

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Využití dextrinů jako prebiotik pro bifidobakterie

Bakalářská práce

Autor: Hana Ludvíková

Obor studia: Výživa a potraviny (ATZD)

Vedoucí práce: doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Využití dextrinů jako prebiotik pro bifidobakterie“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 28.6.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D. za odbornou pomoc při vedení mé práce, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala členům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, že mi umožnili realizovat experimentální část této bakalářské práce.

Využití dextrinů jako prebiotik pro bifidobakterie

Souhrn

Bifidobakterie jsou komenzální, grampozitivní, sacharolytické mikroorganismy. Patří mezi probiotické bakterie díky prokázaným pozitivním vlastnostem na zdraví hostitele. K podpoře jejich množství, metabolické aktivity a proliferace v tlustém střevě slouží prebiotika. Důležité je, aby tyto látky byly selektivní a podporovaly pouze prospěšné bakterie, jako jsou bifidobakterie. Najít vhodné látky odpovídající požadavkům prebiotik je složité. Aktuálně se hojně používají fruktooligosacharidy (FOS), galaktooligosacharidy (GOS), inulin, laktulóza a alternativy oligosacharidů mateřského mléka (OMM). Další z možností je rezistentní dextrin. Ten je obsažen v komerčním produktu NUTRIOSE®, který byl testován v této bakalářské práci.

Cílem bylo otestovat růst bifidobakteriálních kmenů typických pro člověka na komerčním produktu NUTRIOSE®. Tento produkt měl 4 varianty, které se lišily ve zdroji škrobu (pšeničný, kukuřičný), obsahu redukujících sacharidů a úpravě. Dále byl do testování zařazen dextrin (kukuřičný), běžný pšeničný a kukuřičný škrob. Substráty byly testovány vždy jednotlivě jako jediný zdroj uhlíku v médiu. Indikátorem pH byla bromkresolová violet, která umožňovala vizuální vyhodnocení na základě barevné změny v důsledku produkce metabolitů při růstu na daném substrátu. Testování bylo provedeno ve dvou esejích. V první metodice bylo testováno 62 kmenů na mikrotitračních destičkách na médiu API 50 CH, které obsahovalo substráty o koncentraci 1 g/l, objem reakce byl 200 µl. Uvedená esej nebyla po vyhodnocení výsledků shledána jako optimální. Z tohoto důvodu byl pokus proveden ve velkém objemu (10 ml) v médiu podle Pechara a bylo testováno 54 kmenů. Zvýšila se koncentrace substrátů na 10 g/l a bylo zajištěno lepší anaerobní prostředí. Při kontrole se hodnotila změna zbarvení a hodnota pH. Pozitivní vzorek byl zbarven žlutě a pH kleslo pod 5,5. Tento výsledek reflektoval růst bifidobakterií a následnou produkci metabolitů, jež snížily pH. Negativní vzorky byly tmavě fialově zbarvené bez změny pH.

Bylo zjištěno, že utilizace běžných škrobů a dextrinu korelovala s růstem *Bifidobacterium adolescentis*, *B. breve*, *B. gallicum* a *B. pseudolongum* na všech testovaných komerčních produktech NUTRIOSE® (FB 06 a 10, FM 06 a 10). Ostatní testované kmeny jako *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. longum* a *B. catenulatum/ pseudocatenulatum* kromě zástupců *B. bifidum* rostly jen na variantách NUTRIOSE® FB 10 a FM 10, na což mohl mít vliv vysoký obsah redukujících sacharidů. Podobných výsledků bylo dosaženo i u dextrinu.

Bylo prokázáno, že bifidobakterie pocházející z trávicího traktu člověka byly schopny růst v přítomnosti NUTRIOSE® jako jediného zdroje uhlíku v *in vitro* podmínkách. Utilizace uvedeného substrátu byla však druhově a kmenově specifická. NUTRIOSE® je tedy možným prebiotikem pro některé bifidobakteriální druhy a kmeny.

Klíčová slova: Bifidobakterie; dextrin; Nutriose; prebiotikum; MALDI TOF MS

Use of dextrans as prebiotics for bifidobacteria

Summary

Bifidobacteria are commensal, gram-positive, saccharolytic microorganisms. They exhibit several health-promoting effects for the health of the host and consequently they are classified as probiotic bacteria. Prebiotics help to probiotic bacteria to enhance the growth, they support metabolic activity and they improve the proliferation of bacteria in the large intestine. Prebiotics have to be selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit to the host as the genus *Bifidobacterium*, for example. To find a suitable substance which meets the demands of prebiotics is very difficult. Currently, fructooligosaccharides (FOS), galactooligosaccharides (GOS), inulin, lactulose and alternatives of breast milk oligosaccharides are used abundantly. Another option is resistant dextrin. It is included in the commercial product NUTRIOSE® which was tested in this bachelor thesis.

The aim of the bachelor thesis is to test the growth of bifidobacterial strains typical for humans in the commercial product NUTRIOSE®. This product has 4 variants, which differ in the source of starch (wheat, maize), the content of reducing sugars and in modification. Further, maize dextrin was tested, ordinary wheat and maize starch. The substrates were always tested separately as a single source of carbon in a medium. The indicator of pH was bromocresol purple which facilitated visual evaluation on the basis of colour change due to the production of metabolites from the growth in a given substrate. The experiment was carried out in two assays. In the first methodology, 62 strains in well microtiter plates were tested. The medium API 50 CH, which contained substrates in concentration 1 g/l, was used. The volume of the reaction was 200 µl. This assay was not seen as optimal after the evaluation of the results. Consequently, the experiment was carried out in a big volume (10 ml) and in the vial sensed anaerobic ambience. The medium by Pechar was used with the concentration of 10 g/l substrates and 54 strains were tested. The change of colour and the value of pH were evaluated. The positive culture sample has changed its colour to yellow because of the formation of metabolites and the decrease in pH to 5,5. Negative samples were dark purple without a decrease in pH. The evaluation of the tests revealed that the utilization of ordinary starch and dextrin correlated with the growth of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. breve*, *B. gallicum* a *B. pseudolongum* in all the commercial products NUTRIOSE® (FB 06 and 10, FM 06 and 10). The other strains as *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. longum* and *B. catenulatum/ pseudocatenulatum* with the exception of *B. bifidum* only grew in the varieties NUTRIOSE® FB 10 and FM 10. It might be caused by the content of reducing sugars. Similar results have been manifested in the case of dextrin.

It was proven that bifidobacterial strains coming from the human gastrointestinal tract are able to grow in the presence of NUTRIOSE® as the only source of carbon in *in vitro* conditions. The ability of substrate utilization was species-specific and strain-specific. Therefore, NUTRIOSE® can be used as prebiotics for some bifidobacterial species and strains.

Keywords: Bifidobacteria; dextrin; Nutriose; prebiotic; MALDI TOF MS

Obsah

1. Úvod	8
2. Cíl práce.....	9
3. Literární rešerše.....	10
3.1 Mikrobiota.....	10
3.1.1 Vývoj mikrobioty.....	10
3.1.2 Vlastnosti mikrobioty	12
3.2 Bifidobakterie.....	13
3.2.1 Historie	15
3.2.2 Výskyt.....	15
3.2.3 Morfologie a fyziologie	16
3.2.3.1 Optimální teplota, pH a citlivost ke kyslíku.....	17
3.2.3.2 Buněčná stěna.....	17
3.2.3.3 Metabolismus a substrátová preference	18
3.3 Prebiotika	21
3.3.1 Vývoj definice	21
3.3.2 Prebiotický účinek a selektivita.....	22
3.3.3 Oligosacharidy.....	24
3.3.3.1 Oligosacharidy mateřského mléka – OMM	24
3.3.3.2 Fruktooligosacharidy – FOS	25
3.3.3.3 Galaktooligosacharidy – GOS.....	28
3.3.4 Prebiotika odvozená od škrobu.....	29
3.3.4.1 Rezistentní škrob	31
3.3.4.2 Dextrin.....	32
4. Metodika	34
4.1 Příprava bakteriálních kultur pro pokus.....	34
4.1.1 Původ bakteriálních kultur.....	34
4.1.2 Kultivace.....	35
4.1.3 Postup přípravy média	35
4.1.4 Kontrola čistoty a morfologie	36
4.1.4.1 Barvení podle Grama.....	36
4.2 Ověření identity vybraných bifidobakterií pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS.....	37
4.3 Testování růstu na dextrinech a škrobu.....	38
4.3.1 Přehled testovaných substrátů.....	38
4.3.1.1 Testování mikrotitrační metodou	39
4.3.1.2 Testování ve velkém objemu.....	41

4.3.1.3	Příprava základního média testování v lahvičkách (tzv. penicilinkách) podle Pechara	41
5.	Výsledky	44
4.4	Výsledky testování v mikrotitrační destičce	44
4.5	Výsledky testování ve velkém objemu	45
6.	Diskuze	49
7.	Závěr.....	53
8.	Literatura.....	54
9.	Samostatné přílohy	I

1. Úvod

Mikrobiota je důležitým prvkem pro zdraví jedince. Její důležitosti si začali všimnout vědci na přelomu 20. a 21. století, ovšem tento nový orgán není ještě zcela probádán. Je jisté, že je osídlován pozitivními i patogenními bakteriemi. Počet zástupců těchto tříd ovlivňuje jak zdraví, psychiku, imunitu, tak i chování hostitele. Bifidobakterie jsou významnými zástupci probiotických bakterií v lidské mikrobiotě trávicího traktu. Bifidobakterie disponují geny pro syntézu vitamínu K, některých vitamínů skupiny B. V tlustém střevě pomáhají fermentovat komplexní sacharidy na jednodušší. Při fermentaci sacharidů vzniká kyselina octová a mléčná, které snižují pH. Kyselé prostředí chrání střevo před usazením patogennů. Produkty rozkladu polysacharidů zástupců mikrobioty jsou acetát, propionát, butyrát. Je prokázáno, že tyto mastné kyseliny s krátkým řetězcem snižují karcinogenní riziko tlustého střeva, pomáhají při léčbě poruchy střev, Crohnovy nemoci nebo při průjmu a řadě dalších onemocnění. Arzenál pozitivních vlastností mikrobioty, a především prospěšných bakterií, které jsou nositeli benefitů pro zdraví hostitele vede vědce a lékaře k hledání možných cest jak naši mikrobiotu obohatit a zlepšit. K obohacení slouží preparáty zvané probiotika, která obsahují rody prospěšných bakterií. K podpoření růstu těchto pozitivních mikroorganismů se používají látky, zvané prebiotika, které mají za úkol selektivně ovlivňovat růst jen těchto pozitivních bakterií. Ovšem zajištění selektivity je těžké, a tak se hledají vhodné látky, u kterých bude potvrzena podpora růstu jen žádaných bakterií. Tato bakalářská práce se zabývá testováním komerčního produktu NUTRIOSE® jako prebiotického substrátu pro rod *Bifidobacterium*.

2. Cíl práce

Bifidobakterie představují významnou komenzální skupinu mikrobioty trávicího traktu člověka. Druhový výskyt bifidobakterií v trávicím traktu lidí je poměrně stálý. Kvantitativní i druhové zastoupení této bakteriální skupiny můžeme podpořit vhodným prebiotickým substrátem.

Cílem teoretické části této bakalářské práce je vytvořit přehled o výskytu bifidobakterií v trávicím traktu člověka a možnosti jejich podpory pomocí prebiotických substrátů.

Cílem praktické části práce je testování růstu bifidobakterií na komerčním produktu NUTRIOSE® jakožto zdroji dextrinů. Pro porovnání bude do testování zahrnut škrob, který je běžnou součástí diety.

Hypotéza: Bifidobakterie pocházející z trávicího traktu člověka budou schopny využívat dextriny jako například komerční přípravky NUTRIOSE® jako prebiotický substrát

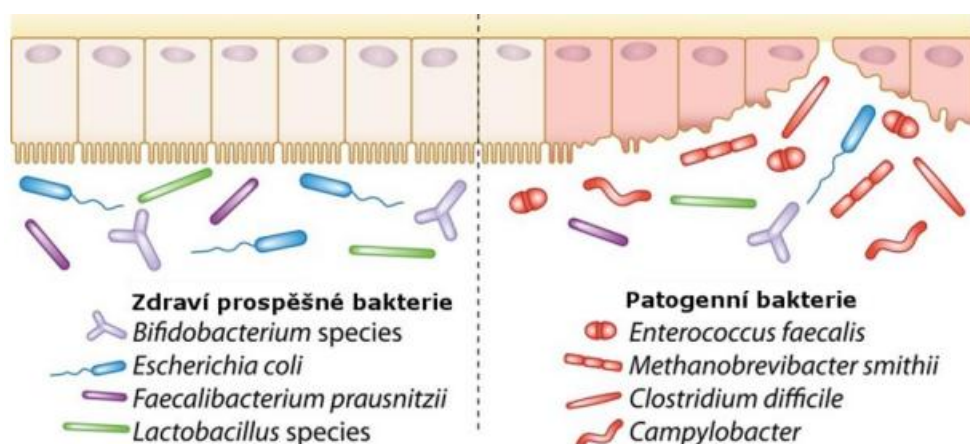
3. Literární rešerše

3.1 Mikrobiota

Mikrobiota gastrointestinálního traktu (GIT) je v dnešní době velmi diskutovaným tématem, neboť se jedná o nový, a dosud ne zcela probádaný orgán. Z již známých výzkumů vyplývá, že mikroorganismy osídlující tlusté střevo hostitele ovlivňují jeho imunitu, chování, psychiku a metabolismus (Frühauf 2017).

GIT je označení pro komplexní ekosystém tvořen bakteriemi, viry, houbami a dalšími mikroorganismy. Ve střevní mikrobiotě se vyskytuje 1000 druhů a 7000 kmenů, což je 10x více než počet buněk lidského těla (Lata 2011). Společenství organismů osídluje kožní část těla, dýchací a močové cesty, a zejména trávicí trubici hostitele (Fryč 2010). Vztah mezi hostitelem a mikrobiotou je oboustranně prospěšný (Foster & McVeyNeufeld 2013).

Podle výše uvedených informací, střevní mikrobiota obsahuje obrovské množství mikroorganismů. Mezi těmito mikroorganismy nalezneme jak ty prospěšné bakterie, tak ty, které se mohou chovat jako patogeny viz Obrázek č. 1.



Obrázek 1: Přehled prospěšných a škodlivých bakterií

(Upraveno podle Milani et al. 2017)

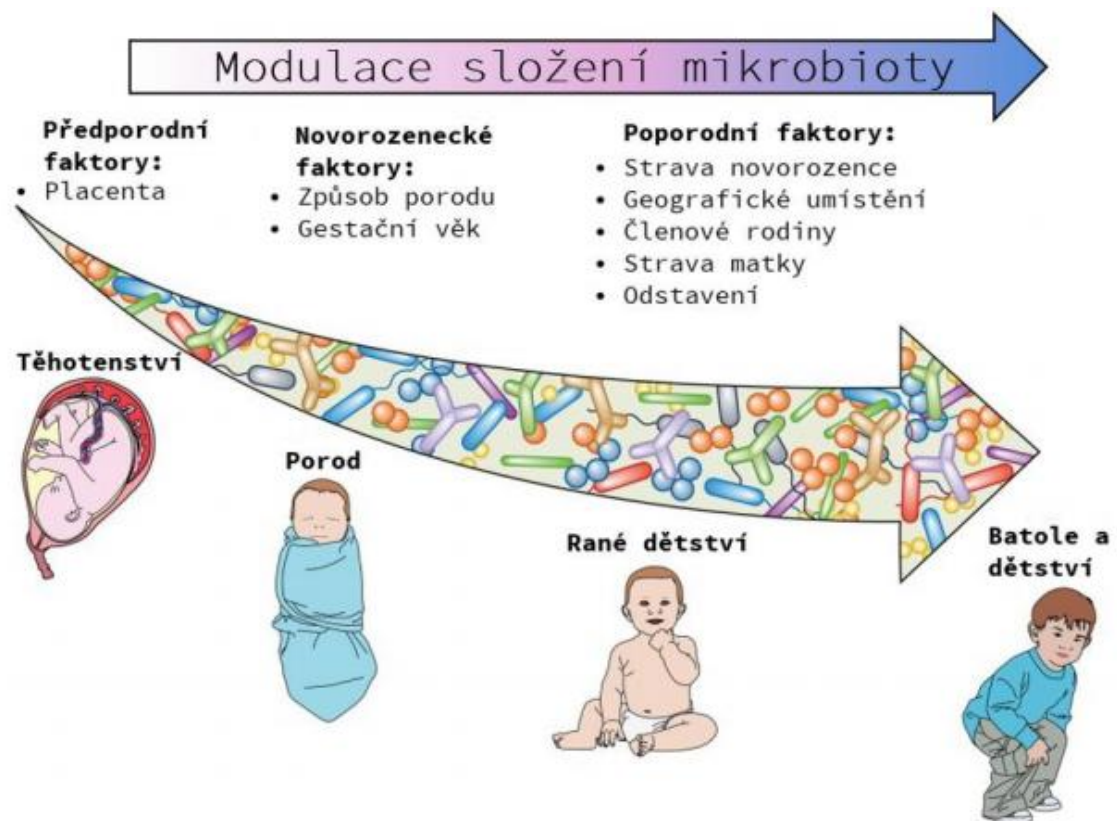
3.1.1 Vývoj mikrobioty

Předpokládalo se, že vývoj mikrobioty začíná až postnatálně, avšak momentálně se zastává názor, že ke kolonizaci gastrointestinálního traktu dochází již během intrauterinního vývoje. Tato část vývoje zahrnuje bezprostřední interkaci mezi plodem a matkou, kdy dochází k osídlení střeva bakteriemi prostřednictvím hematogenního přenosu (orální a střevní osídlení matky) a ascendentní cestou (vaginální osídlení matky). K vývoji slizničního imunitního systému prospívá polykání plodové vody, která taktéž obsahuje bakteriální mikrobiotu. Je tedy jasné, že zastoupení mikroorganismů u novorozence může být nepříznivě ovlivněno, pakliže matka musí během těhotenství užívat antibiotika, která zapříčinují dysbiózu střevního i vaginálního mikrobiomu (Walker 2017).

Ze studie Š. Musilové a spol (2015), vyplývá, že způsob porodu významně ovlivňuje složení bakteriálních kmenů v tlustém střevě. Studie se zaměřila zejména na kolonizaci

prospěšnými bakteriemi rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, které pomáhají k rozvoji imunitního systému. Bifidobakterie byly více zastoupené ve střevě u dětí narozených vaginálním porodem. Děti narozené císařským porodem měly počet bifidobakterií nižší a nacházela se u nich *Clostridium difficile*, jenž může mít spojitost s výskytem ekzému a může přispívat k zánětlivým reakcím (Nimwegen et al. 2011). Roli vývoje imunity u dětí narozených císařským řezem hraje i doba kolonizace laktobacily, která může začít až 10 dnů po porodu a osídlení bifidobakteriemi může být opožděno až o jeden měsíc po porodu (Musilová 2015). Toto zjištění ovlivnilo poporodní ošetření u novorozenců narozených císařským porodem. Lékaři provedou malým vatovým tamponem výtěr vaginálních cest rodičky a dají jej novorozenci k „ožužlávání“. Tím dojde k podobnému spolykání přirozeně se vyskytujících bakterií z matčina těla jako při vaginálním porodu (Filmový dokument 7. 11. 2019)

Vývoj složení mikrobioty v těle od prenatálního období do dětství je zobrazen na Obázku č. 2



Obrázek 2: Vývoj mikrobioty (Upraveno podle Milani et al. 2017)

V neonatálním období je mikrobiota méně rozmanitá než v dospělosti jedince. Složení mikrobioty se odráží i v tom, zdali je dítě kojené mateřským mlékem nebo jeho náhražkou. Ve zdravém lidském mléce jsou přítomny životaschopné komenzálně vzájemné nebo potenciálně probiotické bakterie. Přispívají k dozrávání trávicího a imunitního systému u vyvíjejícího se dítěte a hrají nezastupitelnou roli při podpoře růstu a vývoje (Fernández et al. 2013). Mateřské mléko obsahuje oligosacharidy, aminokyseliny, mikroRNA, vitaminy, minerály, lysozomy a další esenciální látky sloužící k pozitivnímu ovlivnění mikrobioty. Oligosacharidy jsou odolné vůči gastrointestinálnímu trávení, přecházejí do tlustého střeva

bez porušení a fungují jako prebiotikum především pro bifidobakterie a laktobacily. Některé oligosacharidy z mateřského mléka mají funkci tzv. rozpustných receptorů. Díky těmto receptorům je zabráněno uchycení patogenů na epiteliální buňky a pozdějšímu rozvoji onemocnění zapříčiněného kolonizací patogenních mikroorganismů jako jsou například *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* a *Listeria monocytogenes*. Kojenecké výživy zatím nemají takový obsah oligosacharidů s prebiotickými účinky, aby byly schopny napodobit funkce mateřského mléka (Musilová 2015).

Střevní mikroflóra se začíná plně vyvíjet od chvíle, kdy dítě začne konzumovat potraviny zahrnující vlákninu. V této době začíná docházet k osídlení kmeny *Clostridiales* a *Bacteroidales* (Pickard et al. 2017). Postupně ubývá bifidobakterií a dochází k rozšíření laktobacilů a nekultivovaných kmenů. Uspořádání bakteriálního osídlení gastrointestinálního traktu není stálé, mění se v průběhu života. Zastoupení druhů mikrobioty závisí na genetice, změně prostředí, ve kterém se jedinec pohybuje, na skladbě potravy, kterou konzumuje a na mnoho dalších faktorech, které ještě nejsou probádány (Zbořil 2005). U seniorů dochází k velkým změnám ve složení a obsahu bakterií. Snižuje se počet pozitivních bakterií, jako jsou *Bacteroides* a *Bifidobacterium* a zvyšuje se počet negativních rodů *Clostridium*, *Eubacterium* a *Fusobacterium*. Tato změna souvisí se zvýšením pH střevního obsahu až na hodnotu přibližně 7,0–7,5, což může u seniorů způsobit gastrointestinální poruchy (Nowak & Libudzisz 2008).

3.1.2 Vlastnosti mikrobioty

Osídlené střevo bakteriemi slouží k syntéze vitaminů K, B12, niacinu a pyridoxinu viz Obrázek č. 3. Mikroorganismy v tlustém střevě za anaerobních podmínek štěpí komplexní sacharidyna jednodušší. Díky tomu je tělo schopno strávit ovoce a zeleninu. Fermentací sacharidů se ve střevě vytváří mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFAs), zejména acetát, propionát a butyrát (Frühaufl 2017). Tyto mastné kyseliny snižují karcinogenní riziko tlustého střeva, neboť regulují tvorbu zánětlivých cytokinů ve střevě. Usměrnování cytokinů je založena na aktivaci imunitních buněk, které blokuje pro-zánětlivé buňky (Chen 2018). Mezi fermentující bakterie patří druhy z rodu *Bacteroides* a čeledi *Clostridiaceae* a *Lactobacillaceae* (Belizario & Napolitano 2015). Při fermentaci spolu s mastnými kyselinami vzniká energie a plyny v zastoupení vodíku, methanu a oxidu uhličitého. Energií bakterie využijí pro svůj růst a udržování životních funkcí (Sartor, 2008).

