

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Vliv mléčného proteinu a mléčných hydrolyzátů
na adherenci mikroorganismů

Bakalářská práce

Autor práce: Dagmar Miškovská
Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Vliv mléčného proteinu a mléčných hydrolyzátů na adherenci mikroorganismů“ 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 _____

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu této práce doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za poskytnutí možnosti podílet se na výzkumné činnosti pod jeho vedením. Mé poděkování dále patří Ing. Tereze Volšátové za důležité připomínky ke zpracování této práce a vedení v laboratoři.

Souhrn

Bakalářská práce nejprve shrnuje základní poznatky o lidském intestinálním mikrobiomu, jeho významu, složení a variabilitě. Dále je popsán význam bakterií adhezujících na stěnu tenkého a tlustého střeva a je podán přehled stavu poznání mechanismu mikrobiální adheze na střevní epitel a vlivu mléka a mléčných výrobků na lidský intestinální mikrobiom. Experimentální část je věnována měření adherence bakteriálních druhů *Lactobacillus gasseri* R a *Lactobacillus casei* FMP na model intestinálního epitelu při aplikaci hydrolyzátů pěti druhů mléka a roztoků tří mléčných proteinů. Buněčný model je tvořený jednoduchou vrstvou smíšené buněčné kultury Caco-2 a mucin - produkující buněčné kultury HT29-MTX. Na 5 % hladině významnosti byl prokázán pozitivní vliv hydrolyzátu mateřského mléka na adhezenci *L. gasseri* R a hydrolyzátu ovčího mléka na adhezenci *L. casei* FMP. Naproti tomu snížení adherence bylo prokázáno u druhu *L. gasseri* R při ošetření hydrolyzátem vysokoteplotně upraveného (UHT) mléka a roztoky mléčných proteinů kaseinu a kaseinomakropeptidu a u druhu *L. casei* při ošetření roztokem albuminu z hovězího fetálního séra.

Klíčová slova

mléko, kaseiny, syrovátkové proteiny, mikrobiální adherence, adheziny, mucin, Caco-2, HT-29MTX

Summary

Theoretical part of this thesis is targeted to basic knowledge about human gut microbiome, especially its significance, composition and variability of bacteria adhering to the wall of small and large intestine. Known mechanisms of microbial adhesion to the intestinal epithelium and the influence of dairy consumption on the human gut microbiome are described in a following part. Experimental part is dedicated to tests of adherence of two bacterial strains *Lactobacillus gasseri* R and *Lactobacillus casei* FMP to an intestinal epithelium. Experiments were using a monolayer cell model of human intestinal epithelium consisting of co-culture of Caco-2 and mucus-secreting HT29-MTX cell lines. Five types of hydrolyzed milk with different origin and three types of milk proteins were applied to the intestinal model with bacterial suspension. Positive influence of hydrolysate of human maternal milk on the adherence of *L. gasseri* R and sheep milk on the adherence of *L. casei* FMP of 5 % significance was proved. Decreased adherence was observed for the strain *L. gasseri* R after its exposure to UHT-treated milk and solutions of milk proteins casein and caseinomacropeptide. The strain *L. casei* showed decreased ability to adhere after treatment by solution of albumin of bovine fetal serum.

Keywords

milk, casein, whey protein, microbial adhesion, cell adhesion molecules, mucin, Caco-2, HT-29MTX

Obsah

1 Úvod.....	6
2 Cíle práce.....	7
2.1 Testované hypotézy.....	7
3 Literární řešerše.....	8
3.1 Mikrobiom lidského trávicího traktu a interakce se zdravím hostitele.....	8
3.1.1 Hlavní mikroorganismy trávicího traktu člověka.....	8
3.1.2 Role probiotických mikroorganismů.....	11
3.1.3 Role v modulaci imunitního systému.....	11
3.1.4 Změny mikrobiomu v souvislosti s výživou a životním stylem.....	12
3.2 Mechanismy mikrobiální adherence na střevní stěnu.....	14
3.2.1 Význam adherence.....	14
3.2.2 Mechanismy.....	14
3.3 In vitro testy mikrobiální adherence.....	15
3.3.1 Autoagregace a adherence.....	15
3.3.2 Adherence na mucin a slizniční buňky.....	15
3.3.3 Adherence na Caco-2, HT-29 a HT29-MTX kultury.....	15
3.4 Mléko ve výživě člověka.....	16
3.4.1 Bílkoviny kravského mléka.....	17
3.4.2 Mastné kyseliny a jejich triglyceridy.....	17
3.4.3 Antioxidační vlastnosti.....	18
3.5 Možné interakce mikroorganismů s prostředím.....	19
3.5.1 Vytváření biofilmů.....	19
3.5.2 Výsledky z buněčných modelů.....	19
4 Materiál a metody.....	21
4.1 Bakteriální kmeny.....	21
4.2 Buněčné kultury.....	22
4.3 Příprava bakteriální suspenze.....	22
4.4 Příprava mléčného hydrolyzátu.....	23
4.5 Test adherence.....	24
5 Výsledky.....	26
6 Diskuze.....	33
7 Závěr.....	34
8 Seznam Literatury.....	35
8.1 Tištěná literatura.....	35
8.2 Elektronické zdroje.....	39

1 Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá výzkumem adherence dvou druhů potenciálně probiotických bakterií na mucin - produkující buněčný model lidského intestinálního epitelu v závislosti na přítomnosti neutralizovaného hydrolyzátu pěti různých druhů mléka, který představuje model tráveného mléka po hydrolyze v žaludku a následné neutralizaci v dvanácterníku, a dále v závislosti na přítomnosti tří druhů mléčných proteinů.

Lactobacillus gasseri R a *Lactobacillus casei* FMP byly vybrány jako zkoumané druhy bakterií kvůli odlišným autoagregačním vlastnostem, které poukazují na odlišné působící mechanismy adherence.

Dostatečná adheze mikroorganismu je předpokladem pro kolonizaci střevního epitelu a případné probiotické účinky, a proto je jedním ze základních kritérií při volbě bakterie jako probiotického doplňku stravy. Častou metodou dopravení probiotika do gastrointestinálního traktu je podání ve fermentovaném mléčném nápoji, a tudíž adheze probiotických organismů za přítomnosti hydrolyzovaných mléčných frakcí představuje důležitý případ.

Experimentální výzkum, který je předmětem této práce, statisticky prokázal na 5 % hladině významnosti pozitivní vliv hydrolyzátu mateřského mléka na adherenci *L. gasseri* R a hydrolyzátu ovčího mléka na adherenci *L. casei* FMP. Naproti tomu snížení adherence bylo prokázáno pro *L. gasseri* R po ošetření hydrolyzátem vysokoteplotně (UHT) upraveného mléka a dále roztoky mléčných proteinů kaseinu a kaseinomakropeptidu a u druhu *L. casei* FMP při ošetření roztokem albuminu z hovězího fetálního séra.

V teoretické části se tato práce zabývá lidským intestinálním mikrobiomem, jeho významem, složením a variabilitou v rámci lidské populace. Dále je popsán význam bakterií adherujících na stěnu tenkého a tlustého střeva a je podán přehled stavu poznání mechanismu mikrobiální adheze na intestinální epitel. Ve svém závěru se teoretická část věnuje dietologickému významu mléka a vlivu mléka a mléčných výrobků ve stravě na lidský intestinální mikrobiom.

Experimentální část začíná popisem metody měření mikrobiální adherence na model intestinálního epitelu tvořeného jednoduchou vrstvou smíšené kultury Caco-2 a mucin - produkující buněčné kultury HT29-MTX, jsou uvedeny výsledky experimentu, které jsou následně diskutovány v kontextu poznatků, které byly shrnuty v teoretické části.

2 Cíle práce

Cílem této práce je

1. zjistit a popsat vliv hydrolyzátů různých druhů mléka a roztoků mléčných proteinů na adhezenci bakteriálních druhů *Lactobacillus gasseri* R a *Lactobacillus casei* FMP v in vitro modelu trávicího traktu tvořeném buněčnými liniemi Caco-2 a HT29-MTX a
2. statisticky otestovat hypotézu, že některé frakce mléka snižují schopnost probiotik adherovat na střevní stěnu.

2.1 Testované hypotézy

Použitým statistickým testem je Welchova varianta t-testu na 5 % hladině významnosti. Ta stanovuje, za jakých podmínek lze zamítnout na dané hladině významnosti hypotézu, že by dvě náhodné veličiny s normálními rozděleními o různých rozptylech měly stejné střední hodnoty.

Pokud lze dle Welchovy varianty t-testu zamítnout hypotézu, že by se rovnaly střední hodnoty adherence daného bakteriálního druhu v kontrolním vzorku a ve vzorku ošetřeného daným způsobem, je tím statisticky významně na dané hladině významnosti potvrzena hypotéza, že dané ošetření ovlivní střední hodnotu adheze daného bakteriálního druhu na popsaný buněčný model střevního epitelu.

Testovaných hypotéz je tedy šestnáct a vzniknou dosazením dvou druhů bakterií a osmi způsobů ošetření do následující věty:

Adherence daného bakteriálního druhu na buněčný model střevního epitelu tvořený buňkami Caco-2 a HT29-MTX se po daném způsobu ošetření liší od adherence kontrolní neošetřené populace stejného druhu.

Dané dva druhy bakterií jsou *Lactobacillus gasseri* R a *Lactobacillus casei* FMP. Osm daných druhů ošetření sestává z ošetření hydrolyzátem kravského, ovčího, kozího, mateřského a kravského vysokoteplotně upraveného (UHT) mléka a dále z roztoků následujících mléčných proteinů: kaseinu, kaseinomakropeptidu a albuminu.

3 Literární rešerše

V této kapitole jsou shrnuty základní poznatky o mikrobiomu lidského gastrointestinálního traktu, jeho významu, složení a variabilitě v rámci lidské populace. Dále je popsán význam bakterií adherujících na stěnu tenkého a tlustého střeva a je podán přehled stavu poznání mechanismu mikrobiální adheze na intestinální epitel. Následně se kapitola věnuje významu mléka v lidské stravě a vlivu mléka a mléčných výrobků na organismy mikrobiomu lidského gastrointestinálního traktu.

