

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Využívání sacharidů druhem *Bifidobacterium animalis*

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Barbora Dvořáková

Vedoucí práce: prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Využívání sacharidů druhem *Bifidobacterium animalis*“ 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: 10. 4. 2017

Poděkování

Velice děkuji panu prof. Ing. Vojtěchu Radovi, CSc. za čas, který mi věnoval při vedení diplomové práce, a za rady, ochotu a odbornou pomoc při výzkumu v laboratoři.

Využívání sacharidů druhem *Bifidobacterium animalis*

Souhrn

V této diplomové práci je studována schopnost poddruhu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* využívat glukosu, galaktosu a laktosu.

Jako testované bifidobakterie byly použity dva kmeny již zmíněného poddruhu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* izolované z jogurtu (DAN) a výkalů štěněte (V1/2). Pomocí turbidimetrie byla změřena optická denzita narostlých bakterií, následně stanoveny růstové výtěžky váhovou metodou a dále byl výzkum zaměřen na enzymovou aktivitu daného poddruhu.

Výzkumem bylo zjištěno, že některé zdroje uhlíku podporují růst bakterií více a některé méně. Z naměřených výsledků lze obecně konstatovat, že oba testované kmeny poddruhu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* pravděpodobně nejsou schopny využívat galaktosu jako zdroj uhlíku, a to jak ve formě samotného monosacharidu, což vyplývá z výsledků měření optické denzity, kde nebyl zaznamenán žádný růst na galaktose, tak jako součást disacharidu laktosy, což se projevilo na růstových výtěžcích tím, že v případě laktosy došlo k nižšímu nárůstu biomasy ve srovnání s glukosou. Tento fakt je statisticky průkazný.

V případě použití výše zmíněných kmenů poddruhu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ve fermentovaném mléčném výrobku poslouží jako zdroj uhlíku bakteriím pouze glukosa a galaktosa zůstane z laktosy nevyužita.

Klíčová slova: glukosa, galaktosa, laktosa, bifidobakterie

Utilization of saccharides by species *Bifidobacterium animalis*

Summary

In this diploma thesis, the ability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to utilize glucose, galactose and lactose was tested.

Two subspecies of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* were used. The first strain (DAN) was isolated from yoghurt, the second one (V1/2) originated from dog faeces. Optical density of grown bacteria was measured using turbidimetry. Then growth gain was measured using weighting method. Enzymatic activity of bifidobacteria was also tested.

It was found out that some carbon sources were utilized by bacteria more and others less. It is possible to say based on measured values that both tested subspecies of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* are probably not able to utilize galactose as carbon source but utilize lactose. Finding for galactose monosaccharide is based on results of optical density measurement. No bacteria growth was observed there. Finding for galactose being part of lactose disaccharide is based on growth gain measurement. In case of lactose growth of bacteria biomass was smaller than growth on lactose. This observation is statistically significant based on measurement results.

When tested species of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* are used in fermented dairy products, only glucose will serve as carbon source for bacteria and galactose in lactose disaccharide will not be utilized by them at all.

Keywords: glucose, galactose, lactose, bifidobacteria

I. Obsah

| | | |
|-------------|---|-------------|
| I. | Obsah..... | ix |
| II. | Seznam tabulek..... | xi |
| III. | Seznam obrázků | xiii |
| 1 | Úvod..... | 1 |
| 2 | Literární rešerše | 3 |
| 2.1 | Rod <i>Bifidobacterium</i> spp. | 3 |
| 2.1.1 | Výskyt bifidobakterií..... | 3 |
| 2.1.2 | Význam bifidobakterií..... | 6 |
| 2.1.3 | Izolace a identifikace bifidobakterií | 8 |
| 2.1.4 | <i>Bifidobacterium animalis</i> | 9 |
| 2.1.4.1 | Taxonomie | 9 |
| 2.1.4.2 | Výskyt..... | 10 |
| 2.1.4.3 | Využití jako probiotikum..... | 10 |
| 2.2 | Sacharidy | 11 |
| 2.2.1 | Monosacharidy | 12 |
| 2.2.1.1 | Glukosa | 12 |
| 2.2.1.2 | Galaktosa | 13 |
| 2.2.1.3 | Fruktosa | 13 |
| 2.2.2 | Oligosacharidy..... | 15 |
| 2.2.2.1 | Laktosa..... | 15 |
| 2.2.2.2 | Další oligosacharidy..... | 17 |
| 2.2.3 | Polysacharidy | 17 |
| 2.3 | Prebiotika | 18 |
| 2.3.1 | Laktulosa, laktitol a kyselina laktobionová..... | 19 |
| 2.3.2 | Fruktooligosacharidy | 19 |
| 2.3.3 | Galaktooligosacharidy | 19 |
| 3 | Cíl..... | 21 |
| 4 | Materiál a metoda | 23 |
| 4.1 | Mikroorganismy..... | 23 |
| 4.2 | Použitá kultivační média | 23 |
| 4.2.1 | Wilkins-Chalgren bujón | 23 |
| 4.2.2 | Význam složek bujónu | 24 |
| 4.2.3 | Příprava bujónu | 24 |
| 4.3 | Kultivační podmínky | 25 |
| 4.3.1 | Měření optické denzity turbidimetrickou metodou | 26 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.3.2 | API ZYM test | 27 |
| 4.3.3 | Růstové výtěžky | 28 |
| 4.4 | Přístroje použité při výzkumu | 30 |
| 4.4.1 | Mikroskop Nikon eclipse E200..... | 30 |
| 4.4.2 | Laboratorní inkubátor | 30 |
| 4.4.3 | Spektrofotometr (denzitometr) Biosan, McFarland DEN 1B | 31 |
| 4.4.4 | Centrifuga Eppendorf Mini Spin a Universal 320R | 32 |
| 4.4.5 | Lyofilizátor Power Dry LL3000..... | 33 |
| 4.4.6 | Laboratorní váhy Mettler AE 200 | 33 |
| 5 | Výsledky | 35 |
| 5.1 | Měření optické denzity | 35 |
| 5.2 | Růstové výtěžky | 36 |
| 5.2.1 | Růstové výtěžky vzorků kmene DAN | 36 |
| 5.2.2 | Růstové výtěžky vzorků kmene V1/2 | 38 |
| 5.2.3 | Grafické porovnání přírůstku | 41 |
| 5.3 | API ZYM test | 42 |
| 6 | Diskuse..... | 47 |
| 7 | Závěr | 49 |
| 8 | Reference | 50 |

II. Seznam tabulek

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 Znamé druhy bifidobakterií v současné době (Bunešová, et al., 2014)..... | 4 |
| Tabulka 2 Přehled složení hlavních druhů mlék v g na 100 g mléka (Michaelsen, et al., 2003) | 16 |
| Tabulka 3 Běžně užívaná synbiotika (Sekhon & Jairath, 2010)..... | 20 |
| Tabulka 4 Receptura Wilkins-Chalgren bujónu (Anon., 2015)..... | 23 |
| Tabulka 5 Složení pufu..... | 28 |
| Tabulka 6 Optická denzita vzorku <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (DAN) | 35 |
| Tabulka 7 Optická denzita vzorku <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (V1/2)..... | 35 |
| Tabulka 8 Růstové výtěžky vzorků kmene DAN při růstu na glukose | 37 |
| Tabulka 9 Růstové výtěžky vzorků kmene DAN při růstu na laktose..... | 37 |
| Tabulka 10 Dvou výběrový F-test pro rozptyl pro růstové výtěžky vzorků kmene DAN při růstu na glukose a laktose | 37 |
| Tabulka 11 Dvou výběrový T-test pro soubory s nestejným rozptylem pro růstové výtěžky vzorků kmene DAN při růstu na glukose a laktose | 38 |
| Tabulka 12 Růstové výtěžky vzorků kmene V1/2 při růstu na glukose | 39 |
| Tabulka 13 Růstové výtěžky vzorků kmene V1/2 při růstu na laktose | 39 |
| Tabulka 14 Dvou výběrový F-test pro rozptyl pro růstové výtěžky vzorků kmene V1/2 při růstu na glukose a laktose | 39 |
| Tabulka 15 Dvou výběrový T-test pro soubory se stejným rozptylem pro růstové výtěžky vzorků kmene V1/2 při růstu na glukose a laktose | 40 |
| Tabulka 16 Vyhodnocení API ZYM testu podle návodu pro vzorky DAN pro rozbité, odstředěné a celé buňky | 44 |
| Tabulka 17 Vyhodnocení API ZYM testu podle návodu pro vzorky V1/2 pro rozbité, odstředěné a celé buňky | 45 |

III. Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek 1 Struktura molekuly D – glukosa (Anon., 2006) | 12 |
| Obrázek 2 Struktura molekuly D – galaktosa (Anon., 2006) | 13 |
| Obrázek 3 Struktura molekuly D – fruktosa (Anon., 2006) | 15 |
| Obrázek 4 Struktura molekuly laktosa (Minichová, et al., 20015)..... | 16 |
| Obrázek 5 Struktura molekuly rafinosa (Mañas, 2017)..... | 17 |
| Obrázek 6 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (DAN)..... | 25 |
| Obrázek 7 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (V1/2)..... | 26 |
| Obrázek 8 Demonstrace růstu bakterií pomocí detekce zákalu (turbidimetrie) | 27 |
| Obrázek 9 API ZYM test | 28 |
| Obrázek 10 Lyofilizace..... | 29 |
| Obrázek 11 Mikroskop Nikon eclipse E200..... | 30 |
| Obrázek 12 Laboratorní inkubátor..... | 31 |
| Obrázek 13 Denzitometr..... | 31 |
| Obrázek 14 Centrifuga Eppendorf Mini Spin..... | 32 |
| Obrázek 15 Centrifuga Universal 320R..... | 32 |
| Obrázek 16 Lyofilizátor..... | 33 |
| Obrázek 17 Laboratorní váhy | 33 |
| Obrázek 18 Porovnání optické denzity vzorků DAN a V1/2 po 24 hodinách při růstu na glukose, laktose a galaktose | 36 |
| Obrázek 19 Porovnání změřených růstových výtěžků při růstu na laktose a glukose pro vzorky kmenů DAN a V1/2 | 41 |
| Obrázek 20 Porovnání změřených růstových výtěžků vzorků DAN a V1/2 při růstu na laktose a glukose | 41 |
| Obrázek 21 API ZYM test pro vzorky DAN pro rozbité, odstředěné a celé buňky..... | 42 |
| Obrázek 22 API ZYM test pro vzorky V1/2 pro rozbité, odstředěné a celé buňky..... | 42 |
| Obrázek 23 Návod pro vyhodnocení API ZYM testu | 43 |

1 Úvod

Druh *Bifidobacterium animalis* je druhem bifidobakterií běžně používaných v potravinářském průmyslu, který je uváděn na trh po celém světě v různých mléčných výrobcích a kojenecké výživě (Saavedra, et al., 2004). Druh vykazuje vlastnosti typické pro rod *Bifidobacterium*. Bifidobakterie jsou anaerobní bakterie, které jsou schopné štěpit sacharidy (Hopkins, et al., 1998).

V návaznosti na bakalářskou práci (Dvořáková, 2015) předpokládáme, že různé substráty budou rozdílně využívány druhem *Bifidobacterium animalis*, což se projeví na růstových křivkách a růstových výtěžcích. Z naměřených výsledků výše uvedené bakalářské práce lze obecně konstatovat, že druh *Bifidobacterium animalis* velmi dobře využívá glukosu, laktosu i rafinosu jako zdroj uhlíku. Naopak se zdá, že využívání galaktosy je obtížné. Jedná se hlavně o druh *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, u kterého se zdá, že není schopen galaktosu využít vůbec. Na tuto problematiku se zaměříme ve výzkumu této diplomové práce.

2 Literární rešerše

V této kapitole je charakterizován rod *Bifidobacterium* spp., jeho výskyt, význam, významní zástupci a možnosti laboratorní izolace a identifikace. Dále je charakteristika zaměřena na poddruh *Bifidobacterium animalis*, který bude testován v rámci praktické části této diplomové práce. Další podkapitola je zaměřena na rozdělení a charakteristiku sacharidů. Poslední podkapitola popisuje prebiotika, jejich význam a využití.

2.1 Rod *Bifidobacterium* spp.

Bifidobakterie patří mezi obligátně anaerobní organismy. Mohou tedy žít pouze v prostředí, které neobsahuje kyslík (Anon., 2012). Nejlepší kultivační teplota se pohybuje kolem 37 °C. K inhibici dochází při teplotách nižších než 25 °C a vyšších než 45 °C. Optimální pH prostředí se pohybuje v rozmezí 6,5 až 7 (Snah, 2000). Jsou to grampozitivní nesporeující nepohyblivé bakterie (Solano-Aguilar, et al., 2008; Biavati & Mattarelli, 2001). Jedná se o pleomorfní tyčinky s různým větvením. Často se vyskytují v kyjovitém tvaru. Tyčinky s různým větvením se nejčastěji vyskytují ve tvaru písmene Y nebo písmene V (Mullan, 2008). Bifidobakterie jsou často zahrnovány mezi bakterie mléčného kvašení. Důvodem je produkce mléčné kyseliny jako jednoho z hlavních produktů fermentace (Biavati, 2001). Hlavním produktem fermentace sacharidů je však octová kyselina (Tamura, 1983).

2.1.1 Výskyt bifidobakterií

Bifidobakterie se obvykle vyskytují v gastrointestinálním traktu lidí i jiných živočichů. Trávicí soustava průměrného jedince je přirozeným prostředím pro přibližně 10^{11} až 10^{12} mikroorganismů na gram střevního obsahu, střevní mikrobiota tvoří z celkové biomasy více než 1 kg hmotnosti (Hattori & Taylor, 2009). Patří mezi první kolonizátory gastrointestinálního traktu a převládají v něm u kojených dětí do odstavu (Favier, et al., 2002).

K bakteriální kolonizaci lidského střeva dochází hned po narození. Závisí na mnoha faktorech. Jedním z nich je způsob porodu, zda proběhl přirozenou cestou nebo císařským řezem. Dále způsob výživy dítěte, tedy mateřským mlékem nebo umělou výživou. Dalšími faktory jsou užívání antibiotik, hygienické podmínky a různá onemocnění, zvláště infekce gastrointestinálního traktu (Fanaro, et al., 2003). Ve složení stolice kojených dětí jsou zastoupeny zejména bifidobakterie (Kelly, et al., 2007).

