

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Nové kryoprotektivní látky využitelné při konzervaci
potenciálně probiotických bakterií rodu *Bifidobacterium*
metodou lyofilizace**

Diplomová práce

Autor práce: Petra Vrabcová

Vedoucí práce: Ing. Jiří Killer, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Nové kryoprotektivní látky využitelné při konzervaci potenciálně probiotických bakterií rodu *Bifidobacterium* metodou lyofilizace" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Jiřímu Killerovi, Ph.D. a panu Mgr. Radko Pecharovi z Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky ČZU v Praze za vstřícný přístup a cenné rady při zpracovávání této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům Katedry mikrobiologie výživy a dietetiky ČZU v Praze za poskytnutí pracovního prostoru a vytvoření vhodných pracovních podmínek.

Nové kryoprotektivní látky využitelné při konzervaci potenciálně probiotických bakterií rodu *Bifidobacterium* metodou lyofilizace

Souhrn:

Probiotické bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou používány především v mlékárenském a farmaceutickém průmyslu. Pro své pozitivní účinky na zdraví konzumenta jsou v pro(syn)biotických fermentovaných mléčných, sušených a lyofilizovaných produktech přítomné ve formě životaschopných buněk. Lyofilizace představuje jednu z nejrozšířenějších metod dlouhodobé konzervace bifidobakterií. Lyofilizační proces je náročný, avšak velmi žádoucí, a proto je stále nutné zkoumat nové kryo(lyo)protektivní látky, které účinněji ochrání mikrobiální kultury před negativními vlivy kryokonzervace a lyofilizace.

Cílem diplomové práce bylo otestovat různé směsi látek obsahující specifické oligosacharidy, které mají prebiotické vlastnosti, z pohledu jejich potenciálního kryo(lyo)protektivního účinku při procesu lyofilizace. Pro účely studie bylo vybráno dvanáct sbírkových kmenů bifidobakterií lidského a animálního původu. Jako potenciální kryo(lyo)protektiva byly použity roztoky na bázi 5x koncentrovaného TPY média s přídavkem FOS, 10% fruktooligosacharidy (FOS) a roztok na bázi prasečího mucinu, u kterých se v časových odstupech (po 30 dnech, 3 a 6 měsících) sledovala hodnota počtu životaschopných buněk kmenů bifidobakterií, která se zároveň porovnávala s hodnotou vitálních buněk v kontrolních vzorcích po procesu lyofilizace.

Z našich výsledků po šesti měsících od lyofilizace bylo zjištěno, že potenciální kryo(lyo)protektivní účinnost roztoku 5x koncentrovaného TPY média byla prokázána pouze u *B. boum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis* a *Bombiscardovia coagulans*, kde se o čtyři řády snížil počet životaschopných buněk. U roztoku na bázi 10% FOS byla zjištěna potenciální kryo(lyo)protektivní účinnost pouze u *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* a *Bombiscardovia coagulans*, kde byl zjištěn poloviční počet životaschopných buněk. Nejvyšší potenciální kryo(lyo)protektivní účinnost byla zjištěna u roztoku na bázi prasečího mucinu, při jehož použití byl zachován nejvyšší počet životaschopných buněk u lyofilizátů *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. boum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum* a *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum*.

Klíčová slova: *Bifidobacterium*, lyofilizace, kryoprotektiva, oligosacharidy

New cryoprotectives in preservation of potentially probiotic bacteria of *Bifidobacterium* genus using freeze-drying procedure

Summary:

The probiotic bacteria of the genus *Bifidobacterium* are especially used in the dairy and pharmaceutical industry. They are present in the form of viable cells in pro(syn)biotic fermented milk, dried and freeze-dried products for its positive effects on the health. Lyophilization represents one of the widely used methods for long-term preservation of bifidobacteria. The lyophilization process is challenging, but very needed, and for this reason it is still necessary to explore new cryo(lyo)protective substances, which protect the microbial cultures more effectively before the negative effects of cryopreservation and lyophilization.

The aim of the thesis was to test the various mixtures of substances containing specific oligosaccharides, which have prebiotic properties, from the point of view of their potential cryo(lyo)protective effect of lyophilization process. For the purposes of the study, twelve bifidobacterial strains of human and animal origin were selected. As a potential cryo(lyo)protectives were used solutions on the basis of 5x concentrated TPY medium with addition of FOS, 10% fructooligosaccharides (FOS) and the solution on the basis of porcine gastric mucin. Number of viable cells was determined in lyophilisates enriched by the concrete solutions in the time intervals (30 days, 3 months and 6 months) after lyophilization and compared with the control lyophilized samples (fresh cultures without the additive solutions).

The potential cryo(lyo)protective effectiveness of 5x concentrated TPY medium solution has been demonstrated only in *B. boum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis* a *Bombiscardovia coagulans*, where decreased the number of viable cells about four orders of magnitude. The potential cryo(lyo)protective effectiveness in 10% FOS solution was found only in *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* and *Bombiscardovia coagulans*, where was found half the number of viable cells. The highest potential cryo(lyo)protective effectiveness was observed for a solution on the basis of porcine gastric mucin. The highest number of viable cells was demonstrated in *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. boum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum* and *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* lyophilisates using this potential cryo(lyo)protective solution.

Keywords: *Bifidobacterium*, freeze-drying, cryoprotectives, oligosaccharides

Obsah

1. Úvod	10
2. Literární rešerše	12
2.1. Symbiotické bakterie trávicího traktu člověka a hospodářských zvířat.....	12
2.1.1. Historie, charakteristika a systematika bakteriálního rodu <i>Bifidobacterium</i>	12
2.1.2. Ekologie bifidobakterií	16
2.2. Definice a význam probiotik, prebiotik a synbiotik.....	17
2.3. Probiotický účinek bifidobakterií.....	20
2.3.1. Inhibice střevních patogenů	20
2.3.2. Inhibice původců virových střevních onemocnění	21
2.3.3. Imunostimulační účinky	21
2.3.4. Antikancerogenní efekt.....	22
2.3.5. Ovlivnění metabolických a fyziologických pochodů	22
2.3.6. Jiné pozitivní účinky bifidobakterií	23
2.4. Stručná charakteristika vybraných (pod)druhů bifidobakterií	24
2.4.1. <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	24
2.4.2. <i>Bifidobacterium bifidum</i>	25
2.4.3. <i>Bifidobacterium bohemicum</i> a <i>Bifidobacterium bombi</i>	25
2.4.4. <i>Bifidobacterium boum</i>	26
2.4.5. <i>Bifidobacterium breve</i>	26
2.4.6. <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	26
2.4.7. <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	27
2.4.8. <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	27
2.4.9. <i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	27
2.4.10. <i>Bifidobacterium thermophilum</i>	28
2.4.11. <i>Bombiscardovia coagulans</i>	28
2.5. Metody konzervace bakterií	28
2.5.1. Zmrazení	30
2.5.2. Sušení.....	30
2.5.3. Lyofilizace	31
2.5.4. Faktory ovlivňující životaschopnost buněk po lyofilizaci.....	33
2.5.4.1. Koncentrace buněk v počátečním inokulu.....	33
2.5.4.2. Rozdíly mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi	33
2.5.4.3. Použití kryoprotektivních látek.....	34
2.5.4.4. Účinek pH prostředí a osmotického tlaku.....	35
2.5.4.5. Podmínky vlastního lyofilizačního procesu.....	36

2.5.4.6. Podmínky uchovávání lyofilizovaných kultur	37
3. Cíle práce	38
4. Hypotéza	39
5. Materiál a metody	40
5.1. Použité kultury	40
5.2. Složení tekutého růstového média a jeho příprava	41
5.3. Složení média pro zhotovení ředících řad	41
5.4. Složení a příprava roztoků na bázi potenciálně kryo(lyo)protektivně působících oligosacharidů	43
5.5. Lyofilizační proces	45
6. Výsledky	48
6.1. <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	49
6.2. <i>Bifidobacterium bifidum</i>	49
6.3. <i>Bifidobacterium bohemicum</i> a <i>B. bombi</i>	50
6.4. <i>Bifidobacterium boum</i>	51
6.5. <i>Bifidobacterium breve</i>	52
6.6. <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	52
6.7. <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	53
6.8. <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	54
6.9. <i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	54
6.10. <i>Bifidobacterium thermophilum</i>	55
6.11. <i>Bombiscardovia coagulans</i>	56
7. Diskuze	57
8. Závěr	65
9. Seznam použité literatury	66

Seznam tabulek

1. Literární rešerše

Tabulka č. 1. Taxonomický přehled všech validních druhů čeledi Bifidobacteriaceae, včetně jejich místa výskytu a autorů popisů (str. 15)

2. Materiál a metody

Tabulka č. 2. Složení růstového média Tryptone Phytone Yeast extract bujónu (str. 41)

Tabulka č. 3. Složení redukováného média pro přípravu ředících řad (str. 42)

Tabulka č. 4. Složení potenciálního kryo(lyo)protektivního roztoku na bázi 5x koncentrovaného TPY média s přidavkem FOS (fruktooligosacharidů) (str. 43)

Tabulka č. 5. Složení potenciálního kryo(lyo)protektivního roztoku na bázi FOS (fruktooligosacharidů) (str. 43)

Tabulka č. 6. Složení potenciálního kryo(lyo)protektivního roztoku na bázi mucinu (str. 44)

3. Výsledky

Tabulka č. 7. Logaritmické počty životaschopných buněk použitých v laboratorním výzkumu v časových odstupech před a po lyofilizaci (str. 48)

Seznam obrázků

1. Literární rešerše

Obrázek č. 1. Typická morfologie bifidobakterií (str. 13)

Obrázek č. 2. Zjednodušené znázornění průběhu lyofilizačního procesu (str. 32)

2. Materiál a metody

Obrázek č. 3. Vzhled anaerostatu (Anaerojar 3,5 L; Oxoid, Anglie) (str. 42)

Obrázek č. 4. Lyofilizátor Powerdry LL 3000 (str. 46)

Obrázek č. 5. Lyofilizovaná kultura *B. bohemicum* za přítomnosti FOS (str. 46)

3. Výsledky

Obrázek č. 6. Kolonie různých kultur bifidobakterií narostlých z vitálních buněk lyofilizátů po 48 hodinách kultivace na TPY agaru za anaerobních podmínek (str. 47)

Obrázek č. 7. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. animalis* subsp. *lactis* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 49)

Obrázek č. 8. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. bifidum* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 49)

Obrázek č. 9. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. bohemicum* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 50)

Obrázek č. 10. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. bombi* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 50)

Obrázek č. 11. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. boum* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 51)

Obrázek č. 12. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. breve* v časových odstupech před a po lyofilizaci (str. 52)

Obrázek č. 13. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. longum* subsp. *infantis* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 52)

Obrázek č. 14. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. longum* subsp. *longum* v počátku a v časových odstupech po lyofilizaci (str. 53)

Obrázek č. 15. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. pseudolongum* subsp. *globosum* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 54)

Obrázek č. 16. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 54)

Obrázek č. 17. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. thermophilum* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 55)

Obrázek č. 18. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. coagulans* v časových odstupech po lyofilizaci (str. 56)

1. Úvod

Role mikroorganismů v globálním ekosystému je naprosto nezastupitelná. Hrají zásadní roli v koloběhu biogenních prvků na Zemi, široce se využívají v biotechnologiích a různých odvětvích průmyslu. Podstatnou součást mikroorganismů na Zemi tvoří zástupci jedné ze tří domén života, a to domény Bacteria. Odhadovaný celkový počet bakterií na Zemi čítá 5×10^{30} buněk, což představuje přibližně 350-550 miliard tun suché biomasy. Jsou všudypřítomné a jejich jedinečnost spočívá v tom, že přežívají i v tak náročných podmínkách, kde by jiný organismus zahynul. V případě bakterií se jedná o nejvíce zastoupenou formu života na Zemi. Jejich druhová rozmanitost se odhaduje v rozmezí od 10^7 do 10^9 taxonomických jednotek (Schloss *et al.*, 2004).

Historicky byl výzkum bakterií od 19. století nejprve zaměřen na patogenní bakterie, teprve od počátku 20. století začali badatelé uvažovat o bakteriích v souvislosti s jejich možným prospěšným účinkem na zdraví hostitele, a to především člověka a hospodářských zvířat. V současné době mnoho badatelských týmů směřuje svůj výzkum na tzv. symbiotické bakterie intestinálního traktu člověka, hospodářsky významných zvířat a živočichů, jejichž pozitivní efekt na zdraví hostitele se zdá být neoddiskutovatelný.

Odhaduje se, že trávicí trakt člověka zahrnuje 10^{14} bakteriálních buněk (Berg, 1996), z nichž většina obývá kaudální intestinální části, kde převažuje anaerobní prostředí. Uváděný počet bakteriálních druhů vyskytujících se v tomto prostředí se pohybuje v rozmezí od 300 do 1000 (Guarner *et Malagelada*, 2003; Sears, 2005), z nichž přibližně 40 je víceméně dominantních (Miquel *et al.*, 2013). Ovšem je nutno poznamenat, že většina bakterií perzistujících ve výstelce gastrointestinálního traktu je nekultivovatelná prostřednictvím současných metod a jejich vliv na fyziologii trávení a jiných aspektů lidského zdraví může být vyšší oproti charakterizovaným taxonům (Shanahan, 2002). Z taxonomického hlediska náleží důležité symbiotické bakterie intestinálního traktu člověka, ale také mnohých jiných savců a živočichů, do kmenů Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria a Proteobacteria. Nejvýznamnější druhy v rámci těchto taxonomických skupin náleží do rodů *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus* a *Bifidobacterium* (Beaugerie *et Petit*, 2004).

Probiotika jsou obecně definována jako 'živé mikroorganismy, které při aplikaci v dostatečném množství přinášejí zdravotní prospěch hostiteli' (Sanders, 2008). V užším slova smyslu je definice zaměřena právě na symbiotické bakterie obývající víceméně trvale intestinální trakt konkrétního hostitele. Nejznámější a často aplikovaná probiotika zahrnují

především zástupce rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Nejčastější formou podání probiotik jsou fermentované mléčné výrobky a tablety obsahující často kromě vysušených či lyofilizovaných buněk také tzv. prebiotika, která představují nestravitelnou složku potravy podporující růst/aktivitu specifické skupiny intestinální mikrobioty. Prebiotika zahrnují různé typy oligosacharidů, např. fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy aj. Současné podání probiotika a prebiotika dává vzniknout tzv. synbiotiku (odvozeno od slova synergismus, kdy podání dvou složek zároveň zvyšuje finální účinek oproti podání obou složek samostatně).

Hlavním úkolem této práce bylo otestovat různé směsi látek obsahující definované či nedefinované množství různých oligosacharidů z pohledu jejich potenciálního kryoprotektivního účinku při procesu lyofilizace různých druhů/kmenů bifidobakterií. Právě proces lyofilizace (vysušení ze zmrazeného stavu) je hojně využíván nejen při výrobě tabletových forem probiotik, resp. synbiotik, ale také k dlouhodobé konzervaci bifidobakteriálních kultur. V průběhu tohoto procesu je naprosto nezbytné zajistit, aby bakteriální buňky přežily v dostatečném počtu zmrazovací fázi. Pro účely pokusů byly vybrány směsi obsahující oligosacharidy, jejichž možný kryoprotektivní účinek nebyl dosud prozkoumán.

2. Literární řešerše

2.1. Symbiotické bakterie trávicího traktu člověka a hospodářských zvířat

Symbióza zahrnuje vědecký, ekologický termín označující soužití dvou a více organismů s oboustranně výhodnými interakcemi. Symbiotické vztahy jsou na Zemi velice rozšířené a náleží sem vztahy jak mezi prokaryotními organismy, tak také mezi prokaryotními - eukaryotními a samozřejmě také mezi eukaryotními organismy. Složitost těchto vztahů a vazeb je do značné míry závislá na druhové rozmanitosti v rámci dané ekologické niky.

V tomto ohledu je jednou z nejsložitějších ekologických nik kaudální část trávicího traktu savců, ale také jiných živočichů, kde interaguje celá řada rozdílných, především bakteriálních taxonů s eukaryotními buňkami vlastního makroorganismu. V intestinálním traktu člověka, a do určité míry také u jiných savců a živočichů, dominují zástupci bakteriálních kmenů Bacteroidetes a Firmicutes s až 95% zastoupením (Morowitz *et al.*, 2011). Zbytek bakteriálních taxonů je zahrnuta především do kmenů Proteobacteria a Actinobacteria, a rámci posledně uvedeného kmene především představitelé rodu *Bifidobacterium* (Manson *et al.*, 2008).

Počet bakteriálních buněk v intestinálním traktu člověka čítá až 10^{13} , a o řád tak převyšuje počet buněk lidského těla (Gill *et al.*, 2006). Druhová rozmanitost, vysoký počet buněk a rozdílných bakteriálních genů (tzv. intestinální mikrobiom) zcela jistě ovlivňuje biologické pochody člověka, jiných savců, zvířat a živočichů, což bylo potvrzeno mnohými studiemi. V případě probiotických bakterií, které jsou reprezentovány především zástupci rodů *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, jsou často citovány tyto pozitivní účinky na zdravotní stav hostitele: ochrana intestinální bariéry před vstupem patogenních mikroorganismů a nebezpečných látek do makroorganismu, regulace a stimulace imunitního systému, inhibice patogenních bakterií a virových partikulí, příznivý vliv na metabolismus živinových látek (sacharidů, proteinů a lipidů) a vitamínů, pozitivní ovlivnění kognitivních pochodů a v neposlední řadě dekontaminace toxických látek (Rijkers *et al.*, 2011; Bested *et al.*, 2013).

2.1.1. Historie, charakteristika a systematika bakteriálního rodu *Bifidobacterium*

V Paříži na Pasteurově institutu působil francouzský pediater Henry Tissier, který sledoval a v roce 1899 izoloval ze stolice plně kojených dětí neznámé bakterie, které měly charakteristický morfologický rozdvojený tvar Y („bifid“), a proto tyto bakterie pojmenoval „bifidus“. V roce 1900 H. Tissier nazval tyto bakterie jako *Bacillus bifidus communis* na podkladě morfologických poznatků. Ovšem také na počátku 20. století Moro v Itálii našel

bakterie, které se ovšem jeví odlišné od Tissierových bakterií a zařadil je do rodu *Lactobacillus*. Dlouhou dobu byly druhy *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* souhrnně označovány jako "*Lactobacillus bifidus*". Tento termín byl navržen Hollandem roku 1920. Až teprve roku 1924 Orla-Jensen navrhl samostatné zařazení a překlasifikování rodu *Bifidobacterium* (Biavati *et al.*, 2000). Díky této skutečnosti je patrné, že morfologická kritéria jsou nedostatečná, a proto se začaly rozvíjet nové metody identifikace bakterií. Bylo nutné se zaměřit na kritéria genetická, fyziologická a biochemická.

Bifidobakterie jsou morfologicky charakterizovány jako nepravidelné tyčinky nabývající často tvar písmene V, Y, X a kyjovitý tvar, jsou často rozmanitě zakřivené či ztlustělé (Scardovi, 1986) (Obrázek č. 1). Za různých podmínek mohou měnit morfologii až do podoby blízké kokům, jedná se tudíž o tzv. pleomorfní tyčinkovité bakterie (Ahn *et al.*, 2001). Tvar buněk je výrazně ovlivněn látkami obsaženými v živném médiu, ke kterým řadíme N-acetylglukózamin, kyselinu glutamovou, alanin, kyselinu asparagovou, serin a Ca^{2+} ionty v živném médiu (Ventura *et al.*, 2004). Velikost jejich buněk je přibližně 0,5 až 0,8 x 2,0 až 8,0 μm . Tyto bakterie jsou grampozitivní, nesporeující, kataláza a oxidáza-negativní, nepohyblivé se striktně anaerobním metabolismem. Peptidoglykanová vrstva buněčné stěny, která je charakteristická pro grampozitivní bakterie, obsahuje kromě základních stavebních kamenů peptidoglykanu, také 12 bílkovin, kyselinu teichovou a sacharidy, např. galaktózu, glukózu a rhamnózu. Zastoupení jednotlivých cukrů se z hlediska kvantitativního i kvalitativního liší mezi druhy i mezi kmeny a mnohdy záleží na podmínkách kultivace (Biavati *et al.*, 2000).

Obrázek č. 1 Typická morfologie bifidobakterií (*B. bombi*, převzato z Killer *et al.*, 2009)



Bifidobakterie se spolu se skardoviálními rody vyznačují specifickým fermentativním metabolismem, při kterém fermentují glukózu, případně jiné monosacharidy prostřednictvím aktivity enzymů fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy a xylulózo-5-fosfát fosfoketolázy až na konečné produkty kyselinu octovou a mléčnou v přibližném molárním poměru 3 : 2 (Scardovi, 1986; Killer *et al.*, 2010; Killer *et al.*, 2013a). Lze je tudíž zařadit do samostatné,

specifické skupiny bakterií mléčného kvašení. Dalšími odpadními produkty metabolismu mohou být také za určitých podmínek nízké koncentrace jiných látek, např. etanolu, kyseliny jantarové a mravenčí. Tyto bakterie neprodukují CO₂, kyselinu máselnou a propionovou (Sedláček, 2007). Avšak studie Shah *et* Lankaputhra (2002) prokázala za specifických podmínek také produkci kyseliny hippurové a kyseliny máselné.

Optimální teplotou pro růst bifidobakterií lidského původu je rozmezí teplot 36 - 38 °C, ale pro bifidobakterie zvířecího původu je optimem teplota v rozmezí 41-43 °C. Většina bifidobakterií roste nejlépe při teplotách v rozmezí 25 - 38 °C. Optimální pH pro růst je okolo 7,0. Při hodnotách pH pod 4,1 většina druhů odumírá do jednoho týdne i při udržení teploty 4°C. Při pH pod 2,5 hyne valná většina druhů do tří hodin. Zástupci rodu *Bifidobacterium* nedokážou jako zdroj uhlíku využívat organické nebo mastné kyseliny (Shah *et* Lankaputhra, 2002).

Bifidobakterie jsou spolu s příbuznými skardoviálními rody a rodem *Gardnerella* klasifikovány do kmene Actinobacteria, podtřídy Actinobacteridae, řádu Bifidobacteriales a čeledi Bifidobacteriaceae (Biavati *et* Mattarelli, 2012). Doposud bylo popsáno v rámci čeledi Bifidobacteriaceae 54 validních (pod)druhů bifidobakterií a 11 druhů náležejících do příbuzných rodů *Gardnerella*, *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Bombiscardovia*, *Parascardovia*, *Pseudoscardovia* a *Scardovia*. Jednotlivé druhy této taxonomické skupiny, jejich habitat a seznam autorů popisů daných taxonů je uveden níže v Tabulce č. 1.

V rámci rodu *Bifidobacterium* lze rozlišit dvě skupiny bifidobakterií, a to animálního a lidského původu, které se liší nejen genotypem, ale také např. fyziologickými vlastnostmi (Gavini *et al.*, 1991; Milani *et al.*, 2014). Mezi hostitelsky specifické druhy lidského původu se řadí *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. faecale*, *B. gallicum*, *B. kashiwanohense*, *B. longum* subsp. *infantis* / *longum* a *B. pseudocatenulatum* (Biavati *et* Mattarelli, 2012; Choi *et al.*, 2014; Morita *et al.*, 2011). Naopak taxony *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. boum*, *B. choerinum*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum* / *pseudolongum* či *B. thermophilum* se vyskytují skoro výhradně v intestinálním traktu jiných savců a lze je tudíž zařadit do skupiny animálních bifidobakterií (Gavini *et al.*, 2006). Specifickou taxonomickou skupinou jsou druhy, které byly izolovány z trávicího traktu včel (*B. asteroides*, *B. coryneforme* a *B. indicum*) a čmeláků (*B. actinocoloniiforme*, *B. bohemicum* a *B. bombi*), tedy hospodářsky velmi významného hmyzu (Biavati *et* Mattarelli, 2012; Killer *et al.*, 2009; Killer *et al.*, 2011).

Tabulka č. 1. Taxonomický přehled všech validních druhů čeledi Bifidobacteriaceae, včetně jejich místa výskytu a autorů popisů.