Mikrobiota moduluje imunitní systém. Mikroby posílají signály imunitnímu systému tlustého střeva. Díky těmto signálům jsou schopny rozlišit lokální i systémový zánět a rozeznat, zdali se jedná o alergii nebo autoimunitní onemocnění. Mudr. R. Honzák CSc. na své přednášce o mikrobech (12. 4. 2019) zmiňoval, že mikrobiota se podílí na vytváření neurotransmiterů, například serotoninu (5-hydroxytryptamin nebo 5-HT), který je vylučován ve střevě. Udává se, že ve střevě se nachází kolem 95 % serotoninu především uvnitř enterochromafinových buněk a jen 5 % je v mozku. Serotonin je významná enterosolventní signální molekula. Je důležitým faktorem v senzorio-motorických a sekrečních funkcích v kolonu. Aktivuje imunitní buňky ve střevě. Spouští signální transdukcii u T-lymfocytů (Aune et al. 1994) a indukuje proliferaci B-lymfocytů (Freire-Grabal et al. 2003).

Ve střevě dochází k podpoře detoxikaci látek. Jedná se o metabolity z jater vyplavované žlučí do střeva, kde je bakterie zneutralizují (Frühauf 2017). Na Obrázku č 3. je zobrazeno několik vlastností mikrobioty.



Obrázek 3: Hlavní funkce bakterií ve střevě (zdroj: web <https://labiotech.eu/> - upraveno)

Střevní mikrobiota hraje klíčovou roli při metabolizaci různých nutričních substrátů za účelem ovlivnění lidského zdraví (Mohanty et al. 2018). Nárůst chronických metabolických a imunologických poruch v moderní společnosti souvisí se stresem a významnými změnami stravovacích návyků. Tyto chronické stavy jsou spojeny se střevní mikrobiální dysbiózou (Valcheva et al. 2016). Proto je ve střevní mikrobiotě hostitele požadována optimální rovnováha (Mohanty et al. 2018). Mikrobiální dysbiózu lze zlepšit podáním probiotik. Definice probiotik zní: „Probiotika jsou živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v dostatečném množství, poskytují hostiteli zdravotní přínos“ (Hill et al. 2014). Podpoření anebo obnovení těchto bakterií je možné konzumací stimulátorů růstu bakterií, tzv. prebiotik (Vlková et al. 2011).

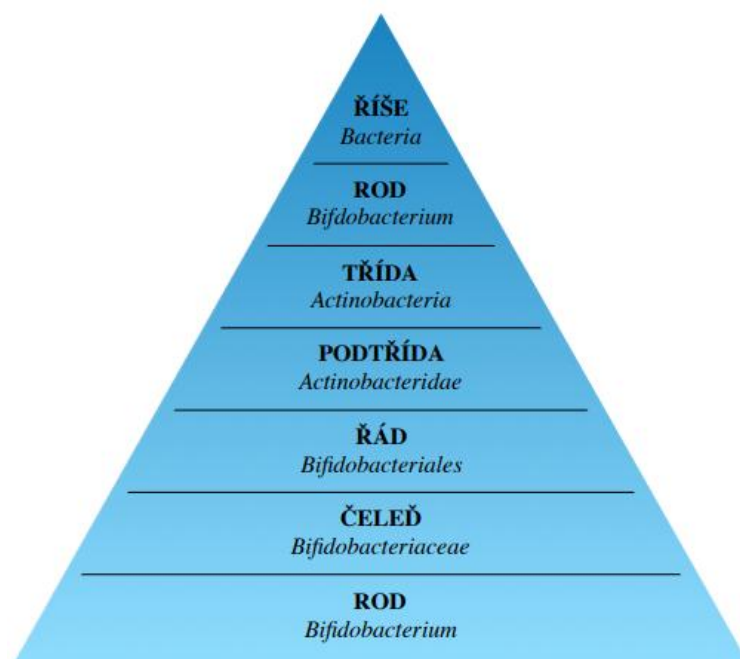
3.2 Bifidobakterie

Bifidobakterie jsou komenzální skupinou bakterií hrající významnou roli ve střevní mikrobiotě. Pro jejich pozitivní vliv na hostitele jsou řazeny mezi probiotické bakterie. Ve fylogenetickém stromu bakterií je rod *Bifidobacterium* řazen do skupiny grampozitivních anaerobních bakterií. Náleží do třídy *Actinobacteria*, jež je jednou z nejpočetnějších taxonomických jednotek. Všechny druhy patřící do rodu *Bifidobacterium* byly identifikovány na základě analýzy genů pro 16S rRNA a 23S rRNA, díky níž byla vylepšena taxonomie a vytvořena nezávislá fylogenetická větev (Ventura et al. 2004) viz Obrázek č. 4. Nově byly vyzolovány nové dva kmeny *Bifidobacterium*, ze lva tamarského a Goeldiho opice,

Bifidobacterium cebidarum sp. nov. a *Bifidobacterium leontopithecii* sp. nov. (Duranti et. Al. 2020). V současnosti se bifidobakterie a jejich taxonomie posuzují především na základě genomických analýz. Příklad takovéto klasifikace je uveden v Obrázku č. 4 (Alberoni et al. 2019).



Obrázek 4: Fylogenetický strom založený na pan-genomové analýze (Alberoni et al. 2019)



Obrázek 5: Taxonomické zařazení rodu *Bifidobacterium* (upraveno podle Ventury et al. 2014)

3.2.1 Historie

Bakterie rodu *Bifidobacterium* byly poprvé objeveny Henri Tissieren, který je roku 1899 izoloval ze stolice kojenců a pojmenoval je *Bacillus bifidus*. Charakterizoval je jako bakterie s podivným tvarem písmene Y, které jsou anaerobní, gram pozitivní a nevytváří žádný plyn během růstu. V roce 1917 byly zařazeny do čeledi *Lactobacillaceae* a o tři roky později je Holland pojmenoval jako *Lactobacillus bifidus*. Přestože Orla-Jensen roku 1947 uznal existenci rodu *Bifidobacterium* jako samostatný taxon, byly tyto bakterie chybně, kvůli své podobnosti s rodem *Lactobacillus*, zaměňovány po dalších 30 let. V roce 1957 si Denhart všiml existence rozmanitých biotopů bifidobakterií a navrhl schéma pro diferenciaci bifidobakterií na základě jejich struktury sacharidové fermentace. Reuter roku 1963 rozpoznal a pojmenoval sedm známých druhů *Bifidobacterium*, včetně prvně popsáno *Bifidobacterium bifidum*. V roce 1965 byla díky Scardovii a Trovatelli objevena charakteristická metabolická dráha bifidobakterií, kde hlavním enzymem je fruktóza-6-fosfát fosfoketoláza. Až v 8. vydání Bergey's manual of determinative bacteriology roku 1974 byl uveden samostatný rod *Bifidobacterium* s 8 druhy. Po zavedení elektroforézy rozpustných buněčných proteinů na polyakrylamidovém gelu bylo objeveno dalších 24 druhů. Prostřednictvím 16S rRNA analýzy byla navržena nová hierarchická struktura shromažďující rod *Bifidobacterium* s rodem *Gardnerella* do jediné čeledi *Bifidobacteriaceae* (Biavati a kol. 2000).

V současnosti rod *Bifidobacterium* zahrnuje okolo 80 druhů a poddruhů (<https://www.bacterio.net/genus/bifidobacterium>) a předpokládá se, že toto číslo poroste.

3.2.2 Výskyt

Bifidobakterie se vyskytují v několika oblastech. V gastrointestinálním a genitálním traktu člověka, v ústní dutině, zvířecím GIT, hmyzím GIT, v potravinách, nalezneme je

i v odpadních vodách. V GIT zvířat a lidí bifidobakterie koexistují s velkým množstvím různých bakterií, z nichž je většina obligátními anaeroby (Venema & Carmo 2015). V tlustém střevě dospělého jedince žije celkem asi 400–500 různých druhů mikroorganismů. Z toho 97 % tvoří striktní anaeroby, především zástupci rodu *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Peptococcus* a *Fusobacterium*. Ve zbylých třech procentech jsou zastoupeny fakultativně anaerobní bakterie z rodů *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Streptococcus* a *Enterococcus* (Vlková et al. 2011). Kmenové zastoupení se liší v různých oblastech traktu.

Institut Zemědělské Microbiologie na Boloňské Universitě v Itálii, vyizoloval přes 7000 kmenů bifidobakterií z různých lidských zástupců a částí těla. Největší počet bifidobakterií byl zaznamenán ve stolici kojenců, pro něž jsou typičtí *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium infantis*. Dále byly kmeny izolovány ze vzorků stolice dospělých, kde se nacházely *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, které se mohou vyskytovat i u novorozenců, a však *Bifidobacterium adolescentis* se nachází výhradně jen u dospělých jedinců.

Výskyt bifidních bakterií ve stolici vedl Mossela k navržení těchto anaerobních bakterií jako indikátoru fekálního znečištění, zejména vod (Jay et al. 2005), což se neujalo vzhledem k náročnosti jejich kultivace v odpadních vodách. Bývá zde detekováno významné množství bifidobakterií, primárně se vyskytují *Bifidobacterium subtile* a *Bifidobacterium minimum* (Ventura et al. 2004).

Velká část popsaných druhů bifidobakterií pochází z trávicího traktu zvířat (Bunešová a kol. 2014). Některé druhy byly izolovány z trávicího traktu hmyzu se sociálním způsobem života (Bunešová a kol. 2014). Dále jsou známy druhy vyskytující se v mléku a mléčných produktech (Alberoni et al. 2019) a v posledních letech bylo více jak 20 druhů izolováno z výkalů novosvětských primátů (Duranti et al. 2019).

3.2.3 Morfologie a fyziologie

Zástupci rodu *Bifidobacterium* netvoří spory, jsou grampozitivní, acidotolerantní, nepohyblivé mikroorganismy. Většina zástupců tohoto rodu nevykazuje katalázovou aktivitu a neredukuje nitráty. Obvykle mají pleomorfní tvar buněk. Tělo bakterií je tvořeno od krátkých pravidelných štíhlých tyčinek, kokoidních pravidelných tvarů, až po dlouhé tyčky s různým typem zakončení. Jejich tvar se mění v závislosti na druhu bakterie a živné půdě, na které jsou kultivované. Vyskytují se jako jednotlivé buňky, řetězce, ve tvaru polymeru, ve tvaru V nebo ve tvaru palisády. Jejich odlišná buněčná morfologie může být užitečná při rozlišování bakterií patřících do tohoto rodu (Scardovi 1986). Kolonie vytvořené na agarových plotnách jsou rovné, konvexní, krémové nebo bílé, lesklé, hladké, upravené, lepkavé a měkké. Na agarových plotnách se kolonie bifidobakterií růstem velmi podobají bakteriím mléčného kvašení (zejména laktobacilům) (Görner 2004).

Bifidobakterie jsou charakterizovány jako nepatogenní. Výjimkou jsou bifidobakterie vyizolované ze zubního kazu, na jehož vzniku se podílejí (Dworkin, et al. 2006). Zubní kaz je způsoben interakcí mezi acidogenními bakteriemi a uhlohydrátovým substrátem, kterým je často sacharóza. Je známo málo faktorů, které ovlivňují kolonizaci chrupu mikroorganismem *B. dentium*. Výskyt na zubním povrchu bez kazu je velmi nízký, avšak hojně se vyskytuje

v hlubokých lézích. To by mohlo být zapříčiněné tím, že výskytem *Streptococcus mutant* a jiných druhů v poškozeném zubu dochází k usnadnění připojení a proliferaci *B. dentium*. Tento druh špatně kolonizuje dentální tvrdé povrchy. Proto může být *B. dentium* považováno za velmi specifický „pozdní marker“ progrese kazu (Henne, et al. 2015).

3.2.3.1 Optimální teplota, pH a citlivost ke kyslíku

Bifidobakterie patří mezi mezofilní bakterie, pro něž je optimální teplota k růstu mezi 20-40 °C. U lidských druhů je teplota růstu kolem 36-38 °C, u zvířecích druhů je teplota vyšší kolem 41-43°C (Gavini et al. 1991). Jedinou výjimkou je *Bifidobacterium thermacidophilum* schopný růstu za mírně termofilních podmínek 49,5 °C (Dong et al. 2000). Na molekulární úrovni bylo zjištěno, že bifidobakterie a mnoho dalších bakterií mají funkční gen DNA K, který má funkci ochrany proti četným nepříznivým podmínkám včetně tepelného šoku a osmotického stresu (Schmidt & Zink 2000). Bylo zjištěno, že exprese tohoto genu se zvyšuje po expozici žlučových solí v bifidobakteriích (Vernazza et al. 2006).

Optimální pH je mezi 6,5 a 7,0. Žádný růst není zaznamenán při pH nižším než 4,5 (pouze *B. thermacidophilum* má zpomalený růst při pH 4) a vyšším než 8,5 (Bottacini et al. 2014). V případě, kdy prostředí dosahuje nižších hodnot včetně 4,1 pH při teplotě 4 °C dochází k vyhynutí většiny druhů těchto bifidobakterií již do jednoho týdne. Téměř pro všechny druhy dokonce stačí méně než tři hodiny při kyselosti pod 2,5 pH, aby došlo k jejich usmrcení (Fuquay et al. 2011).

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou řazeny mezi striktní anaeroby, ačkoli existují i výjimky. Některé druhy mohou kyslík tolerovat a jiné ho tolerují pouze v přítomnosti oxidu uhličitého či v přítomnosti redukčních činidel v kapalných médiích (Kheadr et al. 2007). Většina kmenů nemůže růst v 90 % vzduchu a 10 % CO₂ (Xuedong 2015).

3.2.3.2 Buněčná stěna

Buněčná stěna bifidobakterií má typickou grampozitivní strukturu tvořenou silným 90% peptidoglykanovým obalem složeným z polysacharidů, proteinů, kyseliny teichoové.

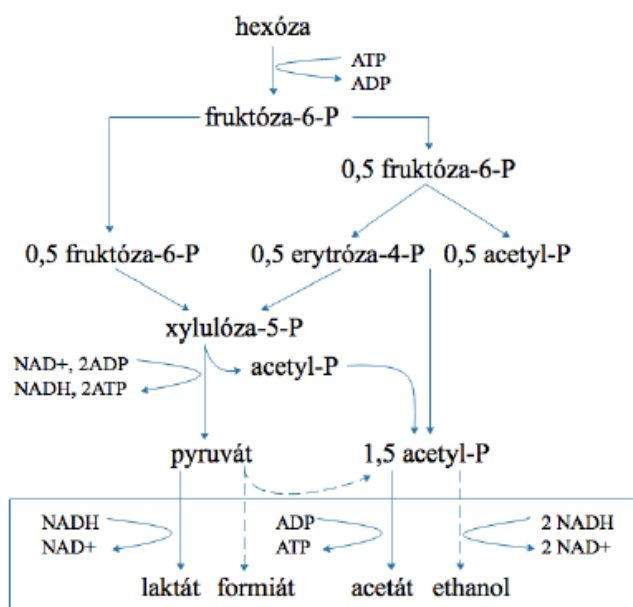
Aminokyselinové složení základních tetrapeptidů mureinu se liší mezi druhy nebo kmeny stejného druhu, díky čemuž je umožněna diferenciací (Lauer & Kandler 1983; Tamime et al. 1995). Obvykle L-alanine, kyselina D-glutamová, L-ornitin a D-alanin tvoří tetrapeptidy, ovšem v některých kmenech může být ornithin nahrazen lysinem. Rozsah zkřížení vazby mezi sousedními tetrapeptidy, tj. spojením mezi jednou nebo více aminokyselinami může pomoci k dalšímu rozlišení mezi kmeny.

Hlavními složkami polysacharidů v buněčné stěně jsou zejména glukóza, galaktóza a ramnóza. Na základě kvalitativní a kvantitativní analýzy můžeme rozeznat od sebe navzájem druhy i kmeny (Nagaoka et al. 1995, 1996).

Lipoteichoové kyseliny tvoří vazby s polysacharidovými řetězci, díky nimž může dojít k adhezi buněk na stěnu střeva. Několik druhů bifidobakterií obsahuje lipoglykany různých struktur, substituované L-alaninem místo obvyklého D-izomeru (Iwasaki et al. 1990). Imunologické studie prokázaly, že lipoteichoové kyseliny jsou běžným antigenem rodu *Bifidobacterium*, které navíc spolu s proteiny tvoří hydrofobní charakter povrchu (Op Den Camp et al. 1985).

3.2.3.3 Metabolismus a substrátová preference

Zástupci rodu *Bifidobacterium* fermentují hexózy v unikátní metabolické dráze označované jako fruktózo-6-fosfátová dráha, ve které je klíčovým enzymem fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza (F-6-PPK). Již v roce 1967 vědci de Vries a Stouthamer prokázali přítomnost enzymu F-6-PPK u bifidobakterií, ale také absenci dvou dalších enzymů, aldolázy a glukóza-6-fosfát dehydrogenázy, které se nacházejí u laktobacilů. U rodu *Bifidobacterium* byly popsány 2 typy tohoto enzymu: fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza, charakteristická pro druhy vyskytující se u člověka a xylulózo-5-fosfát/fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza, charakteristická pro druhy vyskytující se u zvířat. Enzym F-6-PPK je pro rod *Bifidobacterium* jedinečný a je důležitým znakem při jeho identifikaci. U ostatních rodů grampozitivních bakterií, jako jsou například *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Propionibacterium* nebo čeleď *Actinomycetaceae*, se kterými by mohly být zaměněny, není tento enzym přítomen (Fuquay et al. 2011). Enzym štěpí hexózový fosfát na erythros-4-fosfát a acetyl-fosfát (Scardovi & Trovatelli 1965; De Vries et al. 1967). Z fosfátů tetrosy a hexózy postupným působením transaldelázy a transketolázy, se tvoří pentózové fosfáty, které obvyklým 2.–3. štěpením získávají kyselinu mléčnou a kyselinu octovou v teoretickém konečném poměru 1,0: 1,5. Kyselina mléčná a octová okyselují tlusté střevo a omezují hnilobu a potenciálně patogenní bakterie. Dalšími vedlejšími produkty mohou být kyselina mravenčí, etanol a kyselina jantarová, jejichž produkce může změnit rovnováhu kvašení, tedy poměr kyseliny mléčné a kyseliny octové. Různé druhy produkují za stejných podmínek různá množství octanu, laktátu a etanolu (Biavati et al. 2000). Kyselina mravenčí a etanol jsou spolu s malým množstvím kyseliny octové vytvářeny při degradaci pyruvátu. Kyselina jantarová vzniká při fixaci CO₂ bakteriemi (Meulen et al. 2006). Oxid uhličitý se touto dráhou nevytváří, vzniká však při degradaci glukonátu (Ventura et al. 2004).



Obrázek 6: Fruktózo-6-fosfátová cesta (upraveno podle Amarettiho et al. 2007)

Stejně jako většina střevních bakterií, bifidobakterie jsou sacharolytické: získávají uhlík a energii fermentací hostitelských a ve stravě přijatých sacharidů. Všechny bifidobakterie lidského původu jsou schopné fermentovat glukózu, galaktózu, laktózu a většinou i fruktózu, rafinózu a sacharózu jako zdroj uhlíku. Využití uhlohydrátů mezi těmito bakteriemi je druhově specifické viz Tabulka č. 1. Některé druhy dokážou fermentovat pouze čtyři sacharidy, do této skupinky spadá *B.bifidum*, kdežto *B. adolescentis* zvládá využít až 19 různých sacharidů (Fuquay et al. 2011). Bifidobakteriální genomy kódují velký arzenál proteinů schopných katabolizovat komplexní uhlohydráty. Tato rozsáhlá schopnost bifidobakterií metabolizovat sacharidy svědčí o tom, že specifické genetické adaptace těchto bakterií přetrvávají a přežívají v konkurenčních prostředích bohatých na komplexní polysacharidy (Cronin et al. 2011). Schopnost bakterií degradovat a metabolizovat uhlohydráty s různou úrovní polymerace a substituce, obsahujících velké množství glykosydických vazeb, přispívá ke konkurenční schopnosti daného kmene v GIT (Turroni et al. 2008; Guarner & Malagelada 2003). Předmětem fermentace pro bifidobakterie mohou být fruktooligosacharidy (FOS), galaktooligosacharidy (GOS) a inulin, které projdou žaludkem a tenkým střevem bez degradace. Jedná se o prebiotika, která jsou definována jako „selektivně fermentovaná složka, která umožňuje specifické změny, a to jak ve složení, tak v aktivitě gastrointestinální mikrobioty, která zlepšuje zdraví hostitele“ (Hijova et al. 2009). Tyto nestravitelné polysacharidy selektivně stimulují proliferaci a aktivitu populací probiotických bakterií (Gibson 1998).

Prebiotika se nachází přirozeně v mnoha potravinách rostlinného původu, jako jsou zejména cibule, artyčoky, chřest, pór a česnek. Při průchodu tlustým střevem se neabsorbované uhlovodíky, jako jsou FOS, GOS a inulin, hydrolyzují na příslušné cukry. Tyto cukry jsou fermentovány na SCFAs. Mastné kyseliny jsou poté vstřebány epitelem tlustého střeva a stimulují růst kolorektálních slizničních buněk (Rossi et al. 2005). Dále mohou prebiotické oligosacharidy poskytovat zdravotní benefity skrze jejich anti-adhezivní aktivitu. Konkrétně tyto oligosacharidy mohou přímo inhibovat infekce. Mají schopnost jevit se jako strukturální napodobeniny vazebných míst pro patogeny na povrchu gastrointestinálního epitelu (Shoaf et al. 2006). FOS a GOS se řadí mezi nejčastěji používaná prebiotika na trhu v Evropě a Japonsku (Cronin et al. 2011).

Tabulka 1: Fermentace sacharidů dle druhu bifidobakterie (upraveno podle Fuquay et al., 2011)

Druh/ cukr	Ribóza	Cellobióza	Sorbitol	Xylóza	Manóza	Fruktóza	Sacharóza	Maltóza	Laktóza
<i>B. adolescentis</i>	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
<i>B. angulatum</i>	+	-	+/-	+	-	+	+	+	+
<i>B. animalis</i>	+	+/-	-	+	+/-	+	+	+	+
<i>B. bifidum</i>	-	-	-	-	-	+	+/-	-	+
<i>B. breve</i>	+	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+
<i>B. catenulatum</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>B. dentium</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>B. infantis</i>	+	-	-	+/-	+/-	+	+	+	+
<i>B. longum</i>	+	-	-	+/-	+/-	+	+	+	+
<i>B. pseudolognum</i>	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+/-
<i>B. pseudocatenulatum</i>	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+

+ pozitivní reakce, - negativní reakce

Vernazza et al. (2006) testovali substrátové preference na pěti bifidobakteriálních kmenech - *B. adolescentis* DSM20083, *B. infantis* DSM20088, *B. Laris* Bb12, *B. longum* 46, *B. longum* DSM20219. Porovnávaly se kmeny v rychlosti růstu závisící na určitém druhu uhlíku. Výsledky ukazují, že mezi bifidobakteriemi byly upřednostňovány prebiotické oligosacharidy. GOS byly fermentovány všemi testovanými bifidobakteriemi, a dokonce byly lépe využívány než glukóza. Dále bylo zjištěno, že isomaltooligosacharidy (IMO) vysoce podporovaly růst bakterií, podobně jako GOS. Růst u bifidobakterií byl taktéž podpořen disacharidem laktulózou. Studie prokázala, že maltodextrin vykazuje selektivní vlastnosti, protože nebyl využíván všemi kmeny bakterií.

