VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PROBIOTICKÉ BAKTERIE VE FARMACEUTICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE MÁRIA SURANOVÁ
AUTHOR

BRNO 2011

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PROBIOTICKÉ BAKTERIE VE FARMACEUTICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH

PROBIOTIC BACTERIA IN PHARMACEUTICAL PRODUCTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE MÁRIA SURANOVÁ
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE RNDr. MÁRIA VESELÁ, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2011

Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	**FCH-BAK0608/2010**	Akademický rok:	**2010/2011**
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Student(ka):	**Mária Suranová**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)		
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)		
Vedoucí práce	**RNDr. Mária Veselá, Ph.D.**		
Konzultanti:			

Název bakalářské práce:

Probiotické bakterie ve farmaceutických přípravcích

Zadání bakalářské práce:

1. Charakteristika probiotik a probiotických mikroorganismů.
2. Prostudujte metody stanovení probiotických bakterií ve farmaceutických přípravcích.

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

- -	- -	- -
Mária Suranová Student(ka)	RNDr. Mária Veselá, Ph.D. Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc. Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

- -
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT
Probiotiká sú živé mikroorganizmy, ktoré, ak sú podávané v adekvátnych množstvách, majú priaznivé účinky na zdravie hostiteľa. Používajú sa najmä ako súčasť špecifických mliečnych výrobkov a tiež ako doplnky stravy vo forme tabliet, toboliek, dražé alebo sirupov. Najznámejšie probiotické mikroorganizmy sú baktérie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* patriace do skupiny baktérií mliečneho kvasenia. Na hodnotenie probiotických prípravkov sa využíva široká škála metód mikrobiologickej analýzy potravín. Tieto metódy možno rozdeliť na kvantitatívne, určené na stanovenie počtu mikroorganizmov v produkte a kvalitatívne, ktoré sú schopné detekovať prítomnosť alebo absenciu daného mikroorganizmu. Obidva typy metód majú veľký význam pri kontrole účinnosti probiotických prípravkov.

ABSTRACT
Probiotics are live microorganisms, that when administered in adequate amount confer a health benefit on the host. They are used as part of specific milk products and either as dietary supplements in form of tablets, capsules, coated pills and sirups. The most famous probiotic microorganisms are bacteria of *Lactobacillus and Bifidobacterium* genus, that belong in group of lactic acid bacteria. For the assessment of probiotic preparations is used broad range of methods for the microbial analysis of foods. These methods can be separated on quantitative, that enumerate amount of microorganisms in product and qualitative, that are capable detect presence or absence of certain microorganisms. Both types of the methods have large importance in control of the efficiency probiotic preparations.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ
Probiotiká, doplnky stravy, *Lactobacillus, Bifidobacterium*, mikrobiologická analýza potravín

KEYWORDS
Probiotics, dietary supplements, *Lactobacillus, Bifidobacterium*, microbial analysis of foods

SURANOVÁ, M. *Probiotické bakterie ve farmaceutických přípravcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 39 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje boli správne a úplne citované. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

Rada by som touto cestou poďakovala mojej školiteľke RNDr. Márii Veselej, Ph.D. za odborné vedenie a čas, ktorý mi venovala pri vypracovávaní bakalárskej práce.

OBSAH

1 ÚVOD 6

2 TEORETICKÁ ČASŤ 7

2.1 História probiotík 7
2.2 Definícia pojmu probiotikum 7
2.3 Požadované vlastnosti probiotík 8
2.4 Rekombinantné probiotiká 11
2.5 Prebiotiká a synbiotiká 11
2.6 Zdravotné účinky probiotík 12
2.6.1 Prevencia a redukcia symptómov hnačky 12
2.6.2 Redukcia rizika spojeného s mutagenitou a karcinogenitou 13
2.6.3 Liečba a prevencia alergií 13
2.6.4 Cholesterol znižujúci efekt probiotík 14
2.6.5 Zmiernenie laktózovej intolerancie 14
2.6.6 Imunomodulačná aktivita probiotík 15
2.6.7 Inhibícia *Helicobacter pylori* a črevných patogénov 16
2.6.8 Prevencia nešpecifických črevných zápalových ochorení 16
2.7 Probiotické prípravky na českom trhu 17
2.8 Probiotické mikroorganizmy 19
2.8.1 Rod *Lactobacillus* 20
2.8.2 Rod *Bifidobacterium* 23
2.9 Vývoj a hodnotenie nových probiotík 24
2.10 Mikrobiologická analýza potravín 25
2.10.1 Kvantitatívne metódy 25
2.10.2 Kvalitatívne metódy 29
2.11 Kvantitatívne stanovenie probiotických baktérií v potravinách 31
2.12 Identifikácia probiotických baktérií v potravinách 33

3 ZÁVER 35

4 LITERATÚRA 36

5 ZOZNAM SKRATIEK 39

1 ÚVOD

Fermentované zložky potravy boli dôležitou súčasťou výživy človeka počas celej doby jeho evolúcie. Naši predkovia často skladovali svoju potravu naloženú v soli niekoľko týždňov aj mesiacov. Jedlo, ktoré následne požívali, preto obsahovalo veľké množstvo zdraviu prospešných baktérií. Odhaduje sa, že v paleolite ľudia konzumovali približne o miliardu baktérií viac, než sa nachádza v našej strave. Dôsledkom bola oveľa bohatšia a pestrejšia mikrobiálna flóra.

Najmä v posledných 50 až 100 rokoch však došlo k výraznej zmene stravovacích návykov, čo bolo spojené s poklesom príjmu zdraviu prospešných baktérií a látok dôležitých pre ich rast ako je napríklad vláknina. Do potravín ale aj vody a ovzdušia sa začali zavádzať rôzne chemické látky a v liečebnej praxi sa používalo čoraz väčšie množstvo synteticky vyrábaných prípravkov. Všetky tieto faktory sa dnes spájajú s rastúcim výskytom tzv. civilizačných ochorení ako napríklad alergií.

Kompletný návrat k prírodnej strave je už v súčasnosti nerealizovateľný. Preto sa vo výskumných centrách hľadajú možnosti, ako tento návrat čo najviac napodobniť a tak zmierniť riziko vzniku civilizačných ochorení a zabezpečiť predĺženie a zvýšenie kvality života. Jednou z možností je prijímanie látok schopných upraviť mikroflóru nášho čreva a nahradiť v ňom škodlivé baktérie užitočnými. Takýmito látkami sú aj probiotiká.

Existuje veľa rôznych štúdií dokumentujúcich prospešnosť probiotík pre zdravie človeka. Stále však chýba dostatok klinických dvojito zaslepených placebom kontrolovaných skúšok, ktoré ako jediné dokážu naozaj preukázať účinok daného probiotika. V niektorých oblastiach je preto ich účinok dokázaný, v ďalších sa pokladá len za možný. K tomu sa pripája aj fakt, že mechanizmy pôsobenia probiotík ešte nie sú celkom preskúmané a názory odborníkov na ne sa často odlišujú.

Na druhej strane ďalšie práce zaoberajúce sa prieskumom komerčne vyrábaných probiotík zistili, že deklarácie výrobcov o priaznivých účinkoch ich produktov sú často prehnané. Zistená bola častá extrapolácia výsledkov štúdií na zvieratách na ľudskú populáciu, rovnaké účinky boli pripisované jednému bakteriálnemu druhu bez ohľadu na špecifickosť jednotlivých kmeňov, baktérie neboli pomenované podľa platného vedeckého názvoslovia a najmä počet mikroorganizmov v probiotiku mnohokrát nezodpovedal informáciám uvedeným výrobcom a produkty teda neobsahovali koncentráciu probiotických baktérií potrebnú na dosiahnutie liečivých účinkov.

Výrazná propagácia probiotických výrobkov či už na internete, v televízii alebo formou plagátov a brožúrok v lekárňach aj ordináciách lekárov a zároveň správy odborníkov o neúčinnosti mnohých komerčných produktov spôsobujú často nedôveru a pochybnosti spotrebiteľa a otázka užívania probiotík je tak stále viac diskutovaná nielen v odborných kruhoch ale aj v širokej verejnosti.

Keďže neexistuje jednotný názor na pôsobenie probiotík na ľudský organizmus a informácie verejnosti sú v tomto ohľade často nepresné, buď ovplyvnené prílišnou reklamou výrobcov alebo výrazne skeptické, rozhodla som sa vo svojej práci zamerať na zhrnutie súčasných vedeckých poznatkov o probiotikách a probiotických mikroorganizmoch a takisto spomenúť aj niektoré moderné metódy stanovenia probiotických baktérií vo farmaceutických výrobkoch.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 História probiotík

Zdraviu človeka prospešné účinky potravín obsahujúcich živé mikroorganizmy, predovšetkým baktérie mliečneho kvasenia, sú známe už celé storočia. V Perzskej verzii Starého zákona (kniha Genezis 18:8) sa môžeme dočítať, že Abrahám získal svoju dlhovekosť vďaka pitiu kyslého mlieka a v roku 76 pred n. l. rímsky historik Plínius odporúčal podávanie fermentovaných mliečnych výrobkov pri liečbe gastroenteritídy.[1]

Jeden z prvých vedeckých dôkazov o tom, že tzv. správne baktérie v potravinách môžu pozitívne ovplyvniť zdravie hostiteľa, podal nositeľ Nobelovej ceny za medicínu za rok 1908 Iľja Mečnikov. Predpokladal, že dôvodom nezvyčajnej dlhovekosti bulharských roľníkov je pravidelná konzumácia fermentovaného mlieka, či už vo forme jogurtu, kumysu alebo kefíru. Identifikoval v ňom dve baktérie *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*. Tieto baktérie mali byť schopné usídliť sa v čreve človeka a tak znížiť počet patogénnych baktérií.[1,2]

Ďalšie výskumy síce preukázali, že vyššie uvedené baktérie nie sú schopné kolonizácie tráviaceho traktu ale napriek tomu vedci pokračovali v objavovaní možných priaznivých účinkov baktérií. Bolo objavených viacero kmeňov *Lactobacillus acidophilus*, ktoré sa dokázali usídliť v tráviacom trakte a vyvíjať tam značnú fyziologickú aktivitu. To vyvolalo veľký záujem o komerčné produkty fermentované touto baktériou. Významným okamihom pre priemyselnú výrobu bol však najmä rok 1930, kedy Minoru Shirota v Japonsku úspešne izoloval a kultivoval kmeň *Lactobacillus* schopný prežiť prechod cez tráviaci trakt. Kultúra dostala názov *L. casei* kmeň Shirota a začala sa používať pre produkciu fermentovaného mliečneho produktu zvaného Yakult, ktorý podnietil v roku 1935 založenie rovnomennej spoločnosti.[2]

Výskum v oblasti probiotík neskôr zastavila svetová hospodárska kríza a druhá svetová vojna, aj potom však pozornosť venovaná tejto problematike nebola dostatočná. Dôvodom bol objav antibiotík v roku 1928 ako veľmi účinného lieku proti infekčným chorobám.

Potreba hľadania novej alternatívnej liečby a teda aj význam probiotík vzrástol až poznaním niekoľkých skutočností:

- Uznanie, že terapia antibiotikami nie je taká účinná, ako sa predpokladalo. Aj keď nie je pochýb o jej schopnosti riešiť niektoré medicínske problémy, zároveň môže vytvárať problémy nové.
- Rastúce uvedomenie si faktu, že antibiotiká ničia ochrannú mikroflóru a vytvárajú tak predispozíciu k ďalším infekčným ochoreniam.
- Stúpajúca obava z kmeňov baktérií rezistentných voči antibiotikám, čo je dôsledok častého zbytočného predpisovania a teda zneužívania antibiotík.
- Obava, že priemysel nedokáže ďalej vyvíjať nové lieky rýchlosťou schopnou konkurovať rozvoju odolnosti mikroorganizmov voči starým antibiotikám.
- Všeobecne rozšírený záujem o ekologické metódy.[3]

2.2 Definícia pojmu probiotikum

Slovo probiotikum vzniklo ako opozitum k pojmu antibiotikum. Pochádza z gréckeho jazyka a znamená „pre život“. Prvýkrát bol tento pojem použitý v roku 1953 na označenie bežných

zložiek potravín ako vitamínov, aromatických látok, enzýmov a ďalších zlúčenín zúčastňujúcich sa procesov dôležitých pre život.[2]

V spojení so živými mikroorganizmami ho prvýkrát použili v roku 1965 Lilly a Stilwell. Definovali ním látky, produkované mikroorganizmami, ktoré stimulujú rast iných mikroorganizmov.[1]

Definíciu, ktorá sa najviac podobala súčasným popisom probiotík, formuloval až Parker v roku 1974. Probiotiká sú podľa neho organizmy a látky prispievajúce k črevnej rovnováhe. Nebola úplne presná, keďže slovo „látky“ v nej mohlo označovať aj antibiotiká.[1,2] Preto sa v roku 1989 pokúsil Parkerovu definíciu vylepšiť Fuller. Probiotikum opísal ako „živý mikrobiálny potravinový doplnok priaznivo ovplyvňujúci hostiteľské zviera zlepšením jeho črevnej mikrobiálnej rovnováhy“.[4] Zdôraznil tak význam živých buniek ako základnej zložky účinného probiotika ale definícia bola viac aplikovateľná na zvieratá ako človeka.

Existuje ešte veľa ďalších modifikácií pre definíciu probiotík, jednu z najnovších, publikovali v roku 2001 Schrezenmeir a de Vrese: „Probiotiká sú prípravky zo živých mikroorganizmov alebo produkty obsahujúce tieto mikroorganizmy, ktoré, ak sú podávané v dostatočných množstvách, menia mikroflóru v určitom anatomickom mieste hostiteľa a tým priaznivo vplývajú na jeho zdravie“.[1] Táto definícia zahŕňa požiadavku dostatočného množstva mikroorganizmov v probiotiku na dosiahnutie liečivých účinkov a takisto neobmedzuje pôsobenie probiotík len na mikroflóru tráviaceho traktu.