Rody	Druh	Původ	Autoři popisu
Skardoviální rody	<i>Aeriscardovia aeriphila</i>	trávicí trakt domestikovaných prasat	Simpson et al. 2004
	<i>Alloiscardovia omnicoles, macacae, criceti</i>	klinické vzorky člověka	Huys et al. 2007, Killer et al. 2013
	<i>Bombiscardovia coagulans</i>	trávicí trakt čmeláků	Killer et al. 2010
	<i>Parascardovia denticolens</i>	ústní dutina člověka	Jian et Dong 2002
	<i>Pseudoscardovia suis, radai</i>	trávicí trakt divokých prasat	Killer et al. 2013, 2014
	<i>Scardovia inopinata, wiggsiae</i>	ústní dutina člověka	Jian et Dong 2002, Downes et al. 2011
Gardnerella	<i>Gardnerella vaginalis</i>	vagina člověka	Greenwood et Pickett 1980
rod <i>Bifidobacterium</i>	<i>B. actinocoloniiforme</i>	trávicí trakt čmeláků	Killer et al. 2011
	<i>B. adolescentis</i>	lidský trávicí trakt	Reuter 1963
	<i>B. aesculapii</i>	trávicí trakt kosmanů	Modesto et al. 2014
	<i>B. angulatum</i>	lidský trávicí trakt	Scardovi et Crociani 1974
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	trávicí trakt savců	Masco et al. 2004
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	trávicí trakt savců, mléčné fermentované výrobky	Masco et al. 2004
	<i>B. asteroides</i>	trávicí trakt včel	Scardovi et Trovatelli 1969
	<i>B. biavatii</i>	trávicí trakt kosmanů	Endo et al. 2012
	<i>B. bifidum</i>	lidský trávicí trakt, vagina	Orla-Jensen 1924
	<i>B. bohemicum</i>	trávicí trakt čmeláků	Killer et al. 2011
	<i>B. bombi</i>	trávicí trakt čmeláků	Killer et al. 2009
	<i>B. boum</i>	bachor skotu, trávicí trakt savců	Scardovi et al. 1979
	<i>B. breve</i>	lidský trávicí trakt, vagina	Reuter 1963
	<i>B. callitrichos</i>	trávicí trakt kosmanů	Endo et al. 2012
	<i>B. catenulatum</i>	lidský trávicí trakt, vagina	Scardovi et Crociani 1974
	<i>B. choerinum</i>	trávicí trakt domestikovaných prasat	Scardovi et al. 1979
	<i>B. commune</i>	trávicí trakt čmeláků	Praet et al. 2015
	<i>B. coryneforme</i>	trávicí trakt včel	Scardovi et Trovatelli 1969
	<i>B. crudilactis</i>	syrové kravské mléko, mléčné produkty	Delcenserie et al. 2007
	<i>B. cuniculi</i>	trávicí trakt králíků	Scardovi et al. 1979
	<i>B. dentium</i>	lidská ústní dutina, trávicí trakt člověka	Scardovi et Crociani 1974
	<i>B. faecale</i>	lidský trávicí trakt	Choi et al. 2014
	<i>B. gallicum</i>	lidský trávicí trakt	Lauer 1990
	<i>B. gallinarum</i>	trávicí trakt drůbeže	Watanabe et al. 1983
	<i>B. hapali</i>	trávicí trakt kosmanů	Michelini et al. 2016
	<i>B. indicum</i>	trávicí trakt včel	Scardovi et Trovatelli 1969
	<i>B. kashiwanohense</i>	lidský trávicí trakt	Morita et al. 2011
	<i>B. lemurum</i>	trávicí trakt lemura	Modesto et al. 2015
	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	lidský trávicí trakt, vagina	Mattarelli et al. 2008
	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	lidský trávicí trakt, vagina	Mattarelli et al. 2008
	<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>	trávicí trakt selat	Mattarelli et al. 2008
	<i>B. magnum</i>	trávicí trakt králíků	Scardovi et Zani 1974
	<i>B. merycicum</i>	bachor skotu, trávicí trakt savců	Biavati et Mattarelli 1991
	<i>B. minimum</i>	odpadní voda	Biavati et al. 1982
	<i>B. mongoliense</i>	mléčný fermentovaný produkt	Watanabe et al. 2009
	<i>B. moukalabense</i>	trávicí trakt západních nížinných goril	Tsuchida et al. 2014
	<i>B. myosotis</i>	trávicí trakt kosmanů	Michelini et al. 2016
	<i>B. pseudocatenulatum</i>	lidský trávicí trakt	Scardovi et al. 1979
	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	bachor skotu, trávicí trakt savců	Yeashima et al. 1992
	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	bachor skotu, trávicí trakt savců	Yeashima et al. 1992
	<i>B. psychraerophilum</i>	trávicí trakt domestikovaných prasat	Simpson et al. 2004
	<i>B. pullorum</i>	trávicí trakt drůbeže	Trovatelli et al. 1974
	<i>B. reuteri</i>	trávicí trakt kosmana	Endo et al. 2012
	<i>B. ruminantium</i>	bachor skotu	Biavati et Mattarelli 1991
	<i>B. saeculare</i>	trávicí trakt králíků	Biavati et al. 1991
	<i>B. saguini</i>	trávicí trakt kosmana	Endo et al. 2012
	<i>B. scardovii</i>	lidský trávicí trakt	Hoyles et al. 2002
	<i>B. stellenboschense</i>	trávicí trakt kosmana	Endo et al. 2012
	<i>B. subtile</i>	odpadní voda	Biavati et al. 1982
	<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	trávicí trakt domestikovaných prasat	Zhu et al. 2003
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	trávicí trakt domestikovaných prasat	Zhu et al. 2003	
<i>B. thermophilum</i>	bachor skotu, trávicí trakt savců	Mitsuoka 1969	
<i>B. tissieri</i>	trávicí trakt kosmanů	Michelini et al. 2016	
<i>B. tsurumiense</i>	dentální plaky křečků	Okamoto et al. 2008	

2.1.2. Ekologie bifidobakterií

Zástupci rodu *Bifidobacterium* se vyskytují v trávicím traktu lidí, teplotokrevných živočichů, včel a čmeláků (Biavati *et* Mattarelli, 2012). Nacházejí se také v humánním klinickém materiálu a v odpadních vodách (Scardovi, 1986). Gastrointestinální trakt novorozenců je mikroorganismy rychle kolonizován průchodem porodními cestami. Do této doby je trávicí trakt plodu sterilní. U plně kojených dětí jsou po určitém čase detekovány enterokoky, *Escherichia coli* a bifidobakterie s dominancí druhů *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis* a *B. longum* subsp. *longum*. Na rozdíl od plně kojených dětí, u kterých jsou dominantní složkou jejich intestinální mikrobioty bifidobakterie, jsou u dětí krmených dětskou kojeneckou náhražkou často detekováni zástupci rodů *Bacteroides*, *Streptococcus* či *Clostridium* (Rosberg-Cody *et al.*, 2004). Složení mikrobioty kojenců, ale také dětí, adolescentů a dospělých lidí do jisté míry závisí na způsobu stravování, porodu a podávání antibiotik. Některé tyto aspekty výrazně přispívají k nárůstu počtu fakultativně anaerobních bakterií a dochází k opoždění kolonizace trávicího traktu bifidobakteriemi.

U kojenců na mateřském mléce dominují v intestinálním traktu bifidobakterie v počtu cca 10^{11} (na g stolice) a představují tak až 90% veškeré mikrobioty (Harmsen *et al.*, 2000). Tato symbióza bifidobakterií a člověka je především ovlivněna přítomností tzv. bifidogenních stimulantů, které jsou přítomny ve vysokých koncentracích v mateřském mléce. Mezi tyto stimulanty náleží především HMO (Human Milk Oligosaccharides), resp. oligosacharidy mateřského mléka, ale také jiné látky přítomné v mateřském mléce (Coppa *et al.*, 2004). U dospělých lidí není tato složka logicky přítomna a složení intestinální mikrobioty závisí na složení potravy či genotypu člověka. Počet bifidobakterií u dospělých lidí se odhaduje na 10^9 / g stolice a převládajícími druhy, které jsou přítomné v intestinálním traktu, jsou *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* a *B. longum* (Matsuki *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2002). Přestože bifidobakterie reprezentují pouze 3 - 6 % celkové střevní mikroflóry dospělého jedince, jejich výskyt je pro lidské zdraví velmi významný (Schell *et al.*, 2002).

Zatímco u člověka představují bifidobakterie podstatnou součást intestinální mikrobioty, u jiných savců reprezentovaných především hospodářskými zvířaty, mají nižší zastoupení. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena odlišnou skladbou potravy obsahující nižší koncentrace bifidogenních faktorů, především oligosacharidů apod. Jejich přítomnost byla odhalena v trávicím traktu domestikovaných i divokých prasat, skotu, koz, ovcí, králíků, ale také domestikované drůbeže (Scardovi, 1986; Biavati *et* Mattarelli, 2012). Jejich počet

se může lišit podle vývojové fáze, přičemž vyšší počet bývá detekován především u savců na mléčné výživě (Vlková *et al.*, 2006).

Ve výkalech prasat byl odhadnut počet bifidobakterií na $10^6 - 10^8$ (na 1 g), což odpovídá pouze přibližně 1% celkových bakterií. Nejčastěji u nich byly identifikovány druhy *B. boum*, *B. longum* subsp. *suis*, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* a *B. pseudolongum* subsp. *globosum*, *B. psychraerophilum*, *B. thermophilum* a *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* (Rada *et Petr*, 2002; Killer *et al.*, 2013b). U skotu se liší zastoupení bifidobakterií podle odlišných částí trávicího traktu. Nejnížší je v bochorové tekutině (odhadovaný počet do 10^3 / ml), zatímco v kaudálních částech trávicího traktu především sajících telat může počet bifidobakterií, reprezentovaný především poddruhem *B. animalis* subsp. *animalis*, dosahovat až 10^9 (g výkalů) (Lukáš *et al.*, 2007; Vlková *et al.*, 2006). U hrabavé drůbeže byla zkoumána přítomnost bifidobakterií v podstatě pouze u kuřat a slepic. Také u této skupiny hospodářských zvířat se liší počet bifidobakterií v rozdílných částech trávicího traktu. Nejvyšší počty byly odhaleny ve slepých střevech nosnic dosahující až 10^{10} (g tráveniny), nižší byly detekovány ve vletech (10^7 / g tráveniny) (Rada *et Petr*, 2000; Petr *et Rada*, 2001).

Specifickou ekologickou nikou, kde se bifidobakterie vyskytují, je trávicí trakt významných opylovačů, resp. včel a čmeláků. U různých druhů včel byly objeveny 3 druhy bifidobakterií: *B. coryneforme*, *B. indicum* a *B. asteroides*, s prevalencí posledně jmenovaného druhu u evropských včel. Ve výkalovém vaku evropských včel mohou představovat dominantní složku mikrobioty (počet až 10^9 / g výkalového vaku) (Rada *et Petr*, 2002; Rada *et al.*, 1997; Scardovi *et Trovatielli*, 1969). V nedávné době byla potvrzena přítomnost bifidobakterií také u čmeláků, v jejichž trávicím traktu byly objeveny 4 hostitelsky specifické druhy, *B. actinocoloniiforme*, *B. bohemicum*, *B. bombi* a *B. commune* (Killer *et al.*, 2009; Killer *et al.*, 2011; Praet *et al.*, 2015). Navíc byl v trávicím traktu čmeláků objeven zcela nový rod *Bombiscardovia* taxonomicky příbuzný bifidobakteriím (Killer *et al.*, 2010).

2.2. Definice a význam probiotik, prebiotik a synbiotik

První doložené příznivé účinky bakterií mléčného kvašení (BMK) na organismus hostitele pocházejí od německého vědce Dödrleina. Zjistil, že rozvoj patogenních mikroorganismů je potlačen bakteriemi, které produkovaly kyselinu mléčnou a nacházely se ve vagíně žen. V roce 1908 byly popsány další příznivé účinky BMK lékařem jménem Ilja Mečnikov. Byl prvním badatelem, který poukázal na později doloženou skutečnost, že tělo je schopno se bránit mikrobiálními infekcím. Byl rovněž prvním badatelem,

jenž poukázal na to, že pravidelná konzumace BMK může mít významný vliv na zdraví a dlouhověkost člověka (Holzapfel *et al.*, 2001). Poznamenal přitom, že je nutné, aby kolonizující bakterie měly dostatek vhodných živin pocházejících z potravy. Toto období lze označit za začátek výzkumu a aplikace tzv. probiotik.

Slovo probiotické pochází z řeckého výrazu "pro bios", což znamená "pro život". Probiotikum je tedy živý mikrobiální doplněk stravy obsahující především bakterie, které při podávání adekvátního množství a přesně definovaných mikroorganismů příznivě ovlivňuje zdraví konzumenta (Sanders, 2008). Probióza označuje symbiotickou asociaci dvou organismů žijících společně a poskytujících si vzájemně výhody. Jinak lze označit probiózu jako vzájemně prospěšné soužití dvou nebo více druhů živočichů / organismů po přechodnou dobu, přičemž toto soužití není nezbytné pro jejich úspěšnou existenci. Termín probiotický byl zaveden přibližně v roce 1960, avšak až roku 1965 byl tento termín přesněji vymezen (Lilly *et Stillwell*, 1965) a zaveden do vědeckého a odborného jazyka.

Mikroorganismy používané jako probiotika zahrnují především rody bakterií mléčného kvašení, resp. *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Enterococcus*. Právě představitelé těchto rodů se využívají díky jednoduché kultivaci, dlouholetým zkušenostem při aplikaci v mlékárenském průmyslu a nepatogenitě. Od jisté doby jsou hojně využívány v praxi, vzhledem k jejich prokázaným či hypotetickým pozitivním účinkům a nepatogenitě, především bakterie rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* (Vlková *et al.*, 2004).

Probiotické či symbiotické bakterie intestinálního člověka mají zásadní význam pro zdraví člověka. Přispívají ke správnému průběhu metabolických procesů ve střevě, enzymatické aktivitě, regulaci vnitřní homeostázy, potlačování prokancerogenních enzymatických aktivit a také působí jako bariéra bránící přilnutí patogenních bakterií ke střevní výstelce (Holm, 2003). Díky probiotickým mikroorganismům je lidské tělo také schopné lépe využívat vápník či některé vitamíny (Kot *et Bezkorovainy*, 1999).

Dalším diskutovaným pozitivním účinkem probiotik je snižování koncentrace krevního cholesterolu (rozklad solí žlučových kyselin brání zpětnému vstřebávání cholesterolu), možný protinádorový efekt (nižší pH inhibuje růst hnilobných bakterií a nepřímo tak uvolňování kancerogenů či prokancerogenů). Probiotika nemohou příznivě ovlivnit makroorganismus, pokud jejich populace v intestinálním traktu nedosáhne určitého počtu, které se nachází pravděpodobně v rozmezí 10^6 - 10^8 / g intestinálního obsahu. Vyšší koncentrace buněk je potřeba k tomu, aby byly schopny kolonizovat trávicí trakt a pomnožovat se (Walstra *et al.*, 2006).

S probiotiky se člověk dostává do kontaktu již od narození. Prvním zdrojem inokula jsou porodní cesty matek. Také prostřednictvím kojení se probiotika bezprostředně dostávají do gastrointestinálního traktu novorozence. Trávicí ústrojí plně kojeneho novorozence je tak až z 90% osídleno bifidobakteriemi, ovšem v dospělosti se jejich počet snižuje na cca 10 % a u starších osob nebo u imunodeficitních lidí mohou bifidobakterie zcela vymizet. V průběhu našeho života se intestinální mikrobiota neustále vyvíjí na základě aktuálního zdravotního stavu, případné medikamentózní léčby, jídelníčku, fyzické zátěže i vlivu psychických faktorů. V mnoha případech, např. po aplikaci antibiotik, při profylaxi bakteriálních či virových intestinálních infekcí, při zabránění rozvoje alergických onemocnění, je vhodné použít probiotika. Součástí lyofilizovaných probiotických produktů pro člověka jsou nejčastěji taxony *B. longum* subsp. *longum* / *infantis*, *B. breve*, *B. bifidum* a v případě laktobacilů taxony *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* či *L. rhamnosus* (Holzapfel *et* Schillinger, 2002).

Lyofilizované formy probiotických preparátů jsou vhodnější vzhledem k vysokému počtu životaschopných buněk, který je udržován po delší časové období a vzhledem k zachování biochemické aktivity. Další nespornou výhodou je využití lidských, hostitelsky specifických druhů bifidobakterií, které vzhledem k citlivosti vůči přítomnosti kyslíku v prostředí, náročnosti kultivace a jiným charakteristikám nemohou být použity jakožto součást mléčných kysaných probiotických produktů (Maxa *et* Rada, 2002). Z tohoto důvodu je součástí probiotik na bázi kysaných mléčných produktů nejčastěji poddruh *B. animalis* subsp. *lactis*, který je schopen odolávat podmínkám výroby, využívat zdroje přítomné v kravském mléce a po delší čas si uchovávat životaschopnost (Frič, 2007). Mezi důležité faktory, které ovlivňují přežití bifidobakterií v probiotických výrobcích, se řadí délka skladování, acidita, teplota, balicí materiál a redoxní potenciál (Beneš, 2009).

Prebiotikum je definováno jako nemetabolizovaná a nehydrolyzovaná složka potravin, která při požití v dostatečném množství příznivě napomáhá k selektivní stimulaci růstu a/nebo životní aktivitě jednoho i více druhů prospěšných mikroorganismů v gastrointestinálním traktu, čímž do určité míry zlepšuje zdravotní stav konkrétního hostitele (Ouwehand *et al.*, 2007).

Prebiotika jsou reprezentována především oligosacharidy různého typu, např. FOS (fruktoligosacharidy), GOS (galaktooligosacharidy), IMO (isomaltooligosacharidy) a jinými. Je ovšem nutné zdůraznit, že ne všechny tyto oligosacharidy jsou skutečným prebiotikem, a proto musí splňovat jisté požadavky. Prebiotika musí být nestrávitelné v horních částech trávicího traktu makroorganismu, nesmí podporovat růst a množení nežádoucích

mikroorganismů a nesmí být absorbována v gastrointestinálním traktu (Gibson *et al.*, 1997; Roberfroid, 2007). Význam prebiotik spočívá kromě výše uvedeného v tom, že podporují střevní peristaltiku a imunitní systém, zvětšují objem stolice a působí tak proti zácpě, podporují optimální složení intestinální mikrobioty a v neposlední řadě brání růstu choroboplodných bakterií (salmonel, klostridií, enteropatogenní *Escherichia coli* apod.).

Termín synbiotikum je používám pro označení produktů, které jsou směsí probiotik a prebiotik. Termín je odvozen od slova synergismus, kdy dochází k zesilování účinku dvou nebo více současně podávaných složek. Prebiotické látky selektivně podporují probiotické komponenty. Typickým synbiotikem je jogurt obsahující kromě přesně definovaných probiotických bakterií také prebiotikum v podobě oligofruktanů (Rada, 2010). Význam synbiotik spočívá mimo jiné v tom, že zvyšují odolnost probiotické složky průchodem trávicím traktem (Anonym 1, 2011).

2.3. Probiotický účinek bifidobakterií

2.3.1. Inhibice střevních patogenů

Zástupci rodu *Bifidobacterium* mají až téměř nezastupitelný význam v udržování stálého a vyváženého složení mikroflóry ve gastrointestinálním traktu (Satokari *et al.*, 2001). Probiotické, resp. symbiotické bakterie intestinálního traktu usmrcují či inhibují patogenní či potenciálně patogenní bakterie několika způsoby. Bifidobakterie metabolizují sacharidy na kyselinu octovou a mléčnou. Tyto organické kyseliny svou přítomností snižují hodnotu pH ve střevě. Vzniká tak prostředí, které usmrcuje patogenní bakterie. Schopností vazby na enterocyty vytěsňují patogeny, jejichž schopnost vazby na buňky střevní výstelky je limitovaná a také vzhledem k tomu, že tyto bakterie nejsou primárně adaptované na podmínky situované v intestinálním traktu (Müting *et al.*, 1986).

V případě bifidobakterií byla také prokázána produkce látek, které zabraňují adhezi určitých patogenů na střevní výstelku (Fujiwara *et al.*, 2001). Také enzymatická aktivita bifidobakterií může negativně ovlivnit vazebná místa patogenních mikroorganismů. Schopnost shlukovat se u probiotických bakterií, resp. vytvářet tzv. autoagregáty, může do určité míry negativně ovlivnit perzistenci patogenů v intestinálním traktu mimo jiné tím, že autoagregáty mohou obalit či vstřebat buňky patogenů (Zavaglia *et al.*, 2002) a zabránit tak vazbě na buňky střevní výstelky.

Bifidobakterie inhibují či přímo usmrcují buňky patogenních či potenciálně patogenních bakterií produkcí látek s antimikrobiálním účinkem, např. bakteriocinů či látek lipofilního charakteru. Při negativním ovlivnění patogenů sehrávají roli také imunostimulační účinky bifidobakterií (Moroni *et al.*, 2006).

2.3.2. Inhibice původců virových střevních onemocnění

U různých druhů bifidobakterií především lidského původu byl prokázán antivirový účinek. Přesný mechanismus tohoto působení není dosud znám, souvisí však pravděpodobně s modulací vrozené imunitní odpovědi na virové partikule (Vlasova *et al.*, 2013). Bylo prokázáno při testování některých kmenů bifidobakterií, že tyto bakterie jsou schopny podněcovat tvorbu protilátek IgA (imunoglobulin A), které působí proti střevním rotavirům (De Simone *et al.*, 1992). Antivirová aktivita bifidobakterií byla prokázána především na základě *in vitro* testů vůči střevním rotavirům (Vlasova *et al.*, 2013), viru hepatitidy B (Lee *et al.*, 2013) či lidskému papillomaviru (Cha *et al.*, 2012).

2.3.3. Imunostimulační účinky

Mikrobiota intestinálního traktu je při normálním zdravotním stavu a kondici člověka velmi účinným stimulatorem imunity. Trávicí trakt se v krátké době po porodu kolonizuje především bifidobakteriemi a po skončení výživy kojením také jinou fyziologickou mikrobiotou, která antigenně stimuluje rozvoj nespecifických protilátek. Při léčení imunodeficientních pacientů se využívá bakterií mléčného kvašení, které aktivují činnost buněčných makrofágů (Jiang *et al.*, 2001).

Bifidobakterie mohou redukovat zánětlivé procesy v intestinálním traktu nastolením rovnováhy mezi tzv. Th1 (helper) a Th2 lymfocyty. Právě Th1 lymfocyty redukují aktivitu a rozvoj prozánětlivých Th2 lymfocytů. Stimulace vývoje a rozvoje Th1 lymfocytů je pravděpodobně aktivována prostřednictvím specifických polysacharidů produkovaných bifidobakteriemi (Karlsson *et al.*, 2002). Bifidobakterie také mohou zabránit aktivaci prozánětlivého jaderného faktoru κ B a interleukinu 8, zprostředkovaně či přímo pomocí lipopolysacharidů buněčné stěny (Riedel *et al.*, 2006). Mohou navíc také pozitivně ovlivňovat složky vrozené (nespecifické) imunity, např. bylo částečně prokázáno, že mohou stimulovat aktivitu makrofágů a přirozených zabíječských buněk (NK-natural killer cells) (Chiang *et al.*, 2000).

2.3.4. Antikancerogenní efekt

Kolorektální karcinom je v ČR jednou z nejčastějších rakovin. To je do značné míry ovlivněno přemírou masité stravy. Člověk byl původně býložravec a od jisté doby je člověk všežravcem. Lidský trávicí systém není tudíž k trávení masité stravy ještě zcela přizpůsoben. Při trávení bílkovin masité potravy, metabolickou činností mikroorganismů, vznikají hnilobné látky, které slouží jako promotory vzniku zhoubných nádorů.

Mezi bakterie, jejichž odpadním produktem metabolismu mohou být karcinogenní či prokarcinogenní látky, náleží především zástupci proteobakterií, rodů *Fusobacterium* či *Clostridium*. Doprovodným jevem těchto procesů je střevní dysmikrobie, která bývá ovšem zapříčiněna i častým nadužíváním antibiotik. Narušení skladby fyziologické mikrobioty může vést k prozánětlivým stavům, které často vedou k mutacím v DNA a v důsledku toho také ke karcinogenezi (Yuan *et al.*, 2004; Borges-Canha *et al.*, 2015).

Vlastní antikancerogenní účinky fyziologické mikrobioty, tudíž také bifidobakterií a jiných známých probiotických bakterií, nejsou dosud zcela objasněny a nelze je označit za prokázané. Fyziologická intestinální mikrobiota spíše ovlivňuje rozvoj kolorektálního karcinomu nepřímo, např. inhibicí hnilobných bakterií, stimulací imunitního systému, rozkladem potenciálních (pro)kancerogenních látek, změnou fyzikálně-chemických podmínek v intestinálním traktu, ovlivněním kinetiky intestinálních buněk či produkcí antikancerogenních sloučenin (Sanders, 1999; Rafter, 2002; Chong, 2014).

2.3.5. Ovlivnění metabolických a fyziologických pochodů

Laktózová intolerance je částečná nebo úplná neschopnost trávicího traktu zpracovávat laktózu. Je to způsobeno neschopností makroorganismu syntetizovat enzym β -galaktosidázu (laktázu) štěpící disacharid laktózu na monosacharidy glukózu a galaktózu. Lidé, kteří tento enzym nejsou schopni si sami syntetizovat v těle, mají zažívací potíže v podobě nadýmání, střevní kolik či průjmů. Obsah mléčného cukru v mléčných kvašených výrobcích obsahujících bakterie mléčného kvašení (laktobacily, laktokoky či streptokoky) a bifidobakterie se snižuje až o 50%, neboť tyto bakterie běžně produkují β -galaktosidázu. Lidé trpící laktózovou intolerancí proto mohou trávit fermentované mléčné výrobky mnohem snadněji než mléko (Marteau *et al.*, 1990).

Třebaže je cholesterol nezbytným stavebním kamenem buněk a tudíž také nezbytnou součástí potravy člověka, zvýšení sérového cholesterolu a zhoršení lipidového profilu vede ke zvýšení rizika hypertenze, poškození koronárních tepen a v důsledku k rozvoji aterosklerózy či vážnému srdečnímu selhání. Bifidobakterie mohou přispívat k redukci cholesterolu produkcí

hydroxymethylglutarátu, který zabraňuje aktivitě enzymu hydroxymethylglutaryl-koenzym A reduktázy, jenž se účastní syntézy cholesterolu (Delzenne *et al.*, 1999). Navíc u některých kmenů bifidobakterií byla zjištěna *in vitro* asimilace cholesterolu (Tahri *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2002).

U bifidobakterií byla také studována schopnost syntetizovat vitamíny, především však skupiny B, které sehrávají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech. Bylo zjištěno, že většina lidských druhů bifidobakterií je schopna syntetizovat thiamin (vitamín B1), niacin, pyridoxin (B6), kobalamin (B12) či kyselinu listovou. Někteří autoři prokázali po aplikaci bifidobakterií zvýšenou koncentraci kyseliny listové v trávicím traktu. Kyselina listová je nezbytná při proliferaci buněk typu leukocytů, erytrocytů a enterocytů (Pompei *et al.*, 2007; D'Aimmo *et al.*, 2014).

Bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie vytváří ve střevě prostředí s nižší hodnotou pH, která je vhodnější pro absorpci minerálních látek (např. zinku, vápníku, hořčíku) (Sanz-Penella *et al.*, 2012). U mnohých lidských druhů bifidobakterií byla v nedávné době také prokázána schopnost zpřístupnit železo makroorganismu prostřednictvím syntézy sideroforů (Vazquez-Gutierrez *et al.*, 2015). Konečnými produkty specifického metabolismu sacharidů bifidobakterií, jak již bylo zmíněno výše, jsou kyselina octová a mléčná, které slouží jako zdroj energie pro enterocyty a navíc redukují kancerogenní proces stimulací apoptózy, podporují glukózovou toleranci (Yoo *et al.*, 2016).