Tabulka 1 Známé druhy bifidobakterií v současné době (Bunešová, et al., 2014)

| Druh | Výskyt |
|---|---|
| <i>B. actinocoloniformis</i> | Střevo čmeláka |
| <i>B. adolescentis</i> | Střevo dospělých jedinců, bachor skotu |
| <i>B. angulatum</i> | Lidské střevo, kanalizace |
| <i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> | Výkaly kuřat a krys |
| <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> | Jogurt |
| <i>B. asteroides</i> | Střevo včely medonosné |
| <i>B. biavati</i> | Výkaly tamarinda |
| <i>B. bifidum</i> | Střevo dospělých jedinců, stolice kojených dětí |
| <i>B. bohemicus</i> | Střevo čmeláka |
| <i>B. bombi</i> | Střevo čmeláka |
| <i>B. boum</i> | Hovězí bachor |
| <i>B. breve</i> | Střevo kojenců |
| <i>B. callitrichos</i> | Výkaly kočkodana |
| <i>B. catenulatum</i> | Lidská stolice, kanalizace |
| <i>B. choerinum</i> | Prasečí výkaly |
| <i>B. coryneforme</i> | Střevo včely medonosné |
| <i>B. crudilactis</i> | Syrové mléko, sýry ze syrového mléka |
| <i>B. cuniculi</i> | Králičí výkaly |
| <i>B. dentium</i> | Lidský zubní kaz |
| <i>B. gallicum</i> | Střevo dospělých |
| <i>B. gallinarum</i> | Kuřecí slepé střevo |
| <i>B. indicum</i> | Střevo včely medonosné |
| <i>B. kashiwanohense</i> | Stolice zdravého kojence (děvče; 1,5 roku) |
| <i>B. longum</i> | Střevo dětí a dospělých |

| Druh | Výskyt |
|--|------------------------------------|
| <i>subsp. infantis</i> | Střevo kojenců |
| <i>subsp. suis</i> | Prasečí výkaly |
| <i>subsp. longum</i> | Střevo dospělých, telecí výkaly |
| <i>B. magnum</i> | Králičí výkaly |
| <i>B. merycicum</i> | Bachor |
| <i>B. minimum</i> | Odpadní vody |
| <i>B. mongoliense</i> | Fermentovaný mléčný kobydí výrobek |
| <i>B. moukalabense</i> | Stolice gorily nížinné |
| <i>B. pseudocatenulatum</i> | Lidská stolice, odpadní vody |
| <i>B. pseudolongum subsp. globosum</i> | Bachor |
| <i>B. pseudolongum subsp. pseudolongum</i> | Prasečí a kuřecí výkaly |
| <i>B. psychraerophylum</i> | Prasečí slepé střevo |
| <i>B. pullorum</i> | Kuřecí výkaly |
| <i>B. reuteri</i> | Výkaly kočkodana |
| <i>B. ruminantium</i> | Bachor |
| <i>B. saeculare</i> | Králičí výkaly |
| <i>B. saguini</i> | Výkaly tamarinda |
| <i>B. scardovii</i> | Lidská krev |
| <i>B. stellenboschense</i> | Výkaly tamarinda |
| <i>B. stercoris</i> | Stolice zdravé 27leté ženy |
| <i>B. subtile</i> | Odpadní vody |
| <i>B. thermophilum</i> | Prasečí výkaly, hovězí bachor |
| <i>B. thermacidophilum ssp. porcinum</i> | Prasečí výkaly |

| Druh | Výskyt |
|--|-------------------|
| <i>B. thermacidophilum ssp. thermacidophilum</i> | Odpadní vody |
| <i>B. tsurumiense</i> | Zubní plak křečka |

2.1.2 Význam bifidobakterií

Bifidobakterie patří mezi převládající skupiny anaerobních bakterií v trávicím traktu člověka a zvířat. Předpokládá se, že působí příznivě na lidské zdraví. Mezi příznivé vlivy se řadí zejména ochranné činnosti proti patogenům, výroba antimikrobiálních látek, například bakteriocidů nebo blokování adheze patogenů. Mají vliv na energetickou rovnováhu hostitele, protože fermentují nestravitelnou vlákninu a jsou schopny anaerobního metabolismu peptidů a proteinů (Backhed, et al., 2004). Dalším příznivým faktorem je modulace imunitní odpovědi (Rastall, et al., 2005). Výzkum střevní mikrobioty odhalil existenci jejího mutualistického vztahu s lidmi. Dále byly objeveny významné rozdíly ve složení střevní mikrobioty různých jedinců a tyto rozdíly byly spojeny se změnami lidské fyziologie nebo predispozice k různým onemocněním (Filippo, et al., 2010).

Bifidobakterie jsou, jako většina střevních bakterií, sacharolytické a mají důležitou roli ve fermentaci sacharidů v tlustém střevě. Bifidobakterie mohou fermentovat různé komplexní zdroje uhlíku. Tyto komplexní sacharidy mohou být dietní sloučeniny, například rezistentní škroby, glykogen, galaktan, xylan nebo pektin, dále hostitelem produkované sloučeniny jako je mucin, glykosfingolipidy, chondroitin sulfát, kyselina hyaluronová a heparin (Hooper, et al., 2002). Dalšími zdroji uhlíku jsou ty, které produkují ostatní mikroorganismy ve střevní mikrobiotě (Korakli, et al., 2002). Množství a druh nestravitelných sacharidů přítomných ve stravě má přímý vliv na metabolické aktivity a také počet a složení lidské střevní mikrobioty (Walker, et al., 2006). Střevní mikroorganismy mohou využít řadu různých nutričních zdrojů, které unikají degradaci v horní části gastrointestinálního traktu. Schopnost metabolizovat určité sacharidy je ovšem závislá na druhu bifidobakterií. Například *Bifidobacterium longum* využívá meleucitosu nebo animální druhy využívají škrob (Vrese & Schrezenmeir, 2008). Střevní bakterie rozkládají sacharidy s nízkou molekulovou hmotností, které mohou být následně rozložitelné na monosacharidy pomocí široké škály enzymů, které sacharidy štěpí (Scardovi, 1984; Vries & Stouthamer, 1967).

Za degradaci glukosy odpovídá fruktoso-6-fosfoketolasa. Je to enzym typický pro rod *Bifidobacterium*. Stanovení tohoto enzymu představuje rozhodující test pro jejich identifikaci (Scardovi, 1984). Bifidobakterie jsou schopny syntetizovat aminokyseliny (glutamovou kyselinu a asparagovou kyselinu), riboflavin a thyamin (Teraguchi, et al., 1984).

Některé bifidobakterie jsou komerčně využívány jako probiotické mikroorganismy. Růst a metabolická činnost probiotických bakterií, včetně bifidobakterií, může být selektivně stimulována pomocí různých potravinových sacharidů, které se nazývají prebiotika (Gibson, 2008).

Rod *Bifidobacterium* fermentuje hexosy v unikátní metabolické dráze označované jako fruktoso-6-fosfátová dráha, ve které je klíčovým enzymem již zmíněná fruktoso-6-fosfoketolasa. Byly popsány dva druhy tohoto enzymu. Fruktoso-6-fosfoketolasa, která je typická u druhů, které se vyskytují u člověka, a xyluloso-5-fosfát/fruktoso-6-fosfát fosfoketolasa, která je charakteristická pro druhy, které se vyskytují u zvířat. Hlavními koncovými produkty této dráhy jsou octová kyselina a mléčná kyselina, které vznikají v poměru 3:2. Oxid uhličitý se v této dráze netvoří. Vzniká ovšem u degradace glukonátu (Ventura, et al., 2004). Dalšími koncovými metabolity této dráhy mohou být mravenčí kyselina, jantarová kyselina, která může ovlivňovat konečný poměr octové a mléčné kyseliny, a etanol (Meulen, et al., 2006).

Kromě glukosy bifidobakterie využívají i další sacharidy jako jsou laktosa, galaktosa, rafinosa, sacharosa a další. Substráty, jako jsou manitol a sorbitol, fermentují jen některé druhy. Bifidobakterie také mají některé extracelulární enzymy, díky kterým jsou schopny hydrolyzovat polysacharidy, jako jsou amylopektin, amylosa (tedy škrob) nebo xylan (Scardovi, 1984). Růst bifidobakterií je stimulován přítomností růstových faktorů. Ty jsou mimo jiné metabolizovány i v gastrointestinálním traktu člověka střevní mikrobiotou. Jsou to například threonin, cystein, kvasniční extrakt, pepton, dextrin a další. Látky, které procházejí gastrointestinálním traktem člověka až do tlustého střeva, kde jsou přednostně metabolizovány bifidobakteriemi, se nazývají bifidogenní faktory. Mezi ně patří sacharidy obsahující N-acetylglukosaminy, fruktooligosacharidy, laktoferin, laktulosa, laktitol, rafinosa, stachyosa, inulin, xylooligosacharidy a jiné. Fruktooligosacharidy, glukooligosacharidy, sójové oligosacharidy a inulin jsou v porovnání s jinými oligosacharidy využívány přednostně. Většina bakterií přítomných v gastrointestinálním traktu tyto substráty nevyužívá (Rossi, et al., 2005).

Zástupci bifidobakterií produkují množství vitaminů, jako například thiamin (B1), pyridoxin (B6), kyselinu listovou (B9) a kyselinu nikotinovou. Naopak většina druhů, které byly izolovány z člověka, vyžaduje ke svému růstu vitamin B2 a kyselinu pantotenovou. Zdrojem dusíku pro většinu druhů jsou amonné soli. Aktivita enzymů glutamátdehydrogenasy a glutaminsynthetasy umožňuje asimilaci amoniaku (Ventura, et al., 2004).

2.1.3 Izolace a identifikace bifidobakterií

Podle výzkumu (Zinedine & Faid, 2007) mohou být druhy bifidobakterií izolovány z různých zdrojů. Například ze stolice novorozenců, hovězího masa nebo fermentovaného mléka. Každý vzorek je uchováván ve sterilním prostředí obsahujícím pepton, vodu, L-cystein a je homogenizován. Následně jsou vzorky nanášeny na MRS¹ agar a inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin v anaerobních podmínkách.

Podle (Vlková, et al., 2015) je široce používán mupirocin spolu s octovou kyselinou jako selektivními faktory média. TOS (transgalactosylated oligosaccharides) médium doplněné mupirocinem doporučuje Mezinárodní mlékařská federace pro detekci bifidobakterií ve fermentovaných mléčných výrobcích. Média s mupirocinem a octovou kyselinou jsou spolehlivá i pro vzorky ze střeva, ve kterých převažují právě bifidobakterie. Nicméně pro komplexní vzorky, obsahující více rozmanitou mikrobiotu, je selektivita médií s mupirocinem omezena. Odolnost vůči mupirocinu byla prokázána u mnoha anaerobních bakterií, zejména klostridií. Tento problém byl vyřešen přidáním antibiotika, které inhibuje růst klostridií a umožňuje růst bifidobakterií. Tímto antibiotikem je norfloxacin.

Identifikace rodu *Bifidobacterium* se provádí pomocí detekce enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolasy, díky kterému jsou bakterie tohoto rodu schopny metabolizovat hexosy a tento enzym je pro ně specifický. Je to hlavní znak, kterým se bifidobakterie liší od ostatních bakterií (Orban & Paterson, 2000). Existují různé typy testování přítomnosti enzymu. Existují i další biochemické testy včetně stanovení dalších enzymů a utilizace sacharidů pro identifikaci bifidobakterií na úroveň rodu a druhu (Scardovi, 1984). Konečná identifikace bifidobakterií se v současné době provádí hlavně pomocí sekvenace genů jako je gen pro 16SrRNA, *hsp60* a další (Killer, et al., 2013).

¹ MRS agar – růstové médium pro bakterie, které bylo vyvinuto v roce 1960 a nese jméno podle svých vynálezců, de Man, Rogosa a Sharpe (de Man, et al., 1960)

2.1.4 *Bifidobacterium animalis*

Jedná se o druh bifidobakterií běžně používaných v potravinářském průmyslu, který je uváděn na trh po celém světě v různých mléčných výrobcích a kojenecké výživě (Saavedra, et al., 2004). Druh vykazuje vlastnosti typické pro rod *Bifidobacterium*. Jsou to grampozitivní nemotilní nesporulující nepravidelně tyčinkovité anaerobní bakterie. Glukosa je štěpena pomocí charakteristického enzymu fruktosa-6-fosfát fosfoketolasy. Dále jsou fermentovány dextriny, maltosa, maltotriosa, rafinosa a sacharosa. Škrob fermentován není (Masco, et al., 2004).

2.1.4.1 Taxonomie

Taxonomie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* byla sporná od jejího původního popisu (Meile, et al., 1997). Několik studií zkoumalo jeho podobnosti s blízkými příbuznými druhy *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* od (Scardovi & Trovatelli, 1974). Nové poznatky genotypu, které uvádí (Ventura & Zink, 2002; Ventura & Zink, 2003; Ventura, et al., 2003; Zhu & Dong, 2003; Masco, et al., 2004; Kwon, et al., 2005), ukazují, že *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* a *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* by měly být považovány za dva oddělené taxonomické subjekty na úrovni poddruhů.

Podle (Cai, et al., 2000) bylo zjištěno, že *Bifidobacterium lactis* JCM 10602T (T = typ kmene) a *Bifidobacterium animalis* JCM 1190T, jsou si fenotypově podobné. Tyto druhy byly podrobeny zkoumání jejich genetické informace. 16S rRNA sekvence *Bifidobacterium animalis* byla porovnána s ostatními druhy rodu *Bifidobacterium*. *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* si byly nejvíce blízké mezi příbuznými druhy fylogenetického stromu a vykazovaly vysokou podobnost sekvencí (98,8 %). Hladiny DNA-DNA hybridizace mezi oběma druhy se pohybovaly v rozmezí od 85,5 do 92,3 %, což opět ukazuje, že představují samostatný druh.

Bifidobacterium animalis subsp. *animalis* podle (Masco, et al., 2004) nevykazuje žádný růst v případě inkubace na vzduchu nebo na vzduchu obohaceném oxidem uhličitým. Také kmen nevykazuje žádný růst v mléce nebo jiném médiu na bázi mléka. Optimální růstová teplota je 39 až 41 °C.

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* podle (Masco, et al., 2004) nevykazuje žádný růst ve styku se vzduchem, ale toleruje 10 % kyslíku v atmosféře, růst se vyskytuje v mléce nebo na jiných médiích na bázi mléka a optimální růstová teplota je 39 až 42 °C. Tento kmen tedy

vykazuje vlastnosti, které se liší od kmene *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*. Jsou jimi zvýšená tolerance kyslíku (Prasad, et al., 1998), diferenciální růst v médiích na bázi mléka (Ventura & Zink, 2002) a hydrolýza mléčných proteinů (Janer, et al., 2005). To usnadňuje růst v komerčních produktech za anaerobních podmínek.

2.1.4.2 Výskyt

Poddruh *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* byl poprvé identifikován ve výkalech krysy a kuřat (Scardovi & Trovatelli, 1974). Kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* byl poprvé identifikován v jogurtu (Meile, et al., 1997).

