythritol		Aspartam		Pozitivní kontrola 1		Negativní kontrola 1		Xylitol		Sacharin		Sukralóza		Sorbitol		Pozitivní kontrola 2		Negativní kontrola 2	
Kultivace (hod)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
<i>B. adolescentis</i> D2	OD	-	0	-	F5	-	0	-	0	+	F5	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	+	F5	-	0
	pH				6,13						5,47												5,44		
<i>B. adolescentis</i> D6	OD	-	0	+	F4	-	0	-	0	+	F5	-	0	-	0	-	0	-	0	-	F5	+	F4	-	0
	pH				5,45						5,34											5,56		5,42	
<i>B. bifidum</i> DSM 20456	OD	-	0	-	F0,5	-	0	-	0	+	F5	-	0	-	0	-	0	-	0	-	F5	+	F5	-	0
	pH										5,45											5,80		5,47	
<i>B. catenulatum</i> D1	OD	-	0	-	0	-	0	-	0	+	F3	-	0	-	0	-	0	-	0	-	F3	+	F4	-	0
	pH										5,89											5,47		5,46	
<i>B. catenulatum</i> D16	OD	-	0	-	0	-	0	-	0	+	F5	-	0	-	0	-	0	-	0	-	F5	+	F5	-	0
	pH										5,65											5,62		5,45	
<i>B. catenulatum</i> D36	OD	-	0	-	F5	-	0	-	0	+	F5	-	0	-	0	-	0	+	F5	+	F5	+	F5	-	0
	pH				5,52						5,38											5,32		5,34	
<i>B. catenulatum</i> subsp. <i>kashiwano</i> . DSM 21854	OD	-	0	-	0	-	0	-	0	+	F5	-	0	-	0	-	0	+	F5	+	F5	+	F5	-	0
	pH										4,83											5,60		5,43	
<i>B. dentium</i> DSM 20436	OD	-	0	+	F4	-	0	-	0	+	F5	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	+	F5	-	0
	pH				4,99						5,33												5,55		
<i>B. longum</i> D26	OD	-	F4	-	0	-	0	+	F5	+	F5	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	+	F5	-	0
	pH		6,00						5,92		5,33												5,67		
<i>B. pseudocatenulatum</i> D32	OD	-	0	-	0	-	0	-	F0,5	+	F5	-	0	-	0	-	0	+	F5	+	F5	+	F5	-	0
	pH										5,58											5,50		5,34	

Poznámka: + / F0,5 – F5 = nárůst; - / 0 v OD řádku = nebyl nárůst; **modře** = nárůst na daném substrátu skupiny 1 / 2; **oranžově** = nárůst pozitivní kontroly.

Legenda:

McFarlandova stupnice	Nárůst
F0,5 – F2	Slabý
F3	Střední
F4 – F5	Intenzivní



## 5.2 Způsob vyhodnocení mikrodiluční metody

Mikrodiluční metoda se také hodnotila po 24 a 48 hodinách. Vzhledem k tomu, že mikrotitrační destička byla kvůli vytvoření anaerobního prostředí uzavřena v plastovém obalu GENbag, nebylo možné obal otevřít dříve než po 48 hodinách. Proto se po 24 hodinách od začátku kultivace vizuálně zhodnotilo přes obal, zda došlo k nárůstu či ne.

Po 48 hodinách se obal otevřel a mikrotitrační destička se změřila pomocí přístroje Tecan Infinite M200 a pomocí softwaru na analýzu dat Magellan Verze 7.2 (Tecan). Byla změřena optická denzita vzorků při vlnové délce 600 nm a vizuálně zhodnoceny nárůsty oproti pozitivní a negativní kontrole. Nakonec se změřilo pH pomocí pH papírků (ClearTest) u narostlých kmenů.

Výsledné hodnoty z přístroje Tecan Infinite M200 se porovnávaly s pozitivní a negativní kontrolou a také s vizuálním hodnocením nárůstu v destičce.

### 5.2.1 Vyhodnocení výsledků mikrodiluční metody

Výsledky kultivace u mikrodiluční metody z přístroje Tecan i vizuální hodnocení jsou zaznamenány v Tabulce 7 pro obě skupiny testovaných substrátů. Z celkově 48 kmenů byl nárůst pouze u 12 kmenů bifidobakterií, kdy se potvrdila pozitivní i negativní kontrola. Kontrola čistoty se zde neprováděla.

Vizuální hodnocení vzorků v destičce probíhalo oproti nárůstu v pozitivních kontrolách a žádnému nárůstu v negativních kontrolách.

Hodnoty vzorků se substráty naměřené přístrojem Tecan se vyhodnocovaly porovnáním daného substrátu s hodnotou pozitivních a negativních kontrol. Negativní kontrola měla být oproti vzorku a pozitivní kontrole vždy nižší a současně hodnota vzorku měla být stejná nebo vyšší než pozitivní kontrola. Zároveň se hodnoty z Tecanu porovnávaly s vizuálním hodnocením zákalu v destičce.

U první testované skupiny umělých sladidel a cukerných alkoholů z hlediska vizuálního hodnocení nedošlo k žádnému nárůstu kmenů u erythritolu. U všech ostatních substrátů skupiny 1 došlo minimálně k nárůstu 2 kmenů na daném substrátu. Všechny pozitivní kontroly měly nárůst už při 24 hodinách a naměřené hodnoty narostlých bifidobakterií na substrátech byly podobné či vyšší jako hodnoty pozitivní kontroly. Co se týče negativní kontroly, ta nezaznamenala nárůst ani po 48 hodinách a hodnoty testovaných substrátů byly větší než hodnoty negativní kontroly. Acesulfam K měl nárůst u dvou kmenů. První byl *B. dentium* DSM 20436, který narostl už po 24 hodinách. Druhým kmenem byl *B. longum* D26, který narostl po 48 hodinách. *B. angulatum* DSM 20098, *B. dentium* DSM 20436 a *B. scardovii* DSM 13734 narostly po 24 hodinách na isomaltu. Naopak *B. adolescentis* D2 a *B. adolescentis* D6 narostly až po 48 hodinách. Na aspartamu byl nárůst kmenů *B. adolescentis* D6 a *B. adolescentis* D28.

U druhé sady substrátů byl nárůst potvrzen pouze u sorbitolu. Xylitol, sacharin i sukralóza nevykazovaly žádný nárůst bifidobakterií. Pozitivní kontroly všechny narostly již po 24 hodinách a hodnoty testovaných substrátů byly podobné či vyšší než hodnoty pozitivní kontroly. Negativní kontroly po 48 hodinách nevykazovaly růst bifidobakterií a naměřené hodnoty narostlých substrátů byly větší než hodnoty negativní kontroly. *B. adolescentis* B2,

**Tabulka 7** Výsledky kultivace bifidobakterií u mikrodiluční metody

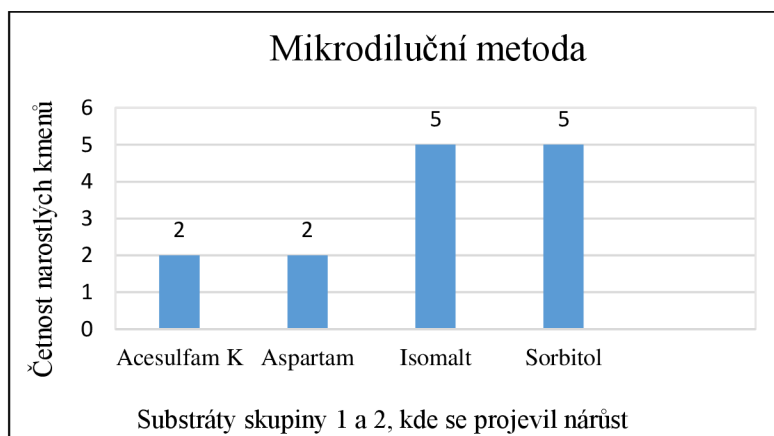
Testované kmeny		Testované substráty sk. 1												Testované substráty sk. 2											
		Acesulfam K		Isomalt		Erythritol		Aspartam		Pozitivní kontrola 1		Negativní kontrola 1		Xylitol		Sacharin		Sukralóza		Sorbitol		Pozitivní kontrola 2		Negativní kontrola 2	
Kultivace (hod)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
<i>B. adolescentis</i> D2	OD	-	0,292	-	0,429	-	0,486	-	0,489	+	0,492	-	0,394		0,397		0,445		0,494		0,497	+	0,607	-	0,443
	pH				6,10								5,60											5,60	
<i>B. adolescentis</i> D6	OD	-	0,360	-	0,441	-	0,467	-	0,522	+	0,597	-	0,404	-	0,377	-	0,415	-	0,524	-	0,571	+	0,530	-	0,371
	pH				5,60				6,10		5,77												5,77		
<i>B. adolescentis</i> D28	OD	-	0,301	-	0,299	-	0,312	+	0,443	+	0,554	-	0,336	-	0,420	-	0,470	-	0,536	-	0,532	+	0,658	-	0,462
	pH								6,10		5,30												5,77		
<i>B. adolescentis</i> B2	OD	-	0,351	-	0,454	-	0,462	-	0,496	+	0,622	-	0,446	-	0,454	-	0,527	-	0,558	+	0,613	+	0,626	-	0,476
	pH										5,60										5,77		5,77		
<i>B. angulatum</i> DSM 20098	OD	-	0,303	+	0,273	-	0,250	-	0,304	+	0,250	-	0,186	-	0,353	-	401	-	0,505	-	0,516	+	0,533	-	0,474
	pH				5,60						5,77												6,10		
<i>B. bifidum</i> B6	OD	-	0,263	-	0,316	-	0,348	-	0,388	+	0,479	-	0,378	-	0,455	-	0,507	-	0,579	-	0,629	+	0,707	-	0,487
	pH										5,40										5,93		5,77		
<i>B. breve</i> ATCC 15700	OD	-	0,308	-	0,239	-	0,245	-	0,258	+	0,402	-	0,199	-	0,393	-	0,411	-	0,470	+	0,577	+	0,671	-	0,387
	pH										5,67										5,60		5,43		
<i>B. dentium</i> DSM 20436	OD	+	0,360	+	0,379	-	0,400	-	0,290	+	0,440	-	0,202	-	0,569	-	0,578	-	0,624	-	0,655	+	0,621	-	0,514
	pH		6,70		5,60						5,60												5,93		
<i>B. longum</i> D26	OD	-	0,383	-	0,378	-	0,415	-	0,392	+	0,476	-	0,380	-	0,347	-	0,447	-	0,478	-	0,490	+	0,514	-	0,437
	pH		6,10								5,30												5,60		
<i>B. longum</i> D67	OD	-	0,503	-	0,492	-	0,510	-	0,509	+	0,603	-	0,441	-	0,460	-	0,388	-	0,490	+	0,528	+	0,524	-	0,348
	pH										5,60										5,77		5,50		
<i>B. pseudocatenulatum</i> D32	OD	-	0,392	-	0,482	-	0,538	-	0,527	+	0,647	-	0,507	-	0,450	-	0,476	-	0,481	-	0,569	+	0,544	-	0,438
	pH										5,93										5,93		5,93		
<i>B. scardovii</i> DSM 13734	OD	-	0,309	+	0,322	-	0,242	-	0,321	+	0,471	-	0,189	-	0,515	-	0,523	-	0,596	-	0,576	+	0,756	-	0,497
	pH				5,80						5,40												6,10		