Bifidobakterie přítomné společně s jinými bakteriemi mléčného kvašení v mléčných kvašených výrobcích odbourávají kasein (mléčnou bílkovinu) na peptidy a aminokyseliny, které jsou vstřebávány enterocyty střevní sliznice do krve a pomocí lymfatického systému jsou dopravovány do míst, kde slouží poté jako stavební jednotky pro bílkoviny organismu.

2.3.6. Jiné pozitivní účinky bifidobakterií

V ČR je obezitou postižených 30% obyvatel. S nárůstem dostupnosti potravin a tedy i energie se stává čím dál tím více obávanějším problémem od poslední dekády minulého století. Nejčastěji uváděnou příčinou, která vede k rozvoji obezity, je nerovnováha mezi příjmem a výdejem energie. Střevní mikroflóra ovlivňuje metabolismus celého těla tím, že ovlivňuje energetickou bilanci a sjednocuje centrální a periferní regulační signály příjmu potravy. Probiotika včetně bifidobakterií mohou mít vliv na chuť k jídlu a tím i na celkový příjem potravy a tělesnou hmotnost (Kobyliak *et al.*, 2016).

Především na animálních modelech bylo zjištěno, že určité kmeny bifidobakterií mohou hrát určitou roli při redukci obezity. Mezi důležité vlastnosti bifidobakterií, které toto mohou ovlivnit, náleží antiaterogenní a protizánětlivá aktivita zprostředkovaná regulací exprese lipogenních a lipolytických genů v játrech, redukcí jaterní steatózy, pozitivním ovlivněním profilu krevních lipidů a glukóзовé tolerance, redukcí endotoxemií a zánětlivých procesů v intestinálním traktu (Woting *et al.*, 2015; Nova *et al.*, 2016).

Dalším potenciálním probiotickým efektem bifidobakterií může být podle prvních výsledků zlepšení kognitivních funkcí a ovlivnění depresivních stavů. Tento efekt byl pozorován především u konkrétních kmenů bifidobakterií (Savignac *et al.*, 2015).

V roce 2015 byla prováděna studie, kdy směsné probiotikum obsahující *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius* a *Lactococcus lactis* bylo použito pro zjištění možného pozitivního ovlivnění depresivních stavů. Výsledkem tohoto experimentu na animálním modelu bylo tvrzení, že příjem probiotik může mít vliv na snížení projevů depresivních stavů (Steenbergen *et al.*, 2015). Pozitivní efekt probiotických bakterií je v souvislosti s tímto spojován především s ovlivněním lokálního a systematického antioxidačního stavu makroorganismu, bezprostřední bakteriální produkcí neurochemických látek, nepřímým vlivem na produkci neurotransmiterů a neuropeptidů, přímou aktivací neurálních drah mezi intestinálním traktem a mozkem, snížením produkce prozánětlivých cytokinů, modulací neurotrofních látek (především mozkového neurotrofního faktoru) a v neposlední řadě s produkcí látek majících přímý či nepřímý vliv na činnost neuronů (Bested *et al.*, 2013).

2.4. Stručná charakteristika vybraných (pod)druhů bifidobakterií

2.4.1. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* je druhem probiotické bakterie izolované z trávicí soustavy savce (Masco *et al.*, 2004). Tato bakterie je často přítomna ve fermentovaných mléčných produktech obsahujících probiotickou kulturu (jogurty, fermentované nápoje apod.) a je aerotolerantní, více odolná vůči působení peroxidu vodíku a kyselin. Z tohoto důvodu se jedná v podstatě o jediný taxon bifidobakterií použitelný v těchto formách (syn)probiotik. Lidské, hostitelsky specifické druhy bifidobakterií jsou mnohem méně odolné vůči podmínkám výroby, jsou méně aerotolerantní a často nemají schopnost fermentovat mléko, a nemohou být tudíž využity. Podle prováděných studií roste rychleji na médiu s FOS nebo s inulinem než na médiu bez těchto bifidogenních látek (Bielecka *et al.*, 2002).

Nevýhodou této bakterie je, že není příliš přizpůsobena na nepříznivé podmínky během skladování daných produktů. Je to způsobeno převážně působením ostatních bakteriálních kultur (Akalm *et al.*, 2004).

Tato probiotická bakterie má prokazatelně pozitivní efekt na gastrointestinální systém člověka. Po měsíci suplementace tímto probiotickým kmenem došlo ke klinicky významnému přínosu ve frekvenci defekace a vyléčení bolestí břicha (Eskesen *et al.*, 2015).

U tohoto konkrétního taxonu byly prováděny mnohé další studie s cílem odhalit jejich možné pozitivní, probiotické účinky. Bylo zjištěno, že tato bakterie může do určité míry zabránit salmonelových infekcím, zmírnit bakteriální translokaci a prozánětlivé stavy v intestinálním traktu, pozitivně ovlivňovat počet ostatních bifidobakterií v trávicím traktu a modulovat imunitní systém (Childs *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2014; Zacarías *et al.*, 2014).

2.4.2. *Bifidobacterium bifidum*

Bifidobacterium bifidum se nachází především v tlustém střevě, mateřském mléku a vagíně člověka (Makino *et al.*, 2013). Psychická zátěž je úzce propojena s diskomfortem v gastrointestinálním traktu. *Bifidobacterium bifidum* prokazatelně snižuje příznaky akutního průjmu a tím i vzniklý stres člověka (Culpepper *et al.*, 2016).

Výzkumy prokázaly, že tato probiotická bakterie produkuje přirozené antibiotické látky, které pomáhají proti onemocnění způsobené *E. coli* a kvasinkami rodu *Candida* (De Simone *et al.*, 1992). Studie zabývající se alergickými reakcemi došly k závěru, že druh *Bifidobacterium bifidum* by mohl zmírňovat alergické projevy. Výzkum byl prováděn na myších, kterým se orálně podávala probiotika. Tyto myši pak vykazovali nižší produkci imunoglobulinu E (Ohno *et al.*, 2005).

2.4.3. *Bifidobacterium bohemicum* a *Bifidobacterium bombi*

Relativně nedávno byla odhalena nová ekologická nika bifidobakterií. V trávicím traktu různých druhů čmeláků pocházejících z různých lokalit v rámci České republiky a Belgie byly objeveny 4 hostitelsky specifické druhy, a to *Bifidobacterium actinocoloniiforme*, *B. bohemicum*, *B. bombi* a *B. commune* (Killer *et al.*, 2009, 2011; Praet *et al.*, 2015). Zajímavé z pohledu fyziologických vlastností je to, že mohou růst za nižších teplot, což může být do značné míry způsobeno jejich adaptací na trávicí trakt čmeláků, kdy tyto bakterie musí perzistovat v trávicím traktu čmeláčích matek přes zimní období. Další zajímavostí je z hlediska biotechnologií jejich potenciální využití jakožto probiotik

v laboratorních chovech čmeláků. Byla připravena a odzkoušena prvotní probiotická směs pro tyto ekologicky velmi významné opylovače (Votavová *et* Killer, 2014).

2.4.4. *Bifidobacterium boum*

Druh *Bifidobacterium boum* byl primárně izolován z bachoru skotu, nicméně byl rovněž izolován z fekálních vzorků domestikovaných a divokých prasat či koní (Scardovi *et al.*, 1979; Killer *et al.*, 2013b; Tanabe *et al.*, 2014). V souvislosti s možným probiotickým účinkem tohoto taxonu existují studie naznačující protizánětlivou schopnost a schopnost ochrany intestinální bariéry u koní (Tanabe *et al.*, 2014). Jiná studie prokázala vliv na snížení exprese genu pro Shiga-toxin produkovaný enterohemorragickým sérotypem *Escherichia coli* (Carey *et al.*, 2008).

2.4.5. *Bifidobacterium breve*

Bifidobacterium breve je součástí především střevní mikrobioty člověka. Tento taxon se však vyskytuje také v reprodukčním traktu žen a odpadních vodách (Reuter, 1963). Intestinální trakt kojenců je osídlen bakteriemi druhu *B. breve* krátce po jeho narození, protože jsou přenášeny z matky na dítě během porodu a v průběhu kojení. *B. breve* reprezentuje dominantní složku intestinální mikrobioty plně kojeneckých novorozenců. Tento druh tudíž sehrává důležitou roli v metabolismu kojence, mimo jiné při fermentačních procesech oligosacharidů mateřského mléka (Björkstén *et al.*, 2001).

B. breve napomáhá udržet fyziologickou funkci tlustého střeva, snižuje produkci plynu ve střevech, četnost průjmů a zmírňuje projevy zácpy. Mezi další probiotické účinky *B. breve* patří stimulace imunitního systému, ochrana před nemocemi způsobenými *E. coli* a jinými patogeny (Mendonca *et al.*, 2012; Delcaru *et al.*, 2016).

2.4.6. *Bifidobacterium longum subsp. infantis*

Taxon *Bifidobacterium longum subsp. infantis* se nachází ve stolici kojenců a dospělých lidí. Podobně jako druh *B. breve* často reprezentuje dominantní složku intestinální mikrobioty plně kojeneckých dětí (Sela *et al.*, 2008). Fermentace melezitózy je příznačná pro tento druh (Scardovi, 1986). Tento taxon náleží mezi nejvýznamnější a nejčastěji používaná probiotika v humánní medicíně.

Podobně jako u jiných lidských druhů bifidobakterií byly u *Bifidobacterium longum subsp. infantis* zjištěny mnohé pozitivní účinky na zdraví člověka. Tato bakterie je schopna snížit

expresi prozánětlivých genů v intestinálním traktu (Wickramasinghe *et al.*, 2015), je aktivní při inhibici intestinálních rotavirových infekcí (Chenoll *et al.*, 2015). Probiotické preparáty s obsahem této bakterie pomáhají snižovat riziko vzniku nekrotizující enterokolity u předčasně narozených dětí (Underwood *et al.*, 2015).

2.4.7. *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*

Bifidobacterium longum subsp. *longum* je taxonomicky blízký příbuzný předchozímu taxonu a nachází se ve shodné ekologické nise. Tato bakterie bývá ovšem nejčastěji izolována ze stolice dospělých lidí (Matsuki *et al.*, 1999). Vhodnými bifidogenními faktory pro tento poddruh jsou fruktooligosacharidy a inulin (Bielecka *et al.*, 2002).

Poddruh *B. longum* subsp. *longum* je přirozeně nepatogenní a je často přidáván do potravin a doplňků stravy pro své více méně prokázané probiotické účinky na zdraví člověka. Tento poddruh se vyznačuje snadnou kolonizací intestinálního traktu a vysokou životaschopností. V tlustém střevě vykazuje antimutagenní a antikarcinogenní účinky. Může do určité míry potlačovat gastrointestinální onemocnění vyvolané užíváním ATB a byla prokázána také stimulace imunitního systému (Lee *et al.*, 2009). Nedávná studie poukazuje na produkci látek antioxidačního charakteru (Gagnon *et al.*, 2015).

2.4.8. *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum*

B. pseudolongum subsp. *globosum* se nachází ve stolici selat, sajících telat, krys, králíků, jehňat, odpadní vodě či bachoru přežvýkavců (Yaeshima *et al.*, 1992). Jedná se tedy o hostitelsky nespecifický animální taxon. Soudobý výzkum se zaměřuje především na probiotické účinky lidských druhů bifidobakterií, také proto nebyly dosud u tohoto poddruhu možné pozitivní vlivy na zdraví zvířat prozkoumány. Nicméně existují studie o tom, že tato bakterie může syntetizovat kyselinu listovou a zpřístupnit potravinový zdroj železa makroorganismu (D'Aimmo *et al.*, 2014; Vazquez-Gutierrez *et al.*, 2015).

2.4.9. *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum*

Tento taxon byl poprvé izolován z výkalů domestikovaných prasat (Dong *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003). Ovšem jeho přítomnost byla zjištěna také v intestinálním traktu kojenců (Kheadr *et al.*, 2007; Moroni *et al.*, 2006). Do diskutovaných probiotických účinků této bakterie lze zahrnout inhibici potravinového patogena *Listeria monocytogenes* či patogenní bakterie *Clostridium perfringens* (Moroni *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007).

2.4.10. *Bifidobacterium thermophilum*

Bifidobacterium thermophilum je přítomen především v trávicím traktu savců, byl konkrétně izolován z výkalů prasat, kuřat, sajících telat a bachoru přežvýkavců (Mitsuoka, 1969; Simpson *et al.*, 2003). Tento druh se vyznačuje velkou odolností vůči vysokým teplotám (růst při teplotě 47 °C) a potvrdilo se, že je velmi tolerantní k přítomnosti kyslíku v prostředí (Gavini *et Beerens*, 1999). Ve výzkumu byl zkoumán synergický efekt *B. thermophilum* a prebiotik na inhibici *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Bylo zjištěno, že tato bakterie ve spojení s frukto- a galaktooligosacharidy inhibuje tohoto patogena (Tanner *et al.*, 2014). V případě této bakterie bylo také víceméně prokázáno, že zprostředkovaně inhibuje intestinální patogeny znepřístupněním železa a zmírňuje aktivitu volných radikálů generovaných z peroxidace lipidů (Kot *et Bezkorovainy*, 1999).

2.4.11. *Bombiscardovia coagulans*

Bombiscardovia coagulans je hostitelsky specifickým taxonem, který je přítomen pouze v trávicím traktu různých druhů čmeláků. Je řazen spolu s bifidobakteriemi do čeledi *Bifidobacteriaceae*. Prostřednictvím výsledků molekulárně-genetických, fyziologických, biochemických a jiných fenotypových metod bylo prokázáno, že náleží do samostatného rodu v rámci výše zmiňované čeledi. Specifickou fyziologickou charakteristikou tohoto rodu je schopnost růstu i při teplotě 5 °C (Killer *et al.*, 2010), což odkazuje podobně jako v případě hostitelsky specifických druhů bifidobakterií izolovaných z trávicího traktu čmeláků na symbiotickou a biologickou adaptaci. Další podstatnou charakteristikou této bakterie je enormní autoagregační schopnost. Také tento taxon je v současné době studován pro možné probiotické využití v laboratorních chovech čmeláků (Votavová *et Killer*, 2014).

2.5. Metody konzervace bakterií

Konzervace bakterií, resp. zachování životaschopného stavu bakteriálních buněk po delší období, jako biologického zdroje má velký význam v různých oblastech biotechnologického výzkumu, zachování genofondu všech dosud popsaných bakteriálních taxonů, v oblasti medicíny či výzkumně-vzdělávacích programů. Z hlediska potravinářského či farmaceutického průmyslu je naprosto nezbytné uchovávat bakteriální kultury v životaschopném stavu po určité časové období a zároveň zachovávat jejich důležité metabolické vlastnosti. Bakteriální kultury jsou pro tyto účely konzervovány prostřednictvím

různých metod v příslušných lokálních či mezinárodních sbírkách mikroorganismů. Typickým příkladem, kde je nutno konzervovat bakteriální kmeny s žádoucími vlastnosti, je potravinářský průmysl, zejména však mlékárenský průmysl (mlékárenské kultury zahrnující např. jogurtové, smetanové, keřirové, acidofilní či sýrařské kultury).

Ovšem obecně je zahrnuta pod úsilím konzervovat bakteriální buňky globální snaha o identifikaci, objasnění taxonomických nesrovnalostí všech mikroorganismů a generování dat ohledně jejich přirozeného prostředí, společenstvech, populacích a ekosystémech.

Metoda konzervace mikroorganismů v živém stavu je náročná na zajištění vhodných podmínek při procesu konzervace. Jednou z nejčastěji využívaných metod konzervace bakterií je zmrazování za použití různých kryoprotektivních látek, resp. látek, které chrání bakteriální buňky především proti negativním účinkům vznikajícího pevného skupenství vody. Do skupiny metod na bázi kryokonzervace náleží také konzervace za použití tekutého dusíku při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tato metoda se zdá být nejvýhodnější, protože kapalný dusík působí jako kryogenní kapalina, která dokáže velmi rychle zmrazit buňky, aniž by došlo k poškození buněčné stěny vznikajícími krystaly vody. Zároveň nevýhodou této metody je finanční náročnost a nesnadná manipulace s tímto materiálem. Další vhodnou formou konzervace bakteriálních buněk je sprejové sušení, z pohledu jednoduchosti metody s velmi vysokým počtem zachování životaschopných buněk (Safronova *et al.*, 1996). Další velmi často používanou metodou konzervace bakterií je tzv. lyofilizace, jejíž anglický název freeze (mražení)-drying (sušení) napovídá, že půjde o metodu využívající kontinuálně proces mražení a sušení.

Pro zvolení co nejúčinnější metody konzervace bakterií je důležité se nejprve zaměřit na jejich rozdělení podle typu metabolismu, přičemž rozlišujeme tzv. aerobní (s respiratorním metabolismem) a anaerobní bakterie (převážně s fermentativním metabolismem). Zcela logicky je příprava, resp. kultivace anaerobních bakterií před konzervačním procesem, náročnější oproti bakteriím s respiratorním metabolismem. Příkladnými bakteriemi s fermentativním metabolismem jsou hlavní zástupci probiotických bakterií patřících taxonomicky do rodů *Lactobacillus* (a jiných rodů bakterií mléčného kvašení) a *Bifidobacterium*. Nejčastěji jsou konzervovány zmrazovacími technikami, sušením nebo lyofilizací, o kterých blíže pojednávají následující kapitoly.

2.5.1. Zmrazení

Zmrazení, neboli kryokonzervace, je metoda založená na bázi snižující se teploty, při které se zpomalí a zablokují životní funkce, při níž ovšem zároveň nedochází k usmrcení buněk. Jedná se v podstatě o historicky nejstarší způsob biologické konzervace. Tento proces, podobně jako jiné konzervační procesy bakteriálních buněk, reverzibilně zabrání projevům životaschopného stavu. Tato metoda zajišťuje dlouhověkost buněk po určité časové období, přičemž zůstávají zachovány genotypové a fenotypové charakteristiky. Obecně lze konstatovat, že čímž nižší teploty se při kryoprezervaci použijí, tím déle zůstávají bakteriální buňky životaschopné (Simione, 1992).

Metody či způsoby kryokonzervace lze rozdělit do několika kategorií podle rozmezí nízkých teplot a mrazících přístrojů. Laboratorní mrazicí boxy udržují teplotu v rozmezí od $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a náleží mezi nejběžněji používané tzv. užitkové mrazicí boxy při kryokonzervaci bakteriálních kultur. Za těchto podmínek a samozřejmě za použití příslušných kryoprotektiv je zachována životaschopnost bakteriálních kultur v období jednoho roku. V případě ultramrazících boxů dosahuje teplota zmrazení hodnot od $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ a životaschopnost bakteriálních buněk za těchto podmínek bývá i několik let (Feltham *et al.*, 1978). Je to způsobeno především tím, že dochází k podstatnému potlačení veškerých chemických reakcí, ať již biologického či fyzikálního původu. Kryogenní mrazicí zařízení využívají ještě nižších teplot pod $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$. K zajištění takto nízkých teplot je často zapotřebí využití tekutého dusíku či specializovaných mechanických systémů. Z těchto důvodů nejsou používána tak často, třebaže životaschopnost bakteriálních buněk je uchovávána za těchto podmínek i několik desítek let.

Při zmrazovací fázi, reprezentující rovněž první krok v procesu lyofilizace, hrají důležitou roli tzv. kryoprotektivní látky. O těchto látkách bude pojednáno v kapitole zahrnující informace o lyofilizaci.

2.5.2. Sušení

Sušení je chemicko-fyzikální děj, kdy účinkem tepla dochází ke snižování obsahu vody nebo jiné kapaliny v daném materiálu a jejímu následnému odpaření, aniž by došlo ke změně chemického složení. Při sušení dochází ke sdílení tepla a hmoty. Sušení je nutné chápat, z hlediska sdílené hmoty, jako difúzní proces vyvolaný rozdílem parciálních tlaků. Díky této metodě dochází v daném materiálu ke změně vlhkosti, která může mít za následek změnu fyzikálních charakteristik, parametrů chemických reakcí a celkovou stabilitu.

Sprejové sušení jako konzervační metoda je využitelná pro celou řadu bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií. Ovšem výsledek tohoto konzervačního procesu je ovlivněn celou řadou faktorů. Nesmí docházet k letálnímu termálnímu účinku při teplotách nad 50 °C, kdy dochází k ireverzibilnímu poškození bílkovin (Lievens *et al.*, 1992). Sprejovým sušením je zvyšována koncentrace iontů média použitého pro kultivaci či resuspendaci bakteriálních buněk, čímž dochází u buněk k tzv. osmotickému stresu. Bakteriální buňky se adaptují na tyto podmínky akumulací příslušných látek přítomných v roztoku (Csonka, 1989). Touto adaptací bakteriální buňky udržují osmotickou rovnováhu s vnějším prostředím. Mezi látky zachovávající osmotickou rovnováhu uvnitř buněk náleží např. některé aminokyseliny, polyolní sloučeniny či tetrahydropyrimidiny (Yancey *et al.*, 1982; Goderska *et Czarnecki*, 2008).

Mezi další ovlivňující faktory, které byly studovány při konzervaci bifidobakterií sušením, náleží např. vstupní teplota sušení, tlak vzduchu a vstupní koncentrace buněk. Bylo prokázáno, že vyšší koncentrace buněk v roztoku a osmoprotektivní látky v podobně maltodextrinu zvyšují počet přeživších buněk bez ovlivnění jejich metabolických a fyziologických vlastností (Potts, 1994; Shokri *et al.*, 2015). Vhodnou stabilizační teplotou zvyšující vitalitu bifidobakterií po procesu sušení se zdá být 4 °C (Simpson *et al.*, 2005).

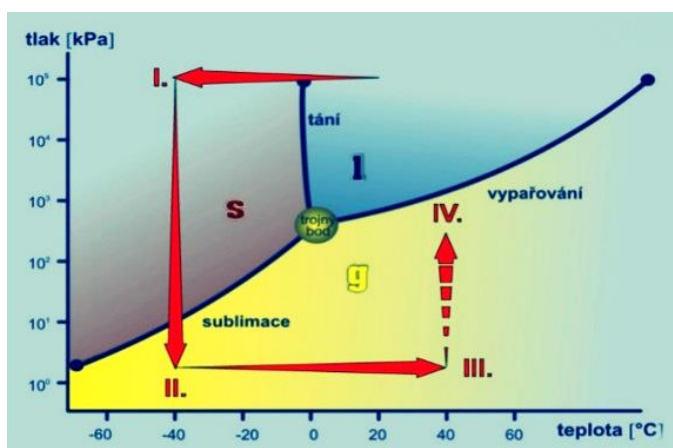
2.5.3. Lyofilizace

Lyofilizace neboli vakuové vymrazování (anglicky freeze-drying) či kryodesikace je děj, při kterém je volná voda ze sušeného materiálu odstraňována sublimací, kterému předcházelo zmrazení materiálu. Tento způsob konzervace je velmi energeticky i časově náročný, a proto se používá k vysušování takových materiálů, které není možno bez rizika destrukce vysušit úspěšně jiným způsobem a vyžadují co nejšetrnější vysoušení. Příkladem jsou termolabilní látky citlivé na přítomnost vlhkosti (např. biologický materiál – mikroorganismy, krevní plazma), drahá léčiva (antibiotika, proteiny, vakcíny). Dnes se již běžně využívá lyofilizace v mlékárenském či farmaceutickém průmyslu, protože tato metoda je nejvhodnější spolu se sušením pro uchovávání bifidobakterií či jiných grampozitivních bakterií. Mezi výhody upřednostňující tento konzervační proces oproti jiným, především však zmrazovacím technikám, patří eliminace kontaminace kultur, snadná manipulace a zajištění vhodných podmínek uchovávání lyofilizovaných kultur. Ovšem nevýhodou lyofilizace je náročnost na přípravu kultur a technologický postup. Bakteriální buňky se po lyofilizaci nachází v tzv. latentním stavu, kdy životaschopnost a biochemické vlastnosti mikroorganismů mohou v závislosti na podmínkách skladování přetrvávat v řádu několika měsíců až let.

Přístroj používaný k lyofilizaci se nazývá lyofilizátor či vykuově-vymrazovací přístroj. Skládá se z několika základních částí, mezi které patří kondenzor, ve kterém jsou nejnižší teploty, a zachycuje se zde vlhkost ve formě ledu. V produktové komoře dochází k vysoušení materiálu v rozsahu teplot přibližně -40°C až $+50^{\circ}\text{C}$. A poslední částí je vývěva připojená ke kondenzátoru, která zajišťuje nezbytné vakuum pro celý proces.

Lyofilizační proces se skládá ze dvou částí, které mají čtyři fáze. Jedná se o zmrazování s následným primárním (sublimace ledu) a sekundárním (desorpce absorbované vody) vakuovým sušením za šetrných podmínek vyrovnávání tlaků. Průběh lyofilizace je znázorněn na **Obrázku č. 2**.

Obrázek č. 2. Zjednodušené znázornění průběhu lyofilizačního procesu



Materiál se musí zmrazit na tak nízkou teplotu, aby se všechna voda převedla v led a vznikl tak pevný materiál. U zmrazování je důležité dbát na způsob provedení, protože na něm závisí výsledný efekt lyofilizace – biologická aktivita sušeného materiálu a vzhled. Při tomto kroku je důležité, v co nejkratším čase, překlenout hranici nebezpečných teplot, při kterých většinou dochází k mikroskopickému poškození materiálu. Ke zmrazování dochází buď přímo v sušící komoře, nebo lze zmrazovat materiál před vložením do sušící komory. V prvním případě způsobí zmrazení nucený odpar části vody, k němuž se využije vlastního tepla daného materiálu.

V další fázi je přiváděno k hluboce zmraženému materiálu lokální teplo z vyhřívané desky. Musí se však přivádět pouze takové množství tepla, aby neustále byly zachovávány podmínky pro existenci vody jen v pevném a plynném skupenství a aby voda z ledu sublimovala.