V súčasnosti sa väčšina autorov prikláňa k odporúčaniam pracovnej skupiny FAO/WHO na hodnotenie probiotík v jedle z roku 2002, ktorá popisuje probiotiká ako živé mikroorganizmy, ktoré podávané v adekvátnych množstvách majú priaznivé účinky na hostiteľa.[5]

Probiotické mikroorganizmy sú najčastejšie používané ako doplnky stravy alebo ako súčasť špecifických mliečnych výrobkov, najnovšie takisto ako súčasť kojeneckej a detskej výživy. V prípade doplnkov stravy sa jedná väčšinou o lyofilizované kultúry pozostávajúce z jedného alebo viacerých druhov probiotických baktérií, ktoré sú samostatne alebo spolu s ďalšími látkami vyrábané vo forme kapslí, toboliek, tabliet alebo dražé. Zakysané mliečne výrobky s obsahom probiotickej kultúry sa najčastejšie vyrábajú ako špeciálne nápoje a jogurty, mliečna a cereálna detská výživa sú dodávané ako dehydrované produkty. Všeobecne je teda možné probiotiká zaradiť k tzv. funkčným potravinám, ktoré okrem základnej funkcie nasýtenia a výživy organizmu majú aj ďalšie vlastnosti pozitívne ovplyvňujúce zdravie a vitalitu človeka.[6]

2.3 Požadované vlastnosti probiotík

Za najdôležitejšiu vlastnosť probiotických mikroorganizmov, vyplývajúcu aj z definície probiotík sa považuje ich životaschopnosť v produktoch a schopnosť dosiahnuť miesto účinku v aktívnej, živej forme a v koncentrácii dostatočnej na vyvolanie zdraviu prospešných účinkov. Ako dostatočná koncentrácia sa väčšinou udáva množstvo 10^6/g v tenkom čreve a 10^8/g v hrubom čreve. Tomu zodpovedá množstvo 10^{10} baktérií v 1 g konzumovanej potraviny, ktoré by malo kompenzovať možný pokles koncentrácie počas výroby a skladovania produktov ako aj počas prechodu konzumovaného probiotika tráviacim traktom.[6] Avšak prežitie mikroorganizmov v tráviacom trakte samo osebe neimplikuje vznik prospešných účinkov a takisto aj neživé mikroorganizmy sú schopné ovplyvniť zdravie človeka. Vo viacerých štúdiách bola pozorovaná schopnosť teplom inaktivovaných mikroorganizmov adherovať na kultúry tkanivových buniek, čo preukázalo, že životaschopnosť nie je nevyhnutne potrebná pre adhéziu, jednu z ďalších dôležitých vlastností funkčných probiotík. Inaktivované probiotiká boli takisto

pozorované inhibovať adhéziu a inváziu hnačku spôsobujúcich baktérií. Významnou je však najmä schopnosť častí bunkovej steny probiotík ako peptidoglykánu, komplexov kyseliny lipoteichoovej a S vrstvy proteínov stimulovať imunitný systém.[7]

Aby mohli probiotiká efektívne pôsobiť na svojho hostiteľa, musia prežiť prechod cez tráviaci trakt, čo znamená, že musia tolerovať kyslé a na proteázy bohaté prostredie žalúdka a prežiť a rásť v prítomnosti žlčových kyselín. Podľa najnovších výskumov je väčšina baktérií na kyslé prostredie citlivá, avšak napriek tomu tieto baktérie dosahujú vysokú koncentráciu vo vzorkách izolovaných z fekálií. S najväčšou pravdepodobnosťou prijímanie jedla, ktoré má veľkú pufrovaciu kapacitu zároveň s probiotikami chráni baktérie pri prechode tráviacim traktom. Ďalšou možnosťou ako baktérie ochrániť je podávanie probiotík v kapsliach.[6,8]

Významným výberovým kritériom je adhézia na črevnú mukózu. Táto vlastnosť je tradične považovaná za predpoklad kolonizácie. Avšak probiotiká nekolonizujú hostiteľa nastálo. Vo väčšine prípadov môžu byť detekované vo fekáliách niekoľko dní alebo týždňov po ukončení dávkovania a potom postupne miznú. Vykazujú teda len prechodnú kolonizáciu. Avšak napriek tomu je výber adhéznych kmeňov dôležitý, keďže vo viacerých prípadoch bolo preukázané, že tieto kmene znižujú napríklad dĺžku trvania rotavírusovej hnačky, pričom bol pozorovaný výrazný vzostup špecifických IgA protilátok, čo naznačuje, že adhézia môže byť dôležitá pre stimuláciu imunitného systému. Zvyšuje totiž čas zadržania baktérií v čreve a umožňuje priviesť baktérie a epitelové bunky do blízkeho kontaktu. Adhézia baktérií na určité miesta má takisto za následok zlepšenú expozíciu probiotík na mieste určenia dosiahnutím žiadanej odpovedi aj pri oveľa nižších dávkach.

S adhéziou úzko súvisí aj koagregácia, teda väzba jedného mikroorganizmu na ďalší. Bolo zistené, že probiotické mikroorganizmy, ktoré majú schopnosť koagregovať s patogénmi, môžu mať lepšiu schopnosť zabíjať ich, keďže produkujú antimikrobiálne látky v ich tesnej blízkosti.

Spomedzi všetkých probiotík bola produkcia antimikrobiálnych látok pozorovaná najmä u baktérií mliečneho kvasenia. Najčastejšie sú to organické kyseliny ako mliečna a octová a takisto aj peroxid vodíka a CO_2. Produkciu týchto látok aj počas prechodu baktérií tráviacim traktom naznačuje redukcia fekálneho pH.[7]

Samozrejme pre použitie probiotických baktérií v potravinách a takisto pre liečebné účely je dôležitá ich bezpečnosť. Len veľmi málo probiotických kmeňov bolo doteraz špecificky testovaných vzhľadom na túto podmienku, keďže dlhá história bezpečnej konzumácie niektorých probiotík a takisto ich prítomnosť v prirodzenej črevnej mikroflóre je považovaná za najlepšiu skúšku ich bezpečnosti. Napriek tomu sa v súčasnosti stáva čoraz dôležitejším potvrdiť bezpečnosť nových aj už existujúcich probiotických kultúr. Dôvodom je najmä neustále zvyšovanie počtu mikroorganizmov odolných voči antibiotikám. Toto testovanie by malo zahŕňať určenie odolnosti kmeňa k širokej škále bežných druhov antibiotík a potvrdenie neschopnosti prenosu génov zodpovedných za rezistenciu voči liekom alebo virulentných plazmidov. Ideálne je, ak probiotická baktéria preukáže toleranciu k antimikrobiálnym látkam používaným v klinickej praxi ale neprenáša túto schopnosť na iné baktérie. Vzhľadom na výrazný vzostup alergií by sa mali výrobcovia takisto pokúsiť minimalizovať alebo až eliminovať použitie potenciálne alergénnych látok vo výrobnom procese.[8]

Pre komerčné využitie probiotík je veľmi dôležité sledovať aj ich technologické vlastnosti. Hodnotí sa najmä možnosť ich produkcie vo veľkom množstve a za priaznivú cenu a takisto ich stabilita pri výrobnom procese, skladovaní a transporte k spotrebiteľovi. Dôležité sú aj

priaznivé organoleptické vlastnosti výsledného produktu a teda používané baktérie by nemali mať negatívny vplyv na chuť výrobku.[8,9]

Existuje veľa ďalších vlastností, ktoré by mali spĺňať funkčné probiotiká. Všetky tieto kritériá je však možné rozdeliť do štyroch základných kategórií: bezpečnosť, technologické vlastnosti, konkurencieschopnosť, účinnosť a funkčnosť.[9] Podrobný zoznam požadovaných vlastností probiotík obsahuje Tabuľka 1.

Tabuľka 1 *Výberové kritériá pre probiotické kmene*[9]

bezpečnosť	správna taxonomická identifikácia
	humánny pôvod
	netoxické, nepatogénne kmene
technologické vlastnosti	kmene vhodné pre masovú produkciu a skladovanie
	životaschopné vo veľkých populáciách
	stabilita žiadaných vlastností počas výroby kultúry, skladovania a transportu
	vhodné organoleptické vlastnosti
	genetická stabilita
konkurencieschopnosť	kmene schopné prežitia, rozmnožovania a metabolickej aktivity v cieľovom mieste
	odolné voči žlči a kyseline
	schopné konkurovať normálnej mikroflóre obsahujúcej rovnaké alebo blízko príbuzné kmene, potenciálne odolné voči bakteriocínom, kyselinám a ďalším antimikrobiálnym látkam produkovaným stálou mikroflórou
	schopnosť adhézie a kolonizácie
účinnosť a funkčnosť	jeden alebo viac klinicky potvrdených zdraviu prospešných účinkov
	antagonistické pôsobenie voči patogénnym baktériám
	produkcia antimikrobiálnych látok (bakteriocínov, peroxidu vodíka, organických kyselín...)
	stimulácia imunity
	antimutagénne a antikarcinogénne účinky
	produkcia bioaktívnych zlúčenín

2.4 Rekombinantné probiotiká

V súčasnosti sa živé geneticky modifikované probiotické kmene nachádzajú v strede záujmu viacerých výskumných pracovísk. Aplikácia metód génového inžinierstva v tejto oblasti totiž umožňuje vytváranie novej generácie probiotík s vopred známymi a s ohľadom na lepší terapeutický účinok upravenými biologickými vlastnosťami.

Baktéria *Bacillus subtilis* 2335 bola modifikovaná plazmidom kódujúcim syntézu ľudského interferónu alfa-2. U rekombinantného kmeňa bola pozorovaná schopnosť uchovávať vysokú antagonistickú aktivitu pôvodnej kultúry a zisk výrazných antivírových vlastností práve vďaka syntéze interferónu. Vzniklo tak nové probiotikum s kombináciou antibakteriálnych a antivírových vlastností. Klinické a bakteriologické vyšetrenia počas a po ukončení podávania subalinu potvrdili jeho neškodnosť a absenciu vedľajších účinkov. Účinnosť subalinu bola ďalej testovaná pri antitumorovej terapii s cyklofosfamidom. Kombinovaná liečba preukázala výrazne vyššiu inhibíciu rastu nádorov a rozširovania metastáz v porovnaní s kontrolnou skupinou, ktorej bol podávaný iba cyklofosfamid. Cytostatická aktivita peritoneálnych makrofágov bola vyššia u myší liečených subalinom.[10]

Ďalšie rekombinantné probiotiká so zlepšenou adhéziou na črevný epitel a in situ syntézou a sekréciou molekúl s terapeutickými vlastnosťami boli vytvorené použitím *Lactococcus lactis* (produkcia a sekrécia IL-10) a *E. coli* Nissle 1917 (produkcia a sekrécia peptidov inhibujúcich fúziu HIV). Rekombinantný *Lactobacillus plantarum* s fragmentom z *Clostridium tetani* bol pozorovaný vyvolávať silnú imunitnú odpoveď pri nasálnej aplikácii.[11]

2.5 Prebiotiká a synbiotiká

Ako už bolo spomenuté v podkapitole 2.3 po konzumácii sú probiotiká konfrontované s množstvom fyzikálnych a chemických bariér ako žalúdočné a žlčové kyseliny a len malá časť z nich je schopná dosiahnuť a udomácniť sa v čreve. Následne musia súťažiť o živiny a miesta kolonizácie so zvyčajnou mikroflórou, ktorá zahŕňa niekoľko stoviek ďalších bakteriálnych druhov. Okrem toho sa zistilo, že po prerušení podávania probiotík boli pridané baktérie z čreva rýchlo vyplavené. Tieto obmedzenia čiastočne prekonáva použitie prebiotík.[10] Sú to látky, ktoré enzýmy produkované ľudskými bunkami rozložiť nedokážu ale mikroorganizmy osídľujúce tráviaci trakt a ďalšie orgány (ústna dutina, pokožka, vagína) áno.[11] Aby látka mohla byť označená ako prebiotikum nesmie byť hydrolyzovaná ani absorbovaná v horných častiach tráviaceho traktu, musí byť schopná pozmeniť črevnú mikroflóru v prospech zdravšieho zloženia a indukovať luminálne a systémové efekty priaznivé pre zdravie hostiteľa.[10]

Prebiotiká zahŕňajú rozličné oligosacharidy (gluko-, frukto-, galakto-, isomalto-, xylo- a sójové oligosacharidy), laktulózu, laktosacharózu, vlákninu a jej štiepne produkty (pektíny, celulóza).[11] Medzi najviac preskúmané však patrí pôsobenie FOS ako prebiotík. Tieto látky sa v prírode vyskytujú najmä v rastlinnom materiále. Boli nájdené v mede, pive, kvasinkách, cibuli, lopúchu, ryži, pažítke, asparágu, artyčokoch, banánoch a ovse. Chemicky ich tvoria krátke až stredne dlhé reťazce z β-D-fruktánov. Niektoré tieto molekuly majú glukózové jednotky ako iniciálnu polovicu. β(2-1) osidická väzba FOS vrátane prvej glukózofruktózovej nie je hydrolyzovaná na vysoký stupeň niektorými tráviacimi enzýmami cicavcov. Podľa dĺžky reťazca sa FOS rozdeľujú na oligofruktózu (stupeň polymerácie menší ako 9) a inulín

(stupeň polymerácie do 60). Keďže bifidobaktérie ľahšie metabolizujú kratšie reťazce, príslušné polyméry sa najprv upravujú enzymatickou hydrolýzou.

Fermentácia FOS črevnou mikroflórou bola dokázaná in vitro, kedy sa použili prirodzené zmiešané fekálne baktérie. V ďalších pokusoch bola sledovaná fermentácia sacharidov glukózy, fruktózy, sacharózy, škrobu, pektínu a FOS kultúrami črevných baktérií a zmiešanými ľudskými fekálnymi kultúrami. Bolo zistené, že vyššie uvedené sacharidy ale z nich najmä FOS sú najviac fermentované bifidobaktériami. Naviac bifidobaktérie na týchto substrátoch rastú intenzívne, na účet bakteroidov, klostrídií alebo koliformných baktérií a tým ich redukujú na nízke počty alebo úplne potláčajú. Táto špecifická vlastnosť bifidobaktérií súvisí s produkciou enzýmu β-fruktosidázy. Fermentácia FOS bola potvrdená aj in vivo na ľuďoch. Mikrobiologické rozbory fekálnych vzorkov odobraných po dvoch týždňoch konzumácie FOS preukázaly zvýšenie počtu bifidobaktérií zo 6 na 22%, pričom obsah bakteroidov, klostrídií a fusobaktérií sa znížil z 25 na 4%, z 1 na 0,2%, zo 4 na 0,4%.[12]

Enzymatická premena prebiotík mikroorganizmami vedie k širokej škále zlúčenín ako mastné kyseliny s krátkym reťazcom (najmä kyselina maslová), niektoré aminokyseliny (arginín, cysteín), polyamíny, rastové faktory, vitamíny a antioxidanty. Tieto látky pokrývajú významnú časť výživy črevného epitelu a zúčastňujú sa množstva metabolických procesov.[11]

V súčasnosti sa probiotiká a prebiotiká čoraz viac používajú vo vzájomnej kombinácii, čo sa označuje ako synbiotikum. Synbiotiká sa definujú ako zmes probiotík a prebiotík, ktoré zlepšujú prežitie a implantáciu živých mikrobiálnych potravinových doplnkov, buď stimulovaním rastu alebo metabolickou aktiváciou zdraviu prospešných baktérií.[10]

V experimentálnych podmienkach o oligofruktózu obohatený inulín stimuloval sekréciu IL-10 v lymfocytoch a sekrečného IgA v ileu. Samotné probiotiká (*Lactobacillus* GG a *Bifidobacterium*) preukázali v tomto experimente len mierne zvýšenie imunitných funkcií. Súčasné podávanie probiotík a prebiotík zvýšilo sekrečný IgA v ileu a znížilo oxidačnú aktivitu neutrofilov. Zdá sa teda, že synbiotiká môžu mať odlišné účinky ako v prípade, keď sú probiotiká a prebiotiká podávané osobitne a teda nemôže dôjsť k aditívnemu a synergistickému efektu.[11]

2.6 Zdravotné účinky probiotík

Už od dôb Mečnikova je produktom, ktoré obsahujú probiotické baktérie pripisovaných mnoho pozitívnych účinkov. Zatiaľ čo niektoré sú veľmi dobre dokumentované a uznávané, ďalšie preukázali priaznivý potenciál pri testovaní na zvieratách a vyžadujú ešte potvrdenie týchto výsledkov štúdiami na ľuďoch.

Je dôležité uvedomiť si, že zdravotné účinky probiotických baktérií sú kmeňovo špecifické a teda neexistuje univerzálny kmeň a dokonca ani viacero kmeňov jedného druhu, ktoré by poskytovali všetky predpokladané účinky.[2] Účinok probiotík takisto závisí na veku a fyziologickom stave príjemcu.[13]

2.6.1 Prevencia a redukcia symptómov hnačky

Jedna z hlavných aplikácií probiotík je liečba a prevencia antibiotikami spôsobenej hnačky, ktorá je často zapríčinená zvýšeným výskytom *Clostridium difficile* po antibiotickej liečbe. *C. difficile* sa nachádza v malých množstvách aj v zdravom čreve, avšak liečba antibiotikami môže viesť k zničeniu pôvodnej mikroflóry a následne vzostupu koncentrácie tohto organizmu a produkcii toxínov vyvolávajúcich symptómy hnačky. Aplikácia probiotík v klinických štúdiách výrazne redukovala antibiotikami asociovanú hnačku v 52% prípadov. Riziko hnačky cestovateľov,

ktorá je spôsobovaná najmä enterotoxickou *E. coli* bolo znížené v 8% prípadov a akútna hnačka spôsobená rozličnými príčinami v 34% prípadov. Najlepšie výsledky definovaných kmeňov probiotík boli zistené u *L. rhamnosus* GG a *B. animalis* Bb-12.