Bunešová, et al. (2012) identifikovali a charakterizovali nové kmeny *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* z psích fekálií. Jednalo se o 4 feny, 6 kojených štěňat a 4 odstavená štěňata německého ovčáka. Tyto kmeny byly vedeny jako typické pro mléčné produkty. Izoláty, pocházející z těchto psů, vykazují dobré funkční vlastnosti předpovídající jejich schopnost přežít v gastrointestinálním traktu a mohly by být testovány jako potenciální probiotika pro psy.

2.1.4.3 Využití jako probiotikum

Podle Organizace pro výživu a zemědělství OSN (FAO) a Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou probiotika definována jako živé mikroorganismy, které při podání v přiměřeném množství pozitivně působí na zdraví hostitele (Anon., 2001).

Organismy, které jsou používány jako probiotika, musí splňovat několik základních požadavků. Musí mít prokazatelně pozitivní vliv na zdraví hostitele, musí být zdravotně nezávadné, izolované ze stejného živočišného druhu jako je předpokládáný příjemce a nesmí mít toxické ani patogenní účinky (Nevoral & Bronský, 2010).

Probiotické organismy přispívají ke stabilizaci střevní mikrobioty kompeticí s patogenními organismy o vazebná místa na receptorech a o živiny. Produkují mastné kyseliny s krátkými řetězci, například kyselinu octovou, propionovou a máselnou. Důsledkem těchto procesů je pokles pH střevního obsahu. Dále zvyšují rozpustnost minerálních látek a omezují zpětnou resorpci žlučových kyselin. Stabilizují střevní slizniční bariéry, produkují antimikrobiální substance, kterými mohou inhibičně působit na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Mezi tyto látky patří organické kyseliny, peroxid vodíku a bakteriociny. Probiotika nejen snižují počet živých buněk, ale ovlivňují také metabolismus bakterií a produkci toxinů. Dále stimulují imunitní odpověď na patogeny zvýšenou produkcí sekrečních imunoglobulinů,

protizánětlivě působících cytokinů a sníženou produkcí prozánětlivých cytokinů (Nevoral & Bronský, 2010).

V posledních letech se stává trendem výzkum probiotických bakterií a jejich aplikace do různých typů produktů. Dříve byly probiotické mikroorganismy zahrnuty jen v mléčných výrobcích a potravinových doplňcích. Možnosti aplikace probiotik do většího počtu výrobků, jako jsou ovocné šťávy a obiloviny, se nyní plně rozvíjí (Heller, 2001; Crittenden, 2009). Použití probiotik v dostatečném množství je důležité pro pozitivní účinky v gastrointestinálním traktu člověka. Výrobky obsahující probiotické mikroorganismy by měly zahrnovat alespoň 10^6 životaschopných buněk na 1 gram v den expirace kvašeného mléčného výrobku (Picot & Lacroix, 2004).

Životaschopnost probiotických buněk je snížena řadou faktorů, jako jsou průběh výroby, skladování produktu a také samotný průchod gastrointestinálním traktem spotřebitele. Mezi tyto faktory patří nízké pH, vysoká teplota, aerobní prostředí, koncentrace žlučových solí, trávicí enzymy a další. Jeden ze způsobů, jak chránit buňky před těmito stresovými faktory, je zapouzdření neboli enkapsulace probiotických mikroorganismů (Adhikari, et al., 2000).

Právě metoda enkapsulace byla použita pro kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, kdy byl komerční probiotický kmen BB12 zapouzdřen za použití enkapsulační emulze do mléčné proteinové matrice bez a s přídavkem lecitinu (Lisová, et al., 2013).

2.2 Sacharidy

Sacharidy představují velkou skupinu chemických látek. Spolu se svými deriváty se vyskytují v každé buňce. Jsou důležitým a lehkým dostupným zdrojem energie, tvoří základní složky živých organismů (chytin a celulóza), tvoří zásobní látky (glykogen, škrob) a také jsou nejrozsaáhlejší třídou biologicky aktivních molekul (koenzymy, glykoproteiny). Ve tkáních jsou sacharidy biologickými prekurzory lipidů, bílkovin a jiných složek živé hmoty. Základ struktury sacharidů tvoří alifatické polyhydroxykarbonylové sloučeniny, aldehydy a ketony, obecně nazývané jako monosacharidy (Šípál, et al., 1992).

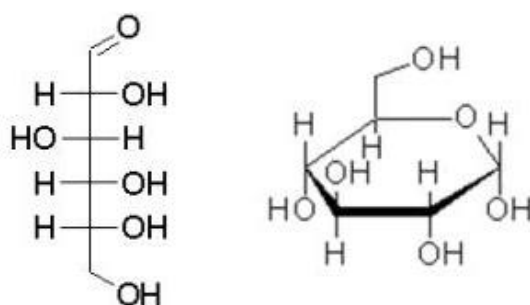
Sacharidy se dělí podle počtu cukerných jednotek do tří základních skupin na mono, oligo a polysacharidy. Spojováním monosacharidů acetalovou vazbou vznikají oligosacharidy, které jsou tvořeny dvěma až deseti monosacharidovými jednotkami, a polysacharidy, které jsou tvořeny více sacharidovými jednotkami (Šípál, et al., 1992).

2.2.1 Monosacharidy

Monosacharidy jsou strukturně nejjednodušší, nelze je štěpit hydrolyzou na jednodušší sloučeniny. Obsahují jednu cukernou jednotku (Blatná, 2005). Jsou to bezbarvé látky, které jsou rozpustné v polárních rozpouštědlech a téměř nerozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Některé z nich mají výrazně sladkou chuť. Většinou se v přírodě vyskytují ve vázaných formách. Výjimku tvoří glukosa a některé ketosy (Šípál, et al., 1992).

2.2.1.1 Glukosa

Glukosa je nejběžnějším a nejrozšířenějším sacharidem v přírodě. Patří mezi aldohexosy.



Obrázek 1 Struktura molekuly D – glukosa (Anon., 2006)

Nachází se v ovoci, rostlinných šťávách, medu, v krvi v koncentraci 3,9-5,6 mmol/l, lymfě a v mozkomíšním moku. Ve vázané formě se často vyskytuje v oligosacharidech, polysacharidech a heteroglykosidech. Z biochemického hlediska jsou významné fosforečné estery glukosy, protože jde o první stupeň rozkladu hexos (Mašek & Cícvárek, 1973). Je snadno vstřebatelná a energeticky dobře využitelná (Velíšek, 1999). Přes buněčnou membránu obvykle prochází pasivním transportem pomocí bílkovinných přenašečů. Přes membránu buněk střevního epitelu a ledvinových tubulů prochází aktivním transportem, symportem se sodnými ionty. Pomocí mikroorganismů je přeměňována na ethanol a laktát (Kodíček, 2007). Tato fermentace se v mikrobiologii využívá pro identifikaci mikroorganismů. Používají se agary s obsahem glukosy, například pro *Bacillus cereus*, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes* a *Clostridium botulinum* (Jičinská & Havlová, 1996).

Glukosa je významný zdroj energie pro organismus savců. Z tohoto důvodu se používá ve vodných roztocích pro infuze při léčbě různých patologických stavů (Kodíček, 2007). Pro některé lidské buňky, zejména buňky mozku a červené krvinky, je glukosa jediným zdrojem energie. Tyto tkáně spotřebují za 24 hodin přibližně 150 gramů glukosy. Na řízení koncentrace

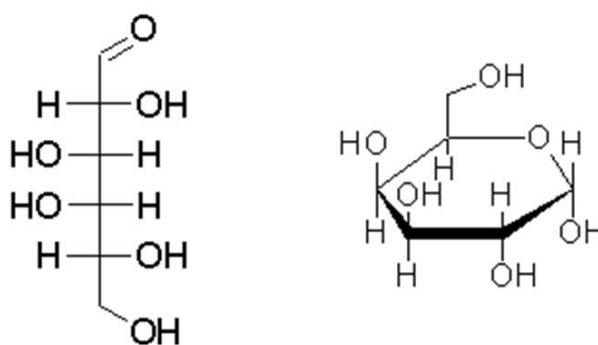
v krvi se podílejí hormony insulin, který snižuje koncentraci v krvi a glukagon, adrenalin, kortizol a somatotropin, které hladinu glukosy zvyšují (Musil, 1994).

V průmyslu je používána jako výchozí surovina pro další procesy, například ethanolové kvašení. Glukosa se připravuje kyselou hydrolyzou kukuřičného, pšeničného či bramborového škrobu, nebo také enzymovou hydrolyzou sacharosy. Farmaceutický a chemický průmysl využívá glukosu především na výrobu D-glucitolu a na něj navazující výrobu L-askorbátu (Pacák, 1975).

2.2.1.2 Galaktosa

Galaktosa je monosacharid, který je běžně přijímán stravou. V přírodě se vyskytuje pouze ve vázané formě. Především se nachází v laktose, disacharidu, který je tvořen jednotkou glukosy a galaktosy. Dále se galaktosa vyskytuje v sójových oligosacharidech a v rostlinných gumách a slizích. U živočichů se nachází jako součást cerebrosidů mozku a nervové tkáně.

V lidském těle slouží především jako zdroj energie, protože se přeměňuje na deriváty glukosy a vstupuje do glykolýzy. Také je substrátem pro syntézu glykolipidů, glykoproteinů a proteoglykanů. Důležitou úlohu hraje galaktosa v syntéze laktosy v mléčné žláze matky. Galaktosa se pomocí enzymu galaktosyltransferasy sloučí s glukosou a vznikne laktosa. V přírodě se vyskytuje i L-galaktosa, která je obsažena v agaru a v glykoproteinech (Jindra, et al., 1966; Ledvina, 2009).



Obrázek 2 Struktura molekuly D – galaktosa (Anon., 2006)

2.2.1.3 Fruktosa

Fruktosa je monosacharid, který se běžně nachází v ovoci a v medu. Ve vázané formě se vyskytuje v disacharidu sacharose. Je nejrozšířenější hexoketosou v přírodě a zároveň je to přirozený cukr s největší sladivostí. Nezpůsobuje zvýšení krevního cukru, protože má odlišný

metabolismus než glukosa. Resorpce fruktosy střevní sliznicí je pomalejší než u glukosy. Prvním orgánem, který fruktosu metabolizuje, jsou játra (Ledvina, 2009).

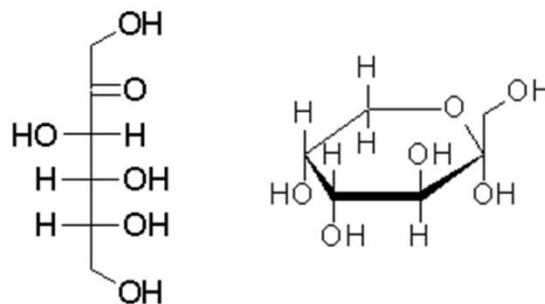
Fruktosa je ze střeva transportována glukosovými transportéry GLUT 5 a difunduje do portální žíly transportéry GLUT 2. Na rozdíl od glukosy absorpce fruktosy z lumen střeva nevyžaduje hydrolýzu ATP, což usnadňuje její akumulaci v játrech. Většina glukosy resorbované ze střeva je transportována do cévního oběhu, kde zvyšuje glykémii a je využita v periferních tkáních jako energetický substrát nebo pro tvorbu glykogenových a lipidových rezerv. Naproti tomu fruktosa po absorpci ze střeva nezvyšuje krevní koncentrace fruktosy ani glukosy, je přiváděná portálním oběhem do jater, kde probíhá její metabolická přeměna (Kazdová, et al., 2013).

Fruktosa v játrech je využita pro syntézu pyruvátu, laktátu, syntézu triacylglycerolů a částečně je i oxidována na oxid uhličitý. Příčinou rozdílu v kvantitativní utilizaci fruktosy a glukosy v játrech je jednak výrazně vyšší aktivita fruktokinasy fosforylující fruktosu než fosfotransferas (glukokinasa a hexokinasa) fosforylujících glukosu a dále pak fruktoso-1-P je přímo štěpen na triosy, to znamená, že obchází fosfofruktokinasovou reakci, která je rychlost limitujícím krokem jaterního metabolismu glukosy. Fruktosa v játrech inhibuje oxidaci lipidů ve prospěch reesterifikace mastných kyselin a syntézy VLDL frakce cholesterolu. Oproti tomu glukosa je v játrech využívána převážně pro tvorbu glykogenu. Vysoká kapacita jater syntetizovat prekurzory triglyceridů (mastné kyseliny, glycerofosfát, triacylglyceroly) a vydávat je ve formě VLDL triglyceridů do cirkulace, je hlavní příčinou hypertriglyceridemického efektu vyvolaného zvýšeným příivodem fruktosy. Na rozdíl od glukosy není vysoká utilizace fruktosy v játrech ovlivněna inzulinem a je zachována i za stavů, kdy utilizace glukosy ve tkáních je výrazně snížena, například při diabetu a hladovění (Kazdová, et al., 2013).

V poslední době je věnována značná pozornost zvýšené akumulaci triglyceridů v játrech, která je definována jako zvýšení obsahu triglyceridů na 5 až 10 % hmotnosti jater. Na základě vysoké prevalence inzulinové rezistence u pacientů s jaterní steatosou a v řadě studií zjištěná akumulace lipidů v játrech u osob s metabolickým syndromem, je dnes jaterní steatosa považována za součást poruch provázející metabolický syndrom. U zdravých dobrovolníků dieta s obsahem 25 % celkové energie ve formě sacharosy zvýšila hladiny jaterních enzymů AST a ALT již po 18 dnech podávání. Výsledky této studie jsou alarmující vzhledem k tomu, že současný průměrný příjem fruktosy v USA činí 12 % celkového energetického příjmu a může dosahovat u některých osob až 15 %. V epidemiologické studii se ukázalo, že osoby

s jaterní steatosou v porovnání s kontrolní skupinou nebo běžnou populací, konzumovaly dvojnásobné množství sladkých nápojů. V mechanismu negativních účinků fruktosy na jaterní steatosu může hrát důležitou úlohu vyčerpání ATP (adenosintrifosfátu) při fosforylaci fruktosy na fruktoso-1- fosfát enzymem fruktokinásou, které je dáváno do souvislosti s rozvojem zánětu a progresí steatosy do steatohepatitidy (Kazdová, et al., 2013).

Fruktosa se průmyslově vyrábí z inulinu. Inulin se získává z plodin, které obsahují jeho vysoké množství. Jsou to čekanka a topinambur (Šimko, 2009).