Dalším bifidogenním faktorem (látky procházející gastrointestinálním traktem hostitele až do tlustého střeva, kde jsou později zmetabolizovány mikrobiotou) jsou sacharidy obsahující N-acetylglukosamin a N-acetyllaktosamin, laktoferin, laktulózu a laktinol, stachyozu, xylooligosacharidy (D-xylan), a κ -kasein (Rossi et al. 2005).

Bifidobakterie disponují také některými extracelulárními enzymy, které hydrolyzují polysacharidy jako amylopektin, amyulóza a xylan (Scardovi 1986). Extracelulární glykosylhydrolázy rozkládají špatně štěpitelné rostlinné polysacharidy, glykoproteiny a glykokonjugáty (např. arabinogalaktany, arabská guma, atd.) (Schell et al. 2002). Studie zaměřené na druhy bifidobakterií specifikovaly enzymy, jako je *apuB* u *B. breve* (UCC2003), u níž bylo dokázáno, že je zodpovědný za rozklad velkých molekul škrobů a škrobových polysacharidů (Cronin et al. 2011).

Jako zdroj dusíku využívá většina druhů amonné soli (Ventura et al. 2004). Pomocí různých druhů deamináz a dehydratáz mohou tyto bakterie fermentovat aminokyseliny. Druh *B. longum* vytváří více než 20 peptidáz, které odštěpují aminokyselinové zbytky

z proteinových substrátů (Schell et al. 2002). Díky analýze dostupných bifidobakteriálních genomových sekvencí je zřejmé, že bakterie disponují genem pro syntézu alespoň 19 aminokyselin. Taktéž jsou schopny kódovat enzymy potřebné k biosyntéze, jak pyrimidinových a purinových nukleotidů, tak k syntéze určitých vitamínů skupiny B i K.

Většina kmenů je schopna biosyntézy vitamínů, jako je: thiamin (B1), pyridoxin (B6), kyselina listová (B11) a nikotinová kyselina (niacin, B3). Některé kmeny navíc disponují genem pro vytvoření vitamínu B2 tzv. riboflavinu (Ventura et al. 2009). Schopnost produkce určitých vitamínů pomocí bifidobakterií vědce přiměla ke zkoumání možného probiotického znaku. 76 kmenů rodu *Bifidobacterium*, patřících do 9 různých druhů, bylo testováno na produkci folátu a schopnost poskytovat proliferující kolonocyty s kyselinou listovou. Požití identifikovaných bifidobakteriálních kmenů produkujících folát by mohlo být použito k prevenci nebo potlačení lokalizovaného deficitu folátu, které je spojeno s premaligními změnami v epitelu tlustého střeva (Pompei et al. 2007).

3.3 Prebiotika

3.3.1 Vývoj definice

V roce 1921 popsal Rettger & Cheplin experimenty s lidmi, jejichž mikrobiota byla po konzumaci uhlohydrátů obohacena laktobacily. Zjištění, že v tlustém střevě je nadvláda anaerobů, kteří čerpají energii z fermentace sacharidů ze stravy, odstartovalo výzkum, který hrál důležitou roli v mnoha dalších mikrobiomových projektech (Gibson et al. 2017). Prebiotika byla původně popisována jako nestravitelná složka potravy v GIT, která je substrátem pro růst bakterií v tlustém střevě, a ty následně pozitivně ovlivňují zdraví hostitele. Tato definice byla zavedena v roce 1995 Gibsonem a Roberfroidem. Podle tohoto popisu bylo za prebiotika považováno pouze několik sloučenin uhlohydrátové skupiny, zejména beta-fruktany s krátkým a dlouhým řetězcem (FOS a inulin), GOS a laktulóza (Gibson et al. 2010). V roce 2004 byla definice prebiotik aktualizována na „selektivně fermentované složky, které umožňují specifické změny, a to jak ve složení, tak v aktivitě gastrointestinální mikrobioty, což přináší výhody pro zdraví hostitele“ (Gibson et al. 2004). Podle tohoto tvrzení byla pro prebiotika požadována tři kritéria:

- 1) schopnost odolat rozložení substrátu v GIT hostitele (například žaludeční kyselost, hydrolýza enzymy, gastrointestinální absorpce)
- 2) fermentace sacharidů střevními mikroorganismy
- 3) selektivní stimulace růstu a/ nebo aktivita střevních bakterií díky podaným látkám pozitivně ovlivňuje zdraví hostitele (Gibson et al. 2017).

Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) a Organizace spojených národů (OSN), uspořádala v roce 2008 setkání s cílem aktualizovat definici prebiotik. Tato schůze navrhla, aby prebiotika byla znovu definována jako „neživotoschopná složka potravin, která přináší zdravotní přínos pro hostitele spojený s modulací mikrobioty“ (Piniero 2008). Zde byla jako kritérium odstraněna selektivní fermentace, ale přitom byla definice kritizována za to, že nevyklučuje antibiotika. Gibson a kolektiv o 2 roky později, definovali užší kategorii „dietních prebiotik“ jako „selektivně fermentovanou složku, která vede ke specifickým změnám ve složení a/ nebo aktivitě gastrointestinální mikrobioty, a tak přináší příznivé účinky na zdraví

hostitele“. V roce 2015 Bindels a kolektiv přichází s další novou formulací a to, že prebiotika jsou: „nestravitelné sloučeniny, které díky metabolizaci mikroorganismů v tlustém střevě modulují složení a/ nebo aktivitu střevní mikrobioty, čímž poskytují hostiteli prospěšný fyziologický účinek“. Tato definice determinovala interakci prebiotik se střevní mikrobiotou (s výjimkou extraintestinálních míst, jako je vagina a kůže) a odstranila požadavek na selektivní fermentaci. Důležité však bylo, že toto tvrzení zdůrazňovalo funkční účinky prebiotik na mikrobiotu (Gibson et al. 2017).

V roce 2016 Mezinárodní vědecká asociace probiotik a prebiotik (ISAPP) upravila definici prebiotik na: „substrát, který je selektivně využíván hostitelskými mikroorganismy, které poskytují zdravotní přínos“. Z této definice je zřejmé, že prebiotika mohou vyvolat změny jakéhokoli hostitelského mikrobiálního ekosystému, nejen tlustého střeva. Nicméně, prebiotika v potravě by měla být hostitelem stále nestrávena a využívána mikrobiotou. Ačkoli většina současných prebiotik je podávána orálně, mohou být také aplikována přímo na jiná, mikrobiálně kolonizovaná, místa těla, jako je vaginální oblast a kůže. Je dokázáno, že prebiotika přesahují stimulaci bifidobakterií a laktobacilů a ovlivňují i další prospěšné taxony, včetně *Roseburia*, *Eubacterium* nebo *Faecalibacterium*. Tyto bakterie produkují SCFAs. Důležité je, aby metabolity vzniklé pomocí bakterií byly prospěšné pro zdraví hostitele. Účinky prebiotik na zdraví se vyvíjejí. V současné době zahrnují přínosy pro GIT (inhibice patogenů, stimulace imunitního systému), kardiometabolismus (snížení hladiny lipidů v krvi, účinky na inzulínovou rezistenci), duševní zdraví (metabolity, které ovlivňují mozkovou funkci, energii a kognitivitu) (Gibson et al. 2017).

3.3.2 Prebiotický účinek a selektivita

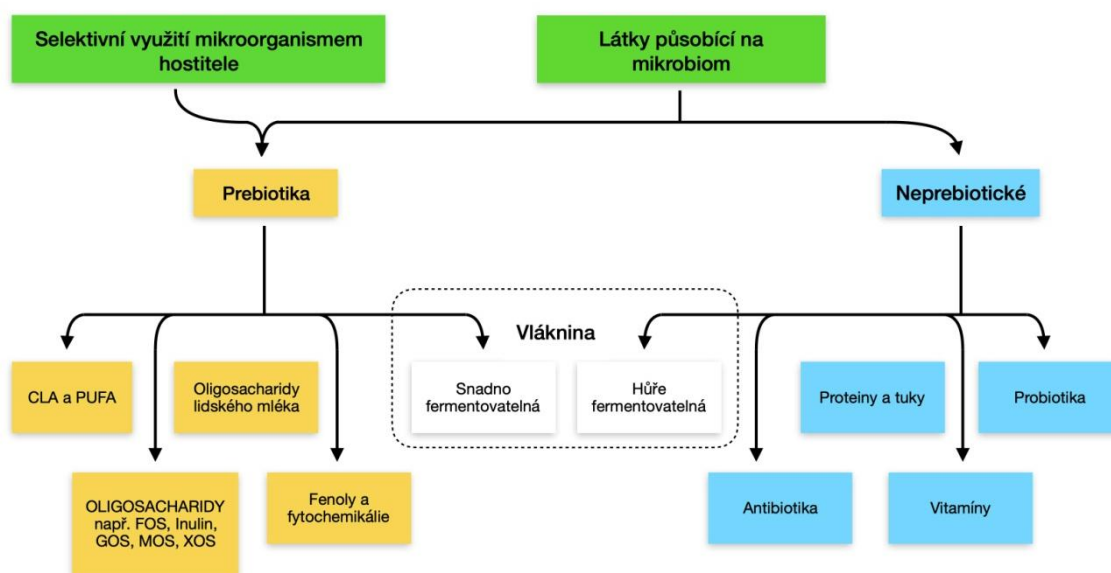
Prebiotikum slouží jako selektivní substrát, využitý pouze určitými (užitečnými) bakteriemi tlustého střeva. Hlavními produkty bakteriální fermentace jsou SCFAs (acetát-produkovaný zejména bifidobakteriemi, propionát a butyrát). Jsou to důležité sloučeniny ovlivňující zdraví hostitele (Koh et al. 2016). SCFAs hrají důležitou roli v mechanismu odpovědnému za inhibici enteropatogenů snížením pH v GIT (Mohanty 2018). Jsou klíčové při prevenci a léčbě metabolického syndromu, poruch střev a rakoviny, ochraně před obezitou indukovanou dietou a regulací střevních hormonů nebo pozitivní účinek na léčbu ulcerózní kolitidy, Crohnovy choroby a průjmu souvisejícího s antibiotiky a obezitou (Míguez et al. 2016). Díky SCFAs dochází ke snížení produkce hnilobných sloučenin, jako jsou amoniak, fenol, indol a mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem (Holscher et al. 2015).

Určit, které látky mohou být prebiotikum je složité. K dispozici jsou jak *in vitro*, tak *in vivo* metody. Důležité je, aby díky produktu rostlo definované rozmezí mikroorganismů (bifidobakterie, laktobacily) produkujících například SCFAs. Jestliže se jedná o selektivní látku, dojde k rozšíření konkrétních mikroorganismů oproti kontrole a k celkovému pozitivnímu zdravotnímu účinku. Pokud se však na tvorbě SCFAs podílejí patogenní mikroorganismy, které se rozmnoží a u hostitele dojde k negativním výsledkům, potělátku nelze nazvat prebiotikem. Zařazení vlákniny jako prebiotikum je komplikováno skutečností, že vláknina z potravy může být prebiotikem u jednoho hostitele, ale ne u druhého (Gibson et al. 2017).

Prebiotika by po požití neměla ve střevní mikrobiotě lidí způsobovat problémy s plynatostí. I zde musí být jejich fermentace selektivní a přednostně zahrnovat rody, které netvoří plyny [např. *Clostridium* plyny tvoří (Šilhánková 2002)].

Substráty, které ovlivňují složení mikrobioty prostřednictvím mechanismů, které nezahrnují selektivní využití hostitelskými mikroorganismy, nejsou prebiotika viz Obrázek č. 7. Mezi tyto substráty patří antibiotika, minerály, vitamíny, které nejsou růstovými substráty, přestože by jejich příjem mohl změnit mikrobiotiku a metabolické složení (Gibson et al. 2017).

Nejčastěji konzumovaná prebiotika jsou FOS, GOS, inulin, laktulóza a oligosacharidy mateřského mléka (OMM). Seznam potenciálních prebiotik stále roste, přestože důkazy o nich, obzvláště u lidí, nejsou prozatím tak dobře známy jako u FOS a GOS. Některá prebiotika jsou již komerčně dostupná, ale řada dalších je v počátečním stadiu vývoje (Belorkar & Gupta 2016; Míguez et al. 2016). Kromě toho substrát, který se kvalifikuje jako prebiotikum, může také záviset na cílovém místě. Například xylitol lze považovat za prebiotikum v ústní dutině, ale jinde v těle se ukázalo, že prebiotikem není (Roberfroid et al. 2010). Na Obrázku č. 7 je diagram látek dělící se na prebiotika a neprebiotické látky, které ovlivňují mikrobiom. CLA je konjugovaná kyselina linolová, která je obsažena v červeném mase a mléčných výrobcích (Tvrzická a kol. 2007). PUFA je používaná anglická značka pro polynenasycené mastné kyseliny. PUFA dělíme na omega-3 a omega-6 (Nevrlá & Matějová 2015). MOS jsou mananoligosacharidy izolovány z buněčných stěn kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Používají se především jako doplňky stravy pro zvířata, většinou u ryb (Gelibolu et al. 2018). Zkratka XOS je pro xylooligosacharidy. Vyrábí se enzymatickou hydrolyzou pomocí endoxylanasy z polysacharidu xylan, který je extrahován většinou z kukuřice (Gibson a kol. 2004).



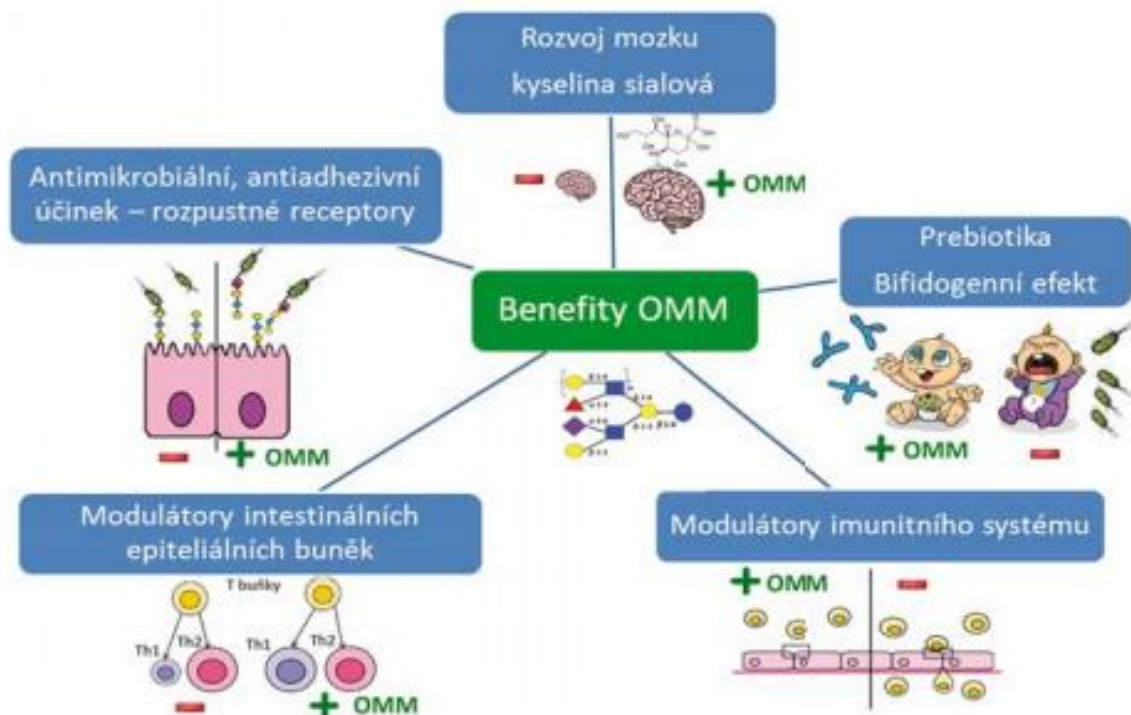
Obrázek 7: Rozlišení toho, co je prebiotikum (upraveno podle Gibson et al. 2017)

3.3.3 Oligosacharidy

Dietní prebiotika, která jsou do značné míry dokumentována jako prospěšná pro zdraví, jsou nestravitelné oligosacharidy fruktany a galaktany (Rastal et al. 2015). Protože jsou nestravitelné, jsou k dispozici pro hydrolýzu hydrolytickými enzymy v tlustém střevě a podporují růst prospěšných bakterií před růstem škodlivých (Venter 2017). Oligosacharidy slouží jako vazebná místa pro toxiny enteropatogenů, které se díky tomu nenaváží na střevní stěnu (Rudolfová & Čurda 2005). Z řady experimentů je zřejmé, že jsou oligosacharidy přednostně metabolizovány bifidobakteriemi (Roberfroid et al. 2010). Jsou to látky ze složených cukrů, které se skládají z několika monosacharidových jednotek (2–10). Jsou běžně dostupné v rostlinných složkách, ale i v živočišných produktech (med a mléko). Mezi hlavní zástupce patří GOS, FOS, inulin, IMO, OMM, sójové-oligosacharidy (SOS), oligofruktóza (OS), rafinóza a mnoho dalších (Venter 2017). Vazby ve FOS a GOS mohou být snadno degradovány enzymy p-fruktanosidázy a p-galaktosidázy, které jsou v bifidobakteriích převládající. Zdá se, že tento rod také přednostně metabolizuje délku řetězce typickou pro oligosacharidy.

3.3.3.1 Oligosacharidy mateřského mléka – OMM

Mateřské mléko obsahuje komplex biologicko-aktivních látek, jako jsou sacharidy (zejména oligosacharidy), aminokyseliny, vitaminy, minerály a další esenciální živiny, které pozitivně ovlivňují vývoj střevní mikrobioty během raného dětství (Musilová 2015). Mateřské mléko obsahuje více než 100 různých sloučenin, které se liší mezi matkami, během období kojení a v období při předčasném narození dětí (Smilowitz et al. 2013). Nejvyšší koncentraci OMM obsahuje kolostrum 20-25 g/l, poté jejich obsah klesá a pohybuje se v rozmezí 5-20 g/l (Chaturvedi et al. 2001). OMM jsou zvláště důležité pro vývoj střevní mikroflóry novorozeného dítěte. Přispívají k vývoji mozku, zlepšují kognitivní funkce kojence. Díky OMM se vyvíjí metabolický a imunologický systém, který ovlivňuje zdraví později v životě (Gibson et al. 2017). OMM tvoří skupinu složitých glykanů, které jsou složeny z pěti základních stavebních kamenů L-fukosy, D-glukosy, D-galaktosy, N-acetylglukosaminu a N-acetylneuraminové kyseliny (kyseliny sialové) (German, 2008). Tyto glykany jsou odolné vůči GIT trávení. Pro novorozené děti představují první prebiotikum (Musilová 2015). Užívání mateřského mléka obsahujícího OMM jasně zvyšuje podíl *Bifidobacteriaceae* a *Bacteroidaceae* (Canfora et al. 2015). Genomová sekvence prokazuje, že *B. longum* subsp. *infantis* je jediný *Bifidobacterium* spp., který je schopen využít celé OMM. Výjimá se velkým množstvím genů glykosylhydrolázy (GH), které se podílejí na enzymatickém zpracování OMM (Thomson et al. 2018). U dospělých převládají zejména *B. longum* subsp. *longum*, *B. adolescentis* a *B. animalis* subsp. *lactis*, avšak jim chybí mnoho enzymů nezbytných pro přímé účinné využití OMM (Gibson et al. 2017). OMM mohou zabraňovat uchycení patogenů na epitelových buňkách střeva, protože jsou umístěny na slizničních receptorech. Tento mechanismus brání patogenům přilnout na slizniční epitel kojence a zabraňuje rozvoji onemocnění (Musilová 2015). Na Obrázku č. 8 jsou popsány benefity OMM.



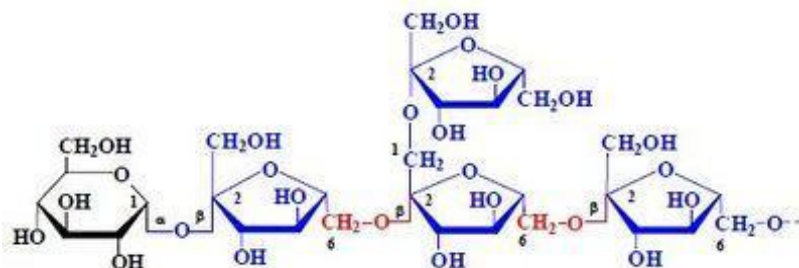
Obrázek 8: Vliv oligosacharidů mateřského mléka (upraveno podle Bode, 2012)

3.3.3.2 Fruktooligosacharidy – FOS

FOS jsou přírodní látky vyskytující se v jednoděložných, dvouděložných rostlinách a zelených řasách (Benkeblia 2013). Jedná se o větvené či lineární polymery D-fruktózy, které jsou spojeny vazbou β -2,1 typ inulin nebo vazbou β -2,6 typ levan. Typ vazby záleží na enzymu použitým pro syntézu. Enzymem při syntéze rostlinných fruktanů je často sacharóza-sacharóza fruktosyl transferáza (Kaur & Gupta 2002). FOS jsou látky s nízkým stupněm polymerace fruktózy, zatímco fruktany spadají do kategorie vyšších polymerů (více než 10 podjednotek) (Yun1996; Pontis 1999). FOS a jejich účinek na bifidobakterie jsou dnes velice dobře zdokumentovány a jsou považovány za důležité prebiotické substráty (Gibson et al. 2010). Tyto látky jsou hojně používané v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Používají se pro zlepšení absorpce minerálů v těle (Lopez et al. 2010). Mají antioxidační a hepatochranné funkce (Chen et al. 2011). Přímým působením na buňky indukují protizánětlivé cytokiny a dochází k imunomodulaci (Vogt et al. 2015). Bylo zjištěno, že při 3-6 g/den FOS dochází k redukci toxických složek a nežádoucích enzymů ve střevě o 40-45 %. Ovšem průměrná spotřeba odpovídá 0,8 g/den (Urgel & Orleans 2001).

Fermentace FOS je umožněna hydrolytickým enzymem β -fruktofuranosidáza, který byl popsán u několika druhů *Bifidobacterium* jako např. *B. adolescentis*, *B. breve* a *B. animalis subsp. laris* (Ehrmann et al. 2003, Ryan et al. 2005).