Procesy, ktorými probiotiká redukujú trvanie hnačky sú stále z veľkej časti neznáme. Jedným z nich môže byť kompetitívne vylúčenie. Je to mechanizmus, ktorým probiotiká inhibujú adhéziu rotavírov a patogénnych baktérií modifikovaním glykozylovaného miesta na receptoroch epitelových buniek sliznice prostredníctvom vylučovania rozpustných faktorov. Prítomnosť probiotík teda predchádza poškodeniu cytoskeletálnych proteínov v epitelových bunkách, ktoré môžu spôsobiť patogény, čo vedie k zlepšeniu bariérnej funkcie sliznice.[2]

2.6.2 Redukcia rizika spojeného s mutagenitou a karcinogenitou

Potenciálne antigenotoxické, antimutagénne a antikarcinogénne vlastnosti probiotík zaujímajú v súčasnosti veľa pozornosti. Mutagény sú veľmi často formované počas stresu, vďaka vírusovým a bakteriálnym infekciám ale takisto aj prostredníctvom jedla.[2]

Hoci nemáme žiadne priame experimentálne dôkazy protirakovinového pôsobenia konzumácie probiotík u ľudí, existuje množstvo nepriamych dôkazov založených na laboratórnych štúdiách. Antimutagénne aktivity živých a mŕtvych buniek rozličných kmeňov *L. acidophilus, Bifidobacterium* ssp. a organických kyselín produkovaných týmito mikroorganizmami boli preukázané proti rozličným potenciálnym mutagénom a promutagénom. Živé probiotické baktérie preukázali vyššiu antimutagénnu aktivitu a ich účinnosť v inhibovaní mutagénov bola vyššia ako u mŕtvych buniek. Predpokladajú sa rozličné mechanizmy tohto pôsobenia ako je zvýšenie imunitnej odpovede hostiteľa, väzba a degradácia potenciálnych karcinogénov mikroorganizmami, kvantitatívne a kvalitatívne zmeny v črevnej mikroflóre. Ďalšie efekty zahŕňajú zmeny metabolických aktivít črevnej mikroflóry a zmeny fyzikálno-chemických podmienok v čreve.[2,10]

Jedným z najčastejších typov rakovín v súčasnosti je kolorektálny karcinóm (rakovina hrubého čreva a konečníka). Epidemiologické štúdie potvrdili, že jeho vznik ovplyvňuje najmä zloženie stravy. Konzumácia veľkého množstva mäsa, tukov a nedostatok vlákniny spôsobuje zmeny v zložení črevnej mikroflóry. Pozorovaný bol vzostup rodov *Bacteroides* a *Clostridium* a zníženie počtu bifidobaktérií. Tieto zmeny v mikroflóre boli spojené so zvýšením aktivity enzýmov ako β-glukuronidáza, azoreduktáza, ureáza a nitroreduktáza. Tieto enzýmy premieňajú prokarcinogény na karcinogény a môžu sa tak podieľať na zvýšení rizika vzniku kolorektálneho karcinómu.[14] Konzumácia stravy obsahujúcej *Bifidobacterium longum*, inulín alebo obidve tieto zložky bola spojená s poklesom enzýmu β-glukuronidázy a amoniaku vo fekáliách v experimentálnych zvieracích modeloch.[10]

2.6.3 Liečba a prevencia alergií

U novorodencov sú imunologické odpovede na environmentálne antigény odchýlené smerom ku Th2 cytokínovému profilu, ktorý je typický pre alergické choroby ako atopický ekzém, alergická nádcha, zápal očných spojiviek a astma. Vzostup týchto ochorení v rozvinutých krajinách sa pripisuje neúmernému dôrazu na hygienické opatrenia (hygienická hypotéza). Takéto správanie znemožňuje vystavenie novorodencov mikrobiálnym stimulom a imunitné odpovede preferujú trvalo Th2 profil. Nedostatočná stimulácia Th1 buniek nemôže vyrovnať rozšírenie Th2 fenotypu a výsledkom je predispozícia k alergickým ochoreniam.[11]

Oneskorená kolonizácia bifidobaktérií a laktobacilov v tráviacom trakte detí a rozdiel v zložení mikroflóry tráviaceho traktu môže hrať rolu v citlivosti k alergiám. Napríklad deti s atopickou

dermatitídou majú viac takých typov bifidobaktérií, aké sa vyskytujú u dospelých. Zdravé deti sú naopak kolonizované hlavne *B. bifidum* typickým pre kojencov. Mikrobiálna kolonizácia v črevách má teda zásadný význam pre navodenie orálnej tolerancie a preto riešenie súčasného problému so zvyšujúcim sa počtom alergií môže zahŕňať aj aplikáciu probiotických kmeňov v rannom detstve.[11]

Tento koncept potvrdilo viacero klinických štúdií ukazujúcich dlhodobý priaznivý efekt. Črevná kolonizácia novorodencov nepatogénnym kmeňom E. coli O83:K24:H1 umožnila vyššiu odolnosť voči nemocničným infekciám. Nasledujúce dlhé sledovanie detí kolonizovaných týmto kmeňom potvrdilo výrazne nízky výskyt alergií nasledujúcich 10 až 20 rokov ako aj opakovaných infekcií počas 10 rokov. Podávanie srvátky obohatenej o probiotiká (*B. lactis* alebo *Lactobacillus* GG) dva mesiace deťom s atopickým ekzémom bolo nasledované výrazným zlepšením zdravotného stavu. *Laktobacillus* GG podávaný kojencom a ich matkám znížil výskyt atopického ekzému u rizikových detí počas prvých dvoch rokov ich života. *L. rhamnosus* a *L. reuteri* po 6 týždňoch podávania zmiernili atopickú dermatitídu u detí vo veku od 1 do 13 rokov.[10]

2.6.4 Cholesterol znižujúci efekt probiotík

Je veľmi dobre známe, že strava bohatá na nasýtené tuky spôsobuje zvýšenie hodnôt krvného cholesterolu, ktoré je jedným z hlavných faktorov podieľajúcich sa na vzniku koronárnych srdcových ochorení. Už v roku 1974 Mann a Spoerry pozorovali pokles sérového cholesterolu u ľudí konzumujúcich veľké množstvá mlieka fermentovaného laktobacilmi. Neskôr bolo zistené, že podobné účinky majú aj bifidobaktérie.

Navrhnutých bolo niekoľko mechanizmov, akými probiotiká znižujú cholesterol. Jedným z nich je asimilácia cholesterolu baktériami v tenkom čreve, pričom baktérie musia byť živé a musia rásť, aby mali tento efekt. Ďalšou možnosťou je zabudovanie cholesterolu do bunkovej membrány baktérií. Na hypocholesterolemickom efekte probiotík sa zúčastňuje aj ich schopnosť enzymaticky dekonjugovať žlčové kyseliny. Dekonjugácia je katalyzovaná hydrolázou žlčových solí, pričom aktivita tohto enzýmu bola zistená u bifidobaktérií aj laktobacilov. Konjugované žlčové kyseliny sú dobre rozpustné a ľahko sa vstrebávajú. Rozpustnosť dekonjugovaných (voľných) žlčových kyselín je oveľa nižšia a teda sú menej absorbované a ľahko sa vylúčia stolicou. Tým sa zvýši potreba pre syntézu nových žlčových kyselín, ktorých prekurzorom je práve cholesterol. Jeho zvýšená spotreba by mohla viesť k jeho nižšej sérovej koncentrácii.[15]

Avšak tieto mechanizmy boli zatiaľ preukázané len v in vitro štúdiách. Zistenia in vivo štúdií boli rozdielne, v niektorých bolo znižovanie cholesterolu potvrdené, v ďalších sa nepreukázalo napriek tomu, že použité kmene baktérií boli neskôr schopné redukovať cholesterol in vitro. Napriek niekoľkým štúdiám na ľuďoch sa tento zdravotný efekt probiotík nepovažuje za dostatočne preukázaný.[2]

2.6.5 Zmiernenie laktózovej intolerancie

Laktózová intolerancia alebo inak povedané nedostatočné trávenie laktózy je spôsobená zníženou produkciou enzýmu β-galaktosidázy (laktázy). Je to normálny stav u všetkých dospelých cicavcov s výnimkou ľudí zo severozápadnej Európy.

Laktóza je počas trávenia hydrolyzovaná laktázou v membráne sliznice tenkého čreva na glukózu a galaktózu, ktoré sú ľahko absorbované do krvného riečiska. Avšak aktivita tohto enzýmu u ľudí s laktózovou intoleranciou je menšia ako 10% z hodnoty jej aktivity v detstve.

Laktóza je potom nedostatočne strávená a prechádza do hrubého čreva, kde vyvoláva zvýšenie osmotického tlaku a následnú hnačku. Okrem toho je laktóza v hrubom čreve fermentovaná črevnou mikroflórou. Tak vznikajú, okrem iného, produkty vodík a oxid uhličitý, čo sa klinicky prejavuje ako bolesti brucha, nevoľnosť a nafukovanie.[2]

Viacero štúdií potvrdilo, že ľudia s laktózovou intoleranciou fermentované mliečne výrobky znášajú lepšie ako ekvivalentné množstvá normálneho mlieka. Predpokladá sa, že za túto skutočnosť sú zodpovedné najmä tri faktory. Po prvé, tradičné kultúry používajúce sa na fermentáciu mlieka využívajú laktózu ako zdroj energie a tým znižujú jej obsah vo fermentovaných mliečnych výrobkoch. Ďalej, po konzumácii týchto výrobkov je väčšina baktérií rozložená v tenkom čreve a v nich obsiahnutý enzým je uvoľnený a ďalej hydrolyzuje laktózu. Ako posledný faktor sa uvádza väčšia viskozita fermentovaných mliečnych výrobkov, ktorá umožňuje dlhší prechod cez tráviaci trakt a teda lepšie strávenie laktózy.[14]

2.6.6 Imunomodulačná aktivita probiotík

Imunitný systém zahŕňa dve základné zložky a to vrodenú a získanú imunitu, ktoré spolupracujú na obrane organizmu pred vonkajšími aj vnútornými vplyvmi.

Črevné epitelové bunky sú v priamom kontakte s črevnou mikroflórou a teda prepájajú a zároveň oddeľujú imunitný systém. Je potvrdené, že imunitný systém môže byť priaznivo ovplyvnený probiotikami prostredníctvom rozpoznávacích receptorov nachádzajúcich sa na povrchu epitelových buniek. Vrodený imunitný systém prostredníctvom TLRs rozpoznáva veľkú skupinu chemických štruktúr v patogénoch ako napríklad lipopolysacharidy a lipoteichoovú kyselinu, čo umožňuje spoznať cudzie objekty a spustiť kaskádu imunitných obranných mechanizmov ako napríklad produkcia pre a proti zápalových cytokínov. TLRs sa nachádzajú najmä na makrofágoch a dendritických bunkách ale aj na povrchu buniek epitelu. Aktivácia TLRs iniciuje odpoveď dendritických buniek, čo vedie k produkcii cytokínov a v konečnom dôsledku aktivácii B a T lymfocytov.

Niekoľkými štúdiami bolo potvrdené potlačenie tvorby cytokínov a chemokínov vyvolávajúcich zápal prítomnosťou probiotík. Odpoveď imunitného systému na probiotiká bola slabšia ako na prítomnosť gramnegatívnych patogénov. V jednej štúdii bola porovnávaná gramnegatívna baktéria *Klebsiella pneumoniae* a *Lactobacillus rhamnosus*. Obidve kultúry indukovali dozrievanie dendritických buniek ale vykazovali rozličný cytokínový profil. *K. pneumoniae* aktivovala expresiu buniek typu Th1, kým *L. rhamnosus* redukoval produkciu cytokínov vyvolávajúcich zápal (TNF-α) a interleukínov IL-6, IL-12 nezrelými dendritickými bunkami ako aj IL-12 a IL-18 zrelými dendritickými bunkami.[2]

Lactobacillus acidophilus UFV-H2b20 podávaný sterilným myšiam stimuloval ich bunkovú imunitnú odpoveď, čo bolo indikované zlepšením aktivity mononukleárnych fagocytov. Neskôr to bolo preukázané aj vymiznutím gramnegatívnych baktérií naočkovaných týmto myšiam a zdvojnásobením počtu Kupfferových buniek zodpovedných za odstránenie patogénnych baktérií.

Orálne podávanie *B. breve* YlT4064 zase aktivovalo humorálnu imunitu zvýšením produkcie IgA protilátok proti rotavírom a IgG protilátok proti chrípkovým vírusom a teda zlepšilo ochranu pred týmito ochoreniami. Orálne podávanie *L. casei* myšiam stimulovalo Th1 bunky, aktivovalo bunkový imunitný system a inhibovalo výskyt nádorov a produkciu IgE protilátok. Podávanie jogurtu doplneného *L. acidophilus*, *B. bifidum* a *B. infantis* zvýšilo produkciu protilátok IgA proti choleratoxínu u myší. Kŕmenie myší majúcich mláďatá

bifidobaktériami zlepšilo produkciu IgA v mlieku a čreve matiek a následne umožnilo lepšiu ochranu mláďat pred antigénmi z potravy.[10]

2.6.7 Inhibícia *Helicobacter pylori* a črevných patogénov

Probiotické kultúry produkujú široké spektrum antibakteriálnych zlúčenín zahŕňajúcich organické kyseliny, peroxid vodíka, bakteriocíny, rozličné peptidy s nízkou molekulovou hmotnosťou, mastné kyseliny, fungicídne peptidy a proteíny. Mliečna a octová kyselina sú hlavnými organickými kyselinami produkovanými probiotikami počas ich rastu a ich pH znižujúci efekt v tráviacom trakte má bakteriocídny a bakteriostatický účinok. Okrem produkcie týchto látok bolo potvrdených viacero mechanizmov, ktorými probiotiká predchádzajú škodlivému pôsobeniu črevných patogénov. Zahŕňajú kompetíciu o živiny, inhibíciu epitelovej a slizničnej adhézie patogénov, inhibíciu invázie patogénov na epitel a stimuláciu slizničnej imunity.

Helicobacter pylori je črevný patogén vyvolávajúci dlhotrvajúcu infekciu, ktorá vedie k chronickej gastritíde, peptickým vredom a vzostupu rizika zhubných nádorov v tráviacom trakte. Aktuálne je infekcia *H. pylori* liečená kombinovanou terapiou pozostávajúcou z dvoch antibiotík a inhibítoru protónovej pumpy, ktorá hoci v mnohých prípadoch pôsobí veľmi efektívne, predstavuje drahú liečbu s mnohými vedľajšími účinkami, najmä antibiotikami asociovanou hnačkou a pravdepodobnosťou vzniku antibiotickej rezistencie proti črevným patogénom. Klinické dôsledky spojené s infekciou *H. pylori* závisia na kmeni tohto patogénu a rozsahu zápalu. Riziko spojené s vývojom peptických vredov a rakoviny tráviaceho traktu je priamo úmerné rozsahu infekcie. Jedno z opatrení, ktoré môže pomôcť redukovať intenzitu infekcie je strava obsahujúca probiotiká.

Probiotické mikroorganizmy nevyhubia *H. pylori* ale v zvieracích aj ľudských štúdiách preukázali schopnosť zmierňovať zápal. Veľa štúdií potvrdilo, že probiotiká podávané spolu s antibiotickou liečbou môžu vyriešiť problémy spojené s vedľajšími účinkami. Preukázalo sa takisto, že schopnosť potláčať infekciu *H. pylori* je kmeňovo špecifická.

L. casei Shirota preukázal významnú redukciu hodnôt kolonizácie *H. pylori* na sliznici u myší a táto redukcia bola spojená s výrazným poklesom s týmto ochorením asociovaných chronických gastrických zápalov. Redukcia kolonizácie *H. pylori* bola pozorovaná aj pri podávaní kmeňov *L. johnsonii* La1 a *L. gasseri* OLL2716. Podobne *L. acidophilus* bol schopný inhibovať rast *H. pylori*.[2]

2.6.8 Prevencia nešpecifických črevných zápalových ochorení

Nešpecifické črevné zápalové ochorenia predstavujú široké spektrum porúch charakterizovaných zápalom, tvorením vredov a abnormálnym zužovaním tráviaceho traktu vedúcich k bolestiam brucha, hnačke a krvácaniu z tráviaceho traktu. Tieto choroby sú reprezentované dvoma fenotypmi: ulceróznou kolitídou a Crohnovou chorobou. Sú to chronické, opakované ochorenia s náchylnosťou spôsobiť neskôr kolorektálny karcinóm.[2]

Za základ patogenézy týchto ochorení sa považuje zlyhanie imunitnej odpovede (strata imunitnej tolerancie) ku antigénom pochádzajúcim z črevného obsahu, konkrétne rezidentným baktériám tráviaceho traktu u osôb s genetickou predispozíciou k tomuto ochoreniu.[10,11] Práve zloženie črevnej mikroflóry viazanej na sliznicu sa javí hrať spúšťaciu úlohu. Niektoré kmene sú schopné spôsobiť ochorenie u osôb s genetickou predispozíciou (rod *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus faecalis*, enteroinvazívna *E. coli*, *Pseodomonas*, *Fusobacterium varium*), iné sa správajú neutrálne a ďalšie majú

protektívny efekt (laktobacily a bifidobaktérie, niektoré nepatogénne kmene *E. coli*). Zápalová odpoveď je výsledkom genetickej predispozície, straty imunity a zmeny správania slizničnej mikroflóry.