Poznámka: + / hodnota v OD řádku = nárůst; - v OD řádku = nebyl nárůst; modře = nárůst na daném substrátu skupiny 1 / 2; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.

*B. breve* ATCC 15700 a *B. longum* D67 vykazovaly nárůst po 24 hodinách na sorbitolu. Kmeny jako *B. bifidum* B6 a *B. pseudocatenulatum* D32 narostly na sorbitolu až po 48 hodinách.

Nárůsty kmenů z vizuálního hodnocení mikrodiluční metody odpovídaly hodnotám nárůstu naměřené pomocí přístroje Tecan.

Na grafu 2 jsou znázorněny nejvíce metabolizovaná umělá sladidla a cukerné alkoholy obou skupin, které byly bifidobakterie schopny využít jako zdroj energie v mikrodiluční metodě. Mezi substráty dominují cukerné alkoholy isomalt a sorbitol. Hned za nimi s menším počtem narostlých bifidobakterií jsou stejně acesulfam K a aspartam jako umělá sladidla.



**Graf 2** Četnost narostlých kmenů bifidobakterií u mikrodiluční metody na substrátech skupiny 1 a 2.

Nárůsty u *B. longum* D26 na isomaltu a u *B. longum* D67 na sorbitolu naznačují, že jde obdobně jako u makrodiluční metody o druhově specifické vlastnosti bifidobakterií. Lze to také prokázat u různých nárůstu 4 kmenů – *B. adolescentis* D2 na isomaltu, *B. adolescentis* D6 na isomaltu a zároveň na aspartamu, *B. adolescentis* D28 pouze na aspartamu a *B. adolescentis* B2 na sorbitolu.

### 5.2.2 Srovnání výsledků makrodiluční a mikrodiluční metody

Výsledky z jednotlivých dilučních metod byly následně srovnány oproti sobě, kdy nárůsty na daných substrátech odpovídaly makrodiluční i mikrodiluční metodě. V obou metodách došlo k nárůstům na cukerných alkoholech jako jsou sorbitol a isomalt. Přičemž sorbitol měl větší četnost nárůstu než isomalt. V zápětí za nimi byly umělá sladidla acesulfam K a aspartam, obě se stejnou četností. Naopak cukerné alkoholy erythritol a xylitol nenarostly ani v jednom případě. U umělých sladidel nedošlo k žádnému nárůstu u sacharinu a sukralózy.

Mezi nejčastější druhy bifidobakterií, které byly schopny využít umělá sladidla a cukerné alkoholy, byly u makrodiluční metody *B. catenulatum* a hned za ním *B. adolescentis*. U mikrodiluční metody šlo hlavně o *B. adolescentis* a poté *B. longum*. Zajímavý je i nárůst *B. dentium* jakožto jedné z patogenních bifidobakterií u obou metod.

Jak už bylo zmíněno výše, stejný druh bifidobakterií byl schopen využít různé substráty. Tímto lze naznačit, že vlastnost bifidobakterií využít umělá sladidla a cukerné alkoholy je kmenově specifická.

Co se týče srovnání metod z hlediska schopnosti stejných bifidobakterií využít stejné substráty, vyšel zde výsledek, že pouze 5 kmenů se shoduje na stejných substrátech v makro i v mikrodiluční metodě. Konkrétně se jedná o *B. adolescentis* D2 na isomaltu, *B. adolescentis* D6 na isomaltu, *B. dentium* DSM 20436 na isomaltu, *B. longum* D26 na acesulfamu K a *B. pseudocatenulatum* D32 na sorbitolu.

I přesto vyplývá, že větším počtem bifidobakterií byly metabolizovány cukerné alkoholy než umělá sladidla, a to v případě makrodiluční i mikrodiluční metody.

## 6 Diskuze

Hlavním cílem diplomové práce bylo otestovat schopnost bifidobakterií metabolizovat umělá sladidla a cukerné alkoholy jako jediný zdroj energie.

Z výsledků našeho experimentu bylo zjištěno, že umělá sladidla sacharin a sukralóza nebyly vůbec metabolizovány bifidobakteriemi. U cukerných alkoholů nedošlo k žádné metabolizaci u erythritolu a xylitolu. Naopak největší nárůst bifidobakterií byl zaznamenán na cukerném alkoholu sorbitolu. Hned poté následoval isomalt, a nakonec se stejnou četností umělá sladidla acesulfam K a aspartam.

Podle souhrnných informací dle Biavati & Mattarelli (2012) o fermentaci různých druhů sacharidů a sladidel u odlišných druhů bifidobakterií byl uveden pouze sorbitol jako zástupce námi použitých cukerných alkoholů. U testovaných kmenů *Bifidobacterium bifidum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. longum* subsp. *longum* a *B. scardovii* nedošlo ve studii z přibližně 90 a více procent k nárůstu na sorbitolu. Sorbitol používají lidské střevní bifidobakterie jako zdroj uhlíku. V několika studiích bylo naznačeno, že sorbitol má potenciální prebiotický účinek (Gultekin et al. 2020).

Další kmeny jako *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. breve* a *B. pseudocatenulatum* vykazovaly proměnlivé výsledky. Pouze jeden druh *B. catenulatum* narostl pozitivně na sorbitolu s procentuálním podílem mezi 11 – 89 % testovaných kmenů. Všechny tyto testované kmeny byly schopny fermentovat glukózu, což je v podstatě forma pozitivní kontroly (Biavati & Mattarelli 2012).

V našem experimentu bylo dosaženo stejného výsledku u druhu *B. catenulatum*, který dokázal metabolizovat sorbitol v makrodiluční metodě. Šlo hned o 3 kmeny téhož druhu – *B. catenulatum* D1, *B. catenulatum* D16 a *B. catenulatum* D36. Na druhou stranu v mikrodiluční metodě nedošlo k žádnému nárůstu u druhu *B. catenulatum*. U více druhů jako jsou *B. longum*, *B. adolescentis* či *B. breve*, došlo k nárůstu na sorbitolu pouze v jedné diluční metodě a v druhé ne.

Dále bylo dosaženo shody u druhů bifidobakterií, které nedokázaly využít sorbitol jako zdroj energie (viz. kapitola 10 – Samostatné přílohy, Tabulky I – V). Jde o druhy *B. angulatum*, *B. dentium* a *B. gallicum* u obou metod. V našem případě jde ještě o druh *B. faecale*, který se ve studiích podle Biavati & Mattarelli (2012) netestoval. Lze uvést také rozdíl na příkladu druhu *B. bifidum* a kmenu *B. pseudocatenulatum* D32, které v našem experimentu měly nárůst na sorbitolu v obou metodách oproti Biavati & Mattarelli (2012) studii.

Potvrzení žádného nárůstu u sorbitolu došlo také u *B. angulatum*. Naopak nárůst byl potvrzen u většiny druhu *B. catenulatum* (přibližně 85 % z testovaných kmenů) obdobně jako v našem experimentu. K rozdílu oproti našemu experimentu došlo u *B. dentium*, kde z 90 % nedošlo k nárůstu na sorbitolu (Scardovi & Crociani 1974). V další studii došlo i ke shodě s naším experimentem v nárůstu *B. pseudocatenulatum* na sorbitolu (Scardovi et al. 1979).

Nárůst bifidobakterií na sorbitolu nebyl potvrzen ve výsledcích studie u *B. gallicum* DSM 20093 (Lauer 1990), dále také u *B. scardovii* (Hoyles et al. 2002) a u *B. faecale* (Choi et al. 2014).