3.1 Mikrobiom lidského trávicího traktu a interakce se zdravím hostitele

Mikrobiom gastrointestinálního traktu člověka je složitý ekosystém organismů, které se vzájemně ovlivňují a mají značný podíl na energetickém příjmu (Bäckhed a kol., 2005 a The Human Microbiome Project Consortium, 2012). Bylo rozeznáno (Eckburg a kol., 2005) nejméně pět funkcí plněných gastrointestinálním mikrobiomem:

1. ochrana před poraněním epiteliálních buněk,
2. regulace ukládání tuků,
3. stimulace intestinální angiogeneze (regenerace sítě krevních kapilár),
4. rozklad polysacharidů a
5. stimulace imunitního systému.

Eckburg a kol. (2005) i Bäckhed a kol. (2005) nazývají mikrobiom lidského gastrointestinálního traktu „mikrobiálním orgánem“ a „anaerobním bioreaktorem“. Velikost populace gastrointestinálního mikrobiomu je největší z mikrobiálních systémů člověka, počet jedinců se může blížit až k 10^{14} a počet unikátních genů přítomných v mikrobiomu je přibližně stokrát vyšší než počet genů lidského genomu (Bäckhed a kol., 2005).

Interakce mezi organismy lidského mikrobiomu gastrointestinálního traktu a jejich hostitelem může být povahy symbiotického i parazitického vztahu. V případě symbiotického vztahu nazýváme organismus probiotikem (např. mnoho bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*) a v případě parazitického vztahu patogenem (rody *Escherechia*, *Salmonella*, *Shigella* nebo *Helicobacter pylori*).

3.1.1 Hlavní mikroorganismy trávicího traktu člověka

Struktura lidského mikrobiomu trávicího traktu člověka se mění od dutiny ústní až po rektum v souvislosti s více faktory podmiňujícími výskyt různých druhů mikroorganismů. Jedná se jak o změny kvantitativní, tak o změny kvalitativní. Jsou ovlivněny

hlavně skladbou a tloušťkou povrchového epitelu, složením mukózy, prouděním a skladbou tráveniny, sekrecí enzymů a žluče, přítomností imunitních buněk, pH a redoxním potenciálem. Podle přítomnosti kyslíku v jednotlivých částech trávicího traktu je můžeme rozdělit na dvě skupiny. V orální části trávicí trubice převládají aerobní a fakultativně anaerobní bakterie, zatímco v aborální části jsou bakterie anaerobní. Narušení přirozené rovnováhy střevní mikrobioty je spojováno s obezitou, malnutricí, zánětlivým břišním onemocněním, neurologickými poruchami a rakovinou (Lozupone a kol. 2012).

Většina zdravých dospělých lidí sdílí stejnou základní mikrobiotu, jejíž zástupci se řadí mezi archae, bakterie, eukaryota i viry, ovšem studie The Human Microbiome Project Consortium prokázala (2012) značnou rozmanitost ve složení mikrobiomu široce variující i mezi zdravými jednotlivci západní společnosti s podobným životním stylem. K podobnému závěru docházejí i Eckburg a kol. (2005), kteří pozorovali značnou variabilitu mezi složením lidského gastrointestinálního mikrobiomu různých jedinců. Většina bakterií pochází z kmenů Bacteroidetes a Firmicutes, naproti tomu kmeny Actinobacteria, Proteobacteria a Verrucomicrobia jsou spíše v minoritním zastoupení.

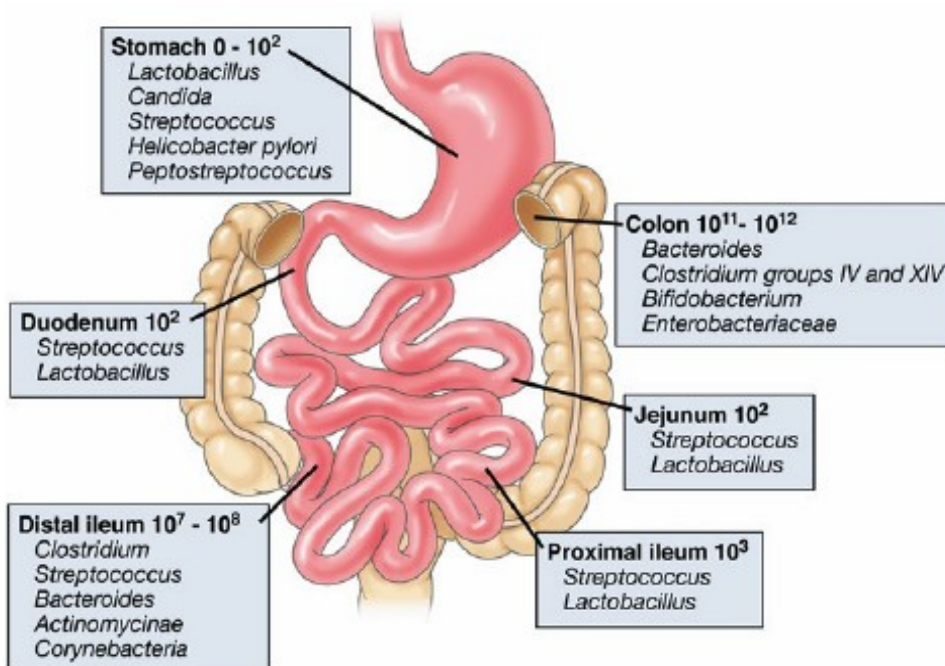
Lozupone (2012) uvádí, že v prvním oddílu trávicího traktu, tedy v ústech, se vyskytuje na 700 druhů mikroorganismů patřících do devíti kmenů bakterií a jednoho kmene Archae. Z bakteriálních rodů je dominantním grampozitivní rod *Streptococcus* řadící se do kmene Firmicutes. Výskyt jednotlivých druhů bakterií závisí na typu zkoumaného povrchu, jako je jazyk, zuby, dásně atp. (Aas a kol., 2005)

Dalším segmentem trávicí trubice je esophagus (jícen), jehož mukózu obývá asi 95 druhů z šesti různých kmenů bakterií, přičemž většina je stejná nebo podobná mikrobiotům dutiny ústní (Pei a kol., 2004). Jícen ústí do žaludku, ve kterém převládá extrémně kyselé prostředí, jehož pH se pohybuje od extrémně kyselých až po neutrální hodnoty v závislosti na složení přijaté potravy. To nejsou podmínky, které by byly pro většinu bakterií slučitelné se životem. Díky tomu žaludek představuje první ochrannou linii proti patogenům, které byly přijaty spolu s potravou. Rezistentními rody, které bez problému projdou pasáží žaludku, jsou například patogeny *Salmonella*, *Shigella* nebo *Helicobacter pylori*.

Množství životaschopných buněk se v žaludku pohybuje mezi 0 až 10^2 CFU / ml dle Sartora (2008) a 10^2 až 10^4 CFU / ml dle Delgada a kol. (2013). Mezi hlavní rody

obývající tento segment trávicího traktu patří *Streptococcus*, *Propionibacterium* a *Lactobacillus* (Delgado a kol. 2013).

Na žaludek navazuje tenké střevo duodenem (dvanáctníkem), ve kterém dochází k neutralizaci v žaludku hydrolyzované potravy. Jako ochranná bariéra zde působí žlučové kyseliny. Jejich přítomnosti odolávají bakterie kmenů Bacteroidetes a Firmicutes, ke kterým řadíme rody *Bacteroides*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* a další. Počet mikroorganismů v tenkém střevě se pohybuje od 10^4 CFU / ml v duodenu až k 10^7 CFU / ml v oblasti jejunu (lačník, střední část tenkého střeva). Vzhledem ke zpomalující se pasáži obsahu trávicího traktu a snižující se koncentraci kyslíku se mění i kvalitativní zastoupení bakterií směrem k narůstajícímu počtu anaerobních organismů (Dethlefsen, 2006). Sartor (2008) uvádí koncentrace bakterií v tenkém střevu o dva řády nižší, viz Obrázek 1.



Obrázek 1: Složení a lumenální koncentrace v CFU / ml dominantních mikroorganismů v různých částech lidského gastrointestinálního traktu (zdroj Obrázek: Sartor, 2008). Jiné zdroje (Dethlefsen a kol., 2006 a Delgado a kol., 2013) uvádějí o dva řády vyšší hodnoty pro žaludek a tenké střevo.

Místem nejvyšší koncentrace organismů mikrobiomu v lidském těle je tlusté střevo. Bakteriální populace zde dosahuje hodnot okolo 10^8 CFU / ml a až 10^{12} CFU / ml ve stolici. Růst bakterií v tlustém střevu, především ve vzestupném tračníku, se zvyšuje s probíhající

hydrolyzou polysacharidů a fermentací sacharidů, v příčném a sestupném tračníku pak koncentrace mikroorganismů klesá vlivem probíhající fermentace aminokyselin (Dethlefsen, 2006).

Druhové zastoupení fakultativních anaerobů klesá z přibližně 25 % až k 1 % (Marteau a kol., 2004) a je zde přítomno všech devět kmenů bakterií: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Cyanobacteria, TM7, Fusobacteria a Spirochaetes, z nichž opět převažují Bacteroidetes a Firmicutes (Ley a kol., 2005). Jedním z rozhodujících faktorů ve složení lidské střevní mikrobioty je věk, dle kterého dělíme lidskou populaci do tří vývojových stádií - neonatální, dospělé a finální „zlatý věk“ (dle ruského imunologa Ilja Iljiče Mečnikova, Morelli a Patrone, 2014).

3.1.2 Role probiotických mikroorganismů

Slovo probiotický je složeno z řeckých pro- (ve prospěch) a -bios (života) a původně bylo používáno k pojmenování látek podporujících růst mikroorganismů, pro které dnes používáme výraz prebiotika. Podle definice uznané mezinárodními společnostmi WHO a FAO jako probiotikum označujeme živý mikrobiální doplněk stravy, který při podání v dostatečném množství prospívá zdraví hostitele (Jensen a kol., 2011).

Aby byla podaná probiotika účinná, musí být splněno několik základních požadavků. Probiotické bakterie musí být při podání živé, aby se mohly rozmnožit v tlustém střevě hostitele. Jejich podávané množství by mělo být takové, aby dosáhly cílového segmentu v dostačujícím počtu i při relativní převaze stálého střevního mikrobiomu. Probiotika by měla být taxonomicky definovatelná jako mikroby nebo kombinace mikrobů s prokazatelnými pozitivními účinky a nezjištěnými negativními vlivy při vnitřním užití zdravým člověkem.

Některé patogeny jako např. *Salmonella* nebo *Shigella* napadají hostitele proniknutím do jeho epiteliálních buněk přes neokupované niky lumenu. Konzumace bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacteria* zabraňuje průniku patogenním mikroorganismům do buněk hostitele (Fons a kol., 2000). Jejich růst je podporován podáváním prebiotických doplňků.