Obrázek 3 Struktura molekuly D – fruktosa (Anon., 2006)

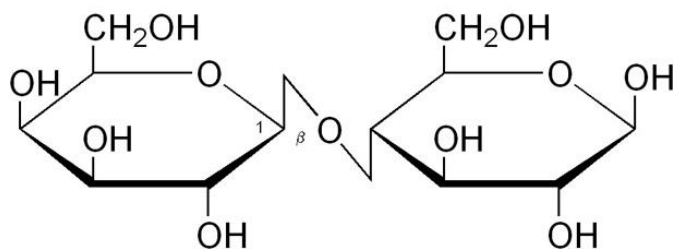
2.2.2 Oligosacharidy

Oligosacharidy vznikají spojováním monosacharidů glykosidickou vazbou, skládají se maximálně z 10 monosacharidů. Podle počtu monosacharidových jednotek je rozlišujeme na disacharidy, trisacharidy atd.

Disacharidy, které jsou běžnou složkou potravy, nejsou vstřebávány ze střeva a musí být v jeho stěně hydrolyticky štěpeny na své monosacharidové jednotky. Nejvýznamnější je v tomto směru laktosa ve výživě mláďat savců a sacharosa, která je zásobní látkou některých rostlin (Šípál, et al., 1992).

2.2.2.1 Laktosa

Laktosa je mléčný cukr. Je to disacharid tvořený z glukosy a galaktosy, které jsou spojeny β 1 \rightarrow 4 glykosidickou vazbou.



Obrázek 4 Struktura molekuly laktosa (Minichová, et al., 20015)

Tvoří základní složku sacharidů mateřského mléka všech savců. Obsah laktosy v mléce je ovlivněn mnoha faktory, například živočišným druhem, fází laktace, výživou nebo zdravotním stavem. Laktosa se podílí spolu s draselnými, sodnými a chloridovými ionty na osmotické rovnováze v mléčných žlázách. Spolu s tuky a bílkovinami tvoří základní nutriční složku mléka (Fox, et al., 1998).

Tabulka 2 Přehled složení hlavních druhů mlék v g na 100 g mléka (Michaelsen, et al., 2003)

| Druh mléka | Voda (g) | Bílkovina (g) | Tuk (g) | Mléčný cukr (g) | Minerální látky (g) |
|--------------------------|----------|---------------|---------|-----------------|---------------------|
| mateřské (lidské) | 87,6 | 1,2 | 4,1 | 7,1 | 0,2 |
| kravské | 87,4 | 3,2 | 3,7 | 4,7 | 0,8 |
| kozí | 86,6 | 3,6 | 4,2 | 4,8 | 0,8 |
| ovčí | 83,9 | 5,2 | 6,2 | 4,2 | 0,9 |

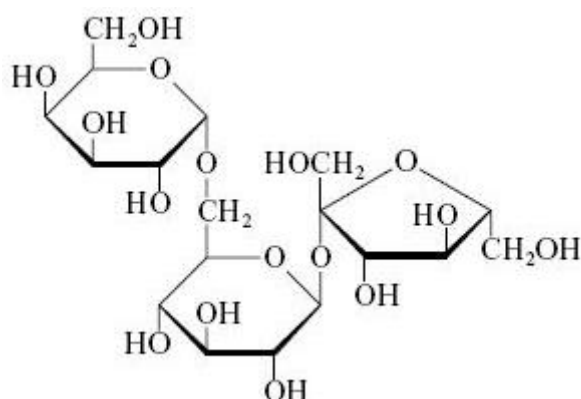
Asi u 70 % populace, zejména v Asii, Africe a Jižní Americe, se po skončení kojení výrazně snižuje produkce laktasy. Laktasa je enzym, který umožňuje štěpení laktosy. Tato laktasová deficiencie vede ke snížené absorpci laktosy a dále až k vytvoření laktosové intolerance (McSweeney & Fox, 2009).

Laktosa je velmi dobře zkvasitelná bakteriemi mléčného kvašení, zejména rody *Lactococcus* spp. a *Lactobacillus* spp., na mléčnou kyselinu. Toho se využívá při výrobě kysaných mléčných výrobků. Dále se z laktosy vyrábí xantanová guma, která má v potravinářství hojné využití. U této výroby slouží laktosa jako substrát pro *Xanthomonas campestris* (Fox, et al., 1998).

Isomerací laktosy se vyrábí laktulosa. Laktulosa je syntetický disacharid, isomer laktosy. Je sladší než laktosa, je antikariogenní a není hydrolyzována v tenkém střevě. Pokračuje do tlustého střeva, kde je fermentována bakteriemi mléčného kvašení včetně bifidobakterií. Z tohoto důvodu se laktulosa využívá k pozitivnímu ovlivnění střevní mikrobioty. Například je přidávána do kojenecké umělé výživy pro podporu bifidogenních a mírně laxativních účinků mateřského mléka. Také je využívána jako veterinární a humánní projímadlo (Wong & Jenness, 1999; Fox, et al., 1998).

2.2.2.2 Další oligosacharidy

Dalšími oligosacharidy jsou rafinosa, stachyosa a verbaskosa. Vyskytují se v semenech luštěnin a způsobují nadýmání u lidí i u zvířat. Tyto sacharidy unikají trávení v horní části gastrointestinálního traktu, protože zde pro ně neexistuje žádná enzymová aktivita (α -galaktosidasa). V důsledku toho je metabolizují bakterie ve spodní části gastrointestinálního traktu a tvoří velké množství oxidu uhličitého a vodíku. Množství a složení vyprodukovaných plynů odrážejí rozdíly v typu, umístění a množství střevních mikroorganismů majících α -galaktosidasu v příznivém živném prostředí (Rackis, 1975).



Obrázek 5 Struktura molekuly rafinosa (Mañas, 2017)

2.2.3 Polysacharidy

Polysacharidy jsou nejrozšířenější biopolymery v přírodě. Skládají se z velkého počtu monosacharidů nebo jejich derivátů. Ty jsou spojeny glykosidovými vazbami do lineárních nebo rozvětvených řetězců. Pokud je řetězec tvořen pouze jedním druhem monosacharidů, jedná se o homoglykan. Pokud se ve stavbě molekuly nacházejí různé monosacharidy jedná se o heteroglykan. Stavebními jednotkami polysacharidů nejsou jednotlivé monosacharidy, ale oligosacharidy. V závislosti na struktuře mají různé polysacharidy různé vlastnosti. Některé

jsou rozpustné ve vodě, například amylosa, některé bobtnají a tvoří viskózní roztoky, například pektiny, jiné jsou ve vodě zcela nerozpustné, například celuloza. V organismech plní funkci podpůrných a stavebních struktur, jako celuloza a chytin, nebo jsou zásobními látkami jako škrob u rostlin nebo glykogen u živočichů anebo plní funkci fyziologicky aktivních látek, například heparin (Šípál, et al., 1992).

2.3 Prebiotika

Prebiotika jsou definována jako nestravitelné složky potravy, které příznivě ovlivňují hostitele tím, že selektivně stimulují růst nebo činnost bakterií, obvykle bifidobakterií a laktobacilů v tlustém střevě, a tím zlepšují zdravotní stav hostitele. Prebiotický efekt je přičítán mnoha složkám potravy (Gibson & Roberfroid, 1995). Aby tyto složky potravy mohly být zahrnuty mezi prebiotika musí splňovat následující kritéria podle (Gibson, 1998):

- nesmí být hydrolyzovány ani absorbovány v horní části gastrointestinálního traktu,
- jsou fermentovány prospěšnými bakteriemi v tlustém střevě,
- jsou schopny měnit střevní mikrobiotu ke zdravějšímu složení, a to zvyšujícím se počtem sacharolytických druhů a zároveň snižováním počtu hnilobných mikroorganismů.

Jako prebiotika se často používají fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, isomaltooligosacharidy, sójové oligosacharidy, hlavně rafinosa, xylooligosacharidy, laktosacharosa, laktulosa a laktitol (Sekhon & Jairath, 2010).

Mezi nejvíce studovaná a dobře zavedená prebiotika patří inulin a oligofruktosa. Splňují nestravitelnost v horní části gastrointestinálního traktu, takže se do tlustého střeva dostanou prakticky beze změny. Díky tomu jsou fermentovány sacharolytickými bakteriemi střevní mikrobioty. Účinky inulinu a oligofruktosy na lidskou střevní mikrobiotu byly rozsáhle studovány v *in vivo* i *in vitro* studiích. Většina studií uvádí selektivní fermentaci prospěšnou mikrobiotou, hlavně bifidobakteriemi a v menší míře laktobacily (Kolida, et al., 2002).

Gibson & Wang (1994) potvrdili prebiotické účinky inulinu a oligofruktosy v *in vitro* studiích. Fermentace byla porovnáována s řadou referenčních sacharidů. Naměřené údaje bakteriálního růstu ukázaly přednostní fermentaci bifidobakteriemi, zatímco populace *Escherichia coli* a *Clostridium perfringens* byly udržovány na relativně nízké úrovni.

2.3.1 Laktulosa, laktitol a kyselina laktobionová

Laktulosa vzniká izomerací glukosylu v laktose způsobené zahřátím mléka. V malém množství je tedy přirozenou složkou tepelně ošetřeného mléka a mléčných výrobků. Patrný vliv na střevní mikrobiotu má ve vyšších koncentracích. Laktitol vzniká elektrolytickou redukcí nebo redukcí tetrahydridboritanem sodným (Modler, 1994). Laktulosa a laktitol se podávají pacientům s encefalopatií, což je intoxikace mozku močovinou v důsledku nefunkčnosti jater, a s chronickou zácpou. Jsou fermentovány v tlustém střevě tamní mikrobiotou a redukují tvorbu amoniaku. Kyselina laktobionová vzniká z laktosy oxidací. Má sladkou chuť, nízkou energetickou hodnotu a působí jako prebiotikum (Schaafsma, et al., 2003).

Laktulosa a kyselina laktobionová nejsou metabolizovány v tenkém střevě, zatímco laktitol částečně ano. Laktulosa je v tlustém střevě lépe využívána bifidobakteriemi než fruktooligosacharidy a laktitol. Bohužel je také dobře fermentována klostridii. U dospělého člověka vede příjem 3 g laktulosy denně ke kolonizaci střev bifidobakteriemi ze 47 % (Gomes & Malcata, 1999).

2.3.2 Fruktooligosacharidy

Fruktooligosacharidy jsou polymery D-fruktosy spojené $\beta(2\rightarrow1)$ vazbami a zakončené molekulou glukosy. Polymerační stupeň je 2 až 30. Jsou rostlinného původu. Vyskytují se například v čekance, cibuli, artyčoku, rajčatech, česneku nebo banánu. Průměrný obsah v čerstvé zelenině a ovoci se pohybuje okolo 6 %. Průmyslově se vyrábí buď hydrolyzou inulinu nebo ze sacharosy červené řepy účinkem fruktosylfuranosidasy z *Aspergillus niger* (Rudolfová & Čurda, 2005). Fruktooligosacharidy nejsou využívány patogenními mikroorganismy tlustého střeva, jako jsou například *Escherichia coli* a *Clostridium perfringens*. Nejsou využívány ani *Streptococcus mutans* v ústech, tím pádem nepřispívají tvorbě zubního kazu. Při dávkování fruktooligosacharidů 3 až 6 gramů za den dochází ke snížení produkce toxických složek a nežádoucích enzymů ve střevě až o 40-45 %. Pozitivní efekt má dávka 2-10 gramů za den, ovšem průměrná spotřeba je pouze kolem 0,8 gramů denně (Rivero-Urgell & Santamaria-Orleans, 2001).

2.3.3 Galaktooligosacharidy

Galaktooligosacharidy jsou živočišného původu (kravské mléko). Vyrábí se průmyslově z laktosy transgalaktosylací (Playne & Crittenden, 1996). Transgalaktosylace je doprovodná

reakce enzymové hydrolýzy laktosy na glukosu a galaktosu účinkem β -galaktosidasy. Ta působí přenos galaktosylu uvolněného rozštěpením vazby mezi glukosou a galaktosou na jiný sacharid, který je přítomný v prostředí. V nejjednodušším případě se jedná o molekulu vody a vzniká volná galaktosa (hydrolýza). V ostatních případech vznikají transgalaktosylací di-, tri-, tetra- a penta- sacharidy (Rudolfová & Čurda, 2005). Galaktooligosacharidy působí jako rozpustná vláknina podobně jako fruktooligosacharidy. Mají významné fyzikálně-chemické vlastnosti, díky kterým se využívají ve výrobě potravinářských produktů. Příkladem jsou zvyšování viskozity výrobků, zádrž vlhkosti, vazbou vody snižují její aktivitu a tím významně omezují projevy mikrobiální kontaminace (Crittenden & Playne, 1996).

Při fermentaci prebiotik vznikají obvykle acetát, propionát a butyrát. Tyto látky snižují pH v tlustém střevě, mohou ovlivňovat peristaltiku střev a slouží jako energetický zdroj. Butyrát slouží jako energetický zdroj kolonocytům. Propionát pravděpodobně snižuje hladinu cholesterolu v krvi (Andoh, et al., 2003).

Kombinací prospěšných účinků probiotik a prebiotik se vyvinula synbiotika. Prebiotika zvyšují životaschopnost probiotických mikroorganismů, se kterými jsou společně obsaženy v synbiotiku (Sekhon & Jairath, 2010).

Tabulka 3 Běžně užívaná synbiotika (Sekhon & Jairath, 2010)

| Probiotikum | Prebiotikum |
|------------------------------|-------------------------------|
| laktobacily | laktitol |
| laktobacily | inulin |
| bifidobakterie | fruktooligosacharidy |
| bifidobakterie | galaktooligosacharidy |
| laktobacily a bifidobakterie | fruktooligosacharidy (inulin) |

3 Cíl

Cílem této diplomové práce je testovat různé sacharidy při kultivaci bakterií druhu *Bifidobacterium animalis*. Při testování budou sacharidy použity jako jediný zdroj uhlíku. Budou použity mono i oligosacharidy. Z monosacharidů bude růst testován na glukose a galaktose a jako oligosacharid bude použita laktosa. Pomocí turbidimetrie bude změřena optická denzita, následně budou stanoveny růstové výtěžky váhovou metodou. Výzkum bude dále zaměřen na enzymovou aktivitu daného druhu. Z naměřených dat bakalářské práce (Dvořáková, 2015) se zdá, že poddruh *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* obtížně využívá galaktosu jako zdroj uhlíku, a proto pomocí API ZYM testu bude testována a porovnána enzymová aktivita u celých a rozbitých buněk zmíněného poddruhu.

Vyslovená hypotéza je, že různé substráty budou rozdílně využívány druhem *Bifidobacterium animalis*, což se projeví na růstových výtěžcích.

4 Materiál a metoda

V této kapitole budou popsány všechny materiály, které byly použity pro výzkum práce, a také všechny postupy výzkumu.