V jiné studii dle Reuter (1971) byl hodnocen pouze sorbitol a erythritol z námi testovaných cukerných alkoholů. K porovnání s naším experimentem byly ve studii testovány pouze kmeny *B. adolescentis*, *B. breve* a *B. longum*. U sorbitolu došlo k nárůstu u kmene

*B. adolescentis* a *B. breve*. Jediný kmen *B. longum* nenarostl na sorbitolu. V našem experimentu byl nárůst na sorbitolu pouze u *B. adolescentis* D6 u makrodiluční metody a *B. adolescentis* B2 u mikrodiluční metody. Ostatní kmeny *B. adolescentis* nevykazovaly nárůst na sorbitolu. V případě druhu *B. longum* je to obdobné, jelikož nárůst na sorbitolu byl u *B. longum* D67, ale u ostatních kmenů tohoto druhu ne.

Oproti tomu u erythritolu došlo ke shodě (Reuter 1971). Ani u jednoho z testovaných kmenů studie, které byly společné i pro náš experiment, nebyly nalezeny nárůsty bifidobakterií na erythritolu. V jiné studii bylo potvrzeno u *B. faecale*, že tento druh také nebyl schopen metabolizovat erythritol, což se nám potvrdilo v experimentu. Na druhou stranu byl tento druh schopný fermentovat xylitol (Choi et al. 2014), který se v našem experimentu nepotvrdil. Xylitol nebyl fermentován ani ostatními bifidobakteriemi.

Ve studii zaměřené výhradně na isomalt bylo zjištěno, že některé druhy jako *B. adolescentis* a *B. catenulatum* byly schopné metabolizovat isomalt (Gostner et al. 2006). V našem experimentu se potvrdil tento závěr u kmenu *B. adolescentis*, a to v obou metodách. V případě *B. catenulatum* došlo k nárůstu pouze u jednoho kmene makrodiluční metody.

Závěrem studie byl přínos v informacích o isomaltu a jeho bifidogenním efektu u zdravých jedinců, který by mohl přispět ke zdravé střevní mikrobiotě jako prebiotické sladidlo (Gostner et al. 2006). Informace o bifidogenním účinku byly v souladu s dalšími studiemi, které zkoumaly prebiotické sacharidy jako studie Ruiz-Ojeda et al. (2019).

Dle studie Frankenfeld et al. (2015) nebyl zjištěn významný rozdíl mezi konzumenty a nekonzumenty acesulfamu K. V našem experimentu došlo k nárůstu *B. dentium* DSM 20436 u makrodiluční metody a *B. longum* D26 na acesulfamu K u obou metod, což by se u konzumenta mohlo projevit. U *B. dentium* můžeme říci, že může být potenciálně rizikový kvůli metabolizaci acesulfamu K, a tedy možnému vzniku zubního kazu.

Obdobně jako u acesulfamu K stejná studie přinesla závěr, že nebyl zjištěn významný rozdíl mezi konzumenty a nekonzumenty aspartamu (Frankenfeld et al. 2015).

Jiná studie o aspartamu z roku 2020 přednesla závěr, že bifidobakterie jsou schopné metabolizovat aspartam a jsou schopné na tomto substrátu zvýšit svůj počet (Gerasimidis et al. 2020). Je zde ale nutné zmínit, že se nejednalo o čistý aspartam. Použitý druh aspartamu obsahoval i maltodextrin (Plaza-Diaz et al. 2020). Zda bifidobakterie byly schopné využít aspartam jsme se přesvědčily u některých druhů bifidobakterií v našem experimentu, kdy kmeny *B. adolescentis* D6 a *B. adolescentis* D28 vykazovaly nárůst v mikrodiluční metodě. *B. longum* D26 jako jediné narostlo v aspartamu v makrodiluční metodě.

Dle studie Ruiz-Ojeda et al. (2019) konzumace sukralózy snižuje celkový počet aerobních i anaerobních bakterií, mezi které se řadí i bifidobakterie. Bylo zjištěno, že sukralóza není pro bakterie vůbec výživná, a to je také důvod, proč je odolná vůči bakteriální fermentaci (Pang et al. 2021). Touto myšlenkou lze podpořit závěr naší studie u sukralózy, kde ani jeden kmen ze všech testovaných bifidobakterií nenarostl na sukralóze jako jediném zdroji energie.

V jedné *in vitro* studii vyvolal sacharin zvýšený počet bakterií rodu *Bifidobacterium* (Plaza-Diaz et al. 2020). V našem experimentu se to ale nepotvrdilo, neboť v přítomnosti sacharinu nenarostl ani jeden kmen bifidobakterií.

Z prostudovaných studií lze vyvodit, že nejčastěji testovaným cukerným alkoholem byl právě sorbitol, který měl nejvíce výsledků, jelikož byl testován už při objevu nových druhů bifidobakterií. Dále následoval isomalt.

Velký zájem odborných studií o tyto dva cukerné alkoholy mohl být zapříčiněn tím, že oba substráty vykazují určitý prebiotický účinek právě pro bifidobakterie. Bylo prokázáno, že mírné dávky cukerných alkoholů zvyšují počet bifidobakterií ve střevní mikrobiotě zdravých jedinců, a to je důvod, proč mohou být cukerné alkoholy používány jako prospěšná prebiotika. Nicméně stále není jasné, jestli takové interakce mohou být i u nemocných jedinců (Ruiz-Ojeda et al. 2019).

Jako nedostatečně zmapovaná sladidla ve spojitosti s bifidobakteriemi lze uvést acesulfam K, sacharin a popřípadě aspartam. Z cukerných alkoholů můžeme uvést erythritol a xylitol.

I v těchto výše uvedených studiích stejně tak jako v naší práci došlo k určitým komplikacím při vyhodnocení našeho experimentu. Značným zkomplikováním v hodnocení významu umělých sladidel a cukerných alkoholů k růstu bifidobakterií bylo, že jednotlivé studie testovaly různé druhy a poddruhy bifidobakterií, a ne vždy se jednalo o stejné kmeny. Dále mohla být omezení v dávce použitého umělého sladidla či cukerného alkoholu, která nemusela odpovídat u všech studií stejnému množství. Zároveň se lišily použité metody, které mohly být ovlivňovány řadou faktorů, které jsou u každé metody různé.

Například rozdíl mezi *in vitro* a *in vivo* studiemi. V *in vivo* studii se musí počítat, že i jenom nepatrná část sladidla může být metabolizována organismem a v určitých případech se nemusí sladidlo vůbec dostat do kontaktu se střevní mikrobiotou, zatímco u *in vitro* studií je dané sladidlo plně k dispozici pouze dané bakterii.

Výše uvedené studie *in vivo* probíhaly na laboratorních krysách a také na lidech. Podávala se jim umělá sladidla a cukerné alkoholy o různých koncentracích na den. Laboratorním krysám se podávaly většinou v rozpuštěných formách v pitné vodě. U lidí šlo o klasické zařazení do jídelníčku, v rámci jednotlivých pokrmů za dodržení daného množství sladidla. V některých studiích byly použity kontrolní skupiny s placebo efektem, nejčastěji v podobě sacharózy. Výsledný vliv sladidel na střevní mikrobiom se zkoumal s pomocí výkalů, kdy se stanovovala bakteriální četnost a diverzita střevní mikrobioty pomocí bakteriologických analýz. Dále se také zkoumaly enzymy a vzniklé produkty fermentace.

U *in vitro* studií se metody a jejich vyhodnocení lišily. Ve většině případů šlo o fermentační testy, které využívaly API systém testování (API 50 CHL, API 20A, API ZYOM a další od výrobce bioMérieux). Další studie probíhaly formou přípravy média s testovanými substráty a indikátory, kdy použité médium se často lišilo mezi studiemi. Poté se hodnotil nárůst, barevná změna, enzymy a koncentrace organických kyselin. Kultivace probíhala ve většině případů při 37-39 °C po různě dlouhé časové úseky. V některých případech i v rámci několika dní až týden. V jiné studii byla vytvořena modelová simulace lidského střeva, které bylo inokulováno mikrobiotou z lidské stolice. Do simulátoru byly poté přivedeny substráty ve formě testovaných sladidel a vyhodnocovaly se produkty fermentace a diverzita mikrobiomu pomocí polymerázové řetězové reakce.

V našem experimentu lze diskutovat také nad vhodností zvolených metod. U makrodiluční metody mohlo dojít ke špatně vytvořené anaerobní atmosféře pro správný růst bifidobakterií pomocí CO<sub>2</sub> kolony. V případě mikrodiluční metody mohlo jít o pomalé zpracování a zaočkování bifidobakterií do mikrotitrační destičky, která poté mohla být vystavena vzduchu, a tedy kyslíku po delší čas, než se uzavřela do anaerobní atmosféry.

Tento fakt mohl zapříčinit, že u 4 kmenů v našem experimentu – *B. catenulatum* D36, *B. longum* D50, *B. adolescentis* D63 a *B. catenulatum* B51 nedošlo k nárůstu pozitivní kontroly a žádného ze substrátů v mikrodiluční metodě (viz. kapitola 10 Samostatné přílohy, Tabulka I-V). Na druhou stranu u makrodiluční metody pozitivní kontrola pro tyto kmeny vyšla pozitivně s nárůstem.

Dále lze uvést, že počty narostlých bifidobakterií byly hodnoceny pouze podle optické denzity, z čehož nelze usoudit, zda jednotlivé buňky byly živé či mrtvé. Nebylo možné tedy posoudit, zda bifidobakterie byly schopné metabolizovat sladidla a využít je jako energii pro další přežití či zda bifidobakterie využily sladidla jako energii, ale už se jim dále nepodařilo přežít.

Vhodnější by se mohla v tomto případě projevit kultivace pomocí plotnové metody, kde lze sledovat, zda po kultivaci na umělých sladidlech a cukerných alkoholech jsou bifidobakterie stále životaschopné a dokážou vytvořit kolonie. Pro potvrzení těchto informací by bylo vhodné v budoucnu tento experiment zopakovat a doplnit právě kvantitativními metodami například plotnovou metodou či metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH).