3.1.3 Role v modulaci imunitního systému

Charakteristika mikrobioty gastrointestinálního traktu odpovídá fenotypu hostitele (Delzenne, 2011). Převážně anaerobní mikrobiota distálního ilea (poslední sekce tenkého střeva ústící do tlustého střeva) a tračníku představuje rozmanitý celek metabolicky aktivních

bakterií a hub, které reagují s hostitelskými epiteliálními buňkami a mukozálním imunitním systémem. Následkem neustálé stimulace patogenních reakcí imunitního systému mikrobioálními antigeny může být vznik zánětlivých střevních onemocnění jako je Crohnova choroba, ulcerativní kolitida a pouchitis. Mezi příznaky probíhajícího zánětu patří zvýšená stimulace imunitního systému, zvýšená propustnost vrstvy mukózy a epiteliální dysfunkce (Sartor, 2008).

Rozsáhlý komplex mikrobioty ilea a tlustého střeva tvoří v těle bohatý zdroj potenciálně škodlivých organismů, ligandů a antigenů, které mohou aktivovat vrozené patogenní a adaptivní reakce imunitního systému. Do organismu mohou být vylučovány metabolické produkty měnící vlastnosti epitelu a jeho imunitní funkce (Eckburg, 2005). Slizniční homeostáza je závislá na komezálních bakteriích, které efektivně vylučují antimikrobiální peptidy a komplexy IgA / IgB. Vzniká relativně nepropustná slizniční bariéra, která se podílí na vytlačování xenotoxinů a opravách epiteliálních defektů. Usměňuje vrozené a adaptivní reakce imunitního systému vyvolané přítomností bakterií a sekundární fagocytózou, mající za následek napadání a ničení bakteriální populace. Rozpoznávací funkci imunitního systému plní epiteliální buňky mukózy a podslizniční vrstva dendritických buněk (Sartor, 2008).

3.1.4 Změny mikrobiomu v souvislosti s výživou a životním stylem

Finegold a kol. (1974) zkoumali vliv stravy na střevní mikrobiom v souvislosti s rakovinou tlustého střeva, nízkým výskytem tohoto onemocnění v Japonsku a nárůstem výskytu střevních karcinomů u Japonců, kteří se přestěhovali do Spojených států. Finegold a kol. analyzovali vzorky stolice a objevili značné rozdíly mezi složením mikrobiomu obyvatel Spojených států a Japonska. Bakterie rodu *Clostridium* a druhu *Streptococcus faecalis* byly přítomné u Američanů v signifikantně nižších počtech než u Japonců. Američané měli naopak vyšší zastoupení druhu *Fusobacterium nucleatum*, který u Japonců často nebyl vůbec detekován. *Clostridium paraputrificum* se zdá být podstatným v kontextu výskytu rakoviny, protože bylo dokázáno, že produkuje karcinogeny z žlučových kyselin. (Finegold a kol., 1974)

Dethlefsen a kol. (2006) pozorovali souvislost mezi genetickými předpoklady k obezitě, vyšší koncentrací bakterií kmene Firmicutes a poklesem v zastoupení kmene Bacteroidetes. Duncan a kol. 2008 zkoumali korelaci mezi složením mikrobiomu u obézních

a neobézních jedinců a neobjevili žádnou souvislost mezi složením mikrobiomu ve stolici a BMI (body mass index) přes hypotézy spekulující o vlivu poměru mezi bakteriemi kmene Firmicutes a Bacteroidetes, ovšem zajímavým pozorovaným faktem byl signifikantní pokles v zastoupení butyrát produkujících bakterií kmene Firmicutes u jedinců snažících se o snížení tělesné hmotnosti pomocí diety založené na nízkém přísunu sacharidů.

Glick-Bauer a Ming-Chin Yeh (2014) zkoumali rozdíl mezi vegany, vegetariány a běžnou populací a odhalili plynule přecházející kontinuum mezi lidmi s velkým zastoupením živočišných produktů ve stravě na jedné straně a vegany na straně druhé. U veganů bylo pozorováno menší zastoupení mnoha patobiontů, včetně několika patogenů čeledi Enterobacteriaceae, a dále byl u veganů pozorován větší podíl bakterií druhu *Faecalibacterium prausnitzii*, jehož deficiencie koreluje s vyšším výskytem Crohnovy nemoci, obezitou a astmatem.

Lopez-Legarrea a kol. (2014) zkoumali vliv tří typů stravy, středomořské, založené na sacharidech (anglicky carbohydrate diet) a vysoko-proteinové, na složení střevního mikrobiomu ve spojení s obezitou a s ní souvisejícími zánětlivými onemocněními. Strava s vysokým obsahem vlákniny korelovala s nárůstem zastoupení bakterií rodů *Bifidobacterium* a *Clostridium*, vyšší tvorbou butyrátu a menší pravděpodobností obezity a souvisejících zánětlivých onemocnění. Strava bohatá na maso byla asociována s větším výskytem kolorektálního karcinomu a s toxickými produkty fermentace, v oblasti složení mikrobiomu pak s nárůstem zastoupení bakterií kmene Bacteroidetes a nižším zastoupením rodu *Bifidobacterium*. Středomořskou je označována strava bohatá na nenasycené mastné kyseliny. Vyznačuje se ovocem, zeleninou, olivovým olejem, zastoupením ryb a drůbeže, nízkým příjmem červeného masa a mírnou konzumací červeného vína. Tento typ stravy je široce uznávaný jako zdraví prospěšný především díky poměru tuků a obsahu antioxidantů. Mezi pozorované mikrobiotické jevy patří především pokles výskytu patogenů rodu *Clostridium* a vyšší zastoupení rodu *Bifidobacterium*.

Lopez-Legarrea a kol. (2014) dále popisují značný vliv podávání probiotických bakterií druhu *Lactobacillus gasseri* v 200 g fermentovaného mléka po dobu 3 měsíců na redukci zásob podkožního tuku u obézních jedinců proti kontrolní skupině, která užívala samotné fermentované mléko. Dále je v této práci uveden přehled studií, které poukazují

na zmírnění průběhu zánětlivých onemocnění souvisejících s obezitou podáváním probiotik druhů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

Pro potřeby srovnání výsledků vědecké komunity byl definován mezinárodní statický in vitro model trávení (Minekus a kol. 2014).

3.2 Mechanismy mikrobiální adherence na střevní stěnu

Existuje více mechanismů intestinální mikrobiální adherence a to jak na slizovitou vrstvu mukózy, tak na samotný intestinální epitel.

3.2.1 Význam adherence

Dostatečná adherence bakterií na střevní epitel je jedním ze základních kritérií při volbě bakteriálního druhu pro použití jako probiotický doplněk stravy (Tuomola, 1998). Naproti tomu selektivní inhibice adherence patogenních organismů představuje způsob léčby některých patogeny působených zánětlivých onemocnění trávicího traktu.

3.2.2 Mechanismy

Coppa a kol. (2006) uvádí mezi možné mechanismy mikrobiální adherence na buňky střevního epitelu Van der Waalovy síly, vodíkové můstky, hydrofobicitu a protein - proteinové a protein - sacharidové interakce pomocí tzv. adhezínů. Kankainen a kol. (2009) popsali specifické části DNA a bílkoviny zodpovědné za tvorbu pilusů, vláskovitých výrůstků na povrchu bakterií, zodpovědných za adhezi a autoagregaci některých grampozitivních druhů bakterií.

Reniero a kol. (1992) pozorovali plasmidem pAM β 1 indukované schopnosti adheze a autoagregace. Plasmid je malý fragment DNA nebo RNA, který není součástí jaderné DNA a může být implantován jako organela do bakterií a umožnit jim expresi a syntézu nových bílkovin. Plasmidy mohou snadno přecházet mezi buňkami a mohou se stát součástí více druhů organismů.

Bäckhed a kol. (2005) popisuje, jak *Bacteroides thetaiotaomicron*, který nedisponuje adhezními organelami, využívá nestrávených zbytků jídla (např. vlákniny) smíšených s mukózou k osídlení střevního epitelu.

3.3 In vitro testy mikrobiální adherence

3.3.1 Autoagregace a adherence

García-Cayuela a kol. (2014) studovali korelaci mezi mírou autoagregace a schopností adheze. Autoagregací označujeme schopnost vytvářet bakteriální kolonie o stejném druhu, koagregací pak nazýváme schopnost dvou druhů vytvářet smíšené kolonie. Tyto kolonie pak mohou snáz kultivovat epiteliální sliz, ovšem stejný mechanismus, který zajišťuje autoagregaci a koagregaci, může také přispívat k adhezi na epiteliální buňky.

3.3.2 Adherence na mucin a slizniční buňky

Intestinální epitel je tvořen diferencovanými buňkami se zastoupením tzv. pohárkových buněk, které produkují glykoprotein mucin o velké hydratační kapacitě. Mucin plní několik funkcí: chrání povrch střevního epitelu, zvlhčuje jej, usnadňuje průchod stravy a obsahuje oligosacharidy schopné imobilizovat některé patogeny nebo napomoci kolonizaci probiotické rezidentní mikroflóry. Výzkum se často provádí na imobilizovaném mucinu získaném ze střev prasat nebo na níže popsaných buněčných kulturách HT29-MTX produkujících mucin (Kadlec a kol., 2011).

3.3.3 Adherence na Caco-2, HT-29 a HT29-MTX kultury

Caco-2 je epiteliální buněčná kultura pocházející z lidského kolorektálního adenokarcinomu, která se používá k buněčným modelům střevního epitelu, protože kultivuje pěstební nádobu ve formě jednoduché vrstvy připomínající epitelovou tkáň enterocytu (Hidalgo a kol., 1989).

HT29 je další buněčná kultura střevního epitelu, která vykazuje tvorbu jednoduché vrstvy se zastoupením pohárkových buněk sekretujících mucin, HT29-MTX je pak buněčná kultura odvozená z HT29 aplikací methotrexátu, která se vyznačuje vyšší mírou tvorby pohárkových buněk a vyšší sekrecí mucinu. HT29-MTX se často používá spolu s Caco-2 v poměru 1:9 jako smíšená kultura, jenž dobře in vitro modeluje střevní epitel.

Greene a Klaenhammer (1994) studovali u dvou bakteriálních druhů *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 a NCFM/N2 a druhu *Lactobacillus gasseri* ADH vliv změn pH

a ošetření trávicími enzymy trypsinem, pepsinem a dalšími na adhezi na buněčný model lidského intestinálního epitelu tvořený kulturou Caco-2.

