

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Přežívání probiotických bakterií v umělých kojeneckých výživách

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Barbora Koutná

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Šárka Musilová, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Přežívání probiotických bakterií v umělých kojeneckých výživách" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych upřímně poděkovala Ing. Šárce Musilové, Ph.D. za pomoc při vypracování diplomové práce, za odborné vedení, trpělivost a čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnutí potřebných materiálů.

Přežívání probiotických bakterií v umělých kojeneckých výživách

Souhrn

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele, jsou v hojné míře přidávány do kojeneckých výživ a díky svým účinkům se staly jejich běžnou součástí. Jako probiotika jsou nejčastěji využívány skupiny bakterií *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Střevní mikrobiota kojenců a uměle živěných dětí se výrazně liší, proto je snaha obohacovat umělé kojenecké výživy tak, aby se složením co nejvíce podobaly mateřskému mléku.

Teoretická část práce se zabývá vymezením pojmů střevní mikrobiota kojenců a faktory, které ji ovlivňují, umělá kojenecká výživa, probiotika, bakterie rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*.

Dále se věnuje umělým kojeneckým výživám obohaceným o probiotické bakterie, o přehledu dostupných kojeneckých výživ a způsobu zpracování probiotických mikroorganismů.

Cílem diplomové práce bylo monitorování počtu probiotických bakterií v kojeneckých výživách v závislosti na podmínkách skladování. K pokusu byly použity umělé kojenecké výživy s probiotiky dostupné na českém trhu. Vzorky byly skladovány v různých podmínkách, a to při různých teplotách (4°C, 18°C, 37°C), za přístupu či omezeném přístupu vzduchu. Pravidelně po 6 týdnech u nich byl stanoven počet probiotických bakterií. Počty bakterií byly stanoveny pomocí kultivační plotnové metody.

Bylo zjištěno, že hojně využívaný kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* se zdá být velmi stabilní a odolný vůči podmínkám skladování.

V uzavřených nádobách byly počty bakterií stabilnější minimálně po dobu 6 týdnů, což je doba delší, než je doporučená skladovací doba od výrobců. Ze získaných výsledků lze konstatovat, že obecně u všech vzorků se zdá být nejvhodnějším způsobem uchování skladování v dobře uzavřených nádobách při teplotě 4°C.

Klíčová slova: probiotika, umělá kojenecká mléka, bifidobakterie, laktobacily

Survival of probiotic bacteria in infant formulas

Summary

Probiotics are live microorganisms, which positively affects host's health condition, Probiotics are abundantly added to baby food and thanks to its effect they became its common component. Bacteria from groups *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are most commonly used probiotics. Breastfed babies and babies fed by infant formula differ in intestinal microbiota, thus an effort to enrich the infant formula to be as much similar to breast milk.

Theoretic part of thesis deals with the definition of terms 'baby intestinal microbiota' and 'factor that influence the microbiota', 'infant formula', 'probiotics', bacteria genus *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*.

In the next step the work focuses to probiotics enriched infant formula, summary of available infant formulas and a way of processing probiotic microorganisms.

The aim of the work was monitoring number of probiotic bacteria in baby food in dependence on storing conditions. Infant formulas available on Czech market, were used in the experiment. Samples of infant formulas were stored in the different conditions, namely in different temperatures (4°C, 18°C, 37°C), in the acces of air or limited access of air. Number of bacteria was determined periodically after 6 weeks. Number of bacteria was determined using culture plate method.

It was found that profusely used genus *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* seems to be very stable and resistant to storage conditions.

Numbers of bacteria in sealed containers were stable for minimum six weeks, which is longer time than recommendation of the manufacturer. From the data obtained, in general we can say, the most adequate way of storage of samples is in sealed containers at temperature 4°C.

Keywords: probiotics, infant formula, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Střevní mikrobiota člověka	10
3.2 Střevní mikrobiota kojenců	14
3.3 Faktory ovlivňující střevní mikrobiotu kojenců	15
3.3.1 Gestáčn� věk a doba porodu.....	16
3.3.2 Způsob porodu	17
3.3.3 V�y�iva matky v pr�b�ehu t�hotenstv�	18
3.4 Mateřské ml�ko a um�l� kojeneck� v�y�iva	19
3.4.1 Historie v�y�ivy kojenců	19
3.4.2 Období v�y�ivy kojence dle studie Hrodek et al. (2002)	20
3.4.3 Um�l� kojeneck� v�y�iva	21
3.4.4 Rozdělení kojeneckých formulí	21
3.4.4.1 Po�ate�n� kojeneck� formule.....	22
3.4.4.2 Pokračovací kojeneck� formule	24
3.5 Kojeneck� v�y�iva s probiotiky	25
3.5.1 Probiotika.....	26
3.5.1.1 Historie a taxonomie rodu Bifidobacterium a Lactobacillus.....	31
3.5.2 Prebiotika	34
3.5.2.1 Probiotika a prebiotika v kojeneckých formulích	34
3.5.3 Synbiotika	35
3.6 Lyofilizace bakterií	36
4 Metoda a materiál	37
4.1 Hodnocen� vzorky	37
4.1.1 Vzorek �slo 1 BEBA OPTIPRO 1	37
4.1.2 Vzorek 2 Hipp Bio Combiotic	37
4.1.3 Vzorek 3 Amilk Bifido®	38
4.1.4 Vzorek 4 Babylove	39
4.2 Skladování vzorků	40
4.3 Odebírání vzorků	40
4.4 Mikrobiologick� rozbor um�l� kojeneckých mlék	41
4.4.1 P�r�prava a složení kultivačních medií	41
4.4.2 P�r�prava ředící řady a ředění vzorku.....	42
4.4.3 Mikrobiologick� rozbor um�l� kojeneck� v�y�ivy	43
4.5 Vyhodnocení počtu kolonií	44

5	Výsledky	46
6	Diskuze	53
7	Závěr.....	56
8	Seznam použité literatury.....	57

1 Úvod

Mateřské mléko je nejvhodnější stravou pro dítě. Plně zajišťuje dávku potřebných živin a tekutin a svým složením nejlépe odpovídá individuálním fyziologickým potřebám novorozence.

Pokud z nějakého důvodu nemůže matka kojit, nahrazujeme mateřské mléko umělou výživou. Na trhu jsou k dispozici počáteční nebo pokračovací kojenecké výživy, které jsou doplněné o probiotickou a prebiotickou složku, která má pozitivní účinky na imunitní systém kojence. Tímto se výrobci umělých výživa snaží co nejlépe napodobit mateřské mléko. Na trhu je k dostání nespočet umělých kojeneckých výživ.

Podle světové zdravotnické organizace (WHO) a České pediatrické společnosti je preferováno výlučné kojení do věku 6 měsíců a poté současné kojení s postupným zaváděním příkrmů, pokud má matka dostatek mléka, doporučuje se pokračovat v kojení do 2 let i déle. Pokud dítě nemůže být nebo není kojeno, dostává jako náhradu mateřského mléka kojeneckou formuli

Cílem počátečních kojeneckých formulí je docílit co největší podobnosti ve složení s mateřským mlékem.

Probiotika jsou stále častěji přidávána do kojeneckých výživ, z důvodu pozitivního vlivu na zdraví kojenců. Vývoj střevní mikrobioty v průběhu prvního roku života je velmi dynamický, ale její mikrobiální rozmanitost je relativně nízká, zpravidla po prvním roce života se mikrobiom stabilizuje a začíná se podobat střevní mikrobiotě dospělých jedinců. Kolonizace střev novorozenců hraje klíčovou roli v rozvoji imunitní odpovědi.

Výsledky studií umělých kojeneckých výživ s přídavkem probiotik a prebiotik, byly spojené se zvyšováním frekvence stolice, ovlivněním konzistence, zlepšením gastrointestinálního pohodlí dětí a byl zjištěn i pozitivní vliv na snižování výskytu alergií.

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele, pokud jsou aplikovány v přiměřeném množství. Probiotika a prebiotika jsou široce využívány jako doplňky v kojenecké výživě a mnohé studie potvrdily jejich účinnost při podpoře změny složení mikrobioty tím, že stimulují růst bifidobakterií.

2 Cíl práce

Cílem práce je monitorování počtu probiotických bakterií v kojeneckých výživách v závislosti na podmínkách skladování.

Hypotéza:

Počty probiotických bakterií se budou v kojeneckých výživách lišit v závislosti na podmínkách skladování.

3 Literární rešerše

3.1 Střevní mikrobiota člověka

Antonie van Leeuwenhoek první pozoroval vztah bakterií a lidského těla již kolem roku 1670. Od této doby výzkum významně pokročil a soustředil se především na mikroorganismy, které mohou být kultivovány *in vitro*. Zcela zásadním problémem je, že stále dokážeme laboratorně vykultivovat pouze kolem 20 % druhů bakterií gastrointestinálního traktu, které byly dosud identifikovány molekulárními metodami (Suau A et al., 1999).

Střevní mikrobiota člověka je soubor organismů získaných postnatálně, zakládá se při porodu mikroby z porodních cest a okolního prostředí. U kojence je tento proces výrazně ovlivněn způsobem porodu a kojením. Prvními mikroorganismy kolonizující střevo jsou aerobní a fakultativně aerobní druhy koliformních bakterií, laktobacilů a streptokoků. Tyto populace snižují oxidoredukční potenciál, a to umožňuje osídlování střeva anaerobními bakteriemi z rodů *Bifidobacterium* a *Bacteroides*. Po zavedení pevné stravy se u kojence složení střevní mikrobioty přibližuje stále více k ustálenému stavu s převahou anaerobů jako u dospělých jedinců (Berg, 1996; Frič, 2005).

Střevní mikrobiota člověka je metabolicky aktivní a funguje jako obranný mechanismus. Je vytvářena po porodu a její ustálená podoba je utvářena po odstavení dítěte a zavedení další výživy, obvykle je ukončena kolem 2. roku života. Obecně můžeme říci, že během procesu vytváření definitivní mikrobioty ubývá bifidobakterií a přibývá laktobacilů a dalších bakteriálních kmenů (Salminen, 2009).

Mutualistické interakce mezi střevní mikrobiotou a člověkem jsou nezbytné pro lidské zdraví (Shanahan, 2009). Enterosolventní mikrobiota je producentem některých molekul, které jsou schopny inhibovat hostitelské patogeny, metabolizovat některé sloučeniny, které by hostitele mohly poškodit na méně toxické látky (Shanahan, 2009; Kovatcheva, 2009) a dále produkovat řadu biologicky aktivních látek jako jsou například konjugovaná kyselina linolová CLA, mastné kyseliny s krátkým řetězcem a gama-aminomáselné kyseliny, u kterých byla diskutována jejich protektivní funkce ve

vztahu k některým civilizačním chorobám jako je obezita, některé druhy nádorových onemocnění nebo kardiovaskulární onemocnění (Kovatcheva, 2009). Mimo to je střevní mikrobiota schopná účastnit se některých biochemických procesů, kterých není lidské tělo s jeho genetickou výbavou schopno, jako je například fermentace nestravitelných polysacharidů, metabolismus komplexních proteinů a syntézu některých vitamínů (Kovatcheva, 2009; Kelly, 2007).

Kvalitativní i kvantitativní složení bakteriálního osídlení je rozdílné v různých částech gastrointestinálního traktu. Počet mikrobů v trávicím traktu aborálně stoupá, v tenkém střevě je 10^5 až 10^6 , v tlustém střevě pak 10^{11} až 10^{12} mikrobiálních buněk/g obsahu (Lata et Jurankova, 2011). Vlivem podmínek, které jsou rozdílné v závislosti na proximálně-distální lokalizaci, jsou patrné i změny ve složení mikrobů – v žaludku dominují Proteobakterie, ve střevě pak *Firmicutes* (většinu tvoří grampozitivní bakterie – *Bacteroidetes* a *Actinobacteria*). Typické jsou malé rozdíly ve složení bakteriálního osídlení v jednotlivých částech tlustého střeva. Anaerobních bakterií je zhruba 10 krát více než aerobních (Mai et al., 2004).

Bakterie gastrointestinálního traktu mají vliv v oblasti výživy, metabolismu xenobiotik, toxicity složek potravy, významnou úlohu pak mikrobiota hraje v etiopatogenezi mnoha nemocí (infekčních, syndromu bakteriálního přerůstání v tenkém střevě, poinfekčního syndromu dráždivého střeva), autoimunitních onemocnění (celiakie, diabetes mellitus 1. typu), alergických onemocnění, metabolických onemocnění (obezita, diabetes mellitus 2. typu, nealkoholická steatohepatitida), idiopatických střevních zánětů, v modulaci gastrointestinálního imunitního systému, ale i v oblasti karcinogeneze, kdy je přítomnost mutagenních a genotoxických substancí bakteriálního původu ve stolici člověka přímým důkazem (Bureš et al., 2010; Heavey et al., 2004; Prakash et al., 2011; Stanghellini et al., 2010). Střevní mikrobiota je nutričně plně závislá na svém hostiteli, na nestravitelných zbytcích potravy (vláknina, škroby, oligosacharidy) a sekretech (hlen, enzymy, střevní hormony).

Na základě genomické analýzy bylo zjištěno, že u zdravých i nemocných jedinců střevní mikrobiota obsahuje převážně zástupce dvou mikrobiálních kmenů a to grampozitivní *Firmicutes* a gramnegativní *Bacteroidetes*. Na základě genetických

analýz byl počet rodů stanoven až na 1800, počet druhů mikroorganismů se udává v rozmezí hodnot 15 000 - 36 000. Nejvíce zastoupené jsou rody *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus* a *Bifidobacterium*, v menší míře jsou zde zastoupeny rod *Escherichia coli* a rod *Lactobacillus* (Frank, 2008; Frič, 2005).

Střevní mikrobiota a její pozitivní vliv na hostitele:

- Syntéza vitamínů skupiny B a vitamínu K
- Vazba potenciálních mutagenů
- Produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem a monosacharidů především z vlákniny, a z dalších nestravitelných složek potravy, jako jsou polysacharidy
- Přímé působení na sliznici; střevní mikrobiota má vliv na funkci imunitního systému, na složení hlenu, neurohumorální regulaci a další

Střevní mikrobiota v některých případech může mít i negativní či přímo škodlivý vliv na hostitelský organismus. Mezi tyto vlivy patří produkce toxinů, aktivace prokarcinogenů, syntéza karcinogenů a genotoxických látek z nestravitelných složek potravy a další.

Významnou roli na výsledný vliv bakterií GIT na hostitele hraje výživa a kvalitativní i kvantitativní zastoupení jednotlivých druhů mikrobů. Podle některých studií (Heavey et al., 2004) je za nevhodný dietní substrát považován nadbytek červeného masa, živočišné tuky a vysoký příjem soli v potravě a naopak příznivým vlivem se vyznačuje konzumace čerstvého ovoce a zeleniny, potravin bohatých na selen a vápník, a dále fermentované i nefermentované vlákniny. Je dokázáno, že změnou složení stravy lze během relativně krátkého časového úseku docílit změny ve složení střevní mikrobioty; ve smyslu snížení počtu gram-pozitivních *Firmicutes* a zároveň zvýšení počtu *Bacteroides* (Camp, 2009; Quispel, 1998).