Bifidobakterie jsou tedy schopné degradovat určité komplexy sacharidů, které lidský hostitel není schopen metabolizovat (Duranti et al., 2021). Způsob fermentace těchto sacharidů má za následek zvýšení produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (např. butyrát) a následné snížení pH (Gostner et al. 2006).

U pozitivních kontrol se nárůstem bifidobakterií a produkcí mastných kyselin s krátkým řetězcem změnilo pH, které se snížilo na rozmezí 5,3 až 6,0 oproti hodnotám pH média před kultivací. To zapříčinilo změnu barevného indikátoru. Obdobně tomu bylo i u umělých sladidel a cukerných alkoholů, kdy došlo také ke snížení pH na rozmezí 5,5-6,0, čímž bylo naznačeno, že bifidobakterie byly schopné využít daná sladidla jako energetický zdroj.

Otázkou je, zda rozkladem umělých sladidel a cukerných alkoholů vznikají rozdílné metabolity než při degradaci glukózy či jsou tyto metabolity stejné, ale liší se jejich poměrem. Tento předpoklad může vést k dalším výzkumům ohledně metabolitů, které bifidobakterie metabolizují při využití umělých sladidel a cukerných alkoholů.

Výsledky a určité komplikace v této práci mohou být podnětem pro další výzkum v oblasti umělých sladidel a cukerných alkoholů se spojitostí k bifidobakteriím a střevní mikrobiotě obecně. Budoucí studie by proto měly zvážit účinky sladidel, jak v krátkodobém, tak v dlouhodobém horizontu, v různých dávkách substrátů a v neposlední řadě ve spojitosti s imunitou a nemocemi.



## 7 Závěr

- Souvislost mezi příjmem cukrů a nemocí jsou částečně způsobeny střevní mikrobiotou. Ta obsahuje jak probiotické, tak patogenní mikroorganismy. Pokud tedy změníme konzumaci cukrů, sacharidů či sladidel, lidská střevní mikrobiota na to může zareagovat dysbiózou. Dysbióza vede poté ke změně prostředí, ve kterém se selektují nové mikrobiální kmeny, které mohou mít negativní vliv na zdraví hostitele.
- Cílem diplomové práce bylo otestovat schopnost bifidobakterií využít vybraná umělá sladidla a cukerné alkoholy. V experimentu bylo otestováno 48 druhů a poddruhů bifidobakterií v přítomnosti 4 umělých sladidel a 4 cukerných alkoholů. U narostlých kmenů se hodnotila optická denzita zákalu a měřilo se pH. Správnost experimentu byla ověřena pomocí pozitivní kontroly s glukózou a negativní kontroly bez substrátu. Výsledky této práce vykazovaly, že u makrodiluční metody bylo schopno využít daný substrát 10 kmenů bifidobakterií z celkového počtu 48 testovaných kmenů. U mikrodiluční metody to bylo 12 kmenů z celkového počtu 48 kmenů. V obou metodách byl nejčastěji metabolizovaným substrátem sorbitol, hned po něm isomalt z řady cukerných alkoholů. Poté umělá sladidla acesulfam K a aspartam, oba se stejnou četností. Z těchto informací lze vyvodit, že bifidobakterie mají enzymy pro využití cukerných alkoholů než umělých sladidel. Další sladidla jako byla erythritol, sacharin, sukralóza a xylitol, nebyla ani v jednom případě metabolizována bifidobakteriemi.
- V experimentu vykazovalo několik různých druhů bifidobakterií schopnost využít substráty sladidel. V některých případech šlo i o kmeny jednoho druhu, které byly schopny využít různé substráty. Příkladem může být druh *B. catenulatum* a 3 jeho kmeny. *B. catenulatum* D1 a *B. catenulatum* D16 byly schopné využít sorbitol v makrodiluční metodě. *B. catenulatum* D36 kromě sorbitolu dokázalo v této metodě využít i isomalt. Z toho můžeme vyvodit, že schopnost metabolizovat umělá sladidla a cukerné alkoholy je u bifidobakterií kmenově specifická a tím potvrdit naši hypotézu.
- Hodnoty pH u pozitivní kontroly s glukózou se snižovaly, díky bifidobakteriím, které produkovaly mastné kyseliny s krátkými řetězci. U narostlých substrátů sladidel tomu bylo obdobně, ale s méně rozsáhlým poklesem než u hodnot pozitivní kontroly. Z toho vyplývá, že se metabolity mohly lišit v poměru oproti pozitivní kontrole nebo mohly tvořit jiné metabolity. V tomto případě se jedná o domněnku, která může sloužit jako podklad k dalšímu výzkumu.
- Z důvodu nedostatečně prozkoumaných informací o některých sladidlech a jejich vztahu konkrétně k bifidobakteriím, může tato informace sloužit k dalšímu výzkumu v této oblasti. Konkrétněji se jedná o umělá sladidla acesulfam K, sacharin a aspartam, a také o cukerné alkoholy erythritol a xylitol. Z hlediska těchto nedostatečných informací a výsledků našeho experimentu lze vyvodit, že funkce umělých sladidel a cukerných alkoholů jsou v lidské stravě stále neurčité.

## 8 Literatura

- Ahmad S, Friel J, Mackay D. 2020. Effect of sucralose and aspartame on glucose metabolism and gut hormones. *Nutrition Reviews* **78**:725-746. DOI: 10.1093/nutrit/nuz099
- Aiello F. 2020. Sweeteners. Pages 191-211 in Nabavi S, Loizzo M, Tundis R, editors. *Food Additives and Human Health*. Bentham Science Publishers, Singapore.
- Arboleya S, Watkins C, Stanton C, Ross R. 2016. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Frontiers in Microbiology* **7**: (1204). DOI: 10.3389/fmicb.2016.01204
- Biavati B, Mattarelli P. 2012. Bifidobacterium. 1-57 in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2nd edition. Bergey's Manual Trust, New York.
- Bottacini F et al. 2018. Comparative genomics and genotype-phenotype associations in *Bifidobacterium breve*. *Scientific Reports* **8**: (10633). DOI: 10.1038/s41598-018-28919-4
- Cukrowska B, Bierła J, Zakrzewska M, Klukowski M, Maciorkowska E. 2020. The Relationship between the Infant Gut Microbiota and Allergy. The Role of *Bifidobacterium breve* and Prebiotic Oligosaccharides in the Activation of Anti-Allergic Mechanisms in Early Life. *Nutrients* **12**: (946). DOI: 10.3390/nu12040946
- Di Rienzi S, Britton R. 2020. Adaptation of the Gut Microbiota to Modern Dietary Sugars and Sweeteners. *Advances in Nutrition* **11**:616-629. DOI: 10.1093/advances/nmz118
- Dreyer J, Liebl A. 2018. Early colonization of the gut microbiome and its relationship with obesity. *Human Microbiome Journal* **10**:1-5. DOI: 10.1016/j.humic.2018.08.002
- Duranti S et al. 2016. Evaluation of genetic diversity among strains of the human gut commensal *Bifidobacterium adolescentis*. *Scientific Reports* **6**: (23971). DOI: 10.1038/srep23971
- Ebrahimzadeh V, Ardalan M, Mahdavi A, Gorbani A. 2018. A review of the health hazards of artificial sweeteners: are they safe?. *Progress in Nutrition* **20**:36-43. DOI: 10.23751/pn.v20i2-S.5901
- Evropský parlament a Rada Evropské Unie. 2008. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. Česká republika. L 354/16.
- Evropský parlament a Rada Evropské Unie. 2011. Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a o zrušení směrnice Komise 87/250/EHS, směrnice Rady 90/496/EHS, směrnice Komise 1999/10/ES, směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES, směrnic Komise 2002/67/ES a 2008/5/ES a nařízení Komise (ES) č. 608/2004. Česká republika. L 304/18.
- Finney M, Smullen J, Foster H, Brokx S, Storey D. 2007. Effects of low doses of lactitol on faecal microflora, pH, short chain fatty acids and gastrointestinal symptomology. *European Journal of Nutrition* **46**:307-314. DOI: 10.1007/s00394-007-0666-7

- Frankenfeld CL, Sikaroodi M, Lamb E, Shoemaker S, Gillevet PM. 2015. High-intensity sweetener consumption and gut microbiome content and predicted gene function in a cross-sectional study of adults in the United States. *Annals of Epidemiology* **25**:736-742. DOI: 10.1016/j.annepidem.2015.06.083
- Gayathiri E, Bharathi B, Priya K. 2018. Study of the enumeration of twelve clinical important bacterial populations at 0.5 mcfarland standard. *International Journal of Creative Research Thoughts* **6**:880-893.
- Gerasimidis K, Bryden K, Chen X, Papachristou E, Verney A, Roig M, Hansen R, Nichols B, Papadopoulou R, Parrett A. 2020. The impact of food additives, artificial sweeteners and domestic hygiene products on the human gut microbiome and its fibre fermentation capacity. *European Journal of Nutrition* **59**:3213-3230. DOI: 10.1007/s00394-019-02161-8
- Gomaa E. 2020. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* **113**:2019-2040. DOI: 10.1007/s10482-020-01474-7
- Gostner A et al. 2006. Effect of isomalt consumption on faecal microflora and colonic metabolism in healthy volunteers. *British Journal of Nutrition* **95**:40-50. DOI: 10.1079/BJN20051589
- Grembecka M. 2015. Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. *European Food Research and Technology* **241**:1-14. DOI: 10.1007/s00217-015-2437-7
- Gultekin F, Oner ME, Savas HB, Dogan B. 2020. Food additives and microbiota. *Northern Clinics of Istanbul* **7**:192–200. DOI: 10.14744/nci.2019.92499
- Hoyles L, Ingana E, Falsen E, Drancourt M, Weiss N, McCartney A, Collins M. 2002. *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *International Journal Of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**:995-999. DOI: 10.1099/ijs.0.02065-0
- Hughes R, Davis C, Lobach A, Holscher H. 2021. An Overview of Current Knowledge of the Gut Microbiota and Low-Calorie Sweeteners. *Nutrition Today* **56**:105-113. DOI: 10.1097/NT.0000000000000481
- Choi J, Lee K, Lee M, Cha C, Kim G. 2014. *Bifidobacterium faecale* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**:3134-3139. DOI: 10.1099/ijs.0.063479-0
- Jensen E, Bertelsen R, Ringel-Kulka T. 2016. Microbiota of the gastrointestinal tract in infancy. Pages 27-35 in Floch M, Ringel Y, Walker W, editors. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis*. Academic Press, Cambridge.
- Khan TA, Ayoub-Charette S, Sievenpiper JL, Comelli EM. 2020. Non-Nutritive Sweeteners and their Effects on Human Health and the Gut Microbiome. 676-684 in Kuipers EJ, editor. *Encyclopedia of Gastroenterology*. Elsevier (Academic Press), Cambridge.