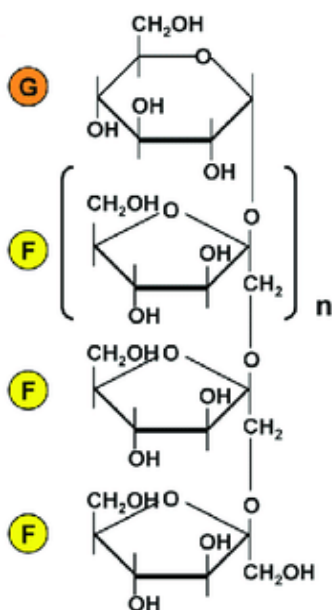
FOS Mohou být rozděleny do tří hlavních typů: inulinová skupina, levanová skupina (chemická struktura viz Obrázek č. 9) a rozvětvená skupina.



Obrázek 9: Glukofruktan levanového typu (www.vscht.cz, CHEMIE POTRAVIN - cvičení SACHARIDY)

3.3.3.2.1 Inulin

Inulin řadíme do jednoduchých FOS. Je složen z lineárního řetězce fruktózovými zbytky vázaných na β -2,1. Tento řetězec fruktofuranos je zakončen D-glukosou (Benkeblia 2013) viz Obrázek č. 10. Inulin je tvořen 97 % fruktózy a 3 % glukózy. Jedná se o bezbarvou látku mikrokrytalické struktury, která se dobře rozpouští v horké vodě. Není štěpen amylózou, a tak jej živočišný organismus neumí využít. Chová se jako rozpustná vláknina (Kaur & Gupta 2001).



Obrázek 10: Chemická struktura inulinu, F= fruktóza, G=terminální glukóza
Dostupné z (<https://www.researchgate.net/>)

V rostlinách se inulin vyskytuje jako zásobní polysacharid. Nalezneme ho například v zelenině, ovoci, luštěninách, ořeších apod. Nejvíce je zastoupen v česneku, cibuli, chřestu, čekance, jeruzalémském artyčoku, banánech, pšenici a pórku (Kaur & Gupta 2002). Viz Tabulka č. 2.

Tabulka 2: Obsah inulinu v některých rostlinách (g/100 g) (upraveno podle Ebringer, 2002)

Druh ovoce/ zelenina	Obsah inulinu g/ 100g
Cibule	2 – 7
Česnek	9 – 16
Pórek	3 – 10
Artyčok	3 – 10
Čekanka (kořen)	35 – 47
Topinambur (hlíza)	16 – 20
Chřest	4 – 18
Pampeliška	12 – 15
Banán	0,3 – 0,7
Rýže	0,5 – 1,0
Ječmen	0,5 - 1,5
Pšenice	1 – 4

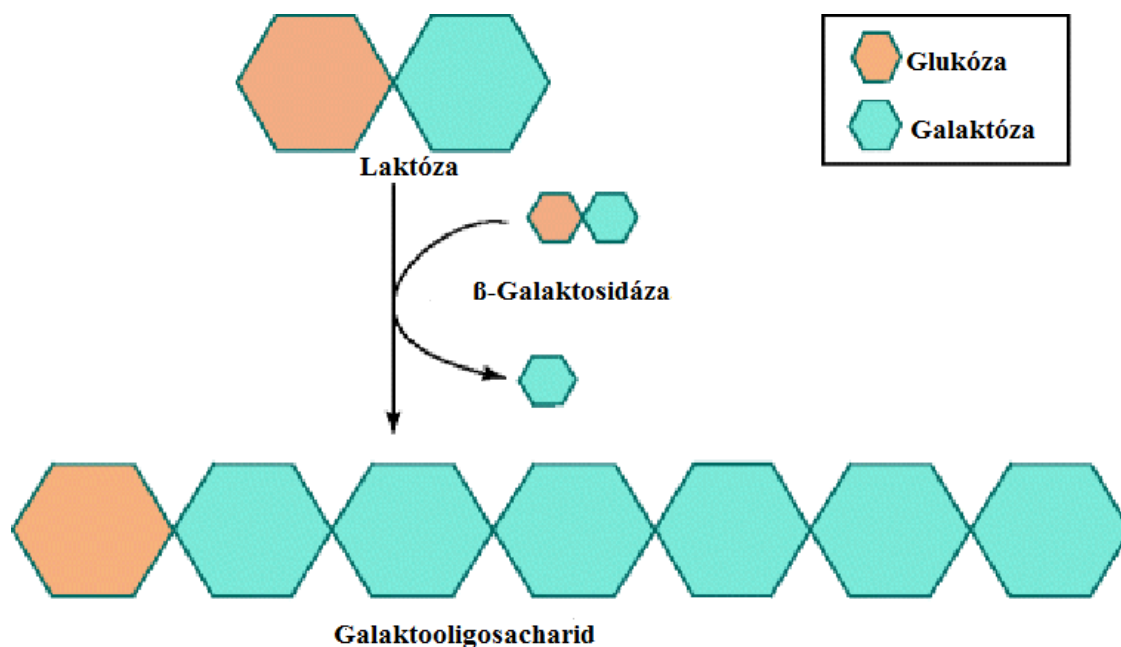
V řadě studií *in vitro* bylo prokázáno, že inulin selektivně podporuje růst bifidobakterií (a v menším rozsahu i laktobacilů) na úkor patogenních bakterií (Gibson et al. 2010). Gibson a Wang zkoušeli v roce 1994 experiment, kdy porovnávali fermentaci FOS a fruktanů s řadou referenčních sacharidů. Zjistili, že bifidobakterie přednostně fermentovaly složité cukry a rozmnožovaly se, zatímco patogenní mikroorganismy jako např. *Escherichia coli* a *Clostridium perfringens* se vyskytovaly v nízké koncentraci a nefermentovaly FOS a inulin. Další studie potvrdily zvýšenou schopnost bifidobakterií fermentovat tyto substráty ve srovnání s glukózou (Kolida et al. 2002). Kaplan a Hutkins (2000) zkoušeli selekci 28 bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií z hlediska jejich schopnosti fermentovat inulin a oligofruktózu na agaru. Celkem 12 z 16 laktobacilů a 7 z 8 bifidobakterií bylo schopno fermentovat substráty (Kolida et al. 2002).

Gibsona et al. (1995) zkoušel 45denní pokus zaměřen na selektivní stimulaci bifidobakterií inulinem a oligofruktózou na 8 dospělých mužích. Testovaným jedincům byla přísně kontrolovaná strava. Nejprve denně konzumovali 15 g sacharózy za první dva týdny. Následující dva týdny byla sacharóza zaměněna za 15 g oligofruktózy na den. Čtyřem z nich pak bylo po další dva týdny podáváno 15 g inulinu/den. Experiment ukázal, že příjem inulinu i oligofruktózy stimuloval rozvoj bifidobakterií, které se staly početně nejzastoupenějším druhem. Zatímco byl zredukován počet bakterií rodu *Bacteroides*, klostridií, fusobakterií a gramnegativních koků. Tento prebiotický efekt trval pouze po dobu konzumace prebiotik (Kolida et al. 2002). Existuje několik studií na odlišných kontinentech světa, kde mají obyvatelé odlišné zastoupení mikrobioty. V těchto testech byl zkoumán jen samotný inulin. Pozoruhodným výsledkem bylo, že u všech testovaných jedinců inulin vykazoval vždy prebiotický účinek – byl zvýšen počet bifidobakterií (Gibson et al. 2010).

Inulin se používá v potravinářství jako náhrada za jednoduchý cukr či tuk, aby bylo dosaženo snížení energetické hodnoty daného výrobku. Nalezneme ho například v mražených krémech, kde inulin ovlivňuje stabilitu výrobku. V mléčných výrobcích anebo cukrovinkách (Niness 1999). Má nízkou energetickou hodnotu 1,5 kcal kvůli nestravitelnosti v organismu (Nyman 2002). Studie prokázaly, že množství 5 g inulinu na den je dobře tolerováno zdravými lidmi. Toto množství nezpůsobuje nadýmání (Ripoll et al. 2010)

3.3.3.3 Galaktooligosacharidy – GOS

GOS jsou látky živočišného původu. Jedná se o oligomery galaktózy spojené s koncem glukózy nebo galaktózy viz Obrázek č. 11. Průmyslově se vyrábějí z vysoce koncentrovaného roztoku laktózy, který se získává z kravského mléka transgalaktosylací hydrolázovým enzymem β -galaktosidáza (Playne & Crittenden 1996).



Obrázek 11: Schéma GOS (upraveno podle: Whisner C. M. and Weaver C. M; 2013)

GOS mají příznivé účinky na zdraví. Napomáhají absorpci hořčíku a vápníku (Chonan et al. 1996, Van den Heuvel et al. 2000). Stimulují imunitní systém (Vulevic et al. 2008). V roce 1993 byla poprvé popsána schopnost GOS provádět změny v mikrobiotě lidského střevního traktu (Ito et al. 1993). Pomáhají k inhibici patogenů ve střevě, které se na GOS navážou (Sinclair et al. 2009; Tzortzis et al. 2005). Používají se při syndromu dráždivého tračníku a zabraňují průjmu (Drakoularakou et al. 2010). Několik studií prokázalo, že dávka 5-15 g GOS na den by měla zmírnit symptomy spojené se zácpou, především u dospělých a starších lidí (Niittynen et al. 2007).

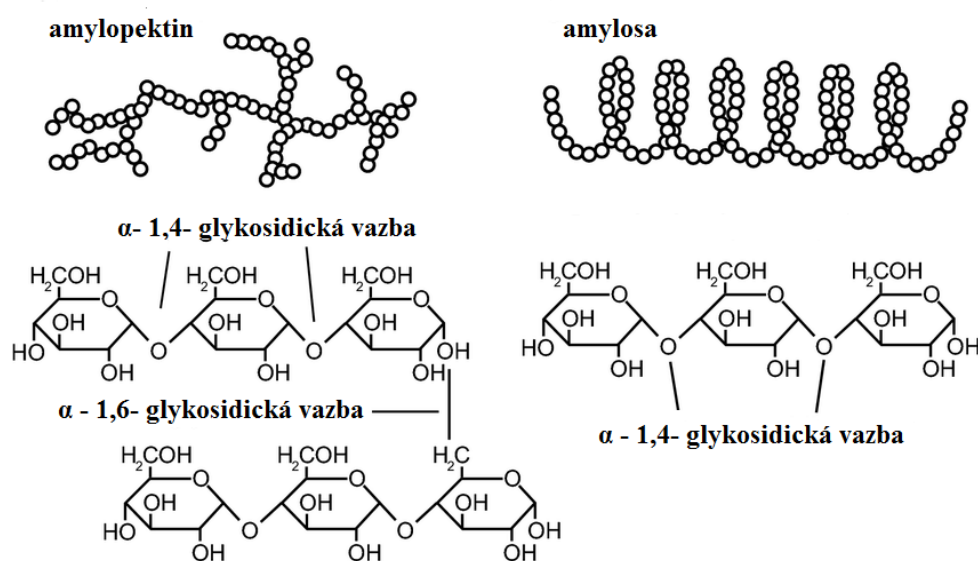
V roce 2010 byl proveden experiment, kdy Davis L.M.G a spol. zkoušel GOS v závislosti na dávce na střevní mikrobiotu zdravých dospělých jedinců. K testování bylo použito 18 zdravých dospělých jedinců, kteří konzumovali žvýkácké cukrovinky obohacené právě o GOS. Bylo použito nejdříve 2,5 g GOS, kdy zvýšená hladina bifidobakterií nebyla

statisticky významná. Poté se dávka zvýšila na 5 g GOS, zde už došlo k výraznějšímu zvýšení počtu bifidobakterií. Poslední zvýšená dávka 10 g GOS už k dalšímu zvýšení bifidobakterií nevedla. V tomto pokusu byly potvrzeny významné bifidogenní vlastnosti GOS, které po přerušení jejich konzumace vymizely. Údaje získané v této studii naznačují, že bifidogenní účinek prebiotického potravinového produktu je ovlivněn dávkou. Davis L.M.G a spol. (2010), uvádí, že minimální dávka 5 g GOS za den vyvolalo významné změny ve střevní mikrobiotě u zdravých lidských dospělých, zejména zvýšením počtu bifidobakterií. Jako nežádoucí efekt respondenti uvedli nadýmavé účinky GOS.

GOS se hojně používají v potravinářském průmyslu. Disponují vysokou rozpustností, vyšší molekulární hmotností než monosacharidy, které zvyšují viskozitu finálního výrobku (Torres set al. 2010). Ovlivňují bod tuhnutí, díky tomu se používají do mražených výrobků. Mají schopnost snižovat aktivitu vody navázáním na své molekuly, tím se zabrání případné bakteriální kontaminaci (Rudolfová & Čurda 2005). Využívají se jako sladidla dosahují 30-60% sladivosti sacharózy. Najdeme je například ve fermentovaných mléčných výrobcích, džemech, nápojích (hlavně džusech), cukrovinkách, pekárenských výrobcích atd. Díky tomu, že nejsou GOS štěpeny trávicími enzymy, nezpůsobují rozvoj zubních kazů a jejich vliv na postprandiální glykémii je zanedbatelný. Jsou přidávány s FOS do mléčných náhražek pro kojenice v poměru 6 - 7,2 g GOS/l a 0,6 - 0,8 g FOS/l (Torres set al. 2010).

3.3.4 Prebiotika odvozená od škrobu

Škrob je významný polysacharid, ukládající se v zásobních orgánech rostlin v podobě škrobových zrn. Škrobová zrna jsou unikátní pro každý druh rostliny. Mají rozdílný vnější vzhled, chemickou strukturu, vlastnosti. Na Obrázku č. 12 jsou obrázky chemických struktur látek, z kterých se skládá škrob. Hlavními složkami škrobu jsou dva α -D-glukany: lineární amylosa s α -D(1,4) a rozvětvený amylopektin s α -D(1,4) a s α -D(1,6) vazbami (Šárka a kol. 2013).



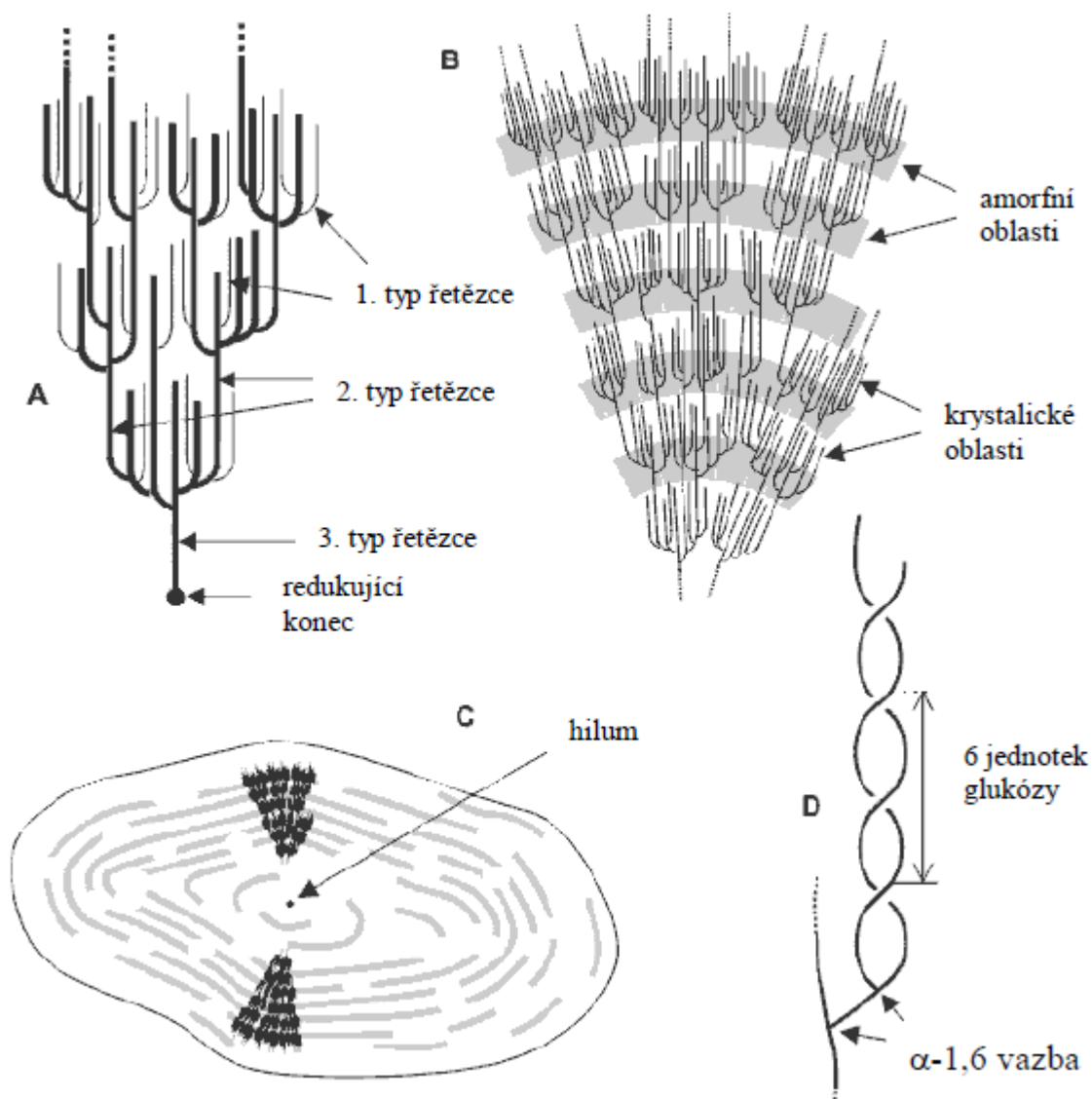
Obrázek 12: Chemická struktura amylopektinu a amylosy
(upraveno z <http://www.biologydiscussion.com/>)

Škrob se využívá v potravinářském, papírenském, textilním a farmaceutickém průmyslu. Je studován i jako pomocná látka v nových formulách léků s postupným uvolňováním (Šárka a kol. 2013).

Podle úrovně stravitelnosti můžeme škrob rozdělit do 3 kategorií:

- rychle stravitelný škrob (rapidly digestible starch – RDS)
- pomalou stravitelný škrob (slowly digestible starch – SDS)
- rezistentní škrob (resistant starch – RS) (Englyst et al. 1992).

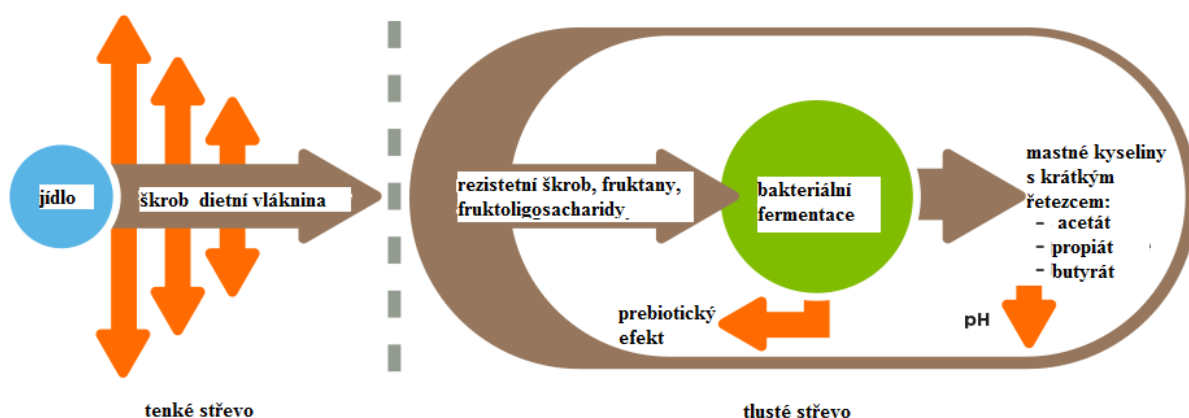
Na Obrázku č. 13 je zobrazena struktura škrobu: **A** – základní řetězec amylopektinu; **B** – organizace amorfních a krystalických oblastí (struktur, které přispívají k vytváření „růstových kruhů“); **C** – orientace molekul amylopektinu v průřezu granule; **D** – struktura dvojité šroubovice ze sousedních řetězců. **Typy řetězce** – (1.) vytváří hustší krystaly (většina obilovin), (2.) vytváří otevřenější hydratované hexagonální krystaly (banány a některé hlízy včetně brambor), (3.) kombinace typů 1 a 2 (hrách a fazole).



Obrázek 13: Struktura škrobu (upraveno z <http://www1.lsbu.ac.uk>)

3.3.4.1 Rezistentní škrob

Rezistentní škrob je nestravitelná část škrobu, která nepodléhá enzymatické hydrolýze amylázou. RS není v tenkém střevě do 120 min tráven a bez porušení pokračuje dál do tlustého střeva, kde dojde k jeho fermentaci mikroorganismy a vzniku SCFAs viz Obrázek č. 14. Dalšími produkty fermentace jsou plyny (hlavně H₂, CO₂ a CH₄), laktát a sukcinát (Englyst & Cummings 1986).



Obrázek 14: Rezistentní škrob- diagram (upraveno z [www.https://www.thehealthygrain.com](https://www.thehealthygrain.com))

RS je nerozpustný ve vodě. Má vysokou tepelnou odolnost a nízkou schopnost zadržovat vodu (Zhou et al. 2014).

RS má velký význam při snížení výskytu střevních chorob. Snižuje inzulinové odezvy a index glykémie a dokonce zvyšuje množství prospěšných bakterií a zlepšuje absorpci minerálů (Zaman & Sarbini 2016). Dle výzkumů se jedná o dobrý substrát pro produkci butyrátu, který může měnit hladinu mikroRNA (miRNA) v buňkách kolorektálního karcinomu. Tím dochází ke snížení rizika rakoviny tlustého střeva spojeného s nadměrnou stravou červeného masa (Humphreys et al. 2014).

Hlavní surovinou pro přípravu RS jsou škroby s vysokým obsahem amylózy. Např. kukuřičný škrob, zrna škrobu s větší průměrnou velikostí, jako jsou brambory a fazole, které mají nižší rychlost hydrolýzy (Eerlingen 1993). Genetickou modifikací vznikly kultivary s vysokým obsahem RS v hlavních obilovinách, jako je rýže, kukuřice a pšenice (Kim et al. 2005).

Z hlediska výživy RS můžeme rozdělit do 5 kategorií:

RS1 – fyzikálně nepřístupný škrob, nelze enzymaticky hydrolyzovat kvůli bariérovému účinku buněčných stěn. Nachází se ve fazolích, semínkách.

RS2 – nativní škrob obsažený ve škrobových zrnech, vztahují se přímo na přírodní rezistentní škrobové granule, jako je syrový bramborový, banánový škrob a kukuřičný škrob.