Coppa a kol. (2006) použili model střevního epitelu založený na Caco-2 při zkoumání vlivu oligosacharidů mateřského mléka na adhezi patogenních mikroorganismů.

Jensen a kol. (2011) provedli stanovení míry adheze na několik buněčných modelů střevního epitelu tvořených čistými kulturami Caco-2, HT-29 a LS 174T pro osm bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus* a druhu *Pediococcus pentosaceus*. Naměřené hodnoty se pohybovaly mezi 1 % a 25 %. Nejvyšších hodnot dosahoval bakteriální druh *Lactobacillus reuteri*.

Gagnon a kol. (2013) pomocí smíšené kultury Caco-2 a HT-29 studovali schopnost bakterie *Salmonella* procházet vrstvou mucinu, dokonce ji využívat a napadat střevní epitel. Coppa a kol. (2006) zkoumali vliv oligosacharidů v lidském mateřském mléce na patogenní mikroorganismy a pozorovali značnou inhibici adheze patogenů *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella fyris* na model intestinálního epitelu založený na Caco-2 buněčných liniích.

3.4 Mléko ve výživě člověka

Dle studií z roku 2010 mléko získané od krav tvoří 83% celkové produkce mléka ve světě (Weaver a kol., 2013). Dokonce obsahuje více bílkovin a minerálů, zvláště vápníku a fosforu, než mléko lidské, patrně je tomu tak z důvodu větších energetických nároků na vývoj telete než lidského novorozence.

Konzumace mléka a mléčných produktů ve světě je různá (Haug a kol., 2007). Většina zemí doporučuje alespoň jednu porci mléka denně a některé až tři. Z řady vybočují El Salvador s třemi porcemi týdně a Guatemala s dvěmi. Ačkoliv se velikost porcí liší, většinou se výživová doporučení pohybují kolem 500 ml denně. Výjimku tvoří (mimo doporučení pro těhotné a kojící ženy) Kanada (doporučení adolescentům ve věku 14 - 18 let činí 3 - 4 porce denně – cca 750 - 1000 ml), Španělsko (dospělé ženy: 3 - 4 porce o velikosti 200 až 250 ml); Irsko (adolescenti: alespoň 5 porcí, 945 ml; velikost porce 1/3 pinty) a Jihoafrická republika (děti 7-13 let: 500-750 ml, Weaver a kol., 2013). Podle USDA nutrient database má kravské mléko 3,15 g proteinu, 3,27 g tuku a 5,05 g cukru (laktózy) na 100 g, 100 ml kravského mléka má hmotnost 103 g (Kopf a kol. 2012). Coppa a kol. (2006) pozorovali u dětí kojených mateřským mlékem významně nižší výskyt zánětlivých onemocnění.

3.4.1 Bílkoviny kravského mléka

Kravské mléko tedy obsahuje cca 3,06 g proteinů na 100 ml. Jeho bílkoviny mají vysokou biologickou hodnotu, díky čemuž je považováno za dobrý zdroj esenciálních aminokyselin včetně lysinu. Velké množství těchto aminokyselin navíc plní v lidském organismu další funkce ve smyslu antimikrobiální aktivity, růstových faktorů, enzymů, hormonů, protilátek a stimulantů imunity (Haug a kol., 2007).

V kravském mléku se nachází dvě hlavní skupiny proteinů: kaseiny a syrovátkové proteiny. Z celkového množství bílkovin tvoří kaseiny 80 % a syrovátka 17 %. Zbývá 3 % jsou zastoupena stovkami proteinů vyskytujících se v minoritním množství (Haug a kol., 2007). Kasein se v mléce vyskytuje ve formě micel vázajících vápník a fosfát. Při pasáži žaludkem vytváří sraženinu. V kravském mléce jsou zastoupeny čtyři typy kaseinu: alfa-s1-kasein (CSN1S1, 39 – 46 % z celkového kaseinu), alfa-s2-kasein (CSN1S2, 8 – 11 %), beta-kasein (CSN2, 25 – 35 %) a kapa-kasein (CSN3, 8 – 15%) (Eigel a kol., 1984; Roginski, 2003). Degradací beta-kaseinu vzniká gamma-kasein. (Ostersen a kol. 1997; Miller a kol. 19907). Při metabolismu beta-kaseinu mohou vznikat také látky nazývané beta-kasomorfiny, které řadíme mezi aktivní peptidy – opioidy. Jejich přítomnost v organismu vyvolává podobné účinky jako po požití morfinu. Podle některých studií mohou být negativním faktorem hrajícím nejasnou roli ve vývinu řady onemocnění jako je diabetes mellitus (Elliot a kol 1999), ischemická choroba srdeční (McLachlan, 2001) nebo náhlý syndrom úmrtí u dětí (Kaminski a kol. 2007).

Syrovátka je tvořena globulárními bílkovinami rozpustnými ve vodě, mezi které patří imunoglobuliny (IgGs), beta-lactoglobuliny (LGB), alpha-lactoalbuminy (LALBA), glykomakropeptidy (GMP), albuminy hovězího séra (BSA) a další minoritní bílkoviny jako laktoperoxidáza, lysozymy a laktoferrin. (Farrel a kol., 2004).

3.4.2 Mastné kyseliny a jejich triglyceridy

Mléčný tuk je dispergován ve formě tukových mléčných kuliček z 95% tvořených triacylglyceroly. Ty jsou obklopeny membránou tvořenou minoritními mléčnými proteiny, enzymy, diacylglyceroly (2%), fosfolipidy (1%), cholesterolem (0.5%) a volnými mastnými kyselinami (0,5%, Haug, 2007).

Kravské mléko obsahuje mezi 3 až 4 g /100 g tuku. V syrovém mléce byly naměřeny hodnoty dosahující až 5,5 g / 100 g. Standardizovaným množstvím pro konzumní mléko

však zůstává 3,5 g / 100 g. Kravské mléko obsahuje vyšší množství nasycených mastných kyselin než lidské mléko: 1,85 g / 100 g, z čehož je asi 40 % tvořeno kyselinou laurovou (C12:00), myristovou (C14:00) a palmitovou (C16:00). Poměrně vysoký obsah má i kyselina stearová (C18:00). Mononenasycená kyselina v nejvyšším zastoupení je kyselina olejová (C18:1) (přibližně 0,8 g / 100 g). Celkově mléko obsahuje přibližně 0,2 g polynenasycených mastných kyselin (PUFA) na 100 g (Haug, 2007 a Høstmark and Harstad, 2007).

3.4.3 Antioxidační vlastnosti

Mléko obsahuje mnoho minerálů, vitamínů a antioxidantů. Antioxidanty hrají roli v prevenci oxidace mléka a mohou mít také ochrannou funkci v buňkách produkujících mléko ve vemeni. Nejdůležitějšími antioxidanty v mléce jsou minerál selen a vitamíny A a E.

Oxidace lipidů v mléce je způsobena vzájemnou interakcí komplexu oxidantů a antioxidantů. Některé z těchto látek mohou být důležitou součástí lidské stravy a mít další fyziologické funkce v gastrointestinálním traktu a tkáních. Antioxidační enzym superoxid dismutáza katalyzuje přeměnu radikálu superoxidu na molekulární kyslík a peroxid vodíku, který může být dále rozložen katalázou nebo glutathion peroxidázou. Druhý jmenovaný enzym je schopen degradace lipidových peroxidáz. Minoritně obsažený protein laktoferrin váže volné ionty železa, které degradují tkáň oxidativním stresem. Výskyt a formy různých antioxidačních proteinů v mléce byly v minulosti už dobře zmapovány. Předmětem zkoumání se nyní staly jednotlivé složky antioxidantů jako např. sloučeniny selenu. Vitamíny v mléce přispívají k dodržování denních výživových doporučení. Vitamin E a karotenoidy jsou rozpustné v membránách tukových globulí a působí zde jako antioxidant a výrazně tak omezují autooxidaci mléka. Vitamin C je důležitý ve vodě rozpustný antioxidant reagující s železem a s antioxidanty rozpustnými v tucích. Koncentrace těchto složek v mléce je ovlivněna výživou krav a podmínkami, v kterých je mléko skladováno. Velký obsah antioxidantů v mléce katalyzuje mnoho reakcí a funkce jednotlivých antioxidantů jsou proto těžko definovány (Lindmark-Månsson a Akesson, 2000).

3.5 Možné interakce mikroorganismů s prostředím

Ouwehand a kol. (2002) ukázali, že intestinální prostředí dané především složením potravy značně ovlivňuje adhezenci probiotických i patogenních bakterií, jak Ouwehand a kol. (2001) a dále Coppa a kol. (2006) pozorovali v případě mléka.

3.5.1 Vytváření biofilmů

Lebeer a kol. (2007a, 2007b) zkoumali způsob, jakým probiotické bakterie druhu *Lactobacillus rhamnosus* GG kolonizují různé povrchy, a objevili funkci luxS proteinu v komunikaci mezi jedinci tohoto bakteriálního druhu, která hraje roli v koordinaci kolonizace střevního epitelu formou biofilmu. Populace adherující k povrchu a k ostatním jedincům tvoří biofilm. Tento mechanismus vysvětluje u některých bakteriálních druhů souvislost mezi schopnostmi adherence a autoagregace.

3.5.2 Výsledky z buněčných modelů

Tuomola a Salmien (1997) zkoumali adhezenci dvanácti bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus* na buněčný model epitelu tvořený kulturou Caco-2. Nejvyšší i nejnižší adherence dosáhly fenotypy druhu *Lactobacillus casei* a to *L. casei* (Fyos, Nutricia) s 14,4 % a *L. rhamnosus* (Lactophilus, Laboratoires Lyocentre) s 2,7 %.

Laparra a Sanz (2009) provedli rozsáhlou studii adherence dvou probiotických druhů *Lactobacillus rhamnosus* GG a *Bifidobacterium animalis* poddruh *lactis* Bb12, dvou komenzálních bakterií *Bifidobacterium animalis* IATA-A2 a *Bifidobacterium bifidum* IATA-ES2 a patogenů *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes* na několik testovacích površích: na neošetřenou plastovou (polykarbonátovou) jamku titrační destičky, na stejnou jamku ošetřenou mucinem MUC2, dále na diferencované kultury Caco-2 a HT29 - MTX, kokulturu Caco-2 / HT29 - MTX a mucinem MUC2 ošetřené kultuře Caco-2. Naměřené hodnoty se pohybovaly od 1 % u patogenů adherujících na HT29-MTX po 31 % u *B. Lactis* kultivující mucinem ošetřenou jamku.