- Klug C, von Rymon Lipinski G. 2012. Acesulfame K. Pages 93-115 in O'Donnell K, Kearsley M, editors. *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. Wiley-Blackwell, Chichester.
- Lauer E. 1990. *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. Isolated from Human Feces. *International Journal of Systematic Bacteriology* **40**:100-102. DOI: 10.1099/00207713-40-1-100
- Lee Y, Chung S, Auh Q, Hong S, Lee Y, Jung J, Lee G, Park H, Shin S, Hong J. 2021. Progress in Oral Microbiome Related to Oral and Systemic Diseases: An Update. *Diagnostics* **11**: (1283). DOI: 10.3390/diagnostics11071283
- Lewis K, Tzilivakis J. 2021. Review and synthesis of data on the potential environmental impact of artificial sweeteners. *EFSA Supporting Publications* **18**: (EN-6918). DOI: 10.2903/sp.efsa.2021.EN-6918
- Liang D, Leung R, Guan W, Au W. 2018. Involvement of gut microbiome in human health and disease: brief overview, knowledge gaps and research opportunities. *Gut Pathogens* **10**: (3). DOI: 10.1186/s13099-018-0230-4
- Lim H, Shin H. 2020. Antimicrobial and Immunomodulatory Effects of *Bifidobacterium* Strains: A Review. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **30**:1793-1800. DOI: 10.4014/jmb.2007.07046
- Liu L, Zhang P, Wang Y, Cui W, Li D. 2021. The relationship between the use of artificial sweeteners and cancer: A meta-analysis of case-control studies. *Food Science & Nutrition* **9**:4589-4597. DOI: 10.1002/fsn3.2395
- Lobach AR, Roberts A, Rowland IR. 2019. Assessing the in vivo data on low/no-calorie sweeteners and the gut microbiota. *Food and Chemical Toxicology* **124**:385-399. DOI: 10.1016/j.fct.2018.12.005
- Mahmood A, Al-Juboori S. 2020. A Review: Saccharin Discovery, Synthesis, and Applications. *Ibn AL- Haitham Journal For Pure and Applied Sciences* vol. **33**: (2). DOI: 10.30526/33.2.2442
- Mattarelli P, Biavati B. 2014. The genera *Bifidobacterium*, *Parascardovia* and *Scardovia*. Pages 509-541 in Holzappel WH, Wood BJB, editors. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley & Sons, Chichester.
- More T, Shaikh Z, Ali A. 2021. Artificial Sweeteners and their Health Implications: A Review. *Biosciences Biotechnology Research Asia* **18**:227-237. DOI: 10.13005/bbra/2910
- Nichols R, Peters J, Patterson A. 2019. Interplay Between the Host, the Human Microbiome, and Drug Metabolism. *Human Genomics* **13**: (27). DOI: 10.1186/s40246-019-0211-9
- O'Callaghan A, van Sinderen D. 2016. *Bifidobacteria* and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology* **7**: (925). DOI: 10.3389/fmicb.2016.00925
- Pang M, Goossens G, Blaak E. 2021. The Impact of Artificial Sweeteners on Body Weight Control and Glucose Homeostasis. *Frontiers in Nutrition* **7**: (598340). DOI: 10.3389/fnut.2020.598340

- Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **70**: 5607-5612. DOI: 10.1099/ijsem.0.004332. Available from <https://lpsn.dsmz.de/genus/bifidobacterium> (accessed March 2022).
- Payne A, Chassard C, Lacroix C. 2012. Gut microbial adaptation to dietary consumption of fructose, artificial sweeteners and sugar alcohols: implications for host-microbe interactions contributing to obesity. *Obesity Reviews* **13**:799-809. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2012.01009.x
- Pielak M, Czarniecka-Skubina E, Trafiałek J, Głuchowski A. 2019. Contemporary Trends and Habits in the Consumption of Sugar and Sweeteners—A Questionnaire Survey among Poles. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **16**: (1164). DOI: 10.3390/ijerph16071164
- Plaza-Diaz J, Pastor-Villaescusa B, Rueda-Robles A, Abadia-Molina F, Ruiz-Ojeda F. 2020. Plausible Biological Interactions of Low- and Non-Calorie Sweeteners with the Intestinal Microbiota: An Update of Recent Studies. *Nutrients* **12**: (1153). DOI: 10.3390/nu12041153
- Reuter G. 1963. Vergleichende untersuchungen ueber die bifidus-flora im saeuglings- und erwachsenenstuhl. Zugleich ein beitrag zur systematisierung und nomenklatur der bifidus-keime [Comparative studies on the bifidus flora in the feces of infants and adults. With a contribution to classification and nomenclature of bifidus strains]. *Zentralbl Bakteriol Orig.* **191**:486-507. Německy. PMID: 14121844.
- Reuter G. 1971. Designation of Type Strains for Bifidobacterium Species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **21**:273-275. DOI: 10.1099/00207713-21-4-273
- Ruiz-Ojeda F, Plaza-Díaz J, Sáez-Lara M, Gil A. 2019. Effects of Sweeteners on the Gut Microbiota: A Review of Experimental Studies and Clinical Trials. *Advances in Nutrition* **10**:31-48. DOI: 10.1093/advances/nmy037
- Sardarodiyani M, Hakimzadeh V. 2016. Artificial sweeteners. *International Journal of PharmTech Research* **9**:357-363.
- Sarkar A, Pitchumoni C. 2016. Identification of the Microbiota in the Aging Process. Pages 37-56 in M. Floch, Y. Ringel and W. Walker, editors. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis*. Academic Press, Cambridge.
- Scardovi V, Crociani F. 1974. Bifidobacterium catenulatum, Bifidobacterium dentium, and Bifidobacterium angulatum: Three New Species and Their Deoxyribonucleic Acid Homology Relationships. *International Journal of Systematic Bacteriology* **24**:6-20. DOI: 10.1099/00207713-24-1-6
- Scardovi V, Trovatelli L, Biavati B, Zani G. 1979. Bifidobacterium cuniculi, Bifidobacterium choerinum, Bifidobacterium boum, and Bifidobacterium pseudocatenulatum: Four New

- Species and Their Deoxyribonucleic Acid Homology Relationships. *International Journal of Systematic Bacteriology* **29**:291-311. DOI: 10.1099/00207713-29-4-291
- Shahriar S, Ahsan T, Khan A, Akhteruzzaman S, Shehreen S, Sajib A. 2020. Aspartame, acesulfame K and sucralose- influence on the metabolism of *Escherichia coli*. *Metabolism Open* **8**: (100072). DOI: 10.1016/j.metop.2020.100072
- Schiffman S, Nagle H. 2019. Revisited: Assessing the in vivo data on low/no-calorie sweeteners and the gut microbiota. *Food and Chemical Toxicology* **132**: (110692). DOI: 10.1016/j.fct.2019.110692
- Stuivenberg GA, Burton JP, Bron PA, Reid G. 2022. Why Are Bifidobacteria Important for Infants?. *Microorganisms* **10**: (278). DOI: 10.3390/microorganisms10020278
- Suez J, Korem T, Zilberman-Schapira G, Segal E, Elinav E. 2015. Non-caloric artificial sweeteners and the microbiome: findings and challenges. *Gut Microbes* **6**:149-155. DOI: 10.1080/19490976.2015.1017700
- Tandel K. 2011. Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* **2**: 236-43. DOI: 10.4103/0976-500X.85936
- Thomson P, Medina DA, Garrido D. 2018. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. *Food Microbiology* **75**:37-46. DOI: 10.1016/j.fm.2017.09.001
- Tissier H. 1900. *Récherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourisson*. G. Carré et C. Naud, Paříž. Francouzsky.
- Turner A, Veysey M, Keely S, Scarlett CJ, Lucock M, Beckett EL. 2020. Intense Sweeteners, Taste Receptors and the Gut Microbiome: A Metabolic Health Perspective. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**: (4094). DOI: 10.3390/ijerph17114094
- Turrone F, Milani C, Duranti S, Ferrario C, Lugli GA, Mancabelli L, van Sinderen D, Ventura M. 2018. Bifidobacteria and the infant gut: an example of co-evolution and natural selection. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**:103-118. DOI: 10.1007/s00018-017-2672-0
- Turrone F, Duranti S, Milani C, Lugli G, van Sinderen D, Ventura M. 2019. Bifidobacterium bifidum: A Key Member of the Early Human Gut Microbiota. *Microorganisms* **7**: (544). DOI: 10.3390/microorganisms7110544
- Yakoob R, Pradeep B. 2019. Bifidobacterium sp as Probiotic Agent - Roles and Applications. *Journal of Pure and Applied Microbiology* **13**:1407-1417. DOI: 10.22207/JPAM.13.3.11
- Zakharevich NV, Nezametdinova VZ, Averina OV, Chekalina MS, Alekseeva MG, Danilenko VN. 2019. Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium angulatum* GT102: Potential Genes and Systems of Communication with Host. *Russian Journal of Genetics* **55**:847-864. DOI: 10.1134/S1022795419070160