4.1 Mikroorganismy

Pro výzkum této diplomové práce byly použity mikroorganismy se sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky Fakulty agrobiologie, přírodních a potravinových zdrojů České zemědělské univerzity:

- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* – izolovaný z fermentovaného mléčného výrobku (kmen DAN)
- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* – izolovaný ze stolice štěněte (kmen V1/2)

4.2 Použitá kultivační média

V této podkapitole je popsán použitý bujón pro kultivaci bakterií, význam jeho jednotlivých složek a jeho příprava.

4.2.1 Wilkins-Chalgren bujón

Wilkins-Chalgren (Oxoid) bujón se používá při kultivaci anaerobních mikroorganismů. Je odvozen od Wilkins-Chalgren Agar, který byl původně vyvinut pro stanovení minimální inhibiční koncentrace pro antibiotika anaerobních bakterií (Anon., 2015). V rámci výzkumu byl použit pro kultivaci bakterií po vyndání z mrazicího boxu pro jejich aktivaci.

Tabulka 4 Receptura Wilkins-Chalgren bujónu (Anon., 2015)

| Přísady | g.litr ⁻¹ |
|---------------------|----------------------|
| Trypton | 10,0 |
| Pepton | 10,0 |
| Sójový pepton | 5,0 |
| Kvasničný autolyzát | 5,0 |
| Glukosa | 1,0 |

| Přísady | g.litr⁻¹ |
|----------------|----------------------------|
| Chlorid sodný | 5,0 |
| L-Arginin | 1,0 |
| Pyruvát sodný | 1,0 |
| Menadione | 0,0005 |
| Haemin | 0,005 |

Při kultivaci buněk pro měření optické denzity a stanovení růstových výtěžků byl použit Wilkins-Chalgren bujón obohacený o cystein 0,5 g.l⁻¹ a tween 1 g.l⁻¹ a do základní receptury nebyla přidána glukosa. Sacharidy byly přidány dle testované varianty v podobě zásobního roztoku až po odkysličení a sterilaci.

4.2.2 Význam složek bujónu

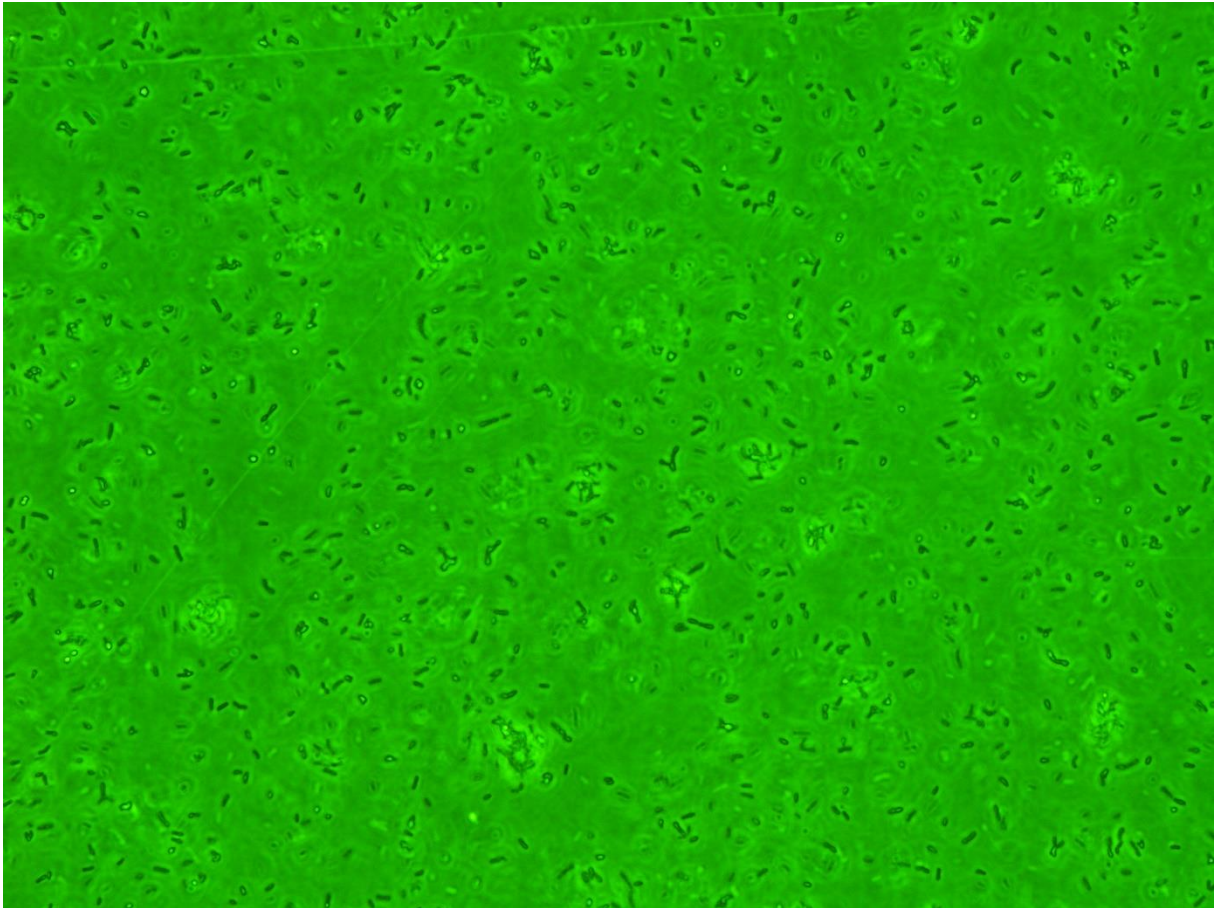
Trypton a pepton slouží jako zdroj dusíku, aminokyselin a minerálních látek. Kvasničný autolyzát je přidáván pro dostatečný obsah vitaminů a dalších růstových faktorů, jako jsou puriny a pirimidiny. Glukosa je zdrojem uhlíku. Chlorid sodný udržuje osmotickou rovnováhu média. L-Arginin napomáhá růstu, pyruvát sodný poskytuje energii a heamin a menadione jsou nezbytné při růstu mnoha anaerobních bakterií.

4.2.3 Příprava bujónu

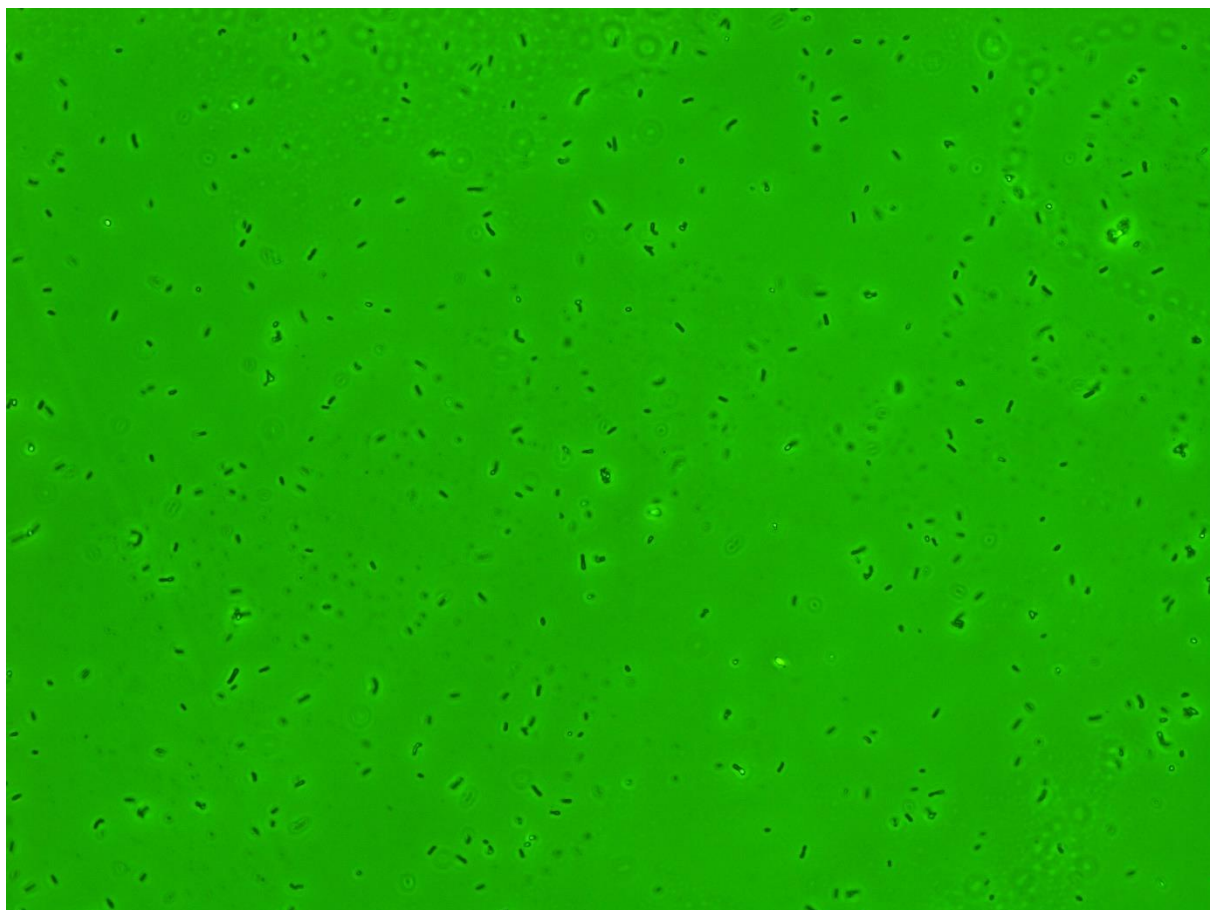
Wilkins-Chalgren bujón byl smíchán s destilovanou vodou v předepsaném poměru (viz Tabulka 4) a rozpuštěn. Následně byl nadávkován do zkumavek či laboratorních nádobek, tzv. penicilinek. Ty byly poté probublány kyslíku prostým oxidem uhličitým přes měděnou kolonu a rychle uzavřeny. Následovala sterilace při 110 °C po dobu jedné hodiny. Do takto připraveného bujónu byly naočkovány zásobní roztoky sacharidů dle testované varianty. Zásobní roztoky sacharidů byly připraveny navážením sacharidů a smícháním s destilovanou vodou. Dále následovalo jejich odkysličení a sterilace.

4.3 Kultivační podmínky

Testované kultury byly přeočkovány z mrazicího boxu do penicilinek s Wilkins-Chalgren bujónem. Inokulační dávka byla 0,4 ml z narostlé kultury. Kultivace probíhala anaerobně během 24 hodin v laboratorním inkubátoru při teplotě 37 °C. Následně byla aktivovaná kultura zkontrolována mikroskopicky z důvodu ověření její čistoty nebo případné kontaminace.



Obrázek 6 *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (DAN)

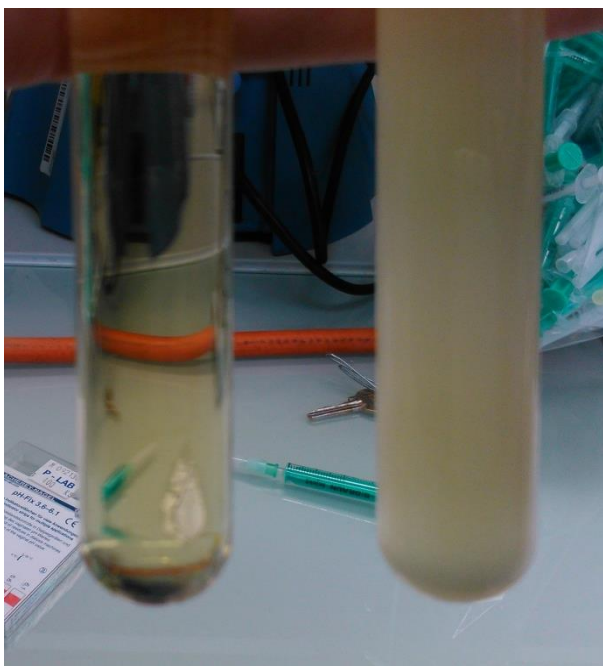


Obrázek 7 *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (V1/2)

4.3.1 Měření optické hustoty turbidimetrickou metodou

Aktivovaná a zkontrolovaná kultura byla přeočkována do zkumavek s 9 ml Wilkins-Chalgren bujónu, upraveným pro tuto část výzkumu, a 1 ml zásobního roztoku sacharidu. Výsledná koncentrace sacharidu byla 2 g.l^{-1} . Množství zaočkované kultury bylo 0,3 ml. Následně bylo provedeno první výchozí měření optické hustoty v čase 0 naočkované kultury pomocí spektrofotometru (Biosan). Dále následovala kultivace po dobu 24 hodin v laboratorním inkubátoru při teplotě $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté bylo provedeno druhé měření pomocí spektrofotometru.

Kultivovaly se dva poddruhy bifidobakterií na třech zdrojích uhlíku (glukosa, galaktosa, laktosa). Každý ve čtyřech kopiích. U měření byla provedena kontrola v podobě zkumavky s bujónem a sacharidem bez zaočkované kultury.



Obrázek 8 Demonstrace růstu bakterií pomocí detekce zákalu (turbidimetrie), vlevo čistý bujón, vpravo plně narostlá kultura

4.3.2 API ZYM test

API ZYM test byl proveden u obou testovaných kmenů, a to z celých buněk, z odstředěných buněk (supernatant) a z rozbitých buněk. Z narostlé kultury byly odebrány 2 ml a převedeny do zkumavky – eppendorfky. Následovalo odstředění po dobu 3 minut na 14500 g. Vzorek supernatantu nebyl dále upravován a rovnou byl nanesen na API ZYM test. U vzorku celých buněk byl vylit supernatant a buňky byly promyty dvěma mililitry pufru. Složení pufru viz Tabulka 5. Ze vzorku na rozbíjení buněk byl také vylit supernatant, buňky byly promyty 1,6 mililitry pufru a potom k nim byl přidán CTAB (hexadecyltrimethylamoniumbromid, Sigma) v množství 0,4 mililitru. API ZYM test byl připraven nanesením malého množství destilované vody na díl s jamkami. Do jamek byly převedeny vzorky. Poté byly testy vloženy na 4 hodiny do laboratorního inkubátoru na kultivaci při 37 °C. Po kultivaci byla do každé jamky přidána kapka roztoku API ZYM A a kapka roztoku API ZYM B. Tím došlo k barevným změnám a následovalo vyhodnocení.



