

VLIV PŘÍDAVKU JEDNOBUNĚČNÝCH ŘAS A SINIC NA SCHOPNOST ADHERENCE U KMENŮ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* A *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SUBSP. *BULGARICUS*

Iva Mrvíková¹, Karolína Medová¹, Ivo Doskočil², Tomáš Brányik³, Olga Kronusová⁴, Gabriela Krausová¹

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

² Česká zemědělská univerzita v Praze

³ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

⁴ EcoFuel Laboratories s.r.o., Praha

Influence of addition of single-cell algae and cyanobacteria on the adherence ability of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Abstrakt

V současné době roste zájem spotřebitelů o potraviny s „přidanou hodnotou“. Zejména se jedná o potraviny s imunomodulačním potenciálem či jinými zdravotními benefity, mezi které patří i fermentované mléčné výrobky, např. jogurty či kefirové nápoje. Za účelem vývoje nových typů těchto výrobků s přídatkem chlorelly a spiruliny byla sledována jejich interakce s jogurtovými kulturami. V předchozí studii byla pozornost věnována zejména vlivu těchto jednobuněčných řas a sinic na růst a schopnost přežívání kmenů *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Na předchozí výsledky se navázalo testováním vlivu přídatku chlorelly a spiruliny na schopnost adherence výše uvedených kmenů na buněčný model simulující střevní epitel *in vitro*, za použití buněčných linií Caco-2 a HT29. Byly použity čtyři druhy laboratorně vykultivované biomasy – *Chlorella vulgaris* G11 s nízkým obsahem chlorofylu a vysokým obsahem karotenoidů, heterotrofní kmen *Chlorella vulgaris* H14 kultivovaná ve fermentoru s obsahem glukózy, *Chlorella vulgaris* AUT s vysokým obsahem chlorofylu kultivovaná autotrofně na venkovních plošinách a sinice *Spirulina maxima*, která byla kultivována autotrofně. Experiment probíhal na 24-jamkové destičce s buněčnými liniemi, které byly kultivovány 14 dní. Byla k nim přidána suspenze použitých probiotických kmenů a vzorky biomasy jednobuněčných řas a sinic ve finální koncentraci 2,5 a 5 mg/ml. Po kultivaci byly odstraněny neadherované bakterie a počty bakterií následně analyzovány plotnovou metodou.

Přídavek všech druhů jednobuněčných řas a sinic v obou koncentracích vykazoval statisticky významný ($p < 0,05$) pozitivní vliv na adherenci kmene *S. thermophilus* na buněčné linii Caco-2. U linie HT29 byl pozorován statisticky významný pozitivní vliv na adherenci kmene *S. thermophilus* u řasy *C. vulgaris* H14 a *C. vulgaris* AUT. Adherence kmene *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nebyla přídatkem řas *C. vulgaris* H14 a *C. vulgaris* AUT ovlivněna na žádné z buněčných linií a přídatkem řasy *C. vulgaris* G11 byla jeho adherence ovlivněna pouze při koncentraci 2,5 mg/ml na buněčné linii HT29. Statisticky významný pozitivní vliv na adherenci byl zaznamenán u přídatku sinice *S. maxima* v koncentraci 2,5 mg/ml u obou buněčných linií a v koncentraci 5 mg/ml na buněčné linii Caco-2. Výsledky naznačují, že jak *C. vulgaris*, tak *S. maxima* mohou ovlivňovat bakteriální adherenci.

Klíčová slova: probiotika, prebiotika, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina maxima*, adherence, buněčná linie, Caco-2, HT29

Abstract

Consumer's interest in „added value“ food is currently growing. Especially, foods containing components with immunomodulatory potential are getting attention. This food also includes fermented dairy products. To develop new types of fermented dairy products, especially yoghurts, with the addition of chlorella and spirulina, their interaction with lactic acid bacteria was tested recently. In previous experiments, the effect of single-cell algae and cyanobacteria on the growth and viability of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* was tested. In this study, the impact of chlorella and spirulina on the adherence ability of the above strains to a tissue model stimulating intestinal epithelium *in vitro* was tested using Caco-2 and HT29 cell lines. We used four *Chlorella vulgaris* species obtained by laboratory cultivation process. *Chlorella vulgaris* G11 with low chlorophyll content and high carotenoid content; *Chlorella vulgaris* H14 cultivated heterotrophically on glucose in a bioreactor, *Chlorella vulgaris* AUT with high chlorophyll content grown autotrophically in outdoor thin-layer photobioreactors and *Spirulina maxima* – cyanobacteria cultivated autotrophically. All biomass samples were diluted to concentrations 2,5 and 5 mg/ml and used for testing. The experiment was performed on a 24-well plate with cell lines. The adherence ability of each strain to the intestinal epithelium was assessed after removing non-adherent cells by plate count method.