Tabulka č. 1 - Složení mikrobioty lidského GIT (Nord CE, 1984)

Mikroorganismy	Počty mikroorganismů (KTJ/g)			
	<i>Gaster</i>	<i>Jejunum</i>	<i>Ileum</i>	<i>Colon</i>
Celkový počet bakterií	0-10 ³	0-10 ⁵	10 ³ -10 ⁹	10 ¹⁰ -10 ¹²
Aerobní bakterie				
čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	0-10 ²	0-10 ³	10 ² -10 ⁷	10 ⁴ -10 ¹⁰
<i>Streptococcus</i>	0-10 ³	0-10 ⁴	10 ² -10 ⁶	10 ⁵ -10 ¹⁰
<i>Staphylococcus</i>	0-10 ²	0-10 ³	10 ² -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁹
<i>Lactobacillus</i>	0-10 ³	0-10 ⁴	10 ² -10 ³	10 ⁶ -10 ¹⁰
<i>Saccharomyces</i>	0-10 ³	0-10 ²	10 ² -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁶
Anaerobní bakterie				
<i>Bacteroides</i>	vzácné	0-10 ³	10 ³ -10 ⁷	10 ¹⁰ -10 ¹²
<i>Bifidobacterium</i>	vzácné	0-10 ⁴	10 ³ -10 ⁹	10 ⁴ -10 ¹¹
<i>Peptostreptococcus</i>	vzácné	0-10 ³	10 ² -10 ⁶	10 ¹⁰ -10 ¹²
<i>Clostridium</i>	vzácné	vzácné	10 ² -10 ⁴	10 ⁶ -10 ¹¹
<i>Eubacteria</i>	vzácné	vzácné	vzácné	10 ¹⁰ -10 ¹²

3.2 Střevní mikrobiota kojenců

Střevní mikrobiota dospělého člověka je považována za mnohem rozmanitější než mikrobiota kojenců a batolat, přičemž je mikrobiota dospělých relativně stabilní (Dethlefsen, 2007; Kovatcheva, 2009; Claesson et al., 2011; Tap et al., 2009). Mikrobiota kojenců je rozdílná, je poměrně méně rozmanitá a v průběhu času se mění. V odborné literatuře se často vyskytují rozdílné informace týkající se složení střevní mikrobioty kojenců. (Resta, 2009; Conroy, 2009; Palmer et al., 2007; Koenig et al., 2011). Po dlouhou dobu byly bifidobakterie považovány za dominantní složku střevní mikrobioty. Výzkumy byly založeny na kultivačních metodách a analýzách za použití druhově specifických DNA sond (Wall et al., 2009; Wang et al., 2008; Jimenez, 2008; Turroni et al., 2009; Zoetendal et al., 2008; Fanaro et al., 2003). Nedávnými metagenomickými studii, které zkoumaly vývoj kojenecké střevní mikrobioty, byl zjištěn nízký počet bifidobakterií popřípadě jejich absence (Resta, 2009; Palmer et al., 2007). Za klíčové faktory je považován způsob výživy kojenců. Byla zjištěna rozdílná kolonizace ilea mezi dětmi kojenými a dětmi, které jsou krmeny umělou kojeneckou formulí (Wang et al., 2008; Fanaro et al., 2003). Vysoké hladiny bifidobakterií jsou spojovány s vývojem a zráním imunitního systému dítěte (DiGiulio et al., 2009; Hart et al., 2004).

Vývoj střevní mikrobioty v průběhu prvního roku života je velmi dynamický, ale její mikrobiální rozmanitost je relativně nízká, zpravidla po prvním roce života se mikrobiom stabilizuje a začíná se podobat střevní mikrobiotě dospělých jedinců (Wang, 2004).

Střevní mikrobiota významně ovlivňuje vývin a zrání imunitního systému v prvních dnech života (Wall et al., 2009; Gottrand, 2008; Conroy, 2009). Kolonizace střev novorozenců hraje klíčovou roli v rozvoji imunitní odpovědi. Bylo zjištěno, že narušení tohoto procesu, například způsobené terapií antibiotiky, může způsobit dlouhodobé zdravotní následky, což může vést až k imunologickým onemocněním jako je například ekzém, alergická rýma nebo zánětlivé onemocnění střev (Gottrand, 2008; Wang et al., 2008). Na dětech ve věku 18 měsíců byla zkoumána rozmanitost střevní mikrobioty v souvislosti s výskytem atopického ekzému v porovnání se zdravými dětmi

stejného věku. Bylo zjištěno, že u dětí s atopickou dermatitidou je střevní mikrobiom méně rozmanitý než u kontrolní skupiny (Saulnier, 2009).

3.3 Faktory ovlivňující střevní mikrobiotu kojenců

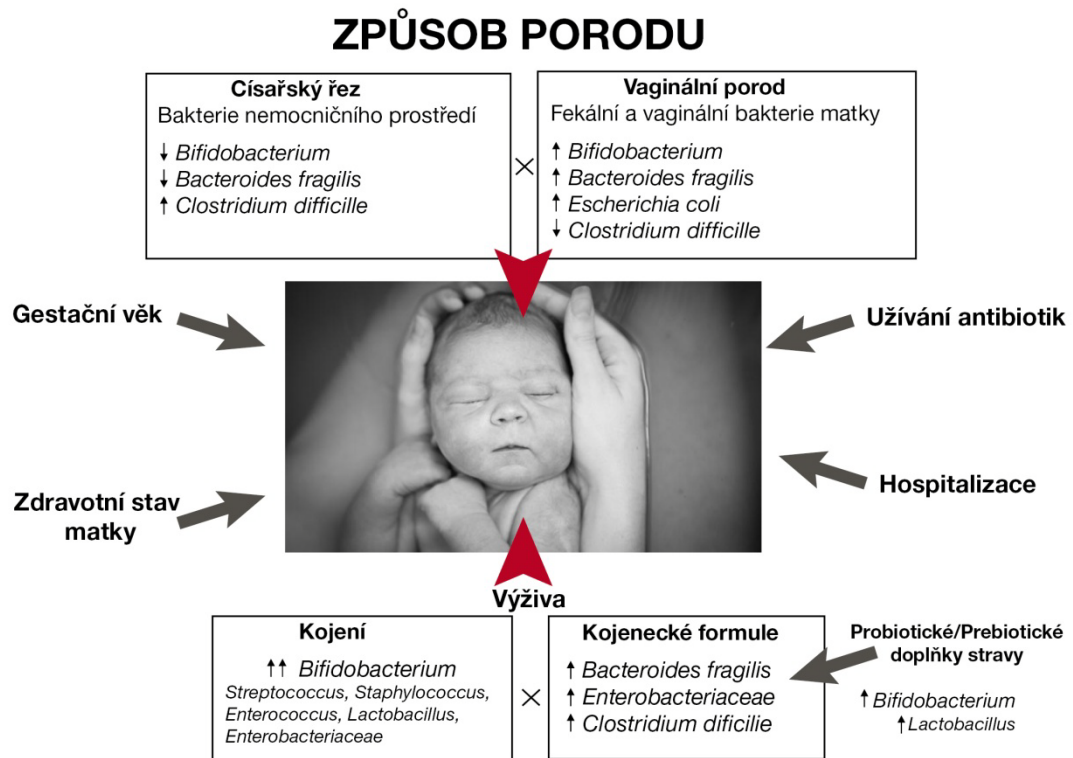
V době porodu byl považován gastrointestinální trakt kojence až donedávna za sterilní. Nyní vědci zjistili, že některé mikroorganismy jsou již přítomny v placentě (Doyle et al., 2014).

Při narození je gastrointestinální trakt novorozence jen velmi slabě osídlen mikroorganismy (Satokari et al., 2009; DiGiulio et al., 2008; Reinhardt et al., 2009), ale během prvních dnů života je rychle kolonizován (Obrázek č. 1), až po zavedení pevné stravy, během dvou let věku je mikrobiota relativně stabilní a již se podobá střevní mikrobiotě dospělých (Palmer et al., 2007; Shanahan et al., 2009; Kovatcheva, 2009; Adlerberth, 2009).

Bezprostředně po porodu je střevo novorozence kolonizováno fakultativně anaerobními bakteriemi, jako jsou *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* a *Staphylococcus* (Penders et al., 2006; Morelli, 2008; Biasucci et al., 2008). Většina interakcí mezi mikroorganismy a lidským hostitelem nemá za následek žádné zdravotní komplikace (Shanahan et al., 2009), tyto bakterie by však potenciálně patogenní být mohly (Biasucci et al., 2008). Tyto bakterie postupně spotřebovávají kyslík, produkují metabolity, tím vytváří vhodné prostředí pro striktně anaerobní bakteriální populace, většinou s dominantním zastoupením bifidobakterií, klostridií a *Bacteroides*, které hrají významnou roli při vytváření a zrání novorozenecké střevní mikrobioty (Penders et al., 2006; Morelli, 2008; Biasucci et al., 2008).

Hygienické podmínky při porodu jsou stále přísnější, matky s novorozenci jsou hospitalizovány po kratší dobu a celkově jsou novorozenci vystaveni nižší bakteriální expozici. Dříve bylo střevo novorozence kolonizováno především fekálními bakteriemi rodu *Enterobacteriaceae* (Morelli, 2008; Biasucci et al., 2008), v poslední době byl tento rod vystřídán především rodem *Staphylococcus*.

Složení novorozenecké střevní mikrobioty je ovlivněno řadou faktorů jako je způsob porodu, gestační věk, typ výživy matky i novorozence, užívání antibiotik, hospitalizace, nemoci, okolní prostředí a další (Penders et al., 2006; Adlerberth, 2009; Morelli, 2008; Biasucci et al., 2008; Butel et al., 2007).



Obrázek č. 1 Faktory ovlivňující střevní mikrobiotu kojenců

3.3.1 Gestační věk a doba porodu

Gestačním věkem označujeme délku těhotenství, počet týdnů strávených v děloze od početí do porodu. V neonatologii se nejčastěji využívá hodnocení gestačního věku dle skórovacího systému Ballardové – hodnotí soustavu somatických znaků, vývojové funkční odpovědi novorozence a jejich kombinací s určitou pravděpodobností dospějeme ke stanovení gestačního věku.

Podle délky gestace můžeme klasifikovat novorozence (Lebl, 2007):

Předčasně narození, nedonošení- narození před 38. gestačním týdnem

Narození v termínu- narození mezi 38. a 42. gestačním týdnem

Přenášení- narození po 42. gestačním týdnu

Bylo prokázáno, že střeva předčasně porozených dětí byla kolonizována častěji bakteriemi *Clostridium difficile*. Počty těchto bakterií byly u předčasně narozených dětí v průměru 7,12 logCFU/g vzorku, v porovnání s dětmi porozenými v řádném termínu, u kterých počty *Clostridium difficile* dosahovaly v průměru 5,06 logCFU/g (Penders, 2006).

3.3.2 Způsob porodu

Novorozenci porození císařským řezem, nedonošení nebo jedinci užívající antibiotika mají opožděnou bakteriální kolonizaci střev (Sýkora, 2006).

Děti porozené vaginálně mají odlišné složení mikrobioty ve srovnání s dětmi porozenými císařským řezem, mikrobiota kojených dětí se liší od dětí živěných kojeneckými mléky (Benno, 1984; Penders, 2006; Musilová et al., 2015).

Ve srovnání s vaginálním porodem, porod císařským řezem má za následek nižší kolonizaci rodem *Bifidobacterium*, zatímco převažují počty bakterií, jako jsou *Clostridium difficile* a *Escherichia coli* (Penders, 2006; Musilová et al., 2015).

V posledních 20 letech dochází celosvětově k znepokojivému nárůstu počtu císařských řezů. Před 2. světovou válkou nedosahovala frekvence císařského řezu 1 %. V současnosti je frekvence císařských řezů v USA nad 30 %, u nás dosáhla v roce 2011 téměř 25 % (Roztočil, 2008).

Při porodu císařským řezem se dítě rodí do sterilního prostředí, čímž nedochází k přirozené kolonizaci střev vlivem sliznic poševní mikrobioty matky. Operační porod tedy modifikuje kolonizaci střeva novorozence a následný vývoj slizniční mikrobioty (Gregora, 2013).

Ve studii, která porovnávala obsah bifidobakterií a laktobacilů ve stolici kojených dětí narozených vaginálně a císařským řezem (Chen et al., 2007), byly v prvních dnech po porodu zjištěny signifikantně vyšší hladiny bifidobakterií u dětí

porozených vaginálně než ve skupině dětí narozených císařským řezem. Zkoumala se stolice zdravých novorozenců narozených mezi 37. a 42. gestačním týdnem. Zatímco růst bifidobakterií byl císařským řezem negativně ovlivněn, rozvoj laktobacilů byl, zjevně vlivem kojení, na stejné úrovni jako u dětí porozených vaginálně (Chen et al., 2007).

Způsob porodu a výživy hraje nejdůležitější roli při vývoji střevní mikrobioty kojence (Wall et al., 2009; Biasucci et al., 2008; Martin et al., 2008). U vaginálně porozených dětí jsou střeva kolonizována především fekálními a vaginálními bakteriemi matky, zatímco střevní mikrobiota dětí narozených císařským řezem je osídlena převážně bakteriemi z nemocničního prostředí (Penders, 2006; Adlerberth, 2009; Biasucci et al., 2008; Butel et al., 2007). Novorozenci porození císařským řezem mají obecně nižší počty bakterií rodu *Bifidobacterium*, výrazně zredukované počty *Bacteroides fragilis* a výrazně vyšší počty *Clostridium difficile* než vaginálně porozené děti (Penders, 2006; Biasucci et al., 2008; Boehm et al., 2008). U kojenců narozených císařským řezem je růst bakterií rodu *Bacteriodes*, *Bifidobacterium* a *Escherichia coli* výrazně opožděný (Morelli, 2008; Butel et al., 2007).

3.3.3 Výživa matky v průběhu těhotenství

U matek, které dodržovaly zásady zdravého životního stylu a dávaly přednost biopotravinám, bylo zjištěno, že své děti kojilo 95% z nich. Na rozdíl od matek, které se stravovaly běžným způsobem, kojilo své děti pouze 59%, což naznačuje souvislost mezi mateřskou dietou, způsobem výživy kojence a složením mikrobioty kojence (Penders, 2006). Také bylo potvrzeno, že děti matek, které dodržovaly zásady zdravé životosprávy, měly ve střevní mikrobiotě nižší zastoupení *Escherichia coli* ve srovnání s ostatními dětmi (Penders, 2006).

3.4 Mateřské mléko a umělá kojenecká výživa

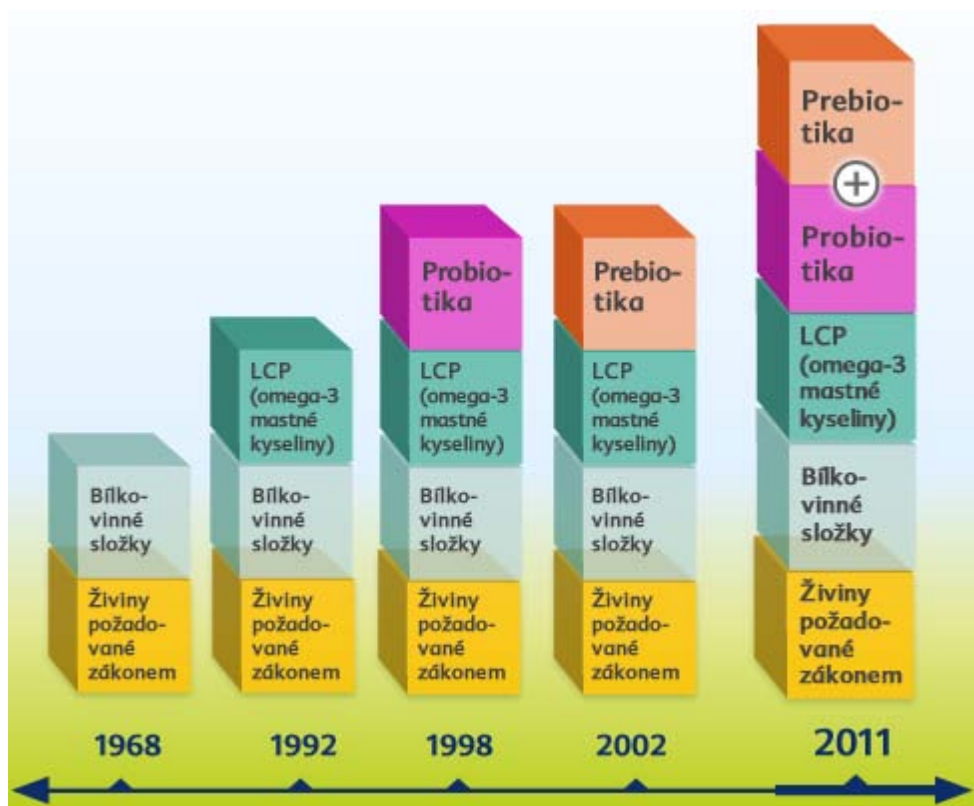
Mateřské mléko je nejvhodnější stravou pro dítě. Plně zajišťuje dávku potřebných živin a tekutin a svým složením nejlépe odpovídá individuálním fyziologickým potřebám novorozence. Mateřské mléko obsahuje prebiotickou složku, která upravuje pH ve střevech a podporuje funkci imunitního systému. Obecně, kojené děti trpí méně často infekcemi, alergiemi a jinými imunologickými poruchami. Mimo jiné se kojením utváří vztah mezi matkou a dítětem (Vincentová, 2006; Shaker, 2004).

Pokud z nějakého důvodu nemůže matka kojit, nahrazujeme mateřské mléko umělou výživou. Na trhu jsou k dispozici počáteční nebo pokračovací kojenecké výživy, které jsou doplněné o prebiotickou složku, která má pozitivní účinky na imunitní systém kojence. Tímto se výrobci umělých výživ snaží co nejlépe napodobit mateřské mléko. Na trhu je k dostání nespočet umělých kojeneckých výživ například: Nutrilon, Beba, Hami, Sunar a jiné (Vincentová, 2006; Shaker, 2004).