Zhang C, Yu Z, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, Chen W. 2019. Colonization and probiotic function of *Bifidobacterium longum*. *Journal of Functional Foods* **53**:157-165. DOI: 10.1016/j.jff.2018.12.022

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

- ADI (Acceptable Daily Intake) – Akceptovatelný denní příjem  
ATCC (American Type Culture Collection) – Americká sbírka typových kultur  
DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) – Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur  
EFSA (European Food Safety Authority) – Evropský úřad pro bezpečnost potravin  
FDA (Food and Drug Administration) – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv  
FISH – fluorescenční in situ hybridizace  
GIT – gastrointestinální trakt  
KMVD – Sběrka mikroorganismů Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky na České zemědělské univerzitě v Praze  
KTJ – kolonie tvořící jednotky  
LMG (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms) – Belgické koordinované sbírky mikroorganismů  
MFU – McFarlandův standard  
MPL (Maximum Permitted Level) – Maximální povolená úroveň  
NK – negativní kontrola  
PK – pozitivní kontrola  
S1 – substrát 1 – Acesulfam K  
S2 – substrát 2 – Isomalt  
S3 – substrát 3 – Erythritol  
S4 – substrát 4 – Aspartam  
S5 – substrát 5 – Xylitol  
S6 – substrát 6 – Sacharin  
S7 – substrát 7 – Sukralóza  
S8 – substrát 8 – Sorbitol



## **10 Samostatné přílohy**

V této kapitole jsou k dispozici tabulky z makrodiluční i mikrodiluční metody, včetně tabulky hodnocených mikrotitračních destiček vyhodnocených přístrojem Tecan Infinite M200. Je zde uvedeno všech 48 kmenů bifidobakterií, které byly testovány.

Bifidobakterie, které vykazovaly nárůst na umělých sladidlech a cukerných alkoholech jsou zmíněny v přehlednějších tabulkách v kapitole 5 – Výsledky.

**Tabulka I** Výsledky mikrodiluční metody u substrátů skupiny 1

Testované kmeny		Testované substráty sk. 1														
		Acesulfam K		Isomalt		Erythritol		Aspartam		Pozitivní kontrola 1		Negativní kontrola 1				
Kultivace (hod)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48			
<i>B. adolescentis</i>	DSM 20083	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH												5,60		
	D2	OD	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH				6,10								5,60		
	D6	OD	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
		pH				5,60				6,10			5,77			
	D28	OD	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
		pH								6,10			5,30			
	D51	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		pH														
	D63	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		pH												5,60		
	B2	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,60		
B9	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	pH												5,67			
B30	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	pH												5,77			
<i>B. angulatum</i>	DSM 20098	OD	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		pH				5,60								5,77		
<i>B. bifidum</i>	DSM 20082	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH												5,50		
	DSM 20456	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,60		
	DSM 20215	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,67		
ATCC 29521	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	pH												5,30			
B6	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	pH												5,40			
<i>B. breve</i>	ATCC 15700	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH												5,67		
<i>B. catenulatum</i>	D1	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		pH												6,50		
	D16	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												6,40		
	D36	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		pH														

Poznámka: + v OD řádku = nárůst; - v OD řádku = nebyl nárůst; modře = nárůst na daném substrátu skupiny 1; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.

**Tabulka I Pokračování**

Testované kmeny		Testované substráty sk. 1														
		Acesulfam K		Isomalt		Erythritol		Aspartam		Pozitivní kontrola 1		Negativní kontrola 1				
Kultivace (hod)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48			
<i>B. catenulatum</i>	B12	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH												5,30		
	B51	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		pH												5,60		
	B53	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												6,10		
<i>B. catenulatum</i> subsp. <i>Kaswiwanohense</i>	DSM 21854	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		pH												5,30		
<i>B. dentium</i>	DSM 20436	OD	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH		6,70		5,60								5,60		
<i>B. faecale</i>	LMG 30642	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH												5,30		
<i>B. gallicum</i>	DSM 20093	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH												5,50		
<i>B. longum</i> subsp. <i>Longum</i>	ATCC 15707	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH												5,40		
<i>B. longum</i>	D3	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		pH												5,60		
	D15	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,77		
	D23	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,77		
	D26	OD	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH		6,10										5,30		
	D30	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,50		
	D45	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,73		
	D50	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		pH														
	D61A	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,85		
	D67	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		pH												5,60		

Poznámka: + v OD řádce = nárůst; - v OD řádce = nebyl nárůst; modře = nárůst na daném substrátu skupiny 1; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.

**Tabulka I Pokračování**

Testované kmeny		Testované substráty sk. 1														
		Acesulfam K		Isomalt		Erythritol		Aspartam		Pozitivní kontrola 1		Negativní kontrola 1				
Kultivace (hod)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48			
<i>B. longum</i>	B1	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH												5,30		
	B3	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,50		
	B4	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,60		
	B5	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,30		
	B7	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,40		
	B8	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,30		
	B19	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,50		
	B20	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,50		
	B27	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,50		
B28	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	pH												5,50			
<i>B. pseudocatenulatum</i>	D32	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH												5,60		
<i>B. scardovii</i>	DSM 13734	OD	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		pH				5,80								5,40		

Poznámka: + v OD řádku = nárůst; - v OD řádku = nebyl nárůst; modře = nárůst na daném substrátu skupiny 1; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.

**Tabulka II** Výsledky mikrodiluční metody u substrátů skupiny 2

Testované kmeny		Testované substráty sk. 2														
		Xylitol		Sacharin		Sukralóza		Sorbitol		Pozitivní kontrola 2		Negativní kontrola 2				
Kultivace (hod)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48			
<i>B. adolescentis</i>	DSM 20083	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH												5,60		
	D2	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		pH												5,60		
	D6	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,77		
	D28	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,77		
	D51	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		pH														
	D63	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,60		
	B2	OD	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
		pH								5,77				5,77		
B9	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	pH												5,60			
B30	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	pH												5,60			
<i>B. angulatum</i>	DSM 20098	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		pH												6,10		
<i>B. bifidum</i>	DSM 20082	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH												5,60		
	DSM 20456	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,50		
	DSM 20215	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												5,77		
ATCC 29521	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	pH												5,50			
B6	OD	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	
	pH									5,93			5,77			
<i>B. breve</i>	ATCC 15700	OD	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	
		pH								5,60				5,43		
<i>B. catenulatum</i>	D1	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		pH												5,93		
	D16	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH												6,10		
	D36	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		pH														

Poznámka: + v OD řádku = nárůst; - v OD řádku = nebyl nárůst; modře = nárůst na daném substrátu skupiny 2; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.

**Tabulka II Pokračování**

Testované kmeny		Testované substráty sk. 2														
		Xylitol		Sacharin		Sukralóza		Sorbitol		Pozitivní kontrola 2		Negativní kontrola 2				
Kultivace (hod)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48			
<i>B. catenulatum</i>	B12	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH											6,10			
	B51	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		pH														
	B53	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH											5,77			
<i>B. catenulatum</i> subsp. <i>Kaswianohense</i>	DSM 21854	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		pH											5,93			
<i>B. dentium</i>	DSM 20436	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH											6,02			
<i>B. faecale</i>	LMG 30642	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH											5,93			
<i>B. gallicum</i>	DSM 20093	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH											5,30			
<i>B. longum</i> subsp. <i>Longum</i>	ATCC 15707	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH											5,60			
<i>B. longum</i>	D3	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		pH											5,77			
	D15	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
		pH											5,85			
	D23	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH											5,60			
	D26	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH											5,60			
	D30	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH											5,40			
	D45	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH											5,93			
	D50	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		pH														
	D61A	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH											5,77			
	D67	OD	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	
		pH								5,77		5,50				

Poznámka: + v OD řádku = nárůst; - v OD řádku = nebyl nárůst; modře = nárůst na daném substrátu skupiny 2; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.

Tabulka II Pokračování

Testované kmeny		Testované substráty sk. 2														
		Xylitol		Sacharin		Sukralóza		Sorbitol		Pozitivní kontrola 2		Negativní kontrola 2				
Kultivace (hod)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48			
<i>B. longum</i>	B1	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH											5,50			
	B3	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH											5,50			
	B4	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH											5,60			
	B5	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH											5,45			
	B7	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH											5,93			
	B8	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH											5,77			
	B19	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH											5,77			
	B20	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH											5,77			
	B27	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
		pH											5,60			
B28	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	pH											5,93				
<i>B. pseudocatenulatum</i>	D32	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-		
		pH										5,77				
<i>B. scardovii</i>	DSM 13734	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
		pH											5,77			

Poznámka: + v OD řádku = nárůst; - v OD řádku = nebyl nárůst; modře = nárůst na daném substrátu skupiny 2; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.