The addition of all microalgae species in both concentrations showed a statistically significant positive effect on the adherence of the genus *S. thermophilus* to the Caco-2 cell line. A statistically significant positive effect was also observed on the HT29 cell line while *C. vulgaris* H14 and *C. vulgaris* AUT were added. The adherence of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* onto any of the cell lines

was not influenced by the addition of *C. vulgaris* G11, *C. vulgaris* H14 and *C. vulgaris* AUT, while adding *C. vulgaris* G11 had an effect only at concentration of 2,5 mg/ml on the HT29 cell line. A statistically significant positive effect on the adherence of this bacterial strain to both cell lines was observed when *S. maxima* was added in the concentration of 2,5 mg/ml as well as 5 mg/ml to Caco-2. The results showed that the adherence of tested strains could be affected by the addition of *Chlorella* and *Spirulina*.

Key words: probiotics, prebiotics, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina maxima*, adherence, cell line, Caco-2, HT29

Úvod

V moderní době, kdy jsou stále větší požadavky na kvalitu a zároveň dlouhodobé uchování potravin, patří mezi jedny z nejčastějších způsobů jejich zpracování mražení či sterilace. To však přináší mnohé nevýhody. Dochází k poklesu nutričních hodnot a znehodnocení přirozeně se vyskytujících cenných látek, zejména vitamínů. Díky tomu se stále více dostávají do popředí i jiné metody jako např. lyofilizace (sušení mrazem) či fermentace, což je dobrým krokem k návratu zdraví prospěšných potravin. Fermentace je proces, při kterém dochází za účasti mikroorganismů k přeměně organických látek, nejčastěji sacharidů, na látky energeticky chudší. Díky tomuto procesu se potravina stává lépe stravitelnou a zároveň je obohacena o zdraví prospěšné mikroorganismy a jejich metabolity. Fermentace je považována za jeden z nejstarších způsobů uchování potravin na světě (Şanlıer a kol., 2019).

Fermentované mléčné výrobky jsou známy od nepaměti zejména díky řadě výhod, které s sebou přinášejí, a to jak z pohledu konzumenta (dobrá stravitelnost, obohacení o prospěšné mikroorganismy), tak z pohledu technologického (prodloužení doby trvanlivosti, snížení rizika nežádoucí kontaminace, senzorycké vlastnosti). Díky nízkému obsahu laktózy v těchto výrobcích jsou dostupné i pro lidi, kteří se jinak mléčným výrobkům vyhýbají (Alm, 1982). Na trhu se vyskytují „tradiční“ fermentované mléčné produkty, jako jsou jogurty či kysané mléčné nápoje, ale také ty méně běžné, obohacené o složky podporující jejich zdravotní benefity. Ve fermentovaných mléčných výrobcích se přirozeně vyskytují bakterie, které jsou zdraví prospěšné a mají probiotické účinky. Nejčastěji se zde nachází bakteriální kultury rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* či *Streptococcus*. Pokud jsou konzumovány v dostatečném množství, přinášejí hostiteli mnohé zdravotní benefity – mohou příznivě regulovat imunitní systém, snižovat hladinu cholesterolu, nebo působit preventivně vůči zánětlivým a průjemným onemocněním (Markowiak a Śliżewska; 2017). Jejich konzumace je v dnešní době hojně doporučována, především díky výše zmíněným účinkům.