3.4.1 Historie výživy kojenců

První sušenou kojeneckou výživu vyrobil chemik Justus von Leibig v Německu roku 1860 (Stevens, 2009; Tláškal, 2008). Tato formule obsahovala kravské mléko, slad, pšeničnou mouku a hydrogenuhličitan draselný. Na konci 19. století byla vyvinuta první kompletní formule rozpustná ve vodě a během dalších let se objevovaly další různé kojenecké formule (Nevoral, 2006). Od minulého století až po současnost byl zaznamenán největší pokrok v rozvoji kojeneckých formulí. V polovině minulého století nastal výrazný útlum v kojení a umělá kojenecká výživa byla velmi podporována (Tláškal, 2008). Četná pozorování odhalila, že děti, které jsou kojené, lépe prospívají a jsou zdravější ve srovnání s dětmi živenými kojeneckou formulí (Tláškal, 2008). Postupem času se opět začala propagovat přirozená výživa, a to jak v porodnicích, tak u praktických lékařů. Vliv na tento vzestupný trend kojení měl i vznik občanského sdružení Laktační liga, která vznikla ve spolupráci s FAO a UNICEF, podporující program propagace kojení. V posledních desetiletí jsou umělé kojenecké výživy stále zkoumány a upravovány, aby se co nejvíce podobaly mateřskému mléku (Nevoral,

2006). Na obrázku číslo 1 je uveden postupný vývoj složení umělých kojeneckých formulí.



Obrázek č. 2 Historie vývoje kojeneckých formulí (zdroj oficiální stránky výrobců kojeneckých výživ)

3.4.2 Období výživy kojence dle studie Hrodek et al. (2002)

- Období výhradně mléčné výživy – do ukončeného 4. měsíce
Kojení nebo počáteční formule v množství 1/6 hmotnosti dítěte
- Období přechodné – od 4 do 6 měsíců
Zavádění příkrmů, popř. přechod na pokračující kojeneckou formuli
- Období smíšené stravy od ukončeného 6. měsíce do 12. měsíce
Pokračující formule a postupné zavádění vhodně upravené stravy

Tato období jsou stanovena na základě psychomotorického vývoje dítěte, funkční zralosti gastrointestinálního traktu a funkční schopností ledvin (Hrodek et al., 2002; Anonym 1)

Kravske mléko je využíváno jako základ pro výrobu kojeneckých formulí. Velmi vzácně jsou použita mléka jiných savců či rostlinné bílkoviny. Pro výrobu kojeneckých formulí je nutné adaptovat bílkovinu kravskeho mléka, upravuje se poměr syrovátkových bílkovin ku kaseinu z 2:8 na 1:1 nebo vyšší (Hrodek et al., 2002; Anonym 1).

3.4.3 Umělá kojenecká výživa

Podle světové zdravotnické organizace (WHO) a České pediatrické společnosti je preferováno výlučné kojení do věku 6 měsíců a poté současné kojení s postupným zaváděním příkrmů, pokud má matka dostatek mléka, doporučuje se pokračovat v kojení do 2 let i déle. Pokud dítě nemůže být nebo není kojeno, dostává jako náhradu mateřského mléka kojeneckou formuli (Hrodek et al., 2002; Anonym 1).

3.4.4 Rozdělení kojeneckých formulí

Složení kojeneckých výživ je přísně regulováno a každý výrobce musí dodržovat stanovené pokyny, které jsou ukotveny v souboru Codex Alimentarius (Forsythe, 2005). Všechny složky, které se přidávají do kojeneckých výživ, mají stanoveny minimální a maximální povolený obsah. Ošetření ionizujícím zářením je u kojeneckých formulí zakázáno, hlavně z důvodu zhoršení organoleptických kvalit (CAC, 2007; FAO, 2007). Vhodným zdrojem bílkovin jsou mléčné bílkoviny. Jednotlivé aminokyseliny mohou být přidány pro zlepšení nutričních hodnot, ale povoleny jsou pouze L-formy (Connolly et al., 2004). Komerčně upravované hydrogenované tuky a oleje nejsou povoleny. Je zakázáno přidávat do výživ fruktózu, z důvodu možného výskytu dědičné intolerance fruktózy u kojenců. Všechny komponenty kojenecké výživy musí mít zavedenou historii bezpečného užívání a musí být prospěšné při výživě novorozence (CAC, 2007). Požadovaný rozsah jednotlivých živin musí být zachován po celou dobu trvanlivosti výrobku (Akers et al., 2005).

V raném dětství je nejčastěji se vyskytující alergií alergie na mléko, vyskytuje se u 2%-3% dětí. Hlavní příčinou alergické reakce jsou proteiny přítomné v mléce (Català-Clariana et al., 2013; Monaci et al., 2010). Symptomy spojené s alergií na potraviny zahrnují reakci buď spojenou s aktivací imunoglobulinu (IgE), ty se projevují

výskytem například ekzému či sípání. Reakce, které nejsou spojeny s aktivací imunoglobulinu (non-IgE) se mohou projevat například v podobě ezofagitidy (Nutrition, 2000). Hypoalergenní kojenecká výživa je vyráběna pomocí enzymatické hydrolýzy, tím se denaturují intaktní proteiny a vytvoří se menší molekuly se změněným potenciálem (Chung et al., 2012; Kuba et al., 2013; Ragno et al., 1993). Hypoalergenní formule musí splňovat požadavky na výživu stejným způsobem jako standardní kojenecké výživy. Aby výrobek prokázal hypoalergenní účinky, musí prokázat negativní alergickou reakci u 90 % dětí s alergií na kravské mléko (Nutrition, 2000).

3.4.4.1 Počáteční kojenecké formule

Cílem počátečních kojeneckých formulí je docílit co největší podobnosti ve složení s mateřským mlékem. Nejčastěji se jako zdroj bílkoviny využívá bílkovina kravského mléka, použita může být i sójová bílkovina (jako příklad výživa Nutrilon 1 Soya). Je doporučeno snižovat konzumaci kojeneckých výživ na bázi sóji z důvodu potenciálně škodlivých účinků pro děti v důsledku přítomnosti fytoestrogenů (Badger et al., 2009; Bhatia et al., 2008).

Bílkoviny kravského mléka mohou být využity neupravené tj. s poměrem bílkovin syrovátky ke kaseinu 2 : 8 nebo může být bílkovina adaptovaná, tedy se změněným poměrem syrovátkových bílkovin a kaseinu. Počáteční kojenecké formule obsahují bílkovinu kravského mléka, laktózu, minerální látky, stopové prvky, vitamíny, tuky, polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Tato mléka mají upravené množství minerálních látek a jsou obohacena o vitamíny a stopové prvky. V tabulce č. 2 je uveden přehled používaných počátečních kojeneckých mléčných výživ v České republice. Tabulka č. 3 a č. 4 uvádí počáteční mléka určené pro speciální výživu kojenců. Jsou zde uvedeny mléka se sníženou schopností vyvolávat alergické reakce u dětí, mléka antirefluxní, mléka pro děti s nízkou porodní hmotností či děti nedonošených a přípravky se sníženým obsahem laktózy.

Tabulka č. 2 Přípravky počáteční kojenecké mléčné výživy používané v současné době v ČR

POČÁTEČNÍ KOJENECKÁ VÝŽIVA NA ZÁKLADĚ KRAVSKÉHO MLÉKA	
S adaptovanou bílkovinou (s převahou syrovátkových bílkovin)	S neadaptovanou bílkovinou (s převahou kaseinu)
<ul style="list-style-type: none"> • Sunar 1 Baby (obsahuje nukleotidy) • Sunar 1 Baby Premium (obsahuje LCP tuky, nukleotidy) • Hero Baby Lactum I (obsahuje LCP tuky, nukleotidy) • Hipp 1 (obsahuje probiotika – <i>Lactobacillus hereditum</i>) • Humana 1, Humana 1 extra (obsahuje rýžový škrob, dextriny) • Beba 1 Premium (obsahuje probiotika <i>B. animalis</i>) • Hami 1 (obsahuje prebiotika) • Nutrilon 1Premium (obsahuje prebiotika, nukleotidy, LCP tuky) • Nutrilon 1 Comfort (obsahuje prebiotika) • Amilk (obsahuje probiotika – <i>Bifidobacterium animalis</i>) • Babylove (obsahuje probiotika – <i>B. animalis</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Nutrilon 1 forte (obsahuje prebiotika, nukleotidy) • Hami 1 forte • (obsahuje prebiotika)

*LCP tuky - vícenenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem důležité pro rozvoj mozku
Tučně zvýrazněné obsahují probiotickou složku*

Tabulka č. 3 Speciální počáteční kojenecké výživy

PŘÍPRAVKY KOJENECKÉ VÝŽIVY SE SNÍŽENOU SCHOPNOSTÍ VYVOLÁVAT ALERGICKOU REAKCI		
Přípravky pro preventivní užití (s částečně rozštěpenou bílkovinou)	Přípravky pro léčebné použití s vysoce štěpenou bílkovinou	Léčebné přípravky na bázi aminokyselin
<ul style="list-style-type: none"> • Sunar H.A.1 • Hipp H.A.1 • Humana H.A.1 • Beba H.A.1Pr • Hami H.A.1 • Nutrilon H.A.1 	<ul style="list-style-type: none"> • Alfaré • Nutrilon 1 Allergy Care • Nutrilon Digestive Care 	<ul style="list-style-type: none"> • Neocate 1 -

Tabulka č. 4 Speciální počáteční kojenecké výživy 2 pokračování tabulky

MLÉKA ANTIREFLUXNÍ	MLÉKA PRO NEDONOŠENÉ DĚTI A DĚTI S NÍZKOU PORODNÍ HMOTNOSTÍ	PŘÍPRAVKY K OBOHACENÍ MATEŘSKÉHO MLÉKA	PŘÍPRAVKY SE SNÍŽENÝM MNOŽSTVÍM LAKTÓZY
<ul style="list-style-type: none"> • Nutrilon 1 A.R. • Beba 1 A.R. • Nutriton - přídavek do mateřského mléka 	<ul style="list-style-type: none"> • BEBA Alprem LC – PUFA • NutrilonNenatal LCP (NutrilonNenatal 0 pro děti do 2500 g a NutrilonNenatal 1 pro nedonošené děti do hmotnosti 4-5 kg) 	<ul style="list-style-type: none"> • FM 85 HumanMilk Fortifier • NutrilonNenatal BMF 	<ul style="list-style-type: none"> • Sunar Alidiar • AL 110 • NutrilonLowLactose

3.4.4.2 Pokračovací kojenecké formule

Pokračovací kojenecké formule jsou určeny pro děti od ukončeného 4. měsíce věku do 36. měsíce věku. Tabulka číslo 5 uvádí souhrn pokračovacích výživ využívaných v ČR.

Tabulka č. 5 Přípravky pokračovací kojenecké mléčné výživy používané v současné době v ČR

POKRAČOVACÍ KOJENECKÉ VÝŽIVY			
Pokračovací kojenecká výživa	Přípravky kojenecké výživy se sníženou schopností vyvolávat alergickou reakci		Mléka antirefluxová
	S částečně rozštěpenou bílkovinou	S vysoce štěpenou bílkovinou	
<ul style="list-style-type: none"> • Bohemilk • Sunar Plus • Sunar Premium • HERO Baby L2 • HIPP 2 • Humana 2 • BEBA 2 Premium • Hami 2 • Nutrilon 2 	<ul style="list-style-type: none"> • Sunar H.A. 2 • Hipp H.A. 2 • Humana H.A. 2 • Beba 2 H.A. Premium • Hami 2 H.A. • Nutrilon 2 H.A. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alfaré • Nutrilon 2 Allergy • Care 	<ul style="list-style-type: none"> • Beba 2 A.R. • Nutrilon 2 A.R.

3.5 Kojenecká výživa s probiotiky

Probiotika jsou stále častěji přidávána do kojeneckých výživ, z důvodu pozitivního vlivu na zdraví kojenců (FAO/WHO, 2001; Mugambi et al., 2012; Shah, 2007). Probiotika i prebiotika, pozitivně ovlivňující růst specifických mikroorganismů v gastrointestinálním traktu (Boehm et al., 2005), jsou v hojné míře přidávány do kojeneckých výživ a díky svým účinkům se staly jejich běžnou součástí (Kent et al., 2014). Výsledky studií umělých kojeneckých výživ s přidavkem probiotik a prebiotik, byly spojené se zvyšováním frekvence stolice, ovlivněním konzistence, zlepšením gastrointestinálního pohodlí dětí a byl zjištěn i pozitivní vliv na snižování výskytu alergií (Mugambi et al., 2012; Braegger et al., 2011). Byla zjištěna antimikrobiální aktivita některých kmenů *Lactobacillus*, inhibiční účinek byl testován proti *Cronobacter sakazakii*, bylo zjištěno, že antimikrobiální aktivita je významná, ale baktericidní účinky jsou silně termolabilní (Awaisheh et al., 2013). Řada studií též prokázala, že prebiotické složky mohou ovlivnit ulpívání v gastrointestinálním traktu (Hickey, 2012; Lane et al., 2010).

Tabulka č. 6 Přehled kojeneckých výživ s probiotiky a prebiotiky na trhu v ČR, počáteční mléka pro kojence 0-6 měsíců (zdroje oficiální stránky výrobců)

Název	Obsahuje
Nutrilon 1-Profutura	Směs prebiotických oligosacharidů s GOS/lcFOS 9:1
Nutrilon 1-Pronutra	Směs prebiotických oligosacharidů s GOS/lcFOS 9:1
Sunar 1 Complex	Galaktooligosacharidy
Beba Pro 1	Živé probiotické kultury <i>B. animalis</i> nebo <i>Lb.reuteri</i>
Beba HA 1	hypoalergenní, probiotická kultura Bifidus- <i>B. animalis</i>
Beba 1 Comfort	Probiotická kultura <i>Lb.reuteri</i>
Hami	směs GOS a FOS
HiPP AR BIO	Kultury mléčného kvašení izolované z mateřského mléka
HiPP HA 1 Combiotic	Směs probiotik
AmilkBifido	Bakterie mléčného kvašení <i>B. animalis</i>
Babylove	<i>Bifidobacterium animalis</i>

3.5.1 Probiotika

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele, pokud jsou aplikovány v přiměřeném množství (Saavedra, 2007).

Pro zařazení mezi probiotika musí jednotlivé bakteriální kmeny splňovat několik základních požadavků. Bakteriální kmeny musí mít prokazatelně pozitivní vliv na zdraví hostitele a musí být zdravotně nezávadné, izolované ze stejného živočišného druhu, jako je předpokládáný příjemce, nesmí být toxické ani patogenní. Forma, ve které je probiotikum do trávicího ústrojí aplikováno, musí obsahovat dostatečné množství životaschopných bakterií, které musí mít schopnost přežít v trávicím ústrojí a být metabolicky aktivní (Nevoral, 2005). Probiotické mikroorganismy by měli být odolné proti zpracování, odolné vůči působení žaludečních kyselin. Dále by měli mít schopnost ulpívat na střevní epitelové tkáni a kolonizovat ji (Guo, 2009). Probiotika jsou bezpečným doplňkem, neboť se jedná o komenzální nepatogenní mikroorganismy, některé patří i mezi léčiva (Mutaflor, Colifant New Born).

Probiotika a prebiotika jsou široce využívány jako doplňky v kojenecké výživě a mnohé studie potvrdily jejich účinnost při podpoře změny složení mikrobioty tím, že stimulují růst bifidobakterií (Saulnier et al., 2009) a tím by mohly přispět při léčbě a prevenci některých chorob (Parracho et al., 2007; O'Hara et al., 2007).