Těchto podmínek je dosaženo sušící komorou s prostorem, kde jsou umístěny kondenzátory, které mají nižší teplotu než jakou má sušící materiál a na kterých se sráží vodní pára odváděná z daného materiálu. Po této fázi se vakuovým sušením, za nízkého tlaku a postupně se zvyšující teploty nad 0°C, odstraní zbytková vlhkost. Sekundární dosoušení zajišťuje odstranění adsorbované vody až na finální hodnotu vlhkosti v rozmezí 1-2%. Pokud je obal, kde se lyofilizát nachází, hermeticky uzavřen, nemůže dojít k adsorpci vzdušné vlhkosti a lyofilizát se tak stává stabilním až na několik let i za podmínek laboratorních teplot. Materiál, který prochází oběma procesy, by měl být v tenké vrstvě, aby vše probíhalo rovnoměrně a přiměřeně dlouhou dobu. Po dosoušení se v sušící komoře zruší vakuum a tím je celý proces lyofilizace ukončen (Liapis *et* Bruttini, 1994; Kyzlink, 1988).

Mezi často diskutované faktory, které ovlivňují přežitelnost lyofilizovaných bakteriálních buněk, náleží koncentrace buněk v počátečním inokulu, rozdíly v chemické skladbě buněčné stěny a s tím související variabilita mezi lyofilizovanými kmeny bakterií, složení růstového média, použití kryo- či lyoprotektivních látek, vliv pH prostředí a osmotického tlaku, podmínky kultivace, vlastního lyofilizačního procesu a uskladnění lyofilizátů (Hershenson, 2000).

2.5.4. Faktory ovlivňující životaschopnost buněk po lyofilizaci

2.5.4.1. Koncentrace buněk v počátečním inokulu

Při nízké koncentraci buněk v počátečním inokulu dochází k nízkému počtu přeživších buněk. Proto pro vyšší přežitelnost bakteriálních buněk, použitých v lyofilizaci, je potřebná vyšší koncentrace buněk v počátečním inokulu (Kilara *et al.*, 1976; Jensen *et al.*, 2009). Ale i příliš vysoká koncentrace buněk v lyofilizovaném preparátu není žádoucí, protože by došlo ke škodlivému efektu nevyrovnaného osmotického tlaku (Bozoglu *et al.*, 1987).

Je důležité zajistit i dostatečný příjem živin pro biomasu. Čím je více živých bakteriálních buněk v počátečním inokulu, tím jsou náročnější na živiny. Při nedostatečném množství živin v růstovém mediu dochází k nižší koncentraci buněk po kultivaci, která není vhodná pro výrobu lyofilizátu (Stoodley *et al.*, 1998).

2.5.4.2. Rozdíly mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi

Gram-negativní bakterie mají typ buněčné stěny, která se skládá z vnější membránové vrstvy a vnitřní tenké pevné peptidoglykanové vrstvy (cca 20% hmotnostních). Vnější membrána obsahuje lipopolysacharidy, proteiny a lipoproteiny. Do této skupiny náleží celá řada patogenních bakterií. Oproti tomu buněčná stěna grampozitivních bakterií je tvořena

především několika vrstvami peptidoglykanu (až 90% hmotnostních), která dává buňce pevný a konstantní tvar (Radhey, 1998). Grampozitivní bakterie jsou díky tomu, a díky nepřítomnosti lipopolysacharidů, vysoce odolné vůči zmražení, sušení a tudíž také vůči lyofilizačnímu procesu oproti gramnegativním bakteriím (Miyamoto-Shinohara *et al.* 2000, 2008).

2.5.4.3. Použití kryoprotektivních látek

Kryoprotektanty chrání buňku před účinky vznikajících krystalů při zmrazení. Tyto ochranné látky omezují tvorbu ledových krystalů uvnitř či vně buněk a tím chrání buňky před porušením integrity buněčné stěny. Použitím kryokonzervačního činidla se zkvalitňuje konzervace mikroorganismů zmrazením. Prostřednictvím těchto látek dochází ke snížení bodu tuhnutí vody či roztoků a zvětšení podílu nezmrzlé kapaliny i při teplotách pod bodem tuhnutí. Tyto látky zabraňují tudíž také nadměrné dehydrataci buněk. V zásadě lze rozlišit tři skupiny kryoprotektivních látek. Intracelulární pronikají zkrz buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu až do cytosolu. Hlavními reprezentanty této skupiny kryoprotektiv jsou glycerol a dimetylsulfoxid. Druhou kategorií kryoprotektiv jsou ta, která pronikají pouze zkrz buněčnou stěnu (např. některé oligosacharidy, nízkomolekulární látky či aminokyseliny). Do třetí kategorie náleží ty látky, které působí vně buněk, např. vysokomolekulární proteiny a polysacharidy (Tao *et Li*, 1986). Intracelulárně působící látky jsou schopné vázat vodu, čímž zabraňují tvorbě intracelulárních krystalů vody (Meryman, 1971). Zástupci druhé skupiny kryoprotektiv, které jsou koncentrovány mezi cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou, zabraňují především mechanickému poškození. Kryoprotektiva třetí kategorie adsorbují na buněčném povrchu a vytvářejí tak jakýsi ochranný, viskózní povlak. Navíc pomocí exoosmózy váží intracelulární vodu, která se následkem toho nemůže přeměnit na krystaly vody (Hubálek, 2003, Pushkar *et al.*, 1974).

Hlavní nevýhodou některých používaných kryoprotektiv je jejich toxicita, která způsobí poškození buněk při přidání kryoprotektiva do směsi ještě před jejím zmražením (Isachenko *et al.*, 2004).

Nejčastěji používanými kryoprotektivními sloučeninami či látkami v bakteriologii a mikrobiologii jsou dimetylsulfoxid, glycerol, ethylen(propylen)glykol, krevní sérum, bovinní sérový albumin, rekonstituované sušené kravské mléko, pepton, kvasničný extrakt, sacharóza, glukóza, polyvinylpyrrolidon, sorbitol a sladový extrakt. Nutno dodat, že kryoprotektivní účinek různých látek či sloučenin z pohledu chemických a fyzikálních parametrů nebyl dosud exaktně vysvětlen (Hubálek, 2003). Někteří badatelé, místo označení kryoprotektiva při jejich využití v lyofilizačním procesu, používají označení lyoprotektiva (Li *et Tian*, 2007).

Mezi takové lyoprotektivní látky, které byly víceméně úspěšně testovány na různých kmenech bifidobakterií, patří deriváty celulózy (Pop *et al.*, 2015), inulin (Amakiri *et al.*, 2015), trehalóza (Celik *et O'Sullivan*, 2013), alginát sodný (lineární polymer extrahovaný z mořských řas skládající se z jednotek kyseliny D-manuronové a L-guluronové vázaných převážně 1,4-glykosidickou vazbou) (Zhang *et al.*, 2013), mannitol (Dianawati *et al.*, 2012), laktóza, sacharóza, sušené rekonstituované mléko (Vinderola *et al.*, 2012), chitosan a ženšenový polysacharid (Yang *et al.*, 2006) či modifikovaný škrob spolu s lecitinem (Donthidi *et al.*, 2010).

2.5.4.4. Účinek pH prostředí a osmotického tlaku

Hodnota pH vyjadřuje koncentraci vodíkových iontů v prostředí, kdy vzniká alkalické nebo kyselé prostředí pro mikroorganismy. Míra kyselosti je vyjádřena stupnicí nabývající hodnot pH od 0-14. Neutrálnímu bodu, z hlediska chemie, odpovídá hodnota pH 7,0. Louis Pasteur zjistil, že mírná acidita podporuje růst plísní a brzdí růst bakterií. Každý zástupce mikroorganismů se může rozmnožovat pouze v určitém rozmezí pH. Růst mikroorganismů mimo optimální pH má vliv na funkci mikrobiálních enzymů a na prodloužení lag fáze při kultivaci, která se projeví méně intenzivním množením mikroorganismů. Na základě kyselosti se rozlišují mikroorganismy na alkalofilní (zásadité prostředí), neutrofilní (neutrální prostředí s pH 6–8), acidofilní (kyselé prostředí) a acidorezistentní (Schindler, 2010).

Zejména u bakterií mléčného kvašení je potřebné kontrolovat hodnotu pH, která by se měla pohybovat kolem 6,6 v závislosti na použití jednotlivých kmenů mikroorganismů při laboratorní činnosti (Šilhánková, 2008). Zástupci rodu *Bifidobacterium* se nemohou množit a růst při hodnotě pH v rozmezí 4,5-8,0. Jediným zástupcem bifidobakterií, který je schopen růstu při pH < 4, je *Bifidobacterium thermacidophilum* (Dong *et al.*, 2000). Kyselé prostředí není většinou mikroorganismů dobře snášeno, a proto se okyselení využívá v bezpečnosti potravin, protože snižuje výskyt nežádoucích mikroorganismů. Avšak některé mikroorganismy se mohou rozmnožovat i při vyšších hodnotách pH (plísně).

Hodnotu pH je tedy nutné kontrolovat v procesu lyofilizace, protože by jinak mohlo docházet k velkému mikrobiálnímu úhynu v důsledku poškození buněčných stěn. Přídavkem kationtů hořčíku a manganu do růstového média se podpoří tvorba glykoproteinů buněčné stěny a sníží se tak mortalita lyofilizovaných buněk (Wright *et Klaenhammer*, 1983).

Osmotický tlak vzniká při toku vody pronikající přes semipermeabilní membránu do okolního prostředí, kde je vyšší koncentrace rozpuštěných iontů nebo molekul. V případě mikroorganismů dochází k vylučování solí hlavně v okolí kanálků. Buněčná membrána

je více propustná pro vodu než pro soli. V důsledku zvýšené koncentrace soli dochází k osmotickému výtoku vody do okolí a buňka se následně smrští. Na propustnosti vody buněčnou stěnou závisí rozsah smrštění buňky. Rychlost zmrazování má vliv na míru poškození buněk osmotickým smrštěním, protože buňky nemají dostatečný čas k rovnovážnému stavu a následnému osmotickému výtoku. Pouze rychlé zmrazení by se tedy zdálo být nevhodnějším způsobem. Ovšem při rychlém zmrazení dochází k vyšší krystalizaci s následnou mortalitou buněk, které obsahovaly více vody. Proto je tedy nutné pro ovlivnění osmotického tlaku použít vhodné kryoprotektivum (či osmoaktivní látky) a jeho množství s ohledem na použitou kulturu, vhodnou rychlost a teplotu zmrazování a koncentraci buněk mikroorganismů (Crowe *et al.*, 1984, 1985). Vyšší osmotický tlak je dobře snášen halotolerantními (enterokoky, stafylokoky) a halofilními bakteriemi (Zhao *et al.* 2004).

2.5.4.5. Podmínky vlastního lyofilizačního procesu

Po procesu, kdy se k mikrobiálním kulturám přidá kryoprotektivní látka je tento vzorek zmrazován. Příslušné parametry mrazení jsou voleny na základě požadavků jednotlivých druhů mikroorganismů. Je důležité zvolit správný způsob a rychlost zmrazování.

Pod bodem mrazu (0 °C až -5 °C) se v buňkách začíná vyvolávat tvorba krystalů ledu, která může mít fatální následky pro bakteriální kultury, protože může dojít k jejímu roztrhnutí. Proto je důležité tyto teploty rychle překonat. Při teplotě -15 °C dochází k úplnému zastavení činnosti většiny mikroorganismů. Míra přežití lyofilizovaných kultur je negativně ovlivněna při namrazovací teplotě -20 °C. Bifidobakterie a i některé jiné grampozitivní bakterie jsou však odolnější a k zastavení jejich životních funkcí dochází až při -25 °C. Podle Pushkar *et al.* (1974) vznikají při pomalém zmrazování krystalizační centra mimo buněk. Dochází k tomu, že voda z buněk se uvolňuje do okolí a vznikají tak velké krystaly v malém počtu. Ale při rychlém zmrazení vznikají v nitru buňky malé krystaly, které se mohou v důsledku rekrystalizace zvětšit a následně pak buňku zničit. Proto se podle nároků lyofilizovaných kultur používá nejčastěji tzv. prudké namrazení, kdy je teplota nastavena na hodnotu okolo -70 °C. Je však nutné zdůraznit, že není možné zachovat všechny konzervované buňky. Citlivost mikrobiálních buněk v procesu zmrazování je závislá na propustnosti buněčných membrán, chemickém složení protoplazmy, složení substrátu, ve kterém jsou buňky konzervovány, stáří a fázi růstu buněčných kultur a iniciální hustotě, tvaru a velikosti buněk (Grout *et Morris*, 1987, Březina *et Jelínek*, 1990).

Zmrazený vzorek se musí dále sušit za vakua (optimálně 24 hodin), které urychluje lyofilizační proces. Důležité je zvolit vhodnou teplotu a tlak v závislosti na druhu mikroorganismu, aby nedošlo k mortalitě buněk (Porubcan *et Sellars*, 1979).

2.5.4.6. Podmínky uchování lyofilizovaných kultur

Lyofilizované produkty jsou extrémně hydrofobické a je tedy potřeba zajistit hermetické uzavření obalu, temné prostředí a teplotu skladování kolem 20°C, aby se zabránilo adsorpci vzdušné vlhkosti. Lyofilizát se tak stává stabilním až na několik let. Lyofilizované kultury nevyžadují speciální podmínky skladování oproti zmrazovacím technikám, kdy je nutné zajistit stále nízkou teplotu v mrazících boxech (Hershenson, 2000).

Negativně působící faktor při skladování lyofilizovaných kultur je účinek světla, a proto je nevhodnější uchovávat lyofilizované kultury v temnu. Byly prováděny studie zabývající se problematikou účinků světla na taxon *Bifidobacterium longum*. Zjistilo se, že při anaerobních podmínkách růstu v zatemněném bioreaktoru došlo k výraznému nárůstu *Bifidobacterium longum* v porovnání s bioreaktorem, který byl vystaven účinkům světla. Interakce světla s kyslíkem a složkami komplexního média má vliv na následnou tvorbu látek inhibujících růst (Kiviharju *et al.*, 2004).

3. Cíle práce

Představitelé probiotických bakterií rodu *Bifidobacterium* jsou přítomny ve formě životaschopných buněk nejčastěji v probiotických kysaných mléčných produktech na bázi jogurtů, jogurtových a jiných fermentovaných nápojů. Součástí těchto produktů bývá nejčastěji taxon animálního původu *B. animalis* subsp. *lactis*. Oproti tomu součástí čtených sušených či lyofilizovaných pro(syn)biotických preparátů, dostupných často pouze v lékárnách, jsou hostitelsky specifické taxony lidského původu (*B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *longum* / *infantis*). Tato forma pro(syn)biotik lépe odpovídá definici probiotik a požadavkům na ně kladeným. Studie zabývající se reálnou aplikací animálních probiotik obsahující bifidobakterie nejsou početné a v praxi se s nimi lze setkat jen ojediněle. Pravděpodobným důvodem je náročnost kultivace, striktně anaerobní metabolismus a soustředění se badatelské obce na výzkum lidských (syn)probiotik. To ovšem neznamená, že animální pro(syn)biotika nebudou v chovech hospodářských zvířat široce využívána.

Hlavními cíli této práce bylo otestovat možné kryo(lyo)protektivní vlastnosti roztoků obsahující víceméně specifikované oligosacharidy s prebiotickým potenciálem při konzervaci lidských a animálních kmenů bifidobakterií procesem lyofilizace. Zvolené roztoky nebyly dosud pro tyto účely testovány.

4. Hypotéza

O různých typech oligosacharidů rostlinného původu je známo, že mají tzv. prebiotický či vyloženě bifidogenní účinek. Podporují selektivně růst bifidobakterií v podmínkách *in vitro*, ale rovněž v intestinálním traktu člověka, savců a jiných živočichů. Jejich potenciální kryo(lyo)protektivní účinek při lyofilizačním procesu konzervace nebyl dosud dostatečně prozkoumán. Lyofilizace (vakuové vymrazování či vysušení ze zmraženého stavu) jako konzervační proces je široce využíván ve sbírkách mikroorganismů, biotechnologiích, mlékárenském a jiném potravinářském průmyslu při uchovávání důležitých bakteriálních kultur s žádoucími vlastnostmi. Podobně jako jiné konzervační postupy má lyofilizace své výhody či nevýhody, výhody však převažují. Lyofilizované bakteriální kultury mohou být životaschopné i po několik let, aniž by ztratily specifické fyziologické vlastnosti. Nutno ovšem podotknout, že výsledek lyofilizačního procesu, resp. vitalita a zachování všech charakteristik lyofilizovaných bakteriálních buněk, je ovlivněn celou řadou faktorů. Mezi ně náleží koncentrace lyofilizovaných buněk, podmínky kultivace, složení růstového média, pH prostředí, osmotický tlak, individualita a původ bakteriálních kmenů, teplota a časové období zmrazovací fáze, teplota a hodnota tlaků v průběhu fáze sušení, kvalita lyofilizačního zařízení, teplota a podmínky skladování lyofilizovaných kultur a v neposlední řadě přítomnost tzv. kryo(lyo)protektivních látek. Tyto látky především zabraňují uvnitř či vně buněk letálnímu účinku krystalků vody, které vznikají v průběhu zmrazovací fáze lyofilizace.

Vlastní tezí této práce je, že určité roztoky obsahující definované či nedefinované množství oligosacharidů (fruktooligosacharidů, mucinových oligosacharidů či sójových oligosacharidů) mohou působit nejen jako prebiotikum, ale také jako kryoprotektivní látky v průběhu lyofilizace různých animálních a lidských kmenů bifidobakterií. V případě zjištěných vysokých počtů bifidobakteriálních buněk při použití specifických oligosacharidových roztoků existuje potenciální aplikovatelnost těchto roztoků v humánní či veterinární medicíně při výrobě humánních či animálních synbiotických preparátů.

5. Materiál a metody

5.1. Použité kultury

Pro účely lyofilizace bylo použito jedenáct kmenů bifidobakterií (lidského a animálního původu) a jeden zástupce čeledi *Bifidobacteriaceae* (*Bombiscardovia coagulans*) ze sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky (Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů; ČZU Praze).

- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140^T
- *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456^T
- *Bifidobacterium bohemicum* DSM 22767^T
- *Bifidobacterium bombi* DSM 19703^T
- *Bifidobacterium boum* DSM 20432^T
- *Bifidobacterium breve* DSM 20213^T
- *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088^T
- *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CCM 7826^T
- *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* DSM 20092^T
- *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* DSM 17755^T
- *Bifidobacterium thermophilum* DSM 20210^T
- *Bombiscardovia coagulans* DSM 22924^T

Zkratky za druhovým pojmenováním označují číslo mezinárodních sbírek mikroorganismů, ze kterých byly kultury zakoupeny a pod nimiž jsou kultury v daných sbírkách uloženy a distribuovány (DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Německá sbírka mikroorganismů; CCM – Czech Collection of Microorganisms, Česká sbírka mikroorganismů). Písmeno ^T značí typový kmen daného druhu. Kultury byly uchovávány ve zmraženém stavu po 24 h kultivaci v anaerobním TPY médiu (Scardovi, 1986), přídatku glycerolu (20% objemových) a za teploty -80 °C.

Čistota a specifická morfologie bifidobakteriálních kultur byla průběžně kontrolována prostřednictvím světelného mikroskopu.

5.2. Složení tekutého růstového média a jeho příprava

Bifidobakteriální kultury byly před přípravou buněčné suspenze v roztocích obsahujících potenciálně kryo(lyo)protektivní látky kultivovány po dobu 24 hodin v TPY (Tryptone Phytone Yeast extract) bujónu, jehož složení je znázorněno v **Tabulce č. 2**.

Tabulka č. 2. Složení růstového média Tryptone Phytone Yeast extract bujónu

TPY (g/L)	
Pepton bakteriologický (Oxoid, Anglie)	10
Glukóza bezvodá (Penta, s.r.o., ČR)	10
Kvasničný extrakt (Scharlau Microbiology, Německo)	5
Pepton sójový (Roth, Německo)	5
K_2HPO_4	2
$MgCl_2 \times 6H_2O$	0,5
Cystein x HCl	0,5
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	0,25
Tween 80 (Sigma-Aldrich, USA)	1 ml

Po rozpuštění a promíchání všech složek v redestilované vodě bylo médium vloženo do vroucí vodní lázně na 20 minut. Médium bylo dávkováno po 9 ml do penicilínek, které byly následně probublány čistým CO_2 (přes kolonu) pro zajištění anaerobní atmosféry a ihned uzavřeny gumovou a následně hliníkovou zátkou. Ampulky s připraveným růstovým médiem byly sterilovány v Kochově sterilátoru po dobu 1 hodiny. Hodnota pH kontrolována nebyla, neboť podle zkušeností pracovníků Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky bývá po sterilaci v rozmezí od 6,6-6,8, což odpovídá rozmezí vhodnému pro kultivaci bifidobakteriálních kmenů.

5.3. Složení média pro zhotovení ředících řad

Před přípravou bakteriální suspenze v daných roztocích a po procesu lyofilizace (a ve stanovených časových intervalech po lyofilizaci) bylo nutné stanovit počet vitálních bakteriálních buněk. Pro tyto účely byly 24 hodinové a lyofilizované kultury naředěny desítkovým systémem v redukovaném médiu o následném složení (viz. **Tabulka č. 3**):

Tabulka č. 3. Složení redukovaného média pro přípravu ředících řad.

Bujón pro ředící řady (g/L)	
Pepton bakteriologický (Oxoid, Anglie)	5
Živný bujón No. 2 (Sigma-Aldrich, USA)	5
Kvasničný extrakt (Scharlau Microbiology, Německo)	2,5
Cystein x HCl	0,25
Tween 80	0,5 ml

Rekudované médium z hlediska nižších koncentrací jednotlivých složek bylo zvoleno proto, aby byl zachován počet životaschopných buněk bifidobakterií a aby zároveň nedošlo k pomnožení. Následná příprava tohoto média byla shodná s přípravou předchozího růstového média.

Naředěné bifidobakteriální kultury (v rozmezí od 10^{-3} do 10^{-8}) byly očkovány v množství 1 ml do sterilních umělohmotných Petriho misek. Poté byly vzorky kultivovány ve sterilním anaerobním TPY agaru ((příprava shodná s přípravou růstového TPY bujónu s tím rozdílem, že byl do roztoku přidán bakteriologický agar (Oxoid, Anglie) v množství 13 g / L)) v anaerostatech (**Obrázek č. 3**) při 37 °C po dobu 48 hodin. Každý vzorek byl z důvodu stanovení co možná nejpřesnějšího množství vitálních buněk zaočkován ve 3 kopiích. V anaerostatu byla v průběhu kultivace vytvořena anaerobní atmosféra prostřednictvím směsi plynů (10% CO₂ a 90% H₂) a katalyzátoru redukujícím rezidua kyslíku.

Obrázek č. 3. Vzhled anaerostatu (Anaerojar 3,5 L; Oxoid, Anglie)



Po kultivaci byly spočítány na příslušných ředěních kolonie narostlé ze životaschopných buněk a převedeny na hodnoty dekadického logaritmu. Hodnoty ze třech kopií byly

zprůměrovány a v následných kapitolách jsou uváděny jako \log_{10} / ml růstového média či lyofilizátů suspenze bifidobakteriálních buněk v potenciálních kryo(lyo)protektivních roztocích.

5.4. Složení a příprava roztoků na bázi potenciálně kryo(lyo)protektivně působících oligosacharidů

Jako možné kryoprotektivní látky byly pro účely konzervace bifidobakterií lyofilizací použity níže uvedené 3 varianty roztoků (1. roztok **na bázi 5x koncentrovaného TPY média s přidavkem FOS**, 2. roztok **jen na bázi FOS**, 3. roztok **na bázi prasečího mucinu**):

Tabulka č. 4. Složení potenciálního kryo(lyo)protektivního roztoku na bázi **5x koncentrovaného TPY média s přidavkem FOS (fruktooligosacharidů)**

5x koncentrované TPY médium s přidavkem FOS (g / L) (% w/ v zastoupení v roztoku)	
Pepton bakteriologický (Oxoid, Anglie)	50 (5)
Glukóza bezvodá (Penta, s.r.o., ČR)	50 (5)
Kvasničný extrakt (Scharlau Microbiology, Německo)	25 (2,5)
Pepton sójový (Roth, Německo)	25 (2,5)
FOS (Raftilose®P95; Mandurah Australia Pty Ltd., Matraville, NSW, Austrálie)	5 (0,5)
K ₂ HPO ₄	2
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,5
Cystein x HCl	0,5

Tabulka č. 5. Složení potenciálního kryo(lyo)protektivního roztoku **na bázi FOS (fruktooligosacharidů)**

Roztok na bázi FOS (g / L) (% w/ v zastoupení v roztoku)	
FOS (Raftilose®P95; Mandurah Australia Pty Ltd., Matraville, NSW, Austrálie)	100 (10)
K ₂ HPO ₄	2
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,5
Cystein x HCl	0,5

Tabulka č. 6. Složení potenciálního kryo(lyo)protektivního roztoku **na bázi mucinu**

Roztok na bázi mucinu (g / L) (% w/ v zastoupení v roztoku)	
Mucin gastrický prasečí (Mucin from porcine stomach II; Sigma-Aldrich, USA)	40 (4)
K ₂ HPO ₄	2
Cystein x HCl	0,5

V případě prvních 2 roztoků byly jednotlivé komponenty rozpuštěny v redestilované vodě, následně byla zjištěna a případně upravena hodnota pH (u kyselých roztoků prostřednictvím 8M NaOH, u zásaditých roztoků prostřednictvím 100% kyseliny octové) v rozmezí 6,8 – 7,0. Tyto roztoky byly sterilovány membránově (velikost pórů sterilních filtrů 0,45 µm; Cellulose Nitrate Filter, Sartorius AG, Německo) z důvodu možného narušení chemické struktury fruktooligosacharidů a změn ve složení roztoků působením tzv. Maillardových reakcí (neenzymatické reakce mezi redukcujícími cukry či produkty jejich degradace a aminokyselinami či bílkovinami) za vysokých sterilizačních teplot. Membránově sterilované roztoky byly následně ošetřeny směsí plynů (10% CO₂ + 90% N₂) za sterilních podmínek, aby bylo zajištěno anaerobní prostředí nezbytné pro zachování životaschopnosti bifidobakteriálních kultur. Infúzní láhve obsahující takto připravené roztoky byly hermeticky uzavřeny a skladovány v mrazicím boxu při -25 °C do doby jejich použití. Zdrojem známé koncentrace oligosacharidů, které by mohly hypoteticky působit jako kryo(lyo)protektivní látky, byla Raftilóza P95 (Mandurah Australia Pty Ltd., Matraville, NSW, Austrálie) složená z 95% fruktooligosacharidy (stupeň polymerace 3 – 10) vyrobenými enzymatickým štěpením inulinu. Dalšími možnými kryo(lyo)protektivními látkami obsaženými v prvním roztoku, u nichž existují zmínky či předpoklady o jejich kryo(lyo)protektivním působení, jsou kvasničný extrakt, glukóza, pepton a sójový pepton obsahující blíže nespecifikované množství tzv. sójových galaktoligosacharidů.