Jejich probiotický účinek a stabilitu můžeme podpořit celou řadou prebiotik. Ta jsou definována jako nestravitelné látky, které jsou selektivně metabolizovány střevními bakteriemi a tím přispívají ke zdraví (Gibson a kol.,

2004). Za jedny z potenciálních zdrojů prebiotických látek můžeme považovat jednobuněčné řasy a sinice. Několik studií potvrzuje, že látky v nich obsažené mohou plnit prebiotickou funkci (Beheshtipour a kol., 2012; Mazinani a kol., 2016). Beheshtipour a kol. (2013) uvádí, že zmíněný prebiotický efekt mohou mít například některé specifické oligosacharidy, ale také vitamíny a dusík obsažený v neproteinových strukturách.

Jednobuněčné řasy a sinice jsou považovány za významný zdroj nejen zdraví prospěšných látek (vitamínů a minerálů), ale také bílkovin a nenasycených mastných kyselin. Na trhu jsou dnes nej dostupnější řasy rodu *Chlorella* či sinice *Spirulina*. Ty jsou konzumovány širokou veřejností především ve formě prášků, tablet, anebo přímo v potravinách.

Chlorella má eukaryotní buňku a spadá do oddělení *Chlorophyta*. Její složení se vyznačuje vysokým podílem bílkovin (61,6 %). Důležitou část sušiny tvoří také polysacharidy (13,7 %) a lipidy (12,5 %). Obsahuje stopové prvky, jako je selen, zinek či hořčík a v neposlední řadě také vitamíny B1, B2, B6, askorbovou kyselinu, D, E a K (Blas-Valdivia a kol., 2011). Četné množství studií uvádí, že konzumace chlorelly může přinášet zdravotní benefity ve formě antioxidačních, hypolipidemických a protinádorových účinků (Beheshtipour a kol., 2013).

Spirulina je mnohobuněčná vláknitá sinice spadající do oddělení *Cyanobacteria*. Je podobně jako chlorella významným zdrojem bílkovin (60–70 %) a oligo- a polysacharidů (13,6 %), které jsou tvořeny převážně jednotkami glukózy, rhamnosy, manosy, xylosy a galaktosy. Lipidy jsou zastoupeny 4–7 %, v sušině najdeme také nenasycené mastné kyseliny, jako jsou linolová a γ -linolenová kyselina. Dle několika studií může *Spirulina* působit v organismu antivirově a antibakteriálně, hypolipidemicky, byly také prokázány její antioxidační účinky. V neposlední řadě může také pomáhat při léčbě nádorových onemocnění (Beheshtipour a kol., 2013).

Jednobuněčné řasy a sinice mohou ovlivňovat adhezi bakteriálních kmenů. Dobrá adheze bakteriálních kmenů s probiotickými účinky je jednou z vlastností, kterou zabraňují patogenním mikroorganismům obsazovat vazebná místa na střevním epitelu (Borchers a kol., 2009; Markowiak a Śliżewska, 2017). Adheze námi použitých kmenů byla testována na buněčných liniích Caco-2 a HT29. Obecně buněčná linie představuje kulturu buněk získanou přímo z živé tkáně (z nádorových buněk), nebo selekcí buněk získaných z primárních kultur pomocí mutagenů. Buněčné linie jsou zcela adaptovány na *in vitro* podmínky. Obě buněčné linie Caco-2 i HT29 pocházejí z kolorektálního karcinomu (Blum a kol., 1993).

Cílem této práce bylo zjistit vliv již zmiňovaných jednobuněčných řas a sinic na adhezi kmenů *Sterptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a navázat tak na předchozí práci, kde byl sledován vliv jednobuněčných řas a sinic na růst a životaschopnost probiotických bakteriálních kmenů a bakterií mléčného kvašení (Medová a kol., 2020). Získaná data by měla

sloužit při vývoji nových typů fermentovaných mléčných výrobků obsahujících chlorellu a spirulinu.