Tabulka č. 7 Působení probiotik (Sýkora, 2006)

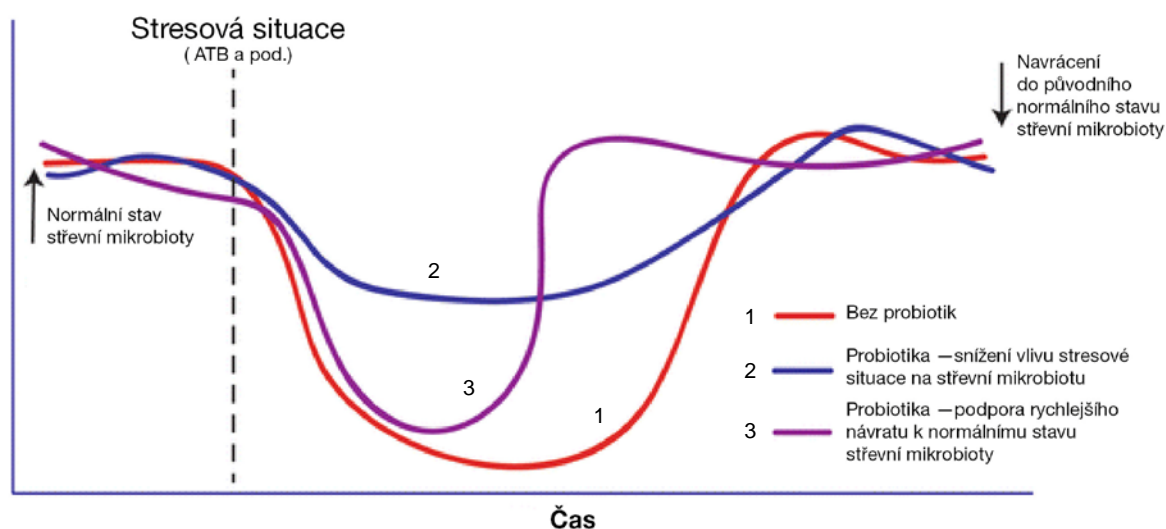
Mechanismus působení probiotik
Stabilizace střevní mikrobioty (kompetice s patogeny)
Produkce mastných kyselin (kyselina máselná)
Pokles pH
Ovlivnění rozpustnosti minerálních látek
Omezení zpětné resorpce žlučových kyselin
Antimikrobiální substance
Stabilizace střevní slizniční bariéry
Modifikace toxinů a toxinových receptorů
Imunomodulační účinky
Antikancerogeneze
Kompetitivní inhibice adheze patogenů

Probiotika jsou definovány jako živé organismy, které jsou podávány v přiměřeném množství a mají pozitivní zdravotní přínos pro lidský organismus (Anonym 2). Jako probiotika jsou nejčastěji využívány skupiny bakterií *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Parracho et al., 2007). Probiotika mohou zabránit v pronikání patogenů v lidském střevě tím, že zvyšují produkci mucinu, snižují propustnost střevní stěny, mohou uvolňovat antimikrobiální sloučeniny nebo se mohou podílet na modulaci imunitního systému (Saulnier et al., 2009). Několik studií prokázalo, že probiotické přípravky jsou bezpečné a účinné zejména při léčbě a prevenci průjemových onemocnění u dětí (Parracho et al., 2007; O'Hara et al., 2007; Puccio et al., 2007), čímž se snižuje riziko výskytu a závažnost nekrotizující enterokolitidy (O'Hara et al., 2007; Martin et al., 2008; Deshpande et al., 2007; Wang, 2004). Mohou být užitečné při zmírnění příznaků malabsorpce laktózy a při prevenci vzniku atopických onemocnění jako projev potravinových alergií u dětí (Parracho et al., 2007).

Bylo potvrzeno, že konzumace probiotik má řadu výhod pro lidské zdraví, mimo jiné hrají probiotika důležitou roli jako prevence při vzniku nekrotizující enterokolitidy u nedonošených dětí. (Lau et al., 2015) zlepšení stavu u kojenců s kolikou (Harb et al.,

2016), snížení doby trvání akutních průjemových onemocnění (Szajewska et al., 2013), prevence vzniku průjmů při antibiotické léčbě (Goldenberg et al., 2015).

Doposud bylo předpokládáno, že mechanismus účinku probiotik vyplýval z jejich schopnosti ovlivnit složení střevní mikrobioty. Nicméně, v nedávno publikovaných studiích bylo zjištěno, že dosud testovaná probiotika nemají podstatný vliv na celkovou kompozici střevní mikrobioty u dospělých, a že změna ve složení mikrobioty střev není hlavním mechanismem účinku (Kristensen et al., 2016). Metagenomické studie porovnávající složení mikrobioty před a po působení stresové situace s přidáním probiotik a bez přidání těchto doplňků, by mohla poskytnout pohled na schopnost probiotik podporovat zdraví prostřednictvím stabilizace hostitelské mikrobioty nikoli měnit složení (Kristensen et al., 2016). Probiotika by mohly podporovat homeostázu střevní mikrobioty, a tím být zdraví prospěšné (Kristensen et al., 2016). Obrázek č. 3 ukazuje vliv probiotik na homeostázu střevní mikrobioty.



Obrázek č. 3 Vliv probiotik na homeostázu střevní mikrobioty

Tabulka č. 8 Mezi nejčastěji používaná probiotika patří:

Bakterierodu <i>Lactobacillus</i>	Bakterierodu <i>Bifidobacterium</i>	Gram pozitivní koky	Ostatní mikroorganismy
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremonis</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>boulardii</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
<i>Lb. casei</i> <i>Shirota</i>	<i>B. animalis</i>	<i>S. diacetylactis</i>	
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>S. intermedius</i>	
<i>Lb. reuteri</i>	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i>	
<i>Lb. brevis</i>	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	<i>E. coli</i> (sérotyp 083:K24:H1)	
<i>Lb. cellobiosus</i>			
<i>Lb. curvatus</i>			
<i>Lb. fermentum</i>			
<i>Lb. plantarum</i>			

Tabulka č. 9 Probiotika dostupná na trhu (Společnost pro probiotika a prebiotika, o.s.):

Název	výrobce/ dovozce	Složení	KTJ / g(ml)
Biopron 9	VALOSUN	<i>Bifidobacterium bifidum, B. breve, B. longum, Lactobacillus acidophilus, Lb. casei, Lb. plantarum, Lb. rhamnosus, Lactococcus lactis subsp. lactis, Streptococcus thermophilus</i>	20 x 10 ⁹
Biopron Junior	VALOSUN	<i>Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, B. infantis</i>	3,6 x 10 ⁹
Bion3	Merck	<i>Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium longum</i>	10 ⁷
Bion3 Junior	Merck	<i>Lb. gasseri, B. longum a B. bifidum</i>	5 x 10 ⁶
Bion3 Senior	Merck	<i>Lb. gasseri, B. longum a B. bifidum</i>	1x 10 ⁷
Infant Dophilus	Pharma agency, s.r.o.	<i>Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium infantis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus</i>	5 x 10 ⁸
Bio Gaia kapky	Ewopharma	<i>Lactobacillus reuteri</i>	10 ⁸

Společnost pro probiotika a prebiotika, o.s. je multidisciplinární sdružení pracovníků různých oborů, kteří se zabývají výzkumem a aplikací probiotik a prebiotik (www.probiotika-prebiotika.cz).

Životaschopnost a množství probiotických bakterií by mohla být ovlivněna v průběhu zpracování potravinových doplňků, skladování a při způsobu užití (Saulnier et al., 2009). Proto by bylo vhodné kombinovat užívání probiotik s prebiotiky (Parracho et al., 2007).

3.5.1.1 Historie a taxonomie rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*

Druhy rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* jsou jedny z nejdůležitějších taxonů v potravinářské mikrobiologii a lidské výživě, vzhledem k jejich roli ve výrobě a konzervaci potravin a krmiv a také díky jejich probiotickým vlastnostem.

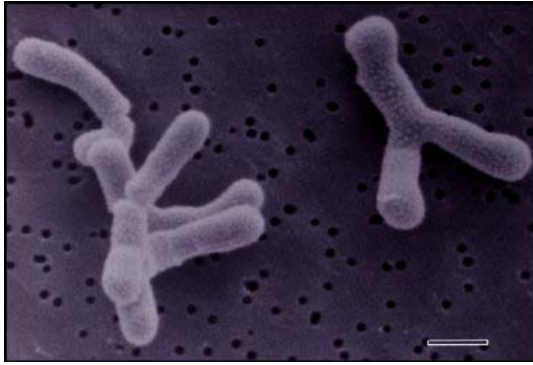
3.5.1.1.1 *Bifidobacterium*

Bakterie; *Actinobacteria*; *Actinobacteria*; *Actinobacteridae*; *Bifidobacteriales*; *Bifidobacteriaceae*

Druhy:

B. angulatum; *B. animalis*; *B. asteroides*; *B. bifidum*; *B. boum*; *B. breve*; *B. catenulatum*; *B. choerinum*; *B. coryneforme*; *B. cuniculi*; *B. dentium*; *B. gallicum*; *B. gallinarum*; *B. indicum*; *B. longum*; *B. magnum*; *B. merycicum*; *B. minimum*; *B. pseudocatenulatum*; *B. pseudolongum*; *B. psychraerophilum*; *B. pullorum*; *B. ruminantium*; *B. saeculare*; *B. scardovii*; *B. simiae*; *B. subtile*; *B. thermacidophilum*; *B. thermophilum*; *B. urinalis*.

Rod *Bifidobacterium* byl objeven roku 1899 francouzským vědcem Tissierem. Bifidobakterie jsou přirozenou součástí bakteriální flóry v lidském těle a mají symbiotické vlastnosti v trávicím traktu. Bifidobakterie podporují dobré trávení, posilují imunitní systém. Fermentují sacharidy za vzniku kyseliny mléčné a kyseliny octové, a tím snižují střevní pH (Reinert, 2002). Inhibují růst *Candida albicans*, *E. coli* a dalších patogenních bakterií.



Obrázek č. 4 – *Bifidobacterium adolescentis*



Obrázek č. 5 - Bifidobakterie na střevním epitelu

Bifidobakterie jsou gram-pozitivní, anaerobní polymorfní tyčinky. Vyskytují se jednotlivě, v řetězcích nebo ve shlucích. Nevytváří spory. Jsou chemoorganotrofní a vykazují negativní test katalázy s výjimkami *Bifidobacterium indicum* a *Bifidobacterium asteroides* (Biavati a Mattarelli, 2001). Bifidobakterie ve střevech fermentují sacharidy za vzniku kyseliny mléčné a kyseliny octové (Reinert, 2002).

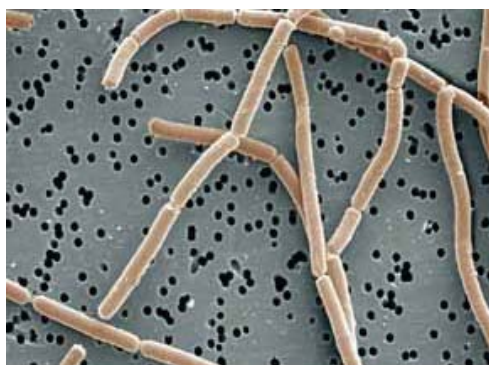
I přes to, že bifidobakterie jsou považovány za striktně anaerobní, existují některé druhy, které jsou schopny přežít i v přítomnosti kyslíku. Bylo prokázáno, že kmen *B.boum* a *B.thermophilum* dokáže dobře růst i při 20% koncentraci kyslíku (Kawasaki et al., 2006). Také bylo zjištěno, že i druh *B. animalis* subsp. *lactis* vykazuje toleranci ke kyslíku, který se vykytuje v okolním prostředí (Li et al., 2010, Meile et al., 1997). Tolerance k obsahu kyslíku je závislá na druhu bifidobakterií a některé druhy jsou tolerantní k obsahu kyslíku pouze v přítomnosti oxidu uhličitého (Ahn et al., 2001; Kawasaki et al., 2006; Meile et al., 1997; Shimamura et al., 1992).

3.5.1.1.2 *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* patří mezi bakterie mléčného kvašení. Tyto bakterie jsou schopné produkovat kyselinu mléčnou jako hlavní konečný produkt fermentace sacharidů (Garrity et al., 2004).

Lactobacillus jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní či mikroaerofilní tyčinky. Rod *Lactobacillus* patří do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řád *Lactobacillales*, čeleď *Lactobacillaceae* (Garrity et al., 2004). Nevytváří spory a vykazuje negativní test katalázy. Fylogeneticky nejbližší čeleď se zdá být *Leuconostoc*, *Oenococcus* a *Weissella* (Hammes et Hertel, 2003).

Byl zkoumán vliv probiotik na snížení cholesterolu v séru a snížení rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Richardson et Eggersdorfer, 2015). Konkrétně byl sledován vliv laktobacilů a bifidobakterií na snížení hladiny cholesterolu v séru (Liong et Shah, 2005; Kumar et al., 2011). Nedávné výzkumy (Ha et al, 2006; Park et al, 2007) byly zaměřeny hlavně na rod *Lactobacillus*. Bylo prokázáno, že dlouhodobá konzumace výrobků, které obsahují dostatečně velké množství aktivních bakterií mléčného kvašení, může snížit hladinu cholesterolu v séru (Nguyen et al., 2007; Lye et al., 2010). Výsledky některých studií nevykazovaly tak značný vliv, pravděpodobně jsou tyto zdravotní benefity závislé i na jiných faktorech jako jsou druhová specifičnost probiotických bakterií, způsob stravování a celkový životní styl pacienta (Hongpattarakere et al., 2012; Jones et al., 2014; da Silva Sabo et al., 2015; Zhao et al., 2015).



Obrázek č. 6 – *Lactobacillus bulgaricus*

3.5.2 Prebiotika

Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy, které mají schopnost selektivně stimulovat růst bifidobakterií a laktobacilů (Saulnier et al., 2009, Parracho et al., 2007). Fruktooligosacharidy (FOS) a galaktooligosacharidy (GOS) bývají často využívány jako prebiotikum a přidávají se do kojeneckých výživ (Parracho et al., 2007) Podávání prebiotik je spojováno s ovlivněním fekálního pH a změnami ve struktuře mastných kyselin s krátkým řetězcem (Boehm et al., 2008) a tím dochází ke zlepšení vstřebávání minerálních látek a podpoře látkové výměny (Saulnier et al., 2009). Mimo jiné, by prebiotika mohly ovlivňovat složení střevní mikrobioty a hrát roli ve vývoji imunitního systému novorozenců (Saulnier et al., 2009; Boehm et al., 2008). V některých studiích bylo prokázáno, že prebiotika zvyšovala počty bifidobakterií ve střevech novorozenců (Saulnier et al., 2009).

3.5.2.1 Probiotika a prebiotika v kojeneckých formulích

Střevní mikrobiota kojených a uměle živených dětí se výrazně liší, proto je snaha obohacovat umělé kojenecké výživy tak, aby se složením co nejvíce podobaly mateřskému mléku. Zároveň je žádoucí, aby se střevní mikrobiota uměle živených dětí co nejvíce podobala mikrobiotě dětí kojených mateřským mlékem (Šráčková, 2005).

Tabulka č. 10 Přehled prebiotik na trhu

Název	Složení	Zařazení
InPure	BIO inulín, sorbitol, extract artyčoku, citrusová vláknina, Mikrokrytalická celulóza, amaranthová vláknina, extract ostropestřce mariánského, stearan hořečnatý, NeOpuntia, violka trojbarevná, BIO aloe vera	prebiotikum
BABIO Dětský mléčný cukr - BIO granulovaný	BIO laktóza, BIO inulín	prebiotikum
BABIO jahoda BIO dětský gran. čaj	BIO laktóza, BIO inulín, BIO jahodový prášek, BIO extract meduňky, BIO extract ibišku	prebiotikum
BABIO Jablko banán BIO dětský gran. čaj	BIO laktóza, BIO inulín, BIO jablečný prášek, BIO extract meduňky, BIO banánový prášek	prebiotikum
BABIO Konejšivý BIO dětský gran. čaj	BIO laktóza, BIO inulín, BIO extract meduňky, BIO extract květulípy, BIO extract máty	prebiotikum
BABIO Fenykl dětský gran. čaj BIO	BIO laktóza, BIO inulín, BIO extract plodu fenyklu	prebiotikum
IontiaPrebio	Instantní rýžový škrob, glukóza, citronan sodný, inulín, chloride sodný, chloride draselný, zázvorový extrakt	prebiotikum
Čajánek Fenyklový	laktóza, fenyklový extrakt, inulín, kmínový extrakt, fenyklová silice	prebiotikum
Čajánek Mrvánek	laktóza, sušený mrkvový prášek, inulín, extrakt z květu heřmánku, β -karoten, vitamín C	prebiotikum
Čajánek	laktóza, sacharóza, inulín, extrakt z majoránky, sušená švestková dřev,	prebiotikum
Blažené břicho	Sušená meruňková dřev, sušená jablečná dřev, extrakty z artyčoku	prebiotikum

3.5.3 Synbiotika

Vhodná kombinace probiotik a prebiotik se nazývá synbiotikum. Synbiotika mohou pozitivně ovlivňovat střevní mikrobiotu, obsahem prospěšných bakterií a současně jsou schopny selektivně stimulovat růst endogenních bakterií jako například bifidobakterií (Parracho et al., 2007; Puccio et al., 2007).