**Tabulka III** Výsledky mikrodiluční metody, vyhodnoceno přístrojem Tecan Infinite M200

Testované kmeny		Testované substráty sk. 1						Testované substráty sk. 2					
		Acesulfam K	Isomalt	Erytritrol	Aspartam	Pozitivní kontrola 1	Negativní kontrola 1	Xylitol	Sacharin	Sukralóza	Sorbitol	Pozitivní kontrola 2	Negativní kontrola 2
<i>B. adolescentis</i>	DSM 20083	0,332	0,396	0,407	0,424	<b>0,592</b>	0,346	0,348	0,339	0,356	0,318	<b>0,445</b>	0,357
	D2	0,292	0,429	0,486	0,489	<b>0,492</b>	0,394	0,397	0,445	0,494	0,497	<b>0,607</b>	0,443
	D6	0,360	0,441	0,467	0,522	<b>0,597</b>	0,404	0,377	0,415	0,524	0,571	<b>0,530</b>	0,371
	D28	0,401	0,299	0,443	0,392	<b>0,554</b>	0,336	0,420	0,470	0,536	0,532	<b>0,658</b>	0,462
	D51	0,264	0,240	0,270	0,262	0,262	0,183	0,344	0,391	0,452	0,441	0,447	0,403
	D63	0,402	0,411	0,454	0,456	<b>0,525</b>	0,439	0,378	0,404	0,448	0,409	<b>0,467</b>	0,353
	B2	0,351	0,454	0,462	0,496	<b>0,622</b>	0,446	0,454	0,527	0,558	0,613	<b>0,626</b>	0,476
	B9	0,261	0,219	0,219	0,230	<b>0,396</b>	0,216	0,368	0,463	0,492	0,515	<b>0,623</b>	0,458
	B30	0,222	0,225	0,204	0,227	<b>0,299</b>	0,184	0,463	0,422	0,520	0,503	<b>0,586</b>	0,402
<i>B. angulatum</i>	DSM 20098	0,303	0,273	0,250	0,304	<b>0,250</b>	0,186	0,353	0,401	0,505	0,516	<b>0,533</b>	0,474
<i>B. bifidum</i>	DSM 20082	0,304	0,265	0,276	0,280	<b>0,386</b>	0,275	0,353	0,440	0,523	0,486	<b>0,672</b>	0,496
	DSM 20456	0,258	0,291	0,326	0,350	<b>0,500</b>	0,273	0,264	0,301	0,328	0,346	<b>0,525</b>	0,267
	DSM 20215	0,277	0,278	0,285	0,284	<b>0,400</b>	0,276	0,474	0,497	0,541	0,562	<b>0,691</b>	0,502
	ATCC 29521	0,458	0,395	0,494	0,430	<b>0,612</b>	0,348	0,314	0,406	0,418	0,433	<b>0,567</b>	0,421
	B6	0,263	0,316	0,348	0,388	<b>0,479</b>	0,378	0,455	0,507	0,579	0,629	<b>0,707</b>	0,487
<i>B. breve</i>	ATCC 15700	0,308	0,239	0,245	0,258	<b>0,402</b>	0,199	0,393	0,411	0,470	0,577	<b>0,671</b>	0,387
<i>B. catenulatum</i>	D1	0,278	0,279	0,243	0,232	<b>0,326</b>	0,199	0,460	0,417	0,504	0,476	<b>0,521</b>	0,401
	D16	0,282	0,256	0,254	0,263	<b>0,305</b>	0,195	0,374	0,484	0,507	0,538	<b>0,554</b>	0,488
	D36	0,392	0,438	0,482	0,483	0,492	0,443	0,334	0,398	0,417	0,447	0,449	0,401
	B12	0,378	0,435	0,464	0,494	<b>0,619</b>	0,474	0,377	0,424	0,489	0,503	<b>0,632</b>	0,428
	B51	0,398	0,344	0,405	0,342	<b>0,606</b>	0,320	0,453	0,490	0,519	0,519	0,537	0,483
	B53	0,359	0,411	0,458	0,434	<b>0,488</b>	0,418	0,445	0,474	0,507	0,515	<b>0,572</b>	0,473
<i>B. catenulatum</i> subsp. <i>Kaswiwanohense</i>	DSM 21854	0,236	0,314	0,290	0,271	<b>0,289</b>	0,206	0,340	0,439	0,477	0,619	<b>0,523</b>	0,470
<i>B. dentium</i>	DSM 20436	0,360	0,379	0,400	0,291	<b>0,440</b>	0,202	0,569	0,578	0,624	0,655	<b>0,621</b>	0,514
<i>B. faecale</i>	LMG 30642	0,272	0,276	0,233	0,246	<b>0,315</b>	0,187	0,496	0,508	0,549	0,497	<b>0,671</b>	0,486
<i>B. gallicum</i>	DSM 20093	0,332	0,313	0,304	0,334	<b>0,453</b>	0,318	0,339	0,406	0,433	0,452	<b>0,544</b>	0,411
<i>B. longum</i> subsp. <i>Longum</i>	ATCC 15707	0,304	0,227	0,228	0,233	<b>0,372</b>	0,197	0,355	0,439	0,464	0,478	<b>0,599</b>	0,413
<i>B. longum</i>	D3	0,304	0,345	0,250	0,266	<b>0,248</b>	0,203	0,389	0,446	0,487	0,501	<b>0,587</b>	0,419
	D15	0,403	0,452	0,490	0,524	<b>0,646</b>	0,421	0,480	0,413	0,490	0,415	<b>0,476</b>	0,314
	D23	0,246	0,237	0,255	0,253	<b>0,381</b>	0,185	0,444	0,534	0,559	0,573	<b>0,631</b>	0,511
	D26	0,383	0,410	0,455	0,462	<b>0,476</b>	0,380	0,347	0,447	0,478	0,490	<b>0,514</b>	0,457
	D30	0,313	0,434	0,465	0,499	<b>0,567</b>	0,492	0,431	0,462	0,521	0,540	<b>0,578</b>	0,469
	D45	0,542	0,460	0,545	0,519	<b>0,657</b>	0,475	0,315	0,387	0,418	0,437	<b>0,466</b>	0,390
	D50	0,391	0,473	0,481	0,503	0,506	0,465	0,373	0,404	0,472	0,484	0,478	0,446
	D61A	0,390	0,458	0,497	0,497	<b>0,602</b>	0,452	0,383	0,465	0,462	0,461	<b>0,533</b>	0,415
	D67	0,503	0,492	0,510	0,509	<b>0,537</b>	0,441	0,460	0,388	0,490	0,528	<b>0,524</b>	0,348
	B1	0,312	0,370	0,426	0,466	<b>0,539</b>	0,428	0,340	0,460	0,492	0,518	<b>0,576</b>	0,485
	B3	0,357	0,442	0,490	0,490	<b>0,567</b>	0,426	0,436	0,527	0,553	0,545	<b>0,600</b>	0,467
	B4	0,353	0,402	0,443	0,437	<b>0,419</b>	0,390	0,403	0,444	0,504	0,515	<b>0,521</b>	0,459
	B5	0,529	0,511	0,536	0,517	<b>0,633</b>	0,450	0,541	0,492	0,564	0,517	<b>0,582</b>	0,425
	B7	0,246	0,419	0,450	0,453	<b>0,559</b>	0,439	0,544	0,508	0,571	0,540	<b>0,669</b>	0,467
B8	0,358	0,464	0,483	0,499	<b>0,570</b>	0,481	0,349	0,446	0,489	0,468	<b>0,614</b>	0,420	

Poznámka: modře = nárůst na daném substrátu skupiny 1 / 2; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.



**Tabulka III** Pokračování

Testované kmeny		Testované substráty sk. 1						Testované substráty sk. 2					
		Acesulfam K	Isomalt	Erytritol	Aspartam	Pozitivní kontrola 1	Negativní kontrola 1	Xylitol	Sacharin	Sukralóza	Sorbitol	Pozitivní kontrola 2	Negativní kontrola 2
<i>B. longum</i>	B19	0,339	0,380	0,331	0,376	<b>0,550</b>	0,382	0,477	0,402	0,543	0,471	<b>0,614</b>	0,358
	B20	0,476	0,447	0,500	0,486	<b>0,666</b>	0,435	0,388	0,295	0,453	0,331	<b>0,549</b>	0,251
	B27	0,306	0,352	0,381	0,457	<b>0,550</b>	0,352	0,416	0,497	0,516	0,527	<b>0,577</b>	0,468
	B28	0,396	0,438	0,501	0,491	<b>0,538</b>	0,449	0,409	0,415	0,482	0,434	<b>0,486</b>	0,393
<i>B. pseudocatenuatum</i>	D32	0,392	0,482	0,538	0,527	<b>0,547</b>	0,507	0,450	0,476	0,481	0,569	<b>0,544</b>	0,438
<i>B. scardovii</i>	DSM 13734	0,309	0,322	0,242	0,321	<b>0,471</b>	0,189	0,515	0,523	0,596	0,576	<b>0,756</b>	0,497

Poznámka: modře = nárůst na daném substrátu skupiny 1 / 2; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.