Obrázek 9 API ZYM test

Tabulka 5 Složení pufu

| Přísady | Množství |
|--------------------------------|----------|
| Hydrogenfosforečnan draselný | 0,12 g |
| Dihydrogenfosforečnan draselný | 0,0333 g |
| Cystein | 0,05 g |
| Destilovaná voda | 100 ml |

4.3.3 Růstové výtěžky

Aktivovaná a zkontrolovaná kultura byla přeočkována do penicilinek s 9 ml Wilkins-Chalgren bujónu, upraveným pro tuto část výzkumu, a 2,25 ml zásobního roztoku sacharidu. Výsledná koncentrace sacharidu byla 2 g.l^{-1} . Množství zaočkované kultury bylo 0,3 ml. Následovala kultivace po dobu 24 hodin v laboratorním inkubátoru při teplotě $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Kultivovaly se dva poddruhy bifidobakterií se dvěma zdroji uhlíku (glukosa a laktosa), každý ve třech kopiích. Následovala centrifugace po dobu čtyř minut při 6000 g . Poté byl slit supernatant, vzorky byly promyty destilovanou vodou a znovu centrifugovány za stejných podmínek. Následně byly ke

vzorkům přidány 4 ml destilované vody a vzorky byly zmrazeny na teplotu minus 50 °C a poté byly vloženy do lyofilizátoru k lyofilizaci. Lyofilizace neboli vakuové vymrazování je metoda sušení vlhkých materiálů. Používá se zejména pro materiál, který nesnáší vyšší teploty jako jsou například buňky nebo bakterie. Uplatňuje se i při sušení potravin a ve farmaceutickém průmyslu. Princip lyofilizace je založen na odstranění vody vakuovou sublimací ledu (Poole & Poole, 1991). Po dvou dnech byly penicilinky vyndány a zváženy. Obsah narostlé biomasy byl vysypán a penicilinky byly promyty destilovanou vodou. Následně byly zmrazeny, opět lyofilizovány po dobu dvou dnů a zváženy. Důvodem druhé lyofilizace byl fakt, že po otevření se do penicilinky dostala vzdušná vlhkost, která ovlivňovala hmotnost, a proto bylo potřeba penicilinky opětovně lyofilizovat pro odstranění vlhkosti. Růstový výtěžek se rovná rozdílu obou vážení.



Obrázek 10 Lyofilizace

4.4 Přístroje použité při výzkumu

V této kapitole jsou popsány přístroje, které byly použity při výzkumu této práce.

4.4.1 Mikroskop Nikon eclipse E200

Mikroskop s fázovým kontrastem byl použit pro zhodnocení čistoty kultur.



Obrázek 11 Mikroskop Nikon eclipse E200

4.4.2 Laboratorní inkubátor

Laboratorní inkubátor sloužil k inkubaci bakterií při teplotě 37 °C u všech měření tohoto výzkumu.



Obrázek 12 Laboratorní inkubátor

4.4.3 Spektrofotometr (denzitometr) Biosan, McFarland DEN 1B

Pomocí denzitometru byla měřena optická denzita narostlé kultury ve zkumavce. Denzitometry jsou určeny pro měření zákalu buněčné suspenze. Denzitometry poskytují možnost měření zákalu roztoku v širším rozsahu, až do 15,0 McFarland jednotek. Denzitometr se používá pro měření koncentrace buněk v průběhu fermentačního procesu, stanovení citlivosti mikroorganismů na antibiotika, identifikace mikroorganismů za použití různých testovacích systémů, pro měření absorpce na určité vlnové délce, tak i pro kvantitativní stanovení koncentrace barevného roztoku, absorbující zelené světlo. Princip činnosti je založen na měření optické hustoty s digitální prezentací výsledků v McFarland jednotkách. Vlnová délka světla generovaného přístrojem je $\lambda = 565 \pm 15$ nm.



Obrázek 13 Denzitometr

4.4.4 Centrifuga Eppendorf Mini Spin a Universal 320R

Při výzkumu byly použity dvě centrifugy. Jedna sloužila pro odstředění vzorků ve zkumavkách eppendorf na 14500 g při API ZYM testu. Druhá centrifuga sloužila pro odstředění vzorků na 6000 g ve zkumavkách při postupu ve stanovování růstových výtěžků.



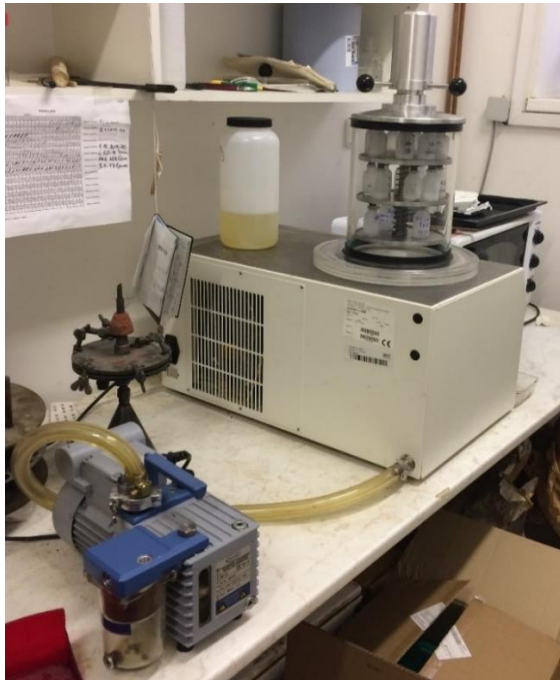
Obrázek 14 Centrifuga Eppendorf Mini Spin



Obrázek 15 Centrifuga Universal 320R

4.4.5 Lyofilizátor Power Dry LL3000

V lyofilizátoru probíhala lyofilizace buněk pro stanovení růstových výtěžků.



Obrázek 16 Lyofilizátor

4.4.6 Laboratorní váhy Mettler AE 200

Laboratorní váhy byly použity pro navážky sacharidů pro zásobní roztoky, pro navážky při přípravě bujónu a zejména pro stanovení růstových výtěžků.



Obrázek 17 Laboratorní váhy

5 Výsledky

V této kapitole jsou uvedeny naměřené hodnoty z měření optické denzity, výsledky stanovení růstových výtěžků spolu se statistickým vyhodnocením a fotograficky zdokumentované výsledky API ZYM testu.

5.1 Měření optické denzity

Pomocí denzitometru byla měřena optická denzita v čase 0 a po 24 hodinách kultivace.

Tabulka 6 Optická denzita vzorku *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (DAN)

| | Sacharid | | | | | |
|---------|-----------------------------|---------------------|---------|---------------------|-----------|---------------------|
| | Glukosa | | Laktosa | | Galaktosa | |
| | Optická denzita (McFarland) | | | | | |
| Čas (h) | Průměr | Směrodatná odchylka | Průměr | Směrodatná odchylka | Průměr | Směrodatná odchylka |
| 0 | 1,2 | 0,05 | 1,2 | 0,08 | 1,3 | 0,06 |
| 24 | 6,8 | 0,1 | 6,8 | 0,05 | 1,3 | 0 |

Tabulka 7 Optická denzita vzorku *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (V1/2)

| | Sacharid | | | | | |
|---------|-----------------------------|---------------------|---------|---------------------|-----------|---------------------|
| | Glukosa | | Laktosa | | Galaktosa | |
| | Optická denzita (McFarland) | | | | | |
| Čas (h) | Průměr | Směrodatná odchylka | Průměr | Směrodatná odchylka | Průměr | Směrodatná odchylka |
| 0 | 1,2 | 0 | 1,2 | 0,05 | 1,3 | 0,06 |
| 24 | 6,8 | 0,05 | 6,6 | 0,13 | 1,3 | 0,1 |



Obrázek 18 Porovnání optické denzity vzorků DAN a V1/2 po 24 hodinách při růstu na glukose, laktose a galaktose

5.2 Růstové výtěžky

Pro zjištění, zda se změřené růstové výtěžky vzorků mikroorganismů liší významně při růstu na laktose a glukose, nejdříve provedeme dvou výběrový F-test pro shodu rozptylů. Tímto testem se zjistí, zda jsou či nejsou rozptyly vah přírůstku stejné. Pokud v testu je $F > F$ kritická, potom rozptyly souborů dat nejsou stejné (Anon., 2016). Pokud stejné jsou, použije se pro zjištění, zda se přírůstky liší statisticky významně, dvou výběrový T-test pro soubory dat se stejným rozptylem. Pokud rozptyly stejné nejsou, použije se dvou výběrový T-test pro soubory dat s nesterjým rozptylem. Pokud je v testu $t_{Stat} > t$ kritická (2), potom se testované soubory dat liší významně (Anon., 2016). Všechny následující statistické testy byly prováděny při nastavené hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5.2.1 Růstové výtěžky vzorků kmene DAN

Byly zjišťovány růstové výtěžky vzorků kmene DAN při růstu na glukose a laktose a provedeno statistické zhodnocení přírůstků.

Tabulka 8 Růstové výtěžky vzorků kmene DAN při růstu na glukose

| Vzorek | Hmotnost zkumavky včetně vzorku (g) | Hmotnost zkumavky bez vzorku (g) | Hmotnost vzorku (mg) |
|--------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| 1 | 18,2661 | 18,2631 | 3 |
| 2 | 33,1464 | 33,1426 | 3,8 |
| 3 | 18,8067 | 18,8027 | 4 |

Tabulka 9 Růstové výtěžky vzorků kmene DAN při růstu na laktose

| Vzorek | Hmotnost zkumavky včetně vzorku (g) | Hmotnost zkumavky bez vzorku (g) | Hmotnost vzorku (mg) |
|--------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| 1 | 30,6014 | 30,5992 | 2,2 |
| 2 | 32,2846 | 32,2824 | 2,2 |
| 3 | 32,6577 | 32,6556 | 2,1 |

Tabulka 10 Dvou výběrový F-test pro rozptyl pro růstové výtěžky vzorků kmene DAN při růstu na glukose a laktose

| | Hmotnost vzorku při glukose (mg) | Hmotnost vzorku při laktose (mg) |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Stř. hodnota | 3,6 | 2,166666667 |
| Rozptyl | 0,28 | 0,003333333 |
| Pozorování | 3 | 3 |
| Rozdíl | 2 | 2 |
| F | 84 | |
| P(F<=f) (1) | 0,011764706 | |
| F krit (1) | 19 | |

Při dvou výběrovém F-testu pro rozptyl pro růstové výtěžky vzorků kmene DAN při růstu na glukose a laktose je $F > F$ kritická, což znamená, že rozptyly vah přírůstků pro glukosu a laktosu nejsou stejné. Pro zjištění, zda se váhové přírůstky liší významně, se tedy použije dvou výběrový T-test pro soubory dat s nestejným rozptylem.

Tabulka 11 Dvou výběrový T-test pro soubory s nestejným rozptylem pro růstové výtěžky vzorků kmene DAN při růstu na glukose a laktose

| | Hmotnost vzorku při glukose (mg) | Hmotnost vzorku při laktose (mg) |
|--------------------------------|---|---|
| Stř. hodnota | 3,6 | 2,166666667 |
| Rozptyl | 0,28 | 0,003333333 |
| Pozorování | 3 | 3 |
| Hyp. rozdíl stř. hodnot | 0 | |
| Rozdíl | 2 | |
| t Stat | 4,664004843 | |
| P(T<=t) (1) | 0,021512826 | |
| t krit (1) | 2,91998558 | |
| P(T<=t) (2) | 0,043025653 | |
| t krit (2) | 4,30265273 | |

Platí, že $t \text{ Stat} > t$ kritická (2), takže **je možné prohlásit, že průměrný váhový přírůstek vzorků kmene DAN při růstu na laktose a glukose se liší významně.**

5.2.2 Růstové výtěžky vzorků kmene V1/2

Byly zjišťovány růstové výtěžky vzorků kmene V1/2 při růstu na glukose a laktose a provedeno statistické zhodnocení přírůstků.

Tabulka 12 Růstové výtěžky vzorků kmene V1/2 při růstu na glukose

| Vzorek | Hmotnost zkumavky včetně vzorku (g) | Hmotnost zkumavky bez vzorku (g) | Hmotnost vzorku (mg) |
|---------------|--|---|-----------------------------|
| 1 | 30,6183 | 30,6149 | 3,4 |
| 2 | 32,9153 | 32,9118 | 3,5 |
| 3 | 32,465 | 32,4614 | 3,6 |

Tabulka 13 Růstové výtěžky vzorků kmene V1/2 při růstu na laktose

| Vzorek | Hmotnost zkumavky včetně vzorku (g) | Hmotnost zkumavky bez vzorku (g) | Hmotnost vzorku (mg) |
|---------------|--|---|-----------------------------|
| 1 | 32,6179 | 32,6154 | 2,5 |
| 2 | 31,9499 | 31,9476 | 2,3 |
| 3 | 33,3428 | 33,3404 | 2,4 |

Tabulka 14 Dvou výběrový F-test pro rozptyl pro růstové výtěžky vzorků kmene V1/2 při růstu na glukose a laktose

| | Hmotnost vzorku při glukose (mg) | Hmotnost vzorku při laktose (mg) |
|-----------------------|---|---|
| Stř. hodnota | 3,5 | 2,4 |
| Rozptyl | 0,01 | 0,01 |
| Pozorování | 3 | 3 |
| Rozdíl | 2 | 2 |
| F | 1 | |
| P(F<=f) (1) | 0,5 | |
| F krit (1) | 19 | |

Při dvou výběrovém F-testu pro rozptyl pro růstové výtěžky vzorků kmene V1/2 při růstu na glukose a laktose je $F < F$ kritická, což znamená, že rozptyly vah přírůstků pro glukosu a laktosu jsou stejné. Pro zjištění, zda se váhové přírůstky liší významně, se tedy použije dvou výběrový T-test pro soubory dat se stejným rozptylem.