3.6 Lyofilizace bakterií

Průmyslové využití probiotických i obecně bakterií mléčného kvašení je závislé na jejich technologických vlastnostech, na koncentraci života schopných buněk a na technologii konzervace (Conrad et al., 2000; Carvalho et al., 2003; Fonseca et al., 2004; Rault et al., 2007). Zmrazení a lyofilizace se běžně využívají pro konzervaci a skladování startovacích kultur používaných v mléčném průmyslu. Nešetrné nebo nesprávné provedení těchto technik může mít za následek narušení membrány buněk, denaturaci bílkovin a enzymů, anebo poškodit DNA (Meng et al., 2008; Meng et al., 2008; Stummer et al., 2012). Důležité pro přípravu bakteriálních kultur, které by měly obsahovat vysoký počet životaschopných buněk a měly by mít dobrou životnost při skladování, patří tvar a velikost buněk, genetické složení, složení buněčných membrán, ale i růstové podmínky, použité sušící médium či podmínky uchování (Carvalho et al., 2004). Bylo prokázáno, že odolnost během sušení a zmrazení je kmenově specifická (Strasser et al., 2009; Siaterlis et al., 2009). Buňky využívané pro lyofilizaci jsou sbírány nejčastěji v průběhu stacionární fáze růstu, protože bylo dokázáno, že v této fázi jsou méně citlivé na podmínky okolního prostředí v porovnání s těmi buňkami, které byly odebrány ve fázi exponenciální (Daly et al., 1998; Morgan et al., 2006). Médium, které se využívá k sušení buněk, obsahuje prostředky pro ochranu před zmrazením, například dextran, sacharóza, laktóza, glukóza, sorbitol, glycerol, proteiny, sušené odstředěné mléko. Bylo prokázáno, že tyto ochranné prostředky jsou účinné při zlepšení přežívání bakterií v průběhu sušení a následného skladování (Hubalek, 2003; Ming et al., 2009; Savini et al., 2010), účinnost je dána hlavně tím, že dochází k inhibici intracelulární tvorbě ledových krystalků, proto nedochází k poškození membrán ani denaturaci proteinů. Několik studií (Carvalho et al., 2004; Higl et al., 2007; Katarzyna et al., 2009) prokázalo, že rekonstituované sušené odstředěné mléko se zdá být jako vhodné sušící médium pro některé druhy bakterií.

4 Metoda a materiál

4.1 Hodnocené vzorky

4.1.1 Vzorek číslo 1 BEBA OPTIPRO 1

Instantní počáteční mléčná kojenecká výživa s bakteriemi Bifidus B_L BEBA OPTIPRO 1. Bifidus B_L je komerční označení výrobce, použitý probiotický bakteriální kmen je u této výživy *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Výrobci často uvádějí neúplné či nesprávné názvy použitých probiotických bakterií. Také se na obalech často vyskytuje nesprávné tvrzení, že bifidobakterie jsou bakterie mléčného kvašení. Toto tvrzení není zcela správné, protože bifidobakterie produkují jako hlavní konečný produkt fermentace vedle kyseliny mléčné i kyselinu octovou.

Popis výrobce:

- Obsahuje Bifidus B_L (Bakterie mléčného kvašení)
- Bifidus B_L jsou bakterie podobné těm, které se nacházejí v trávicím traktu kojeneckých dětí. V jedné porci BEBA OPTIPRO 1 se nachází přibližně 129 miliónů bakteriálních buněk.

Doporučení výrobce:

- Uchovejte v suchu při pokojové teplotě.
- Spotřebujte do 3 týdnů od otevření.

4.1.2 Vzorek 2 Hipp Bio Combiotic

První kojenecké mléko Hipp Bio Combiotic s obsahem probiotik. *Lactobacillus fermentum hereditum*® je komerční označení výrobce, použitý probiotický bakteriální kmen je u této výživy *Lactobacillus fermentum*.

Popis výrobce:

- Obsahuje přírodní kulturu mléčného kvašení (*Lactobacillus fermentum hereditum*®¹)

Doporučení výrobce:

- Uchovejte v suchu při pokojové teplotě a zamezte kolísání teplot.
- Spotřebujte do 3 týdnů od otevření obalu.
- Aby nedošlo k poškození přírodních kultur mléčného kvašení (Laktobacily), nepřelévejte výrobek příliš horkou vodou.

4.1.3 Vzorek 3 Amilk Bifido®

Počáteční mléčná kojenecká výživa Amilk Bifido®, výživa obsahuje probiotické bakterie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Popis výrobce, že výrobek obsahuje bakterie mléčného kvašení, není zcela správný, protože bifidobakterie produkují jako hlavní konečný produkt fermentace vedle kyseliny mléčné i kyselinu octovou.

Popis výrobce:

- Obsahuje bakterie mléčného kvašení (*Bifidobacterium lactis*),

Doporučení výrobce:

- Uchovejte v suchu při pokojové teplotě.
- Spotřebujte do 3 týdnů od otevření.

4.1.4 Vzorek 4 Babylove

Babylove počáteční kojenecká výživa v prášku v BIO kvalitě. Použitý probiotický bakteriální kmen je u této výživy *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Jako u předchozích vzorků i zde je uvedeno nesprávné tvrzení, že výživa obsahuje bakterie mléčného kvašení.

Popis výrobce:

- bakterie mléčného kvašení (*Bifidobacterium lactis*),

Doporučení výrobce:

- Skladujte v chladu, suchu a hygienicky.
- Otevřený sáček dobře uzavřete a spotřebujte v průběhu 2-3 týdnů.



Obrázek č. 7 Testované kojenecké výživy - vzorek 1-4

4.2 Skladování vzorků

Vzorky byly skladovány v rozdílných podmínkách po dobu několika měsíců. Periodicky po šesti týdnech byl u vzorků prováděn mikrobiologický rozbor a byl zjišťován počet probiotických bakterií.

Vzorky byly skladovány v otevřených a uzavřených nádobách při různých teplotách. Teploty skladování byly 4°C, kdy byly vzorky uchovávány v lednici, při pokojové teplotě 18°C a v termostatu při 37°C. Vzorky nebyly vystaveny přímému slunci.

4°C otevřená nádoba
4°C uzavřená nádoba
18°C otevřená nádoba
18°C uzavřená nádoba
37°C otevřená nádoba
37°C uzavřená nádoba

4.3 Odebírání vzorků

Jeden gram vzorku kojenecké výživy byl odebrán do penicilínky s ředící řadou. Ta byla dobře utěsněna a obsah zkumavky lehce promíchán tak, aby byl celý vzorek rozpuštěn v tekutině.

4.4 Mikrobiologický rozbor umělých kojeneckých mlék

4.4.1 Příprava a složení kultivačních medií

Wilkins-Chalgren anaerobe agar (Oxoid, UK)

Univerzální neselektivní půda, pro stanovení celkových počtů anaerobních bakterií. Hodnota pH je $7,1 \pm 0,2$ (Oxoid, UK).

Složení:

- Trypton 10 g
- Pepton 10 g
- Kvasniční extrakt 5 g
- Glukóza 1 g
- Chlorid sodný 5 g
- L – arginin 1 g
- Pyruvát sodný 1 g
- Menadion 0,0005 g
- Haemin 0,005 g

Do 100 ml destilované vody bylo naváženo 4,3g Wilkins-Chalgren agaru, 0,5g sojového peptonu, 0,05g cysteinu a 0,1ml tweenu. Nádoba se směsí byla dobře promíchána, utěsněna zátkou a uložena ke sterilizaci do autoklávu na 121°C po dobu 15 minut.

Wilkins-Chalgren anaerobe agar (Oxoid, UK) s přidáním Mupirocinu (Oxoid, UK)

Agar pro stanovení rodu *Bifidobacterium* s přidáním antibiotika mupirocinu

- Wilkins-Chalgren agar 4,3 g
- Sojový pepton 0,5 g
- Cystein 0,05 g
- Tween 0,1 ml
- Destilovaná voda 100 ml
- Mupirocin

Do 100 ml destilované vody bylo naváženo 4,3g Wilkins-Chalgren (Oxoid, UK) agaru, 0,5g sojového peptonu, 0,05g cysteinu a 0,1ml tweenu. Nádoba se směsí byla

dobře promíchána, utěsněna zátkou a uložena do lázně, kde byla rozvážena po dobu 20 minut. Po vytemperování na 50°C byl přidán mupirocin o koncentraci 100 mg/l.

Rogosa agar (Oxoid, UK)

Pro kultivaci bakterií rodu *Lactobacillus*. Hodnota pH agaru je 5,4.

Složení:

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

Přesně navážené množství 82 g se rozpustí v 1000 ml destilované vody.

4.4.2 Příprava ředící řady a ředění vzorku

Ředící řady využíváme k dosažení potřebného naředění vzorku.

Na přípravu ředící řady je třeba navázat:

- 900 ml destilované vody
- 4,5 g trypton
- 4,5 g nutrient broth
- 2,5 g extraktu z kvasnic
- 0,45 ml tweenu
- 0,225 g cysteinu

Takto připravená směs byla rozvářena po dobu 10-20 minut. Dobře rozvářená tekutina byla nadávkována po 9ml do sterilních penicilínek, a poté vložena do lázně s destilovanou vodou na 10 minut při 100°C.

Po vytažení z lázně, byl obsah penicilínek probublán kolonou. Penicilínky byly utěsněny špuntem a kovovým víčkem a vloženy do autoklávu ke sterilaci na 15 minut při 120°C.

Do penicilínky ředící řady se odebere 1 g umělé kojenecké výživy. Penicilínka byla poté řádně utěsněna a byl v ní promíchán obsah. Vznikne tak ředění 10^{-1} . Dále se z tohoto ředění odebere 1ml tekutiny a přenesse se do další penicilínky, vznikne tak ředění 10^{-2} . Takto se postupuje až do ředění 10^{-9} . Při ředění vzorku je třeba pracovat asepticky a používat sterilních nástrojů, aby nedošlo k ovlivnění koncentrací a kontaminaci vzorku.



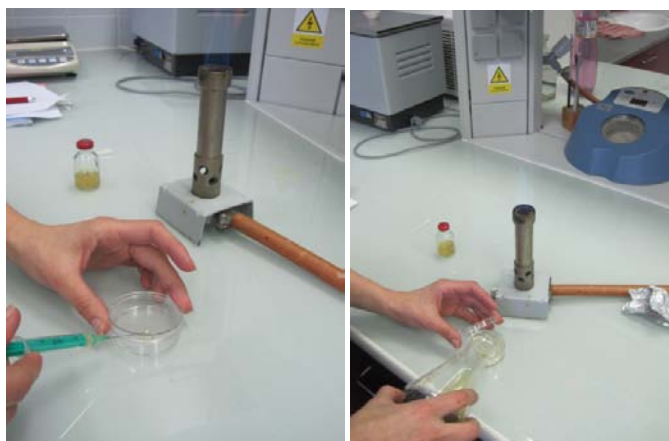
Obrázek č. 8 Ředící řada se vzorkem (vlastní fotodokumentace)

4.4.3 Mikrobiologický rozbor umělé kojenecké výživy

Na mikrobiologický rozbor kojeneckých formulí je třeba připravit:

- Ředící řady se vzorkem
- Kultivační media- agary
- Petriho misky
- Sterilní injekční stříkačky, jehly
- Plynový kahan
- Anaerostat (Oxoid, UK)

Na mikrobiologický rozbor byly připraveny a popsány Petriho misky. Na misky bylo zaočkováváno jednou injekční stříkačkou od nejvyššího ředění (10^{-8}) po 0,5ml ředící řady dané koncentrace. Ihned po zaočkování byly misky zality kultivačním médiem. Misky byly ihned uzavřeny a uloženy do anaerostatů, ve kterých bylo vytvořeno anaerobní prostředí. Toto prostředí bylo vytvořeno odčerpáním vzdušného kyslíku a nahrazením jinými plyny (vodíkem a oxidem uhličitým). Vzduchotěsně uzavřené anaerostaty s řízenou atmosférou byly uloženy do termostatů, kde dochází ke kultivaci ($37^{\circ}\text{C}/48\text{hod}$). Misky určené ke kultivaci rodu *Lactobacillus* byly po ztuhnutí první vrstvy agarů zality znovu, aby bylo vytvořeno mikroaerofilní prostředí. Po druhém zalití byly uloženy do termostatu ke kultivaci při 37°C po dobu 48 hodin.



Obrázek č. 9 Zaočkování a přelití agarem (Oxoid, UK)



Obrázek č. 10 Anaerostat

4.5 Vyhodnocení počtu kolonií

Po kultivaci byly spočítány kolonie ve všech ředěních a na všech živných médiích. Desková metoda stanovení počtu bakterií vychází z předpokladu, že z jedné životaschopné buňky vyroste jedna kolonie.

Po inkubaci vyrůstají mikroorganismy na pevných živných médiích ve formě kolonií, což jsou útvary vzniklé pomnožením jedné buňky nebo shluku dvou či více od sebe neoddělitelných buněk. Narostlé kolonie obsahují 10^7 - 10^9 buněk a mohou být poměrně rozmanitých tvarů i velikostí.

K vyhodnocování výsledků se vždy vybírají jen Petriho misky z těch ředění, kde je množství kolonií dobře počítatelné, kde nejsou kolonie vzájemně přerostlé, slité či jinak nepřehledné.

Při vyjadřování počtu mikroorganismů ve vzorcích se obvykle používá výrazu CFU/g či CFU/ml. Počet CFU značí "počet jednotek tvořících kolonie" (Colony Forming Units) a používá se z několika důvodů. Je nutno si uvědomit, že ne z každé buňky ve vzorku naroste skutečně kolonie - kultivačními metodami obecně nelze nikdy zachytit absolutně veškeré přítomné mikroorganismy. Na druhé straně některé kolonie mohou vyrůst nikoliv z jediné buňky, ale z více neoddělitelných buněk, proto se nikdy výsledný počet mikroorganismů ve vzorku, zjištěný kultivační metodou, nevyjadřuje jako „počet buněk“, ale jako počet CFU. Českým ekvivalentem výrazu CFU je KTJ (kolonie tvořící jednotky).



Obrázek č. 11 Vyhodnocení počtu kolonií

5 Výsledky

Výsledný počet mikroorganismů v závislosti na době a podmínkách skladování

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí statistické analýzy rozptylu pomocí STATGRAPHICS Centurion XV.II (Manugistics, Rockville, MD, USA) s pravděpodobností na 95 %. Analýzou bylo zjištěno, že se počty probiotických bakterií u jednotlivých vzorků výživ statisticky významně liší.

Byly zkoumány vzorky čtyř kojeneckých výživ s probiotiky, u kterých byly stanoveny počty těchto mikroorganismů. Byl pozorován vliv času a způsobu skladování na schopnost přežívání probiotických mikroorganismů. Vzorky byly vyhodnoceny na začátku skladování, dále po 6, 12 a u vzorku číslo 1 i po 18 týdnech.

Tabulky č. 11 a č. 12 uvádějí množství bakterií (\log KTJ/g \pm směrodatná odchylka) v závislosti na způsobu skladování, tabulka č. 11 uvádí počty bakterií u jednotlivých vzorků skladovaných po dobu 6 týdnů a tabulka č. 12 po dobu 12ti týdnů. V tabulce č. 11 se množství mikroorganismů výrazně neliší, větší rozdíly byly stanoveny až v rozbořech po 12 týdnech, výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 12. Ze získaných výsledků lze konstatovat, že obecně vyšší množství mikroorganismů bylo stanoveno u vzorků, které byly uchovávány v uzavřených nádobách, kdy docházelo k omezenému přístupu vzduchu, u otevřených nádob přístup vzduchu pravděpodobně negativně ovlivnil přežívání probiotických bakterií.

Nejnižší množství bylo stanoveno u vzorku 2, který obsahoval bakterie rodu *Lactobacillus*, a to $4,74 \pm 0,11 \log$ KTJ/g po 12 týdnech skladování v otevřené nádobě při teplotě 18°C (Tabulka č. 12). Naopak nejvyšší množství bylo zjištěno u vzorku 1, který obsahoval probiotické bakterie *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*, a to v množství $7,22 \pm 0,02 \log$ KTJ/g po 12ti týdnech skladování v zavřené nádobě při teplotě 37°C (Tabulka č. 12).

Tabulka č. 11 Množství bakterií (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) v závislosti na způsobu skladování po dobu 6 týdnů u jednotlivých vzorků.

Způsob skladování	4°C otevřená nádoba	4°C zavřená nádoba	18°C otevřená nádoba	18°C zavřená nádoba	37°C otevřená nádoba	37°C zavřená nádoba
Vzorky výživ						
Vzorek 1	7,28 ± 0,03 ^d	7,14 ± 0,07 ^d	7,10 ± 0,06 ^c	7,23 ± 0,02 ^d	7,03 ± 0,05 ^b	7,29 ± 0,07 ^d
Vzorek 2	6,34 ± 0,13 ^a	6,51 ± 0,02 ^{bc}	6,62 ± 0,02 ^c	6,44 ± 0,03 ^{ab}	6,46 ± 0,05 ^b	6,43 ± 0,16 ^{ab}
Vzorek 3	7,02 ± 0,04 ^{ab}	7,32 ± 0,05 ^c	6,95 ± 0,10 ^a	7,04 ± 0,10 ^{ab}	7,07 ± 0,09 ^b	7,05 ± 0,12 ^{ab}
Vzorek 4	6,85 ± 0,06 ^a	7,26 ± 0,02 ^c	6,85 ± 0,04 ^a	7,04 ± 0,05 ^b	6,81 ± 0,02 ^a	7,25 ± 0,05 ^c

Hodnoty v rádcích s různými indexy se statisticky významně liší.
Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.
S pravděpodobností na 95 %

Tabulka č. 12 Množství bakterií (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) v závislosti na způsobu skladování po dobu 12 týdnů u jednotlivých vzorků.

Způsob skladování	4°C otevřená nádoba	4°C zavřená nádoba	18°C otevřená nádoba	18°C zavřená nádoba	37°C otevřená nádoba	37°C zavřená nádoba
Vzorky výživ						
Vzorek 1	6,46 ± 0,37 ^a	7,11 ± 0,06 ^{cd}	7,08 ± 0,03 ^{bcd}	7,05 ± 0,02 ^{bcd}	6,91 ± 0,04 ^b	7,22 ± 0,02 ^d
Vzorek 2	-	-	4,74 ± 0,11 ^a	5,18 ± 0,06 ^c	4,95 ± 0,04 ^b	5,33 ± 0,06 ^c
Vzorek 3	-	6,00 ± 0,09 ^b	5,76 ± 0,09 ^a	6,39 ± 0,07 ^d	6,33 ± 0,03 ^d	6,22 ± 0,09 ^c
Vzorek 4	6,68 ± 0,08 ^c	7,07 ± 0,04 ^d	5,42 ± 0,13 ^a	6,32 ± 0,13 ^b	-	-

Hodnoty v rádcích s různými indexy se statisticky významně liší.
Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.
S pravděpodobností na 95 %

Změny počtu mikroorganismů u jednotlivých vzorků

U vzorku 1 jako u jediného bylo stanoveno pro analýzu dostatečné množství mikroorganismů i po 18ti týdnech skladování. I když byl využit stejný probiotický kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* jako u vzorků 3 a 4. Jsou zde patrné rozdíly v přežívání v závislosti na podmínkách skladování. Rozdíly by pravděpodobně mohly být zapříčiněné způsobem zpracování mikroorganismů při výrobě.

Při skladování vzorků v uzavřených nádobách nebyly stanoveny téměř žádné statisticky významné rozdíly, počty mikroorganismů byly relativně stabilní. Až po 18ti týdenním skladování zde byly zjištěny statisticky významné rozdíly, výsledky byly vyhodnoceny analýzou rozptylu pomocí STATGRAPHICS Centurion XV.II (Manugistics, Rockville, MD, USA) a jsou uvedeny v tabulce č. 13. Pouze u vzorku, který byl skladován v otevřené nádobě při 4°C nebyly stanoveny žádné životaschopné mikroorganismy, pravděpodobně to bylo zapříčiněno přístupem vzduchu a možnou zvýšenou vlhkostí.

Tabulka č. 13 Změny počtu probiotických bakterií (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) v čase během podmínek skladování u vzorku č. 1.

Vzorek 1	Rozbor 0	Po 6 týdnech	Po 12 týdnech	Po 18 týdnech
4°C otevřená nádoba	7,09 ± 0,04 ^b	7,28 ± 0,03 ^b	6,46 ± 0,37 ^a	--
4°C zavřená nádoba	7,09 ± 0,04 ^b	7,14 ± 0,07 ^b	7,11 ± 0,06 ^b	6,84 ± 0,02 ^a
18°C otevřená nádoba	7,09 ± 0,04 ^b	7,10 ± 0,06 ^b	7,08 ± 0,03 ^b	6,82 ± 0,03 ^a
18°C zavřená nádoba	7,09 ± 0,04 ^b	7,23 ± 0,02 ^d	7,05 ± 0,02 ^b	6,96 ± 0,03 ^a
37°C otevřená nádoba	7,09 ± 0,04 ^c	7,03 ± 0,05 ^b ^c	6,91 ± 0,04 ^b	6,02 ± 0,18 ^a
37°C zavřená nádoba	7,09 ± 0,04 ^b	7,29 ± 0,07 ^c	7,22 ± 0,02 ^c	6,84 ± 0,09 ^a

Hodnoty v rádcích s různými indexy se statisticky významně liší.
 Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.
 S pravděpodobností na 95 %

Ve vzorku 2 docházelo k výraznějšímu snižování počtu mikroorganismů při skladování v otevřených nádobách. Nejnižší počty laktobacilů byly zjištěny v otevřené nádobě, která byla skladována při teplotě 18°C ($4,74 \pm 0,11$ log KTJ/g). U vzorku, který byl skladován při 4°C nebyly stanoveny žádné životaschopné mikroorganismy, pravděpodobně to bylo zapříčiněno přístupem vzduchu a možnou zvýšenou vlhkostí, pravděpodobně použitý kmen *Lactobacillus* byl velmi citlivý na podmínky skladování. Výsledky vyhodnocené analýzou rozptylu pomocí STATGRAPHICS Centurion XV.II (Manugistics, Rockville, MD, USA) jsou uvedeny v tabulce č. 14.

Tabulka č. 14 Změny počtu probiotických bakterií (log KTJ/g \pm směrodatná odchylka) v čase během podmínek skladování u vzorku č. 2.

Vzorek 2	Rozbor 0	Po 6 týdnech	Po 12 týdnech
4°C otevřená nádobá	$6,51 \pm 0,03^b$	$6,34 \pm 0,13^a$	-
4°C zavřená nádobá	$6,51 \pm 0,03^a$	$6,51 \pm 0,02^a$	-
18°C otevřená nádobá	$6,51 \pm 0,03^a$	$6,62 \pm 0,02^b$	$4,74 \pm 0,11$
18°C zavřená nádobá	$6,51 \pm 0,03^b$	$6,44 \pm 0,03^a$	$5,18 \pm 0,06$
37°C otevřená nádobá	$6,51 \pm 0,03^a$	$6,46 \pm 0,05^a$	$4,95 \pm 0,04$
37°C zavřená nádobá	$6,51 \pm 0,03^a$	$6,43 \pm 0,16^a$	$5,33 \pm 0,06$

Hodnoty v rádcích s různými indexy se statisticky významně liší.
Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.
S pravděpodobností na 95 %

U vzorku 3 byly počty probiotických bakterií po 6 týdnech relativně podobné, statisticky významné rozdíly byly stanoveny až při skladování po 12 týdnech. Výsledky analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 15. Nejnižší množství bylo stanoveno u vzorku, který byl skladován při teplotě 18°C v otevřené nádobě a to $5,76 \pm 0,09$ log KTJ/g. Jako u předchozích vzorků u skladování v otevřené nádobě při 4°C nebyly stanoveny žádné životaschopné mikroorganismy.

Tabulka č. 15 Změny počtu probiotických bakterií (log KTJ/g \pm směrodatná odchylka) v čase během podmínek skladování u vzorku č.3.

Vzorek 3	Rozbor 0	Po 6 týdnech	Po 12 týdnech
4°C otevřená nádoba	$7,43 \pm 0,12^b$	$7,02 \pm 0,04^a$	-
4°C zavřená nádoba	$7,43 \pm 0,12^b$	$7,32 \pm 0,05^b$	$6,00 \pm 0,09^a$
18°C otevřená nádoba	$7,43 \pm 0,12^c$	$6,95 \pm 0,10^b$	$5,76 \pm 0,09^a$
18°C zavřená nádoba	$7,43 \pm 0,12^c$	$7,04 \pm 0,10^b$	$6,39 \pm 0,07^a$
37°C otevřená nádoba	$7,43 \pm 0,12^c$	$7,07 \pm 0,09^b$	$6,33 \pm 0,03^a$
37°C zavřená nádoba	$7,43 \pm 0,12^c$	$7,05 \pm 0,12^b$	$6,22 \pm 0,09^a$

Hodnoty v rádcích s různými indexy se statisticky významně liší.
Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.
S pravděpodobností na 95 %

I u vzorku 4 byly počty probiotických bakterií po 6 týdnech relativně stabilní, statisticky významné rozdíly byly stanoveny až při skladování po 12 týdnech. Nejnižší množství bylo zjištěno u vzorku, který byl skladován při teplotě 18°C v otevřené nádobě a to $5,42 \pm 0,13 \log \text{KTJ/g}$. U tohoto vzorku nebyly stanoveny žádné životaschopné mikroorganismy při skladování po dobu 12 týdnů při teplotě 37°C bez ohledu na přístup vzduchu, výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 16.

Tabulka č. 16 Změny počtu probiotických bakterií (log KTJ/g \pm směrodatná odchylka) v čase během podmínek skladování u vzorku č.4.

Vzorek 4	Rozbor 0	Po 6 týdnech	Po 12 týdnech
4°C otevřená nádobá	$7,22 \pm 0,04^c$	$6,85 \pm 0,06^b$	$6,68 \pm 0,08^a$
4°C zavřená nádobá	$7,22 \pm 0,04^b$	$7,26 \pm 0,02^b$	$7,07 \pm 0,04^a$
18°C otevřená nádobá	$7,22 \pm 0,04^c$	$6,85 \pm 0,04^b$	$5,42 \pm 0,13^a$
18°C zavřená nádobá	$7,22 \pm 0,04^c$	$7,04 \pm 0,05^b$	$6,32 \pm 0,13^a$
37°C otevřená nádobá	$7,22 \pm 0,04^b$	$6,81 \pm 0,02^a$	-
37°C zavřená nádobá	$7,22 \pm 0,04^a$	$7,25 \pm 0,05^a$	-

Hodnoty v rádcích s různými indexy se statisticky významně liší.
Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.
S pravděpodobností na 95 %

Ze získaných výsledků lze konstatovat, že obecně u všech vzorků se zdá být nejvhodnějším způsobem uchování skladování v dobře uzavřených nádobách při teplotě 4°C. V uzavřených nádobách byly počty bakterií stabilnější minimálně po dobu 6 týdnů, což je doba delší, než je doporučená skladovací doba od výrobců.

6 Diskuze

Míra přežití bakteriálních kultur je závislá na řadě faktorů, na podmínkách sušení a skladování, na výběru bakteriálního druhu i kmene kultury (Goderska, 2012). V současné době je věnována stále větší pozornost technologii zpracování a zlepšení stability probiotických organismů. Je žádoucí testovat způsoby zpracování bakterií tak, aby došlo ke zlepšení schopnosti přežití těchto mikroorganismů, jak při zpracování, během skladování a v neposlední řadě i při průchodu gastrointestinálním traktem u lidí. Aby vykazovala probiotika terapeutický účinek, bylo navrženo, že musí obsahovat alespoň 6 log CFU/g bakterií až do konce doby trvanlivosti produktu (Goderska, 2012). V této diplomové práci byly stanoveny průměrné počty probiotických bakterií po 6-ti týdnech skladování na 6,93 log CFU/g. Můžeme tedy konstatovat, že všechny testované kojenecké výživy obsahovaly dostatečné množství životaschopných buněk. Počty po 12-ti týdenním skladování dosahovaly v průměru 6,51 log CFU/g, pouze výživa obsahující *Lactobacillus fermentum* vykazovala počty výrazně nižší, a to 5,05 log CFU/g, u vzorků skladovaných při 4°C nebyly detekovány žádné životaschopné mikroorganismy.

Lyofilizace se běžně používá pro konzervaci a skladování mikroorganismů. V práci (Kandil et Soda, 2015) byly hodnoceny podmínky přežívání 26 kmenů bakterií, které byly lyofilizovány a poté skladovány po dobu 6 měsíců. Tato studie ukázala významné snížení počtů životaschopných buněk při skladování lyofilizovaných kmenů. Podobné závěry byly pozorovány i u lyofilizovaných kultur *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus para-mesenteroides*, *Lactobacillus mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Yao et al., 2008), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* (Ziadi et al., 2005), *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus thermophilus* (Andersen et al., 1999) a *Lactobacillus acidophilus* (King et Su, 1994), *Lactobacillus rhamnosus* (Ananta et al., 2005), *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Fonseca et al., 2000; Panoff et al., 2000), *Streptococcus thermophilus* (Beal et al., 2001). Bylo dokázáno, že ztráta životaschopnosti lyofilizovaných kultur by mohla být důsledkem poškození buněk, především poškození buněčné stěny, buněčných membrán či poškození DNA (Teixeira et al., 1996). Také v průběhu lyofilizace jsou bakteriální buňky vystaveny osmotickému tlaku, protože dochází ke snížení aktivity vody sušícího média. Zmrazení způsobuje různá poškození bakteriálních buněk (Ananta et al., 2005),

jako nejčastější příčina se ale uvádí vznik ledových krystalků a vysoký osmotický tlak (Santivarangkna et al., 2007; Carvalho et al., 2003; Rault et al., 2007). Obrana bakteriálních kmenů závisí na schopnosti akumulovat vnitřní rozpuštěné látky, zvyšovat vnitřní osmotický tlak, a tím měnit kompozici membránových lipidů (Beales, 2004). Teixeira et al. (1996) naznačují, že oxidace mastných kyselin membránových lipidů je nejpravděpodobnější příčinou zániku lyofilizovaných mikrobiálních buněk během skladování. Studie Kandil et Soda (2015) uvádí, že *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* měl vyšší míru přežití ve srovnání s laktobacily. Bylo zjištěno, že čím vyšší je měrný povrch buňky, tím vyšší je pravděpodobnost, že dojde k poškození buněčných membrán a dojde k vytváření ledových krystalů během zmrazování (Fonseca et al., 2000). Také bylo zjištěno, že rezistence k lyofilizaci je kmenově specifická (Hubalek, 2003; de Valdez et al., 1985). Nebyla zjištěna významná korelace mezi autolytickou aktivitou a schopností přežívání lyofilizovaných bakterií, ale bylo zjištěno, že zvýšená autolytická aktivita mikroorganismů má za následek při zpětné rehydrataci ztrátu enzymové aktivity (Kandil et Soda, 2015; Koch et al., 200; Riveros et al., 2009). Studie Kandil et Soda (2015) ukazují, že kmeny rodu *Lactobacillus* vykazovaly vyšší autolytickou aktivitu než bakterie kulovitého tvaru (koky). Tyto závěry byly potvrzeny i dalšími studiemi, které uvádí, že je výše zmíněný vztah kmenově závislý (Husson-Kao et al., 2000).

V této diplomové práci bylo též zjištěno, že kmen *Lactobacillus*, použitý do kojenecké výživy, byl velice citlivý na podmínky skladování. I přes to, že jsou laktobacily fakultativně anaerobní a měly by vykazovat vyšší toleranci k obsahu kyslíku v prostředí, jejich počty byly výrazně nižší než stanovené počty bifidobakterií, u kterých byl očekáván vzhledem k tomu, že jsou striktně anaerobní rychlejší a výraznější úbytek. Použitý kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* je pravděpodobně velmi odolný. U vzorku číslo jedna byly stanoveny vysoké počty i po skladování po 18ti týdnech (6,69 log CFU/g.), mohlo by to být pravděpodobně zapříčiněno jinou technologií při zpracování, či využití jiného sušícího média.

V současné době jsou některé kmeny *B. animalis* subsp. *lactis* běžně používané v mnoha probiotických výrobcích. Byla prokázána vyšší citlivost u druhů *Bifidobacterium* izolovaných z lidského gastrointestinálního traktu, než u bifidobakterií živočišného původu (Sanze, 2007). Bakteriální kmen *B. animalis* subsp. *lactis* byl

izolován z různých zvířecích hostitelů (Bunesova et al., 2012; Masco et al., 2004; Mayer et al., 2007).