Jensen a kol. (2011) uskutečnili studii čtyř fenotypů bakteriálního rodu *Lactobacillus Plantarum*, jednoho fenotypu *Lactobacillus pentosus*, čtyř fenotypů *Lactobacillus sakei*, po jednom fenotypu *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus farciminis*, *Pediococcus pentosaceus* a čtyř fenotypů *Lactobacillus reuteri*. Zkoumána byla životaschopnost po simulovaném průchodu žaludkem a schopnost adheze na tři typy buněčných epiteliálních kultur (Caco-2, HT-29, LS 174T). Naměřené hodnoty

se pohybovaly od přibližně 1 % adherence na HT29 pro *L. Plantarum* NC8 až po 25 % pro *L. Reuteri* DSM20016.

García-Cayuela a kol. (2014) zkoumali různé fenotypy bakteriálního druhu *Lactobacillus plantarum* a kromě jejich autoagregace a koagregace experimentálně studovali adherenci na buněčný model intestinálního epitelu tvořený buněčnou kulturou Caco-2. *L. Plantarum* se vyznačuje velkým množstvím odlišných fenotypů s rozdílnými vlastnostmi. Ze zkoumaných fenotypů měl nejmenší adherenci, přibližně 5 %, fenotyp *L. Plantarum* IFPL124. Nejvyšší adherenci, přibližně 14 % , vykazoval fenotyp *L. Plantarum* IFPL162.

Vliv hydrolyzátu kravského vysokoteplotně upraveného (UHT) mléka na adherenci dvou druhů probiotických bakterií zkoumali Volšátová a kol. (2015) a prokázali statisticky významné snížení bakteriální adherence *Lactobacillus gasseri* R a *Lactobacillus plantarum* S2 po ošetření mléčným hydrolyzátem na méně než poloviční procentuální podíl adherovaných organismů oproti kontrole. Konkrétně u druhu *L. gasseri*, jehož zkoumání je součástí této práce, došlo k poklesu adherence ze 7 % na 3 %.

4 Materiál a metody

Níže popsaná experimentální metoda byla vyvinuta Jensenem a kol. (2011) a modifikována Volšátovou a kol. (2015). Autorka této bakalářské práce se pod vedením doc. Ing. Jaroslava Havlíka, Ph.D. a Ing. Terezy Volšátové účastnila experimentální aplikace této metody pro dva vybrané bakteriální druhy, pět druhů mléka a tři druhy mléčných proteinů. Experimentální práce byla provedena v laboratořích Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze tak, jak je popsáno ve zbytku této kapitoly.

4.1 Bakteriální kmeny

Bakteriální populace druhu *Lactobacillus gasseri* R byla izolována ze vzorku stolice jeden měsíc starého dítěte. Populace druhu *Lactobacillus casei* FMP byla získána izolací vzorku z komerčního probiotického produktu. V případě obou bakteriálních druhů byl k izolaci bakteriální populace použit Rogosův agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, VB) mikroaerofilně kulturovatelný při teplotě 37 °C po dobu 72 hodin. Rogosův agar je standardní selektivní médium pro izolaci a kultivaci bakterií rodu *Lactobacillus* s výjimkou druhu *Lactobacillus carnis*. Selektivní kultivace bakterií rodu *Lactobacillus* je dosaženo vysokou koncentrací octanu sodného (1,7 g / l) a nízkým pH 5.4 (při 25°C), které efektivně potlačují růst mnoha jiných běžných bakterií řádu Lactobacillales (Oxoid, 2016).

Bakteriální kmeny byly charakterizovány biochemickými páskový API™ 50CHL™ (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, Francie), které slouží k identifikaci mikroorganismů na základě reakcí jejich metabolických produktů.

Bakteriální druhy byly následně identifikovány pomocí MALDI - TOF hmotnostní spektroskopie za použití systému MALDI BioTyper™ (Bruker Daltonik, Brémy, Německo). MALDI je zkratkou pro anglický název matrix-assisted laser desorption/ionization, což znamená matricí podporovaná laserová desorpce a ionizace. TOF je zkratka pro time of fly, tedy čas letu, která se používá pro označení metod fyzikálních měření založených na měření doby letu. MALDI-TOF je metoda hmotnostní spektroskopie pro měření měrného náboje molekulárních fragmentů velkých molárních hmotností a našla proto značné uplatnění v mikrobiologii. Vzorek je nejprve smíchán s matricovým materiálem, který slouží k absorpci energie laserového pulzu a brání rozpadu zkoumané látky na příliš

malé fragmenty. Tato směs je na vhodném nosiči, např. na nerezové destičce, umístěna do silného elektrického pole (25 až 30 kV) a ozářena laserovým pulzem o délce trvání několika nanosekund. Matricový materiál umožní ionizaci cestou odtržení velkých molekulárních fragmentů, které okamžitě uchopí silné elektrické pole a urychluje je k detektoru. Měřený čas mezi ionizací a detekcí je závislý výhradně na podílu náboje a hmotnosti ionizovaného molekulárního fragmentu a umožňuje tak jeho identifikaci (Havliš, 1999). Bruker MALDI BioTyper™ je mikrobiologický systém pro identifikaci mikroorganismů pomocí jejich molekulárního složení sestávající z MALDI - TOF hmotnostního spektrometru a počítačového softwaru pro rozpoznání bílkovinného složení a následné identifikaci druhu mikroorganismu. (Bruker, 2016)

4.2 Buněčné kultury

K vyhodnocení schopnosti adheze na lidském střevním epitelu u dvou různých bakteriálních kmenů byl použit model lidského epitelu sestávající z buněčných linií Caco-2 a HT29-MTX. Ke kultivaci buněk došlo v Dulbeccově modifikovaném Eaglově médiu (DMEM) doplněném 20 % fetálního hovězího séra (FBS), 1 % neesenciálních aminokyselin, 100 U / ml (molekul na mililitr) penicilinu a 100 µg / ml streptomycinu. Buněčné linie byly udržovány při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5 % (v / v tzn. objemové koncentrace) CO₂ a 95 % vzduchu. Médium bylo měněno každé dva dny a buňky subkultivovány při 80 % konfluenci (pokrytí pěstební nádoby) každý týden.

4.3 Příprava bakteriální suspenze

Před testy adherence byly bakterie pěstovány za anaerobních podmínek na Manově, Rogosově a Sharpově bujónu (MRS, Oxoid Ltd., Basingstoke, VB) po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Poté bylo médium s populací bakterií zředěno v Dulbeccově fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (DPBS, Sigma-Aldrich, Praha) a bakterie byly centrifugovány akcelerací 2000 × g po dobu 10 minut. Získaná bakteriální peleta byla dále dvakrát vymyta fosfátem-pufovaným roztokem (phosphate buffered saline, PBS) o pH 7,0. Bakteriální suspenze byla zředěna pomocí DPBS na koncentraci 2 × 10⁸ CFU / ml (kolonií na mililitr). Koncentrace jedinců byla určena měřením optické hustoty bakteriální suspenze za pomoci světla o vlnové délce 420 nm destičkovým spektrofotometrem (anglicky plate reader nebo microplate reader) Infinite® M200 (Tecan Group Ltd., Rakousko), který byl předtím kalibrován dle kultury o známé koncentraci.

4.4 Příprava mléčného hydrolyzátu

Cílem tohoto kroku je napodobit trávení mléka v žaludku žaludeční šťávou, která obsahuje 0,5 % až 1 % HCl, následnou neutralizaci v dvanácterníku a enzymatické trávení v tenkém střevě. Postupně v jednotlivých experimentech bylo syrové kravské, kozí a mateřské mléko a dále plnotučné pasterované mléko a vysokoteplotně upravené (UHT) mléko hydrolyzováno následujícím způsobem, jenž je mezinárodním standardním *in vitro* statickým modelem trávení (Minekus a kol. 2014). Popis a původ zkoumaných druhů mléka je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Popis a původ zkoumaných druhů mléka

Název	Popis	Výrobce / Prodávající
kravské mléko	syrové kravské mléko	Farma Hole (Oldřich Poláček)
kozí mléko	syrové kozí mléko	ČZU
ovčí mléko	bio plnotučné pasterované ovčí mléko	Kozí farma Pěňčín (Josef Pulíček)
mateřské mléko	syrové mateřské mléko	ČZU
UHT mléko	plnotučné kravské UHT mléko	K-Classic, Milbu, Kaufland ČR v.o.s.

První fáze, trávení v žaludku, byla simulována smíšením 5 ml vzorku testovaného mléka s 5 ml simulované žaludeční šťávy (SGF, simulated gastric fluid, složení viz Minekus a kol., 2014), dále přidáním enzymu pepsinu pocházejícího z prasete v množství 2000 U / ml (molekul enzymu na mililitr finální směsi) a úpravou pH na hodnotu 3,0 pomocí HCl o koncentraci 1 M (tzn. 1 mol / dm³) na dobu 2 hodin při teplotě 37 °C.

Fáze simulovaného trávení v žaludku je ukončena přidáním hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO₃) o koncentraci 0,5 M v takovém množství, aby došlo k neutralizaci směsi na pH 7,0. Následně je přidáno 10 mL simulované duodenální (dvanácterníkové) šťávy (SDF, simulated duodenal fluid, pro složení viz Minekus a kol., 2014) a množství žlučových solí odpovídající koncentraci 10 mM ve finální směsi.

Enzymatické trávení v tenkém střevě bylo napodobeno přidáním enzymů trypsinu pocházejícího z prasete v koncentraci 100 U / ml SDF (100 molekul enzymu na mililitr simulované duodenální šťávy), hovězího chymotrypsinu v koncentraci 25 U / ml SDF, prasečí intestinální lipázy v koncentraci 2000 U / ml SDF a prasečí intestinální kolipázy v koncentraci

4000 U / ml SDF. Směs byla ponechána enzymatickému působení po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C a následně byla tato fáze ukončena zmražením směsi na teplotu -80 °C. Všechny použité enzymy byly zakoupeny od společnosti Sigma - Aldrich (Praha).

Před samotným měřením adheze byla směs modelující trávené mléko rozmrazena a zředěna Dulbecem modifikovaným Eaglovým médiem (DMEM) tak, aby každý měřený vzorek mléčného hydrolyzátu obsahoval 1,5 µg bílkovin na mililitr.

4.5 Test adherence

Testy byly provedeny dle metody popsané Jensenem a kol. (2011). Kultivační destičky s 24 jamkami byly inokulovány buněčnými kulturami Caco-2 a HT29-MTX o populacích $3,6 \times 10^4$ buněk Caco-2 na jamku a 4×10^3 buněk HT29-MTX na jamku. Smíšená buněčná kultura v jamkách byla ponechána růstu 14 ± 1 dní až do konfluence při 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5 % CO₂ (v / v) a 95 % vzduchu. Kultivační médium bylo měněno každé dva dny. Před měřením adheze byly buněčné vrstvy promyty DPBS, aby byla odstraněna antibiotika původního kultivačního média. Bakteriální suspenze připravená dle popisu výše o objemu 100 µl byla přidána do každé jamky.

Následně bylo přidáno 100 µl zředěného mléčného hydrolyzátu obsahujícího 5 % původního vzorku mléka nebo 100 µl roztoku zkoumaného mléčného proteinu v PBS o koncentraci 10 µg bílkovin na ml do poloviny jamek. Druhá polovina jamek tvořící kontrolní skupinu byla místo mléčného hydrolyzátu nebo roztoku mléčných bílkovin ošetřena 100 µl PBS. Pro oba bakteriální druhy byly kontrolní jamky i jamky ošetřené každým ze zkoumaných mléčných hydrolyzátů a každým roztokem bílkoviny připraveny po trojicích. Přehled zkoumaných mléčných proteinů spolu s původem vzorků je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled zkoumaných mléčných proteinů spolu s popisem původu

Zkratka	Zkoumaný protein	Původ
BSA	Albumin z hovězího séra	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
CMP	Kaseinomakropeptid	Ekomilk, s.r.o., Frydek-Místek, CZ
CSN	Práškový kasein z hovězího mléka	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE

Takto kultivované destičky byly jednu hodinu inkubovány při teplotě 37 °C v atmosféře o koncentraci 5 % CO₂ (v / v). Po inkubaci byl z jamek odstraněn kal a buněčné

kultury byly jemně opláchnuty třikrát po sobě DPBS tak, aby byly odstraněny neadherující bakterie. 300 μ l 1% Triton-X100 (Sigma-Aldrich, Praha) bylo použito k trypsinizaci populace epiteliálních buněk a bakterií od stěn jamky a od sebe navzájem po dobu 3 minut a následně bylo do jamek přidáno 700 μ l PBS. Takto vzniklá suspenze byla inokulována na De Manův, Rogosův a Sharpův agar (MRS agar), kultivována po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C a následně byl určen počet adherovaných bakterií. Míra adheze je následně určena jako procentuální podíl počtu adherovaných a původně dodaných bakterií.

5 Výsledky

Stanovení adheze bylo provedeno u dvou bakteriálních druhů (*Lactobacillus gasseri* R a *Lactobacillus casei* FMP) pro pět druhů mléka a následně pro tři druhy mléčných bílkovin.

Informace o původu jednotlivých zkoumaných typů mlék jsou uvedeny v tabulce 1. Data z měření adheze za přítomnosti mléčného hydrolyzátu obou bakteriálních druhů jsou uvedeny v tabulce 3. Následně byly vypočítány pro každý bakteriální druh průměrné hodnoty a směrodatné odchylky adheze kontrolních měření a měření s jednotlivými druhy hydrolyzátů mléka, které následují v tabulce 4. Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky procentuálního podílu adherovaných organismů jsou pak zakresleny pro oba bakteriální druhy na obrázku 2.

Následně byla statisticky testována skupina tzv. nulových hypotéz na hladině významnosti 0,05. Nulovou hypotézou je tvrzení, že daný způsob ošetření nezpůsobí změnu adherence oproti kontrolnímu měření. Výsledkem statistického testu je, že buď zamítneme nebo nezamítneme nulovou hypotézu. V případě nezamítnutí nulové hypotézy se jedná o neprůkazný výsledek, v případě zamítnutí nulové hypotézy je prokázána na dané hladině významnosti alternativní hypotéza, v tomto případě fakt, že daný způsob ošetření ovlivní adherenci zkoumaného mikroorganismu.

Stejným způsobem byla zpracována data z měření vlivu přítomnosti mléčných proteinů na adherenci mikroorganismů. Data z měření obou bakteriálních druhů jsou uvedena v tabulce 6. Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky adheze kontrolních měření i měření s jednotlivými druhy mléčných proteinů pro oba bakteriální druhy následují v tabulce 7. Průměrné hodnoty jsou pak zakresleny pro oba bakteriální druhy na obrázku 3.

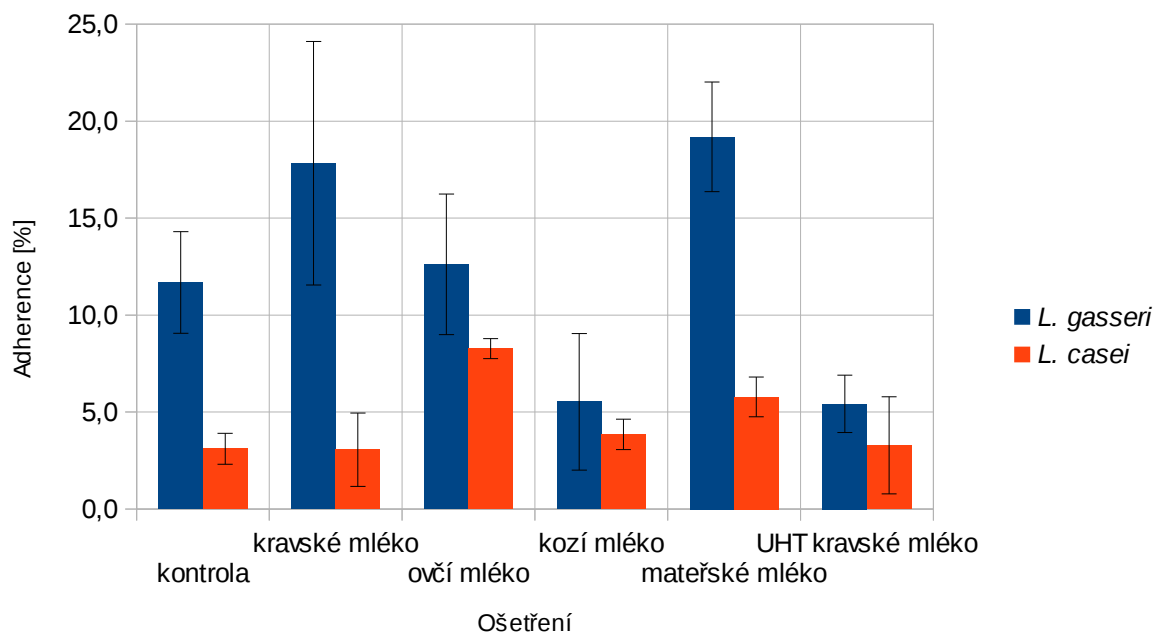
Jelikož není známo, zda rozptyl procentuálního podílu adherovaných organismů bude konstantní, je použita Welchova varianta t-testu pro testování shodnosti střední hodnoty dvou náhodných veličin o různých rozptylech. Welchův t-test byl proveden pomocí tabulkového procesoru Calc kancelářského balíku LibreOffice, konkrétně pomocí oboustranné varianty funkce T.TEST pro veličiny o rozdílných rozptylech (režim 2, typ 3, viz LibreOffice, 2016). Tato funkce má za výstupní hodnotu pravděpodobnost chyby při zamítnutí nulové hypotézy, tedy shodnosti střední hodnoty dvou normálních rozdělení o různých neznámých rozptylech. Z toho vyplývá, že k statisticky významnému prokázání vlivu zkoumaného

ošetření na adhezi zkoumaného bakteriálního druhu má být výsledná hodnota použité varianty funkce TTEST na trojici kontrolních měření a trojici měření po ošetření zkoumanou frakci daného bakteriálního druhu menší než hladina významnosti, v našem případě 0,05.

Výsledky aplikace Welchova testu na naměřená data jsou uvedeny v tabulce 5 pro ošetření mléčnými hydrolyzáty a v tabulce 8 pro ošetření mléčnými proteiny. Ve sloupci označeném TTEST je pravděpodobnost omylu při zamítnutí nulové hypotézy. Měření, která statisticky prokazují na hladině významnosti 5 % vliv zkoumané frakce na mikrobiální adhezi, jsou tučně zvýrazněna.

Tabulka 3: Procentuální podíl adherovaných organismů ku počtu dodaných organismů při měření vlivu ošetření mléčnými hydrolyzáty

Bakteriální druh	Ošetření	Procentuální míra adheze
<i>L. gasseri</i>	kontrola	10,76
<i>L. gasseri</i>	kontrola	14,64
<i>L. gasseri</i>	kontrola	9,64
<i>L. gasseri</i>	kravské mléko	17,21
<i>L. gasseri</i>	kravské mléko	24,40
<i>L. gasseri</i>	kravské mléko	11,89
<i>L. gasseri</i>	ovčí mléko	13,14
<i>L. gasseri</i>	ovčí mléko	8,76
<i>L. gasseri</i>	ovčí mléko	15,95
<i>L. gasseri</i>	kozí mléko	4,69
<i>L. gasseri</i>	kozí mléko	2,50
<i>L. gasseri</i>	kozí mléko	9,38
<i>L. gasseri</i>	mateřské mléko	21,90
<i>L. gasseri</i>	mateřské mléko	19,40
<i>L. gasseri</i>	mateřské mléko	16,27
<i>L. gasseri</i>	UHT kravské mléko	5,94
<i>L. gasseri</i>	UHT kravské mléko	6,57
<i>L. gasseri</i>	UHT kravské mléko	3,75
<i>L. casei</i>	kontrola	3,90
<i>L. casei</i>	kontrola	3,13
<i>L. casei</i>	kontrola	2,30
<i>L. casei</i>	kravské mléko	3,40
<i>L. casei</i>	kravské mléko	4,76
<i>L. casei</i>	kravské mléko	1,02
<i>L. casei</i>	ovčí mléko	8,16
<i>L. casei</i>	ovčí mléko	8,84
<i>L. casei</i>	ovčí mléko	7,82
<i>L. casei</i>	kozí mléko	4,76
<i>L. casei</i>	kozí mléko	3,40
<i>L. casei</i>	kozí mléko	3,40
<i>L. casei</i>	mateřské mléko	4,76
<i>L. casei</i>	mateřské mléko	5,78
<i>L. casei</i>	mateřské mléko	6,80
<i>L. casei</i>	UHT kravské mléko	1,36
<i>L. casei</i>	UHT kravské mléko	2,38
<i>L. casei</i>	UHT kravské mléko	6,12