Súčasná terapia nešpecifických črevných zápalových ochorení sa týka výlučne blokády zápalových imunitných odpovedí (podávanie antibiotík). Tento prístup však rieši skôr dôsledky ako príčiny patogénnych procesov. Optimálna terapia potrebuje posúdiť aj prevenciu a recidívu týchto ochorení. Prevencia požaduje elimináciu dominantného antigénu a blokádu imunitnej odpovede k tomuto stimulu. Antibiotiká síce zabíjajú patogénne mikroorganizmy a sú teda účinné proti príznakom a komplikáciám týchto ochorení, avšak sú nevhodné pre prevenciu vzhľadom na ich krátko trvajúci vplyv na črevnú mikroflóru, značné neželané účinky rizika návratu patogénov a vývoj rezistencie.

Naopak probiotiká vykazujú viaceré protektívne mechanizmy proti týmto ochoreniam a môžu teda zastávať úlohu prevencie. Tieto mechanizmy zahŕňajú inhibíciu agresívnej mikroflóry, zlepšenie funkcie sliznice a epitelu ako bariéry a moduláciu imunity.[11]

Podrobná evidencia využitia probiotík pri liečbe nešpecifických črevných zápalových ochorení sa spája najmä s použitím *E. coli* pri ulceróznej kolitíde. Podávanie nepatogénneho kmeňa tejto baktérie malo efekt ekvivalentný s mesalazínom, čo je štandartná terapia pre zmiernenie tohto ochorenia. Podobne aj 5-aminosalycilová kyselina sa bežne používa pri liečbe ulceróznej kolitídy ale u niektorých ľudí môže vyvolávať alergické reakcie. U alergických pacientov ju dokázal nahradiť nový probiotický preparát VSL#3 (obsahuje 3 druhy bifidobaktérií, 4 druhy laktobacilov a jeden kmeň *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*).[10]

2.7 Probiotické prípravky na českom trhu

Probiotiká nemajú podľa platných predpisov v USA štatút liečiv a takisto príslušný panel Európskeho orgánu pre bezpečnosť potravín (EFSA) dosiaľ žiadnemu probiotiku neschválil zdravotné tvrdenie. Výroba probiotík sa preto zatiaľ riadi predpismi pre potraviny.[13]

V Českej republike sú probiotické prípravky registrované ako doplnky stravy. Po posúdení ich bezpečnosti Státním zdravotním ústavem (pokiaľ si ich výrobca alebo dovozca takéto posúdenie vyžiada) alebo na základe notifikácie týchto subjektov MZd ČR (predloženie etikety a oznámenie o uvedení na trh) sú probiotiká registrované v databázi RoHy (Registr hlavního hygienika).

V súčasnej dobe je v databázi RoHy registrovaných viac ako 100 druhov doplnkov stravy s obsahom probiotík a prebiotík, pričom asi 40% z nich obsahuje súčasne probiotiká aj prebiotiká. Najpoužívanejšou formou sú kapsle/tobolky, ďalej dražé, žuvacie tablety a len výnimočne sa jedná o práškové formy alebo roztoky (suspenzie). Obsah mikroorganizmov sa pohybuje rádovo v rozmedzí od 10^7 do 10^9 mikroorganizmov v jednej tobolke/kapsli, prípadne dennej dávke. Pokiaľ ide o zastúpenie mikroorganizmov v registrovaných doplnkoch stravy, na prvom mieste sa nachádza *Lactobacillus acidophilus* (73%), *Bifidobacterium bifidum* (40%), *L. rhamnosus*, *L. casei*, *B. longum*, *L. plantarum*, *L. lactis* (15%). V menej ako 10% výrobkov sú zastúpené *Streptococcus thermophilus*, *L. fermenti*, *L. helveticus*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii*, *B. infantis*, *B. lactis*, *Bacillus subtilis* a ojedinele potom rada ďalších druhov alebo rodov baktérií a kvasiniek.[6]

Zoznam aktuálnych probiotík, prebiotík a synbiotík v ČR uvádza na svojich webových stránkach stránkach aj česká Společnost pro probiotika a prebiotika (www.probiotika-prebiotika.cz), ktorá sa od svojho založenia v roku 2006 zaoberá podporou základného aj aplikovaného výskumu probiotík a prebiotík a takisto organizáciou odborných a edukačných

foriem prezentácie a komunikácie s odbornou i laickou verejnosťou o význame probiotík a prebiotík pre zlepšenie zdravotného stavu, prevenciu a liečenie chorôb.

Základný popis niektorých doplnkov stravy s obsahom probiotík na českom trhu je uvedený v tabuľkách (Tabuľka 2 a Tabuľka 3).

Tabuľka 2 *Niektoré probiotické doplnky stravy na trhu v Českej republike.*[16,17,18]

Produkt	Zloženie	Pomocné látky	Popis a vlastnosti produktu
Probio-Fix	*Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12	dextróza, výťažok z kvasníc, stearan horečnatý, askorban sodný, inozitol, glutamát sodný,alginát sodný, odstredené sušené mlieko, želatína, dioxid titanu	$4 \cdot 10^9$ baktérií v jednej kapsuli, lyofilizované baktérie uložené v špeciálnej polysacharidovej matrici, použitie pri liečbe hnačky, zápchy, atopických ochorení
Nutrolin B	*Bacillus coagulans* (*Lactobacillus sporogenes*), vitamíny skupiny B	neuvedené	$4 \cdot 10^7$ životaschopných spór baktérií v jednej kapsuli alebo 5 ml sirupu, napomáha k obnoveniu črevnej mikroflóry pri hnačkách spôsobených napr. antibiotikami a infekčnými ochoreniami, posilňuje imunitný systém
Biopron9	*Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium longum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacilus rhamnosus, Lactococcus lactis* spp. *lactis, Streptococcus thermophilus,* fruktooligosacharidy (50 mg)	kyselina askorbová, stearan horečnatý E470b, farbivo E171, škrob, želatina	$9 \cdot 10^9$ baktérií v dennej dávke (2 tobolky), odstránenie tráviacich ťažkostí (zápcha, hnačka, plynatosť, dráždivosť), rekonvalescencia po užívaní antibiotik, stimulácia imunitného systému, detoxikácia organizmu, problematická pleť, kandidózy a mykózy, regulácia hladiny cholesterolu, diétne a očistné kúry

Tabuľka 3 *Niektoré probiotické doplnky stravy na trhu v Českej republike.*[19,20,21]

Produkt	Zloženie	Pomocné látky	Popis a vlastnosti produktu
Biopron Forte	*Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, fruktooligosacharidy, (80 mg), inulín (50 mg)	želatina, farbivo E171	$1 \cdot 10^{10}$ baktérií v dennej dávke (2 tobolky), pri akútnych hnačkách rôzneho pôvodu (patogény, diétna chyba), pri hnačkách po užívaní antibiotík a hnačkách cestovateľov, obnova črevnej mikroflóry, posilnenie imunity
LactoFlor	*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus thermophilus*, inulín	neuvedené	$4{,}5 \cdot 10^{10}$ baktérií v jednej kapsuli, počas liečby antibiotikami pri zápche, hnačke, bakteriálnych a vírusových enterokolitídach, posilnenie imunitného systému, redukcia cholesterolu
Lactobene	*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus sporogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, vitamíny B6, B1, B12, kyselina listová	fruktóza, stearan horečnatý, zrážaný oxid kremičitý, broskyňová príchuť	najmenej $1{,}5 \cdot 10^{9}$ baktérií v jednom sáčku, udržuje a obnovuje črevnú mikroflóru, podporuje pravidelné zažívanie, posilňuje imunitný systém, vhodné po užívaní antibiotík

2.8 Probiotické mikroorganizmy

Z historického hľadiska boli a stále sú najpoužívanejšími probiotickými mikroorganizmami baktérie mliečneho kvasenia a to najmä rody *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Enterococcus*. Príčinou je najmä dlhodobá skúsenosť s týmito baktériami pri spracovaní mlieka, výrobe kvasenej zeleniny a siláže, ich prevažná nepatogénnosť a takisto ľahká manipulovateľnosť. Rod *Bifidobacterium* sa začal využívať až neskôr vzhľadom na to, že vyžaduje striktne anaeróbne podmienky a teda zložitejší technologický postup výroby.

Organizmy používané ako probiotiká sa však v súčasnosti neobmedzujú len na baktérie mliečneho kvasenia. Využívajú sa aj iné rody ako *Bacillus*, *Clostridium butyricum* a *Propionibacterium* a takisto kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) a mikroskopické vláknité huby (*Aspergillus oryzae*).[13]

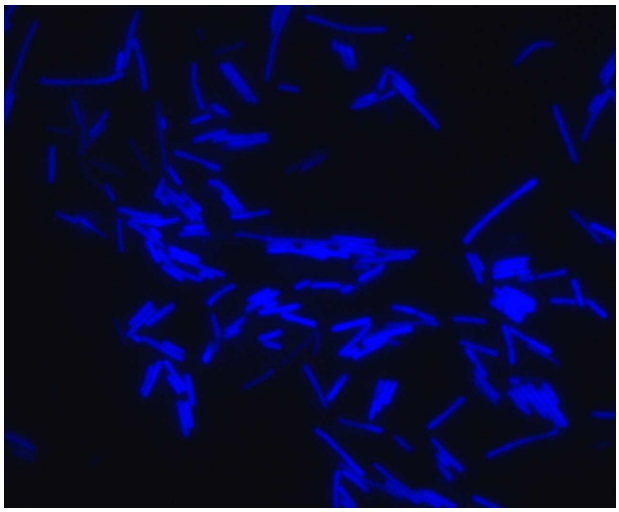
2.8.1 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* bol prvýkrát popísaný v roku 1901 Beijerinckom a následne bol rozdelený do skupín založených na fenotypových charakteristikách: najprv na základe optimálnych rastových teplôt a schémach fermentácie hexózy, neskôr s ohľadom na ich obligátno/fakultatívny a homo/hetero fermentačný potenciál. S rozvojom metód molekulárnej biológie bola nomenklatúra laktobacilov opäť pozmenená, nové skupiny boli vytvorené na základe 16S rRNA. V roku 2007 bolo opísaných 135 druhov a 27 poddruhov rodu Lactobacillus. Tento rod je vysoko heterogénny a predpokladajú sa ďalšie zmeny v jeho systéme pri použití moderných na poznaní genómu založených techník. Kompletná genómová sekvencia bola zatiaľ uverejnená pre 6 kmeňov patriacich druhom *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. johnsonii*, *L. sake*, *L. salivarius*, *L. plantarum*.[22]

Taxonómia

Taxonomické zaradenie rodu *Lactobacillus* je nasledovné:

- Doména: *Bacteria*
- Kmeň: *Firmicutes*
- Trieda: *Bacilli*
- Rád: *Lactobacillales*
- Čeľaď: *Lactobacillaceae*
- Rod: *Lactobacillus*[23]



Obr. 1 *Baktérie rodu Lactobacillus pod fluorescenčným mikroskopom (farbivo DAPI)*

Morfológia a fyziológia

Baktérie tohto rodu tvoria bunky tvaru pravidelných tyčiniek, obvykle dlhších, občas kokovitých, niekedy usporiadaných do palisád alebo krátkych retiazok.[23] Dĺžka buniek a stupeň ich ohnutia závisí od veku kultúry, od zloženia kultivačného média a tenzie kyslíka v prostredí. Bunky sa delia iba v jednej rovine. Pri raste v symbióze s inými organizmami tvoria nepravidelné involučné formy (kefírové zrná). Spravidla sú nepohyblivé.[24] Obsah bází G+C v DNA sa pohybuje medzi 32 až 51 mol%.[27]

Laktobacily sú grampozitívne a nesporulujúce, fakultatívne anaeróbne, občas mikroaerofilné, niektoré vyžadujú pri izolácii anaeróbne podmienky. Všeobecne platí, že prítomnosť 5 % CO_2 podporuje ich rast. Ich metabolizmus je fermentačný, hlavnými metabolitmi fermentácie sacharidov sú kyselina mliečna, octová, etanol a CO_2. Neredukujú nitráty, nehydrolyzujú želatinu a kataláza je negatívna.[23]

Podľa fermentácie hexóz, pentóz a glukonátov sa laktobacily delia na tri skupiny:

- Obligátne homofermentatívne: hexózy fermentujú skoro výlučne na kyselinu mliečnu, pentózy a glukonáty nefermentujú. Patrí tu napr. *L. acidophilus, L. salivarius, L. delbrueckii* spp. *bulgaricus, L. delbrueckeii* spp. *lactis, L. helveticus.*
- Fakultatívne heterofermentatívne: hexózy fermentujú skoro výlučne na kyselinu mliečnu, pri nedostatku glukózy produkujú niektoré druhy kyselinu octovú, etanol a kyselinu mravčiu, pentózy fermentujú pomocou indukovateľnej fosfoketolázy. Do tejto skupiny patria druhy ako *L. casei* spp. *casei, L. casei* spp. *rhamnosus, L. plantarum, L. sake, L. curvatus,*
- Obligátne heterofermentatívne: hexózy fermentujú na kyselinu mliečnu, kyselinu octovú, etanol a CO_2. Pentózy fermentujú na kyselinu mliečnu a kyselinu octovú. Zaraďujeme tu napr. *L. brevis, L. kefir, L. reuteri, L. fermentum, L. buchneri.*[24]

Výskyt, výživa a kultivačné vlastnosti

U zdravých ľudí sa laktobacily bežne vyskytujú na slizničných membránach v ústnej dutine (*L. salivarius*), ileu, hrubom čreve a sú dominantným mikroorganizmom vo vagíne (*L. acidophilus*). V tráviacom trakte sa začínajú objavovať veľmi skoro po narodení. V menšom množstve sa nachádzajú na rastlinách, oveľa viac na rozkladajúcich sa materiáloch rastlinného pôvodu. Rozhodujúcu úlohu hrajú v produkcii fermentovaného jedla: zeleniny, mäsa a najmä fermentovaných mliečnych výrobkov.[22]

Keďže sú adaptované na komplexné organické substráty, laktobacily sú veľmi náročné na živiny a rastové faktory. Okrem fermentovateľných sacharidov ako zdroja uhlíka a energie vyžadujú aj nukleotidy, aminokyseliny a vitamíny skupiny B. Ako kultivačné médium najlepšie vyhovuje živná pôda obsahujúca fermentovateľný sacharid, peptón, mäsový extrakt a kvasničný autolyzát. Ďalšie rastové faktory ako rajčinová šťava, mangán, estery kyseliny octovej a olejovej pôsobia na rast mnohých druhov stimulačne, pre iné sú esenciálne.

Najlepšie rastú v slabokyslých médiách s počiatočnou hodnotou pH 6,4 až 4,5. Rast sa zastavuje ak pH dosiahne hodnoty 4,0 až 3,6, čo však závisí od druhu a kmeňa. Väčšinou rastú pri mezofilných teplotách s hornou hranicou asi 40 °C, niektoré rastú aj pri nižších teplotách ako 15 °C, aj 5 °C. Termofilné laktobacily majú hornú teplotnú hranicu 55 °C a nerastú pod 15 °C.