Materiál a metodika

Použité mikroorganismy

Jednobuněčné řasy a sinice byly poskytnuty firmou EcoFuel Laboratories s.r.o. (Praha, ČR). Konkrétně se jednalo o tři laboratorně vykultivované řasy a jednu sinici, jejichž způsoby kultivace se lišily. *C. vulgaris* H14 (S1) byla kultivována heterotrofně ve fermentoru s obsahem glukózy. Dezintegrace probíhala pomocí průmyslového vysokotlakého homogenizátoru při tlaku 800 bar a průtoku 30–50 l/h. *C. vulgaris* AUT (S2) byla kultivována autotrofně na venkovních plošinách. Díky vyššímu obsahu chlorofylu má výrazně zelenou barvu. Dezintegrace probíhala totožně jako u *C. vulgaris* H14. *C. vulgaris* G11 (S3) byla kultivována heterotrofně v mediu s glukózou za nepřístupu světla. Kvůli ochraně luteinu nebyla dezintegrována vysokotlakou homogenizací. *S. maxima* (S4) byla kultivována autotrofně a poté sprejově sušena na prášek. Dezintegrace nebyla nutná díky přítomnosti velmi křehké buněčné stěny.

Použité bakteriální kmeny *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 364 a *S. thermophilus* CCDM 144 pocházely ze sbírky mlékařských mikroorganismů Laktoflora®.

Tab. 1 Použité mikroorganismy, řasy, sinice a jejich označení

Mikroorganismy, řasy a sinice	Označení	Pracovní označení
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CCDM 364	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CCDM 144	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	H14	S1
<i>Chlorella vulgaris</i>	AUT	S2
<i>Chlorella vulgaris</i>	G11	S3
<i>Spirulina maxima</i>	-	S4

Kultivace buněčných linií

Pro testování adheze byly použity buněčné linie kolorektálního karcinomu HT29 a Caco-2 (Sigma-Aldrich CZ). Tyto linie byly kultivovány v mediu Dulbecco's Modified Eagle's Medium–high glucose (EMEM) (Sigma-Aldrich CZ) s přísady: 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), 1 % hydrogenuhličitanu sodného, 1 % pyruvátu sodného, 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % penicilinu a streptomycinu.

Buněčné linie byly kultivovány v kultivačních lahvičkách 7 dní, 2–3× týdně došlo k výměně média za čerstvé. Po 7 dnech, kdy bylo dosaženo 90 % konfluency, byla buněčná vrstva promyta pomocí 5 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS). Po odstranění PBS bylo přidáno 5 ml trypsinu k zajištění oddělení buněk od dna kultivační lahve. Poté bylo k suspenzi přidáno 5 ml média pro neutralizaci trypsinu. Obsah kultivační lahve byl převeden do 15 ml centrifugační zkumavky a centrifugován při 1,1×10³ RPM (10 minut). Neutralizovaný trypsin byl následně odstraněn a nahrazen čerstvým médiem, ve

kterém byly buňky rozředěny. Buněčná suspenze v poměru 1:200 byla přidána do nové kultivační lahve s čerstvým médiem a umístěna do CO₂ kultivačního boxu s teplotou 37 °C a 5 % koncentrací CO₂. Zbytky buněčných linií byly následně naředěny na koncentraci 4×10⁴ pro samostatné linie. Takto naředěné suspenze byly použity pro založení 24-jamkových destiček kultivované za stejných podmínek.

Příprava bakteriální suspenze

Pro testování adheze byly použity dva bakteriální kmeny: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a kmen *Streptococcus thermophilus*. Bakteriální suspenze byly připraveny rozpuštěním lyofilizátů v 10 ml příslušného média (pro *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* – MRS 5,7; pro *S. thermophilus* – M17). Množství 10 ml čerstvě narostlých kultur bylo přeneseno do centrifugačních zkumavek a zcentrifugováno při 2×10³ RPM (10 minut). Bakterie byly 3× promyty 5 ml PBS a následně rozmíchány v 5 ml v EMEM bez suplementů.

Příprava suspenzí jednobuněčných řas a sinic k testování prebiotického efektu

Jako potenciální prebiotika byly zvoleny jednobuněčné řasy a sinice *Chlorella vulgaris* H14 (S1), *Chlorella vulgaris* AUT (S2), *Chlorella vulgaris* G11 (S3) a *Spirulina maxima* (S4). Vzorky jednobuněčných řas a sinic byly naváženy a naředěny na finální koncentraci 25 a 50 mg/ml.