RS3 – retrogradovaný škrob, je obtížně hydrolyzovatelný amylázou kvůli jeho krystalizaci vytvořené během chlazení a skladování po želatinizaci (Englyst & Cummings 1985). Škrob je nejprve zmazovatělý, poté je amylosa následkem zmazovatění uvolněna do roztoku jako náhodně uspořádané šroubovice. Po ochlazení dojde ke vzniku dvojitéch

šroubovic. Tyto dvojšroubovice vytvářejí hexagonální krystalickou strukturu, která brání přístupnosti α -amylasy ke glykosidovým vazbám (Šárka a kol. 2013).

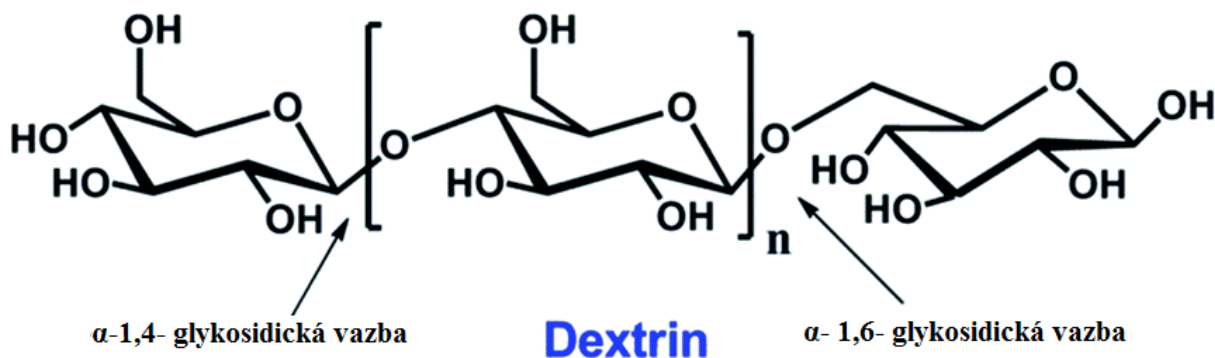
RS4 - chemicky modifikovaný škrob, jedná se o karboxymethylškrob a zesíťovaný škrob, který má rezistenci vůči enzymatické hydrolýze v důsledku změny své původní molekulární struktury (Englyst et al. 1992).

RS5 - komplex amylozy a lipidů vznikající do spirálové struktury, kterou je obtížné strávit (Haenen et al. 2013).

Se zlepšením životní úrovně lidí se klade důraz na kvalitní jídlo. Dietní vláknina je považována jako mimořádně důležitá surovina. Všechny země po celém světě mají přísné předpisy pro příjem vlákniny každý den. Jako nový typ potravinářské přídatné látky má RS fyziologickou funkci vlákniny z potravy a další výhody, které vláknina z potravin nemá (Homayouni et al. 2014). Doporučený denní příjem RS je v České republice stanoven na 5g (Šárka a kol. 2013). Jeho základní vlastnosti jsou podobné běžnému škrobu a neovlivňují chuť, strukturu a smyslové hodnocení jídla (Homayouni et al. 2014).

3.3.4.2 Dextrin

Dextrin je nízkomolekulární uhlovodík, který vznikl štěpením polysacharidu – škrobu nebo glykogenu. Chemicky se jedná o polymery glukózy odvozené od škrobu s krátkým řetězcem, spojené α -(1,4) nebo α -(1,6) glykosidickými vazbami viz Obrázek č. 15. Dextrin byl částečně hydrolyzovaný a modifikovaný pomocí tepla za přítomnosti kyselin, alkalických látek nebo látek měnících hodnotu pH. Jedná se většinou o bílý až nažloutlý sypký prášek. Je dobře rozpustitelný v teplé vodě. Je nerozložitelný v tenkém střevě (Ohkuma et al. 1997). Obvykle se přidává do nápojů ke zvýšení viskozity (Marhal et al. 1999).



Obrázek 15: Chemická struktura dextrinu

3.3.4.2.1 Komerční dextrin NUTRIOSE®

Firma Roquette vyrábí rezistentní dextriny pod komerčním názvem NUTRIOSE®, kukuřičné s označením FM či pšeničné s označením FB.

Vyrábí se zahříváním škrobu frakcionačním krokem, při kterém vznikají nové glykosidické vazby. Touto přeměnou se ze škrobu stává vláknina. Kromě typických vazeb pro škrob (α -1,4) a (α -1,6), které jsou stravitelné, vytvářejí se také nestravitelné glykosidické

vazby jako (α -1,2) nebo (α -1,3), které nemohou být štěpeny enzymy v trávicím traktu (Roturier et al. 2003; Roturier et al. 2006). Při frakcionačním kroku se snižuje polydisperzita distribuce molekulové hmotnosti a zajišťuje vysoký obsah vlákniny. Další kroky čištění a sušení rozprašováním poskytují obsah mono- a disacharidů pod 0,5 % v sušině s poměrem vláken 85 % pro NUTRIOSE® 06 (Gordon et al. 2002). Proto je NUTRIOSE® glukózový polymer přírodního původu, zcela rozpustný ve studené vodě bez vyvolání viskozity nebo změny chuti. Podrobné složení NUTRIOSE® na str. 39 v Tabulce č. 6.

4. Metodika

4.1 Příprava bakteriálních kultur pro pokus

Cílem laboratorního experimentu této bakalářské práce bylo zjistit schopnost utilizace redukujících dextrinů různými kmeny bifidobakterií. Substráty s pozitivním výsledkem metabolizace danými kmeny by mohly být použity jako potenciální prebiotika.

4.1.1 Původ bakteriálních kultur

K pokusu bylo vybráno přes 80 divokých kmenů rodu *Bifidobacterium* izolovaných z lidské stolice. Fekální vzorky byly od lidí s odlišnými stravovacími návyky a rozdílným stářím. Do výzkumu byly zapojeny osoby na konveční dietě a vegetariáni. Kojenci ve věku 1-2 měsíců, afričtí kojenci a děti s PEG vývodem (endoskopicky založený umělý vstup do žaludku pro podání výživy). Děti s PEG vývodem musely mít zavedenou sondu kvůli psychickým obtížím nebo z důvodu zranění, nevyskytovalo se u nich žádné onemocnění trávicího traktu. Podrobnější informace k původu kmenů jsou uvedeny na str. 67-69 v tabulkách 11-13. Tyto vzorky pocházejí ze sbírky doc. Ing. Věry Neužil Bunešové, Ph.D. a Ing. Nikol Modráčkové, Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky (KMVD). Jako kontrola byly použity referenční a typové kmeny z německé a americké sbírky mikroorganismů, které jsou k dispozici na KMVD Tabulka č. 3.

Tabulka 3: Seznam sbírkových kmenů

Kód kmene	Izolováno z	Druh
DSM 20083	střevo dospělého	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
DSM 20098	stolice dospělý člověk	<i>Bifidobacterium angulatum</i>
ATCC 15700	střevo kojence	<i>Bifidobacterium breve</i>
DSM 20082	střevo dospělého	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
DSM 20215	střevo dospělého	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
DSM 20456	stolice kojene dítě	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
DSM 16992	stolice dospělý člověk	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>
ATCC 17930	stolice kojene dítě	<i>Bifidobacterium longum</i>
DSM 20219	střevo dospělého	<i>Bifidobacterium longum</i>
DSM 20088	střevo kojence	<i>Bifidobacterium longum</i>
DSM 20438	stolice kojene dítě	<i>Bifidobacterium pseudoecatenulatum</i>
DSM 20093	střevo dospělého	<i>Bifidobacterium gallicum</i>
DSM 20093	střevo dospělého	<i>Bifidobacterium gallicum</i>
ATTC 29521	stolice kojene dítě	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
DSM 20090	střevo kojence	<i>Bifidobacterium longum</i>

4.1.2 Kultivace

Ke správnému provedení pokusu bylo důležité u všech testovaných bifidobakterií ověřit jejich rodovou a druhovou identitu. Nejdříve došlo k rozmražení zásobních kultur vzorků uchovávaných v -20 °C s 30% obsahem glycerolu a následnému přeočkování (0,5 ml) těchto testovaných kultur do penicilinových lahvíček, v nichž bylo anaerobně připravené WSP médium (10 ml, Wilkins-Chalgren broth s přidavkem sojového peptonu, cysteinu a tweenu), které bylo předem připraveno. Přesné složení média je uvedeno v Tabulce č. 4.



Obrázek 16: Penicilinové lahvičky s kultivačním médiem

4.1.3 Postup přípravy média

Wilkins-Chalgren médium (broth) je základní kultivační tekuté médium pro anaerobní bakterie od značky Oxoid. Na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky se používá jako modifikované, tedy vylepšené o níže uvedené komponenty.

Tabulka 4: Složení Wilkins-Chalgren média

Médium	Podmínky kultivace	Složení selektivního média na 1000 ml
Modifikované Wilkins-Chalgren médium (WSP)	48 h, anaerobní, při 37 °C	1 l demineralizované vody, 33 g Wilkins-Chalgren bujónu, 5 g GMO – sojového peptonu, 0,5 g L-cysteinu, 1 ml tweenu 80

Jednotlivé složky byly zváženy a postupně přidány do konické Erlenmeyerovy baňky. Obsah byl řádně promíchán. Poté se namíchaná suspenze dala vařit na 10 minut do vodní lázně. Po provaření bylo dávkováno 10 ml média do penicilinových lahviček. Lahvičky se vložily do vodní lázně při 100 °C. Po vyndání se všechny penicilinové tuby „probublaly“ oxidem uhličitým, aby bylo dosaženo anaerobního prostředí, které je potřebné pro růst bifidobakterií a dalších anaerobů. Poté byly lahvičky uzavřeny gumovou zátkou. Na závěr byla aplikována hliníková krytka pro udržení anaerobních podmínek. Všechny penicilinové lahvičky byly vloženy do autoklávu a sterilovány.

4.1.4 Kontrola čistoty a morfologie

Z narostlé kultury byla, pomocí injekční stříkačky, odebrána malá část vzorku, která se přenesla na podložní sklíčko. Kapka vzorku se co nejdříve přikryla krycím sklíčkem a následně byla prohlédnuta morfologie bakterií pod světelným mikroskopem s fázovým kontrastem. Kontrola pod mikroskopem byla důležitá, neboť bylo třeba vyloučit kontaminaci jinými mikroorganismy.

Jestliže se jedná o čistou kulturu, v mikroskopu se vyskytují pleomorfní tyčinky bifidobakterií. Tyto bakterie mají pravidelný štíhlý tvar, jde o dlouhé tyčky s různým zakončením nebo větvením. Jsou nepohyblivé, nespojolující. Buňky se mohou vyskytovat jednotlivě nebo tvořit takzvané agregáty. Pokud se objevují koky, laktobacily nebo jiné rody s bifidobakteriemi dohromady, nejedná se o čistou kulturu. Tento vzorek nelze použít a je potřeba ho vyřadit.

4.1.4.1 Barvení podle Grama

U vybraných kmenů byla provedena technika přípravy fixovaného preparátu, tzv. barvení podle Grama. Jedná se o diagnostickou metodu, která odlišuje dva typy bakterií, a to gram pozitivní (+) a gram negativní (-) bakterie. Tato metoda je založena na odlišném složení bakteriální stěny mikroorganismů.

Gramovo barvení bylo zahájeno přenosem bakteriální suspenze injekční stříkačkou ze zkumavky na podložní sklíčko. Bakteriální kličkou byla kapka na sklíčko rozetřena, aby vrstva tekutiny byla tenká. Fixace preparátu proběhla sušením na vzduchu. Tato metoda schnutí je k bakteriím šetrnější, neboť nemůže dojít k jejich poškození jako při fixaci plamenem.

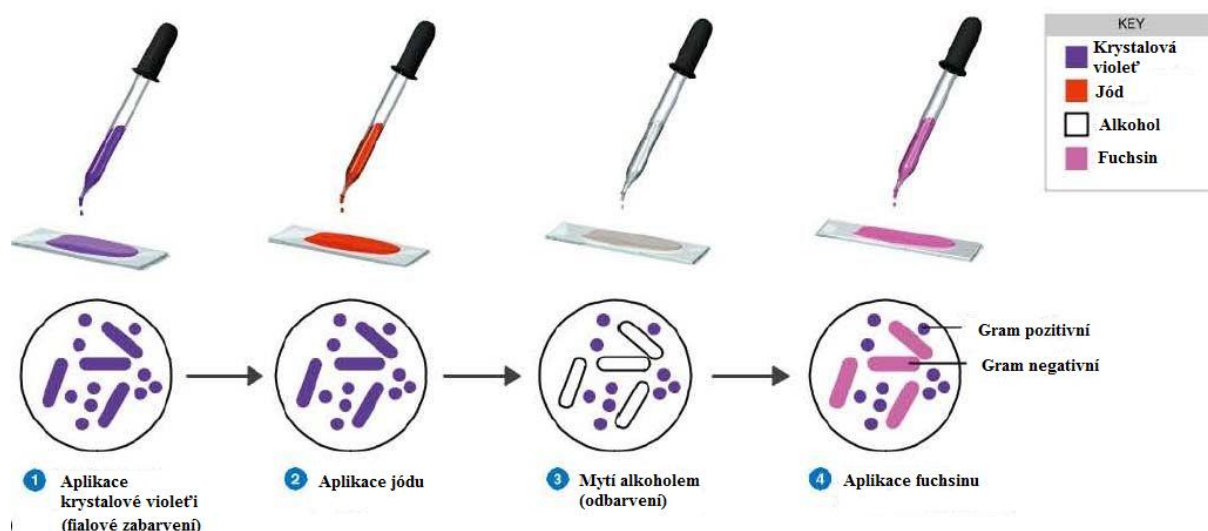
První byla použita krystalová violet. Violet se navázala na nitrobuněčné struktury G+ a G- a zbarvila fixované kultury do fialova. Po 60 sekundách bylo přebytečné barvivo smyto vodou.

Poté byl aplikován Lugolův roztok na 60 sekund a následně byl smyt vodou. Lugolův roztok zajistil fixaci obarvení a vytvořil se komplex barviva s jódem. Komplex barviva s jódem zůstane ve vícevrstvé mureinové struktuře buněčné stěny grampozitivní bakterie i po odbarvení. Naproti tomu u gramnegativních bakterií dojde k uvolnění komplexu po použití odbarvovacího roztoku.

Na sklíčku se vytvořil tmavě modrý povlak, který byl odbarven nad umyvadlem pomocí etanolu. Etanol narušil buněčnou stěnu bakterií. Kvůli nízkému obsahu peptidoglykanů v buněčné stěně se odbarvily jen G- bakterie a G+ zůstaly fialové. Došlo k dalšímu omytí vodou.

Posledním krokem bylo obarvení preparátu karbofuchsinem, který zbarvil G- bakterie do červena. Sklíčko bylo naposledy omyto pod vodou a nechalo se uschnout.

Na místo, které mělo být zkontrolováno, byl aplikován imerzní olej a proběhlo prohlédnutí pod světelný mikroskop při zvětšení 100x. Pod mikroskopem bylo možné pozorovat modrofialově zbarvené pleomorfní tyčinky. Tím došlo k potvrzení, že se jedná o *Bifidobacterium*, které patří do G+ bakterií. Pokus je zobrazen na Obrázku č. 17.



Obrázek 17: Schéma Gramova zbarvení, (dostupné z laboratoryinfo.com/gram-staining-principle-procedure-interpretation-and-animation/)

Po prohlédnutí bylo do ampulek odměřeno 6 ml bifipufu s glycerolem, aby mohl být vzorek zamražen bez porušení bakteriální suspenze. Bifidokulturny bylo potřeba zamrazit z důvodu realizace pokusu, který probíhal déle. Všechny narostlé kultury, které prošly prohlídkou pod mikroskopem, byly znovu přeočkovány. Poté byly kultury identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS.

4.2 Ověření identity vybraných bifidobakterií pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS

Do Eppendorfovy zkumavky o objemu 1,5 ml byl odměřen 1 ml narostlého bakteriálního kmene z kultivačního média Wilkins-Chalgren broth. Mikrozkuavky byly vloženy do centrifugy na 3 minuty a při 14 500 otáčkách za minutu stočeny. V Eppendorfově zkumavce (1,5 ml) se na dně usadil sediment bakterií tzv. peleta.

Veškerý supernatan, který byl tvořen médiem byl odstraněn. K peletě bylo přidáno 0,5 ml 70% etanolu kvůli fixaci buněk. Suspenze byla primárně promíchána pomocí špičky pipety. K sekundárnímu promíchání byla použita třepačka Vortex. Takto promíchaná směs byla opět vložena do centrifugy a stočena po dobu 2 minut při stejných otáčkách.

Znovu došlo k usazení pelety na dně mikrozkušavky a následnému vylití supernatantu. Pomocí pipety byly odsány zbytky etanolu okolo pelety 10 minut se vzorek nechalschnout na vzduchu.

Po deseti minutách bylo do Eppendorfovy zkumavky přidáno 20 μ l 70% kyseliny mravenčí.

Opět byla suspenze promíchána nejdříve pomocí špičky pipety a poté na třepačce. Po promísení bylo přidáno 20 μ l acetonitrilu a na třepačce se směs homogenizovala. Kyselina mravenčí spolu s acetonitrem slouží k porušení buňky a vylití ribozomálního proteinu.

Po homogenizaci byly mikrozkušavky vloženy naposled do centrifugy. Po stočení zkumavek, byl použit supernatant. Byl odebrán 1 μ l vzorku, který byl aplikován na MALDI destičku (ve dvou kopiích). Poté se počkalo na zaschnutí vzorku a byla nanesena matrice (Bruker). Poté byl vzorek analyzován.

4.3 Testování růstu na dextrinech a škrobu

4.3.1 Přehled testovaných substrátů

Cílem bylo otestovat růst bifidobakterií na různých zdrojích uhlíku na bázi škrobu. Byly použity tyto substráty:

Tabulka 5: Seznam použitých substrátů

rezistentní dextrin FM 06 (kukuřičný)
rezistentní dextrin FM 10 (kukuřičný)
rezistentní dextrin FB 06 (pšeničný)
rezistentní dextrin FB 10 (pšeničný)
dextrin
kukuřičný škrob
pšeničný škrob
glukóza (kontrola)

Rezistentní dextriny byly od firmy Roquette s obchodním označením NUTRIOSE®. Jednotlivé vzorky byly odlišné v procentuálním zastoupení vlákniny, počtu monosacharidů a disacharidů. Detailnější specifikace viz Tabulka č. 6. Dále byl použit škrob kukuřičný a pšeničný. Glukóza byla použita jako pozitivní kontrola (ověření použitých esejí).

Všechny uvedené substráty byly testovány pomocí dvou různých mikrobiálních esejí a to - růst v mikrotitrační destičce a růst ve velkém objemu v penicilinových lahvičkách.

Tabulka 6: Složení NUTRIOSE®

		FM	FM	FB	FB
		06 – kuk.	10 – kuk.	06 – pšen.	10 – pšen.
Celkový obsah vlákniny v sušině		85 %	75 %	85 %	75 %
Obsah sušiny		cca 96 %	cca 96 %	cca 96 %	cca 96 %
Mono + disacharidy		0.5 % max.	15 % max.	0.5 % max.	15 % max.
Redukující cukry (%)		2-5	8-12	2-5	8-12
Ekvivalent dextrosy		3-5	10	3-5	10
Viskozita při 20°C (mPa.s) 60% vodný roztok		±1500	±600	±1500	±600

4.3.1.1 Testování mikrotitrační metodou

Pro tuto metodu bylo použito médium API 50 CH připravené podle instrukcí výrobce (bioMérieux). Výše uvedené testované substráty byly testovány v koncentraci 1 g/l. Příprava média a postup testování je popsán níže.

4.3.1.1.1 Příprava modifikovaného API 50CH média pro testování v mikrotitračních destičkách

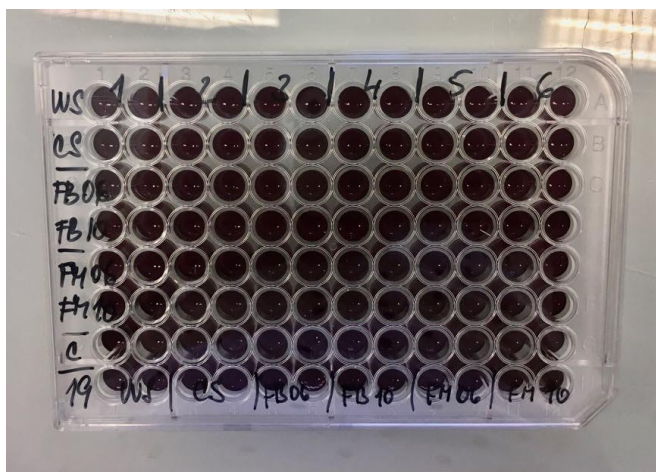
Tabulka 7: Složení API 50CH média

Médium	Podmínky kultivace	Složení selektivního média na 1000 ml
API 50CH médium	48 h, anaerobní, při 37 °C	1 l demineralizované vody, 10 g polypeptonu, 5 g kvasnicového extraktu, 1 ml tweenu 80, 2 g fosforečnanu draselného, 5 g octanu sodného, 2 g citrátu amonného, 0,2 g síranu hořečnatého, 0,05 g síranu manganatého, 0,012 mg bromkresolové violeti,

Podle receptury výrobce Biomériux (Francie) bylo připraveno základní médium bez zdroje uhlíku, které bylo posléze obohaceno o 1 g určitého testovaného substrátu-uhlíku. Přesné složení média viz tabulka č. 7. Jednotlivé složky byly naváženy a postupně přidávány do konické Erlenmeyerovy baňky za stálého míchání. Následně byla namíchaná suspenze vložena na 10 minut do varné lázně, aby došlo k rozpuštění látek. Každá navařená varianta byla přelita do 250 ml lahvíček, které byly označeny daným typem média. Lahvičky se s obsahem vysterilovaly a tvořily zásobní roztok k pipetování pro budoucí pokus v mikrotitrační destičce.

4.3.1.1.2 Postup testování a vyhodnocení

Před založením pokusu byly fixem nadepsány mikrotitrační destičky. Destička byla složena z jamek 12 x 8. Bylo testováno 6 kmenů na 7 substrátech viz Obrázek č. 18.



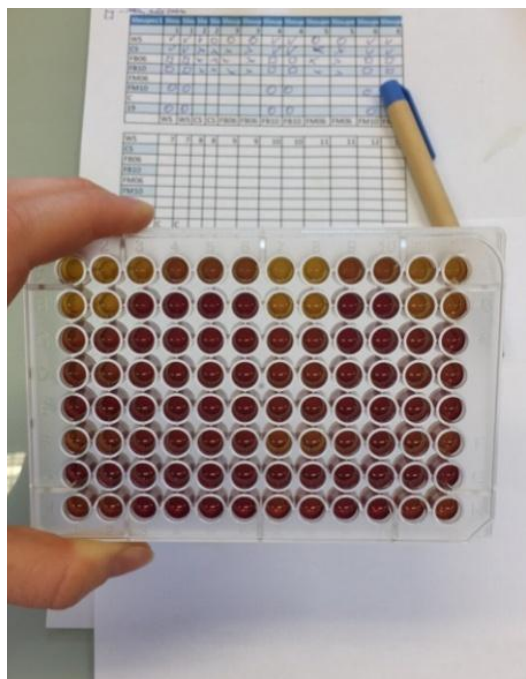
Obrázek 18: Nadepsaná mikrotitrační destička

Do každé jamky bylo pipetováno 180 μ l určitého média, které bylo před pokusem připraveno. Substrátem byly: kukuřičný a pšeničný škrob, rezistentní škrob FB 06, FB 10, FM 06, FM 10 a kontrolní médium, které neobsahovalo žádný ze zkoumaných preparátů, jen barevný pH indikátor pro porovnání změny barvy při vyhodnocování.