Kolónie na agarových médiách mávajú priemer 2 až 5 mm s pravidelným okrajom, sú vyduté, hladké, lesklé, nepriehľadné a bezfarebné. V tekutých médiách rastú pravidelne v celom objeme, odumreté bunky klesajú na dno. Pri raste v bežných médiách netvoria charakteristický pach. V potravinách však prispievajú k tvorbe ich charakteristických chuťových a vôňových vlastností tvorbou prchavých látok ako acetaldehydu, kyseliny octovej, aminokyselín a v syroch aj H_2S.[24]

Priemyselne významné druhy

Laktobacillus bulgaricus

Tvorí tyčinky dlhé 5 až 10 μm, široké 0,7 až 1,5 μm, niekedy aj väčších rozmerov. Vyskytujú sa jednotlivo aj v retiazkach prechádzajúcich niekedy až do vlákien. V mladej kultúre sú grampozitívne, neskôr sa stávajú gramlabilnými. Vplyvom zmien teploty, povahy a koncentrácie dusíkatých látok majú tyčinky tendenciu meniť tvar a granulovať. V mliečnom prostredí rastie v teplotnom rozmedzí 22 až 25 °C. Optimálna teplota je 45 až 50 °C. Charakteristickým znakom je spôsob zrážania mlieka pri optimálnej teplote, kedy mlieko stuhne behom 3-4 hodín v celom objeme na porcelánovitú kompaktnú hmotu na rozdiel od *Lactobacillus acidophilus*, ktorý mlieko zráža pomalšie a odspodu. Na srvátkovom agare s autolyzátom a čínskou modrou rastie v podobe modrých machovitých kolónií, niektoré kmene tvoria hladké

kolónie. Spolu s druhom *Streptococcus thermophilus* tvorí kultúru tradičného jogurtu v pomere 2:1 až 1:2, eidamskú kultúru v pomere 1:1 a termofilnú tvarohovú kultúru.[25]

Laktobacillus helveticus

Vytvára tyčinky o veľkosti 2 až 6 μm, väčšinou samostatné, zriedkavo združené do veľmi krátkych retiazok. Pri vyššej kultivačnej teplote má sklon tvoriť niťovité tvary. Povrchové kolónie na agarových pôdach sú malé, šedobiele, hĺbkové kolónie sú podobné ako u *L. bulgaricus*. Mlieko očkované touto kultúrou dáva pevnú homogénnu zrazeninu bez plynov a srvátky.[25] Používa sa v syrárskych kultúrach, konkrétne ako súčasť tzv. ementálskeho zákysu (termofilného zákysu) na výrobu tvrdých syrov.[24]

Lactobacillus lactis

Tvorí dlhé 1,2 μm široké a 6 až 10 μm dlhé tyčinky, v čerstvej kultúre jednotlivé alebo vo dvojiciach, staršia kultúra tvorí rôzne dlhé tyčinky aj vlákna väčšinou s volutinovými zrnami. Rastie v rozmedzí teplôt 18 až 59 °C, optimálna teplota je 40 °C. Hĺbkové kolónie v tomatopeptickom agare sú drobné a vatovité, povrchové kolónie malé a šedobiele. Pôvodne bola táto tyčinky izolovaná z mlieka a mliečnych výrobkov. Je súčasťou syrárskych kultúr.[25]

Lactobacillus casei

Tvorí tyčinky 0,1 až 1 μm široké a dlhé 10 μm. Veľkosť tyčiniek je veľmi variabilná a závisí od kultivačného prostredia. Rastie v rozmedzí teplôt 10 až 40 °C, optimum je 30 °C. Na srvátkovom agare s kvasničným extraktom a roztokom čínskej modrej vyrastajú prevažne povrchové, hladké, sýtomodré kolónie. Hĺbkové kolónie majú diskovitý tvar s nepravidelným okrajom.[25] Tento druh bol pôvodne izolovaný z tráviaceho traktu ľudí.[22] Vyskytuje sa v mlieku, syroch, mliečnych produktoch, pekárenskom kvase, kravskom hnoji, siláži, tráviacom trakte a ústnej dutine ľudí.[24]

Lactobacillus plantarum

Tyčinky široké 0,7 až 1 μm a dlhé 3 až 8 μm. Vyskytujú sa jednotlivo alebo v krátkych retiazkach. Bunky majú zaoblené konce. Na mäsopeptónovom agare tvoria drobné belavé ploché kolónie v tvare disku. Rast je veľmi pomalý. Rýchlejšie rastie na sladinovom agare, kde tvorí vatovité kolónie s nerovnými okrajmi. Optimálna teplota rastu je 30 °C rastie však v rozpätí teplôt 10 až 40 °C. Niektoré kmene produkujú za určitých podmienok peroxid vodíka.[25] Vyskytuje sa v mlieku, mliečnych výrobkoch, siláži, kyslej kapuste, kvasenej zelenine, pekárenskom kvase, kravskom hnoji, tráviacom trakte zvierat a ľudí[24], z ktorého bol pôvodne izolovaný.[22]

Lactobacillus acidophilus

Tvorí tyčinky 0,5 až 1 μm široké a 2 až 10 μm dlhé vyskytujúce sa zriedkavo v pároch alebo krátkych retiazkach. V mladých kultúrach je grampozitívny, v staršej kultúre gramlabilný až gramnegatívny. V tejto fáze sú tyčinky pretiahnuté a poprehýbané. Na srvátkovom agare s kvasničným autolyzátom a roztokom čínskej modrej vyrastajú za 3 až 5 dní acidogénne vatovité kolónie s nepravidelným okrajom. Vytvára R- aj S-formy kolónií. R-forma je drsná a je typická pre kultúry izolované zo zdravého ľudského tráviaceho traktu. Rastové teplotné rozmedzie sa pohybuje medzi 22 až 48 °C. Optimálna teplota je 37 °C. Produkuje veľké množstvo kyseliny mliečnej, 1,6 až 2%. Využíva sa v nápojových kultúrach pre výrobu acidofilnej kyšky a kefíru a je najčastejšie používaným druhom pri výrobe farmaceutických

probiotík.[25] Vyskytuje sa bežne v ústnej dutine ľudí a tráviacom trakte ľudí, odkiaľ bol pôvodne izolovaný.[22]

2.8.2 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* bol prvýkrát popísaný v roku 1899 Tissierom ako prevládajúca mikroflóra u dojčiat. Tissier bol zároveň prvý, kto propagoval teoretické využitie tohto rodu a to konkrétne pri liečbe novorodeneckej hnačky, kedy odporúčal orálne podávanie veľkých dávok bifidobaktérií. Po objavení boli bifidobaktérie zaraďované do rôznych rodov ako napr. *Bacteroides*, *Bacillus*, *Nocardia* aj *Lactobacillus* a až v roku 1974 boli uznané ako samostatný rod.[26] V súčasnosti zahŕňa 29 druhov, 10 z nich bolo izolovaných z ľudských zdrojov.[27]

Taxonómia

Taxonomické zaradenie rodu *Bifidobacterium* je nasledovné:

- Doména: *Bacteria*
- Kmeň: *Actinobacteria*
- Trieda: *Actinobacteria*
- Rád: *Bifidobacteriales*
- Rod: *Bifidobacterium*[23]

Morfológia a fyziológia

Baktérie tohto rodu tvoria tyčinky veľmi rozmanitého tvaru, obvykle mierne zakrivené a kyjovité, často zhrubnuté či s náznakmi vetvenia. Usporiadané sú jednotlivo, po dvoch vo "V" zoskupení, občas v retiazkach, palisádach alebo ružiciach. Príležitostne vykazujú zhrubnuté kokovité tvary.[23] Obsah bází C+G v DNA sa pohybuje od 55 do 67 mol %.[27]

Bifidobaktérie sú grampozitívne, často nepravidelne ofarbené. Nepohyblivé, nesporulujúce, neacidorezistentné, anaeróbne (niektoré druhy môžu rásť na vzduchu s doplnkom 10 % CO_2). Chemoorganotrofné, aktívne fermentujú radu cukrov za produkcie prevažne kyseliny octovej a mliečnej v pomere 3:2. CO_2, kyselinu maslovú ani propionovú netvoria.[23] Ako vedľajšie metabolity tvoria malé množstvá kyseliny mravčej, etanolu a kyseliny jantárovej.[24] Kataláza je negatívna.[23] Kľúčový enzým v glykolitickej fermentácii je fruktóza-6-fosfát fosfoketoláza, ktorý slúži ako taxonomická vlastnosť pri charakterizácii rodu.[27]

Ako zdroj dusíka využívajú síran amónny. Niektoré kmene vykazujú v mlieku miernu proteolytickú aktivitu. V in vitro podmienkach bola pozorovaná produkcia alanínu, valínu, aspartátu a threonínu *B. bifidum*.

Niektoré bifidobaktérie izolované z ľudských zdrojov dokážu syntetizovať vitamíny skupiny B najmä vitamín B1 (thiamín), B12 (kyanokobalamín), B6 (kyselina listová), B9 (pyridoxín).[26]

Výskyt, výživa a kultivačné vlastnosti

Bifidobaktérie tvoria významnú súčasť pôvodnej mikroflóry teplokrvných zvierat. U ľudí sa vyskytujú v tráviacom a urogenitálnom trakte, konkrétne zastúpenie je limitované vekom a stravou. Dominujú v mikroflóre dojčiat, kde sa dostávajú krátko po narodení. Ich rozšírenie je stimulované glykoproteínovými zložkami κ-kazeínu v ľudskom mledzive a v menšej miere v ľudskom mlieku. So zvyšujúcim sa vekom zastúpenie bifidobaktérií klesá a predstavuje až tretí najbežnejší rod v ľudskej mikroflóre po *Bacteroides* a *Eubacterium*. Zároveň sú postupne druhy *B. infantis* a *B. breve* nahradené *B. adolescentis*. *B. longum* zostáva prítomné po celý

život. Tieto zmeny môžu byť ovplyvnené príjmom tzv. bifidogénnych faktorov v strave.[27] Medzi tieto faktory radíme laktulózu, N-acetyl-D-glukózamín obsahujúce sacharidy (bifidus faktor 1) a transgalaktozylované oligosacharidy.

Niektoré druhy tolerujú prítomnosť O_2 v prostredí ale len za prítomnosti CO_2 alebo bifidogénnych faktorov a takisto v mlieku, ak rastú spolu s ich prirodzeným črevným partnerom *L. acidophilus*. Na Petriho miskách však v aeróbnom prostredí nerastú.[24]

Optimálny rast je v rozmedzí 37 až 41 °C, hraničné teploty sú v rozmedzí 25 až 28 °C (minimum) a 43 až 45 °C (maximum). Optimálna hodnota pH je 6,5 až 7, nerastú pri pH 5,0 a 4,5 8,0 až 8,5.[24]

Na tuhých médiách bifidobaktérie nerastú.[26] Na polotuhých médiách vytvárajú hladké, vypuklé kolónie s hladkými okrajmi, smotanovo biele, lesklé a mäkkej konzistencie.[24]

Priemyselne významné druhy

Bifidobacterium bifidum

Tvorí tyčinky široké 0,5 až 0,7 µm a 2,0 až 8,0 µm dlhé združené v dvojiciach alebo v krátkych retiazkach. V kultúre udržovanej dlhšiu dobu v mlieku už nejavia známky vetvenia ako v kultúre čerstvo izolovanej zo stolice kojencov. Kolónie na srvátkovom agare s kvasničným autolyzátom sú biele, drobné, s nepravidelnými okrajmi. V tekutom prostredí tvoria zákal a neskoršie vločkový sediment.[25]

Bifidobacterium infantis

Tyčinky dlhé 1,5 až 8 µm a široké 05 až 1,3 µm. Sú nesporulujúce, nepohyblivé, dlhé aj kratšie, bez špecifických rysov, podobné mnohým ďalším druhom tohto rodu, morfológia je ovplyvnená kultivačnými podmienkami. Optimálna kultivačná teplota 37 až 41 °C. Na MRS agare tvorí 1-2 mm veľké kolónie, smotanové až biele, okrúhle, s hladkými neporušenými okrajmi, lesklé, konvexné, mäkkej konzistencie. Vyskytuje sa vo fekáliách kojencov a sajúcich teliat, fermentovaných mliečnych výrobkoch.[28]

2.9 Vývoj a hodnotenie nových probiotík

Vývoj moderného probiotika zahŕňa niekoľko nevyhnutných stupňov a pomocných činností. Medzi najzákladnejšie patrí izolácia, charakterizácia a kultivácia kmeňa, hodnotenie jeho biologických vlastností, možností produkcie, hodnotenia bezpečnosti a účinnosti.

Izolácia potenciálneho probiotického kmeňa sa v súčasnosti neuskutočňuje len zo zvieracej a ľudskej voľnej mikroflóry ale taktiež z baktérií, ktoré sú priľnuté na povrch sliznice tráviaceho traktu. Je to možné dosiahnuť jednak perendoskopickou biopsiou ale viac je preferovaná technika "brushingu". Keďže je menej invazívna, je prijateľnešia z etického hľadiska a zároveň umožňuje získanie kvalitatívne aj kvantitatívne bohatých vzoriek.[8]

Po izolácii a vyčistení kultúry nasleduje jej taxonomická klasifikácia. Pracovná skupina FAO/WHO na hodnotenie probiotík v jedle v roku 2002 stanovila metódy, ktoré je najvhodnejšie použiť pre zaradenie potenciálne probiotického mikroorganizmu. Na určenie druhu sa z genotypových metód odporúča najmä DNA-DNA hybridizácia, prípadne 16S rRNA katalogizácia. Tieto metódy je vhodné doplniť aj fenotypovými testami, z ktorých medzi kľúčové patrí zisťovanie modelov fermentácie cukrov a fermentačných produktov získaných spracovaním glukózy. Zaradenie ku konkrétnemu kmeňu sa uskutočňuje použitím reprodukovateľných genotypových metód ako je pulzná gelová elektroforéza a DNA amplifikačné techniky alebo

využitím jedinečnej fenotypovej charakteristiky. Klasifikovaný kmeň sa odporúča zaradiť do medzinárodne uznávanej zbierky mikroorganizmov.

Po zaradení mikroorganizmu nasledujú in vitro testy, prípadne testy na zvieratách, ktoré sú dôležité jednak pre stanovenie bezpečnosti probiotických mikroorganizmov a jednak pre získanie ďalších vedomostí o kmeňoch a mechanizmoch ich probiotických účinkov. Najčastejšie sa testuje odolnosť mikroorganizmov voči žalúdočným a žlčovým kyselinám, schopnosť adherovať na mukózu, epitelové bunky a tkanivá, schopnosť zabraňovať adhézii patogénov a produkcia antimikrobiálnych látok.

Aby mohli byť probiotiká uvedené do komerčnej výroby je nutný ešte posledný krok a to hodnotenie ich účinnosti a bezpečnosti na ľuďoch. Pracovná skupina FAO/WHO pre hodnotenie probiotík v jedle odporúča štandartné klinické skúšky (dvojito zaslepené, placebom kontrolované s náhodným výberom testovaných), pokiaľ je to možné, potvrdené druhou nezávislou štúdiou. Ak je potrebné potvrdenie schopnosti probiotika ovplyvňovať konkrétne ochorenia uskutočňuje sa porovnanie jeho účinku s obvyklým liečebným postupom.[5]

2.10 Mikrobiologická analýza potravín

Analýza potravín je disciplína, ktorá patrí medzi predmety teoretického základu. Z toho vyplýva, že sa v nej využívajú teoretické poznatky z analytickej chémie ale aj teoretické a praktické poznatky z fyziky, fyzikálnej chémie a biologických vied, najmä biochémie a mikrobiológie. Potrebné sú takisto znalosti z organickej, anorganickej chémie a chémie potravín. Analýza potravín zahŕňa aj senzorickú analýzu, ktorá využíva ako detektory ľudské zmysly. Rovnako dôležité sú pri analýze potravín štatistické metódy hodnotenia výsledkov.

Úlohou analýzy potravín je získavať informácie o zložení posudzovanej potraviny, vypracúvať nové metódy na sledovanie takých látok, ktoré neboli známe, respektíve hľadať optimálne podmienky pri metódach, ktoré boli vypracované na iné než potravinárske materiály. Analýzu potravín je možné rozdeliť na analýzu prírodných zložiek uplatňujúcich sa väčšinou pozitívne vo výžive aj technológii potravinárskych produktov, analýzu cudzorodých látok, ktoré sa uplatňujú ako negatívne zložky a senzorickú analýzu.