**Tabulka IV** Výsledky makrodiluční metody u substrátů skupiny 1

Testované kmeny		Testované substráty sk. 1												
		Acesulfam K		Isomalt		Erythritol		Aspartam		Pozitivní kontrola 1		Negativní kontrola 1		
Kultivace (hod)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	
<i>B. adolescentis</i>	DSM 20083	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	-	-
		pH											5,40	
	D2	OD	-	-	-	F5	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH				6,13							5,47	
	D6	OD	-	-	F4	F4	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH				5,45							5,34	
	D28	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH											5,37	
	D51	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F2	-	-
		pH											5,55	
	D63	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH											5,40	
	B2	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH											5,46	
	B9	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH											5,25	
	B30	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH											5,43	
<i>B. angulatum</i>	DSM 20098	OD	-	-	-	-	-	-	-	F4	F4	-	-	
		pH											4,96	
<i>B. bifidum</i>	DSM 20082	OD	F1	F1	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH											4,84	
	DSM 20456	OD	-	-	-	F1	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH											5,45	
	DSM 20215	OD	-	-	-	-	-	-	-	F1	F4	F4	-	-
		pH											4,84	
	ATCC 29521	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH											4,95	
B6	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
	pH											5,26		
<i>B. breve</i>	ATCC 15700	OD	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH											5,33	
<i>B. catenulatum</i>	D1	OD	-	-	-	-	-	-	-	F2	F3	-	-	
		pH											5,89	
	D16	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH											5,65	
	D36	OD	-	-	-	F5	-	-	-	-	-	F5	-	-
		pH				5,52							5,38	

Poznámka: + / F0,5 – F5 v OD řádku = nárůst; - v OD řádku = nebyl nárůst; modře = nárůst na daném substrátu skupiny 1; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.

Legenda:

McFarlandova stupnice	Nárůst
F0,5 – F2	Slabý
F3	Střední
F4 – F5	Intenzivní

**Tabulka IV** Pokračování

Testované kmeny		Testované substráty sk. 1														
		Acesulfam K		Isomalt		Erythritol		Aspartam		Pozitivní kontrola 1		Negativní kontrola 1				
Kultivace (hod)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48			
<i>B. catenulatum</i>	B12	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH											5,17			
	B51	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F3	F5	-	-
		pH											5,26			
	B53	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F2	F3	-	-
		pH											5,69			
<i>B. catenulatum</i> subsp. <i>Kaswiwanohense</i>	DSM 21854	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH											4,83			
<i>B. dentium</i>	DSM 20436	OD	-	-	F3	F4	-	-	-	F1	F4	F5	-	-		
		pH				4,99							5,33			
<i>B. faecale</i>	LMG 30642	OD	-	-	-	-	-	F1	-	-	-	F4	F4	-	-	
		pH											4,94			
<i>B. gallicum</i>	DSM 20093	OD	-	-	-	-	-	-	-	F1	F5	F5	-	-		
		pH											5,05			
<i>B. longum</i> subsp. <i>Longum</i>	ATCC 15707	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH											5,39			
<i>B. longum</i>	D3	OD	F0,5	F0,5	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH											5,68			
	D15	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH											5,34			
	D23	OD	F0,5	F0,5	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH											5,64			
	D26	OD	-	F4	-	-	-	-	-	F5	F5	F5	-	-		
		pH		6,00						5,92			5,33			
	D30	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F3	F3	-	-	
		pH											5,63			
	D45	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F4	F5	-	-	
		pH											5,49			
	D50	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH											5,37			
	D61A	OD	-	-	F0,5	F1,0	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH											5,35			
	D67	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	-	-	
		pH											5,38			

Poznámka: + / F0,5 – F5 v OD řádku = nárůst; - v OD řádku = nebyl nárůst; modře = nárůst na daném substrátu skupiny 1; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.

Legenda:

McFarlandova stupnice	Nárůst
F0,5 – F2	Slabý
F3	Střední
F4 – F5	Intenzivní

**Tabulka IV Pokračování**

Testované kmeny		Testované substráty sk. 1														
		Acesulfam K		Isomalt		Erythritol		Aspartam		Pozitivní kontrola 1		Negativní kontrola 1				
Kultivace (hod)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48			
<i>B. longum</i>	B1	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH												5,25		
	B3	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH												5,35		
	B4	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH												5,35		
	B5	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH												5,43		
	B7	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH												5,19		
	B8	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F4	F5	-	-
		pH												5,33		
	B19	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH												5,20		
B20	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
	pH												5,19			
B27	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
	pH												5,21			
B28	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
	pH												5,20			
<i>B. pseudocatenulatum</i>	D32	OD	-	-	-	-	-	-	-	F1	F1	F5	F5	-	-	
		pH												5,58		
<i>B. scardovii</i>	DSM 13734	OD	F1	F1	F1	F1	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH												4,91		

Poznámka: + / F0,5 – F5 v OD řádku = nárůst; - v OD řádku = nebyl nárůst; **modře** = nárůst na daném substrátu skupiny 1; **oranžově** = nárůst pozitivní kontroly.

Legenda:

McFarlandova stupnice	Nárůst
F0,5 – F2	Slabý
F3	Střední
F4 – F5	Intenzivní

**Tabulka V** Výsledky makrodiluční metody u substrátů skupiny 2

Testované kmeny		Testované substráty sk. 2													
		Xylitol		Sacharin		Sukralóza		Sorbitol		Pozitivní kontrola 2		Negativní kontrola 2			
Kultivace (hod)			24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	
<i>B. adolescentis</i>	DSM 20083	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F3	f5	-	-	
		pH											5,38		
	D2	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	f5	-	-	
		pH											5,44		
	D6	OD	-	-	-	-	-	-	-	F5	F2	F4	-	-	
		pH								5,56		5,42			
	D28	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH										5,67			
	D51	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	-	-	
		pH										5,55			
	D63	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH										5,45			
B2	OD	-	-	-	-	-	-	F2	F2	F5	F5	-	-		
	pH								5,74		5,58				
B9	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-		
	pH										5,43				
B30	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-		
	pH										5,50				
<i>B. angulatum</i>	DSM 20098	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F4	F4	-	-	
		pH										5,44			
<i>B. bifidum</i>	DSM 20082	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH										5,39			
	DSM 20456	OD	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	F5	-	-	
		pH								5,80		5,47			
	DSM 20215	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F4	F5	-	-	
		pH										5,42			
ATCC 29521	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-		
	pH										5,45				
B6	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-		
	pH										5,24				
<i>B. breve</i>	ATCC 15700	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH										5,45			
<i>B. catenulatum</i>	D1	OD	-	-	-	-	-	-	F2	F3	F3	F4	-	-	
		pH								5,47		5,46			
	D16	OD	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	F5	-	-	
		pH								5,62		5,45			
	D36	OD	-	-	-	-	-	-	-	F4	F5	F5	F5	-	-
		pH								5,32		5,34			

Poznámka: + / F0,5 – F5 v OD řádku = nárůst; - v OD řádku = nebyl nárůst; modře = nárůst na daném substrátu skupiny 2; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.

Legenda:

McFarlandova stupnice	Nárůst
F0,5 – F2	Slabý
F3	Střední
F4 – F5	Intenzivní

**Tabulka V Pokračování**

Testované kmeny		Testované substráty sk. 2												
		Xylitol		Sacharin		Sukralóza		Sorbitol		Pozitivní kontrola 2		Negativní kontrola 2		
Kultivace (hod)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	
<i>B. catenulatum</i>	B12	OD	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH										5,29		
	B51	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F1	F3	-	-
		pH										5,69		
	B53	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F2	F3	-	-
		pH										5,69		
<i>B. catenulatum</i> subsp. <i>Kaswiwanohense</i>	DSM 21854	OD	-	-	-	-	-	F5	F5	F5	F5	-	-	
		pH							5,60		5,43			
<i>B. dentium</i>	DSM 20436	OD	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH									5,55			
<i>B. faecale</i>	LMG 30642	OD	-	-	-	-	-	-	-	F3	F3	-	-	
		pH									5,69			
<i>B. gallicum</i>	DSM 20093	OD	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH									5,35			
<i>B. longum</i> subsp. <i>Longum</i>	ATCC 15707	OD	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH									5,41			
<i>B. longum</i>	D3	OD	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH										5,32		
	D15	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F4	F4	-	-
		pH										5,43		
	D23	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH										5,42		
	D26	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH										5,46		
	D30	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH										5,40		
	D45	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F4	F5	-	-
		pH										5,31		
	D50	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH										5,33		
	D61A	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH										5,31		
	D67	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	-	-
		pH										5,56		

Poznámka: + / F0,5 – F5 v OD řádku = nárůst; - v OD řádku = nebyl nárůst; modře = nárůst na daném substrátu skupiny 2; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.

Legenda:

McFarlandova stupnice	Nárůst
F0,5 – F2	Slabý
F3	Střední
F4 – F5	Intenzivní

**Tabulka V Pokračování**

Testované kmeny		Testované substráty sk. 2												
		Xylitol		Sacharin		Sukralóza		Sorbitol		Pozitivní kontrola 2		Negativní kontrola 2		
Kultivace (hod)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	
<i>B. longum</i>	B1	OD	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH										5,45		
	B3	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH										5,40		
	B4	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH										5,31		
	B5	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH										5,25		
	B7	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH										5,38		
	B8	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH										5,36		
	B19	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-
		pH										5,51		
B20	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F4	F5	-	-	
	pH										5,31			
B27	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F2	F5	-	-	
	pH										5,31			
B28	OD	-	-	-	-	-	-	-	-	F4	F5	-	-	
	pH										5,33			
<i>B. pseudocatenulatum</i>	D32	OD	-	-	-	-	-	F2	F5	F1	F5	-	-	
		pH							5,49		5,44			
<i>B. scardovii</i>	DSM 13734	OD	-	-	-	-	-	-	-	F5	F5	-	-	
		pH									5,45			

Poznámka: + / F0,5 – F5 v OD řádku = nárůst; - v OD řádku = nebyl nárůst; modře = nárůst na daném substrátu skupiny 2; oranžově = nárůst pozitivní kontroly.

Legenda:

McFarlandova stupnice	Nárůst
F0,5 – F2	Slabý
F3	Střední
F4 – F5	Intenzivní