Obrázek 2: Průměrné hodnoty a směrodatné odchytky bakteriální adherence dvou bakteriálních kmenů na směsné kultuře Caco-2 a HT29-MTX po přidání pěti různých mléčných hydrolyzátů v koncentraci 1,5 ug / ml

Tabulka 4: Průměrné hodnoty a směrodatné odchytky bakteriální adherence při přítomnosti mléčných hydrolyzátů

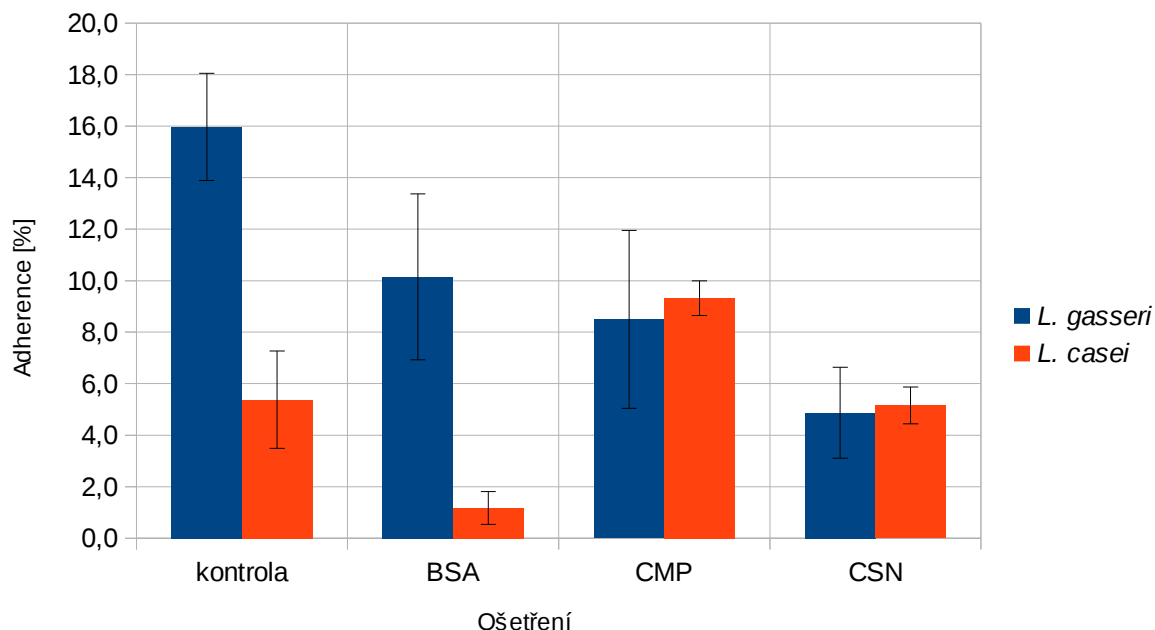
Bakteriální druh	Ošetření	Průměrná procentuální míra adheze	Směrodatná odchytka procentuální míry adheze
<i>L. gasseri</i>	kontrola	11,7	2,6
<i>L. gasseri</i>	kravské mléko	17,8	6,3
<i>L. gasseri</i>	ovčí mléko	12,6	3,6
<i>L. gasseri</i>	kozí mléko	5,5	3,5
<i>L. gasseri</i>	mateřské mléko	19,2	2,8
<i>L. gasseri</i>	UHT kravské mléko	5,4	1,5
<i>L. casei</i>	kontrola	3,1	0,8
<i>L. casei</i>	kravské mléko	3,1	1,9
<i>L. casei</i>	ovčí mléko	8,3	0,5
<i>L. casei</i>	kozí mléko	3,9	0,8
<i>L. casei</i>	mateřské mléko	5,8	1,0
<i>L. casei</i>	UHT kravské mléko	3,3	2,5

Tabulka 5: Statistické testování vlivu mléčných hydrolyzátů na adhezivitu mikroorganismů, měření průkazné na hladině významnosti 0.05 jsou tučně zvýrazněny

Bakteriální druh	Ošetření	TTEST	Průkazné
<i>L. gasseri</i>	kravské mléko	0,226	NE
<i>L. gasseri</i>	ovčí mléko	0,737	NE
<i>L. gasseri</i>	kozí mléko	0,077	NE
<i>L. gasseri</i>	mateřské mléko	0,028	ANO
<i>L. gasseri</i>	UHT kravské mléko	0,034	ANO
<i>L. casei</i>	kravské mléko	0,969	NE
<i>L. casei</i>	ovčí mléko	0,001	ANO
<i>L. casei</i>	kozí mléko	0,315	NE
<i>L. casei</i>	mateřské mléko	0,026	ANO
<i>L. casei</i>	UHT kravské mléko	0,916	NE

Tabulka 6: Procentuální podíl adherovaných organismů ku počtu dodaných organismů při měření vlivu ošetření mléčnými proteiny v koncentraci 10 µg / ml (BSA – albumin z hovězího séra, CMP – kaseinomakropeptid, CSN - kasein)

Bakteriální druh	Ošetření	Procentuální míra adheze
<i>L. gasseri</i>	kontrola	18,3
<i>L. gasseri</i>	kontrola	15,4
<i>L. gasseri</i>	kontrola	14,2
<i>L. gasseri</i>	BSA	6,5
<i>L. gasseri</i>	BSA	11,4
<i>L. gasseri</i>	BSA	12,6
<i>L. gasseri</i>	CMP	12,4
<i>L. gasseri</i>	CMP	7,1
<i>L. gasseri</i>	CMP	5,9
<i>L. gasseri</i>	CSN	6,9
<i>L. gasseri</i>	CSN	3,7
<i>L. gasseri</i>	CSN	4,1
<i>L. casei</i>	kontrola	4,9
<i>L. casei</i>	kontrola	3,8
<i>L. casei</i>	kontrola	7,5
<i>L. casei</i>	BSA	1,9
<i>L. casei</i>	BSA	0,9
<i>L. casei</i>	BSA	0,7
<i>L. casei</i>	CMP	10,1
<i>L. casei</i>	CMP	9,1
<i>L. casei</i>	CMP	8,8
<i>L. casei</i>	CSN	5,2
<i>L. casei</i>	CSN	5,9
<i>L. casei</i>	CSN	4,4



Obrázek 3: Průměrné hodnoty a směrodatné odchytky bakteriální adherence při přítomnosti mléčných proteinů v koncentraci 10 µg/ml (BSA – albumin z hovězího séra, CMP – kaseinomakropeptid, CSN - kasein)

Tabulka 7: Průměrné hodnoty a směrodatné odchytky bakteriální adherence při přítomnosti mléčných proteinů v koncentraci 10 µg/ml (BSA – albumin z hovězího séra, CMP – kaseinomakropeptid, CSN - kasein)

Bakteriální druh	Ošetření	Průměrná procentuální míra adheze	Směrodatná odchytka procentuální míry adheze
<i>L. gasseri</i>	kontrola	16,0	2,1
<i>L. gasseri</i>	BSA	10,2	3,2
<i>L. gasseri</i>	CMP	8,5	3,5
<i>L. gasseri</i>	CSN	4,9	1,8
<i>L. casei</i>	kontrola	5,4	1,9
<i>L. casei</i>	BSA	1,2	0,6
<i>L. casei</i>	CMP	9,3	0,7
<i>L. casei</i>	CSN	5,2	0,7

Tabulka 8: Statistické testování vlivu mléčných proteinů na adherenci mikroorganismů, měření průkazné na hladině významnosti 0.05 jsou tučně zvýrazněny (BSA – albumin z hovězího séra, CMP – kaseinomakropeptid, CSN - kasein)

Bakteriální druh	Ošetření	TTEST	Průkazné
<i>L. gasseri</i>	BSA	0,068	NE
<i>L. gasseri</i>	CMP	0,043	ANO
<i>L. gasseri</i>	CSN	0,002	ANO
<i>L. casei</i>	BSA	0,049	ANO
<i>L. casei</i>	CMP	0,056	NE
<i>L. casei</i>	CSN	0,862	NE

6 Diskuze

Na 5 % hladině významnosti byl prokázán vliv hydrolyzátu mateřského mléka, kravského UHT mléka a roztoků kaseinu a kaseinomakropeptidu na adhezenci druhu *Lactobacillus gasseri* R. Adherence populace *L. gasseri* R na zkoumaný buněčný model vzrostla přibližně o 60 % po ošetření mateřským mlékem. Naproti tomu adherence poklesla na 46 % po ošetření UHT mlékem. Kasein a kaseinomakropeptid snižují adhezenci *L. gasseri* R na zkoumaný buněčný model epitelu na přibližně 53 % kontrolní hodnoty adherence v případě kaseinu a dokonce na 31 % hodnoty adherence neošetřené populace v případě kaseinomakropeptidu.

Z tohoto se dá usuzovat na mechanismy adheze *L. gasseri* R. inhibované mléčnými proteiny kaseinem a kaseinomakropeptidem, které tvoří značnou část kravského UHT mléka, oproti mateřskému mléku, které obsahuje podstatně méně kaseinů. To by ovšem mělo způsobit stejný pokles adherence u syrového kravského mléka, který nebyl pozorován. Lze tedy usuzovat na pozitivní vliv na adhezenci u syrovátkových proteinů, mléčných tuků nebo dalších látek, které se rozpadají vlivem UHT a jsou přítomny v syrovém mateřském a kravském mléce. Snížení adheze *L. gasseri* R po ošetření UHT mlékem odpovídá hodnotám publikovaným Volštátovou a kol. (2015)

Dále bylo na 5 % hladině významnosti prokázáno zvýšení adherence *L. casei* FMP na buněčný model střevního epitelu při ošetření hydrolyzátem mateřského mléka, kdy adherence vzrostla o 87 %, a především při ošetření hydrolyzátem ovčího mléka, kdy adherence na zkoumaný buněčný model narostla o 167 %. Naproti tomu bylo prokázáno snížení adherence na 22 % kontrolní hodnoty po ošetření roztokem albuminu.

Zvýšení adheze *L. casei* FMP na buněčnou kulturu ošetřenou hydrolyzátem lidského mléka obsahujícího velký podíl albuminu a značné snížení adherence čistým albuminem poukazuje na značný vliv dalších frakcí mateřského mléka.