Okrem chemických, fyzikálno-chemických, prípadne mechanických princípov analýz sa v potravinárskej praxi čoraz viac využívajú aj biologické princípy stanovenia zložiek potravín konkrétne enzymatické a mikrobiologické metódy. Sú síce náročnejšie na čas a a zložitejšie ale zase sú citlivejšie a špecifickejšie.[29]

Mikrobiologické metódy pre analýzu potravín a probiotických doplnkov stravy je možné rozdeliť na kvantitatívne a kvalitatívne. Kvantitatívne metódy sa využívajú na stanovenie počtu mikroorganizmov vo vzorke a to buď priamo (vyčíslením množstva alebo objemu) alebo nepriamo (meraním absorbancie, impedancie atď.). Kvalitatívne metódy detekujú prítomnosť alebo absenciu daného mikroorganizmu vo vzorku (druhové zastúpenie mikroorganizmov) a to tiež buď priamo alebo nepriamo.[30]

2.10.1 Kvantitatívne metódy

Klasické kultivačné metódy

Konvenčné metódy pre počítanie baktérií v potravinách sú založené na počítaní kolónií. V týchto metódach je celkové množstvo baktérií v produkte určené očkovaním zriedených suspenzií vzorku na povrch pevného rastového média metódou rozteru alebo zmiešaním podielu

vzorky s tekutým agarovým médiom v Petriho miske (metóda prelivu). Počítanie sa uskutočňuje po inkubácii po uplynutí presne stanovenej doby pri teplote od 7 do 55 °C v aeróbnej, mikroaeróbnej alebo anaeróbnej atmosfére v závislosti od cieľového mikroorganizmu. Počas inkubácie sa každá individuálna bunka rozmnoží do kolónie, ktorá je viditeľná voľným okom. Klasické kultivačné metódy majú kvantifikačný limit od 4 cfu/ml pre tekuté potraviny alebo 40 cfu/g pre pevné potraviny, čo zodpovedá 4 kolóniám na platni, ak je použitý na očkovanie 1 ml východzej suspenzie. Podľa nory ISO 7218:2007 prítomnosť 1-3 kolónií na platni len indikuje detekciu cieľového organizmu a množstvo takto určené by malo byť ohlásené len ako odhadovaný počet.

Ak sú vo vzorkách potravín očakávané nízke počty baktérií (menej ako 50/g), ich množstvo môže byť odhadnuté pomocou metódy MPN. Pri tejto metóde sú riedenia potravinových vzoriek pripravené ako pre metódu počítania na platni. Tri radové riedenia sú potom prenesené do 9 alebo 15 skúmaviek s vhodným kvapalným médiom. Po inkubácii je spočítaný počet pozitívnych skúmaviek pre každé riedenie. Na základe tohto čísla je pre každé riedenie určené najviac pravdepodobné množstvo baktérií v originálnom vzorku pomocou štandartných MPN tabuliek a zohľadnením faktoru zriedenia.

MPN metóda je založená na kvalitatívnej skúške množenia testovaných podielov vzorku a použití štatistických procedúr a ako také sú jej výsledky náchylné k väčšej nepresnosti ako pri metóde počítania kolónií na platni. Preto je táto metóda považovaná za schopnú len odhadnúť počet mikroorganizmov.[30]

Biochemické metódy

Impedancia

Baktérie, ktoré aktívne rastú na kultivačnom médiu vytvárajú pozitívne alebo negatívne nabité konečné produkty, čo spôsobuje zmenu v odpore média (zmenu impedancie).[30] Na počiatku rastu je kultúra tvorená prevažne neionizovanými alebo málo pohyblivými organickými molekulami a makromolekulami (glukóza, bielkoviny, polysacharidy) a je prakticky nevodivá. Počas rastu stúpa koncentrácia malých iónov, najmä vodíkových katiónov a aniónov kyselín, takže vzrastá vodivosť roztoku, jej časový priebeh zodpovedá rastovej krivke. Priebeh rastu vodivosti je závislý na zložení média, veľkosti inokula, druhu elektród, povahe prítomného mikroorganizmu a rýchlosti jeho rastu. Vodivosť je významne ovplyvňovaná aj kapacitnou zložkou impedancie, pretože prítomnosť samotných mikroorganizmov a ich produktov ovplyvňuje zloženie a tým aj kapacitu elektrickej dvojvrstvy na elektródach a čiastočne ich polarizuje. Vzrast vodivosti nespôsobujú organizmy produkujúce neionizované produkty ako napr. alkoholy alebo organizmy schopné absorbovať vznikajúce ióny. V takýchto prípadoch je možné namiesto vodivosti zaznamenávať práve kapacitnú zložku impedancie.[31]

Čas, v ktorom je rast prvýkrát detekovaný sa označuje ako DT a je nepriamo úmerný logaritmu počtu baktérií vo vzorke. Na začiatku je požadovaný kalibračný proces na experimentálne zhodnotenie matematického vzťahu medzi DT a logaritmom z počtu cieľových baktérií.[30]

Impedancia je navrhnutá ako alternatívna metóda na kontrolu plnenia kritérií stanovených pre *E. coli* v mäkkýšoch. Príkladom prístroja založeného na meraní impedancie je BacTrac (Sylab). Môže byť použitý pre kvalitatívne a kvantitatívne aplikácie na detekciu biologickej záťaže, stanovenie množstva vybraných skupín mikroorganizmov a prítomnosti či absencie vybraných patogénov.[30]

ATP bioluminiscencia

Táto technika meria svetelnú emisiu produkovanú v prítomnosti ATP, ktorá je zapríčinená enzým-substrátovou reakciou medzi luciferázou a luciferínom svetlušiek alebo luciferázou a flavínmononukleotidom morských baktérií *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri* a rodov *Photobacterium* a *Xenorhabdus* (bioluminiscencia).[31] Množstvo vyprodukovaného svetla je priamo úmerné koncentrácii ATP a teda aj počtu mikroorganizmov v pôvodnom vzorku. ATP bioluminiscencia môže byť použitá na určenie celkového počtu baktérií ale je aplikovateľná len v prípade ich vysokého množstva (viac ako 10 000 cfu/g). Meranie ATP a počty mikroorganizmov sa dajú do vzťahu zavedením kalibračnej krivky.

Prítomnosť ATP však nie je obmedzená len na bakteriálne bunky ale je základnou zlúčeninou každého biologického materiálu. ATP bioluminiscencia je preto všeobecne používaná ako rýchly indikátor prítomnosti biologického materiálu. Ako taká je táto technika väčšinou používaná na odhadnutie celkovej povrchovej čistoty vrátane prítomnosti organických čiastočiek a mikrobiologickej kontaminácie poskytujúc výsledok za menej ako päť minút.

V mliečnej technológii je ATP metóda využívaná na rýchle určenie celkového počtu živých mikroorganizmov v mlieku použitím takých krokov pri príprave vzorku, ktoré degradujú organické čiastočky, somatické bunky a teda konečný signál vychádza len z mikrobiálnej ATP.[30]

Mikroskopické metódy

Fluorescencia

Fluorescenčný mikroskop sa od svetelného odlišuje najmä zdrojom svetla. Tým býva najčastejšie ultrafialové žiarenie. Toto žiarenie je po styku so špeciálnymi farbivami (fluorochrómamy), ktorými sa ofarbujú bakteriálne bunky, absorbované a vyžiarené ako viditeľné svetlo.

Špeciálnym príkladom využitia fluorescencie je DEFT. Je to mikroskopická metóda počítania buniek, ktorá spája filtráciu a fluorescenciu bakteriálnych buniek. Pri tejto metóde sa vzorka ošetrená použitím detergentov a enzýmov filtruje cez polykarbonátovú membránu. Mikrobiálne bunky sa tak koncentrujú a zbierajú na membráne, kde sú namorené fluoreskujúcim farbivom. Na tomto povrchu sa vykonáva mikroskopická analýza. Tento spôsob detekcie môže byť automatizovaný spojením mikroskopu s obraz analyzujúcim systémom. Samotné farbenie a počítanie zaberie menej ako pol hodiny až hodinu ale celkový detekčný čas predlžujú kroky potrebné na prípravu vzorku. Detekčný limit je 10^4 až 10^5 buniek na 1 ml. Práve tak ako nižšie uvedená prietoková cytometria aj táto technika sa využíva pre určenie celkového počtu mikroorganizmov v surovom mlieku.[30]

Prietoková cytometria

Prietoková cytometria je komplexná metóda sledujúca súčasne niekoľko optických alebo aj elektrochemických vlastností buniek prítomných vo vzorku.[31]

Suspenzia buniek preteká tenkým laminárnym prúdom meracou komôrkou, kde na ňu dopadá sústredený zväzok lúčov (z laseru alebo ortuťovej či xenónovej výbojky). Pomocou fotonásobiča sa zaznamenáva niekoľko parametrov bunky práve prechádzajúcej komôrkou. Ako prvé sa vyhodnocuje zoslabenie žiarenia absorbciou, merané v smere prechádzajúceho lúča. Zistená hodnota je najmä funkciou veľkosti bunky. Ďalej sa zaznamenáva rozptyl žiarenia v malom uhle k smeru dopadajúceho žiarenia, ktorý podáva informácie o objeme a veľkosti

bunky, tvare a vlastnostiach jej povrchu a o jej životaschopnosti. Vyhodnocuje sa aj rozptyl žiarenia v uhle 90°, ktorý informuje o granularite bunky, pomernom zastúpení nukleových kyselín, prítomnosti cytoplazmatických inklúzií atď. Nakoniec sa meria fluorescencia. Fluorescencia môže byť emitovaná samotnou bunkou, konkrétne bunkovými komponentami ako flavínové nukleotidy, pyridín a fotosyntetické pigmenty alebo pridanými fluorochrómami špecifickými pre niektoré organely alebo zložky buniek.[30,31]

Väčšina mikroorganizmov si je opticky príliš podobná na odlíšenie jedného od druhého alebo od iných častíc organického pôvodu a práve preto sa používa označovanie fluorochrómamy. Tieto fluorescenčné farbivá sa využívajú na vyšetrenie životaschopnosti a metabolického štádia mikroorganizmu. Prietoková cytometria sa tak často uskutočňuje v kombinácii s farbením živých aj mŕtvych buniek (farbivá SYTO-9 a PI) alebo v kombinácii s farbením živých buniek (farbivo ChemChrome) indikujúcim metabolickú aktivitu.

Pre bežné analýzy kvality mlieka bol vyvinutý automatizovaný prístroj (Bactoscan 8000 method). Táto metóda prietokovej cytomerie používa ethidium bromid (interkalujúci s DNA), ktorý zafarbuje baktérie v mlieku. Rušivé zložky mlieka sú redukované a rozptýlené ošetrením s detergentom a enzýmom pri 50 °C. Pri použití tohto prístroja sa získa výsledok po ôsmych minútach. Prietoková cytometria teda nachádza svoje uplatnenie v technológiach vody, nápojov a mlieka.[30]

Molekulárne metódy

Kvantitatívna real-time PCR

Schopnosť dvoch jednoreťazcových molekúl DNA hybridizovať in vitro prostredníctvom špecifického párovania bází je základom všetkých molekulárnych detekčných metód. Podobnosť dvoch sekvencií určuje ich stupeň hybridizácie. Vývoj real-time PCR umožnil okrem kvalitatívneho aj kvantitatívny prístup.[30]

Real-time PCR je založená na sledovaní polymerázovej reťazovej reakcie priamo počas jej priebehu pomocou fluorescenčných sond alebo farbív, ktoré detekujú množstvo PCR produktu behom reakcie zvýšením svojej fluorescenčnej aktivity. Fluorescencia je meraná počas každého cyklu PCR a je priamo alebo nepriamo úmerná množstvu amplifikátu prítomnému v reakčnej zmesi. Kvantifikácia sa uskutočňuje prostredníctvom matematickej analýzy amplifikačných kriviek získaných vynesením nameranej fluorescencie oproti poradovému číslu príslušného cyklu.

Typická amplifikačná krivka má esovitý tvar a je možné ju rozdeliť na tri časti. Najprv je to fáza, kedy je amplifikátu tak málo, že jeho fluorescencia ešte nedosahuje merateľných hodnôt. Ďalej nasleduje exponenciálna fáza, kedy množstvo produktu rastie exponenciálne a nakoniec fáza plató, kedy dochádza k saturácii systému a teda množstvo amplifikovaného produktu sa ďalej nemení a fluorescencia zostáva konštantná. Čím skôr dosiahne amplifikačná krivka exponenciálnu fázu alebo určitý fluorescenčný prah umiestnený do tejto fázy, tým viac štartovacích templátových molekúl bolo prítomných vo vzorke na začiatku reakcie. Cyklus, kedy amplifikačná krivka prekročí tento prah sa označuje ako C_T.

V mikrobiologickej analýze sa využíva tzv. absolútna kvantifikácia. Je založená na zistení, že existuje lineárny vzťah medzi logaritmom štartovacieho počtu templátových kópií a C_T príslušnej amplifikačnej krivky. Ak teda amplifikujeme vzorku o neznámej koncentrácii spoločne s dilučnou sériou štandartov o známej koncentrácii dostaneme kalibračnú krivku, z ktorej je možné odčítať východziu koncentráciu neznámeho vzorku.[32]

2.10.2 Kvalitatívne metódy

Klasické kultivačné metódy

Klasické kultivačné metódy sú používané pre testovanie prítomnosti alebo absencie patogénnych mikroorganizmov väčšinou v 25 g potraviny ale prípadne môžu byť vyhodnocované aj menšie alebo väčšie množstvá potravín. Klasické kultivačné metódy sa využívajú najmä na identifikáciu štyroch hlavných patogénov. Sú to *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes* a *E. coli* O157. Tieto metódy sú predmetom neustáleho dohľadu a sú intenzívne testované v rámci verifikácie a validácie.

V skutočnosti sú všetky patogény v potrave sub-letálne poškodené. Preto detekčné metódy často zahŕňajú dvojkrokový proces úpravy. Najprv prebehne resuscitácia mikroorganizmu trvajúca niekoľko hodín počas inkubácie v neselektívnom alebo poloselektívnom médiu umožňujúca znovuobnovenie a limitovaný rast (10^2 až 10^4 cfu/ml) stresovaného cieľového organizmu. Druhý krok zahŕňa úpravu v selektívnom médiu s cieľom potlačiť kompetitívnu flóru a zlepšiť množenie cieľového mikroorganizmu tak, aby dosiahol dostatočne vysoké hodnoty (10^4 až 10^6 cfu/ml) pre následnú izoláciu alebo detekciu rozmanitými metódami.

Pri použití klasických kultivačných metód je po úprave cieľový organizmus izolovaný na selektívne rozlišovacie agarové médium. Nakoniec je požadovaná purifikácia predpokladaných typických kolónií a ich potvrdenie použitím definovaného množstva morfologických, fyziologických a niekedy sérologických testov. Tieto potvrdzovacie testy sa usilujú overiť isté množstvo typických charakteristík, ktoré sú jednoducho určiteľné a umožňujú dobré rozlíšenie od kompetitívnych blízko príbuzných kmeňov.

Celkovo čas, ktorý je potrebný na získanie negatívneho výsledku testu (absencia typických kolónií) alebo predpokladaného pozitívneho výsledku testu (prítomnosť typických kolónií) sa pohybuje v rozmedzí od jedného do štyroch dní. Plné potvrdenie pozitívneho výsledku testu je päť až sedem dní.[30]

Imunologické testy

ELISA

ELISA je biochemická technika, ktorá spája imunologický s enzýmovým testom. Najčastejšie sa používa priama nekompetitívna ELISA (Sandwich ELISA). Táto technika zahŕňa viacero krokov. Najprv sú špecifické protilátky pripevnené na povrch 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky. Následne je pridaná vzorka s neznámym množstvom cieľového antigénu, ktorý sa začne spájať s protilátkami. Nenaviazané antigény sú odstránené vymývaním. Ďalej sú protilátky s naviazaným antigénom opäť pripevnené k doštičke a nasleduje adícia enzýmom označených sekundárnych protilátok, ktoré sú schopné viazať sa na predchádzajúce protilátky. Voľné sekundárne protilátky sú opäť odstránené vymývaním. Nakoniec je pridaný substrát, ktorý umožní premeniť enzým na detekovateľný signál. ELISA detekcia trvá 2 až 3 hodiny.