Z čerstvě narostlých kultur bylo asepticky injekční stříkačkou odebráno 1 ml do Eppendorfovy zkumavky. Zkumavky byly stočeny na centrifuze 3 minuty při 14 500 otáčkách za minutu. Supernatant, který vznikl po odstředění, byl odstraněn. Bylo přidáno 950 μ l bifipufu a pomocí špičky na pipetě došlo k primárnímu promíchání suspenze a poté k sekundárnímu promíchání na třepačce. Jednotlivé vzorky byly pak v množství 20 μ l pipetovány do náležitě nadepsaných jamek na mikrotitračních destičkách. Vždy každý vzorek ve dvou kopiích.

Byl připraven sáček s vyvíječem anaerobního prostředí (Thermo Scientific) k zajištění anaerobních podmínek. Každá mikrotitrační destička byla do něj vložena a uzavřena svorkou na sáček. Vzorek byl umístěn do termostatu při 37 °C a byl kultivován 48 hodin.

Po dvou dnech proběhlo vyhodnocení pokusu viz Obrázek č. 19. Cílem vyhodnocení bylo porovnání změny barvy v jamkách. Součástí média byl pH indikátor bromkresolová violet. Při okyselení se mění fialové zbarvení na žluté. Pozitivně se tedy projevil ten vzorek bifidokultury, u kterého došlo k barevné změně (zežloutnutí). To znamenalo, že dané bifidobakterie jsou schopny určitý substrát využít. Celé vyhodnocení tohoto pokusu na str. 70-72 v Tabulkách č. 14-16.



Obrázek 19: Vyhodnocování testu na mikrotitrační destičce

4.3.1.2 Testování ve velkém objemu

Pro lepší anaerobní podmínky pokusu byly použity penicilinové lahvičky s navařeným základním médiem podle Pechar et al. (2014), které bylo obohaceno substrátem o vyšší koncentraci než v experimentu v mikrotitrační destičce. Do testování byla zařazena také glukóza v koncentraci 2 g/l, která sloužila jako pozitivní kontrola pro růst bifidobakterií. Dále byly použity lahvičky pro kontrolu bez zdroje uhlíku jen s pH indikátorem (negativní kontrola).

Postup byl podobný jako v předchozím zkoumání, avšak bez třepání a odstředování bifidobakterií.

4.3.1.3 Příprava základního média testování v lahvičkách (tzv. penicilinkách) podle Pechara

Kvůli nedostačujícím výsledkům z mikrotitračních destiček, které mohly být zapříčiněné:

- 1) aerobními podmínkami, způsobujícími stres a inaktivaci anaerobních bifidobakterií
- 2) malým množstvím substrátu (1 g/l)

Bylo připraveno jiné základní médium obohacené o větší koncentraci substrátů, které bylo následně nadávkováno do penicilinových lahviček. Díky tomu se povedlo zajistit striktnější anaerobní podmínky. Byla použita receptura podle publikace Pechar et al. (2014), která byla modifikována a místo mucinu v receptuře byly použity naše testované substráty.

Tabulka 8: Složení Média podle Pechara

Médium	Podmínky kultivace	Složení selektivního média na 1000 ml
Médium podle Pechara	48 h, anaerobní, při 37 °C	1 l demineralizované vody 5 g tryptonu 5g peptonu 2,5 g kvasnicového extraktu 1 ml tweenu 80 0,25 g cysteine-hydrochloridu 0,1 g mupirocinu 15 g agaru 0,1 g bromkresolové violeti

Bylo připraveno základní médium bez zdroje uhlíku, které bylo posléze obohaceno o 10 g určitého testovaného substrátu-uhlíku. Přesné složení média viz tabulka č. 8. Jednotlivé složky byly naváženy a postupně přidávány do konické Erlenmeyerovy baňky za stálého míchání. Následně byla namíchaná suspenze vložena na 10 minut do varné lázně, aby došlo k rozpuštění látek. Bylo nadávkováno 10 ml média do penicilinových lahviček. Tuby byly zahřáty na 100 °C a probublány oxidem uhličitým k zajištění anaerobních podmínek. Lahvičky byly uzavřeny gumovou zátkou, opatřené hliníkovým plíškem a vloženy do autoklávu ke sterilaci.

4.3.1.3.1 Postup testování a vyhodnocení

Z čerstvě narostlých kultur bylo, při aseptických podmínkách, přeneseno pomocí injekční stříkačky 0,5 ml bakteriální suspenze do penicilinových lahviček, které byly nadepsané náležitým typem substrátu. Po naočkování všech kultur byly vzorky vloženy do termostatu při 37 °C na 48 hodin. Testování bylo provedeno opět ve dvou kopiích.

Po dvou dnech bylo možno vyhodnotit vzorky. Opět se vyhodnocení týkalo změny barvy oproti kontrolní lahvičce (negativní kontrola).



Obrázek 20: Porovnání zmetabolizovaného vzorku s kontrolou

Po vyhodnocení změny barvy, byla každá lahvička otevřena a bylo změřeno pH pomocí pH metru HI98100 Checker®Plus od značky Hanna instruments. Naměřené hodnoty byly zapsány k náležitým testovaným vzorkům do sestavených tabulek.



Obrázek 21: Měření pH

5. Výsledky

K výše popsanému experimentu bylo původně vybráno 96 kmenů bifidobakterií. Toto číslo se zredukovalo na 62 kmenů u testování v mikrotitrační destičce a na 54 kmenů v případě experimentu v tzv. velkém objemu. Výsledky celkového přehledu všech kmenů jsou viz str. 67-69. Redukce kmenů byla zapříčiněna např. kontaminací, kdy po mikroskopické kontrole bylo zjištěno, že se nejedná o čistou kulturu. Dále se nám u některých kmenů ani na třetí přeočkování nepodařilo zmražené kultury oživit.

Po přeočkování proběhla kontrola identity pomocí MALDI – TOF MS, aby došlo k ověření, zdali se jedná o druh, za který byl vzorek považován. Celkem 75 kmenů bylo identifikováno s vysokým skórem, které je označeno zelenou barvou a identifikační skóre se pohybuje v rozmezí hodnot 3,000 – 2,299. Osm kmenů bylo identifikováno se středním skórem do hodnoty 1,700 a je označeno žlutou barvou. Nižší – žluté skóre mohlo být zapříčiněno špatnou přípravou na destičku MALDI – TOF MS. U 1 kmene nebylo možno kmen pomocí dané metody identifikovat, v tomto případě skóre identifikace nižší než 1,699 (detekovaná hodnota červěně zobrazena). U 5 kmenů byla identifikace zopakována, neboť nedošlo k jejímu určení hned na první pokus. U několika divokých kmenů se neshodovala původní identifikace s předchozí identifikací. Mohlo se jednat o kokulturu, kdy se u člověka vyskytovaly 2 druhy a jeden mohl převládat. Taktéž mohlo dojít k záměně či konatimaci. Pro potřeby této bakalářské práce jsme se rozhodli použít poslední identifikaci.

4.4 Výsledky testování v mikrotitrační destičce

K tomuto testování byly použity připravené substráty o koncentraci 1 g/l, které byly rozpipetovány do jamek v destičce v objemu 180 µl. K vyhodnocení byl pověřen jen 1 člověk, protože se jednalo o vyhodnocování barevné změny, která může být velice subjektivní. Míra výsledného zbarvení byla zaznamenána do připravených tabulek na základě odečtu 3 hodnot intenzity barevné změny, a to žluté, hnědé, fialové. Tabulky viz str. 71-73. Bylo otestováno 62 kmenů na 6 substrátech. Nejvíce docházelo k barevné změně u pšeničného škrobu, poté u kukuřičného škrobu. Z komerčních produktů NUTRIOSE® se podle barevné změny značně užíval substrát s označením FM 10, který náležel kukuřičnému škrobu. Dále byl dobře využíván substrát FB 10, v tomto případě se jednalo o pšeničný škrob. Oproti tomu komerční substráty FM 06 (rezistentní dextrin kukuřičný) a FB 06 (rezistentní dextrin pšeničný) užívané téměř nebyly anebo jen zřídka. Důvodem může být nízký obsah použitého uhlíkatého zdroje/substrátu a s tím související obsah redukujících cukrů. Výrobky FB 10 a FM 10 mají 8-12 % redukujících cukrů, kdežto výrobky FB 06 a FM 06 pouhých 2-5 %. Výsledky byly hodně variabilní. Spousta testovacích jamek vykazovala negativní výsledky. Důvodem mohly být také stresové podmínky, jimž anaerobní kmeny byly vystaveny. Kvůli malému množství testovaného média nebylo možné změřit pH.

Neuspokojivé výsledky byly předmětem pro změnu testovací metody. Rozhodli jsme se udělat experiment v tzv. velkých objemech (10 ml). Byl snížen počet kmenů a připravila se nová esej o jiné koncentraci substrátu.

4.5 Výsledky testování ve velkém objemu

K tomuto experimentu byly připraveny substráty o koncentraci 10 g/l. Navíc zde byl zařazen dextrin z kukuřičného škrobu 10 g/l. Pro kontrolu správnosti eseje byla použita jako pozitivní kontrola glukóza 2 g/l a jako negativní kontrola médium bez přidání substrátu. Všechny kmeny byly schopné využít glukózu a tím potvrdily daný test. Na základním médiu bez substrátu kmeny nerostly. Počet kmenů byl zredukován na 54.

Druhy *B. pseudolongum*, *B. adolescentis* a *B. gallicum* utilizovaly všechny komerční přípravky NUTRIOSIA®, dextrin, běžný pšeničný a kukuřičný škrob a kontrolní glukózu viz Tabulka č. 9. a č. 10. *B. animalis* subsp. *lactis* výborně rostlo na NUTRIOSE® FB 10 a FM 10, dextrinu. V kontrolním médiu s glukózou kmen 005 vykazoval negativní výsledky barevně i pH hodnotami. Tento fakt může být zapříčiněn původím pH zkumavky (anaerobní příprava – probublávání CO₂ na to může mít vliv). Lehké barevné změny, a i pH pokles pod 5,5 byly zaznamenány u všech kmenů *B. animalis* v penicilinových lahvičkách obsahujících NUTRIOSIA® FB 06. U substrátu s označením FM 06 byl naměřen pH pokles na 5,4 u kmenů 042, 049, 080 a na hodnotu pH 5,3 u M 4/2 a M 4/4, v tomto případě byl pokles detekován i změnou barvy u obou kopií do světle hnědé. Žádný testovaný škrob (pšeničný, kukuřičný) využit *B. animalis* nebyl. *B. bifidum* naopak neutilizovalo žádný substrát NUTRIOSE® či jiný zdroj uhlíku. Byly zaznamenány mírné pH změny např. u jedné kopie DSM 20215 u FM 10 a FB 10. Stejných změn pH dosáhl i kmen DSM 20456. V případě FM 10 byla rozlišena i změna barvy oproti kontrole. Na glukóze – kontrolním médiu byl podle očekávání zaznamenán růst vyjma kmenů BL10 a B10. Všechny kmeny *B. breve* kromě divokých kmenů s označením 065 a 074 utilizovaly veškeré substráty, na kterých byly testovány. Divoké kmeny 065 a 074 nevykazovaly pozitivní růst u pšeničného ani u kukuřičného škrobu. Jiné kmeny *B. breve* tyto škroby velmi dobře metabolizovalo. Kmeny *B. catenulatum* výborně rostly na Nutriosa FM 10, všechny barevné kontroly byly pozitivní a korespondovaly s pH. U Nutriosa FB 10 byl růst taktéž pozitivní. Jen u divokého kmenu BSM 11 – 1 nedošlo k barevné změně a ani pH nepotvrdilo výskyt metabolitů, zde mohl být opět problém s původním pH zkumavky. Dextrin byl taktéž pozitivně metabolizován, ovšem s porovnáním substrátu NUTRIOSE® FM 10 nevykazoval tak nízké pH. Růst na NUTRIOSE® FB 06 byl pozitivně vyhodnocen až na divoký kmen BL1, kde nedošlo ani k barevné změně ani k poklesu pH. Dále u sbírkového kmenu DSM 16992 nedošlo v případě NUTRIOSE® FB 06 k utilizaci a ani u NUTRIOSE® FM 06. Bylo detekováno negativní barevné vyhodnocení i změna pH. Pšeničný a kukuřičný škrob využit nebyl až na výjimky u divokého kmene BSM 11 – 1, MA5 a MA2 viz Tabulka č. 10. *B. pseudocatenulatum* z německé sbírky DSM 20438 utilizovalo všechny uvedené substráty včetně škrobů. U všech testovaných substrátů byla pozitivní barevná kontrola v korelaci s nízkým pH. Všechny kmeny *B. longum* rostly na NUTRIOSE® a produkovaly metabolity vedoucí k barevné změně u typu FB10 a FM10. Dextrin byl též dobře utilizován, ovšem vykazoval ve srovnání s FM 10 a FB10 o něco vyšší pH. To by mohlo být zapříčiněné dostupností redukujících cukrů, protože dextrin byl vyroben jiným procesem než NUTRIOSE®. Hodnoty pH u vzorků s pozitivní reakcí se pohybovaly mezi 4,3 – 5,4. U substrátů FB 06 a FM 06 došlo k lehkým pH změnám u kmenů VB 1/8, VB 6/10, M 1/6, MA3, BL 12, VB 8/8. U těchto kmenů s pH poklesem nebyla

detekována barevná změna. Pšeničný a kukuřičný škrob nebyl vůbec využíván, až na výjimky. Divoké kmeny ETH 43, 068 a VB 2/10 rostly na všech testovaných látkách včetně škrobů. Výsledky u pšeničných a kukuřičných škrobů korelovaly s výsledky NUTRIOSE® FB 06 a FM 06.

Tabulka 9: Výsledky měření a)
(ND= nebylo detekováno)

Kmen	FM 06	FM 10	FB 06	FB 10	DEX	CS	WS	GLU	K
	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH
<i>B. adolescentis</i>									
VB 1/4	4,53 5,19 4,9 ++	4,88 4,85 4,9 ++	5,24 4,77 5,0 +	4,32 5,16 4,7 ++	3,84 5,24 4,5 ++	5,21 4,39 4,8 ++	5,28 4,54 4,9 ++	4,34 5,38 4,9 ++	5,77 5,88 5,8 -
VB 5/2	4,55 4,52 4,5 ++	4,94 4,98 5,0 ++	5,2 5,17 5,2 +	4,3 4,75 4,5 ++	5,21 4,03 4,6 ++	4,39 5,15 4,8 ++	4,73 5,19 5,0 +	5,18 4,31 4,7 ++	5,85 5,74 5,8 -
MB 2/9	4,69 4,78 4,7 ++	4,37 4,7 4,5 ++	4,75 4,67 4,7 ++	4,94 4,78 4,9 ++	3,98 4,27 4,1 ++	4,5 5,03 4,8 ++	5,3 5,74 5,5 -	5,15 4,54 4,8 ++	5,95 5,94 5,9 -
035	4,89 5,24 5,1 +	4,25 4,3 4,3 ++	4,67 4,54 4,6 ++	4,98 4,95 5,0 +	5,07 5,11 5,1 +	4,64 4,42 4,5 ++	3,7 5,03 4,4 ++	4 4,32 4,2 ++	5,5 5,77 5,6 -
JK 10	4,77 4,98 4,9 ++	4,39 4,43 4,4 ++	4,62 4,63 4,6 ++	4,5 4,54 4,5 ++	4,23 4,25 4,2 ++	4,39 4,45 4,4 ++	4,67 4,54 4,6 ++	4,23 4,22 4,2 ++	5,64 5,69 5,7 -
<i>B. animalis subsp. lactis</i>									
042	5,42 5,37 5,4 +	4,54 4,48 4,5 +	5,4 5,36 5,4 +	4,8 4,72 4,8 ++	4,9 5,06 5,0 +	5,63 5,62 5,6 -	5,79 5,6 5,7 -	5,18 5,02 5,1 +	5,74 5,7 5,7 -
M 4/2	5,21 5,45 5,3 +	4,39 4,5 4,4 ++	5,4 5,43 5,4 +	4,76 4,69 4,7 ++	4,82 ND 4,8 ++	5,65 5,62 5,6 -	5,55 5,58 5,6 -	4,33 4,31 4,3 ++	6,17 6,14 6,2 -
M 4/4	5,3 5,22 5,3 +	4,42 4,35 4,4 ++	5,31 5,23 5,3 +	4,57 4,55 4,6 ++	4,84 4,85 4,8 ++	5,63 6,29 6,0 -	5,6 5,33 5,5 -	4,3 4,25 4,3 ++	5,62 5,87 5,7 -
005	5,62 5,4 5,5 -	4,71 4,66 4,7 ++	5,39 5,4 5,4 +	4,87 4,83 4,9 ++	5,2 5 5,1 +	5,7 5,6 5,7 -	5,9 5,7 5,8 -	5,7 5,9 5,8 -	5,7 5,7 5,7 +
049	5,33 5,49 5,4 +	4,47 4,4 4,4 ++	5,28 5,23 5,3 +	4,68 4,57 4,6 ++	4,9 4,9 4,9 +	5,6 5,5 5,6 -	5,9 5,5 5,7 -	4,6 4,3 4,5 ++	5,6 6 5,8 +
080	5,3 5,46 5,4 +	4,41 4,35 4,4 ++	5,33 5,13 5,2 +	4,69 4,51 4,6 ++	4,8 ND 4,8 ++	5,6 5,5 5,6 -	5,5 5,9 5,7 -	4,3 4,3 4,3 ++	5,6 5,6 5,6 +
ATCC 17930	5,88 5,53 5,7 -	4,51 4,49 4,5 ++	5,28 5,34 5,3 +	4,65 4,63 4,6 ++	5,1 5,1 5,1 +	5,8 5,7 5,8 -	6,6 5,7 6,2 -	4,5 4,4 4,5 ++	6 5,7 5,9 +
<i>B. bifidum</i>									
DSM 20215	5,8 5,8 5,8 -	5,3 5 5,2 +	5,74 5,68 5,7 -	5,22 5,61 5,4 +	5,6 5,64 5,6 -	5,79 5,89 5,8 -	6,6 5,75 6,2 -	4,51 4,38 4,4 ++	5,85 5,73 5,8 -
DSM 20456	5,88 5,78 5,8 -	5,25 5,23 5,2 +	5,68 5,69 5,7 -	5,39 5,43 5,4 +	5,78 5,7 5,7 -	5,87 5,8 5,8 -	5,74 5,7 5,7 -	4,34 4,32 4,3 ++	6 5,87 5,9 -
BL10	5,81 6,36 6,1 -	5,53 5,66 5,6 -	5,7 5,78 5,7 -	5,78 5,46 5,6 -	5,69 ND 5,7 -	5,91 ND 5,9 -	5,82 ND 5,8 -	5,69 ND 5,7 -	5,84 ND 5,8 -
B10	5,72 ND 5,7 -	6,16 ND 6,2 -	5,67 5,69 5,7 -	5,23 5,61 5,4 +	5,7 ND 5,7 -	5,73 ND 5,7 -	5,85 ND 5,9 -	5,7 ND 5,7 -	5,84 ND 5,8 -
B6	5,78 ND 5,8 -	5,78 ND 5,8 -	5,59 5,82 5,7 -	5,51 6,04 5,8 -	5,41 ND 5,4 -	6,03 ND 6,0 -	ND ND ND	4,39 ND 4,4 ++	6,28 ND 6,3 -
B 33	5,76 ND 5,8 -	5,68 ND 5,7 -	5,65 5,85 5,8 -	ND 5,43 5,4 +	5,48 ND 5,5 +	6,28 ND 6,3 -	5,84 ND 5,8 -	4,48 ND 4,5 ++	5,91 ND 5,9 -
B29	5,78 ND 5,8 -	5,52 ND 5,5 -	5,71 6,03 5,9 -	ND 5,69 5,7 -	5,76 ND 5,8 -	6,12 ND 6,1 -	ND ND ND	4,76 ND 4,8 ++	5,93 ND 5,9 -
<i>B. breve</i>									
065	5,31 5,3 5,3 +	4,36 4,38 4,4 ++	5,27 5,24 5,3 +	4,6 4,59 4,6 ++	5,03 4,93 5,0 +	5,48 5,49 5,5 -	5,6 5,72 5,7 -	4,5 4,45 4,5 ++	5,62 5,56 5,6 -
OLS	5,18 5,42 5,3 +	4,42 4,36 4,4 ++	5,36 4,91 5,1 +	4,62 4,52 4,6 ++	4,11 ND 4,1 ++	4,33 4,42 4,4 ++	4,72 4,93 4,8 ++	4,59 4,39 4,5 ++	6,03 5,56 5,8 -
TA1	4,85 4,88 4,9 ++	4,41 4,37 4,4 ++	4,65 4,64 4,6 ++	4,47 4,5 4,5 ++	4,04 4,01 4,0 ++	4,14 4,87 4,5 ++	4,43 4,94 4,7 ++	4,37 4,95 4,7 ++	5,77 5,61 5,7 -
070	5,3 5,18 5,2 +	4,65 4,36 4,5 ++	5,08 5 5,0 +	4,86 4,53 4,7 ++	4,27 4,65 4,5 ++	4,7 4,6 4,7 ++	4,86 4,51 4,7 ++	4,74 4,4 4,6 ++	5,9 5,78 5,8 -
074	5,4 5,44 5,4 +	4,42 4,35 4,4 ++	5,24 5,32 5,3 +	4,63 4,61 4,6 ++	4,79 4,98 4,9 ++	5,65 5,81 5,7 -	5,62 5,78 5,7 -	4,38 4,28 4,3 ++	5,66 6,3 6,0 -
<i>B. gallicum</i>									
DSM 20093	4,98 4,8 4,9 ++	4,39 4,5 4,4 ++	4,7 4,7 4,7 ++	4,6 4,5 4,5 ++	4 4,2 4,1 ++	4,6 4,4 4,5 ++	4,5 4,6 4,6 ++	4,3 4,3 4,3 ++	5,7 5,7 5,7 -

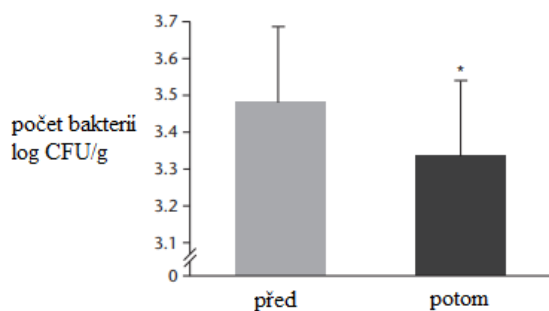
6. Diskuze

Bifidobakterie náleží do skupiny anaerobních grampozitivních bakterií vyskytující se v trávicím traktu živočichů a jsou dominantní skupinou u savců na mléčné výživě (Ventura et al. 2004). Kromě *B. dentium* jsou bifidobakterie považovány za zdraví prospěšné komenzální bakterie člověka i zvířat (Dworkin, et al. 2006). *B. bifidum*, *B. breve* a *B. longum* ssp. *infantis* jsou nejčastěji detekovanými druhy ve stolici kojených dětí (Ryan et al. 2006; Turroni et al. 2009). Také se u kojenců vyskytuje *B. pseudocatenulatum*, které osídluje i trávicí trakt dospělých (Scardovi et al. 1979; Biavati et al. 1984; Biavati et al. 1986). *B. animalis* subsp. *lactis*, se vyskytuje v zakysaných mléčných produktech a je prodáván jako lidské probiotikum (Wall et al. 2007). V důsledku toho se tento druh stále častěji vyskytuje u lidí, u nichž je také známo, že jejich střevo je kolonizováno *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. longum* a *B. bifidum* (Matsuki et al. 1999). *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. longum*, *B. gallicum*, a *B. adolescentis* jsou detekovány v lidském střevě především v dospělosti hostitele (Biavati et al. 1986; Kim et al. 2005). Rozšíření a hojnost různých druhů bifidobakterií může záviset na věku hostitele, genetických faktorech a druhu potravy (Mattö et al. 2004). Právě výše uvedené bifidobakteriální druhy byly testovány v rámci experimentů této bakalářské práce.