7 Závěr

V teoretické části této bakalářské práce byly podány základní informace o mikrobiomu lidského intestinálního traktu, jeho složení, významu a variabilitě a dále byl popsán význam bakterií adherujících na stěnu tenkého a tlustého střeva a několik možných mechanismů mikrobiální adherence. Byl uveden význam mléka v lidské stravě a vliv mléka a mléčných výrobků na organismy mikrobiomu lidského gastrointestinálního traktu.

Následně byla rozvedena metoda měření mikrobiální adherence na buněčný model lidského intestinálního epitelu schopná kvantifikovat změny adherence na střevní stěnu za přítomnosti různých látek a pomoci tak s výběrem vhodného probiotického bakteriálního kmene nebo s léčbou zánětlivých onemocnění střev. Dále může popsaná metoda sloužit k analýze vlivu různých složek potravy na adhezi probiotických i patogenních bakteriálních kmenů k intestinálnímu epitelu, a tudíž může poskytnout informace pro dietologická doporučení a opatření.

Popsaná experimentální metoda byla použita k ověření hypotézy o vlivu hydrolyzovaných druhů mléka a roztoků mléčných proteinů na adherenci dvou bakteriálních druhů. Výsledky ukazují vliv přítomnosti kaseinu a kaseinomakropeptidu na snížení adheze bakteriálního druhu *L. gasseri* R. Mateřské mléko naopak zvýšilo adherenci *L. gasseri* R. Je otázkou, zda se jedná o vliv syrovátkových proteinů, mléčných tuků nebo jiné frakce či jejich kombinace.

Byl pozorován značný pokles adherence druhu *L. casei* FMP při ošetření roztokem mléčného proteinu albuminu, proto je překvapující statisticky významný vliv mateřského mléka na zvýšení adherence u *L. casei* FMP.

8 Seznam Literaturny

8.1 Tištěná literatura

Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes L. N., Olsen, I., Dewhirst F. E. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 2005 Nov, 43(11), 5721-32.

Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. Gordon, J. I. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* 307, 1915 (2005). DOI: 10.1126/science.1104816.

Coppa, G. V., Zampini, L., Galeazzi, T., Facinelli, B., Ferrante, L., Capretti, R., Orazio, G. 2006. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella ftyris*. *Pediatr Res.* 2006 Mar, 59(3):377-82. DOI: 10.1203/01.pdr.0000200805.45593.17.

Delgado S, Cabrera-Rubio R., Mira A., Suarez A., Mayo B. 2013. Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. *Microb Ecol.* 2013;65:763!772.

Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., Backhed, F., Cani, P. D. 2011. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nature Reviews. Endocrinology.* 7. 639-646. DOI:10.1038/nrendo.2011.126.

Dethlefsen, L, Eckburg, P.B., Bik, E.M., Relman, D.A. 2006. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends in ecology and evolution.* 21(9) 517-522. DOI:10.1016/j.tree.2006.06.013.

Duncan, S. H., Lobley G. E., Holtrop G., Ince J., Johnstone A. M., Louis P., Flint H. J. 2008. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International Journal of Obesity* (2008) 32, 1720–1724. DOI: 10.1038/ijo.2008.155.

Eckburg, P.B. a kol. 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science.* 308, 1635; DOI: 10.1126/science.1110591.

Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. A., Farrell, H. M., Halwarkar, V.R., Jenness, R., Whitney, R.M., 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *J. Dairy. Sci.* 67: 1599–1631. DOI: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81485-X](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81485-X).

- Elliott, R.B., Harris, D.P., Hill, J.P., Bibby, N.J., Wasmuth, H.E., 1999. Type I (insulindependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia*. 42: 292–296..
- Farrell, H. M. Jr., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer L.K. a kol. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *J. Dairy Sci.* 87: 1641–1674.
- Finegold, S. M., Attebery H. R., Sutter V. L. 1974. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1974 Dec;27(12):1456-69.
- Fons, M., Gomez, A., Karjalainen, T. 2000. Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract Part 2: Bacteria/bacteria interactions. *Microb. Ecol. Health Dis.* 12, 240–246.
- García-Cayuela, T., Korany, Ahmed M., Bustos, I., Gómez de Cadiñanos, L. P., Requena, T., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M. C. 2014. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International* 57: 44-50. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.01.010.
- Gagnon, M., Zihler Berner, A., Chervet, N., Chassard, C., Lacroix, C. 2013. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *J. Microbiol Methods*. 2013 Sep;94(3):274-9. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.06.027.
- Glick-Bauer, M., Ming-Chin Yeh. 2014. The Health Advantage of a Vegan Diet: Exploring the Gut Microbiota Connection. *Nutrients*. 2014 Nov; 6(11): 4822–4838. DOI: 10.3390/nu6114822
- Greene, J. D., Klaenhammer T. R. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol*. 1994 Dec, 60(12), 4487-94.
- Haug, A.,Høstmark, A. T., Harstad, O. M. 2007. Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*. December 2007, 6:25. DOI: 10.1186/1476-511X-6-25.
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J., Borchardt, R. T. 1989. Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability, *Gastroenterology*, 96, 736–749. DOI: 10.1208/s12248-011-9283-8.

- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., Axelsson L. 2011. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 216–222. DOI: 10.1155/2008/357964.
- Kadlec R., Křížová L., Halová D. 2011. In vitro modely adherence probiotik – přehled. *Mlékařské listy* č. 124.
- Kamiński, S., Cieslińska, A., Kostyra, E. J. 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Appl. Genet.* 48(3), pp. 189–198.
- Kankainen, M. a kol. 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Oct 6;106(40):17193-8. doi: 10.1073/pnas.0908876106. Epub 2009 Sep 17.
- Laparra, J.M. and Sanz, Y. 2009. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. DOI:10.1111/j.1472-765X.2009.02729.
- Lindmark-Månsson, H., Akesson, B. 2000. Antioxidative factors in milk. *Br. J. Nutr.* Nov;84 Suppl. 1:S103-10.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Vélez, M.P., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C. J.. 2007a Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG *Appl. Environ. Microbiol.* Nov; 73(21): 6768–6775. DOI: 10.1128/AEM.01393-07.
- Lebeer, S., De Keersmaecker, S.C., Verhoeven, T. L., Fadda, A. A., Marchal, K., Vanderleyden J. J. 2007b. Functional analysis of luxS in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *Bacteriol. Feb*;189(3):860-71.
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., Gordon, J. I. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005 Aug 2; 102(31): 11070–11075. DOI: 10.1073/pnas.0504978102.
- Lopez-Legarrea P., Fuller N. R., Zulet M. A., Martinez J. A., Caterson I. D. 2014. The influence of Mediterranean, carbohydrate and high protein diets on gut microbiota composition in the treatment of obesity and associated inflammatory state. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* 2014;23(3):360-8. DOI: 10.6133/apjcn.2014.23.3.16.

- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., Knight, R.. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 489 (221-229). DOI:10.1038/nature11550.
- Marteau, P., Lepage, P., Mangin, I., Suau, A., Doré, J., Pochart P., Seksik P. 2004. Gut flora and inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. Volume 20, Issue Supplement s4, pages 18–23, October 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2004.02062.x.
- Miller, M.J.S., Witherly, S.A., Clark, D.A., 1990. casein: a milk protein with diverse biologic consequences. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195: 143–159.
- Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, a kol. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*. 2014;5(6):1113-24. DOI: 10.1039/c3fo60702j.
- Morelli, L., Patrone V. 2014. Probiotic Microorganisms for Shaping the Human Gut Microbiota – Mechanisms and Efficacy into the Future. *Diet-Microbe Interactions in the Gut, Effects on Human Health and Disease*. Academic Press. ISBN 9780124078253.
- Ostensen, S., Foldaber, J., Hermansen, J.E., 1997. Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. *J. Dairy Res.* 64: 207–219. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029996002099>.
- Ouwehand, A. C., Tuomola, E. M., Tolkkio, S., Salminen, S. 2001. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 119–126. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00440-2.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82, 279–289. DOI: 10.1007/978-94-017-2029-8_18.
- Pei, Z., Bini, E. J., Yang, L., Zhou, M., Francois, F., Blaser, M. J. 2004. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004 Mar 23; 101(12): 4250–4255. DOI: 10.1073/pnas.0306398101.
- Reniero, R., Cocconcelli, P., Bottazi, V., Morelli, L. 1992. High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *Journal of General Microbiology*, 138, 763–768. DOI: 10.1099/00221287-138-4-763.

Roginski, H. 2003. Encyclopedia of dairy sciences. Academic Press. London. ISBN 0-12-227235-8.

Sartor, R. B. 2008. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. Reviews in basic and clinical gastroenterology. Gastroenterology. 134(2), 577-594 DOI:10.1053/j.gastro.2007.11.059.

The Human Microbiome Project Consortium. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature 486, 207–214. DOI: 10.1038/nature11234.

Tuomola, E. M., Salminen, S. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures. Int. J. Food. Microbiol. 1998 May 5;41(1):45-51.

Volšátová, T., Havlík, J., Doskočil, I., Geigerová M., Rada V. 2015. Effect Of Hydrolyzed Milk On the Adhesion Of *Lactobacilli* To Intestinal Cells. Scientia agriculturae bohemica, 46, 2015 (1): 21–25. DOI: 10.1515/sab-2015-0012.

Weaver, C., Wijesinha-Bettoni, R., McMahon, D., Spence, L. 2013. Milk and dairy products as part of the diet. Milk and dairy products in human nutrition (ed. Muehlhoff, E., Bennett, A., McMahon, D.). Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN 978-92-5-107863-1.

8.2 Elektronické zdroje

Bruker. 2016. MALDI Biotyper overview. [HTML dokument] Bruker corporation. [cit. 29. března 2016] Dostupné z: <<https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-biotyper/overview.html>>.

Havliš, J. 1999. Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. [HTML dokument] Vesmír 78, 448, 1999/8. [cit. 4. dubna 2016] Dostupné z: <<http://casopis.vesmir.cz/clanek/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof>>.

LibreOffice. 2016. Statistical Functions Part Five [HTML dokument] LibreOffice help – Calc. [cit. 10. dubna 2016] Dostupné z: <https://help.libreoffice.org/Calc/Statistical_Functions_Part_Five#TTEST>.

Oxoid. 2016. Dehydrated Culture Media - ROGOSA AGAR. [HTML dokument] Oxoid, Ltd. [cit. 4. dubna 2016] Dostupné z: <http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0627&org=82&c=uk&lang=en>.