Testování adheze

Po 14 dnech kultivace byly destičky 3× promyty pomocí PBS, následně bylo přidáno 900 µl naředěných bakteriálních suspenzí a 100 µl suspenzí S1, S2, S3 a S4 v koncentracích 25 a 50 mg/ml, tím byla získána konečná koncentrace 2,5 a 5 mg/ml. Destičky byly kultivovány 90 minut v CO₂ inkubátoru při 37 °C a 5% koncentrací CO₂. Po inkubaci byl obsah jamek odstraněn a 3× promyt PBS, aby došlo k odstranění neadherovaných bakteriálních kmenů. Následně bylo do jamek přidáno 300 µl 1% Triton-X100 na 1 minutu pro uvolnění adherovaných buněk a poté bylo přidáno 700 µl PBS.

Ze vzniklých suspenzí byla připravena desetinásobná ředění, která byla následně pipetována na Petriho misky v objemu 100 µl a přelita příslušným médiem. Misky byly kultivovány v termostatu na 37 °C po dobu 72 h (Tab. 2). Následně byly plotnovou metodou stanoveny počty kolonií tvořící jednotku (KTJ), výsledky jsou uvedeny v log KTJ/ml.

Tab. 2 Kultivační podmínky pro jednotlivé kmeny

Bakteriální kmen	Médium	Kultivační podmínky
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	MRS agar 5,7	37 °C, 72 h, anaerobně
<i>Streptococcus thermophilus</i>	M17 agar	37 °C, 72 h, aerobně

Statistické zpracování výsledků

Výsledky byly vyhodnoceny na hladině významnosti $p < 0,05$ v Microsoft Excel. Byl vypočítán průměr

Tab. 3 Výsledky testování adheze kmenů *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *S. thermophilus* ($p < 0,05$) na buněčných liniích HT29 a Caco-2 za přítomnosti vzorků jednobuněčných řas a sinic (S1–S4) v koncentracích 2,5 a 5 mg/ml.

Koncentrace jednobuněčných řas a sinic	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> HT29 (log KTJ/ml)	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Caco-2 (log KTJ/ml)	<i>S. thermophilus</i> HT29 (log KTJ/ml)	<i>S. thermophilus</i> Caco-2 (log KTJ/ml)
S1 5 mg/ml	4,75 ± 0,13 ^{AB}	4,67 ± 0,00 ^{AB}	5,32 ± 0,14 ^B	5,30 ± 0,02 ^B
S1 2,5 mg/ml	4,83 ± 0,01 ^{AB}	4,83 ± 0,04 ^{AB}	5,30 ± 0,00 ^B	5,22 ± 0,04 ^B
S2 5 mg/ml	4,41 ± 0,09 ^{AB}	4,68 ± 0,11 ^{AB}	4,90 ± 0,01 ^{AB}	5,24 ± 0,20 ^B
S2 2,5 mg/ml	4,74 ± 0,13 ^{AB}	3,90 ± 0,32 ^{AB}	5,20 ± 0,03 ^B	5,09 ± 0,28 ^B
S3 5 mg/ml	4,97 ± 0,08 ^{AB}	3,91 ± 0,39 ^{AB}	4,97 ± 0,05 ^{AB}	5,13 ± 0,12 ^B
S3 2,5 mg/ml	5,39 ± 0,04 ^B	4,64 ± 0,01 ^{AB}	5,20 ± 0,26 ^{AB}	5,38 ± 0,20 ^B
S4 5 mg/ml	5,46 ± 0,02 ^B	4,70 ± 0,01 ^{AB}	4,56 ± 0,18 ^{AB}	5,19 ± 0,26 ^B
S4 2,5 mg/ml	5,56 ± 0,13 ^B	4,98 ± 0,03 ^B	4,67 ± 0,41 ^{AB}	5,72 ± 0,02 ^B
kontrola	4,93 ± 0,09 ^A	4,85 ± 0,06 ^A	4,95 ± 0,36 ^A	4,28 ± 0,14 ^A

S1 (*Chlorella vulgaris* H14), S2 (*Chlorella vulgaris* AUT), S3 (*Chlorella vulgaris* G11), S4 (*Spirulina maxima*)
Data ve sloupcích s rozdílným horním indexem se statisticky významně liší ($p < 0,05$).

a směrodatná odchylka a následně byla porovnána adherence kmenů s přidavkem vzorků jednobuněčných řas a sinic s kontrolou (kmeny bez přidavku vzorku).