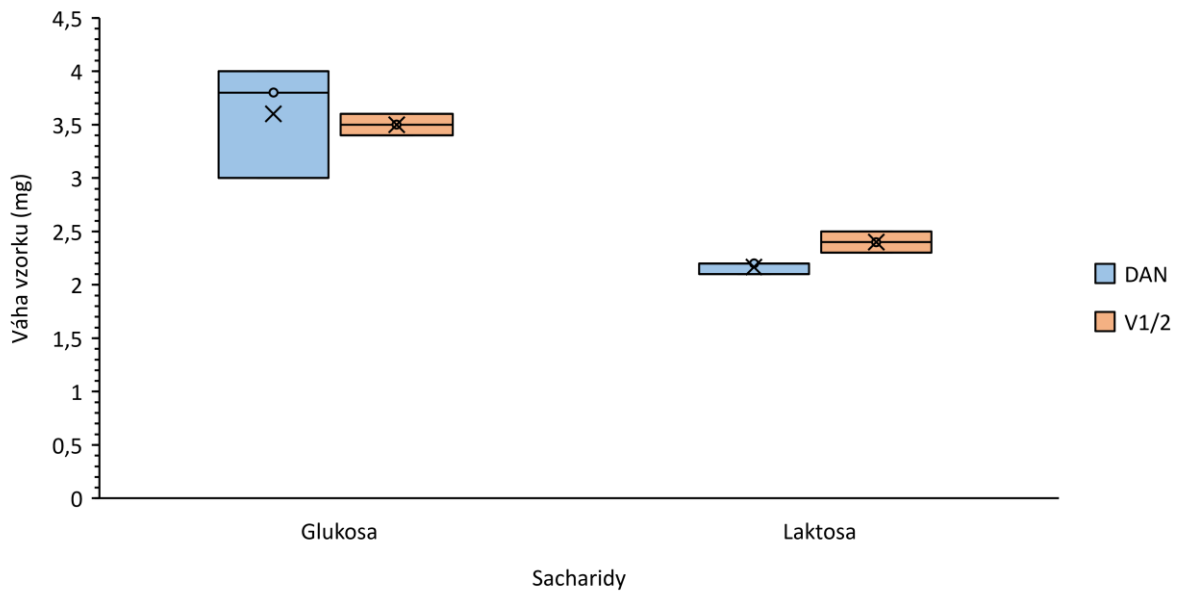
Tabulka 15 Dvou výběrový T-test pro soubory se stejným rozptylem pro růstové výtěžky vzorků kmene V1/2 při růstu na glukose a laktose

| | Hmotnost vzorku při glukose (mg) | Hmotnost vzorku při laktose (mg) |
|--------------------------------|---|---|
| Stř. hodnota | 3,5 | 2,4 |
| Rozptyl | 0,01 | 0,01 |
| Pozorování | 3 | 3 |
| Hyp. rozdíl stř. hodnot | 0,01 | |
| Rozdíl | 0 | |
| t Stat | 4 | |
| P(T<=t) (1) | 13,47219359 | |
| t krit (1) | 8,78177E-05 | |
| P(T<=t) (2) | 2,131846786 | |
| t krit (2) | 0,000175635 | |

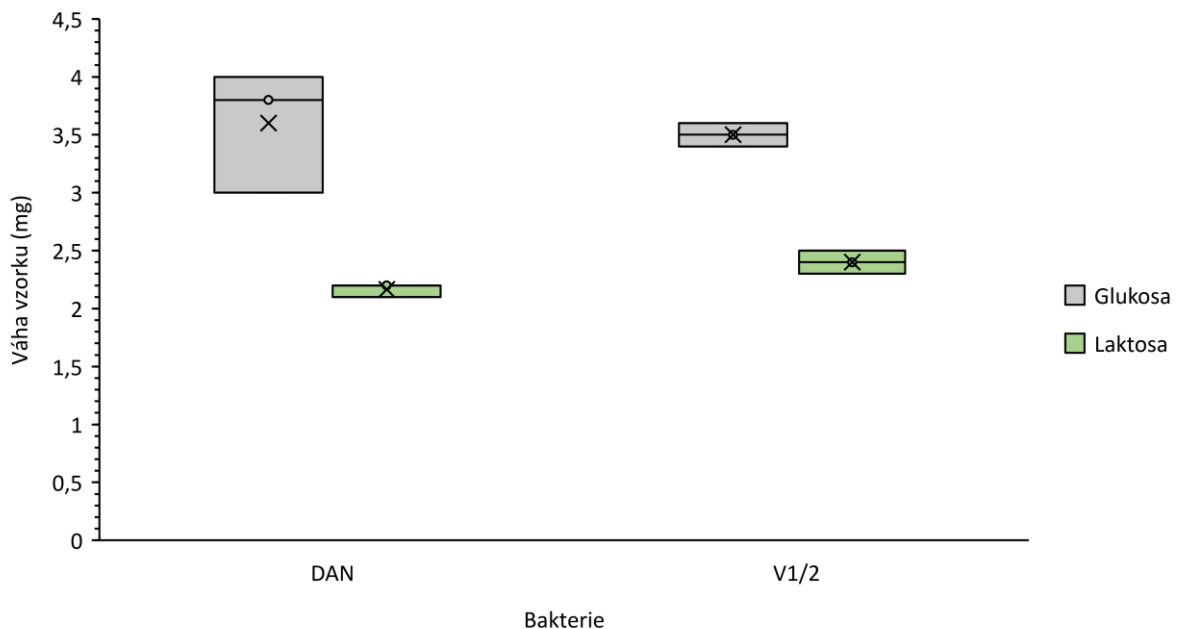
Platí, že $t \text{ Stat} > t$ kritická (2), takže **je možné prohlásit, že průměrný váhový přírůstek vzorků kmene V1/2 při růstu na laktose a glukose se liší významně.**

5.2.3 Grafické porovnání přírůstku

V kapitole jsou graficky porovnány váhové přírůstky vzorků DAN a V1/2 při růstu na glukose a laktose.



Obrázek 19 Porovnání změřených růstových výtěžků při růstu na laktose a glukose pro vzorky kmenů DAN a V1/2



Obrázek 20 Porovnání změřených růstových výtěžků vzorků DAN a V1/2 při růstu na laktose a glukose

5.3 API ZYM test

API ZYM testem byly zkoumány buňky vzorků DAN a V1/2 třemi různými způsoby (na obrázcích shora dolů):

1. Rozbité buňky
2. Odstředěné buňky (supernatant)
3. Celé buňky



Obrázek 21 API ZYM test pro vzorky DAN pro rozbité, odstředěné a celé buňky



Obrázek 22 API ZYM test pro vzorky V1/2 pro rozbité, odstředěné a celé buňky

Barevné změny byly vyhodnoceny dle návodu API ZYM testu.

| Quantité de substrat hydrolysé Quantity of hydrolysed substrate | 0 nanomole | 5 nanomoles | 10 nanomoles | 20 nanomoles | 30 nanomoles | ≥40 nanomoles |
|--|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| Activité chiffrée Activity mark | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Control – Témoin | 1 | | | | | |
| 2 - naphtyl - phosphate | 2 | | | | | |
| 2 - naphtyl - butyrate | 3 | | | | | |
| 2 - naphtyl - caprylate | 4 | | | | | |
| 2 - naphtyl - myristate | 5 | | | | | |
| L - leucyl - 2 - naphtylamide | 6 | | | | | |
| L - valyl - 2 - naphtylamide | 7 | | | | | |
| L - cystyl - 2 - naphtylamide | 8 | | | | | |
| N-benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide | 9 | | | | | |
| N-glutaryl-phénylalanine-2-naphtylamide | 10 | | | | | |
| 2 - naphtyl - phosphate | 11 | | | | | |
| Naphtol-AS-BI-phosphate | 12 | | | | | |
| 6-Br-2-naphtyl-αD-galactopyranoside | 13 | | | | | |
| 2-naphtyl-βD-galactopyranoside | 14 | | | | | |
| Naphtol-AS-BI-βD-glucuronide | 15 | | | | | |
| 2-naphtyl-αD-glucopyranoside | 16 | | | | | |
| 6-Br-2-naphtyl-βD-glucopyranoside | 17 | | | | | |
| 1-naphtyl-N-acétyl-βD-glucosaminide | 18 | | | | | |
| 6-Br-2-naphtyl-αD-mannopyranoside | 19 | | | | | |
| 2-naphtyl-αL-fucopyranoside | 20 | | | | | |

papi

API ZYM

ECHELLE DE LECTURE - READING SCALE

papi

69280 Marcy-l'Étoile / France / tél. 78 87 20 00 / télex 330 967
BIO MÉRILEUX SA au capital de 45 068 400 F / Imprimé en France / RCS Lyon B 673620399

EN 40001-9 D

Obrázek 23 Návod pro vyhodnocení API ZYM testu

Tabulka 16 Vyhodnocení API ZYM testu podle návodu pro vzorky DAN pro rozbité, odstředěné a celé buňky

| | Rozbité buňky | Supernatant | Celé buňky |
|------------------------------|--|--------------------|-------------------|
| Číslo enzymu v návodu | Vyhodnocení výsledku podle návodu | | |
| 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 1 | 0 | 1 |
| 4 | 1 | 0 | 1 |
| 5 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 5 | 0 | 5 |
| 7 | 1 | 0 | 1 |
| 8 | 0 | 0 | 1 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 1 | 0 | 1 |
| 12 | 1 | 1 | 5 |
| 13 | 1 | 0 | 5 |
| 14 | 5 | 0 | 5 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 5 | 1 | 5 |
| 17 | 5 | 0 | 5 |
| 18 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka 17 Vyhodnocení API ZYM testu podle návodu pro vzorky V1/2 pro rozbité, odstředěné a celé buňky

| | Rozbité buňky | Supernatant | Celé buňky |
|------------------------------|--|--------------------|-------------------|
| Číslo enzymu v návodu | Vyhodnocení výsledku podle návodu | | |
| 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 1 | 0 | 1 |
| 4 | 1 | 0 | 1 |
| 5 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 5 | 0 | 5 |
| 7 | 1 | 0 | 1 |
| 8 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 1 | 0 | 1 |
| 12 | 1 | 0 | 3 |
| 13 | 3 | 0 | 5 |
| 14 | 5 | 0 | 5 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 5 | 0 | 5 |
| 17 | 5 | 0 | 3 |
| 18 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 |

6 Diskuse

Z naměřených výsledků lze obecně konstatovat, že oba testované kmeny poddruhu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* pravděpodobně nejsou schopny využívat galaktosu jako zdroj uhlíku, a to jak ve formě samotného monosacharidu, tak jako součást disacharidu.

Z výsledků měření optické denzity vyplývá, že oba kmeny velmi dobře (plně) využívají glukosu. Zde byla optická denzita naměřena nejvyšší. Rovněž využívají laktosu, zde byl nárůst nižší než u glukosy a u galaktosy optická denzita vůbec nevzrostla. Tyto výsledky napovídají, že buňky v případě laktosy, která se skládá z glukosy a galaktosy, využily pouze glukosu, a proto byl nárůst na tomto disacharidu nižší. V návaznosti na tyto poznatky bylo provedeno měření růstových výtěžků.

Pro měření růstových výtěžků byly zvoleny sacharidy glukosa a laktosa pro ověření hypotézy, že testované kmeny nevyužijí galaktosu z laktosy, což se projeví na růstovém výtěžku nižším nárůstem biomasy ve srovnání s glukosou. Po statistickém vyhodnocení naměřených výsledků se hypotéza potvrdila. Je možné prohlásit, že průměrný váhový přírůstek vzorků obou kmenů při růstu na laktose a glukose se liší významně.

Rod *Bifidobacterium* rychle využívá množství oligosacharidů ve srovnání s jejich monosacharidovými složkami (Mitsuoka, 1992). Hopkins, et al. (1998) testovali schopnost bifidobakterií fermentovat různé zdroje uhlíku s ohledem na růstové parametry, jako je například specifická růstová rychlost. Tato studie ukazuje, že mnoho kmenů využívá lépe oligosacharidy než samotné monosacharidy, ze kterých se skládají. Watabe, et al. (1983) popisují deset kmenů *Bifidobacterium gallinarum*. Jeden z kmenů nebyl schopen využít samotnou glukosu, ovšem dobře rostl na médiu obsahujícím sacharosu. Také podle (Trojanová, et al., 2006) druhy *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium animalis* mají značně vyšší specifickou růstovou rychlost na sójových oligosacharidech (rafinosa, stachyosa) než na glukose. Podle (Ročková, et al., 2012) vykazují jednotlivé druhy bifidobakterií specifické rozdíly ve využívání sacharidových substrátů.

Pomocí API ZYM testu byla testována enzymatická aktivita obou kmenů. API ZYM test umožňuje testovat aktivitu dvaceti enzymů. U každého kmene byly testovány tři varianty, a to testování enzymatické aktivity rozbitých buněk, celých buněk a supernatantu. Aktivita supernatantu vyšla v případě kmene V1/2 nulová a u kmene DAN byla zaznamenána mírná aktivita u dvou enzymů, a to u naftol-AS-BI-fosfohydrolasy a alfa-glukosidasy. Na základě tohoto výsledku se zdá, že enzymy jsou přítomny pouze uvnitř buněk. Mezi rozbitými a celými

buňkami kmene DAN byly zaznamenány odlišnosti u tří enzymů, u cystinarylamidasy, naftol-AS-BI-fosfohydrolasy a alfagalaktosidasy. V tomto případě se vždy jedná o slabší aktivitu rozbitých buněk. Tento fakt by mohl být způsoben tím, že rozbitá buňka již není schopna štěpení substrátu. Mezi rozbitými a celými buňkami kmene V1/2 byly zaznamenány odlišnosti u tří enzymů, u naftol-AS-BI-fosfohydrolasy a alfagalaktosidasy a beta-glukosidasy. V případě naftol-AS-BI-fosfohydrolasy a alfagalaktosidasy se jedná o vyšší aktivitu celých buněk a v případě beta-glukosidasy o vyšší aktivitu rozbitých buněk.

Fakt, že oba kmeny nejsou schopné využít galaktosu jako zdroj uhlíku, by mohl být způsoben tím, že se galaktosa nedostane přes buněčnou membránu do buňky. O mechanismu absorpce sacharidů u bifidobakterií zatím není mnoho informací, ovšem podle (Degnan & Macfarlane, 1993) pravděpodobně mají vyšší efektivitu ve vstřebávání dimerních a oligomerních zdrojů uhlíku a menší efektivitu u některých monosacharidů. U obou kmenů byla zaznamenána aktivita enzymů alfa-galaktosidasy a beta-galaktosidasy. Z tohoto důvodu jsou buňky schopny využít laktosu jako zdroj uhlíku. Jsou tedy schopny rozložit laktosu na glukosu a galaktosu a glukosu využít. Zdá se tedy, že buňky nejsou schopny galaktosu využít ani v případě, že se ve formě laktosy dostane do buňky.

V případě použití výše zmíněných kmenů poddruhu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ve fermentovaném mléčném výrobku poslouží jako zdroj uhlíku bakteriím pouze glukosa a galaktosa zůstane z laktosy nevyužita.

7 Závěr

V úvodu této diplomové práce bylo uvedeno, že druh *Bifidobacterium animalis* je druhem bifidobakterií běžně používaných v potravinářském průmyslu, který je uváděn na trh po celém světě v různých mléčných výrobcích a kojenecké výživě (Saavedra, et al., 2004). Druh vykazuje vlastnosti typické pro rod *Bifidobacterium* (Hopkins, et al., 1998).

Z bakalářské práce (Dvořáková, 2015) vycházel předpoklad, že různé substráty jsou rozdílně využívány druhem *Bifidobacterium animalis*, což se projevuje na růstových křivkách, a že tento poddruh není schopen využívat galaktosu.