Mucin jakožto možný kryo(lyo)protektivní element při konzervaci bifidobakterií lyofilizací nebyl dosud zkoumán. Pro účely pokusu byl použit tzv. prasečí gastrický mucin (Mucin from porcine stomach II; Sigma-Aldrich, USA), poněvadž je oproti lidskému gastrickému (intestinálnímu) mucinu dostupný a jeho složení víceméně odpovídá lidskému mucinu. Muciny obecně reprezentují makromolekuly glykoproteinů pokrývající epiteliální povrch gastrointestinálního traktu savců a jiných živočichů. Až 70% hmotnostních makromolekuly mucinu reprezentují oligosacharidové řetězce, které jsou navázány na proteinové jádro. Hlavními monosacharidy přítomnými v oligosacharidových řetězcích jsou

N-acetylglukózamin, N-acetylgalaktózamin, galaktóza, fukóza a kyselina sialová. Mucinové řetězce tudíž reprezentují rozličnou směs dusíkatých oligosacharidů či galaktooligosacharidů (Corfield *et al.*, 1992). Právě proto se především tato zajímavá část mucinové makromolekuly stala předmětem našeho pokusu.

Prasečí gastrický mucin byl v dané koncentraci resuspendován v redestilované vodě. U takto připraveného roztoku byla upravena hodnota pH v rozmezí 7,0 – 7,2 prostřednictvím 8M NaOH. Poté byl roztok ošetřen směsí plynů (10% CO₂ + 90% N₂) z důvodu zajištění anaerobních podmínek nezbytných pro úspěšné přežívání buněk bifidobakterií a sterilován za výše uvedených podmínek. Stanovená hodnota pH tohoto roztoku byla po sterilaci 6,6. Roztok byl skladován při -25 °C do doby jeho využití.

5.5. Lyofilizační proces

Čerstvé kultury bifidobakterií pro účely lyofilizace byly připraveny následovně: z mražených kultur byl odebrán vždy objem 0,5 ml, který byl přeočkován pomocí sterilních stříkaček a jehel do 3 penicilínek obsahujících 9 ml růstového média. Narostlé 24 hodinové kultury bifidobakterií, u nichž byla zkontrolována morfologie a čistota a které byly použity pro stanovení počtu vitálních buněk, byly odebrány v množství 1,5 ml a smíchány ve 20 ml penicilínkách ((z nichž byl předem odstraněn za sterilních podmínek anaerobní sterilní fyziologický roztok (9 g NaCl / L)) se stejným objemem tří výše uvedených roztoků. Tímto procesem byl eliminován přístup vzduchu pro zajištění vhodných fyziologických podmínek bifidobakteriálních buněk. Objem suspenze narostlých kultur spolu s potenciálními kryo(lyo)protektivními roztoky (3 ml) byl zvolen pro účely lyofilizace tak, aby hladina této suspenze v použitých 20 ml penicilínkách nepřesáhla 0,5 cm. Je obecně známo, že výška hladiny a množství lyofilizovaných roztoků rozhoduje o kvalitě lyofilizátů především z pohledu koncentrace rezidua vázané vody. Takto připravené vzorky byly vždy v 6 kopiích od každého kmene ručně lehce promíchány a ihned vloženy do mrazicího boxu (Ultra-low Temperature Freezer, MDF-U73V, SANYO Electric Co., Ltd., Japonsko) nastaveného na teplotu -80 °C. U kontrolních vzorků bylo postupováno obdobně, jen se do 20 ml penicilínek dávkovalo vždy po 3 ml narostlé kultury, aby byl zachován stejný objem jako v případě vzorků obsahujících možné kryo(lyo)protektivní roztoky. Přibližně po 1 hodině byly zmražené kultury vyňaty a kleštěmi za sterilních podmínek odstraněny obě původní zátky (hliníkové a gumové). Poté byla urychleně na hrdlo otevřených penicilínek nasazena za sterilních podmínek speciální lyofilizační zátka, která byla následně zakryta sterilní aluminiovou fólií. Tato fáze přípravy vždy probíhala v co nejkratším čase, aby nedocházelo k rozmrznutí kultury. Poté se takto

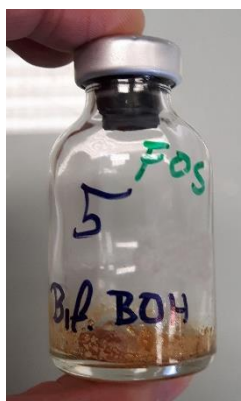
připravené vzorky opět vložily na přibližně 3 hodiny do mrazicího boxu. Po vyjmutí z mrazicího boxu byly vzorky ihned vloženy do lyofilizačního zařízení (Lyofilizátor: Powerdry LL 3000, Site Thermo Electron a.s., ČR; **Obrázek č. 4**) a lyofilizovány po dobu 24 hodin. U tohoto přístroje nelze přednastavit žádné specifické parametry podtlaku či vymrazovacích teplot.

Obrázek č. 4. Lyofilizátor Powerdry LL 3000



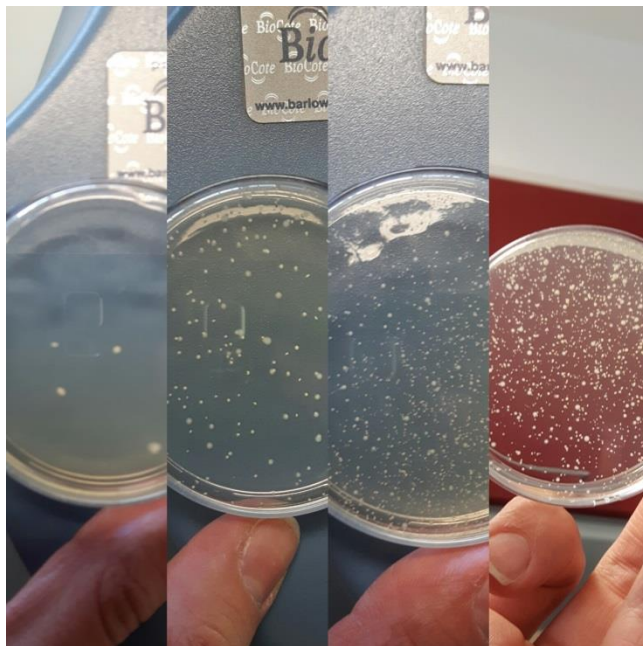
Po lyofilizaci byly lyofilizační zátky jednotlivých vzorků zaraženy do hrdla penicilínek přímo v lyofilizační komoře stlačením jednotlivých pater pomocí šroubovacího mechanismu. Následně byly lyofilizáty hermeticky uzavřeny prostřednictvím hliníkových uzávěrů za použití k tomuto účelu vyráběných kleští. Ukázka lyofilizované kultury (konkrétně lyofilizát taxonu *B. bohemicum* za požití roztoku FOS) je uvedena na **Obrázku č. 5**.

Obrázek č. 5. Lyofilizovaná kultura *B. bohemicum* za přítomnosti FOS



Ihned po lyofilizaci byly u jedné z kopií konkrétních lyofilizovaných kultur za přítomnosti roztoků možných kryoprotektiv či bez nich (kontrolní vzorek) stanoveny počty životaschopných buněk podle výše zmíněné metodiky a převedeny na hodnoty dekadického logaritmu. Ukázka kolonií bifidobakterií narostlých z vitálních buněk po 48 hodinách kultivace na TPY agaru za anaerobních podmínek je znázorněna na **Obrázku č. 6**. Pro účely potvrzení či vyvrácení hypotézy práce byly dále zjišťovány počty vitálních buněk u dalších kopií v určitých časových intervalech (po 30 dnech, 3 měsících a 6 měsících ode dne lyofilizace) a zároveň porovnávány s kontrolními vzorky.

Obrázek č. 6. Kolonie různých kultur bifidobakterií narostlých z vitálních buněk lyofilizátů po 48 hodinách kultivace na TPY agaru za anaerobních podmínek



6. Výsledky

Souhrnné výsledky jsou uvedeny v následující **Tabulce č. 7**.

Tabulka č. 7. Logaritmické počty životaschopných buněk použitých v laboratorním výzkumu v časových odstupech před a po lyofilizaci

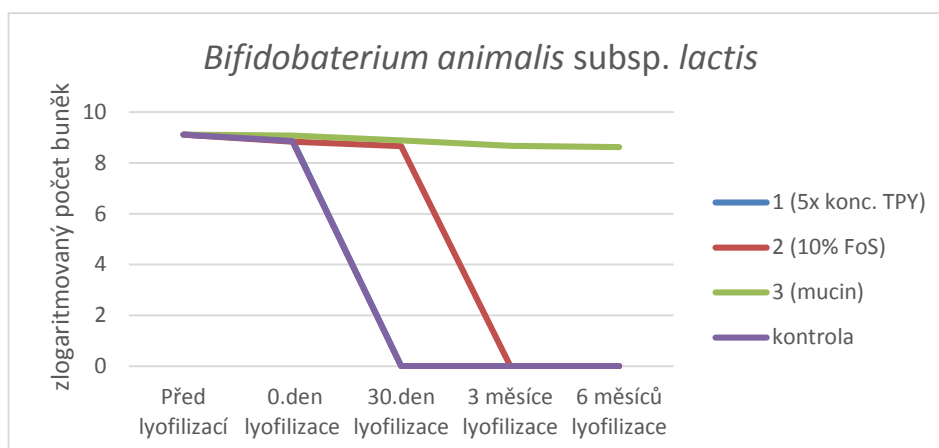
Kmen		Počty před lyofilizací	Počty ihned	Počty ihned	Počty ihned po	Počty ihned po lyofilizaci
			po lyofilizaci	po lyofilizaci	lyofilizaci 90.den	180.den (6 měsíců)
			0.den	30.den	(3 měsíce)	
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	1 (5x konc. TPY)	9,12	8,91	0	0	0
	2 (10% FoS)	9,12	8,84	8,66	0	0
	3 (mucin)	9,12	9,08	8,89	8,68	8,62
	kontrola	9,12	8,86	0	0	0
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1 (5x konc. TPY)	7,15	7,13	6,47	0	0
	2 (10% FoS)	7,15	7,11	6,94	0	0
	3 (mucin)	7,15	7,08	6,82	0	0
	kontrola	7,15	7,02	0	0	0
<i>Bifidobacterium bohemicum</i>	1 (5x konc. TPY)	9,56	9,35	6,73	0	0
	2 (10% FoS)	9,56	9,44	8,86	0	0
	3 (mucin)	9,56	9,22	0	0	0
	kontrola	9,56	8,72	0	0	0
<i>Bifidobacterium bombi</i>	1 (5x konc. TPY)	9,43	9,23	8,16	0	0
	2 (10% FoS)	9,43	9,29	7,43	0	0
	3 (mucin)	9,43	8,67	0	0	0
	kontrola	9,43	9,41	0	0	0
<i>Bifidobacterium boum</i>	1 (5x konc. TPY)	9,28	8,35	7,54	5,4	3,73
	2 (10% FoS)	9,28	8,65	5,21	3,53	0
	3 (mucin)	9,28	8,71	8,45	7,28	6,85
	kontrola	9,28	8,57	0	0	0
<i>Bifidobacterium breve</i>	1 (5x konc. TPY)	9,13	8,86	6,96	4,39	4,32
	2 (10% FoS)	9,13	9,11	6,25	0	0
	3 (mucin)	9,13	9,11	0	0	0
	kontrola	9,13	8,74	0	0	0
<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>	1 (5x konc. TPY)	9,03	9,02	6,95	4,04	4,01
	2 (10% FoS)	9,03	8,93	7,21	0	0
	3 (mucin)	9,03	8,51	8,46	8,36	8,34
	kontrola	9,03	8,4	0	0	0
<i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i>	1 (5x konc. TPY)	9,34	8,48	0	0	0
	2 (10% FoS)	9,34	8,96	0	0	0
	3 (mucin)	9,34	9,28	7,85	5,26	5,21
	kontrola	9,34	9,22	0	0	0
<i>Bifidobacterium pseudolongum subsp. globosum</i>	1 (5x konc. TPY)	8,46	8,17	8,07	0	0
	2 (10% FoS)	8,46	8,23	8,06	0	0
	3 (mucin)	8,46	8,18	8,04	8	7,94
	kontrola	8,46	7,28	0	0	0
<i>Bifidobacterium thermacidophilum subsp. porcinum</i>	1 (5x konc. TPY)	9,72	9,21	8,97	5,61	0
	2 (10% FoS)	9,72	9,29	7,11	6,36	5,24
	3 (mucin)	9,72	9,36	9,11	8,91	8,48
	kontrola	9,72	9,18	0	0	0
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	1 (5x konc. TPY)	9,21	9,09	8,96	6,63	0
	2 (10% FoS)	9,21	9,18	0	0	0
	3 (mucin)	9,21	9,2	0	0	0
	kontrola	9,21	9,12	0	0	0
<i>Bombiscardovia coagulans</i>	1 (5x konc. TPY)	8,45	8,35	8,19	7,18	3,11
	2 (10% FoS)	8,45	8,43	8,25	6,48	5,42
	3 (mucin)	8,45	8,28	0	0	0
	kontrola	8,45	8,39	0	0	0

Následující kapitoly graficky znázorňují tendenci poklesu počtu vitálních buněk lyofilizátů jednotlivých bifidobakteriálních kmenů (abecedně seřazených) v určitých časových odstupech po lyofilizaci za použití 3 odlišných roztoků obsahujících možné kryo(lyo)protektivní látky (v grafech označené jako **5x konc. TPY**, **10% FOS** a **mucin**). Výsledky jsou stručně

komentovány především s ohledem na odlišnosti mezi různými roztoky a porovnání s kontrolními lyofilizáty.

6.1. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

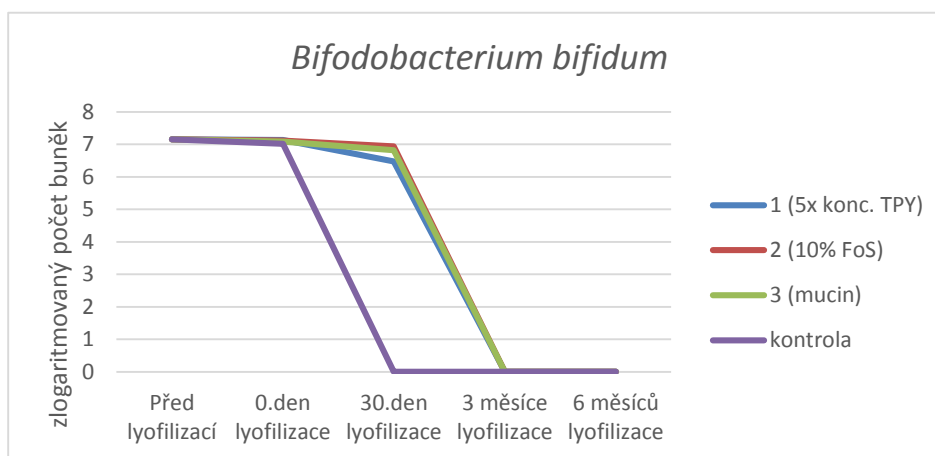
Obrázek č. 7. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. animalis* subsp. *lactis* v časových odstupech po lyofilizaci



Z uvedeného grafu vyplývá, že pouze dvě potenciální kryo(lyo)protektiva na bázi mucinu a 10% FOS měla příznivý účinek na delší dobu přežití buněk v porovnání s kontrolním lyofilizátem. V kontrolním lyofilizátu se po měsíci od lyofilizace nevyskytovaly žádné přeživší buňky. Potenciální kryo(lyo)protektivum na bázi prasečího mucinu umožnilo přežití v celém časovém období pokusu, tj. v období 6 měsíců. V případě roztoku FOS došlo k výraznému poklesu vitálních buněk již po 30 dnech od lyofilizace.

6.2. *Bifidobacterium bifidum*

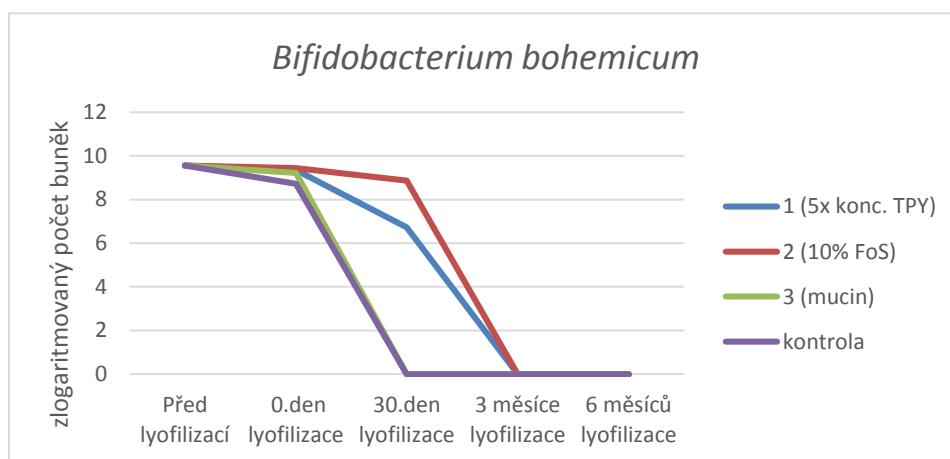
Obrázek č. 8. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. bifidum* v časových odstupech po lyofilizaci



Po prvním měsíci od lyofilizace došlo u lyofilizátů s přidavkem látek jako potenciálních kryoprotektiv k rychlému poklesu přeživších buněk *Bifidobacterium bifidum*. Nebyl tedy potvrzen výrazně příznivější vliv použitých potenciálních kryo(lyo)protektiv u tohoto kmene, přestože kontrolní lyofilizát neobsahoval živé buňky *B. bifidum* po třicátém dnu lyofilizace.

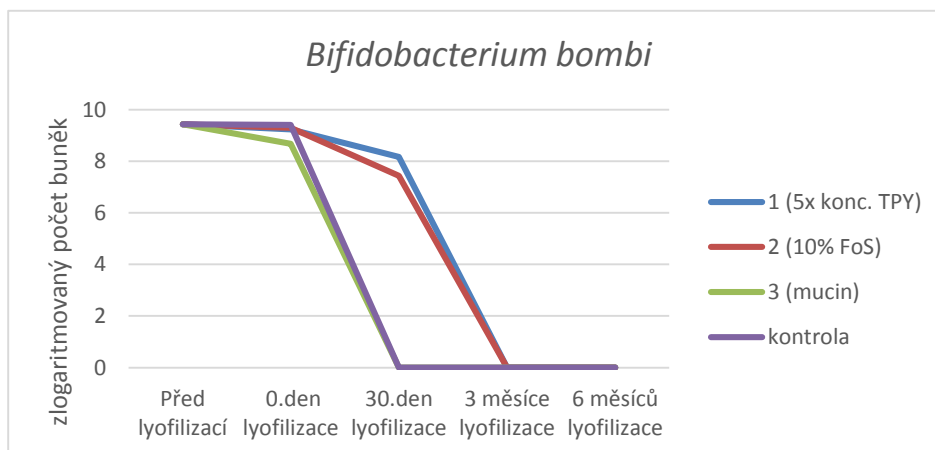
6.3. *Bifidobacterium bohemicum* a *B. bombi*

Obrázek č. 9. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. bohemicum* v časových odstupech po lyofilizaci



Redukovaná přežitelnost buněk *B. bohemicum* do 3. měsíců od lyofilizace se projevila pouze u potenciálních kryo(lyo)protektiv na bázi 5x koncentrovaného TPY a 10% FOS. Kontrolní lyofilizát a možné kryo(lyo)protektivum na bázi mucinu dosáhly už po měsíci nulové hodnoty přeživších buněk *B. bohemicum*. Nebyl tedy potvrzen příznivější vliv použití mucinu jako potenciálního kryoprotektiva u toho kmene.

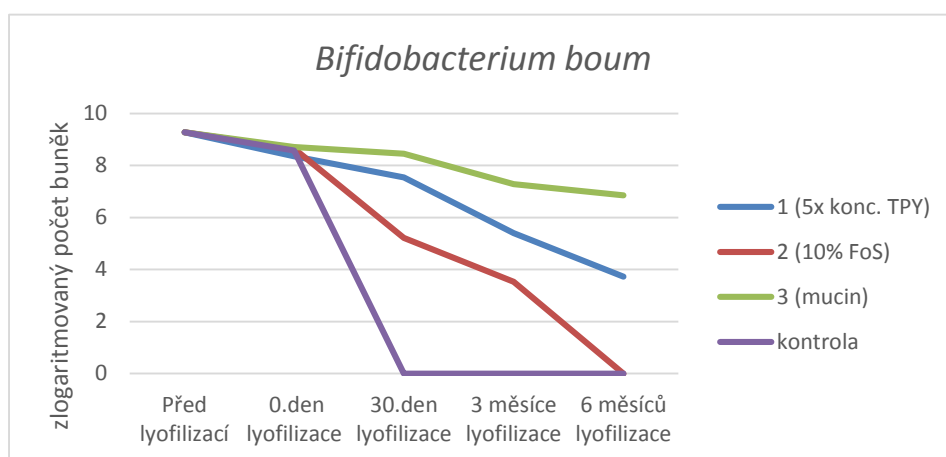
Obrázek č. 10. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. bombi* v časových odstupech po lyofilizaci



Výsledky použití všech tří potenciálních kryo(lyo)protektiv u *B. bombi* jsou velmi podobné výsledkům dosaženým u příbuzného taxonu *Bifidobacterium bohemicum*. I zde neměly látky výrazně příznivější vliv na životaschopnost buněk. Kontrolní lyofilizát a mucinový roztok vykázal již po měsíci nulovou hodnotu přeživších buněk, zatímco u zbývajících 2 roztoků byl zjištěn určitý počet vitálních buněk pouze ve 30. dni od lyofilizace.

6.4. *Bifidobacterium boum*

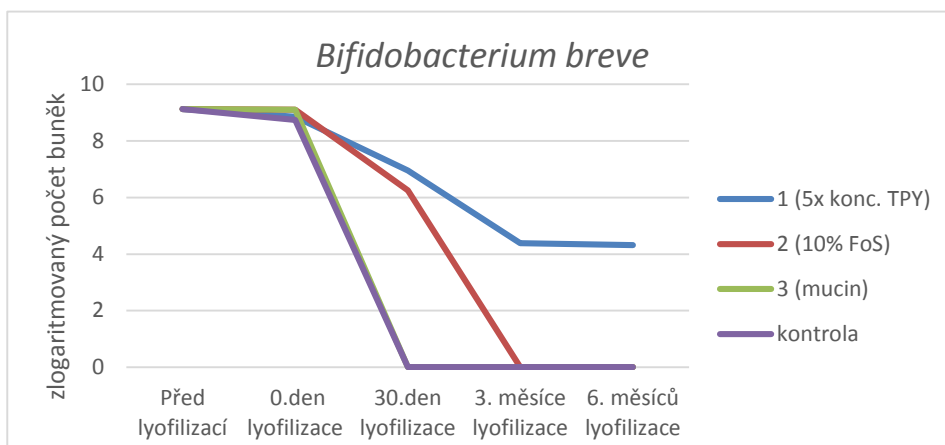
Obrázek č. 11. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. boum* v časových odstupech po lyofilizaci



Všechny tři použité roztoky měly určitý příznivý vliv na přežití buněk *Bifidobacterium boum*. Ovšem jako nejúčinnější se projevila dvě potenciální kryo(lyo)protektiva, a to na bázi prasečího mucinu a 5x koncentrovaného TPY, kdy přežitelnost buněk přesahovala zkoumanou dobu šesti měsíců od lyofilizace. Nejnižší účinnost, v porovnání s ostatními dvěma použitými roztoky, měl 10% FOS. V kontrolním lyofilizátu nebyla shledána životaschopnost buněk stejně jako u všech dalších zkoumaných bifidobakteriálních kmenů již ve 30 dni od lyofilizace.

6.5. *Bifidobacterium breve*

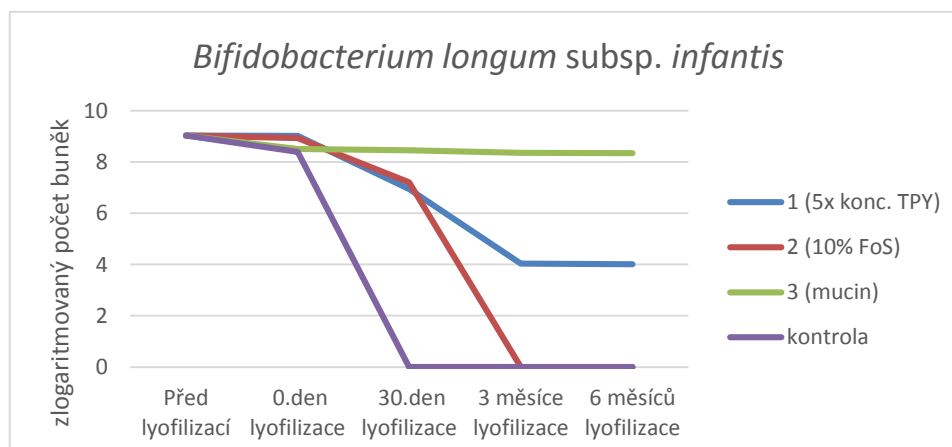
Obrázek č. 12. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *B. breve* v časových odstupech před a po lyofilizaci



Uvedený graf znázorňuje, že po dobu šesti měsíců byla nejvyšší přežitelnost buněk u lyofilizátu, kde byl použit 5x koncentrovaný TPY roztok s přidavkem FOS jako potenciálně kryo(lyo)protektivní substance. Životaschopnost buněk u potenciálního kryo(lyo)protektiva na bázi 10% FOS byla do třetího měsíce od lyofilizace kladná. V případě roztoku na bázi prasečího mucinu nebyl zjištěn kryo(lyo)protektivní účinek, neboť již po 30 dni od lyofilizace stejně jako u kontrolního lyofilizátu, nebyly detekovány vitální buňky.

6.6. *Bifidobacterium longum subsp. infantis*

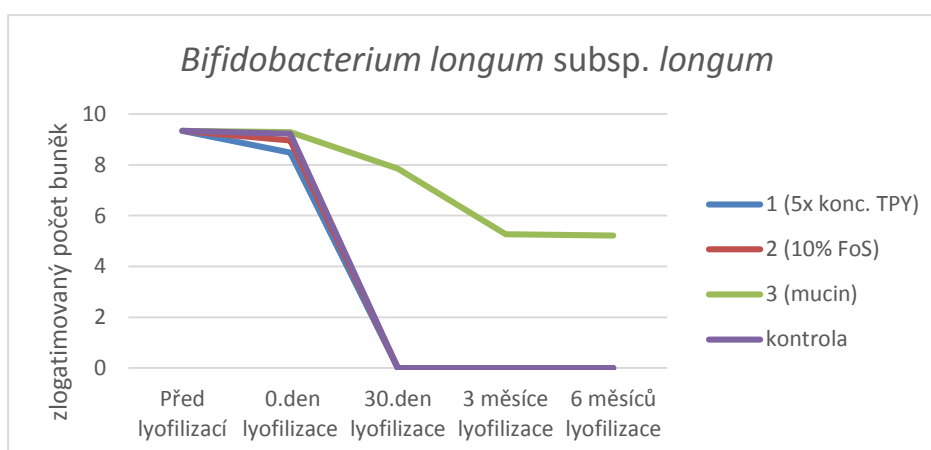
Obrázek č. 13. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *B. longum subsp. infantis* v časových odstupech po lyofilizaci



V grafu jsou znázorněny vysoké výsledné počty životaschopných buněk *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* v lyofilizátu při použití roztoku na bázi prasečího mucinu. Ve srovnání s počátečním počtem buněk *B. longum* subsp. *infantis* se jedná o velmi příznivý výsledek. Ostatní sledované látky měly nižší účinnost na zachování životaschopnosti buněk *B. longum* subsp. *infantis* v porovnání s kontrolním lyofilizátem. Určitý nižší počet vitálních buněk po 6 měsících od lyofilizace byl stanoven také u lyofilizátu na bázi 5x koncentrovaného TPY roztoku.

6.7. *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*

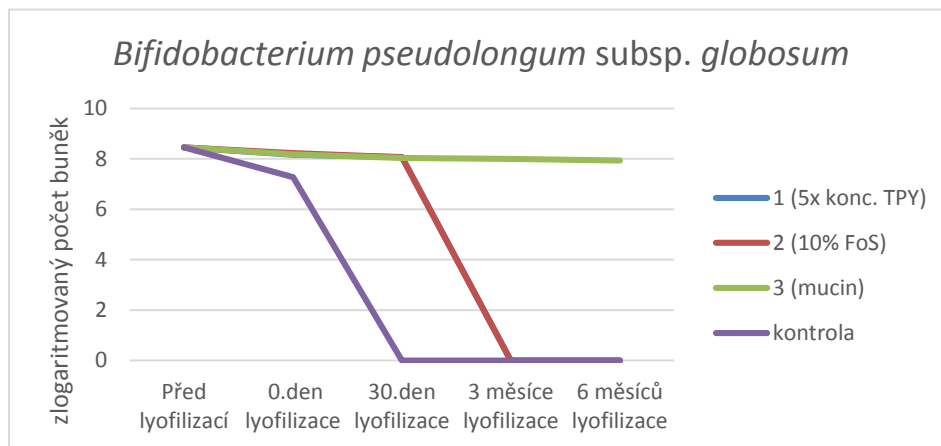
Obrázek č. 14. Graf logaritmů počtu životaschopných buněk *B. longum* subsp. *longum* v počátku a v časových odstupech po lyofilizaci



Přeživší buňky u tohoto bifidobakteriálního kmene byly v celém časovém horizontu pokusu stanoveny pouze u lyofilizátu s přidavkem možného kryo(lyo)protektivního roztoku na bázi prasečího gastrického mucinu. Ostatní roztoky obsahující potenciálně kryo(lyo)protektivně působící oligosacharidy nevykázaly žádný příznivý efekt na životaschopnost buněk tohoto taxonu porovnáním s kontrolním lyofilizátem.

6.8. *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum*

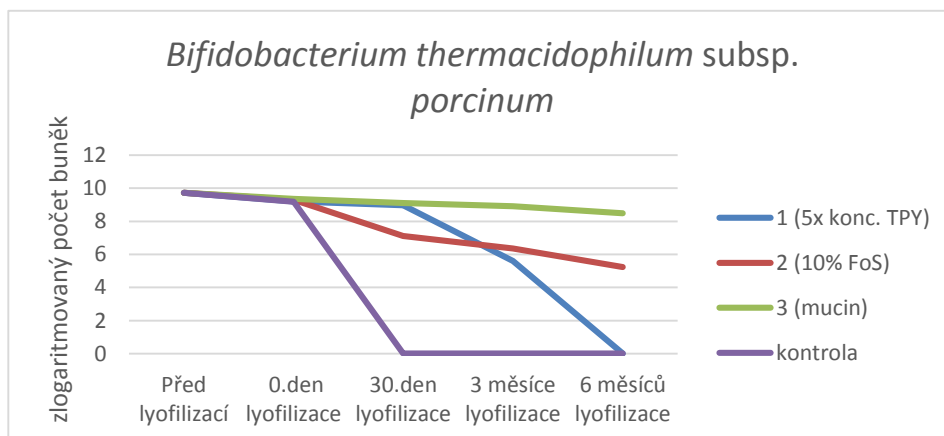
Obrázek č. 15. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *B. pseudolongum* subsp. *globosum* v časových odstupech po lyofilizaci



Podobně jako u lyofilizátů *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. boum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum* a *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* byl zjištěn také u kultury *B. pseudolongum* subsp. *globosum* určitý kryo(lyo)protektivní účinek mucinového roztoku, neboť lyofilizované buňky přežívaly v určitém počtu po celé sledované období od počátku lyofilizace. Po 30 dni od lyofilizace byly stanoveny podobné počty vitálních buněk u lyofilizátů na bázi roztoků 5x koncentrovaného TPY a 10% FOS, a proto se jejich hodnoty ve výše uváděném grafu překrývají. U těchto roztoků možných kryo(lyo)protektiv se tedy u tohoto taxonu prokázala minimální účinnost.

6.9. *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum*

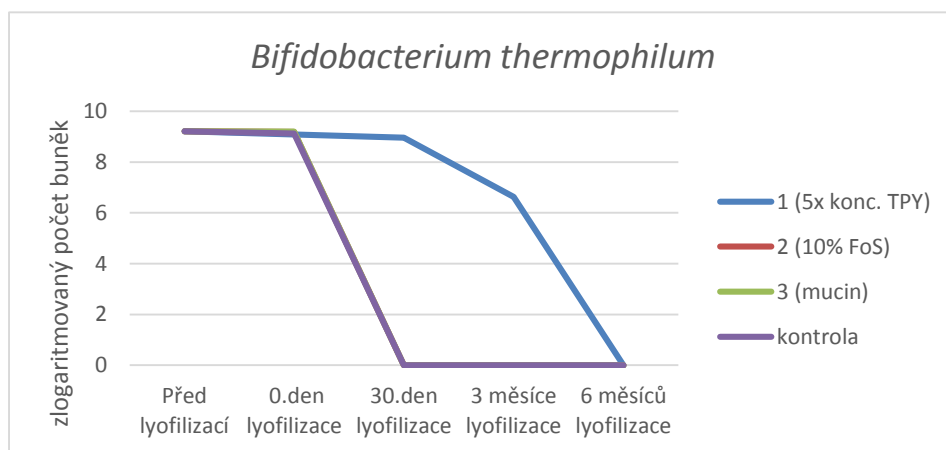
Obrázek č. 16. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* v časových odstupech po lyofilizaci



Oproti počáteční hodnotě počtu životaschopných buněk *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *procinum* po lyofilizaci došlo u lyofilizátů na bázi roztoku prasečího mucinu po šesti měsících lyofilizace jen k nepatrně nižším hodnotám. Ovšem také 10% roztok FOS prokázal určitý kryo(lyo)protektivní efekt, třebaže oproti počáteční hodnotě došlo po šesti měsících k výraznému poklesu životaschopných buněk. Také potenciálně kryo(lyo)protektivní roztok na bázi 5x koncentrovaného TPY média s přidavkem FOS zajistil zvýšení počtu vitálních buněk oproti kontrolním lyofilizátům.

6.10. *Bifidobacterium thermophilum*

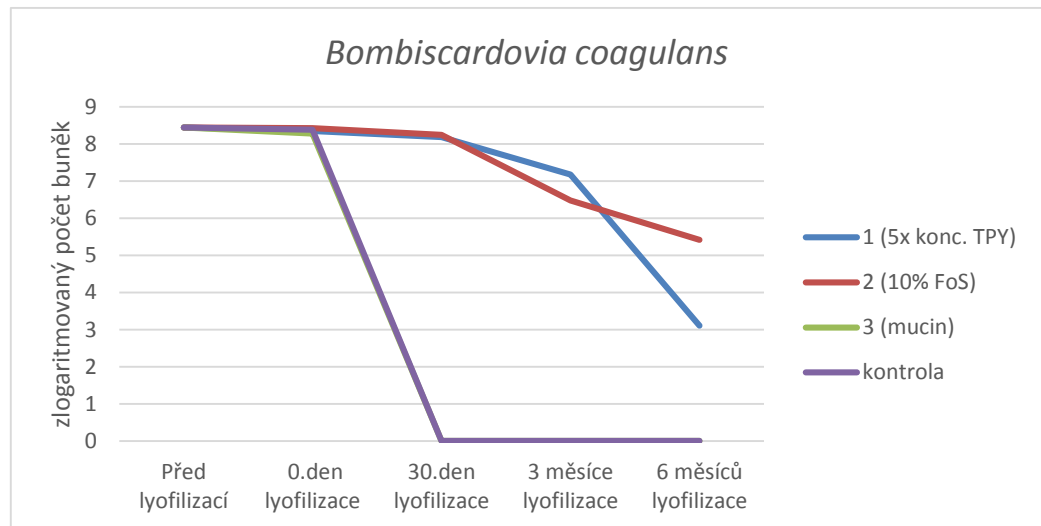
Obrázek č. 17. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *B. thermophilum* v časových odstupech po lyofilizaci



Z výše uvedeného grafu je zcela jasně viditelné, že 5x koncentrovaný roztok TPY s přidavkem FOS je jediným potenciálním kryo(lyo)protektivem, který zajistil v průběhu lyofilizace delší životaschopnost buněk *Bifidobacterium thermophilum*. Výsledky zbývajících dvou roztoků neprokázaly kryo(lyo)protektivní efekt vůči buňkám *B. thermophilum*. V grafu se tudíž výsledné křivky překrývají s křivkou kontrolního lyofilizátu.

6.11. *Bombiscardovia coagulans*

Obrázek č. 18. Graf logaritmu počtu životaschopných buněk *B. coagulans* v časových odstupech po lyofilizaci



Z výše uvedeného grafu je patrné, že potenciálně kryo(lyo)protektivní roztoky TPY a 10% FOS prokázaly určitý pozitivní účinek z pohledu vitality buněk *Bombiscardovia coagulans* v průběhu lyofilizačního procesu. Životaschopné buňky byly zjištěny v obou případech v celém časově ohraničeném období pokusu, i když se jejich počet na konci pokusného bodobí výrazně snížil. Roztok na bázi prasečího mucinu neměl žádný kryo(lyo)protektivní účinek (křivka se překrývá s křivkou kontrolních lyofilizátů) na tuto bakterii reprezentující bifidobakteriím příbuzný, leč odlišný rod v rámci čeledi *Bifidobacteriaceae*.

7. Diskuze

Při lyofilizaci se z předem zmrazeného materiálu (obvykle mrazeného při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) sublimačním sušením (při $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$) přemění rovnou látky z pevného skupenství na skupenství plynné. Přestože je lyofilizační proces náročný na přípravu kultur, čas, technologický postup a speciální technické zařízení, má své veliké přednosti. Jedná se o nejšetrnější způsob konzervace až na několik let, protože si při něm lyofilizované mikroorganismy zachovávají nejvyšší možné množství původních látek, biochemické vlastnosti, přičemž jsou potlačeny negativní chemické změny (včetně oxidace). Ovšem za předpokladu správného zachování všech náležitostí procesu lyofilizace. Lyofilizace je jednou z nejčastěji využívaných metod konzervace bakterií, resp. mikroorganismů, v mezinárodních sbírkách mikroorganismů, potravinářském či biotechnologickém průmyslu a v mnoha jiných případech, kdy je člověkem využíváno prospěšných metabolických, fyziologických a jiných vlastností mikroorganismů.

Pro své široké a rozvíjející se uplatnění jsou v souvislosti s lyofilizací v současnosti zkoumány nové potencionální kryo(lyo)protektivní látky. Kryo(lyo)protektiva v podstatě svým účinkem pomáhají chránit kultury mikroorganismů při fázi zmrazení jednak před krystalizací vody a také nepřímo před dehydratací buněk, která je často způsobena tzv. osmofilním tlakem. Tyto látky tudíž nepůsobí příznivě na vitalitu buněk pouze ve zmrazovací fázi, ale také v sublimační fázi lyofilizačního procesu, kdy často dochází k prudkým změnám osmofilních tlaků.

Počet dostupných studií prokazujících víceméně kryo(lyo)protektivní účinky konkrétních látek při konzervaci bifidobakterií lyofilizací není vysoký. Velmi často se v souvislosti s ochranou buněk bifidobakterií, ale i ostatních známých probiotik náležejících do rodu *Lactobacillus*, před negativními vlivy lyofilizačního procesu diskutuje o tzv. enkapsulaci (jakémsi obalení buněk) polymerními látkami, především různými typy polysacharidů. Tento proces se zdá být velmi účinný, nicméně příprava takto upravených buněk není z technologického i finančního hlediska snadná. Z tohoto důvodu nebyla předmětem výzkumu v rámci této práce enkapsulace buněk, ale pouze zjištění možného kryo(lyo)protektivního efektu roztoků obsahující definované či nedefinované množství oligosacharidů.

Mezi roztoky látek o vymezené koncentraci, které alespoň do určité míry prokázaly kryo(lyo)protektivní účinek při lyofilizaci bifidobakteriálních kultur, náleží 4% trehalóza, 5-15% sušené rekonstituované mléko, 5-10% sacharóza, 15% laktóza (Vinderola *et al.*, 2012; Celik *et O'Sullivan*, 2013;), dále z (oligo)polysacharidových látek 1-5% inulin, dextrin (nízkomolekulární polysacharid vyráběný hydrolyzou škrobů), 1-2% alginát sodný či vápenatý,

2% želatizovaný škrob (Donthidi *et al.*, 2010; Savini *et al.*, 2010; Amakiri *et al.*, 2015), 5-10% ženšenový polysacharid (Yang *et al.*, 2006); 1,5 - 3% fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy (Capela *et al.*, 2006; Shamekhi *et al.*, 2013).

Pro svůj potenciální kryo(lyo)protektivní efekt sacharidových látek byly v rámci této práce otestovány různé roztoky na bázi oligosacharidů při procesu lyofilizace u kmenů bifidobakterií lidského i animálního původu. U lyofilizátů, kde před vlastním procesem lyofilizace byly k čerstvě narostlým kulturám přidány konkrétní roztoky možných kryo(lyo)protektiv, se zjišťovaly počty životaschopných buněk v časových odstupech po lyofilizaci a byly porovnávány s kontrolními lyofilizáty, při jejichž přípravě nebyly použity výše zmiňované roztoky. Zjištěné výsledky těchto potenciálních kryo(lyo)protektivních látek by mohly být nápomocny nejen např. při dlouhodobé konzervaci bifidobakteriálních kultur, ale také při navrhování nových synbiotických humánních i animálních lyofilizovaných preparátů. Tato forma současného podání probiotik a prebiotik umožňuje zvýšení pozitivního (synergického) efektu oproti samostatné aplikaci probiotik či prebiotik. Potvrzení možného kryo(lyo)protektivního účinku určitých oligosacharidů či roztoků oligosacharidů, u nichž byl více méně prokázán prebiotický účinek, by mohlo vést k relativně snadné a efektivní výrobě synbiotik. O prebiotických látkách bylo zjištěno, že kromě selektivní stimulace růstu a / nebo aktivity konkrétních probiotických bakterií, mohou zmírnit projevy infekcí intestinálního traktu a průjemových virových onemocnění vyvolaných aplikací antibiotik, redukovat symptomy a zánětlivé procesy u chronických zánětlivých střevních onemocnění (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida), působit protektivně vůči rozvoji kolorektálního karcinomu, zvýšit dostupnost a vstřebávání minerálních látek (hlavně vápníku a hořčíku), snížit rizikové faktory spojené s kardiovaskulárními onemocněními a redukovat váhu či preventivně působit vůči obezitě (Slavin, 2013). Nutno podotknout, že aplikovaný výzkum zaměřený na animální synbiotika využitelná především v chovech hospodářských zvířat je jaksí opožděný oproti výzkumu humánních synbiotik. Tímto význam výzkumu, který byl součástí této práce, do určité míry vzrůstá, neboť bylo pro potvrzení či vyvrácení hypotézy použito také několik animálních kmenů bifidobakterií s probiotickým potenciálem.

Výsledky této práce charakterizují, jaká byla účinnost použitých potenciálních kryo(lyo)protektiv u jednotlivých sbírkových kmenů bifidobakterií (*B. animalis* subsp. *lactis* (DSM 10140^T), *B. bifidum* (DSM 20456^T), *B. bohemicum* (DSM 22767^T), *B. bombi* (DSM 19703^T), *B. boum* (DSM 20432^T), *B. breve* (DSM 20213^T), *B. longum* subsp. *infantis* (DSM 20088^T), *B. longum* subsp. *longum* (CCM 7826^T), *B. pseudolongum* subsp. *globosum* (DSM 20092^T), *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* (DSM 17755^T), *B. thermophilum* (DSM

20210^T) a jednoho zástupce čeledi *Bifidobacteriaceae* (*Bombiscardovia coagulans*, DSM 22924^T) na základě zjištěných počtů vitálních buněk v časových odstupech po lyofilizaci, a zda byl rozdílný účinek potencionálních kryo(lyo)protektiv u bifidobakterií lidského či animálního původu.

U roztoku 5x koncentrovaného TPY s přídavkem FOS se hodnoty počtu životaschopných buněk u použitých sbírkových kmenů bifidobakterií stanovených po šesti měsících lišily od výsledků hodnot životaschopnosti buněk stanovených ihned po lyofilizaci. Po šesti měsících lyofilizace byla životaschopnost buněk zachována pouze u *B. boum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis* a *Bombiscardovia coagulans*, kdy se snížil počet životaschopných buněk o čtyři řády ve srovnání s hodnotami stanovených buněk ihned po lyofilizaci. Ovšem kontrolní lyofilizáty bez přídavku daných roztoků neobsahovaly vitální buňky již ve 30 dni od lyofilizace. U výše zmíněných bifidobakteriálních kmenů byl tudíž prokázán jistý kryo(lyo)protektivní účinek daného roztoku. Z výsledků hodnot životaschopných buněk stanovených po šesti měsících se domnívám, že při použití roztoku 5x koncentrovaného TPY jako potencionálního kryoprotektiva není účinnost ovlivněna původem bifidobakterií. Při laboratorní studii byla prokázána jistá účinnost 5x koncentrovaného TPY pouze u čtyř z dvanácti použitých sbírkových kmenů bifidobakterií. Taxon *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, který je citlivý na stresové podmínky, byl použit také ve studii Dianawati *et* Shah (2011), kteří doporučují skladovat lyofilizáty při nižší hodnotě vodní aktivity (a_w 0,07-0,1; fyzikální veličina vyjadřující míru schopnosti vody účastnit se chemických, biochemických a mikrobiálních procesů) a teplotě 25 °C, protože se tím dosáhne účinnějšího efektu v zachování jeho původní enzymové aktivity. Při námi provedené studii došlo po šesti měsících od lyofilizace ke změně struktury lyofilizátů na bázi 5x koncentrovaného TPY roztoku. Lyofilizáty vykazovaly netypické známky tmavého zhnědnutí a kompaktní lepicí strukturu. Domnívám se, že příčinou změny byly zřejmě oxidačně-redukční změny a zvýšená a_w uvnitř lyofilizátu. To mohlo být způsobeno nedostatečným hermetickým uzavřením lyofilizátů, čímž mohlo dojít k přístupu vzduchu a vzdušné vlhkosti. Třebaže tento roztok s přídavkem FOS byl navrhnut pro účely pokusu vzhledem k přítomnosti možných kryo(lyo)protektiv (pepton, sójový pepton, kvasničný autolyzát, glukóza), u nichž byl dříve prokázán kryo(lyo)protektivní efekt (Hubálek, 2003), dosažené špatné výsledky vitality buněk mohly být ovlivněny mnoha faktory. Mohla být použita příliš vysoká koncentrace jednotlivých komponent, současná interkace těchto komponent spolu s FOS také mohla negativně ovlivnit výsledek pokusu. Také vstupní koncentrace vitálních buněk ovlivňuje výsledek lyofilizace (Jensen *et al.*, 2009), což bylo také

prokázáno u bifidobakteriálních kmenů, kde byl stanoven nižší počet vitálních buněk před vlastním lyofilizačním procesem. Dalším faktorem mohla být krátká doba spolupůsobení roztoků možných kryo(lyo)protektiv s vlastními bakteriálními buňkami, kdy nemuselo dojít k jejich vstřebání zkrz buněčnou stěnu či cytoplazmatickou membránu a tím pádem ke kryo(lyo)protektivnímu účinku. Dalším ovlivňujícím faktorem mohla být fáze růstové křivky, v níž se kultury nacházely před vlastním lyofilizačním procesem (Schwab *et al.*, 2007), dále pak hodnota pH a redox potenciálu (resp. nepřímá hodnota míry anaerobního prostředí) suspenze buněk a použitého roztoku a v neposlední řadě hodnota vodní aktivity lyofilizátů či podmínky skladování. Výše uvedené faktory nemohly být v rámci této práce z časových důvodů a vzhledem k omezenému přístrojovému vybavení vzaty v potaz. Výsledek lyofilizačního procesu je ovšem ovlivněn celou řadou jiných faktorů, které budou níže diskutovány.

U roztoku na bázi 10% fruktooligosacharidů (FOS) se hodnoty počtu životaschopných buněk u použitých sbírkových kmenů bifidobakterií stanovených po šesti měsících lišily od výsledků hodnot životaschopnosti buněk stanovených ihned po lyofilizaci. Po šesti měsících lyofilizace byla životaschopnost buněk zachována pouze u *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* a *Bombiscardovia coagulans*, kdy byl snížen počet životaschopných buněk přibližně o polovinu ve srovnání s hodnotami zjištěnými ihned po lyofilizaci. U některých jiných lyofilizovaných kmenů byl prokázán nízký kryo(lyo)protektivní účinek tohoto roztoku, neboť u nich byla prokázána určitá vitalita po 30 dni a po 3 měsících od počátku lyofilizace. Z výsledků hodnot životaschopných buněk stanovených po šesti měsících se domnívám, že při použití roztoku na bázi 10% FOS jako potencionálního kryoprotektiva je účinnost především u kmenů bifidobakterií animálního původu. Stejně jako u předchozího roztoku (5x koncentrovaný TPY) byl i zde proveden kontrolní lyofilizát, u kterého stejně jako u všech ostatních testovaných kmenů klesl počet životaschopných buněk už do měsíce na nulovou hodnotu. Domnívám se také, že nízká účinnost FOS v námi provedené studii může být zapříčiněna nižším zastoupením oligosacharidů v potenciálním kryoprotektivu, třebaže jiní autoři prokázali určitý kryo(lyo)protektivní účinek i při nižších koncentracích (Shamekhi *et al.*, 2013; Capela *et al.*, 2006). Podle studie Shu *et al.* (2012) byla prokázána vyšší přežitelnost buněk u *B. bifidum* až při použití 12% přídatku fruktooligosacharidů jako prebiotik v ochranném mediu. Při použití prebiotického / kryo(lyo)protektivního roztoku 16% isomaltooligosacharidů byla zachována optimální koncentrace životaschopných buněk *B. bifidum*. Jiné faktory, které mohly negativně ovlivnit výsledek lyofilizace za použití samostatného roztoku fruktooligosacharidů, jsou zmíněny výše v rámci diskuze ovlivňujících

faktorů za použití 5x koncentrovaného roztoku TPY jakožto možného kryo(lyo)protektiva. Zde ovšem bylo opomenuto několik dalších významných, ovlivňujících faktorů. Nelze opomenout individuální charakter bifidobakteriálních kmenů, jejichž odlišné chemické složení buněčné stěny či cytoplasmatické membrány může do značné míry ovlivnit výsledek lyofilizačního procesu (Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2000). Tento faktor byl potvrzen také v rámci této diplomové práce. Lyofilizace je jeden z nejsložitějších fyzikálních a, v případě jeho použití u jakýchkoliv životaschopných buněk, také biologických procesů. Lyofilizační proces je zkoumán mnoha laboratořemi na celém světě a již nyní lze na základě mnohaletého bádání konstatovat, že neexistuje a ani nemůže existovat jednotný postup pro konzervaci bakteriálních či jiných mikrobiálních kultur touto metodou. Podstatnou roli může hrát volba lyofilizačního zařízení a nastavení podmínek lyofilizace (např. vymrazovací teploty, hodnot podtlaků apod.). Námi použitý, relativně jednoduchý, lyofilizátor neumožňoval nastavení specifických podmínek lyofilizačního procesu. Také jsme v rámci této práce z výše uvedených důvodů nezjišťovali reziduální vlhkost lyofilizátů, která by měla být v rozmezí od 1-2%. Tento faktor hraje velmi důležitou roli při zachování vitality při dlouhodobém skladování lyofilizátů.