Výsledky a diskuse

Adherence kmenu *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* na buněčných liniích HT29 byla oproti kontrole statisticky významně vyšší ($p < 0,05$) se vzorkem S4 o koncentraci 2,5 a 5 mg/ml a se vzorkem S3 o koncentraci 2,5 mg/ml. Na buněčné linii Caco-2 byla adherence statisticky významná ($p < 0,05$) pouze u vzorku S4 o koncentraci 2,5 mg/ml. Adherence kmene *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* na buněčných liniích HT29 a Caco-2 s ostatními vzorky se od kontroly statisticky významně nelišila ($p < 0,05$) jak je uvedeno v tabulce 3.

Adherence kmenu *S. thermophilus* na buněčné linii HT29 byla v porovnání s kontrolou statisticky významně vyšší ($p < 0,05$) se vzorkem S1 o koncentraci 2,5 i 5 mg/ml a se vzorkem S2 o koncentraci 2,5 mg/ml. U přidavků ostatních vzorků nebyla prokázána statisticky významná změna. Na buněčných liniích Caco-2 byla adherence statisticky významně vyšší ($p < 0,05$) od kontroly, a to ve všech případech.

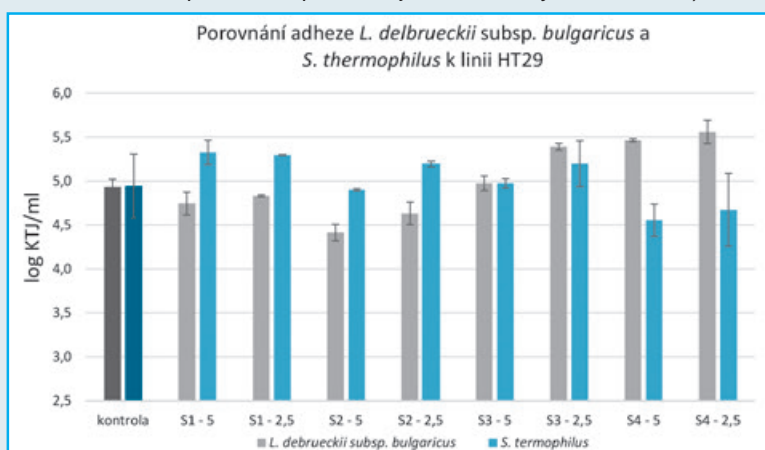
Z výše uvedených výsledků vyplývá, že kmen *S. thermophilus* s přidavky vzorků jednobuněčných řas a sinic oproti kmenu *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* adheroval lépe, a to zejména na buněčných liniích Caco-2.

Pokud porovnáme výsledky vlivu jednobuněčných řas a sinic na schopnost vybraných kmenů adherovat na buněčné linii *in vitro* s výsledky jejich vlivu na růst

a životaschopnost těchto kmenů (Medová a kol., 2020), můžeme vidět jisté shody. A to jak u kmene *S. thermophilus*, který byl pozitivně ovlivněn při růstu i adhezenci na buněčných liniích HT29 a Caco-2 přidavkem vzorků *C. vulgaris* H14 (S1) a *S. maxima* (S4), tak i u kmene *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, který byl pozitivně ovlivněn přidavkem vzorků *S. maxima* (S4) i *C. vulgaris* G11 (S3) při růstu i adhezenci na buněčné linii HT29.

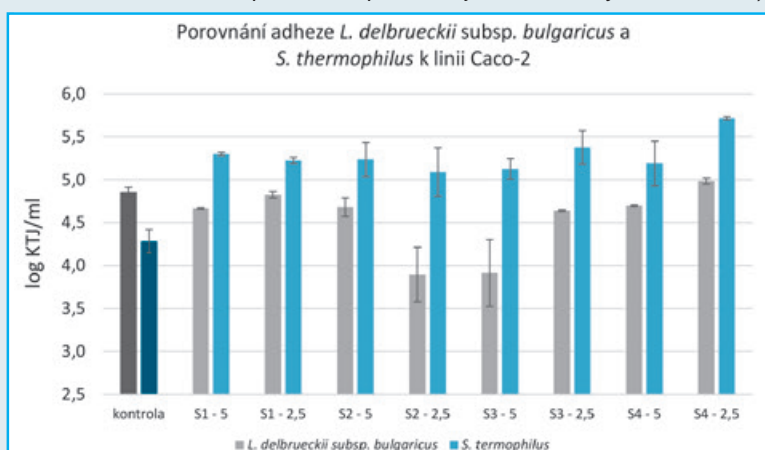
V případech kontrol (samotných bakteriálních kmenů), zejména u buněčné linie HT29, můžeme vidět (Obr. 1), že kmen *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* adheroval lépe než kmen *S. thermophilus*, adheroval dokonce lépe než s přidavky většiny řas.

Obr. 1 Porovnání adheze kmenů *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *S. thermophilus* na buněčných liniích HT29 s přidavkem jednobuněčných řas a sinic (S1–S4) o koncentracích 2,5 a 5 mg/ml v porovnání s kontrolou (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus* bez přidavku jednobuněčných řas a sinic)



S1 (*Chlorella vulgaris* H14), S2 (*Chlorella vulgaris* AUT), S3 (*Chlorella vulgaris* G11), S4 (*Spirulina maxima*)

Obr. 2 Porovnání adheze kmenů *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *S. thermophilus* (K2) na buněčných liniích Caco-2 s přidavkem jednobuněčných řas a sinic (S1–S4) o koncentracích 2,5 a 5 mg/ml v porovnání s kontrolou (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus* bez přidavku jednobuněčných řas a sinic)



S1 (*Chlorella vulgaris* H14), S2 (*Chlorella vulgaris* AUT), S3 (*Chlorella vulgaris* G11), S4 (*Spirulina maxima*)

Některé studie poukazují, že prebiotika mohou jak pozitivně, tak negativně ovlivňovat adhezi bakteriálních kmenů (Altamimi a kol., 2016) a je důležité ke konkrétním probiotikům hledat správná synbiotická prebiotika (Krausová a kol., 2016).

Pokud se podíváme na jednotlivé námi testované vzorky, jako nejvhodnější se jeví *S. maxima* (S4), u níž se statisticky významně ($p < 0,05$) zvýšila adherence u tří ze čtyř skupin (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* HT29, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Caco-2, *S. thermophilus* Caco-2) oproti kontrole. *S. maxima* má velmi křehké buněčné stěny a díky tomu mohou být živiny pro použité bakteriální kmeny lépe dostupné. Jako druhým vhodným přídavkem se jeví *C. vulgaris* H14 (S1), která byla dezintegrována a podobně jako u *S. maxima* mohly být živiny pro bakterie přístupnější. V potaz však musíme brát i samotné složení jednobuněčných řas a sinic, mohou být pozorovány větší či menší rozdíly u jednotlivých druhů a kmenů. Přístupnost živin pro bakteriální kmeny u jednotlivých řas a sinic může ovlivňovat i způsoby jejich pěstování, jako je např. složení růstového média, dezintegrace apod. Díky tomu mohou jednotlivé bakteriální kmeny podporovat rozdílně (Krausová a kol. 2019). Kombinací správných bakteriálních kmenů a látek s prebiotickou funkcí lze u bakteriálních kmenů dosáhnout výrazně lepších probiotických vlastností (Kadlec a Jakubec, 2014).

Oba testované kmeny jsou charakteristické i dobrou produkcí exopolysacharidů (EPS), což může vést právě ke zvýšení schopnosti adherence (Kanamarlapudi a Muddada, 2017). EPS jsou extracelulární polymerní látky vylučované do prostředí a jsou jim připisovány mnohé zdravotní benefity (Fedorová a kol., 2018). V poslední době je EPS věnována pozornost také díky jejich technologickým vlastnostem při výrobě potravin, zejména mléčných výrobků (Kanamarlapudi a Muddada, 2017).

Z výsledků také vyplývá, že se koncentrace 2,5 mg/ml jeví pro adhezi bakteriálních kmenů jako vhodnější oproti koncentraci 5 mg/ml.