Výsledky studie Bunešová et al., (2012) ukazují, že některé druhy bifidobakterií nemusí být hostitelsky specifické, tyto druhy vykazují větší míru tolerance k hostiteli. Jako příklad byla uvedena schopnost kmenu *B. animalis* přežít v trávicím traktu telat (Bunešová et al., 2012). Bylo prokázáno, že některé bifidobakterie, které jsou využívány pro lidskou konzumaci, byly identifikovány ve fekálních vzorcích jehňat (Satokari et al., 2001). Biavati et al., (2000) uvádí, že byly identifikovány stejné druhy *Bifidobacterium* u kojených dětí a sajících telat.

Druhy *B. animalis* a *B. lactis* byly přehodnoceny a zahrnuty do druhu *B. animalis* se dvěma poddruhy *B. animalis* subsp. *lactis* a subsp. *Animalis*. *B. animalis* subsp. *lactis* byl izolován z králičí stolice, mimo to byl identifikován i u jiných zvířat, například u prasat (Mayer et al., 2007) a psů (Bunesova et al., 2012c). Také bylo zjištěno, že i druh *B. animalis* subsp. *lactis* vykazuje toleranci ke kyslíku, který se vykytuje v okolním prostředí (Li et al., 2010, Meile et al., 1997). Tolerance k obsahu kyslíku je závislá na druhu bifidobakterií a některé druhy jsou tolerantní k obsahu kyslíku pouze v přítomnosti oxidu uhličitého (Ahn et al., 2001; Kawasaki et al., 2006; Meile et al., 1997).

V této diplomové práci bylo zjištěno, že obecně u všech vzorků se zdá být nejvhodnějším způsobem uchování skladování v dobře uzavřených nádobách při teplotě 4°C. V uzavřených nádobách byly počty bakterií stabilnější minimálně po dobu 6 týdnů, což je doba delší, než je doporučená skladovací doba od výrobců.

7 Závěr

- Ze získaných výsledků lze konstatovat, že obecně u všech vzorků se zdá být nejvhodnějším způsobem uchovávání skladování v dobře uzavřených nádobách při teplotě 4°C.
- V uzavřených nádobách byly počty bakterií stabilnější minimálně po dobu 6 týdnů, což je doba delší, než je doporučená skladovací doba od výrobců.
- Jako nejcitlivější na podmínky skladování se zdá být použitý kmen rodu *Lactobacillus*, ve výživách aplikovaný kmen *Bifidobacterium*, je i přes to, že bifidobakterie jsou striktně anaerobní, velmi odolný a přežíval i v podmínkách s dobrým přístupem kyslíku.

Hypotéza: Počty probiotických bakterií se budou v kojeneckých výživách lišit v závislosti na podmínkách skladování. Hypotéza byla v této práci potvrzena.

8 Seznam použité literatury

- Adlerberth, I., Wold, A. 2009. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr.* 98. 229–238.
- Ahn, J.B., Hwang, H.J. And Park, J.H., 2001. Physiological response of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. *Journal of microbiology and Biotechnology.* 11. 443-451.
- Akers, S.; Groh-Wargo, S. 2005. Normal nutrition during infancy. In *Handbook of Pediatric Nutrition*, 3rd ed.; Queen Samour, P., King, K., Eds.; Jones and Bartlett: Sudbury, MA, USA. 75–106.
- Ananta, E., Volkert, M. and Knorr, D. 2005. Cellular Injuries and Storage Stability of Spray-Dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal.* 15. 399-409.
- Andersen, A. B., Fog-Petersen, M.S., Larsen, H. and Skibsted, L.H. 1999. Storage Stability of Freeze-Dried Starter Cultures (*Streptococcus thermophilus*) as Related to Physical State of Freezing Matrix. *LWT-Food Science and Technology.* 32. 540-547.
- Anonym 1 Pracovní skupina dětské gastroenterologie a výživy. Doporučení pracovní skupiny gastroenterologie a výživy ČPS pro výživu kojenců a batolat. *Česko-slovenská pediatrie.* 2014, roč. -, vol. duben, s. 10-18, ISSN 0069-2328.
- Anonym 2 <http://www.collectio-jav.estranky.cz/clanky/mikrobiologie/molekularne-genetickadiagnostikav-mikrobiologii.html> [10.4.2015].
- Awaisheh, S.S.; Al-Nabulsi, A.A.; Osaili, T.M.; Ibrahim, S.; Holley, R. 2013. Inhibition of *Cronobacter sakazakii* by heat labile bacteriocins produced by probiotic lab isolated from healthy infants. *J. Food Sci.* 78. 1416–1420.
- Badger, T.M.; Gilchrist, J.M.; Pivik, R.T.; Andres, A.; Shankar, K.; Chen, J.-R.; Ronis, M.J. 2009. The health implications of soy infant formula. *Am. J. Clin. Nutr.* 89. 1668–1672.

- Beal, C., Fonseca, F. and Corrieu, G. 2001. Resistance to Freezing and Frozen Storage of *Streptococcus thermophilus* Is Related to Membrane Fatty Acid Composition. *Journal of Dairy Science*. 84. 2347-2356.
- Beales, N. 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3. 1-20.
- Benno, Y., Sawada, K., Mitsuoka, T. 1984. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breastfed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol*. 28. 975–986.
- Berg, R. 1996. The indigenous gastrointestinal microbiota. *Trends Microbiol*. 4. 430-435.
- Bhatia, J.; Greer, F. 2008. Use of soy protein-based formulas in infant feeding. *Pediatrics*. 121. 1062–1068.
- Biasucci, G., Benenati, B., Morelli, L., Bessi, E., Boehm, G. 2008. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J Nutr*. 138. 1796–1800.
- Biavati, B., And Mattarelli, P. 2001. The Family Bifidobacteriaceae. In: *The Prokaryotes*, Release 3.7.
- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V., 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol*. 50. 117–131.
- Boehm, G., Moro, G. 2008. Structural and functional aspects of prebiotics used in infant nutrition. *J Nutr*. 138. 1818–1828.
- Boehm, G.; Stahl, B.; Jelinek, J.; Knol, J.; Miniello, V.; Moro, G.E. 2005. Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. *Acta Paediatr*. 94. 18–21.
- Braegger, C.; Chmielewska, A.; Decsi, T.; Kolacek, S.; Mihatsch, W.; Moreno, L.; Piescik, M.; Puntis, J.; Shamir, R.; Szajewska, H. 2011. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: A systematic review and comment by the espghan committee on nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 52. 238–250.

- Bunesova, V., Vlkova, E., Rada, V., Rockova, S., Svobodova, I., Jebavy, L., Kmet, V., 2012. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains isolated from dog faeces. *Vet. Microbiol.* 160. 501–505.
- Bureš, J., Cyrany, J., Kohoutová, D., Förstl, M., Rejchrt, S., Květina, J., Voříšek, V., Kopáčová, M. 2010. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome. *World J Gastroenterol.* 16(24). 2978-2990.
- Butel, M.-J., Suau, A., Campeotto, F., Magne, F., Aires, J., Ferraris, L., Kalach, N., Leroux, B., Dupont, C. 2007. Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 44. 577–582.
- CAC. Standards for Infant Formula and Formulas for Special Medical Purposes Intended for Infants; CODEX STAN 72-108; Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2007.
- Camp, Jg., Kanther, M., Semova, I., Rawls, Jf. 2009. Patterns and scales in gastrointestinal microbial ecology. *Gastroenterology.* 136(6). 1989-2002.
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X. and Gibbs, P. 2003. Effect of Various Growth Media upon Survival during Storage of Freeze-Dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology.* 94. 947-952.
- Català-Clariana, S.; Benavente, F.; Giménez, E.; Barbosa, J.; Sanz-Nebot, V. 2013. Identification of bioactive peptides in hypoallergenic infant milk formulas by CE-TOF-MS assisted by semiempirical model of electromigration behavior. *Electrophoresis.* 34. 1886–1894.
- Claesson, Mj., Cusack, S., O’sullivan, O., Greene-Diniz, R., De Weerd, H. 2011. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108. 14586–14591.
- Connolly, E.; Lönnerdal, B. 2004. D_l-lactic acid-producing bacteria safe to use in infant formulas. *NUTRA Foods.* 3. 37–49.

- Conrad, P.B., Miller, D.P., Cielenski, P.R. and de Pablo, J.J. 2000. Stabilization and Preservation of *Lactobacillus acidophilus* in Saccharide Matrices. *Cryobiology*. 41. 17-24.
- Conroy, M.E., Shi, H.N., Walker, W.A. 2009. The long-term health effects of neonatal microbial flora *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 9. 197–201.
- Da Silva Sabo, S., Converti, A., Todorov, S.D., Dominguez, J.M. & De Souza Oliveira, R.P. 2015. Effect of inulin on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* in stationary and shaken cultures. *International Journal of Food Science & Technology*. 50. 864–870.
- Daly, C., Fitzgerald, G.F., O'Connor, L. and Davis, R. 1998. Technological and Health Benefits of Dairy Starter Cultures. *International Dairy Journal*. 8. 195-205.
- de Valdez, G.F., de Giori, G.S., de Ruiz Holgado, A.P. and Oliver, G. 1985. Rehydration Conditions and Viability of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. *Cryobiology*. 22. 574-577.
- Deshpande, G., Rao, S., Patole, S. 2007. Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials, *Lancet*. 369. 1614–1620.
- Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., Relman, D.A. 2007. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and diversity *Nature*. 449. 811–818.
- Digiulio, D.B., Romero, R., Amogan, H.P., Kusanovic, J.P., Bik, E.M., Gotsch, F., Kim, C.J., Erez, O., Edwin, S., Relman, D.A. 2008. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS ONE*. 3. 3056.
- Doré, J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 65(11). 4799-4807
- Doyle, M., Neu, J., Mai, V. 2014. Intestinal microbiota development in the premature neonate: establishment of a lasting commensal relationship? *Nutr Rev*. 66. 658–663.

Fanaro, S., Vigi, V., Chierici, R., Boehm, G. 2003. Fecal flora measurements of breastfed infants using an integrated transport and culturing system. *Acta Paediatr.* 92. 634–635.

FAO. *Enterobacter sakazakii* and Other Microorganisms in Powdered Infant Formula; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2007; p. 81.

FAO/WHO Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria (2001) <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>

FAO/WHO. Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria; FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2001.

Fonseca, F., Béal, C. and Corrieu, G. 2000. Method of Quantifying the Loss of Acidification Activity of Lactic Acid Starters during Freezing and Frozen Storage. *Journal of Dairy Research.* 67. 83-90.

Forsythe, S.J. 2005. *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. *Matern. Child Nutr.* 1. 44–50.

Frank, D., Pace, N. 2008. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr Opin Gastroenterol.* 24, 4-10.

Frič, P. 2005. Probiotika a prebiotika – renesance terapeutického principu. Teorie a experimentální doklady. *Postgrad medicína.* 7. 472–477.

Garrity, G.M., Bell, J.A., And Lilburn, T.G. 2004. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, Release 5.0, Springer-Verlag, New York. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>.

Goderska. 2012. Czarnecki Influence of microencapsulation and spray drying on the viability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Polish Journal of Microbiology.* 57(2). 135-140.

- Goldenberg, Jz., Lytvyn, L., Steurich, J., Parkin, P., Mahant, S., Johnston, Bc. 2015. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev.* 12. CD004827.
- Gottrand, F. 2008. Long-chain polyunsaturated fatty acids influence the immune system of infants *J Nutr.* 138. 1807–1812.
- Gregora, M. 2013. Porod císařským řezem a jeho možná negativa pro novorozence. *Pediatr. Praxi.* 14 (6). 404–406.
- Guo, 2009. Pre- and probiotics. *Journal of Microbial and Biochemical Technology.* 15. 1457- 1499.
- Ha, C.G., Cho, J.K., Chai, Y.G., Ha, Y.A. & Shin, S.H. 2006. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Lactobacillus plantarum* CK 102. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 16. 1047–1052.
- Hammes, W.P., Hertel, C. 2003. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: *The Prokaryotes Release 3.15*, Editor Martin Dworkin.
- Harb, T., Matsuyama, M., David, M., Hill, Rj. 2016. Infant colic-what works: a systematic review of interventions for breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 62(5). 668–86.
- Hart, Al., Lammers, K., Brigidi, P., Vitali, B., Rizzello, F., 2004. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut.* 53. 1602–1609.
- Heavey, Pm., Rowland, Ir. 2004. Microbiota interactions in health and disease. *Gastrointestinal cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 18(2). 323-336.
- Hickey, R.M. 2012. The role of oligosaccharides from human milk and other sources in prevention of pathogen adhesion. *Int. Dairy J.* 22. 141–146.
- Higl, B., Kurtmann, L., Carlsen, C.U., Ratjen, J., Forst, P., Skibsted, L.H., Kulozik, U. and Risbo, J. 2007. Impact of Water Activity, Temperature, and Physical State on the Storage Stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* Freeze-Dried in a Lactose Matrix. *Biotechnology Progress.* 23. 794-800.

- Hongpattarakere, T., Rattanaubon, P. & Buntin, N. 2012. Improvement of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* survival using water extracts and crude fibers from food crops. *Food and Bioprocess Technology*. 6. 1885–1896.
- Hrodek, Otto, VAVŘINEC, Jan, et al. *Pediatric*. 1. vydání. Praha : Galén, 2002. s. 92-96. ISBN 80-7262-178-5.
- Hubalek, Z. 2003. Protectants Used in the Cryopreservation of Microorganisms. *Cryobiology*. 46. 205-229.
- Husson-Kao, C., Mengaud, J., Cesselin, B., van Sinderen, D., Benbadis, L. and Chapot-Chartier, M.P. 2000. The *Streptococcus thermophilus* Autolytic Phenotype Results from a Leaky Prophage. *Applied and Environmental Microbiology*. 66. 558-565.
- Chen, J., Cai, W., Feng, Y. 2007. Development of intestinal Bifidobacteria and Lactobacilli in breast-fed neonates. *Clin Nutr*. 26. 559–566.
- Chung, C.S.; Yamini, S.; Trumbo, P.R. 2012. FDA's health claim review: Whey-protein partially hydrolyzed infant formula and atopic dermatitis. *Pediatrics*. 130. 408–414.
- Jiménez, E., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*. 159. 187–193.
- Jones, M.L., Martoni, C.J., Parent, M. & Prakash, S. 2011. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolaseactive *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *British Journal of Nutrition*. 107. 1505–1513.
- Kandil, S.; Soda, M. E. 2015. Influence of Freezing and Freeze Drying on Intracellular Enzymatic Activity and Autolytic Properties of Some Lactic Acid Bacterial Strains. *Advances in Microbiology*. 5. 371–382.
- Katarzyna, L., Dembczyński, R., Białas, W. and Jankowski, T. 2009. Production of Dry *Lactobacillus rhamnosus* Preparations by Spray Drying and Lyophilization in Aqueous Two-Phase Systems. *Acta Scientiarum Polonorum: Technologia Alimentaria*. 39-49.

- Kawasaki, S., Mimura, T., Satoh, T., Takeda, K. And Niimura, Y., 2006. Response of the microaerophilic Bifidobacterium species, B-boum and B-thermophilum, to oxygen. *Applied and Enviromental Microbiology*. 72. 6854-6858.
- Kelly, D., King, T., Aminov, R. 2007. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of imunity *Mutat Res*. 622. 58–69.
- Kent, R.M.; Doherty, S.B. 2014. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *Food Res. Int*. 64. 567–576.
- King, V.A.E. and Su, J.T. 1994. Dehydration of *Lactobacillus acidophilus*. *Process Biochemistry*. 28. 47-52.
- Koenig, Je., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, Ad., Stombaugh, J. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108. 14578–14585.
- Koch, S., Eugster-Meierb, E., Obersona, G., Meilea, L. And Lacroix, C. 2008. Effects of Strains and Growth Conditions on Autolytic Activity and Survival to Freezing and Lyophilization of *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* Isolated from Cheese. *International Dairy Journal*. 18. 187-196.
- Kovatcheva-Datchary, P., Zoetendal, E.G., Venema, K., de Vos, W.M., Smidt, H. 2009, Review: tools for the tract: understanding the functionality of the gastrointestinal tract *Ther Adv Gastroenterol*. 2. 9–22.
- Kristensen, Nb., Bryrup, T., Allin, Kh., Nielsen, T., Hansen, Th., Pedersen, O. 2016. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Med*. 8. 52.
- Kuba, Y.; Seddon, P.; Ducharme, F.M. 2013. Hypoallergenic formula milk versus cow's milk for prevention of wheeze and asthma in children with a family history of atopy. *Cochrane Datebase Syst. Rev*. 3, doi:10.1002/14651858.
- Kumar, R., Grover, S. & Batish, V.K. 2011. Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing *Lactobacillus plantarum* strains in Sprague-Dawley rats. *British Journal of Nutrition*. 105. 561–573.

- Lane, J.A.; Mehra, R.K.; Carrington, S.D.; Hickey, R.M. 2010. The food glycome: a source of protection against pathogen colonization in the gastrointestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 142. 1–13.
- Lau, Cs., Chamberlain, Rs. 2015. Probiotic administration can prevent necrotizing enterocolitis in preterm infants: a meta-analysis. *J Pediatr Surg.* 50(8). 1405–1412.
- Lebl, Jan, Kamil Provazník a Ludmila Hejčmanová. *Preklinická pediatrie*. 2. vydání. Praha : Galén, 2007. s. 3. ISBN 978-80-7262-438-6.
- Li, Q., Chen, Q., Ruan, H., Zhu, D. And He, G., 2010. Isolation and characterisation of an oxygen, acid and bile resistant *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Qq08. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 90. 1340-1346.
- Liong, M.T. & Shah, N.P. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science.* 88. 55–66.
- Lye, H.-S., Rahmat-Ali, G.R. & Liong, M.-T. 2010. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal.* 20. 169–175.
- Mai, V., Morris, Jg. Jr. 2004 Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. *J Nutr.* 134(2). 459-464.
- Martin, C.R., Walker, W.A. 2008. Probiotics: Role in pathophysiology and prevention in necrotizing enterokolitis *Semin Perinatol.* 32. 127–137.
- Masco, L., Ventura, M., Zink, R., Huys, G., Swings, J., 2004. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54. 1137–1143.
- Mayer, Hk., Amtmann, E., Philippi, E., Steinegger, G., Mayrhofer, S., Kneifel, W. 2007. Molecular discrimination of new isolates of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* from reference strains and commercial probiotic strains. *Int Dairy J.* 17. 565-573.

Meile, L., Ludwig, W., Rueger, U., Gut, C., Kaufmann, P., Dasen, G., Wenger, S. And Teuber, M. 1997. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Systematic and Applied Microbiology*. 20. 57-64.

Meile, L., Ludwig, W., Rueger, U., Gut, C., Kaufmann, P., Dasen, G., Wenger, S., Teuber, M., 1997. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Syst. Appl. Microbiol.* 20. 57–64.

Meng, X.C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Daly, C. and Ross, R.P. 2008. Anhydrobiotics: The Challenges of Drying Probiotic Cultures. *Food Chemistry*. 106. 1406-1416.

Ming, L., Rahim, R., Wan, H. and Ariff, A. 2009. Formulation of Protective Agents for Improvement of *Lactobacillus salivarius* I 24 Survival Rate Subjected to Freeze Drying for Production of Live Cells in Powderized Form. *Food and Bioprocess Technology*. 2. 431-436.

Monaci, L.; Nørgaard, J.V.; Van Hengel, A.J. 2010. Feasibility of a capillary LC/ESI-Q-TOF MS method for the detection of milk allergens in an incurred model food matrix. *Anal. Methods*. 2. 967–972.

Morelli, L. 2008. Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. *J Nutr*. 138. 1791–1795.

Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A. and Vesey, G. 2006. Preservation of Micro-Organisms by Drying: A Review. *Journal of Microbiological Methods*. 66. 183-193.

MUDr. Tláškal, P. 2008. Historie a současnost počáteční dětské výživy. *Pediatr. pro Praxi*. 9 (2). 86–92.

Mugambi, M.N.; Musekiwa, A.; Lombard, M.; Young, T.; Blaauw, R. 2012. Synbiotics, probiotics or prebiotics in infant formula for full term infants: A systematic review. *Nutr. J.* 11. doi:10.1186/1475-2891-11-81.

Musilová, Š.; Rada, V.; Vlková, E.; Bunešova, V.; Nevoral, J. Colonisation of the gut by bifidobacteria is much more common in vaginal deliveries than Caesarean sections. *Acta Pædiatrica*. 104. 184–186.

Nevoral, J. 2005. Prebiotika, probiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*. 2. 59–65.

- Nevoral, Jiří. 2006. Historie umělé výživy. Čtvrtletní noviny. Mimořádné vydání. 3. 3-4.
- Nguyen, T.D.T., Kang, J.H. & Lee, M.S. 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology*. 113. 358–361.
- Nutrition, C.O. 2000. Hypoallergenic infant formula. *Pediatrics*. 106. 346–349.
- O'hara, A., Shanahan, F. 2007. Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases *TheScientificWorldJOURNAL*. 7. 31–46.
- Palmer, C., Bik, Em., Digiulio, Db., Relman, Da., Brown, Po. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 5. 177.
- Panoff, J.M., Thammavongs, B. and Gueguen, M. 2000. Cryoprotectants Lead to Phenotypic Adaptation to Freeze-Thaw Stress in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIP 101027T. *Cryobiology*. 40. 264-269.
- Park, Y.H., Kim, J.G., Shin, Y.W., Kim, S.H. & Whang, K.Y. 2007. Effect of dietary inclusion of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17. 655–662.
- Parracho, H., McCartney, A.L., Gibson, G.R. 2007. Probiotics and prebiotics in infant nutrition *Proc Nutr Soc*. 66. 405–411.
- Penders, J.; Thijs, C.; Vink, C.; Stelma, F. F.; Snijders, B.; Kummeling, I.; Van Den Brandt, P. A.; Stobbering, E. E. 2006. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Pediatrics*. 118 (511). 2005–2824.
- Prakash, S., Rodes, L., Coussens, M., Tomaro-Duchesneau, C. 2011. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*. 5. 71-86.
- Puccio, G., Cajozzo, C., Meli, F. Rochat, F., Grathwohl, D., Steenhout, P. 2007. Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics *Nutrition*. 23. 1–8.

- Quispel, A., Lourens, G. M., Baas Becking (1895–1963). 1998. Inspirator for many (micro) biologists. *Int Microbiol.* 1(1). 69-72.
- Ragno, V.; Giampietro, P.; Bruno, G.; Businco, L. 1993. Allergenicity of milk protein hydrolysate formulae in children with cow's milk allergy. *Eur. J. Pediatr.* 152. 760–762.
- Rault, A., Béal, C., Ghorbal, S., Ogier, J.-C. and Bouix, M. 2007. Multiparametric Flow Cytometry Allows Rapid Assessment and Comparison of Lactic Acid Bacteria Viability after Freezing and during Frozen Storage. *Cryobiology.* 55. 35-43.
- Reinert, Birgit. Friendly tenants in the human gut: The genome of *B. longum*. 2002. Genome News Network.
- Reinhardt, C., Reigstad, C.S., Bäckhed, F. 2009. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 48. 249–256.
- Resta, S.C. 2009. Rest Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling *J Physiol.* 587. 4169–4174.
- Richardson, D.P. & Eggersdorfer, M. 2015. Opportunities for product innovation using authorised European Union health claims. *International Journal of Food Science & Technology.* 50. 3–12.
- Riveros, B., Ferrer, J. and Borquez, R. 2009. Spray Drying of a Vaginal Probiotic Strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technology.* 27. 123-132.
- Roztočil A. Moderní porodnictví. Praha: Grada 2008.
- Saavedra, J.M. 2007. Use of probiotics in pediatrics: Rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutrition in Clinical Practice.* 22. 351–365.
- Salminen, S. 2009. Gut microbiota in infants between 6 and 24 months of age. *Nestle NutrWorkshop Ser Pediatr Program.* 64. 43-56.
- Sanders, Me., Heimbach, Jt., Pot, B., Tancredi, Dj., Lenoir-Wijnkoop, I., Lahteenmaki-Uutela, A., Gueimonde, M., Banares, S. 2011. Health claims substantiation for probiotic and prebiotic products. *Gut Microbes.* 2(3). 127–133.

- Santivarangkna, C., Kulozik, U. and Foerst, P. 2007. Alternative Drying Processes for the Industrial Preservation of Lactic Acid Starter Cultures. *Biotechnology Progress*. 23. 302-315.
- Sanz, Y., 2007. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. *Int. Dairy J.* 17. 1284–1289.
- Satokari, R., Grönroos, T., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. 2009. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. *Lett Appl Microbiol.* 48. 8–12.
- Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Akkermans, A.D.L., Saarela, M., De Vos, V.M., 2001. *Bifidobacterial* diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67. 504–513.
- Saulnier, J.K. Spinler, G.R. Gibson, J. Versalovic. 2009. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods *Curr Opin. Biotechnol.* 20. 135–141.
- Savini, M., Cecchini, C., Verdenelli, M.C., Silvi, S. and Orpianesi, C. 2010. Pilot-Scale Production and Viability Analysis of Freeze-Dried Probiotic Bacteria Using Different Protective Agents. *Nutrients*. 2. 330-339.
- Shah, N.P. 2007. Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* 17. 1262–1277.
- Shaker, I., Scott, J. A., Reid, M. 2004. Infant feeding attitudes of expectant parents: breastfeeding and formula feeding. *Journal of Advanced Nursing*. 45 (3). 260–268.
- Shanahan, F., Stanton, C., Ross, P., Hill, C. 2009. Pharmabiotics: Bioactives from Mining Host–Microbe–Dietary Interactions *Funct Food Rev.* 1. 1–6.
- Shimamura, S., Abe, F., Ishibashi, N., Miyakawa, H., Yaeshima, T., Araya, T. And Tomita, M., 1992. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen-metabolism of *Bifidobacterium* species. *Journal of Dairy Science*. 75. 3296-3306.
- Siaterlis, C. and Charalampopoulos, D.D. 2009. Effect of Culture Medium and Cryoprotectants on the Growth and Survival of Probiotic *Lactobacilli* during Freeze Drying. *Letters in Applied Microbiology*. 48. 295-301.

- Stanghellini, V., Barbara, G., Cremon, C., Cogliandro, R., Antonucci, A., Gabusi, V., Frisoni, C., De Giorgio, R., Grasso, V., Serra, M., Corinaldesi, R. 2010. Gut microbiota and related diseases: clinical features. *Intern Emerg Med.* 5(1). 57-63.
- Stevens, Emily, Thelma, E., Patrick and Rita Pickler. 2009. A History of Infant Feeding. *Journal of Perinatal Education.* 18 (2). 32-39.
- Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R. and Danner, H. 2009. Influence of Lyophilization, Fluidized Bed Drying, Addition of Protectants, and Storage on the Viability of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied Microbiology.* 107. 67-177.
- Stummer, S., Toegel, S., Rabenreither, M.-C., Unger, F.M., Wirth, M., Viernstein, H. and Salar-Behzadi, S. 2012. Fluidized-Bed Drying as a Feasible Method for Dehydration of *Enterococcus faecium* M74. *Journal of Food Engineering.* 111. 156-165.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J. J., Gibson, G., Collins, Md., Doré, J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 65 (11), 4799-4807.
- Sýkora, J., Schwarz, J., Siala, K. 2006. Probiotika v dětském věku. *Pediatr. Praxi.* 7(5). 264–270.
- Szajewska, H., Skorka, A., Ruszczyński, M., Gieruszczak-Bialek, D. 2013. Meta-analysis: *Lactobacillus GG* for treating acute gastroenteritis in children--updated analysis of randomised controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther.* 38(5). 467–476.
- Šráčková, D. Kojení stále nenahraditelné. In: *Praktická gynekologie*, 2005, roč. 9, č. 3, s. 16-19. ISSN 1211-6645.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol.* 11. 2574–2584.
- Teixeira, P.C., Castro, M.H. And Kirby, R.M. 1996. Evidence of Membrane Lipid Oxidation of Spray-Dried *Lactobacillus bulgaricus* during Storage. *Letters in Applied Microbiology.* 22. 34-38.

- Teixeira, P.C., Castro, M.H. and Kirby, R.M. 1996. Evidence of Membrane Lipid Oxidation of Spray-Dried *Lactobacillus bulgaricus* during Storage. *Letters in Applied Microbiology*. 22. 34-38.
- Turrone, F., Foroni, E., Pizzetti, P., Giubellini, V., Ribbera, A. 2009. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl Environ Microbiol*. 75. 1534–1545.
- Vincentová, D. 2006. Výživa novorozence, výživa novorozence, kojence a batolete. *Pediatr. Pro Praxi*. 4. 224–226.
- Wall, R., Ross, R.P., Shanahan, F., O'Mahony, L., O'Mahony, C., Coakley, M., Hart, O., Lawlor, P., Quigley, E.M., Kiely, B., et al. 2009. Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *Am. J. Clin Nutr*. 89. 1393–1401.
- Wang, M., Ahrne, S., Antonsson, M., Molin, G. 2004. T-RFLP combined with principal component analysis and 16S rRNA gene sequencing: an effective strategy for comparison of fecal microbiota in infants of different ages *J Microbiol Method*. 59. 53–69.
- Wang, M., Karlsson, C., Olsson, C., Adlerberth, I., Wold, A.E., Strachan, D.P., Martricardi, P.M., Aberg, N., Perkin, M.R., Tripodi, S., et al. 2008. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema *J Allergy Clin Immunol*. 121. 129–134.
- Yao, A.A., Bera, F., Franz, C., Holzapfel, W. and Thonart, P. 2008). Survival Rate Analysis of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria Using the Arrhenius and Z-Value Models. *Journal of Food Protection*. 71. 431-434.
- Zhao, C., Wu, Y., Yang, C., Liu, B. & Huang, Y. 2015. Hypotensive, hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of bioactive compounds from microalgae and marine microorganisms. *International Journal of Food Science & Technology*. 50. 1705–1717.
- Ziadi, M., Touhami, Y., Achour, M., Thonart, P. and Hamdi, A. 2005. The Effect of Heat Stress on Freeze-Drying and Conservation of *Lactococcus*. *Biochemical Engineering Journal*. 24. 141-145.

Zoetendal, Eg., Rajilic-Stojanovic, M., De Vos Wm. 2008. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Nat Methods*. 57. 1605–16015.

Zdroje použitých obrázků

Obrázek č. 1 Faktory ovlivňující střevní mikrobiotu kojenců..... 16

Modifikace - Programming infant gut microbiota: Influence of dietary and enviromental factors. *Current Opinion in Biotechnology*. 21(2). 149-156.

Dostupné z:

https://www.researchgate.net/publication/43533357_Programming_infant_gut_microbiota_Influence_of_dietary_and_environmental_factors

Obrázek č. 2 Historie vývoje kojeneckých formulí (zdroj Oficiální stránky výrobců kojeneckých výživ) 20

Dostupné

z:

<http://www.hipp.cz/mleko/matenske-mleko-a-kojeni/historie-kojenecke-vyzyvy/>

Obrázek č. 3 Vliv probiotik na homeostázu střevní mikrobioty 28

Modifikace - Sanders, ME., Heimbach, JT., Pot, B., Tancredi, DJ., Lenoir-Wijnkoop, I., Lahteenmaki-Uutela, A., Gueimonde, M., Banares, S. 2011. Health claims substantiation for probiotic and prebiotic products. *Gut Microbes*. 2(3).127–33.

Obrázek č. 4 – *Bifidobacterium adolescentis* 32

Dostupné z: From The Food Research and Development Centre in Canada, Diane Montpetit (microbewiki.kenzon.edu)

Obrázek č. 5 - Bifidobakterie na střevním epitelu..... 32

Dostupné z: Bifidobacterium cells on colon epithelium. From Centre of Excellence for Knowledge Transfer, Research and Education in Food and Health for Central and Eastern Europe

Obrázek č. 6 – <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	33
Dostupné z: Lactobacillus bulgaricus. From Utah State University.	
Obrázek č. 7 – Testované kojenecké výživy - vzorek 1-4.....	39
Dostupné z: Oficiální stránky výrobců	
Obrázek č. 8 –Ředící řada se vzorkem (vlastní fotodokumentace).....	43
Vlastní fotodokumentace	
Obrázek č. 9 – Zaočkování a přelití agarem	44
Obrázek č. 10 –Anaerostat (Oxoid, UK).	
Materiál katedry mikrobiologie výživy a dietetiky, FAPPZ, ČZU	
Obrázek č. 11 –Vyhodnocení počtu kolonií	45
Materiál katedry mikrobiologie výživy a dietetiky, FAPPZ, ČZU	