Jedná se o sacharolytické bakterie, které mají geny kódující glykosidázy, transportéry a jedinečnou metabolickou dráhu známou jako fruktózo-6-fosfátová (F-6-PPK) dráha (Fushinobu 2010). Klasifikace bifidobakteriálního pan-genomu ukázala, že přibližně 14% identifikovaných bifidobakteriálních genů kóduje enzymy podílející se na metabolismu uhlohydrátů (Milani et al. 2014; Milani et al. 2016). Jedním ze znaků pro identifikaci bifidobakterií je jejich specifický enzym F-6-PPK. Jiné grampozitivní bakterie tento enzym nemají (Fuquay et al. 2011). Bifidobakterie jsou schopny využít nejrozmanitější komplex substrátů v podobě jednoduchých cukrů, ale i polysacharidů. Řadíme je mezi probiotické bakterie (Miranda et al. 2011; Hill et al. 2014; Vandenplas et al. 2015). Jejich metabolizací substrátů vzniká kyselina octová a mléčná v poměru 3:2, působící jako jeden z probiotických faktorů. Acetát snižuje pH, působí antimikrobiálně a inhibuje celou řadu patogenů. Díky tomuto procesu se dá předejít celé řadě onemocnění (Biavati et al. 2000). Produkce laktátu a acetátu bifidobakteriemi během jejich růstu snižuje pH kultivačního média, což umožňuje při testování fermentačních profilů použít pH indikátory jako je například brómkresolová violet (Modráčková 2019), čehož bylo využito při testování bifidobakterií v níže zmíněných experimentech.

Pozitivní vliv bifidobakterií na zdraví motivuje vědce k hledání vhodných prebiotik. Jedná se o selektivní substrát pro probiotické bakterie, čímž se dosáhne podpoření jejich růstu v trávicím traktu a následnému tvoření metabolitů prospěšných pro zdraví hostitele (Cronin et al. 2011). Rada et al. (2008) a Bunešová et al. (2012) ve svých projektech pojednávají o tom, že existuje spousta prebiotik, která nejsou selektivní. Je tedy důležité najít takové látky, které budou podporovat jen prospěšné bakterie. Adepty na tyto substance může být rezistentní a modifikovaný škrob. Dále se často používají FOS, GOS, inulin, laktulóza a OMM (Belorkar & Gupta 2016; Míguez et al. 2016). Kim et al. (2018) zjistil, že selektivním prebiotikem by mohl být produkt pod komerčním názvem NUTRIOSE®, jenž má schopnosti redukovat patogenní *Clostridium perfringens* viz Obrázek č. 22 (Lefranc-Millot et al. 2012).

Proto jsme se rozhodli tento komerční výrobek otestovat a zjistit, jak vhodným substrátem bude pro bifidobakterie.



Obrázek 22: Vývoj počtu *Clostridium perfringens* před a po orálním užití přípravku NUTRIOSE®(upraveno podleLefranc-Millot et al. 2012)

Existuje málo studií zabývajících se vlivem NUTRIOSE® na přítomnost bifidobakterií. V roce 2004 van den Heuve zkusil testovat vlastnosti NUTRIOSE® na 20 mužích. Tito testovaní jedinci konzumovali NUTRIOSE® a placebo maltodextrin v dávkách 10, 15, 30, 45, 60 a 80 g denně. Experiment se nezaměřoval na změny počtu mikroorganismů ve střevě, ale na pozorování nadjímání, pocitu nevolnosti, vyprazdňování apod. Výsledkem bylo, že optimální množství NUTRIOSE® je 45 g denně. O 8 let později Hobden (2013) zkoušel *in vitro* testovat NUTRIOSE® na modelu tlustého střeva. Od zdravých dárců, kteří minimálně 3 měsíce před dárcovstvím nekonzumovali probiotika a neprošli antibiotickou léčbou, dostal fekální vzorky. K těmto vzorkům bylo přidáváno každý den 10-15g NUTRIOSE®. Pomocí diagnostiky FISH byl stanoven počet bakteriálních populací. Bylo prokázáno, že pšeničný dextrin podporuje grampozitivní bakterie *Clostridium* a rod *Roseburia* a dochází ke zvýšení butyrátu.

Ve výše uvedené práci byly použity 4 typy komerčních substrátů: NUTRIOSE® FB 06, FM 06, FB 10, FM 10. Tyto substance se lišily z hlediska původu škrobu a úpravy. Byly pšeničného nebo kukuřičného původu a měly odlišný obsah redukcujících sacharidů. Uvedené substráty byly testovány ve dvou typech esejí. V první metodě byl rozpuštěn 1 g/l potencionálního prebiotika NUTRIOSE® v médiu API 50 CH (podle BioMérieux, Francie) a testován v mikrotitračních destičkách. Použité množství substrátu se však jevilo jako nedostatečné pro optimální růst a produkci metabolitů, navíc mikrotitrační objemy neumožňovaly změření pH. Bylo tedy nutné zkusit testovat substráty v tzv. velkém objemu. Do tohoto testování byl navíc zařazen i dextrin původem z kukuřičného škrobu, který má jiný způsob výroby, nežli NUTRIOSE®. Substráty byly rozpuštěny v koncentraci 10 g/l v základním médiu podle Pechar et al. (2014).

NUTRIOSE® je dextrin, který sloužil jako jediný zdroj uhlíku pro bifidobakterie v testovacím médiu. V našem testování byl použit pH indikátor - bromkresolová violet'. Testování vycházelo z metabolismu bifidobakterií. Dosud publikované studie netestovaly produkt NUTRIOSE® na čistých kulturách bifidobakterií *in vitro*. Pro testování v rámci této práce bylo vybráno 9 druhů bifidobakterií o 54 kmenech typických pro trávicí trakt člověka: *B. adolescentis*, *B. animalis subsp. lactis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. longum*, *B. pseudolongum* a *B. gallicum*.

V případě, že bifidobakterie vykazovaly růst, produkovaly mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFAs) acetát a meziprodukt laktát. Tyto metabolity snížily pH, což bylo detekováno jako žluté zbarvení díky pH indikátoru, který mění barvu z fialové na žlutou při pH menším než 5,5. Pro pozitivní kontrolu byla použita glukóza, k negativní kontrole bylo použito základní médium s pH indikátorem bez přidání zdroje uhlíku.

Díky svým genům *B. breve* a *B. adolescentis*, jako jedni z mála druhů bifidobakterií, umí využít polysacharidy z rostlin – škroby (Ryan et al. 2006; Duranti a kol. 2014). To se potvrdilo i v našem testování, kdy tyto druhy společně s *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum* a *B. gallicum* byly schopny využít pšeničný a kukuřičný škrob. Bohužel škrob není vhodným adeptem pro prebiotika nýbrž je využíván i patogenními bakteriemi jako jsou klostridie (Luo et al. 2018). Utilizace škrobu korelovala s růstem bifidobakterií, zmíněných v tomto odstavci, na produktu NUTRIOSE® FM 06 a FB 06.

Také *B. pseudolongum* má významnou schopnost hydrolyzovat rezistentní škrob (Centanni et al. 2018). V testování se prokázala jeho způsobilost k utilizaci rezistentního škrobu a všechny 3 testované kmeny *B. pseudolongum* byly schopny metabolizovat veškeré substráty, které jim byly podány od pšeničných a kukuřičných dextrinů NUTRIOSE® až po běžný pšeničný a kukuřičný škrob a dextrin. Tato vlastnost může hrát důležitou roli v mikrobiotě, neboť *B. pseudolongum* spolu s *B. breve* a *B. adolescentis* mohou rozštěpit složité sacharidy například oligofruktózu na jednodušší sacharidy, např. fruktózu, a zpřístupnit ji pro ostatní bakterie. Tomuto jevu se říká cross feeding, tedy „křížové krmení“ (Falony et al. 2006).

Genomická výbava umožňuje *B. breve* využít komplexní uhlohydráty obsahující kyselinu sialovou, které se nacházejí v mucinu, glykosfingolipidech a lidském mléce (Wang et al. 2001), což naznačuje určitou hostitelskou adaptaci tohoto druhu. Díky široké škále enzymů *B. breve* v našem pokusu utilizoval všechny podané substráty.

B. bifidum může jako jediný z rodu *Bifidobacterium* plně degradovat mucin a růst v přítomnosti mucinu jako jediného zdroje uhlíku. Tyto metabolické schopnosti *B. bifidum* získalo, protože se vyskytuje v mateřském mléce a potřebovalo získávat energii z glykanů vyskytujících se v mléce (Duranti et al. 2015). Podle genomové sekvence je prokázáno, že *B. longum* subsp. *infantis* je jediným *Bifidobacterium* schopným využít kompletní oligosacharidy mateřského mléka (OMM). Má velký arzenál genů glykosylhydroláz, které se podílejí na enzymatickém zpracování OMM (Thomson et al. 2018). *B. bifidum* a *B. longum* subsp. *infantis* neumí využít škroby ani dextriny. To bylo potvrzeno v našem experimentu v případě *B. bifidum*. Ovšem u *B. longum* subsp. *infantis* pod označením DSM 20088 a DSM 20090, kterým byl podán dextrin, došlo k mírnému poklesu pH na 5,4, ačkoli barevná kontrola byla negativní. Mohlo by to být zapříčiněné obsahem redukujících cukrů, které je 5% a vyšší než u FB 06 a FM 06 (2-5 %). Parche et al. (2006) v experimentu zjistili, že *B. longum* je schopno fermentovat monosacharidy jako je glukóza, galaktóza a méně fruktózu. Taktéž využívá různé disacharidy (rafinózu a laktózu) a oligosacharidy. Proto *B. longum* subsp. *infantis* pod označením kmenů DSM 20088 a DSM 20090 byly schopny plně využít jen glukózu a NUTRIOSE® FB 10 a FM 10. V tomto případě by opět mohlo jít o obsah redukujících cukrů (8-12 %), jenž je tento druh schopen metabolizovat. Redukující cukry zahrnují všechny monosacharidy (např. glukóza, fruktóza, galaktóza) a některé disacharidy (např. celobiosa, maltóza, laktóza) (Xiang et al. 2012). Obsah

redukujících cukrů pro variantu FB 06 a FM 06 je nižší (2–5 %) viz Tabulka č. 6 na str. 36. Dále byla u všech kmenů *B. longum* potvrzena barevnou kontrolou, ale i pH hodnotou utilizace NUTRIOSE® FB 10 a FM 10 a dextrinu.

7. Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo otestovat růst bifidobakterií na komerčním produktu NUTRIOSE®, který by mohl sloužit jako prebiotikum. Vycházeli jsme z hypotézy popisující utilizaci dextrinů pomocí bifidobakterií, pocházejících z trávicího traktu člověka. Dextriny jsou obsaženy např. v námi testovaném komerčním produktu NUTRIOSE®. Tento substrát byl již v minulosti testován jinými studiemi a prohlášen za prebiotikum. Avšak žádný z experimentů nezkoumal přítomnost bifidobakterií po aplikaci NUTRIOSE®.

Hypotéza byla správná a povedlo se splnit cíl. Bylo zjištěno, že bifidobakterie pocházející z trávicího traktu člověka byly schopny růst v přítomnosti NUTRIOSE® jako jediného zdroje uhlíku v *in vitro* podmínkách. Utilizace uvedeného substrátu byla však druhově a kmenově specifická. Například druh *B. adolescentis*, dominující v dospělé populaci, výborně metabolizoval NUTRIOSE®. To je vypovídající výsledek o tom, že NUTRIOSE® může být vhodným prebiotikem pro dospělé lidi. Vznikající metabolity při utilizaci *B. adolescentis* podporují růst jiných bakterií v tlustém střevě tzv. „cross feeding“. Další zástupci bifidobakterií lidského trávicího traktu jako *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolognum*, *B. gallicum* též vykazovaly pozitivní růst na NUTRIOSE®. Druh *B. bifidum*, který se vyskytuje u novorozenců, testovaný substrát, podle předpokladu, nevyužíval. Výsledek potvrzuje jeho známou adaptaci na oligosacharidy třídy mateřského mléka a mupirocin.

Pro přesnější výstupy a vyhodnocení testování by bylo vhodné kvantifikovat vzniklé množství acetátu a laktátu. Taktéž by bylo dobré zanalyzovat složení produktu NUTRIOSE®, abychom zjistili, které sacharidy jsou předmětem utilizace a v jakém množství. Tato analýza by pomohla objasnit značný rozdíl mezi variantami NUTRIOSE® FM a FB 10 a FM a FB 06.

8. Literatura

Alberoni D, Gaggia F, Baffoni L, Modesto MM, Biavati B, Gioia D. 2019. *Bifidobacterium xylocopae* sp. nov. and *Bifidobacterium aemilianum* sp. nov., from the carpenter bee (*Xylocopa violacea*) digestive tract. *Systematic and Applied Microbiology* **42**: 205-16

Amaretti A, Bernardi T, Tamburini E, Zanoni S, Lomma M, Matteuzzi D, Rossi M. 2007. Kinetics and Metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 Growing on Glucose, Galactose, Lactose, and Galactooligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* (73) DOI: 10.1128/AEM.02914-06

Bahaka D, Neut C, Khattabi A, Monget D, Gavini F. 1993. Phenotypic and genomic analyses of human strains belonging or related to *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, and *Bifidobacterium breve*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**: 565–573.

Belorkar SA, Gupta AK. 2016. Oligosaccharides: a boon from nature's desk. *AMB Express*. (6). DOI: 10.1186/s13568-016-0253-5

Benkeblia N. 2013. Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. *Journal of Chromatography A* **1313**: 54-61

Biavati B, VESCOVO M, TORRIANI S, BOTTAZZI V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology* **50**: 117-131.

Bindels LB, Delzenne NM, Cani PD, Walter J. 2015. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol* **12**: 303–310

Bode L. 2012. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* **22**: 1147–1162

Bottacini F, Ventura M, Van Sinderen D, Motherway MOC. 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. In *Microbial cell factories* (13) DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S4>

Bunešová V, Vlková E, Rada V, Kňazovická V, Ročková Š, Geigerová M, Božík M. 2012. Growth of infant fecal bacteria on commercial prebiotics. *Folia Microbiologica* (57) DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0123-8>

Bunešová V, Vlková E, Rada V, Killer J, Musilova S. 2014. Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: Differences and similarities. *Beneficial Microbes* 5 DOI: <https://doi.org/10.3920/BM2013.0081>.

- Bunešová V, Killer J, Vlkova E, Musilova S, Tomaska M, Rada V, Kmet V. 2014. Isolation and characterization of bifidobacteria from ovine cheese. *International Journal of Food Microbiology* (188) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.001>
- Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. 2015. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology* **11**: 577–591
- Cronin M, Ventura M, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. 2011. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International journal of food mikrobiology* (149) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.019>
- Davis LMG, Martínez I, Walter J, Hutkins R. 2010. A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults. *International Journal Of Food Microbiology* (144) DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.007](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.007)
- Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X, Ling D. 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 119-125
- Drakoularakou A, Tzortzis G, Rastall RA, Gibson GR. 2010. A double-blind, placebo-controlled, randomized human study assessing the capacity of a novel galacto-oligosaccharide mixture in reducing travellers' diarrhoea. *European Journal of Clinical Nutrition* **64**: 146-152
- Duranti S, et al. 2019. Characterization of the phylogenetic diversity of five novel species belonging to the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium castoris* sp. nov., *Bifidobacterium callimiconis* sp. nov., *Bifidobacterium goeldii* sp. nov., *Bifidobacterium samirii* sp. nov. and *Bifidobacterium dolichotidis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **69**: 1288-98.
- Duranti S, et al. 2020. Characterization of the phylogenetic diversity of two novel species belonging to the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium cebidarum* sp. nov. and *Bifidobacterium leontopitheci* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (70) DOI: [10.1099/ijsem.0.004032](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004032)
- Eerlingen RC, Deceuninck M, Delcour JA. 1993. *Cereal Chemistry* **70**: 345-350
- Ehrmann MA, Korakli M, Vogel RF. 2003. Identification of the gene for beta-fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis* DSM10140(T) and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* **46**: 391-397
- Englyst HN, Cummings JH. 1986. Digestion of the carbohydrates of banana (*Musa paradisiaca sapientum*) in the human small intestine. *The American Journal of Clinical Nutrition* **44**: 42-50

- Englyst HN, Cummings JH. 1985. Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *The American Journal of Clinical Nutrition* **42**: 778-787
- Englyst HN, Kingman SM, Cummings JH. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition* **46**: 33-50
- Euzenat O, Guibert A, Combes D. 1997. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry* **32**: 237-243.
- Falony G, Vlachou A, Verbrugghe K, Vuyst L. 2006. Cross-Feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and Acetate-Converting, Butyrate-Producing Colon Bacteria during Growth on Oligofructose. *Applied and Environmental Microbiol* (72) DOI: 10.1128/AEM.01296-06
- Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM. 2013. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research* **69**: 1-10
- Foster JA, McVey Neufeld KA. 2013. Gut – brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences* (36) DOI: 10.1016/j.tins.2013.01.005
- Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PLH. 2011. *Encyclopedia of dairy sciences* 2nd ed. Academic Press, Amsterdam
- Fushinobu S. 2010. Unique sugar metabolic pathways of bifidobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**: 2374-2384
- Frühauf P. 2017. Střevní mikrobiota a možnosti ovlivnění. *Pediatric pro praxi* **18**: 239-242
- Gavini F, Pourcher AM, Neut C, Monget D, Romond C, Oger C, Izard D. 1991. Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **4**: 548-557
- Gelibolu S, Yanar Y, Genc MA, Genc E. 2018. The Effect of Mannan-Oligosaccharide (MOS) as a Feed Supplement on Growth and Some Blood Parameters of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **18**: 817-823
- German J, Freeman S, Lebrilla C, Mills D. 2008. Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria. *Nestlé Nutrition Workshop, Pediatric Program, Helsinki, September 2007* (62)
- Gibson GR. 1998. Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *The British Journal of Nutrition* **80**: 209-212

Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition research reviews* **17**: 259-275

Gibson GR, et al. 2010. Dietary prebiotics: current status and new definitiv. *Food Science and Technology Bulletin* **7**: 1-19

Gibson GR, et al. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* (14) DOI: 10.1038/nrgastro.2017.75

Gordon DT, Okuma K. 2002. Determination of total dietary fibre in selected foods containing resistant maltodextrin by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC International* **185**: 435-444

Görner F, Valík L. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia potravín* 1. vyd. Malé centrum, Bratislava

Guarner F, Malagelada JR. 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet* **361**: 512-519

Haenen D, Zhang J, Souza da Silva C, Bosch G. 2013. A diet high in resistant starch modulates microbiota composition, SCFA concentrations, and gene expression in pig intestine. *Journal of Nutrition* **143**: 274-283,

Henne K, Rheinberg A, Melzer-Krick B, Conrads G. 2015. Aciduric microbial taxa including *Scardovia wiggisiae* and *Bifidobacterium* spp. in caries and caries free subjects. *Anaerobe* **35**: 60-65.

Hijova E, Chmelarova A, Bomba A, Zitnan R. 2009. Prebiotic foodstuffs and their health benefits in experiment. *Bratislavské Lekárske Listy* **110**: 523-525

Hill C, et al. 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. **11**: 506-514.