Závěr

Ve většině případů přídavek jednobuněčných řas a sinic (2,5 i 5 mg/ml) ke kmenům *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* příznivě ovlivnil jejich schopnost adherence k buněčným liniím Caco-2 a HT29 v porovnání s kontrolou. Adherence byla pozitivně ovlivněna zejména u kmene *Streptococcus thermophilus* na buněčných liniích Caco-2. Na základě získaných výsledků se jeví jednobuněčné řasy a sinice jako vhodné a plní prebiotickou funkci podporou adherence bakteriálních kmenů. Tato funkce je však velmi specifická pro jednotlivé bakteriální kmeny a druhy jednobuněčných řas a sinic.

Při porovnání použitých koncentrací se jeví jako více účinná koncentrace 2,5 mg/ml. Do budoucna bude vhodné otestovat větší množství koncentrací, dále pak chování kmenů na smíšeném modelu buněčných linií Caco-2

a HT29, jako i vliv na adhezi u některých probiotických kmenů rodu *Bifidobacterium* a dalších.

Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou Národní agentury pro zemědělský výzkum (MZe ČR) při řešení projektu QK1910300 a za podpory MZE-RO1420.

Literatura

- Alm, L. (1982). Effect of fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. *Journal of dairy science*, 65, (3), s. 346-352.
- Altamimi, M., Abdelhay, O., & Rastall, R. A. (2016). Effect of oligosaccharides on the adhesion of gut bacteria to human HT-29 cells. *Anaerobe*, 39, s. 136-142.
- Beheshtipour H., Mortazavian A. M., Haratian P., Darani K. K. (2012) Effects of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties. *European Food Research and Technology*, 235, s. 719-728.
- Beheshtipour H., Mortazavian A. M., Mohammadi R., Sohrabvandi S., Khosravi-Darani K. (2013) Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, s. 144-154.
- Blas-Valdivia V., Ortiz-Butron R., Pineda-Reynoso M., Hernández-García A., Cano-Europa E. (2011) *Chlorella vulgaris* administration prevents HgCl₂-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. *Journal of Applied Phycology*, 23, s. 53-58.
- Blum, S., Reniero, R., Schiffrin, E. J., Crittenden, R., Mattila-Sandholm, T., Ouwehand, A. C., ... & Collins, K. (1999). Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends in Food Science & Technology*, 10, (12), s. 405-410.
- Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (2009). Probiotics and immunity. *Journal of gastroenterology*, 44, (1), s. 26-46.
- Fedorová, M., Prokeš, M., Pisl, J., & Nemcová, R. (2018). Exopolysacharidy jako významné produkty probiotik. *Chemické listy*, 112, (11), s. 770-776.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition research reviews*, 17, (2), s. 259-275.
- Kadlec, R., & Jakubec, M. (2014). The effect of prebiotics on adherence of probiotics. *Journal of Dairy Science*, 97, (4), s. 1983-1990.
- Kanamarlapudi, S. L. R. K., & Muddada, S. (2017). Characterization of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. *Biomed research international*, 2017.
- Krausová, G., Hyrsolva, I., Jakubec, M., & Hynstova, I. (2016). In vitro evaluation of prebiotics on adherence of lactobacilli. *J. Microb. Biochem. Technol*, 8, s. 6-8.
- Krausová G., Karpíšková K., Smolová J., Lucáková S., Brányik T. (2019) Růst laktobacilů a bifidobakterií na mediu s přídavkem mikroskopických řas. *Mlékařské listy*, 175, s. 9-14.
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9, (9), s. 1021.
- Mazinani S., Fadaei V., Khosravi K. (2016) Impact of *Spirulina platensis* on physicochemical properties and viability of *Lactobacillus acidophilus* of probiotic UF feta cheese: Microalgal incorporation probiotic UF feta cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40, s.1318-1324.
- Medová, K., Krausová, G., Smolová, J., Brányik, T., Kronusová, O. (2020). Vliv jednobuněčných řas a sinic na růst a životaschopnost probiotických bakterií a bakterií mléčného kvašení. *Mlékařské listy*, 181, s. 12-21.
- Şanlıer, N., Gökçen, B. B., & Sezgin, A. C. (2019). Health benefits of fermented foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59, (3), s. 506-527.

Korespondující autor: MVDr. Gabriela Krausová, Ph.D.
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, e-mail: krausova@milcom-as.cz

Přijato do tisku: 13. 11. 2020

Lektorováno: 24. 11. 2020