V súčasnosti je veľa ELISA testov k dispozícii v podobe robotizovaných automatizovaných systémov kvôli redukcii pracovného času a zlepšeniu reprodukovateľnosti a štandardizácie každého kroku v teste. Konečná detekcia je založená buď na chromogénnych substrátoch alebo na základe fluorescencie.[30]

Metódy založené na detekcii bakteriofágu

Bakteriofágy sú vírusy infikujúce baktérie. Tieto vírusy sú extrémne hostiteľsky špecifické. Väčšina baktérií môže byť infikovaná len konkrétnymi fágmi a je bežné, že pridaný fág môže rozpoznať a infikovať len jeden alebo niekoľko kmeňov či druhov baktérií. Špecifita týchto

fágov je sprostredkovaná asociovanými proteínmi, ktoré charakteristicky rozpoznávajú povrchové molekuly prístupných baktérií. Bakteriofágy alebo proteíny bakteriofágov sú súčasťou rozličných metód využívajúcich sa na detekciu patogénov.

Špecifické proteíny bakteriofágov môžu byť pripojené k paramagnetickým časticiam a zachytávať baktérie v suspenzii. Paramagnetické častice potiahnuté fágovými proteínmi fungujú oveľa lepšie ako na protilátkach založené častice (imunomagnetická separácia), keďže majú vyššiu citlivosť a lepšiu obnoviteľnosť.

Alternatívny postoj na využitie bakteriofágov poskytuje prístroj ALASKA FOOD DIAGNOSTICS: the Alaska AK Phage, ktorý je k dispozícii pre detekciu *Salmonella* spp. a *E. coli* O157. Táto metóda spája imunomagnetický separačný krok na naviazanie cieľovej baktérie a bakteriofágový krok na špecifickú lýzu živých baktérií a uvoľnenie vnútrobunkového enzýmu adenylátkinázy. Potom nasleduje amplifikačný krok založený na adenylátkinázou sprostredkovanej konverzii ADP na ATP. Konečne je vzniknutá ATP detekovaná pomocou bioluminiscencie. Štandartná ATP bioluminiscencia je takto citlivejšia vďaka amplifikačnému kroku a kombinácii so zachytením pomocou imunomagnetickej separácie. Špecifita testu je poskytovaná použitím protilátok počas imunomagnetickej separácie ako aj použitím špecifického bakteriofágu na lýzu buniek.[30]

Molekulárne metódy

FISH metóda

Hybridizácia ribozomálnej RNA s oligonukleotidovými sondami je jednou z najbežnejšie používaných molekulárnych techník, ktoré nie sú založené na PCR. Výber RNA namiesto DNA vedie k viac senzitívnej technike (vyššie číslo kópií). Pri použití metódy FISH sú mikrobiálne bunky ošetrené vhodným chemickým ustaľovačom a potom hybridizované pod prísnymi podmienkami na sklených doštičkách alebo v roztoku s oligonukleotidovými sondami. Tieto sondy sú dlhé 15 až 25 nukleotidov a na 5´konci majú kovalentne naviazané fluorescenčné farbivo. Po dôkladnom premytí, aby sa odstránili nenaviazané sondy, sú špecificky ofarbené bunky detekované pomocou epifluorescenčnej mikroskopie. Limit detekcie je približne 10^4 cfu/ml.[30]

PCR metóda

PCR je trojkroková cyklická in vitro procedúra založená na schopnosti DNA polymerázy kopírovať vlákno DNA. Oblasť, ktorá je amplifikovaná, je špecifikovaná voľbou primerov. Primery sú krátke oligonukleotidy, zvyčajne o veľkosti 20 až 30 nukleotidov, ktorých sekvencie sa zhodujú s koncom oblasti záujmu. Amplifikácia sa uskutočňuje počas určitého množstva cyklov. Počas každého cyklu je dvojreťazcová DNA matrica denaturovaná zahriatím a produkuje jednoreťazcové vlákna. Reakčná zmes sa potom ochladí dovoliac tak primerom naviazať sa na jednovláknové reťazce. To poskytne aktívne miesto pre termostabilnú DNA polymerázu, ktorá syntetizuje komplementárny reťazec produkujúc znova dvojreťazcovú DNA. V ďalších cykloch sa primery viažu na pôvodnú aj novosyntetizovanú DNA, čo vedie k exponenciálnemu vzostupu počtu kópií.

Výsledky PCR sú tradične (konvenčná PCR) detekované elektroforézou na agarózovom gele a farbením. To umožnuje amplifikovanú DNA vizualizovať ako pásy rozličnej veľkosti. Špecifickosť pásov môže byť ďalej identifikovaná sekvenovaním.[30,31]

2.11 Kvantitatívne stanovenie probiotických baktérií v potravinách

Spoľahlivé zistenie životaschopnosti baktérií v probiotických produktoch je veľmi dôležité, pretože definícia probiotík vyžaduje živé baktérie. Veľa štúdií preukázalo, že určenie, či sú bunky živé alebo mŕtve, nie je jednoduchá otázka.

Tradične používaná metóda na určenie životaschopnosti baktérií je ich kultivácia na platni a následné počítanie kolónií. Táto metóda však má jasné nevýhody. V prvom rade vyžaduje dlhý inkubačný čas. Často je komplikovaná technickými ťažkosťami ako zhlukovanie a inhibícia susediacich buniek. Aj výber vhodného média a inkubačných podmienok pre špecifické druhy môže byť náročné. Pre veľa druhov nie je vôbec známe vhodné rastové médium. Okrem toho pre niektoré prieberčivé mikroorganizmy ako bifidobaktérie, ktoré sú črevného pôvodu, môže byť zložité nájsť optimálne rastové médium, aby počítanie bolo spoľahlivé. Tieto baktérie majú jedinečné nutričné a environmentálne požiadavky pre svoj optimálny rast a počty na platni pre určité kmene môžu kolísať pri kultivácii na rozličných médiách. Hľadanie a overovanie vhodného rastového média je namáhavá úloha a často nie je možné testovať všetky potenciálne rastové médiá.[33]

Takisto sa ukázalo, že aj výber techniky očkovania môže ovplyvňovať presnosť počtu bifidobaktérií. Metóda prelivu je v ich prípade lepšia ako metóda rozteru, keďže je efektívnejšia vo vytváraní anaeróbnych podmienok výhodných pre tieto mikroorganizmy a takisto uľahčuje vývoj separátnych kolónií.[36]

Ďalší veľký problém metódy počítania kolónií na platni je, že takzvané dormantné (spiace) baktérie nie sú schopné rásť na konvenčných rastových médiách, ale napriek tomu môžu byť vyhodnotené ako živé použitím testov cytologickej životaschopnosti. Dormantné populácie môžu existovať v probiotických produktoch a mliečnych štartéroch a podobné populácie sa vyskytujú aj v žlčovou kyselinou stresovaných bifidobaktériách. Aj počas predĺženej úschovy sa môžu probiotické baktérie vo fermentovaných produktoch stať dormantnými.[33]

Všetky vyššie uvedené problémy potom môžu v konečnom dôsledku viesť k príliš nízkemu odhadu počtu baktérií vo vzorke.

Vo všeobecnosti sa v súčasnosti pre počítanie probiotických mikroorganizmov patriacich k rodom *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* v potravinárskych produktoch najviac využíva MRS agar, pričom pre bifidobaktérie sa k nemu dodávajú rozličné doplnky ako cysteín alebo antibiotiká.[34] Ďalšie médiá, ktoré boli ohlásené ako vhodné pre selektívne počítanie bifidobaktérií sú RCM[33], DP, BP a AMC.[36]

Kvantitatívna real-time PCR je založená na kvantifikácii bakteriálnej DNA. Hodnoty DNA nie sú spojené so životaschopnosťou, pretože mŕtve bunky si tiež môžu uchovať výrazné množstvá DNA. V porovnaní s real-time PCR je metóda FISH založená na detekcii 16S rRNA z buniek. Polčas rozpadu rRNA je kratší ako DNA, čo robí rRNA potenciálnou cieľovou molekulou pre testovanie životaschopnosti. Vhodnosť FISH na testovanie životaschopnosti baktérií závisí na rozklade rRNA po bunkovej smrti. Faktory ovplyvňujúce pozitívny signál FISH zahŕňajú množstvo cieľovej 16S rRNA prítomnej v bunke, prístupnosť sondy pre rRNA a intenzitu fluorescencie naviazanej sondy. Rozklad rRNA nasledujúci bunkovú smrť závisí spomedzi ďalších faktorov na hodnotách RNAsy vnútri a mimo bunky a integrite aj permeabilite bunkovej membrány. Vo viacerých štúdiách bolo preukázané, že mŕtve bunky môžu obsahovať isté množstvo zvyškovej rRNA a hoci intenzita fluorescenčného signálu týchto buniek je po smrti znížená, stále môže byť dostatočne silná pre vizuálne počítanie a mŕtve bunky tak môžu byť vyhodnotené ako živé. Z vyššie uvedeného teda vyplýva, že množstvá baktérií určené pomocou real-time PCR a metódy FISH nie je možné asociovať so životaschopnosťou

probiotických baktérií, keďže k degradácii DNA nedochádza a hodnoty rRNA sú aj po smrti baktérie stále dosť vysoké na to, aby mohli byť bunky detekované. Avšak obe tieto metódy sú vhodné pre určenie celkového množstva buniek.

Real-time PCR je rýchlejšia ale požaduje oveľa drahšie činidlá. Metóda FISH je naopak pracnejšia a náročnejšia na čas. Detekčný limit pre kvantitatívnu real-time PCR je približne 10^4 buniek/ml a pre metódu FISH kombinovanú s fluorescenčnou mikroskopiou a vizuálnym počítaním približne 10^6 buniek/ml. FISH môže byť tiež kombinovaná s prietokovou cytometriou.

FISH a kvantitatívna real-time PCR sú vhodné pre tekuté aj tuhé potraviny, za predpokladu, že testované potravinové vzorky sú homogénne alebo môžu byť jednoducho zhomogenizované. Potraviny, v ktorých sú bunky uzavreté v tuku môžu spôsobovať problémy, pretože bunky nie sú schopné ľahko suspendovať do vodnej fáze počas homogenizácie. V takýchto prípadoch homogenizačné tlmivé pufry môžu byť fortifikované miernymi detergentmi alebo emulgátormi na zlepšenie uvoľnenia bakterií z potravín.[33]

Pri sledovaní životaschopnosti baktérií v probiotických produktoch sa v súčasnosti bežne používajú fluorescenčné techniky. Ich základom je označovanie buniek pomocou fluorescenčných sond. Fluorescencia môže byť detekovaná fluorescenčným mikroskopom, prietokovou cytometriou alebo fluorimetrom. Väčšinou sa využíva duálny spôsob označovania zahŕňajúci farbenie živých buniek jedným fluorescenčným farbivom nasledované protikladným farbením mŕtvych alebo všetkých buniek iným farbivom, aby sa získal celkový počet buniek vo vzorke.[34,35] Sondy detekujú rozdiely v permeabilite membrány alebo enzymatickej aktivite buniek a to je základný rozdiel, ktorý ich odlišuje od klasických kultivačných metód spoliehajúcich na mikrobiálnu reprodukciu.[34]

Fluorescenčné sondy používané pri hodnotení životaschopnosti rôznych baktérií mliečneho kvasenia obsahujú farbivá viažuce sa na nukleové kyseliny ako PI, TOTO-1 (farbia mŕtve bunky), SYTO-9, DAPI (farbia živé aj mŕtve bunky, používajú sa spolu s ďalšími sondami) a fyziologické indikátory ako ChemChrome, BCECF, CFDA, FTUG a BOX.[34,35]

Okrem vhodnej úpravy vzorkov, výberu správneho pufru, inkubačnej doby a teploty je veľmi dôležitý aj výber fluorescenčnej sondy.[34] Použiteľnosť väčšiny z nich je totiž ovplyvňovaná napr. matricou vzorku, pH, fyziologickými a biochemickými stavmi cieľových mikroorganizmov.[35]

Z vyššie uvedených farbív sa najčastejšie uplatňuje kombinácia sond SYTO-9 a PI. Komerčne sú spolu dostupné vo forme LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit.[33,34,35] Použitie týchto sond je založené na poznatku, že pre prežitie baktérií zohráva významnú úlohu práve bunková stena, ktorá udržuje optimálne vnútorné podmienky pre bunkový metabolizmus a energetickú transdukciu.[33] Ako už bolo vyššie spomenuté obe farbivá sú schopné viazať sa na nukleové kyseliny. Avšak SYTO-9 je schopné voľne prechádzať cez bunkovú membránu a preto sfarbuje živé aj mŕtve bunky (zelená fluorescencia pri 530 nm na základe excitácie pri 488 nm). Naopak PI dokáže vstúpiť len do buniek s poškodenou membránou a teda sfarbuje len mŕtve bunky (červená fluorescencia pri 620 nm na základe excitácie pri 488 nm). Pretože PI ma vyššiu afinitu k DNA ako SYTO-9 je schopné ho z DNA vytlačiť. V konečnom dôsledku sa teda živé bunky javia ako zelené, mŕtve ako červené a poškodené ale stále živé bunky ako oranžové.[35]

Ďalšie farbivo použiteľné pre väčšinu čistých kultúr aj probiotických produktov je ChemChrome. Toto farbivo je fluorogénny ester, ktorý je premieňaný na voľný fluoresceín pomocou enzýmu esterázy v živých bunkách. Na súčasnú vizualizáciu mŕtvych a poškodených

buniek sa toto farbivo používa v kombinácii s napr. PI. Podľa viacerých výskumov neexistuje baktéria, ktorá by nemala žiadnu esterázovú aktivitu Avšak napriek tomu existuje niekoľko dôvodov, prečo sa živé bunky sa neofarbia pri použití substrátov esterázy a teda aj ChemChrome. Jednak môže byť aktivita esterázy v bunkách príliš nízka a jednak môže byť tento substrát neschopný prejsť do bunky, pretože jeho prepustenie či zadržanie je závislé na membránovom potenciáli.[34]

Použitie fluorescenčných sond požaduje, aby bunky boli extrahované z potravinovej matrice nepoškodené. Pre tekuté vzorky sa to dá jednoducho dosiahnuť hoci zákal zvyškových tuhých častíc môže spôsobovať problémy. Tie sa dajú odstrániť vhodnou centrifugačnou technikou. Pre husté kvapaliny ako jogurty a pre pevné potraviny napr. syry extrakcia baktérie požaduje, aby boli vzorky rozpustené v pufri a homogenizované. Homogenizačný proces by mal byť dosť dôkladný na to, aby uvoľnil baktérie z potravinovej matrice ale zároveň jemný, aby ju uchoval živú.[33]

Fluorescenčné techniky (1 až 2 hod.) sú podstatne rýchlejšie ako tradičné kultivačné metódy (2 až 5 dní). Navyše metódy počítania na platni môžu podhodnotiť počty živých buniek vďaka baktériám neschopným kultivácie, čo spôsobuje stres alebo poškodenie buniek. Z jednotlivých fluorescenčných metód sa prietoková cytometria ukazuje byť náchylnejšia k počtovým chybám, keďže jeden bunkový zhluk spočíta ako jednu bunku a zase naopak ďalšie fluoreskujúce častice okrem buniek môžu viesť k nadhodnoteniu počtu buniek pri tejto metóde. Výhodnejšie je v tomto prípade použitie farbiva ChemChrome, ktoré ofarbí len bunky baktérií, kým LIVE/DEAD BacTrac Bacterial Viability Kit môže sfarbiť aj iné častice a ak sú podobnej veľkosti ako bunky, prístroj ich vyhodnotí ako baktérie. Pri prietokovej cytometrii je teda voľba fluorescenčného farbiva a správna úprava vzorku oveľa dôležitejšia ako pri epifluorescenčnej mikroskopii. Avšak keďže prietoková cytometria umožňuje simultánne meranie viacerých bunkových parametrov a môže byť ľahšie automatizovaná, je vhodnejšia pre väčšie množstvá vzoriek.[34] Výsledky merania fluorescencie pomocou fluorimetra sú porovnateľné s epifluorescenčnou mikroskopiou. Avšak výhodou tejto metódy je, že zmeny vo fyziologickom stave bakteriálnych buniek v probiotických produktoch môžu byť detekované rýchlejšie a skôr ako pomocou mikroskopie. Fluorimetria je tak rýchla ako prietoková cytometria ale je oveľa jednoduchšia pre používateľa a zároveň aj cenovo výhodnejšia. Meranie pomocou fluorimetra môže byť teda sľubnou pomôckou pre rutinnú analýzu kvality probiotických preparátov.[35]

2.12 Identifikácia probiotických baktérií v potravinách

Napriek faktu, že užívanie probiotík s cieľom zlepšenia ľudského zdravia si v súčasnosti získava veľkú popularitu, stále existuje na strane konzumentov nedôvera ohľadne kvality a správneho označovania komerčných probiotických produktov. Veľa štúdií preukázalo, že regenerácia obsiahnutých probiotických mikroorganizmov je často veľmi slabá a že by sa malo venovať viac pozornosti presnejšiemu určeniu identity, bezpečnosti a funkčnosti týchto produktov.