Hobden MR, Martin-Morales A, Guerin-Deremaux L, Wils D, Costabile A, Walton GE, Rowald I, Kennedy OB, Gibson GR. 2013. In vitro fermentation of NUTRIOSE® FB06, a wheat dextrin soluble fibre, in a continuous culture human colonic model system. *PLoS ONE* **8** (e77128) DOI: 10.1371/journal.pone.0077128

- Holscher HD, Caporaso JG, Hooda S, Brulc JM, Fahey GC Jr, Swanson KS. 2015. Fiber supplementation influences phylogenetic structure and functional capacity of the human intestinal microbiome: follow-up of a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* **101**: 55-64
- Homayouni A, Amini A, Keshtiban AK, Mortazavian AM. 2014. Resistant starch in food industry: A changing outlook for consumer and producer. *Starch - Stärke* **66**: 102-114
- Chaturvedi P, Warren CD, Altaye M, Morrow AL, Ruiz-Palacios G, Pickering LK, Newburg DS. 2001. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology* **11**: 365–372
- Chonan O, Takahashi R, Yasui H, Watanuki M. 1996. Effects of beta 1-4 linked galactooligosaccharides on use of magnesium and calcification of the kidney and heart in rats fed excess dietary phosphorous and calcium. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **60**: 1735-1737
- Ito M, Deguchi Y, Miyamori A, Matsumoto K, Kikuchi H, Matsumoto K, Kobayashi Y, Yajima T, Kan T. 1990. Effects of administration of galactooligosaccharides on the human faecal microflora, stool weight and abdominal sensation. *Microbial Ecology in Health and Disease* **3**: 285-292
- Iwasaki H, Araki Y, Ito E, Nagaoka M, Yokokura T. 1990. Structure of macroam- piphiles from several *Bifidobacterium* strains. *Journal of Bacteriology* **172**: 845-852
- JAY JM, LOESSNER MJ, GOLDEN DA. 2005. *Modern food mikrobiology: Food science text series* 7th ed. Springer Science+Business Media, New York
- Kaur N, Gupta AK. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences* (27) DOI: 10.1007/BF02708379.
- Kheadr E, Dabour N, von Ah U, Lacroix C, Meile L, Fliss I. 2007. Genetic and phenotypic diversity of *Bifidobacterium thermacidophilum* fecal isolates from newborns. *Canadian Journal of Microbiology* **53**: 1348–1359
- Kim HJ, Shin SI, Lee SJ, Moon TW, Lee CJ. 2018. Screening and selection of *Bifidobacterium* strains isolated from human feces capable of utilizing resistant starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **98**: 5901-5907
- Kim KS, Kang HJ, Hwang IK, Hwang HG, Kim TY, Choi HC. 2005. Fibrillar microfilaments associated with a high-amylose rice, goami 2, a mutant of ilpumbyeo, a high-quality japonica rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 2600-2608

- Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Backhed F. 2016. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* **165**: 1332–1345
- Kolida S, Tuohy K, Gibson GR. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* (87) DOI: 10.1079/BJN/2002537.
- Lefranc-Millot C, Guérin-Deremaux L, Wils D, Neut C, Miller LE, Saniez-Degrave MH. 2012. Impact of a resistant dextrin on intestinal ecology: How altering the digestive ecosystem with NUTRIOSE®, a soluble fibre with prebiotic properties, may be beneficial for health. *Journal of International Medical Research* **40**: 211-224
- Lopez HW, Coudray C, Levrat-Verny MA, Feillet-Coudray C, Demigné C, Rémésy C. 2000. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* **11**: 500–508
- Marchal LM, Beeftink HH, Tramper J. 1999. Towards a rational design of commercial maltodextrins. *Trends Food Sci. Tech*: 345-355
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4506-4512
- Mattö J, Malinen E, Suihko M, Alander M, Palva A, Saarela M. 2004. Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 459-470
- Meulen RV, Adriany T, Verbrugghe K, Vuyst L. 2006. Kinetic analysis of bifidobacterial metabolism reveals a minor role for succinic acid in the regeneration of NAD⁺ through its growth-associated production. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5204-5210.
- Míguez B, Gómez B, Gullón P, Gullón B, Alonso JL. 2016. Pectic Oligosaccharides and Other Emerging Prebiotics. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. Venketeshwer Rao and Leticia G. Rao, IntechOpen. DOI: 10.5772/62830
- Milani C, et al. 2014. Genomic encyclopedia of type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 6290-6302
- Milani C, et al. 2016. Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. *Applied and Environmental Microbiology* **82**: 980-991

- Miranda RO, Neto GG, de Freitas R, de Carvalho AF, Nero LA. 2011. Enumeration of bifidobacteria using Petrifilm™ AC in pure cultures and in a fermented milk manufactured with a commercial culture of *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology* **28**: 1509-1513
- Modrackova N, Makovska M, Chachrazed M, Vlkova E, Tejnecky V, Bolechova P, Bunesova V. 2019. Prebiotic potential of natural gums and starch for bifidobacteria of variable origins. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* (20) DOI: 10.1016/j.bcdf.2019.100199
- Mohanty D, Misra S, Mohapatra S, Sahu PS. 2018. Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. *Food Bioscience* **26**: 152-160
- Musilova S, Rada V, Vlkova E, Bunesova V, Nevoral J. 2015. Colonisation of the gut by bifidobacteria is much more common in vaginal deliveries than Caesar sections. *Acta Paediatrica* (104) DOI: 10.1111/apa.12931.
- Musilova S, Rada V. 2015. Vliv oligosacharidů mateřského mléka na střevní mikrobiotu kojence. *Pediatric pro praxi* **16**: 17-19
- Nagaoka M, Hashimoto S, Shibata H, Kimura I, Kimura K, Sawada H, Yokokura T. 1996. Structure of a galactan from cell walls of *Bifidobacterium catenulatum* YIT4016. *Carbohydrate Research* **281**: 285-291.
- Nagaoka M, Shibata H, Kimura I, Hashimoto S, Kimura K, Sawada H, Yokokura T. 1995. Structural studies on a cell wall polysaccharide from *Bifidobacterium longum* YIT4028. *Carbohydrate Research* **274**: 245-249.
- Nevrlá M, Matějová H. 2015. Význam polynenasycených mastných kyselin během těhotenství a při kojení, jejich zdroje a přívod. *Výživa a potraviny* **4**: 99
- Niittyen L, Kajander K, Korpela R. 2007. Galactooligosaccharides and bowel function. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition* **51**: 62-66
- Ninnes KR. 1999. Inulin and Oligofructose: What Are They?. *Journal of Nutrition* (129) DOI: 10.1093/jn/129.7.1402S.
- Nowak A, Libudzisz Z. 2008. Mikroorganizmy jelitowe człowieka The intestinal microbiota of humans. *Standardy medyczne* **5**: 372-379
- Nyman M. 2002. Fermentation and bulking capacity of indigestible carbohydrates: the case of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* **87**: 163-168
- Ohkuma A, Hanno Y, Inaba K, Matsuda I, Katsuda Y. 1997. The United States Patent and Trademark Office, USA. US 5620873 A

- Op den Camp HJM, Oosterhof A, Veerkamp JH. 1985. Cell surface hydrophobicity of *Bifidobacterium bifidum* subsp. *pennsylvanicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **51**: 303-312.
- Parche S, et al. 2006. Sugar Transport Systems of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **12**: 9–19
- Pineiro M, et al. 2008. FAO technical meeting on prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology* **42**: 156–159
- Playne MJ, Crittenden RG. 1996. Production, properties, and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology* **7**: 353-361
- Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D, Rossi M. 2007. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 179–185
- Rada V, Nevoral J, Trojanová I, Tománková E, Šmehilová M, Killer J. 2008. Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in *in vitro* conditions. *Anaerobe* **14**: 205-208
- Rastall RA, Gibson GR. 2015. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology* **32**: 42-46
- Ripoll C, Flourie B, Megnier S, Hermand O, Janssens M. 2010. Gastrointestinal tolerance to an inulin-rich soluble roasted chicory extract after consumption in healthy subjects. *Nutrition* **26**: 799-803
- Rivero-Urgell M, Santamaria-Orleans A. 2001. Oligosaccharides: application in infant food. *Early Hum Dev* **65**: 43
- Roberfroid M, et al. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition* **104**: 1–63
- Rossi M, Corradini C, Amaretti A, Nicolini M, Pompei A, Zanoni S, Matteuzzi D. 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 6150-6158.
- Roturier JM, Looten P, Ostermann E. 2003. Dietary fibre measurements in food containing NUTRIOSE® FB. *Proceedings of the Dietary Fibre Conference*. Noordwijkerhout, The Netherlands

Roturier JM, Looten P. 2006 NUTRIOSE®: Analytical aspects. Proceedings of the Dietary Fibre Conference. Helsinki, Finland

Ryan SM, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2005. Transcriptional regulation and characterization of a novel beta-fructofuranosidase-encoding gene from *Bifidobacterium breve* UCC2003. Applied and Environmental Microbiology **71**: 3475-3482

Ryan SM, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2006. Screening and identification of starch, amylopectin and pullulan-degrading activities in bifidobacterial strains. Applied and Environmental Microbiology **72**: 5289-5296

Sakata S, Ryu CHS, Kitahara M, Sakamoto M, Hayashi H, Fukuyama M, Benno Y. 2006. Characterization of genus *Bifidobacterium* by automated ribotyping and 16 S rRNA gene sequences. Medical Microbiology and Immunology **50**: 1-10.

Sangeetha PT, Ramesh MN, Prapulla SG. 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. Trends in Food Science and Technology **16**: 442–457.

Scardovi V.1986. Genus *Bifidobacterium* Orla – Jensen 1924. 1418 – 1434 in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2. Sneath P, Williams E, Wilkins W, Baltimore

Shoaf K, Mulvey GL, Armstrong GD, Hutkins RW. 2006. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. Infection and Immunity **74**: 6920-6928

Schell MA, et al. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proceedings of the National Academy of Sciences **99**: 14422-14427.

Schmidt G, Zink R. 2000. Basic features of the stress response in three species of bifidobacteria: *B. longum*, *B. adolescentis*, and *B. breve*. International Journal of Food Microbiology **55**: 41–45.

Sinclair HR, De Slegte J, Gibson GR, Rastall RA. 2009. Galactooligosaccharides (GOS) inhibit *Vibrio cholera* toxin binding to its GM1 receptor. Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**: 3113-

Slavík B, Štěpánková J. 2004. KVĚTENA ČR, díl 7. Academia, Praha

Smilowitz JT, Sullivan AO, Barile D, German JB, Lönnerdal B, Slupsky CM. 2013. The human milk metabolome reveals diverse oligosaccharide profiles. Journal of Nutrition **143**: 1709-1718

- Šárka E, Smrčková P, Seilerová L. 2013. Rezistentní apomalu stravitelný. *Chemické Listy* **107**: 929–935
- Šilhánková L. 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, 3. vyd. Academia, Praha
- Thomson P, Medina DA, Garrido D. 2018. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. *Food Microbiology* **75**: 37-46
- Torres DPM, Duarte PM, Goncalves MPF, Teixeira JA, Rodrigues LR. 2010. Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (9) DOI: 10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x.
- Turroni F, Ribbera A, Foroni E, van Sinderen D, Ventura M. 2008. Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. *Antonie van Leeuwenhoek* **94**: 35-50
- Tvrzická E, Vecka M, Žák A. 2007. Konjugovaná kyselina linolenová – dietní suplement v prevenci kardiovaskulárních onemocnění? *ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH* **5**: 459
- Tzortzis S, Goulas AK, Gee JM, Gibson GR. 2005. A novel galactooligosaccharides mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. *Journal of Nutrition* **135**: 1726- 1731
- Valcheva R, Dieleman LA. 2016. Prebiotics: definition and protective mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **30**: 27-37.
- Van den Heuvel EGHM, Schoterman MHC, Muijs T. 2000. Trans galactooligosaccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal women. *Journal of Nutrition* **130**: 2938-2942
- Van den Heuvel EGHM, Wils D, Pasman WJ, Saniez MH, Kardinaal AF. 2005. Dietary supplementation of different doses of NUTRIOSE®FB, a fermentable dextrin, alters the activity of faecal enzymes in healthy men. *European Journal of Nutrition* **44**: 445-451.
- Vandenplas Y, Huys G, Daube G. 2015. Probiotics: An update. *Jornal de Pediatria* **91**: 6-21
- Van Nimwegen FA, et al. 2011. Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **128**: 948-55
- Venema K, Carmo AP. 2015. *Probiotics and prebiotics: Current research and future trends*. Caister Academic Press, London
- Venter CS. 2007. Prebiotics: An update. *Journal for Family Ecology and Consumer Sciences* **35**: 17-25

Ventura M, Turrone F, Lugli GA, van Sinderen D. 2014. Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**: 163-168.

Vernazza CL, Gibson GR, Rastall RA. 2006. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 846-853.

Vlková E, RADA V, KILLER J. 2011. *Potravinářská mikrobiologie*. Česká zemědělská univerzita, Praha

Vogt L, et al. 2015. Immunological properties of inulin-type fructans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **55**: 414–436.

Vulevic J, Drakoularakou A, Yaqoob P, Tzortzis G, Gibson GR. 2008. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition* **88**: 1438-1446

Walker WA. 2017. The importance of appropriate initial bacterial colonization of the intestine in newborn, child and adult health. *Pediatric Research* **82**: 387–395

Wall R, Hussey S, Ryan C, O'Neill M, Fitzgerald GF, Stanton C, Ross R. 2007. Presence of two *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* probiotic strains in the neonatal ileum. *The ISME Journal* **2**: 83-91

Wang B, Brand-Miller J, McVeagh P, Petocz P. 2001. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition* **74**: 510-515

Xiang J, Zhu W, Han J, Li Z, Ge H, Lin Z. 2012. Analysis of organic acids in Chinese raisin tree (*Hovenia dulcis*) peduncle and their changes in liquid fermentation process *Food Science and Biotechnology* **21**: 1119-1127, 10.1007/s10068-01200146-6

Yaeshima T, Takahashi S, Ishibashi N, Shimamura S. 1996. Identification of bifidobacteria from dairy products and evaluation of a microplate hybridization method. *International Journal of Food Microbiology* **30**: 303–313.

Yun JW. 1996. Fructooligosaccharides—occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology* **19**: 107–117

Zaman SA, Sarbini SR. 2016. The potential of resistant starch as a prebiotic. *Critical Reviews in Biotechnology* **36**: 578-584

Zbořil V, a kol. 2005. Mikroflóra trávicího traktu – Klinické souvislosti. Grada Publishing, Praha

Zhou Y, Meng S, Chen D, Zhu X, Yuan H. 2014. Structure characterization and hypoglycemic effects of dual modified resistant starch from indica rice starch. Carbohydrate Polymers journal **103**: 81-86

Zhou X, Li Y. 2015. Atlas of oral mikrobiology: From healthy microflora to disease. Academic Press, Oxford

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Přehled prospěšných a škodlivých bakterií (Upraveno podle Milani et al. 2017)	10
Obrázek 2: Vývoj mikrobioty (Upraveno podle Milani et al. 2017)	11
Obrázek 3: Hlavní funkce bakterií ve střevě (zdroj: web https://labiotech.eu/ - upraveno)	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 4: Fylogenetický strom založený na pan-genomové analýze (Alberoni et al. 2019)	14
Obrázek 5: Taxonomické zařazení rodu Bifidobacterium (upraveno podle Ventury et al. 2014)	15
Obrázek 6: Fruktóza-6-fosfátová cesta (upraveno podle Amarettiho et al. 2007)	18
Obrázek 7: Rozlišení toho, co je prebiotikum (upraveno podle Gibson et al. 2017)	23
Obrázek 8: Vliv oligosacharidů mateřského mléka (upraveno podle Bode, 2012).....	25
Obrázek 9: Glukofruktan levanového typu (www.vscht.cz, CHEMIE POTRAVIN - cvičení SACHARIDY)	26
Obrázek 10: Chemická struktura inulinu, F= frukóza, G=terminální glukóza Dostupné z (https://www.researchgate.net/)	26
Obrázek 11: Schéma GOS (upraveno podle: Whisner C. M. and Weaver C. M; 2013).....	28
Obrázek 12: Chemická struktura amylopektinu a amylozy (upraveno z http://www.biologydiscussion.com/	29
Obrázek 13: Struktura škrobu (upraveno z http://www1.lsbu.ac.uk)	30
Obrázek 15: Rezistentní škrob- diagram (upraveno z www.https://www.thehealthygrain.com)	31
Obrázek 16: Chemická struktura dextrinu	32
Obrázek 17: Penicilinové lahvičky s kultivačním médiem.....	35
Obrázek 18: Schéma Gramova zbarvení, (dostupné z laboratoryinfo.com/gram-staining-principle-procedure-interpretation-and-animation/)	37
Obrázek 19: Nadepsaná mikrotitační destička	40
Obrázek 20: Vyhodnocování testu na mikrotitrační destičce.....	41
Obrázek 21: Porovnání zmetabolizovaného vzorku s kontrolou	43
Obrázek 22: Měření pH	43
Obrázek 23: Vývoj počtu <i>Clostridium perfringens</i> před a po orálním užití přípravku NUTRIOSE®(upraveno podleLefranc-Millot et al. 2012).....	50

9. Samostatné přílohy

Tabulka 11: Vyhodnocení MALDI TOF – MS

a)

Kmen	Izolováno z	Identifikováno jako*	Ověření identifikace MALDI TOF MS	
			Identifikováno jako	score
005	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	2.103
006	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	2.005
008	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.192
019	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	Nenarostlo	xxx
033	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	Vyřazeno kokultura	xxx
035	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.205
040	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	2.13
042	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	2.049
045	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	Nenarostlo	xxx
049	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	2.041
057	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	Nenarostlo	xxx
063	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.07
065	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.967
068	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.311
070	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	2.186
074	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.962
078	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.07
080	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	2.112
083	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	Nenarostlo	xxx
086	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	Nenarostlo	xxx
090	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	Nenarostlo	xxx
097	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium longum</i>	Nenarostlo	xxx
105	stolice dítě (PEG)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.05
1/4	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.029
1/8	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.789

Tabulka 12: Vyhodnocení MALDI TOF – MS

b)

2/3	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.225
2/10	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Nenarostlo	xxx
3/2	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.048
3/7	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.055
3/10	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.106
4/2	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.063
4/5	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium longum</i>	Nenarostlo	xxx
5/2	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.055
5/3	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.169
6/2	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.24
6/10	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.083
7/4	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium longum</i>	Kokolultura	xxx
7/5	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.217
8/4	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.153
8/8	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.931
9/1	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.168
9/5	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.106
9/8	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.086
10/2	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium longum</i>	Nenarostlo	xxx
10/5	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.074
10/11	stolice dospělý vegetarián	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.222
BL1	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.187
BL10	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.22
BL12	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.119
JK3	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.173
JK4	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Lactobacillus Johnsonii</i>	2.248
JK5	stolice kojeneček (1,5m)	neidentifikovatelný	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.063
JK10	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.264
JK11	stolice kojeneček (1,5m)	neidentifikovatelný	<i>Escherichia coli</i>	xxx
JK16	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.142
JK17	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Nenarostlo	xxx

Tabulka 13: Vyhodnocení MALDI TOF – MS

c)

JK19	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.118
MA2	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	1.956
MA3	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.172
MA4	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	Nenarostlo	xxx
MA5	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.097
OL5	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.079
OL8	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	2.007
TA1	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	2.074
TA2	stolice kojeneček (1,5m)	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.2
1/1	stolice dospělý člověk	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.196
1/6	stolice dospělý člověk	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.138
2/9	stolice dospělý člověk	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Neidentifikovatelné	2.236
2/10	stolice dospělý člověk	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.994
3/2	stolice dospělý člověk	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.36
3/6	stolice dospělý člověk	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.087
3/11	stolice dospělý člověk	<i>Bifidobacterium longum</i>	Nenarostlo	xxx
4/2	stolice dospělý člověk	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	2.264
4/4	stolice dospělý člověk	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	2.079
BSM 8-1	stolice africký kojeneček	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	2.05
BSM 11-1	stolice africký kojeneček	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.19
ETH 37	stolice africký kojeneček	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.108
ETH 42	stolice africký kojeneček	<i>Bifidobacterium longum</i>	Nenarostlo	xxx
ETH 43	stolice africký kojeneček	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.877
PV 20-2	stolice africký kojeneček	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	2.055
TPY 11-1	stolice africký kojeneček	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.26
DSM 20083	oficiální sbírka	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	2.275
DSM 20098	oficiální sbírka	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	2.191
ATCC 15701	oficiální sbírka	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	2.059
DSM 20082	oficiální sbírka	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.231
DSM 20215	oficiální sbírka	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.24
DSM 20456	oficiální sbírka	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.149
DSM 16992	oficiální sbírka	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.182
DSM 20219	oficiální sbírka	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.237
DSM 20088	ssp. <i>Infantes</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.092
DSM 20438	oficiální sbírka	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	1.886
DSM 20093	oficiální sbírka	<i>Bifidobacterium gallicum</i>	<i>Bifidobacterium gallicum</i>	2.333
ATCC 29521	oficiální sbírka	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.143
DSM 20090	ssp. <i>Infantes</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.222

Tabulka 14: Výsledky měření na mikrotitrační destičce

a)

Kmen	Druhová specifita	FB 06	FB 10	FM 06	FM 10	WS	CS
VB 1/4	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	*	*	-	+	++	++
VB 5/2	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	*	*	*	+	++	++
MB 2/9	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	+	+	*	*	++	++
JK3	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	-	*	-	*	+	-
035	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	*	*	*	*	++	++
JK 10	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	-	-	-	*	+	-
DSM 20098	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	*	+	*	+	++	++
042	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	-	*	-	*	++	-
M 4/2	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	-	*	-	*	++	-
M 4/4	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	-	*	-	*	+	-
005	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	-	*	-	*	+	-
049	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	-	*	*	*	+	-
080	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	*	-	-	*	+	-
ATCC 1793	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	-	-	-	-	*	++
JK16	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	*	-	*	*	-
DSM 20082	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	*	*	-	+	++
DSM 20215	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	*	-	*	*	-
DSM 20456	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	-	-	*	*	-
008	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	-	-	-	*	-
BL10	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	*	-	*	*	-
105	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	-	-	*	*	-

Vysvětlivky: ++ pozitivní výsledek, jasně žlutá barva
 + pozitivní výsledek, žlutohnědá barva
 * neutrální výsledek, došlo k nepatrné změně barvy
 - negativní výsledek, bez barevné změny

Tabulka 15: Výsledky měření na mikrotitrační destičce

b)

105	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	-	-	*	*	-
M 3/6	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	*	*	-	*	+	++
MA5	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	*	-	-	*	+	-
006	<i>Bifidobacterium breve</i>	-	*	-	*	+	-
065	<i>Bifidobacterium breve</i>	-	*	-	*	+	-
OL8	<i>Bifidobacterium breve</i>	*	++	+	++	++	++
TA1	<i>Bifidobacterium breve</i>	-	*	-	*	+	+
070	<i>Bifidobacterium breve</i>	*	*	-	*	++	++
074	<i>Bifidobacterium breve</i>	-	*	*	*	+	-
VB 3/10	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	+	+	-	+	++	++
VB 9/1	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	-	-	-	+	++	-
BSM 11-1	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	-	+	-	+	++	-
MA2	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	-	-	-	+	+	-
BL1	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	-	*	-	+	+	*
DSM 16992	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	-	*	*	+	*	*
DSM 20438	<i>Bifidobacterium pseudoCATENULATUM</i>	*	++	-	+	++	++
VB 1/8	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	-	-	-	++	-

Tabulka 16: Výsledky měření na mikrotitrační destičce

c)

VB 3/7	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	-	-	*	+	-
VB 5/3	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	-	-	*	+	-
VB 6/2	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	-	-	*	+	-
VB 6/10	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	-	-	+	+	-
ETH 43	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	+	-	+	+	-
068	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	*	-	+	++	++
M1/6	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	+	-	+	++	+
M 2/10	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	+	-	+	++	++
MA3	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	+	-	+	+	--
BL 12	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	*	-	*	++	++
JK19	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	*	-	*	+	*
VB 8/8	<i>Bifidobacterium longum</i>	*	*	-	*	+	-
OL5	<i>Bifidobacterium longum</i>	*	*	-	+	+	+
TA2	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	+	-	++	++	++
063	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	*	-	*	+	-
VB 2/10	<i>Bifidobacterium longum</i>	*	*	*	*	++	++
DSM 20219	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	-	-	-	+	++
DSM 20088	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	*	-	*	*	-
DSM 20090	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	-	-	+	++	-
VB 10/11	<i>Bifidobacterium longum</i>	-	*	-	*	+	-
BSM 8-1	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	+	+	*	*	++	++
PV 20-2	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	+	+	*	*	++	++
DSM 20083	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	*	+	*	+	++	++
DSM 20093	<i>Bifidobacterium gallicum</i>	++	+	+	+	++	++