Cílem práce bylo testovat různé sacharidy při kultivaci bakterií druhu *Bifidobacterium animalis* za podmínek, že sacharidy byly použity jako jediný zdroj uhlíku. Byly použity glukosa, galaktosa a laktosa. Pomocí turbidimetrie byla změřena optická denzita a stanoveny růstové výtěžky váhovou metodou. Dalším cílem bylo zaměřit se na enzymovou aktivitu daného druhu. Všechny zmíněné cíle byly v práci dosaženy.

Vyslovená hypotéza byla, že různé substráty budou rozdílně využívány druhem *Bifidobacterium animalis*, což se projeví na růstových výtěžcích. Tato hypotéza byla potvrzena. Růstové výtěžky narostlé na laktose byly nižší než na glukose, protože oba testované kmeny pravděpodobně nejsou schopny galaktosu využít jako zdroj uhlíku, a to ani jako součást laktosy. Tento fakt je statisticky průkazný.

8 Reference

- Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I. U. & Fernando, L., 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, Svazek 83, pp. 1946-1951.
- Andoh, A., Tsujikawa, T. & Fujiyama, Y., 2003. Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Curr. Pharm. Des*, Issue 9, pp. 347-358.
- Anon., 2001. *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. [Online]
Available at: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>
[Accessed 11 March 2015].
- Anon., 2006. *Buňka - interaktivní výuková aplikace*. [Online]
Available at: <http://sszdra-karvina.cz/bunka/>
[Přístup získán 6 2 2017].
- Anon., 2012. *Medical Dictionary*. [Online]
Available at: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/obligate+anaerobe>
[Accessed 20 2 2015].
- Anon., 2015. *Dehydrated Culture Media*. [Online]
Available at: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0643&cat=&sec=1&c=UK&lang=EN
[Accessed 19 2 2015].
- Anon., 2016. *f-Test*. [Online]
Available at: <http://www.excel-easy.com/examples/f-test.html>
[Accessed 16 3 2017].
- Anon., 2016. *t-Test*. [Online]
Available at: <http://www.excel-easy.com/examples/t-test.html>
[Accessed 16 3 2017].
- Backhed, F. et al., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*, Issue 101, p. 15718–15723.
- Biavati, B., 2001. Bifidobacteria. In: B. Biavati, V. Bottazzi, L. Morelli & C. Schiavi, eds. *Microorganisms as health supporters*. Novara: Mofin-Alce, p. 10–33.

- Biavati, B. & Mattarelli, P., 2001. In: M. Dworkin, et al. eds. *The Prokaryotes*. New York: Springer, p. 1–70.
- Blattná, J., 2005. *Výživa na začátku 21. století aneb jak o výživě aktuálně a se zárukou*. Praha: Výživa servis s. r. o..
- Bunešová, V. a další, 2014. Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Beneficial Microbes*.
- Bunešová, V. a další, 2012. Bifidobacterium animalis subsp. lactis strains isolate from dog faeces. *Veterinary microbiology*, Svazek 160, pp. 501-505.
- Cai, Y., Matsumoto, M. & Yoshimi, B., 2000. Bifidobacterium lactis Meile et al. 1997 Is a Subjective Synonym of Bifidobacterium animalis (Mitsuoka 1969) Scardovi and Trovatelli 1974. *Microbiology and Immunology*, 44(10), pp. 815-820.
- Crittenden, R., 2009. Incorporating probiotics into foods. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, pp. 58-75.
- Crittenden, R. & Playne, M. J., 1996. Trends Food Sci. Technology. 7(353).
- de Man, J. D., Rogosa, M. & Sharpe, M. E., 1960. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, Issue 23, p. 130–135.
- Degnan, B. & Macfarlane, G., 1993. Transport and metabolism of glucose and arabinose in Bifidobacterium breve. *Arch. Microbiol.*, Svazek 160, pp. 144-151.
- Dvořáková, B., 2015. *Využití mono a oligosacharidů bifidobakteriemi*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů.
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P. & Vigi, V., 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl.*, Issue 91, p. 48–55.
- Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M. & Akkermans, A. D., 2002. *Applied and environmental microbiology*, Issue 68, pp. 219-226.
- Filippo, C. et al., 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA*, Issue 107, p. 14691–14696.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. & O'Mahony, J. A., 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. XIV editor Londýn: Blackie Academic and Professional.

- Gibson, G. R., 1998. Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *British Journal of Nutrition*, Issue 80, p. 209–212.
- Gibson, G. R., 2008. Prebiotics as gut microflora management tools. *J Clin Gastroenterol.*, Issue 42, p. 75–79.
- Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, Issue 125, pp. 1401-1412.
- Gibson, G. R. & Wang, X., 1994. Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiology Letters*, Issue 118, p. 121 – 128.
- Gomes, A. M. & Malcata, F. X., 1999. Trends Food Sci. Technology. 10(139).
- Hattori, M. & Taylor, T. D., 2009. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res.*, Issue 16, p. 1–12.
- Heller, K. J., 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, Svazek 73, pp. 374-379.
- Hooper, L., Midtvedt, T. & Gordon, J., 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr.*, Issue 22, p. 283–307.
- Hopkins, M. J., Cummings, J. H. & Macfarlane, G. T., 1998. Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *J. Appl. Microbiol.*, pp. 381-386.
- Janer, C. et al., 2005. Enzymatic ability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to hydrolyze milk proteins: identification and characterization of endopeptidase. *O. Appl. Environ. Microbiol.*, Issue 71, pp. 8460-8465.
- Jičinská, E. & Havlová, J., 1996. *Metody detekce patogenních mikroorganismů v potravinách*. 1. vydání editor Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací.
- Jindra, A., Šípál, Z. & Kovács, P., 1966. *Učebnice biochemie pro farmaceuty*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství.
- Kazdová, L. a další, 2013. FRUKTOSA A METABOLICKÝ SYNDROM – NOVÉ POZNATKY A OTÁZKY. *Atherosklerosa*.
- Kelly, D., King, T. & Aminov, R., 2007. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat Res.*, Issue 622, p. 58–69.

- Killer, J. et al., 2013. *Pseudoscariovia suis* gen. nov., a new member of the family Bifidobacteriaceae isolated from the digestive tract of wild pigs (*Sus scrofa*). *Systematic and Applied Microbiology*, Issue 36, pp. 11-16.
- Kodíček, M., 2007. *Biochemické pojmy - výkladový slovník*. 2. verze editor Praha: VŠCHT.
- Kolida, S., Tuohy, K. & Gibson, G. R., 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 2(87), pp. 193-197.
- Korakli, M., Ganzle, M. G. & Vogel, R. F., 2002. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J Appl Microbiol.*, Issue 92, p. 958–965.
- Kwon, H. S. et al., 2005. Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, Issue 250, pp. 55-62.
- Ledvina, M., 2009. *Biochemie pro studující medicíny 1. díl*. 2. vydání editor Praha: Praha Karolinum.
- Lisová, I. a další, 2013. Emulsion encapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 with Addition of Lecithin. *Czech J. Food Sci.*, Svazek 31, pp. 270-274.
- Mañas, J. M. G., 2017. *CURSO DE BIOMOLÉCULAS*. [Online] Available at: <http://www.ehu.eus/biomoleculas/hc/sugar33a.htm> [Accessed 6 2 2017].
- Masco, L. et al., 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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Issue 54, pp. 1137-1143.
- Mašek, K. & Cívárek, Z., 1973. *Biochemie*. Praha: Zdravotnické nakladatelství.
- McSweeney, P. L. & Fox, P. F., 2009. *Advanced dairy chemistry, Volume 3 - Lactose, water, salts and minor constituents*. 3. edice editor místo neznámé: Springer - Verlag. 825.
- Meile, L. et al., 1997. *Bifidobacterium lactis*. sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Syst. Appl. Microbiol.*, Issue 20, pp. 57-64.

- Meulen, R. V., Adriany, T., Verbrugghe, K. & Vuyst, L., 2006. Kinetic analysis of bifidobacterial metabolism reveals a minor role for succinic acid in the regeneration of NAD⁺ through its growth-associated production. *Appl. Environ. Microbiol.*, Svazek 72, pp. 5204-5210.
- Michaelsen, K. F., Weaver, L., Branca, F. & Robertson, A., 2003. Feeding and Nutrition of Infants and young Children. *WHO*.
- Minichová, S., Vanko, M., Arnold, O. & Hrinko, A., 2015. *Projekt: Božie dary*. [Online] Available at: http://www.1sg.sk/www/data/01/projekty/2015_2016/falcons/vyrobcovia/Projekt_Bozie_dary/Mlieko_a_laktoza.html [Přístup získán 6 2 2017].
- Mitsuoka, T., 1992. The human gastrointestinal tract. V: *The lactic acid bacteria in health and disease*. London: Elsevier.
- Modler, H. W., 1994. *Int. dairy J.* Svazek 4, p. 383.
- Mullan, W. M. A., 2008. *Probiotic microorganisms in food. Properties, benefits, safety and enumeration*. [Online] Available at: <http://www.dairyscience.info/index.php/probiotics/50-probiotics.html?showall=1&limitstart=> [Accessed 1 March 2015].
- Musil, J., 1994. *Molekulové základy klinické biochemie*. Praha: Grada Avicenum.
- Nevoral, J. & Bronský, J., 2010. *Probiotika a jejich klinické užití*. [Online] Available at: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/probiotika-a-jejich-klinicke-uziti-452403> [Přístup získán 11 Březen 2013].
- Orban, J. I. & Paterson, J. A., 2000. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *J. Microbiol. Meth.*, Issue 40, pp. 221-224.
- Pacák, J., 1975. *Stručné základy organické chemie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury.
- Picot, A. & Lacroix, C., 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Dairy Journal*, Svazek 14, pp. 505-515.
- Playne, M. J. & Crittenden, R., 1996. *Bull. International Dairy Federation*. 10(313).

- Poole, C. F. & Poole, S. K., 1991. *Chromathography today*. místo neznámé:Netherlands.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J. & Gopal, P. K., 1998. Selection and characterisation of Lactobacillus and Bifidobacterium strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.*, Issue 8, pp. 993-1002.
- Rackis, J. J., 1975. Oligosaccharides of Food Legumes: Alpha-Galactosidase Activity and the Flatus Problem. V: *Physiological effects of food carbohydrates*. místo neznámé:American chemical society, pp. 207-222.
- Rastall, R. A. et al., 2005. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol Ecol.*, Issue 52, p. 145–152.
- Rivero-Urgell, M. & Santamaria-Orleans, A., 2001. Early Human Development. 43(65).
- Ročková, Š. a další, 2012. Inter-species differences in the growth of bifidobacteria cultured on human milk oligosaccharides. *Folia Microbiol. Vol. 57*, Svazek 4.
- Rossi, M. a další, 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a compatarative study of pure and fecal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, Svazek 71, pp. 6150-6158.
- Rudolfová, J. & Čurda, L., 2005. Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci. *Chemické listy*, Issue 99, pp. 168-174.
- Saavedra, J. M., Abi-Hanna, A., Moore, N. & Yolken, R. H., 2004. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am. J. Clin. Nutr.*, Issue 79, pp. 261-267.
- Scardovi, V., 1984. Genus Bifidobacterium Orla-Jensen, 1924. In: N. Krieg & J. Holt, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: The Williamd & Wilkins Co., p. 1418–1434.
- Scardovi, V. & Trovatelli, L. D., 1974. Bifidobacterium animalis (Mitsuoka) comb. nov. and the “minimum” and “subtile” groups of new bifidobacteria found in sewage. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Issue 24, pp. 21-28.
- Sekhon, B. S. & Jairath, S., 2010. Prebiotics, probiotics, synbiotics: an overview. *J. Pharm. Educ. Res.*, Issue 1, pp. 13-36.

- Schaafsma, G., Roginski, H., Fuguay, J. W. & Fox, P. F., 2003. Encyclopedia of Dairy Sciences. V: Londýn: Academic Press, p. 1529.
- Snah, N. P., 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.*, Issue 83, pp. 894-907.
- Solano-Aguilar, G. et al., 2008. Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12) in the intestine after feeding of sows and their piglets. *Applied and environmental microbiology*, October, 20(74), pp. 6338-6347.
- Šimko, P., 2009. *Zásady zpracování potravin*. Bratislava: autor neznámý
- Šípal, Z. a další, 1992. *Biochemie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství.
- Tamura, Z., 1983. Nutriology of Bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora*, Issue 2, pp. 3-16.
- Teraguchi, S. et al., 1984. Vitamin production of Bifidobacteria originating from human intestine. *Jap. J. Soc. Nutr. Food Sci.*, Issue 37, pp. 157-164.
- Trojanová, I., Vlková, E., Rada, V. & Marounek, M., 2006. Different Utilization of Glucose and Raffinose in *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium animalis*. *Folia Microbiol.*, Svazek 51, pp. 320-324.
- Velíšek, J., 1999. *Chemie potravin*. 1. vydání editor Tábor: Osis.
- Ventura, M. et al., 2003. Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. *Appl. Environ. Microbiol.*, Issue 69, pp. 6908-6922.
- Ventura, M., Sinderen, D., Fitzgerald, G. F. & Zink, R., 2004. Insights into taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. Svazek 86, pp. 205-223.
- Ventura, M. & Zink, R., 2002. Rapid identification, differentiation and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Issue 68, pp. 6429-6434.
- Ventura, M. & Zink, R., 2003. Comparative sequence analysis of the *tuf* and *recA* genes and restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region sequences supply additional tools for discriminating *Bifidobacterium lactis* from *Bifidobacterium animalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Issue 69, pp. 7517-7522.

- Vlková, E. a další, 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe*, Svazek 34, pp. 27-33.
- Vrese, M. & Schrezenmeir, J., 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, Issue 111, p. 1–66.
- Vries, W. & Stouthamer, A., 1967. Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *J Bacteriol.*, Issue 93, p. 574–576.
- Walker, A., Cerdeno-Tarraga, A. & Bentley, S., 2006. Faecal matters. *Nat Rev Microbiol.*, Issue 4, p. 572–573.
- Watabe, J., Benno, Y. & Mitsuoka, T., 1983. *Bifidobacterium gallinarum* sp. nov.: a new species isolated from the caeca of chicken. *Int. J. Syst. Bacteriol*, Svazek 33, pp. 127-132.
- Wong, N. & Jenness, R., 1999. *Fundamentals of dairy chemistry*. 3. edice editor Gaithersburg: Maryland: Aspen Publishers.
- Zhu, L. & Dong, X., 2003. Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Issue 53, pp. 1619-1623.
- Zinedine, A. & Faid, M., 2007. Isolation and characterization of strains of bifidobacteria with probiotic proprieties in vitro. *World J. Dairy Food Sci.*, Issue 2, pp. 28-34.