Jako poslední byl použit roztok na bázi prasečího mucinu, u kterého se hodnoty počtu životaschopných buněk u použitých sbírkových kmenů bifidobakterií stanovených po šesti měsících lišily od výsledků hodnot životaschopnosti buněk stanovených ihned po lyofilizaci. Po šesti měsících lyofilizace byla životaschopnost buněk zachována u *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. boum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum* a *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum*, kdy se snížil počet životaschopných buněk přibližně o jeden až dva řády ve srovnání s hodnotami stanovených životaschopných buněk ihned po lyofilizaci. Většina výše uvedených taxonů (kromě *B. longum* subsp. *longum* / *infantis*) je animálního původu. U použitých sbírkových kmenů bifidobakterií měl roztok na bázi prasečího mucinu nejvyšší potenciální kryo(lyo)protektivní účinnost po šesti měsících ve srovnání získaných výsledků oproti ostatním použitým roztokům. Mucinový roztok, jako možné kryo(lyo)protektivum při lyofilizaci bakteriálních kultur, nebyl dosud zkoumán. Naše pilotní studie prokázala určitý kryo(lyo)protektivní účinek 4% roztoku mucinu u bifidobakterií především animálního původu. Ovšem u pěti ze zkoumaných taxonů (*B. bohemicum*, *B. bombi*, *B. coagulans*, *B. breve* a *B. thermophilum*) byl pozorován možný inhibiční účinek mucinového roztoku. Za zmínku stojí, že tři z pěti uvedených taxonů tvoří taxonomicky i hostitelsky specifickou skupinu bifidobakterií vyskytující se výhradně v trávicím ústrojí čmeláků (Killer *et al.*, 2009, 2011). Použití prasečího gastrického mucinu

jakožto možného kryo(lyo)protektiva u těchto taxonů se nezdá být vhodný, neboť složení a vlastnosti intestinálních mucinů savců a hmyzu jsou pravděpodobně zcela odlišné. Nelze tudíž ani zamítnout možný inhibiční účinek prasečího gastrického mucinu vůči těmto taxonům. Detailní chemická skladba prasečího gastrického mucinu nebyla určena. Muciny produkované epiteliálními buňkami v různých částech gastrointestinálního traktu mohou mít více méně odlišnou skladbu, z tohoto důvodu by bylo vhodnější pro účely pokusu použít mucin produkovaný enterocyty. Ovšem intestinální lidský či animální mucin není dostupný, nebo je jeho pořízení velmi cenově nákladné. Nicméně v této práci byl u některých bifidobakteriálních kmenů potvrzen určitý kryo(lyo)protektivní efekt 4% roztoku prasečího gastrického mucinu. Muciny jsou obecně glykoproteiny pokrývající epiteliální povrch gastrointestinálního traktu savců a jiných živočichů, přičemž až 70% hmotnostních makromolekuly mucinu reprezentují oligosacharidové řetězce navázané na proteinové jádro. Hlavními monosacharidy přítomnými v oligosacharidových řetězcích jsou N-acetylglukózamin, N-acetylgalaktózamin, galaktóza, fukóza a kyselina sialová. Mucinové řetězce tudíž reprezentují rozličnou směs dusíkatých oligosacharidů či galaktooligosacharidů (Corfield *et al.*, 1992). Zda-li byl prokázán kryo(lyo)protektivní účinek mucinového roztoku u konkrétních kmenů bifidobakterií způsoben protektivním obalením buněk (enkapsulací) mucinovým gelem, intracelulárním kryoprotektivním účinkem mucinových oligosacharidů či proteinovou složkou makromolekuly mucinu se lze pouze domnívat a měl by být tudíž předmětem dalšího bádání.

Vzhledem k důležitým a specifickým požadavkům lyofilizace se zaměřím v další části diskuze na výčet a posouzení významných faktorů, které se podílejí na procesu lyofilizace a na výsledné kvalitě lyofilizátu, a které mohly být také příčinou ovlivnění výsledků provedené studie.

Průběh lyofilizace může být ovlivněn už v počátku přípravy kultury, kdy je důležitý např. výběr vhodné kultury (grampozitivní/gramnegativní), typ růstového média, množství a růstová fáze kultur. Podle Nguyen *et al.* (2015) bylo prokázáno, že při stacionární fázi kultury je zachována vyšší životaschopnost *B. bifidum* po procesu lyofilizace. Při naší provedené studii nebyla zjišťována růstová fáze a pH narostlé kultury. Předpokládali jsme, že kultura po 24 hodinách kultivace se nachází na konci exponenciální nebo na začátku stacionární růstové fáze, a proto je vhodná pro použití v procesu lyofilizace.

Při zjišťování počtu životaschopných buněk před a po lyofilizaci a při samotné kultivaci bylo, vzhledem k námi zvoleným kulturám bifidobakterií, velmi důležité zajistit anaerobní prostředí. Při naší studii jsme zajišťovali anaerobní prostředí odstraněním vzduchu

z bioreaktoru, resp. anaerostatu, použitím katalizátoru redukujícím rezidua kyslíku a pomocí plynových bomb (CO₂, H₂). Předpokládali jsme, že tento manuální způsob zajištění anaerobního mikroklima je nejvhodnější k získání lepších výsledků počtu životaschopných buněk. Ovšem je nutné podotknout, že míra anaerobního prostředí (resp. redox-potenciál) nebyla v rámci této práce zjišťována a mohla do určité míry ovlivnit výsledek lyofilizace u citlivějších kmenů bifidobakterií.

V průběhu lyofilizace je nezbytně nutný správný způsob a rychlost zmrazování vzorku (Pushkar *et al.* 1974). Před samotnou lyofilizací byly v naší studii vzorky zmrazovány v hlubokomrazícím boxu (-75 °C), kdy pak bylo nutné vyměnit uzávěr penicilínky za lyofilizační zátku. Aby nedocházelo k tání vzorku, při výměně uzávěru penicilínky za lyofilizační zátku, byly vzorky při tomto procesu přechodně uchovány na nezbytně nutnou dobu v laboratorním mrazáku (-25 °C) a poté následně hlubokozmrazeny. Vzhledem k laboratorním podmínkám a časové náročnosti se domnívám, že tento způsob byl nejvhodnější pro zachování neporušené integrity buněk a zachování zmrzlého stavu, který je nezbytný pro sublimační sušení v lyofilizaci. Ovšem tento zásah, kdy po určitou dobu byl nutně umožněn přístup vzduchu, mohl do určité míry negativně ovlivnit životaschopnost striktně anaerobních bifidobakteriálních kultur. Je důležité zmínit, že v naší studii byla nulová hodnota životaschopných buněk do měsíce u všech kontrolních lyofilizátů (samotná kultura). Domnívám se, že tak vysoká mortalita buněk mohla být způsobena v důsledku působení osmotického tlaku při zmrazení.

Námi zhotovené lyofilizované kultury byly skladovány půl roku při laboratorní teplotě 25 °C a v temnu, což je u lyofilizovaných kultur obecně doporučováno (Kiviharju *et al.*, 2004). Podle Pehkonen *et al.* (2008) je doporučeno používat skleněné nádoby, protože se tak zachová nejvyšší životaschopnost buněk. Při použití jiného materiálu, např. plastu, se vlhkost z okolí může dostat do lyofilizátu a způsobit tak nežádoucí rehydrataci konzervovaných mikrobiálních kultur. Proto i při naší provedené studii byly lyofilizované kultury bifidobakterií ve skleněných (průhledných) penicilínových lahvičkách, aby byl tento efekt eliminován.

Pro výběr vhodného lyofilizátoru je nutné se zaměřit na využití přístroje (laboratorní/potravinářský), plochu a teplotu polic, teplotu a tlak kondenzátoru, sušící výkon, kapacitu ledu, čištění a jaký typ produktu bude lyofilizován. Aby byla zajištěna čistota přístroje, byla v naší provedené studii sušící komora lyofilizátoru před každým použitím otřena 70% etanolem. Zabránilo se tak případné kontaminaci lyofilizátů, které měly lyofilizační zátku pouze v 1/3 hrdla penicilínky (z důvodu sublimačního sušení) chráněnou aluminiovou fólií.

Z technického hlediska jsou důležitá čidla vlhkosti, teploty a tlaku rovnoměrně rozmístěna v lyofilizátoru pro zajištění kvalitnějšího výsledku procesu lyofilizace. Při poškození těchto čidel dochází k špatné přípravě lyofilizátu s následným znehodnocením výsledků prováděného výzkumu (Roy *et* Pikal, 1988). Pro účely diplomové práce byl použit laboratorní přístroj Powerdry LL 3000 vyrobený v České republice. Tento přístroj poskytuje jednoduchou manipulaci a je vhodný pro laboratorní účely, kde se používá jen malé množství materiálu. Nevýhodou tohoto přístroje je nemožnost nastavení či úpravy podmínek lyofilizačního procesu.

Vzhledem k námi získaným výsledkům ze tří použitých roztoků s oligosacharidy, bych doporučila používat roztok na bázi prasečího mucinu jako potenciální kryo(lyo)protektivní látku pro potřeby uchovávání sbírkových kmenů bifidobakterií (*B. animalis* subsp. *lactis*, *B. boum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum* a *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum*), protože po šesti měsících od lyofilizace došlo k nejvyšší hodnotě počtu přeživších buněk. Je však nutné dodat, že pro specifikaci této potenciální kryo(lyo)protektivní látky by bylo nutné prozkoumat v dalších studiích i jiné kmeny mikroorganismů s probiotickým účinkem, např. laktobacily, kde by tento roztok mohl mít teoreticky vyšší kryo(lyo)protektivní účinnost.

8. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo otestovat možné kryo(lyo)protektivní vlastnosti roztoků (5x koncentrovaného TPY media s přidavkem FOS, 10% FOS a 4% roztoku prasečího gastrického mucinu), které obsahovaly více méně specifikované oligosacharidy. Tezí této diplomové práce bylo, že právě tyto roztoky s přidavkem oligosacharidů, které mají prebiotický potenciál, mohou být používány jako kryo(lyo)protektivní látky při konzervaci animálních či lidských bifidobakterií procesem lyofilizace. Potenciální kryo(lyo)protektivní účinek tří roztoků byl zjišťován na základě počtu životaschopných buněk dvanácti vybraných sbírkových kmenů bifidobakterií lidského a animálního původu v průběhu šesti měsíců od lyofilizace.

Z výsledků naší provedené práce vyplývá potvrzení hypotézy o kryo(lyo)protektivním účinku výše zmiňovaných roztoků jen zčásti. U všech kontrolních lyofilizátů, kde byla použita pouze kultura z dvanácti vybraných sbírkových kmenů bifidobakterií, došlo po měsíci od lyofilizace k nulové hodnotě počtu životaschopných buněk. Z výsledků všech tří roztoků po šesti měsících od lyofilizace vyplývá, že potenciální kryo(lyo)protektivní účinnost roztoku 5x koncentrovaného TPY media byla pouze u čtyř z dvanácti použitých sbírkových kmenů bifidobakterií, kde se o čtyři řády snížil počet životaschopných buněk. U roztoku na bázi 10% FOS byla zjištěna potenciální kryo(lyo)protektivní účinnost s polovičním počtem životaschopných buněk pouze u dvou z dvanácti použitých sbírkových kmenů bifidobakterií. U potenciálního kryo(lyo)protektiva na bázi prasečího mucinu byly pouze se snížením o jeden až dva řády zachovány hodnoty stanovených životaschopných buněk po šesti měsících ve srovnání s hodnotami buněk ihned po lyofilizaci.

Na základě uvedených výsledků tří roztoků a kontrolních lyofilizátů je jako nejvíce účinný potenciální kryo(lyo)protektivní roztok na bázi prasečího mucinu pro dlouhodobou konzervaci určitých bifidobakteriálních kultur. Podle zjištěných výsledků tří roztoků byla prokázána vyšší ochranná účinnost u sbírkových kmenů bifidobakterií animálního původu.

9. Seznam použité literatury

- Ahn, J. B., Hwang, H. J., Park, J. H. 2001.** Physiological response of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11 (3). 443-451.
- Akalm, A. S., Fenderya, S., Akbulut, N. 2004.** Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. *International Journal of Food and Technology*. 39 (6). 613-621.
- Amakiri, A. C., Kalombo, L., Thantsha, M. S. 2015.** Lyophilised Vegetal BM 297 ATO-Inulin lipid-based synbiotic microparticles containing *Bifidobacterium longum* LMG 13197: design and characterisation. *Journal of Microencapsulation*. 32 (8). 820-827.
- Anonym 1.** Anonymous. Synbiotika [online]. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Oddělení mikrobiologie 2011 [cit. 2015-10-15]. Dostupné z <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/mikrofloraGIT/funkcnipotrav/odk3.htm>>
- Beaugerie, L., Petit, J. C. 2004.** Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Practise & Research Clinical Gastroenterology*. 18 (2). 337-352.
- Beneš, J. 2009.** Infekční lékařství—1. vydání. Galén. Praha. 651 s. ISBN: 978-80-7262-644-1.
- Berg, R. D. 1996.** The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology*. 4 (11). 430-435.
- Bested, A. C., Logan, A. C., Selhub, E. M. 2013.** Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances: Part II - contemporary contextual research. *Gut Pathogens*. 5(1):3.
- Biavati, B., Mattarelli, P. 1991.** *Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumen of cattle. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41 (1). 163-168.
- Biavati, B., Mattarelli, P. 2012.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Family Bifidobacteriaceae. Second edition. Springer. New York. 171–224. Springer. ISBN 978-0-387-9043-3.
- Biavati, B., Mattarelli, P., Crociani, F. 1991.** *Bifidobacterium saeculare*: a new species isolated from feces of rabbit. *Systematic and Applied Microbiology* 14 (4). 389-392.
- Biavati, B., Scardovi, V., Moore, W. E. C. 1982.** Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 32 (3). 358-373.

- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V. 2000.** Bifidobacteria: History, Ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*. 50 (2). 117-131.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E., Majkowska, A. 2002.** Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International*. 35 (2-3). 125-131.
- Björkstén, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T., Mikelsaar, M. 2001.** Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 108 (4). 516–520.
- Borges-Canha, M., Portela-Cidade, J. P., Dinis-Ribeiro, M., Leite-Moreira, A. F., Pimentel-Nunes, P. 2015.** Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: a systematic review. *Revista espanola de enfermedades digestivas*. 107 (11). 659-671.
- Bozoglu, T. F., Ozilgen, M., Bakir, U. 1987.** Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbial Technology*. 9 (9). 531-537.
- Březina, P., Jelínek, J. 1990.** *Chemie a technologie mléka I. část*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 166 s. ISBN 80-7080-075-5.
- Capela, P., Hay, T. K. C., Shah, N. P. 2006.** Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*. 39 (2). 203-211.
- Carey, C. M., Kostrzynska, M., Ojha, S., Thompson, S. 2008.** The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Microbiological Methods*. 73 (2). 125-132.
- Celik, O. F., O'Sullivan, D. J. 2013.** Factors influencing the stability of freeze-dried stress-resilient and stress-sensitive strains of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. 96 (6). 3506-3516.
- Coppa, G. V., Bruni, S., Morelli, L., Soldi, S., Gabrielli, O. 2004.** The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 38 (6). 80-83.
- Corfield, A. P., Wagner, S. A., Clamp, J. R., Kriaris, M. S., Hoskins, L. C. 1992.** Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infection and Immunity*. 60 (10). 3971-3978.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Chapman, D. 1984.** Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*. 223 (4637). 701–703.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Chapman, D. 1985.** Interaction of carbohydrates with dry dipalmitoylphosphatidylcholine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 236 (1). 289–296.

- Csonka, L. N. 1989.** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*. 53 (1). 121-147.
- Culpepper, T., Christman, M. C., Nieves, C. Jr., Specht, G. J., Rowe, C. C., Spaiser, S. J., Ford A. L., Dahl, W. J., Girard, S. A., Langkamp-Henken, B. 2016.** *Bifidobacterium bifidum* R0071 decreases stress-associated diarrhoea-related symptoms and self-reported stress: a secondary analysis of a randomised trial. *Beneficial Microbes*. 3. 1-10.
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., Mattarelli, P., Biavati, B., Andlid, T. 2014.** Biosynthesis and cellular content of folate in bifidobacteria across host species with different diets. *Anaerobe*. 30. 169-177.
- De Simone, C., Ciardi A., Grassi, A., Gardini, S. L., Tranzoglou, S., Trinchieri, V., Moretti, V., Jirillo E. 1992.** Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* on gut mucosa and peripheral blood B lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 14 (1), 331-340.
- Delcaru, C., Alexandru, I., Podgoreanu, P., Cristea, V. C., Bleotu, C., Chifiriuc, M. C., Bezirtzoglou, E., Lazar, V. 2016.** Antagonistic activities of some *Bifidobacterium* sp. strains isolated from resident infant gastrointestinal microbiota on Gram-negative enteric pathogens. *Anaerobe*. 39. 39-44.
- Delcenserie, V., Gavini, F., Beerens, H., Tresse, O., Franssen, C., Daube, G. 2007.** Description of a new species, *Bifidobacterium crudilactis* sp. nov., isolated from raw milk and raw milk cheeses. *Systematic and Applied Microbiology*. 30 (5). 381-389.
- Delzenne, N. M., Kok, N. N. 1999.** Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *Journal of Nutrition*. 129 (7). 1467–1470.
- Dianawati, D., Mishra, V., Shah, N. P. 2012.** Role of calcium alginate and mannitol in protecting *Bifidobacterium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (19). 6914-6921.
- Dianawati, D., Shah, P. 2011.** Enzyme Stability of Microencapsulated *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 after Freeze Drying and during Storage in Low Water Activity at Room Temperature. *Journal of Food Science*. 76 (6), 463 – 471.
- 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 (1). 119–125.
- Donthidi, A. R., Tester, R. F., Aidoo, K. E. 2010.** Effect of lecithin and starch on alginate-encapsulated probiotic bacteria. *Journal of Microencapsulation*. 27 (1). 67-77.
- Downes, J., Mantzourani, M., Beighton, D., Hooper, S., Wilson, M.J., Nicholson, A., Wade, W. G. 2011.** *Scardovia wiggsiae* sp. nov., isolated from the human oral cavity and

- clinical material, and emended descriptions of the genus *Scardovia* and *Scardovia inopinata*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 61 (1), 25-29.
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y., Schumann, P., Pukall, R., Dicks, L. M. 2012.** *Bifidobacterium reuteri* sp. nov., *Bifidobacterium callitrichos* sp. nov., *Bifidobacterium saguini* sp. nov., *Bifidobacterium stellenboschense* sp. nov. and *Bifidobacterium biavatii* sp. nov. isolated from faeces of common marmoset (*Callithrix jacchus*) and red-handed tamarin (*Saguinus midas*). Systematic and Applied Microbiology. 35 (2). 92-97.
- Eskesen, D., Jespersen, L., Michelsen B., Whorwell, P. J., Müller-Lissner, S., Morberg, C. M. 2015.** Effect of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, on defecation frequency in healthy subjects with low defecation frequency and abdominal discomfort: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. British Journal of Nutrition. 114(10). 1638-1646.
- Feltham, R. K., Power, A. K., Pell, P. A., Sneath, P. A. 1978.** A simple method for storage of bacteria at -76 degrees C. Journal of Applied Bacteriology. 44 (2). 313-316.
- Frič, P. 2007.** Probiotika a prebiotika v praxi. Medicína po promoci. 8 (6). 57-60.
- Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T., Forstner, J. F. 2001.** Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor gangliotetraosylceramide on the cell surface. International Journal of Food Microbiology. 67 (1-2). 97-106.
- Gagnon, M., Savard, P., Rivière, A., LaPointe, G., Roy, D. 2015.** Bioaccessible antioxidants in milk fermented by *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains. Biomed Research International. 2015:169381.
- Gavini, F., Beerens, H. 1999.** Origin and identification of bifidobacteria strains isolates from meat and meat products. International Journal of Food Microbiology. 46 (1). 81-85.
- Gavini, F., Delcenserie, V., Kopeinig, K., Pollinger, S., Beerens, H., Bonaparte, C., Upmann, M. 2006.** *Bifidobacterium* species isolated from animal feces and from beef and pork meat. Journal of Food Protection. 69 (4). 871-877.
- Gavini, F., Pourcher, A. M., Neut, C., Monget, D., Romond, C., Oger, C., Izard, D. 1991.** Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins. International Journal of Systematic Bacteriology. 41 (4). 548-557.
- Gibson, G. R., Saavedra, J. M., MacFarlane, S., MacFarlane, G. T. 1997.** Probiotic and intestinal infections. In: Fuller R. (Ed.): Probiotics 2: applications and practical aspects. Chapman and Hall, London. 10-31. ISBN 978-94-011-5860-2.

- Gill, S. R., Pop, M., Deboy R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., Nelson K. E. 2006.** Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 312 (5778). 1355-1359.
- Goderska, K., Czarnecki, Z. 2008.** Influence of microencapsulation and spray drying on the viability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Polish Journal of Microbiology*. 57 (2). 135-140.
- Greenwood, J. R., Pickett, M. J. 1980.** Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 30. 170-178.
- Grout, B. W. W., Morris, G. J. 1987.** The effects of low temperatures on biological systems. Freezing and cellular organization. Edward Arnlon. London. 147-174. ISBN 0713128933.
- Guarner, F., Malagelada, J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 361 (9356). 512-519.
- Harmsen, H. J., Wildeboer-Veloo, A. C., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijn, N., Bindels, J. G., Welling G. W. 2000.** Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 30 (1). 61-67.
- Hershenson, S. I. 2000.** "Freeze drying (lyophilization) is considered useful and effective for preservation of many biologically active materials." U.S. Patent No. 6020469 A.
- Holm, F.** Zdravé střevo. Denmark: Evropsky projekt Fair Flow, souhrnná zpráva o vlivech pro- a prebiotik. Flairflow4.vscht [online]. 2003 [cit. 2015-12-11] Dostupné na World Wide Web: <<http://flairflow4.vscht.cz/syntSME1.doc>>
- Holzappel, W. H., Habere, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. 2001.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73 (2). 365–373.
- Holzappel, W. H., Schillinger, U. 2002.** Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*. 35 (2-3). 109-116.
- Hoyles, L., Inganäs, E., Falsen, E., Drancourt, M., Weiss, N., McCartney, A. L., Collins M. D. 2002.** *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52 (3). 995-999.
- Hubálek, Z. 2003.** Protectans used in cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 46 (3). 205-229.

- Huys, G., Vancanneyt, M., D'Haene, K., Falsen, E., Wauters, G., Vandamme, P. 2007.** *Alloscardovia omnicoles* gen. nov., sp. nov., from human clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57 (7). 1442-1446.
- Cha, M. K., Lee, D. K., An, H. M., Lee, S. W., Shin, S. H., Kwon, J. H., Kim, K. J., Ha, N. J. 2012.** Antiviral activity of *Bifidobacterium adolescentis* SPM1005-A on human papillomavirus type 16. *BMC Medicine* 10:72. doi: 10.1186/1741-7015-10-72.
- Chenoll, E., Rivero, M., Codoñer, F. M., Martinez-Blanch, J. F., Ramón, D., Genovés, S., Moreno Muñoz, J. A. 2015.** Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Strain CECT 7210, a Probiotic Strain Active against Rotavirus Infections. *Genome Announcements*. 3(2). pii: e00105-15.
- Chiang B. L., Sheih, Y. H., Wang L. H., Liao, C. K., Gill, H. S. 2000.** Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *European Journal of Clinical Nutrition*. 54 (11). 849-855.
- Childs, C. E., Röytiö, H., Alhoniemi, E., Fekete, A. A., Forssten, S. D., Hudjec, N., Lim, Y. N., Steger, C. J., Yaqoob, P., Tuohy, K. M., Rastall, R. A., Ouwehand, A. C., Gibson G. R. 2014.** Xylo-oligosaccharides alone or in synbiotic combination with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* induce bifidogenesis and modulate markers of immune function in healthy adults: a double-blind, placebo-controlled, randomised, factorial cross-over study. *British Journal of Nutrition*. 111 (11). 1945-1956.
- Choi, J. H., Lee, K. M., Lee, M. K., Cha, C. J., Kim, G. B. 2014.** *Bifidobacterium faecale* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 (9). 3134-3139.
- Chong, E. S. 2014.** A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30 (2). 351-374.
- Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I. I., Montag, M., Dessole, S., Nawroth, F., van der Ven, H. 2004.** Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biology of Reproduction*. 71 (4). 1167-1173.
- Jensen, P. D., Hardin. M. T., Clarke, W. P. 2009.** Effect of biomass concentration and inoculum source on the rate of anaerobic cellulose solubilization. *Bioresource Technology*. 100 (21). 5219-5225.

- Jian, W., Dong, X. 2002.** Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52 (3). 809-812.
- Jiang, H. Q., Bos, N. A., Cebra, J. J. 2001.** Timing, localization and persistence of colonization by segmented filamentous bacteria in the neonatal mouse gut depend on immune states of mothers and pups. *Infection and Immunity*. 69 (6). 3611-3617.
- Karlsson, H., Hesse, C., Rudin, A. 2002.** Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. *Infection and Immunity*. 70 (12). 6688-6696.
- 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 (12). 1348-1359.
- Kilara, A., Shahani, K. M., Das, N. K. 1976.** Effect of cryoprotective agents on freeze-drying and storage of lactic cultures. *Cultured Dairy Products Journal*. 11. 8-11.
- Killer, J., Havlík, J., Bunesova, V., Vlkova, E., Benada, O. 2014.** *Pseudoscardovia radai* sp. nov., another representative of a new genus within the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the digestive tract of a wild pig (*Sus scrofa scrofa*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 (9). 2932-2938.
- Killer, J., Kopečný, J., Mrázek J., Havlík, J., Koppová, I., Benada O., Rada V., Kofroňová O. 2010.** *Bombiscardovia coagulans* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the digestive tract of bumblebees. *Systematic and Applied Microbiology*. 33 (7). 359-366.
- Killer, J., Kopečný, J., Mrázek, J., Koppová, I., Havlík, J., Benada O., Kott, T. 2011.** *Bifidobacterium actinocoloniiforme* sp. nov. and *Bifidobacterium bohemicum* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61 (6). 1315-1321.
- Killer, J., Kopečný, J., Mrázek, J., Rada, V., Benada, O., Koppová, I., Havlík, J., Straka, J. 2009.** *Bifidobacterium bombi* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59 (8). 2020-2024.
- Killer, J., Mrázek, J., Bunešová, V., Havlík, J., Koppová, I., Benada, O., Rada, V., Kopečný, J., Vlková, E. 2013b.** *Pseudoscardovia suis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the digestive tract of wild pigs (*Sus scrofa*). *Systematic and Applied Microbiology*. 36 (1). 11-16.

- Killer, J., Ročková, Š., Vlková, E., Rada, V., Havlík, J., Kopecny, J., Bunesová, V., Benada, O., Kofronová, O., Pechar, R., Profousová, I. 2013a.** *Alloscardovia macacae* sp. nov., isolated from the milk of a macaque (*Macaca mulatta*), emended description of the genus *Alloscardovia* and proposal of *Alloscardovia criceti* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63 (12). 4439-4446.
- Kim, P. I., Jung, M. Y., Chang, Y. H., Kim, S., Kim, S. J., Park, Y. H. 2007.** Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74 (5). 1103-1111.
- Kiviharju, K., Leisola, M., von Weymarn, N. 2004.** Light sensitivity of *Bifidobacterium longum* in bioreactor cultivations. *Biotechnology Letters*. 26 (6). 539-542.
- Kobyliak, N., Conte, C., Cammarota, G., Haley, A. P., Styriak I., Gaspar, L., Fusek, J., Rodrigo, L., Kruzliak, P. 2016.** Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. *Nutrition & Metabolism London*. 13 (14).
- Kot, E., Bezkorovainy, A. 1999.** Binding of ferric iron to the cell walls and membranes of *Bifidobacterium thermophilum*: effect of free radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (11). 4606-4610.
- Kyzlink, V. 1988.** Teoretické základy konzervace potravin. Vyd. 1. Praha. Nakladatelství technické literatury. 286 s.
- Lauer, E. 1990.** *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. isolated from human feces. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 40 (1). 100-102.
- Lee do, K., Kang, J. Y., Shin, H. S., Park, I. H., Ha, N. J. 2013.** Antiviral activity of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 against Hepatitis B virus. *Archives of Pharmacal Research*. 36 (12). 1525-1532.
- Lee, Y., Salminen, S. 2009.** Handbook of probiotics and prebiotics, second edition, John Wiley & Sons. ISBN: 9780470135440.
- Li, B. Q., Tian, S. P. 2007.** Effect of intracellular trehalose in *Cryptococcus laurentii* and exogenous lyoprotectants on its viability and biocontrol efficacy on *Penicillium expansum* in apple fruit. *Letters in Applied Microbiology*. 44 (4). 437-442.
- Liapis, A., Bruttini, R. 1994.** A theory for the primary and secondary drying stages of the freeze-drying of pharmaceutical crystalline and amorphous solutes: comparison between experimental data and theory. *Separations Technology*. 4 (3). 144–155.
- Lievens, L. C., Verbeek, M. A. M., Taekema, T., Meerdink, G., Riet K. V. 1992.** Modelling the inactivation of *Lactobacillus plantarum* during a drying proces. *Chemical Engineering Science*. 47 (1). 87-97.

- Lilly, D. M., Stillwell, R. H. 1965.** Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147. 747-748.
- Lukáš, F., Koppová, I., Kudrna, V., Kopečný, J. 2007.** Postnatal development of bacterial population in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiologica*. 52 (1). 99-104.
- Makino, H., Kushiro, A., Ishikawa, E., Kubota, H., Gawad, A., Sakai, T., Oishi, K., Martin, R., Ben-Amor, K., Knol, J., Tanaka, R. 2013.** Mother-to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early development of vaginally delivered infant's microbiota. *PLoS One*. 8 (11):e78331.
- Manson, J. M., Rauch, M., Gilmore, M. S. 2008.** The commensal microbiology of the gastrointestinal tract. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 635. 15-28.
- Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J. F., Rambaud, J. C. 1990.** Effect of the microbial lactase activity in yogurt on the intestinal adsorption of lactose. An in vivo study in lactase – deficient humans. *British Journal of Nutrition*. 64 (1). 71-79.
- Masco, L., Ventura, M., Zink, R., Huys, G., Swings, J. 2004.** Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54 (4). 1137-1143.
- 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 (10). 4506-4512.
- Mattarelli, P., Bonaparte, C., Pot, B., Biavati, B. 2008.** Proposal to reclassify the three biotypes of *Bifidobacterium longum* as three subspecies: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* subsp. nov., *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* comb. nov. and *Bifidobacterium longum* subsp. *suís* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58 (4). 767-772.
- Maxa, V., Rada, V. 2002.** Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. 1. vydání Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací. 42 s. ISBN: 80-85120-57-7.
- Mendonca, F. H., Santos, S. S., Faria Ida, S., Gonçalves e Silva, C. R., Jorge, A. O., Leão, M. V. 2012.** Effects of probiotic bacteria on Candida presence and IgA anti-Candida in the oral cavity of elderly. *Brazilian Dental Journal*. 23 (5). 534-8.
- Meryman, H.T., 1971.** Cryoprotective agents. *Cryobiology*. 8 (2). 173-183.
- Michellini, S., Oki, K., Yanokura, E., Shimakawa, Y., Modesto, M., Mattarelli, P., Biavati,**

- B., Watanabe, K. 2016.** *Bifidobacterium myosotis* sp. nov., *Bifidobacterium tissieri* sp. nov. and *Bifidobacterium hapali* sp. nov., isolated from faeces of baby common marmosets (*Callithrix jacchus* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66 (1). 255-265.
- Milani, C., Lugli, G. A, Duranti, S., Turrone, F., Bottacini, F., Mangifesta, M., Sanchez, B., Viappiani, A., Mancabelli, L., Taminiu, B., Delcenserie, V., Barrangou, R., Margolles, A., van Sinderen, D., Ventura, M. 2014.** Genomic encyclopedia of type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 80 (20). 6290-6302.
- Miquel, S., Martín, R., Rossi, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Chatel, J. M., Sokol, H., Thomas, M., Wells, J. M., Langella, P. 2013.** *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Current Opinion in Microbiology*. 16 (3). 255-261.
- Mitsuoka, T. 1969.** Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung I*. 210. 52-64.
- Miyamoto-Shinohara, Y., Imaizumi, T., Sukenobe, J., Murakami, Y., Kawamura, S., Komatsu Y. 2000.** Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology*. 41 (3). 251-255.
- Miyamoto-Shinohara, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T., Nakahara, T. 2008.** Survival of freeze-dried bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 54 (1). 9-24.
- Modesto, M., Michelini, S., Stefanini, I., Ferrara, A., Tacconi, S., Biavati, B., Mattarelli, P. 2014.** *Bifidobacterium aesculapii* sp. nov., from the faeces of the baby common marmoset (*Callithrix jacchus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 (8). 2819-2827.
- Modesto, M., Michelini, S., Stefanini, I., Sandri, C., Spiezio, C., Pisi, A., Filippini, G., Biavati, B., Mattarelli P. 2015.** *Bifidobacterium lemorum* sp. nov., from faeces of the ring-tailed lemur (*Lemur catta*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65 (6). 1726-1734.
- Morita, H., Nakano, A., Onoda, H., Toh, H., Oshima, K., Takami, H., Murakami, M., Fukuda, S., Takizawa, T., Kuwahara, T., Ohno, H., Tanabe, S., Hattori, M. 2011.** *Bifidobacterium kashiwanohense* sp. nov., isolated from healthy infant faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61 (11). 2610-2615.
- Moroni, O., Kheadr, E., Boutin, Y., Lacroix, C., Fliss, I. 2006.** Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Bifidobacterium* strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (11). 6894-6901.

- Morowitz, M. J., Carlisle, E. M., Alverdy, J. C. 2011.** Contributions of intestinal bacteria to nutrition and metabolism in the critically ill. *Surgical Clinics of North America*. 91(4). 771-785.
- Müting, D., Leimbeck, R., Flasshoff, J. 1986.** The effect of fortified viable *B. bifidum* intestinal microbial ecology, toxic protein metabolites and liver function: a controlled clinical study in liver cirrhosis with portal hypertension. *Microecology and Therapy*. 16. 287-395.
- Nova, E., Pérez de Heredia, F., Gómez-Martínez, S., Marcos, A. 2016.** The Role of Probiotics on the Microbiota: Effect on Obesity. *Nutrition in Clinical Practice*. Feb 11. pii: 0884533615620350 (in press).
- Nguyen, H. T., Razafindralambo, H., Richel, A., Jacquet, N., Evrard, P., Antoine, P., Thonart, P., Delvigne, F. 2015.** Scalable temperature induced stress for the large-scale production of functionalized Bifidobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 42 (9). 1225-1231.
- Ohno, H., Tsunemine, S., Isa, Y., Shimakawa, M., Yamamuru, H. 2005.** Oral Administration *Bifidobacterium bifidum* G9-1 Suppresses Total and Antigen Specific Immunoglobulin E Production in Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 28 (8). 1462-1466.
- Okamoto, M., Benno, Y., Leung, K. P., Maeda, N. 2008.** *Bifidobacterium tsurumiense* sp. nov., from hamster dental plaque. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58 (1). 144-148.
- Orla-Jensen, S. 1924.** La classification des bactéries lactiques. *Le Lait*. 4(36). 468-474.
- Ouwehand, A. C., Tiihonen, K., Makivuokko, H., Rautonen, N. 2007.** Synbiotics: combining the benefits of pre – and probiotics. In: Mattila-Sandholm T., Saarela M. (eds): *Functional dairy products*. Woodhead publishing, Cambridge. 195-209. ISBN 9781845691530.
- Pehkonen, K. S., Roos, Y. H., Miao, S., Ross, R. P., Stanton, C. 2008.** State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). *Journal of Applied Microbiology*. 104 (6). 1732-1743.
- Pereira, D. I. A., Gibson, G. R. 2002.** Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (9). 4689-4693.
- Petr, J., Rada, V. 2001.** Bifidobacteria are obligate inhabitants of the crop of adult laying hens. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*. 48 (3). 227-233.

- 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 (1). 179-185.
- Pop, O. L., Brandau, T., Schwinn, J., Vodnar, D. C., Socaciu, C. 2015.** The influence of different polymers on viability of *Bifidobacterium lactis* 300b during encapsulation, freeze-drying and storage. *Journal of Food Science and Technology*. 52 (7). 4146-4155.
- Porubcan, R. S., Sellars, R. L. 1979.** Lactic starter culture concentrates. In: Peppler, H.J., Perlman, D., editors. *Academic Press, New York. Microbial Technology*. 1 (2). 59-92.
- Potts, M. 1994.** Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews*. 58 (4). 755-805.
- Praet, J., Meeus, I., Cnockaert, M., Aerts, M., Smagghe, G., Vandamme, P. 2015.** *Bifidobacterium commune* sp. nov. isolated from the bumble bee gut. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107 (5). 1307-1313.
- Pushkar, N. S., Rozanov, L. F., Gordienko, E. A. Itkin, IuA. 1974.** Certain aspect of cell injury in freezing. *Problemy Gematologii i Perelivaniia Krovi journal*. 19 (4). 44-47.
- Rada V., Petr J. 2000.** A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods*. 43 (2). 127-132.
- Rada, V. 2010.** Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní medicína pro praxi*. 12 (2). 92-97.
- Rada, V., Máchová, M., Huk, J., Marounek, M., Dušková, D. 1997.** Microflora in the honeybee digestive tract: counts, characteristics and sensitivity to veterinary drugs. *Apidologie*. 28 (6). 357-365.
- Rada, V., Petr, J. 2002.** Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. *Veterinary-Medicine Czech* 47 (1). 1-4.
- Radhey, S. 1998.** Protein Phylogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships among Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (4). 1435-1491.
- Rafter, J. 2002.** Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *British Journal of Nutrition*. 88 (1). 89-94.
- Reuter, G. 1963.** Vergleichende untersuchungen über die bifidus-flora im säuglings- und erwachsenenstuhl. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Orig Abt I*. 191. 486-507.
- Riedel, C. U., Foata, F., Philippe, D., Adolfsson, O., Eikmanns, B. J., Blum, S. 2006.** Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation. *World Journal of Gastroenterology*. 12 (23). 3729-3735.

- Rijkers, G. T., de Vos, W. M., Brummer, R. J., Morelli, L., Corthier, G., Marteau, P. 2011.** Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. *British Journal of Nutrition*. 106 (9). 1291-1296.
- Roberfroid, M. 2007.** Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*. 137 (3). 830-837.
- Rosberg-Cody, E., Ross, R. P., Hussey, S., Ryan, C. A., Murphy, B. P., Fitzgerald G. F., Devery, R., Stanton, C. 2004.** Mining the microbiota of the neonatal gastrointestinal tract for conjugated linoleic acid-producing bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (8). 4635-4641.
- Roy, M. L., Pikal, M J. 1989.** Process control in freeze drying: determination of the end point of sublimation drying by an electronic moisture sensor. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 43 (2). 60-66.
- Safronova, V. I., Novikova, N. I. 1996.** Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: Lyophilization and liquid nitrogen freezing. *Journal of Microbiological Methods*. 24 (3). 231-237.
- Saito, Y., Hamanaka, Y., Saito, K., Takizawa, S., Benno, Y. 2002.** Stability of species composition of fecal bifidobacteria in human subjects during fermented milk administration. *Current Microbiology*. 44 (5). 368-373.
- Sanders, M. E. 1999.** Probiotics. *Food Technology*. 53 (11). 67-77.
- Sanders, M. E. 2008.** Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases*. 46 (2). 58-61.
- Sanz-Penella, J.M., Tamayo-Ramos, J.A., Sanz, Y., Haros, M. 2012.** Phytate reduction in bran-enriched bread by phytase-producing Bifidobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (21). 10239–10244.
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Akkermans, A. D. L., Saarela, M., de Vos W. M. 2001.** Bifidobacterial diversity in human reeces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (2). 504-513.
- Savini, M., Cecchini, C., Verdenelli, M. C., Silvi, S., Orpianesi, C., Cresci, A. 2010.** Pilot-scale production and viability analysis of freeze-dried probiotic bacteria using different protective agents. *Nutrients*. 2 (3). 330-339.
- Scardovi V., Crociani, F. 1974.** *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 24. 6-20.

- Scardovi, V. 1986.** Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins. 2. 1418–1434.
- Scardovi, V., Trovatelli L. D. 1969.** New species of bifidobacteria from *Apis mellifica* and *Apis indica*. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr hyg Abt I Orig. 123 (2). 64-88.
- Scardovi, V., Trovatelli, L. D., Biavati, B., Zani, G. 1979.** *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum*, and *Bifidobacterium pseudocatenulatum*: four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. International Journal of Systematic Bacteriology. 29 (4). 291-311.
- Scardovi, V., Zani, G. 1974.** *Bifidobacterium magnum* sp. nov., a large acidophilic Bifidobacterium isolated from rabbit faeces. International Journal of Systematic Bacteriology. 24 (1). 29-34.
- Sears, C. L. 2005.** A dynamic partnership: celebrating our gut flora. Anaerobe. 11 (5). 247-251.
- Sedláček, I. 2007.** Taxonomie prokaryot (Taxonomy of prokaryotes). 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN: 80-210-4207-9.
- Sela, D. A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J. H., Chen, F., Whitehead, T. R., Lapidus, A., Rokhsar, D. S., Lebrilla, C. B., German, J. B., Price, N. P., Richardson, P. M., Mills, D. A. 2008.** The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. Proceedings of the National Academy of Sciences. 105 (48). 18964-18969.
- Shah, N. P., Lankaputhra, W. E. V., 2002.** *Bifidobacterium* spp.: Applications in fermented milks. In: Roginski, H., Fuquay, J. W., Fox, P. F. (Eds) Encyclopedia of Dairy Sciences. London. Academic Press, (vol 1). 141-151.
- Shamekhi, F., Shuhaimi, M., Ariff, A., Manap, Y. A. 2013.** Cell viability of microencapsulated *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* under freeze-drying, storage and gastrointestinal tract simulation conditions. Folia Microbiologica (Praha). 58 (2). 91-101.
- Shanahan, F. 2002.** The host-microbe interface within the gut. Best Practise & Research Clinical Gastroenterology. 16 (6). 915-931.
- Shokri, Z., Fazeli, M. R., Ardjmand, M., Mousavi, S. M., Gilani, K. 2015.** Factors affecting viability of *Bifidobacterium bifidum* during spray drying. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 23:7.

- Shu, G. W., Hu, M, Qin, T., Chen, H., Q. Ma, Q. 2012.** Effect of Fructo-Oligosaccharide, Isomalto-Oligosaccharide, Inulin and Xylo-Oligosaccharide on Survival of *B. Bifidum* during Freeze-Drying, *Advanced Materials Research*. 382. 454-457
- Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M. C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. D., Arigoni, F. 2002.** The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99 (22). 14422-14427.
- Schindler, J.** Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.
- Schloss, P., Handelsman, J., 2004.** Status of the microbial census. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. 68 (4). 686–691.
- Schwab, C., Vogel, R., Gänzle, M. G., 2007.** Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology*. 55 (2). 108-114.
- Simione, F. P., Jr. 1992.** Key issues relating to the genetic stability and preservation of cells and cell banks. *Journal of Parenteral Science and Technology*. 46 (6). 226-232.
- Simpson, P. J., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. 2004.** *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54 (2). 401-406.
- Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. 2003.** Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. *Jornal of Bacteriology*. 185 (8). 2571-2581.
- Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. 2005.** Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*. 99 (3). 493-501.
- Slavin, J. 2013.** Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*. 5 (4). 1417-1435.
- Steenbergen, L., Sellaro, R., van Hemert, S., Bosch, J. A., Colzato, L. S. 2015.** A randomized controlled trial to test the effect of probiotics on cognitive reactivity to sad mood. *Brain, Behavior, and Immunity*. 48. 258-264.
- Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M. 1998.** Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology*. 85 (S1). 19-28.

- Šilhánková, L., 2008.** Mikrobiologie pro potravináře a mikrobiology. 3. vydání, Praha: Academia. 363 s. ISBN: 80-20010-24-6.
- Tahri, K., Crociani, J., Ballongue, J., Schneider, F. 1995.** Effect of three strains of bifidobacteria on cholesterol. Letters in Applied Microbiology. 21 (3). 149-151.
- Tanabe, S., Suzuki, T., Wasano, Y., Nakajima, F., Kawasaki, H., Tsuda, T., Nagamine, N., Tsurumachi, T., Sugaya, K., Akita, H., Takagi, M., Takagi, K., Inoue, Y., Asai, Y., Morita, H. 2014.** Anti-inflammatory and Intestinal Barrier-protective Activities of Commensal Lactobacilli and Bifidobacteria in Thoroughbreds: Role of Probiotics in Diarrhea Prevention in Neonatal Thoroughbreds. Journal of Equine Science. 25 (2). 37-43.
- Tanner, S. A., Chassard, C., Zihler Berner, A., Lacroix, C. 2014.** Synergistic effects of *Bifidobacterium thermophilum* RBL67 and selected prebiotics on inhibition of *Salmonella* colonization in the swine proximal colon PolyFermS model. Gut Pathogens. 6(1):44.
- Tao, D., Li, P. H. 1986.** Classification of plant cryoprotectants. Journal of Theoretical Biology. 123 (3). 305–310.
- Trovatelli, L. D., Crociani, F., Pedinotti, M., Scardovi, V. 1974.** *Bifidobacterium pullorum* sp. nov.: a new species isolated from chicken feces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit feces. Archives of Microbiology. 98 (1). 187-198.
- Tsuchida, S., Takahashi, S., Nguema, P.P., Fujita, S., Kitahara, M., Yamagiwa, J., Ngomanda, A., Ohkuma, M., Ushida, K. 2014.** *Bifidobacterium moukalabense* sp. nov., isolated from the faeces of wild west lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 64 (2). 449-455.
- Underwood, M. A., German, J. B., Lebrilla, C. B., Mills, D. A. 2015.** *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*: champion colonizer of the infant gut. Pediatric Research. 77 (1-2). 229-235.
- Vazquez-Gutierrez, P., Lacroix, C., Jaeggi, T., Zeder, C., Zimmerman, M. B., Chassard C. 2015.** Bifidobacteria strains isolated from stools of iron deficient infants can efficiently sequester iron. BMC Microbiology. 15:3. doi: 10.1186/s12866-014-0334-z.
- Ventura, M., Van Sinderen, D., Fitzgerald, G. F., Zink, R. 2004.** Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 86 (3). 205-223.
- Vinderola, G., Zacarías, M. F., Bockelmann, W., Neve, H., Reinheimer, J., Heller, K. J. 2012.** Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. Food Microbiology. 30 (1). 274-280.

- Vlasova, A. N., Chattha, K. S., Kandasamy, S., Liu, Z., Esseili, M., Shao, L., Rajashekara, G., Saif, L. J. 2013.** Lactobacilli and bifidobacteria promote immune homeostasis by modulating innate immune responses to human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *PLoS One*. 8(10).76962.
- Vlková, E., Rada, V., Trojanová, I. 2004.** Enumeration, isolation and identification of bifidobacteria from dairy products. *Acta Agriculturae Slovenica*. 84 (1). 31-36.
- Vlková, E., Trojanová, I., Rada V. 2006.** Distribution of bifidobacteria in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiologica*. 51 (4). 325-328.
- Votavová, A., Killer, J. 2014.** Probiotický výživový doplněk pro čmeláky. Užiténý vzor č. CZ 27148.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J. 2006.** Fermented Milks. Dairy Science and Technology. Boca Raton: CRC Press. 570- 571. ISBN 978-0824727635.
- Watanabe, J., Benno, Y., Mitsuoka, T. 1983.** *Bifidobacterium gallinarum* sp. nov.: a new species isolated from the ceca of chickens. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 33 (2). 127-132.
- Watanabe, K., Makino, H., Sasamoto, M., Kudo, Y., Fujimoto, J., Demberel, S. 2009.** *Bifidobacterium mongoliense* sp. nov., from airag, a traditional fermented mare's milk product from Mongolia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59 (6). 1535-1540.
- Wei, M., Wang, Z., Liu, H., Jiang, H., Wang, M., Liang, S., Shi, K., Feng, J. 2014.** Probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi-07 alleviates bacterial translocation and ameliorates microinflammation in experimental uraemia. *Nephrology (Carlton)*. 19 (8). 500-506.
- Wickramasinghe, S., Pacheco, A. R., Lemay, D. G., Mills, D. A. 2015.** Bifidobacteria grown on human milk oligosaccharides downregulate the expression of inflammation-related genes in Caco-2 cells. *BMC Microbiology*. 15:172.
- Woting, A., Pfeiffer, N., Hanske, L., Loh, G., Klaus, S., Blaut, M. 2015.** Alleviation of high fat diet-induced obesity by oligofructose in gnotobiotic mice is independent of presence of *Bifidobacterium longum*. *Molecular Nutrition & Food Research*. 59 (11). 2267-2278.
- Wright, C. T., Klaenhammer T. R. 1983.** Influence of Calcium and Manganese on Dechaining of *Lactobacillus bulgaricus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 46 (4). 785-792.
- Yaeshima, T., Fujisawa, T., Mitsuoka, T. 1992.** *Bifidobacterium globosum*, subjective synonym of *Bifidobacterium pseudolongum*, and description of *Bifidobacterium pseudolongum*

subsp. *pseudolongum* comb. nov. and *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* comb. nov. Systematic and Applied Microbiology. 15 (3). 380-385.

Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. 1982. Somero GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science. 217 (4566). 1214-1222.

Yang, S. H., Seo, S. H., Kim, S. W., Choi, S. K., Kim, D. H. 2006. Effect of ginseng polysaccharide on the stability of lactic acid bacteria during freeze-drying process and storage. Archives of Pharmacal Research. 29 (9). 735-740.

Yoo, J. Y., Kim, S. S. 2016. Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders. Nutrients. 8 (3).

Yuan, H., Liddle, F. J., Mahajan, S., Franj, D. A. 2004. IL-6-induced survival of colorectal carcinoma cells is inhibited by butyrate through down-regulation of the IL-6 receptor. Carcinogenesis. 25 (11). 2247-2255.

Zacarias, M. F., Reinheimer, J., Forzani, L., Grangette, C., Vinderola, G. 2014. Mortality and translocation assay to study the protective capacity of *Bifidobacterium lactis* INL1 against *Salmonella Typhimurium* infection in mice. Beneficial Microbes. 5 (4). 427-436.

Zavaglia, A. G., Kociubinski, G., Pérez, P., Disalvo, E., De Antoni, G. 2002. Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. Journal of Applied Microbiology. 93 (5). 794-799.

Zhao, G., He, L., Zhang H., Ding, W, Liu, Z., Luo, D., Gao, D. 2004. Trapped water of human erythrocytes and its application in cryopreservation. Biophysical Chemistry. 107 (2). 189-95.

Zhu, L., Li, W., Dong, X. 2003. Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53 (5). 1619-1623.