Mikrobiálna analýza probiotických produktov pre taxonomické účely požaduje štandardizované a presné postupy pre izoláciu a identifikáciu obsiahnutých bakteriálnych kmeňov. V praxi je však vyčíslenie a izolácia probiotických baktérií z produktov stále problematická najmä z toho dôvodu, že neexistuje žiadne štandartné médium, ktoré by umožnilo selektívne odlíšenie bifidobaktérií od iných baktérií mliečneho kvasenia. Izolačné médiá aktuálne k dispozícii nie sú dostatočne selektívne alebo elektívne, čo vedie k nepresným alebo nereprodukovateľným výsledkom a veľa z nich nie je komerčne k dispozícii a sú preto

náročné na prípravu. Avšak metóda kultivácie mikroorganizmov na platni nasledovaná identifikáciou limitovaného množstva izolátu na druhovej úrovni je stále bežne používaná v kontrole kvality probiotík.

V súčasnosti existuje viacero metód založených na DNA "fingerprintingu" alebo sekvenovacej analýze ribozomálnych génov pre spoľahlivé určenie druhov probiotických baktérií. Len veľmi málo štúdií sa však dosiaľ pokúsilo rozlíšiť bakteriálne izoláty z probiotických produktov aj na individuálnej kmeňovej úrovni, hoci je to významná pomôcka pri hodnotení funkčnosti a bezpečnosti probiotík.

Pri identifikácii probiotických baktérií v produktoch sa v zásade využívajú dva prístupy. Prvý predstavuje kombináciu klasickej izolačnej stratégie založenej na kultivácii mikroorganizmu na vhodnom rastovom médiu a jeho následnú identifikáciu pomocou molekulárnych metód.[36] Pri tejto metóde sa mikroorganizmy zo vzorky vykultivujú na platni a v závislosti na morfologických znakoch kolónií sa náhodne vyberú dve až päť kolónií každého typu. Po ich purifikácii sú izoláty podrobené biochemickým testom a pozorovaniu pod mikroskopom. Na základe týchto pozorovaní sa odhadne, k akým rodom patria a sú ďalej vypestované na tekutom živnom médiu. Genómová DNA z týchto baktérií sa získa pomocou fenol-chloroformovej extrakcie. Nasleduje samotná identifikácia. Najprv sa uskutočňuje rodovo-špecifická PCR. Laktobacily je potom možné ešte triediť pomocou multiplex PCR na ich zaradenie do jednotlivých skupín. Pre odlíšenie druhov laktobacilov a bifidobaktérií nasleduje druhovo-špecifická PCR. Na odlíšenie potenciálnych replikátov sa používa RAPD-PCR. Nakoniec je uskutočnená PFGE na rozlíšenie jednotlivých kmeňov.[37] Takáto mikrobiálna analýza probiotických produktov je však náročná na čas a výsledky môžu byť skreslené zlou životaschopnosťou a nízkym počtom cieľového mikroorganizmu.

Preto sa v poslednom čase dostáva do popredia ako alternatívny a/alebo doplnkový druhý prístup pre kontrolu kvality probiotických produktov a to detekcia a identifikácia mikroorganizmov nezávislá na kultivácii. Táto metóda je založená na extrakcii celkovej bakteriálnej DNA z produktu nasledovanej selektívnou amplifikáciou špecifickej časti bakteriálnych 16S rRNA génov použitím nested-PCR a separáciou výsledných amplikónov použitím DGGE.

Väčšinou je DGGE schopná detekovať v produkte všetky alebo viac druhov baktérií ako prístup založený na kultivácii, keďže je schopná určiť aj prípadne mŕtve baktérie vo vzorke. Tieto rozdiely medzi počtami druhov baktérií určených DGGE a klasickou identifikáciou založenou na kultivácii môžu byť významné najmä u lyofilizovaných alebo enkapsulovaných produktov. Mikrobiálne kvality týchto probiotík totiž nie sú také dobré ako u fermentovaných mliečnych výrobkov, keďže technologické procesy použité pri ich výrobe môžu výrazne obmedziť regeneráciu najmä bifidobaktérií na niektorých živných médiách. Skutočnosť, že metóda DGGE dokáže detekovať aj mŕtve baktérie vo vzorke však môže byť na druhej strane aj istou nevýhodou. DGGE, ktorá síce poskytuje rýchlu a reprodukovateľnú taxonomickú analýzu probiotických produktov a má lepší detekčný potenciál ako klasická na kultivácii založená analýza totiž nie je schopná poskytnúť informácie ohľadom metabolického stavu mikroorganizmov, ktoré sú veľmi dôležité pre hodnotenie účinnosti probiotík.[36]

3 ZÁVER

V tejto práci boli zhrnuté základné poznatky o probiotikách. Na začiatku bola opísaná história ich používania a vývoj súčasnej definície, takisto bola stručne zmienená definícia prebiotík a synbiotík a krátka kapitola bola venovaná rekombinantným probiotikám ako modernému trendu v oblasti vývoja nových probiotík. Takisto boli v práci zhrnuté požadované vlastnosti, ktoré by mali účinné probiotiká spĺňať a ich význam pri liečbe niektorých ochorení. Stručne bolo spomenuté aj zastúpenie probiotík ako doplnkov stravy na českom trhu. Ďalej nasledoval opis najčastejšie používaných probiotických baktérií, konkrétne bifidobaktérií a laktobacilov. Na záver boli stručne popísané princípy jednotlivých metód mikrobiologickej analýzy potravín a aplikácie týchto metód v kvantitatívnom aj kvalitatívnom hodnotení probiotických produktov.

Nie všetci autori sa zhodujú v názoroch na zdravotné pôsobenie probiotík. Niektoré z účinkov probiotík sú iba predpokladané alebo boli dokázané len v in vitro štúdiách či v pokusoch na zvieratách a o ich pôsobení na zdravie ľudí svedčia len nepriame dôkazy. Takisto ešte neboli objasnené všetky mechanizmy ich pôsobenia.

Probiotiká nie je možné chápať ako všeliek. Väčšinu ochorení, u ktorých bolo opísané ich priaznivé pôsobenie nedokážu vyliečiť sami osebe a sú vhodné najmä ako podporná a doplnková terapia popri normálnej liečbe napr. antibiotikami (nešpecifické črevné zápalové ochorenia, infekcia *Helicobacter pylori* a inými črevnými patogénmi, hnačka, zápchy atď). Úloha probiotík pri liečbe týchto ochorení spočíva najmä v zmiernení ich príznakov a skrátení doby liečby. Takisto môžu poslúžiť ako prevencia pred ich vznikom alebo prípadným opätovným návratom. Z tohto hľadiska majú probiotiká veľký význam pri udržovaní celkového dobrého zdravotného stavu človeka a znižovaní rizika vzniku rôznych ochorení.

Napriek faktu, že niektoré z deklarovaných zdravotných účinkov môžu byť poskytované aj mŕtvymi baktériami, predpokladá sa, že väčšina priaznivých efektov probiotík požaduje metabolicky aktívne bunky. Aj samotná definícia opisuje probiotiká ako živé baktérie. Je teda samozrejmé, že produkty, u ktorých sa zistí, že dlhšie neobsahujú živé baktérie, musia zákonite vzbudiť pochybnosti a nedôveru u prípadných konzumentov. Preto je nutné kontrolovať u probiotických produktov, či naozaj obsahujú živé baktérie a či je ich množstvo dostatočné na to, aby mohli skutočne pôsobiť na zdravie človeka.

Takisto správne označovanie probiotických produktov a obsah druhov a kmeňov s deklarovanými zdravotnými účinkami zohráva nemalú úlohu v ich účinnosti. Nie všetky kmene daných druhov totiž majú podobné charakteristiky. Tento fakt je významný najmä v prípade vlastností dôležitých pre prežitie probiotických mikroorganizmov v tráviacom trakte človeka ako rezistencia k nízkemu pH, lyzozýmom a žlči. Len malé percento kmeňov a druhov, vo všeobecnosti menej ako 10% je schopných rásť v takýchto podmienkach. Efekt probiotík je tak závislý na individuálnom kmeni a teda je jednoznačne potrebná správna taxonomická identifikácia komerčne používaných kmeňov.

V zaistení skutočnej účinnosti probiotík teda zohráva nemalú úlohu ich spoľahlivá kontrola a hodnotenie. Okrem dôkladného a najlepšie klinickými štúdiami potvrdeného hodnotenia ich zdravotných účinkov je veľmi dôležité sledovať a kontrolovať aj obsah jednotlivých probiotických produktov a to z kvantitatívneho aj kvalitatívneho hľadiska.

4 LITERATÚRA

[1] Schrezenmeir, J., de Vrese, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics-approaching a definition. *Amer J Clin Nutr*, 2001, vol. 73, pp. 361–364.

[2] Vasiljevic, T., Shah, N. P. Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 2008, vol. 18, pp. 714–728

[3] Bengmark, S. Ecological kontrol of gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut*, 1998, vol. 42, pp. 2–7.

[4] Fuller, R. Probiotic in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 1989, vol. 66, pp. 365–378.

[5] Guidelines for evaluation of Probiotic in Food, Report of a Point FAO/WHO Working Group, 2002.

[6] Špelina, V., Winklerová, D. Princípy hodnotenia účinnosti a bezpečnosti probiotík a charakteristika registrovaných doplnkov stravy s obsahom probiotík a prebiotík. *Pediatrie pro praxi*, 2009, roč. 10, č. 4, s. 247–250.

[7] Ouwehand, A., C. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 1999, vol. 9. pp. 43–52.

[8] Del Piano, M., et al. Probiotics-from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, 2006, vol. 38, pp. 248–255.

[9] Klaenhammer, T. R., Kullen, M. J., Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, vol. 50, pp. 45–57.

[10] Kaur, I. P., Chopra, K., Saini, A., Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 2002, vol. 15, pp 1–9.

[11] Fric, P. Probiotics and prebiotics – renaissance of a therapeutic principle. *Central European Journal of Medicine*. 2007, vol. 2, pp. 237–270.

[12] Maxa, V., Rada, V. Význam probiotik a prebiotik pro výživu a zdraví. *Potravinářské aktuality (Mlékarenský průmysl)*, 2000, roč. 43, č. 2, s. 62-70. ISSN 0862-2132.

[13] Rada, V. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní Med*., 2010, roč. 12, č. 2, s. 92–97.

[14] Ouwehand, A. C., Salminem, S., Isolauri, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, vol. 82, pp. 279–289.

[15] Grofová Z. Probiotika a jejich vplyv na dislipidemii a diabetes. *Med pro praxi*, 2010, roč. 7, č. 5, s. 233–234.

[16] Probio-Fix [online]. [cit. 28.03. 2011]. Dostupné z www: http://www.probiofix.sk/produkty/probio-fix/

[17] Nutrolin B [online]. [cit. 28.03. 2011]. Dostupné z www: http://www.nutrolin.sk/nutrolin-b-kapsuly/

[18] Biopron 9–10 Tob [online]. 2005–2008, [cit. 28.03. 2011]. Dostupné z www: http://www.valosun.cz/kategorie/probiotika/biopron-9-10-tob.html

[19] Biopron Forte–10 Tob [online]. 2005–2008, [cit. 28.03. 2011]. Dostupné z www: http://www.valosun.cz/kategorie/probiotika/biopron-forte.html

[20] LactoFlor [online]. [cit. 28.03. 2011]. Dostupné z www: http://www.lactoflor.sk/lactoflor/lactoflor-kapsuly/

[21] Lactobene sáčky [online]. 2011, [cit. 28. 03. 2011]. Dostupné z www: http://www.lekynainternetu.cz/p/lactobene/

[22] Bernardeau, M., et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, vol. 126, pp. 278–285.

[23] Sedláček, I.: *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.

[24] Görner, F., Valík, Ľ.: *Aplikovaná mikrobiológia požívatín*. 1. vyd. Bratislava: MALÉ CENTRUM, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

[25] Teplý, M., et al.: *Čisté mlékařské kultury*. 1. vyd. Praha: SNTL-Nakladatelství technické literatury, 1984. 296 s. ISBN 04-806-84.

[26] Arunachalam, K. D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition research*, 1999, vol. 19, no. 3, pp. 1559–1597.

[27] Charteris, W. P., et al. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Mickrobiology*, 1997, vol. 35, pp. 1–27.

[28] Chumchalová, J.: *Bifidobacterium infantis*. *Miniatlas mikroorganizmů* [online]. [cit. 28.03. 2011]. Dostupné z www: http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/bifi-i.htm

[29] Príbela, A.: *Analýza potravín*. 1. vyd. Bratislava: Edičné stredisko STU, 1991. 225 s. ISBN 80-227-0374-5.

[30] Jasson, V., et al. Alternative microbial methods: An overview and selection kriteria. *Food Microbiology*, 2010, vol. 27, pp. 710–730.

[31] Julák, J.: *Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. 195 s. ISBN 382-141-97.

[32] Základní principy kvantitativní real-time PCR [online]. 2009, [cit. 11.03. 2011]. Dostupné z: http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/

[33] Lahtinen, S. J., et al. Comparison of four methods to enumerace probiotic bifidobacteria in fermented food products. *Food Microbiology*, 2006, vol. 23, pp. 571–577.

[34] Maukonen, J., et al. Suitability of the fluorescent techniques for the enumeration of probiotic bakteria in commercial non-dairy drinks and in pharmaceutical products. *Food Research International*, 2006, vol. 39, pp. 22–32.

[35] Alakomi, H.-L., et al. Application of a microplate scale fluorochrome staining assay for the assessment of viability of probiotic products. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, vol. 62, pp. 25–35.

[36] Masco, L., et al. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, vol. 102, pp. 221–230.

[37] Coeuret, V., et al. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, vol. 97, pp. 147–156.

5 ZOZNAM SKRATIEK

FAO	Food and Agriculture Organization of the united Nations
WHO	World Health Organization
HIV	angl. Human Immunodeficiency Virus – vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti
FOS	Fruktooligosacharidy
IgA, IgG, IgE	Imunoglobulín A, G, E
IL-6, -10, -12, -18	Interleukín 6, 10, 12, 18
TLRs	Toll-like receptors
EFSA	European Food Safety Authority
Mzd ČR	Ministerstvo zdravotníctva Českej republiky
RoHy	Register hlavného hygienika
MPN	angl. Most probable number – metóda najviac pravdepodobného množstva
DT	angl. Detection time – detekčný čas
ATP	Adenozíntrifosfát
DEFT	angl. Direct Epifluorescent Filter Technique – priama epifluorescenčná technika
PCR	angl. Polymerase Chain Reaction – polymerázová reťazová reakcia
C_T	angl. Treshold cycle
ELISA	angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FISH	angl. Fluorescent in situ hybridization – fluorescenčná in situ hybridizácia
MRS	De Man Rogosa Sharpe agar
RMC	angl. Reinforced clostridial medium
DP	angl. Dicloxacillin-Propionic acid
BP	angl. Bifidobacterium medium
AMC	Arroyo, Martin and Cotton agar
PI	Propidium jodid
BCECF	2'7'-bis-(karboxyethyl)-5(-6) karboxyfluoresceín
CFDA	Karboxyfluoresceín diacetát
FTUG	N-(fluoresceín thio-ureanyl)-glutamát
BOX	Bisoxonol
PFGE	angl. Pulsed-Field Gel Electrophoresis – pulzná gelová elektroforéza
DGGE	angl. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – denaturačná gradientová gelová elektroforéza
RAPD-PCR	angl. Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction