

- KUHN C., THALLER G., WINTER A., BININDA-EMONDS O. R. P., KAUPE B., ERHARDT G., BENNEWITZ J., SCHWERIN M., FRIES R. (2004): Evidence for multiple alleles at the *DGAT1* locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. *Genetics*, 167, 1873–1881.
- LI M., GAO Q., WANG M., LIANG Y., SUN Y., CHEN Z., ZHANG H., KARROW N. A., YANG Z., MAO Y. (2020): Polymorphisms in fatty acid desaturase 2 gene are associated with milk production traits in Chinese Holstein cows. *Animals*, 10, 671.
- LITTLEJOHN M. D., TIPLADY K., LOPDELL T., LAW T. A., SCOTT A., HARLAND C., SHERLOCK R., HENTY K., OBOLONKIN V., LEHNERT K., MACGIBBON A., SPELMAN R. J., DAVIS S. R., SNELL R. G. (2014): Expression variants of the lipogenic *AGPAT6* gene affect diverse milk composition phenotypes in *Bos taurus*. *Plos One*, 9, 1–12.
- MEDRANO J. F., SHARROW L. (1991): Genotyping of bovine beta-casein loci by restriction site modification of polymerase chain reaction (PCR) amplified DNA. *Journal of Dairy Science*, 74, 282.
- MILUCHOVÁ M., GÁBOR M., TRAKOVICKÁ A. (2013): Analysis of Slovak Spotted breed for bovine beta casein A1 variant as risk factor for human health. *Acta Biochimica Polonica*, 60, 799–801.
- MÖMKE S., BRADE W., DISTL O. (2011): Co-segregation of quantitative trait loci (QTL) for milk production traits and length of productive life with QTL for left-sided displacement of the abomasum in German Holstein dairy cows. *Livestock Science*, 140, 149–154.
- POKORSKA J., KUŁAJ D., OCHREM A. (2020): Impact of bovine lipocalin-2 haplotype on milk composition, somatic cell score and incidence of mastitis in Polish Holstein-Friesian cattle. *Journal of Applied Animal Research*, 48, 51–56.
- PROSKURA W. S., LIPUT M., ZABORSKI D., SOBEK S., YU Y.H., CHENG Y.H., DYBUS A. (2019): The effect of polymorphism in the *FADS2* gene on the fatty acid composition of bovine milk. *Archives Animal Breeding*, 62, 547–555.
- ROY R., ORDOVAS L., ZARAGOZA P., ROMERO A., MORENO C., ALTARRIBA J., RODELLAR C. (2006): Association of polymorphisms in the bovine *FASN* gene with the milk fat content. *Animal Genetics*, 37, 215–218.
- SANDERS K., BENNEWITZ J., REINSCH N., THALLER, PRINZENBERG E.-M., KÜHN C., KALM E. (2006): Characterization of the *DGAT1* mutations and the *CSN1S1* promoter in the German Angeln dairy cattle population. *Journal of Dairy Science*, 89, 3164–3174.
- STRZALKOWSKA N., KRZYZEWSKI J., ZWIERZCHOWSKI L., RYNIOWICZ Z. (2002): Effects of κ -casein and β -lactoglobulin loci polymorphism, cows' age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish Black-and-White cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 20, 21–35.
- VIALE E., TIEZZI F., MARETTO F., DE MARCHI M., PENASA M., CASSANDRO M. (2017): Association of candidate gene polymorphisms with milk technological traits, yield, composition, and somatic cell score in Italian Holstein-Friesian sires. *Journal of Dairy Science*, 100, 7271–7281.
- ZHANG H., WEI Y., ZHANG F., LIU Y., WANG H., LI Y., LI G. (2019): Polymorphisms of mannose-binding lectin-associated serine protease 1 (*MASP1*) and its relationship with milk performance traits and complement activity in Chinese Holstein cattle. *Research in Veterinary Science*, 124:346-351.

Kontaktní adresa: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.,
Katedra genetiky a zemědělských biotechnologií,
Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích, Studentská 1668,
370 05 České Budějovice, e-mail: citek@zf.jcu.cz

Přijato do tisku: 31. 8. 2021
Lektorováno: 27. 9. 2021

PREBIOTICKÁ AKTIVITA POLYSACHARIDOVÝCH FRAKČÍ IZOLOVANÝCH Z BIOMASY MIKROŘASY *CHLORELLA* *VULGARIS*

**Kateřina Mazancová¹, Gabriela Krausová²,
Ivana Hyršlová², Tamilla Mirzayeva¹, Roman Bleha¹,
Tomáš Brányik¹**

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, fakulta
potravinářské a biochemické technologie

² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

Prebiotic activity of fractions from alga *Chlorella vulgaris*

Abstrakt

Práce se zaměřuje na izolaci frakcí z biomasy řasy *Chlorella vulgaris*, jejich charakterizaci pomocí infračervené spektroskopie. Dále byla sledována prebiotická aktivita získaných frakcí, a to na základě stanovení růstu tří kmenů z rodu *Lactobacillus* denzitometricky a na základě produkce kyseliny mléčné a octové v médiích s přidávkem těchto frakcí. Významnou prebiotickou aktivitu projevila frakce s označením F3, která stimulovala růst testovaných kmenů nejvíce, což bylo potvrzeno i vysokou produkcí organických kyselin. Tato frakce byla získána promytím řasové biomasy organickými rozpouštědly, následnou extrakcí horkou vodou a částečným enzymatickým odstraněním proteinů. V porovnání s ostatními frakcemi obsahovala nejvyšší podíl polysacharidů. Z naměřených spekter pomocí FTIR spektroskopie je patrné, že se jedná převážně o škrob, zásobní polysacharid řas a vyšších rostlin. Pokud jde o metabolickou aktivitu testovaných laktobacilů, byla v médiích s přidávkem řasových frakcí zaznamenána vyšší produkce kyseliny octové. Její možný vliv na senzorycké vlastnosti fermentovaných mléčných výrobků s přidávkem řasových frakcí bude třeba ověřit.

Klíčová slova: *Chlorella vulgaris*, frakce, bakterie rodu *Lactobacillus*, prebiotická aktivita

Abstract

The work focuses on the isolation of fractions from the biomass of the alga *Chlorella vulgaris*, their characterization by using infrared spectroscopy. Furthermore, the prebiotic activity of the obtained fractions was evaluated on the basis of the growth of three strains of the genus *Lactobacillus* determined densitometrically and on the basis of the production of lactic and acetic acid in the media with the added fractions. Significant prebiotic

activity was shown by the fraction F3, which stimulated the growth of the tested strains the most, which was confirmed also by the high production of organic acids. This fraction was obtained by washing the algal biomass with organic solvents, followed by hot water extraction and partial enzymatic removal of the proteins. Compared to the other fractions, this fraction contained the highest proportion of polysaccharides. From the spectra measured using infrared spectroscopy, it was made mainly by starch, the main supplying polysaccharide of algae and higher plants. Regarding the metabolic activity of the tested lactobacilli, a higher production of acetic acid was recorded in the media containing algal fractions. Its possible influence on the sensory properties of fermented dairy products containing these algal fractions will need to be verified.

Kyewords: *Chlorella vulgaris*, fractions, bacteria of the genus *Lactobacillus*, probiotic activity

Úvod

Mikroskopické řasy jsou v současné době velmi populárním tématem. Obsahují a produkují látky, které mohou být využívány jako složky biopaliv, léčiv, barviv a kosmetických přípravků. Dále mohou sloužit k čištění odpadních vod, k obohacování krmiv pro zvířata nebo stimulaci růstu rostlin. Kromě toho je značná pozornost zaměřena na použití mořských a sladkovodních řas k vývoji funkčních potravin z důvodu jejich obsahu živin a zdraví prospěšných účinků (Spolaore a kol., 2006; Mata a kol., 2010; Priyadarshani a Rath, 2012; Safi a kol., 2014).

Významným zástupcem mikroskopických řas je jednobuněčná sladkovodní řasa *Chlorella vulgaris*, která má vysokou nutriční hodnotu díky přítomnosti řady proteinů, sacharidů, lipidů, mastných kyselin, vitamínů a minerálů v biomase (Belasco, 1997; Tokuşoglu a Ünüal, 2003). Stále více studií však zkoumá řasové polysacharidy jakožto důležité potencionální bioaktivní složky (Laurienzo, 2010; De Jesus Raposo a kol., 2015; Priyan Shanura Fernando a kol., 2019). V případě řasy *Chlorella vulgaris* je nejvíce zastoupen zásobní polysacharid škrob. Dále jsou přítomny strukturální polysacharidy celulóza a hemicelulózy (Ferreira a kol., 2020). V buněčné stěně *Chlorelly* se také vyskytují glukuronoramnan, arabinomanan, β -D-galaktan nebo glukosaminoglykan (Kapaun a Reisser, 1995; Ogawa a kol., 1999; Sajtos a kol., 2001; Lordan a kol., 2011). Důležitým polysacharidem řas rodu *Chlorella* je také β -1,3-glukan. Kromě toho mají druhy rodu *Chlorella* schopnost produkovat také extracelulární polysacharidy (Maksimova a kol., 2004; Ferreira a kol., 2020).

Odlíšné chemické složení řasových polysacharidů má vliv na jejich různou biologickou aktivitu. V celé řadě studií jsou zkoumány biologické aktivity polysacharidů z řas rodu *Chlorella*. Nejčastěji jsou zmiňovány antioxidační, imunomodulační a protinádorová aktivita, dále i aktivita neuroprotektivní, hypolipidemická, anti-

astmatická, antimikrobní a také protizánětlivé účinky či schopnost vázat těžké kovy (Kaplan a kol., 1987; Sheng a kol., 2007; Chen a kol., 2016; de Borba Gurgilhares a kol., 2019; Yu a kol., 2019; Zhang a kol., 2019; Ferreira a kol., 2020). Nejméně probádanou, avšak aktivitou také spojovanou s polysacharidy řas rodu *Chlorella*, je aktivita prebiotická. Prebiotika zahrnují nestravitelné složky potravy, které selektivně prospívají hostitelskému organismu stimulací růstu a/nebo aktivity probiotických bakterií v trávicím traktu. Existují následující kritéria, která vymezují, co lze za prebiotikum považovat a co ne. Prebiotikum by nemělo být hydrolyzováno pankreatickými a střevními enzymy a absorbováno v horním gastrointestinálním traktu, mělo by odolávat kyselosti žaludku a dostávat se až do tlustého střeva, kde nastává jeho fermentace mikroflórou. V neposlední řadě by prebiotikum mělo selektivně stimulovat růst a/nebo aktivitu střevních bakterií, což je spojováno se zdravotním benefitem. Většina prebiotik jsou rozpustné a nerozpustné oligosacharidy a polysacharidy, přičemž výsledkem jejich fermentace jsou převážně mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), které jsou poté využívány jako zdroj energie (Markowiak a Śliżewska, 2017; de Borba Gurgilhares a kol., 2019; Gotteland a kol., 2020).

Mnoho studií zkoumá vliv biomasy řas rodu *Chlorella* na probiotické bakterie a uvádí stimulační účinky na růst a životaschopnost těchto bakterií a další prospěšné vlastnosti (Beheshtipour a kol., 2012; Beheshtipour a kol., 2013; Ścieszka a Klewicka, 2020; Sylwia a Elżbieta, 2020; Hyrslova a kol., 2021). Zároveň několik výzkumů studuje a uvádí řasové oligosacharidy a polysacharidy jakožto prebiotickou složku, která má blahodárné účinky na lidské tělo, zejména na střevní mikrobiom (O'Sullivan a kol., 2010; Sardari a Nordberg Karlsson, 2018; de Borba Gurgilhares a kol., 2019; Gotteland a kol., 2020; Lopez-Santamarina a kol., 2020). Z tohoto důvodu a vzhledem k nedostatku informací v této oblasti je nutné prebiotickou aktivitu polysacharidů mikroskopických řas intenzivně zkoumat a zejména provést tento výzkum u polysacharidů získaných z řas rodu *Chlorella*, jakožto řas v mnoha oblastech hojně využívaných. Proto bylo cílem této práce stanovit prebiotickou aktivitu frakcí, vzájemně se lišících obsahem polysacharidů a přítomností jiných komponent, získaných izolací postupem z biomasy řasy *Chlorella vulgaris*.

Materiál a metodika

Použité mikroorganismy

Ve studii byla použita řasa *Chlorella vulgaris* Beijerinck, kultivována za autotrofních podmínek, kmen 256, izolovaný na Novém Zélandu v roce 1952 a uložen ve sbírce autotrofních organismů (CCALA) v Třeboni. Řasa byla dodána již v dezintegrované formě, a v tomto stavu byla použita v experimentální práci. Ke stanovení prebiotické aktivity byly vybrány 3 kmeny z rodu *Lactobacillus* používané v mléčných výrobcích. Kmeny

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* a *Lactobacillus rhamnosus* s označením CCDM 364 a CCDM 146 pochází ze sbírky mlékařských mikroorganismů Laktoflora® (MILCOM a.s., Tábor, ČR) a kmen *Lactobacillus casei* s označením Lafti L-26 je komerční probiotický kmen (DSM Food Specialties, Nizozemsko).

Izolace frakcí z řasové biomasy *Chlorella vulgaris* a jejich charakterizace pomocí infračervené spektroskopie

Izolace frakcí probíhala podle předem navrženého postupu, kdy nejprve došlo k homogenizaci navážky (20 g) pomocí kulového mlýnu Retsch (čas 2 min., frekvence 30 s⁻¹). Následovalo promývání hexanem za účelem odstranění nepolárních látek (lipidy), poté promývání 96% ethanolem, aby se odstranily polární látky (lipidy, polyfenoly) a dále kyselým ethanolem (0,2 M HCl v 80% ethanolu) do odbarvení. K odstranění kyseliny byl použit 80% ethanol, poté 96% ethanol k promytí do neutrálního pH. Vzorek byl promyt acetonem (odstranění vody) a přes noc vysušen na vzduchu. Tímto způsobem byla získána frakce s označením F1. Následovala extrakce vodou o teplotě 100 °C po dobu 5 hodin. Získané filtráty byly zakoncentrovány na vakuové odparce (70 °C, 240 mbar) a poté lyofilizovány. Takto byla získána frakce F2. Pevný podíl (PP) z extrakce byl uchován v mrazáku také pro následné testování prebiotické aktivity, přičemž před daným testováním byl promyt acetonem a vysušen. Po enzymatickém odstranění proteinů (200 rpm, 40 °C, inaktivace 30 min, 90 °C) z 1 gramu frakce F2 pomocí kombinace enzymů pepsinu a pronasy byl odfiltrován vzniklý precipitát a z filtrátu byly vysráženy polysacharidy pomocí 96% ethanolu (3/1 v/v). Tím se získala frakce F3.

Všechny frakce byly charakterizovány pomocí infračervené spektroskopie. Měření bylo prováděno na spektrometru Nicolet 6700 s využitím software Omnic 8.0 (ThermoScientific, USA). Byla získána FTIR spektra ve střední oblasti (4000-400 cm⁻¹), kdy byl vzorek připraven jako KBr tableta (rozlišení 2 cm⁻¹, 64 skenů, tableta byla připravena pomocí ručního lisu). Dále byla všechna spektra vyhlazena, byla provedena korekce základní linie a normalizace. Všechna spektra byla dále ve formátu csv. zpracována v programu Origin 6 (Microcal Origin, USA).

Stanovení prebiotické aktivity

Vstupní řasová biomasa, izolované frakce a pevný podíl získaný z extrakce byly přidány do bazálního média (2 g/l) viz Tab. 1. Přídavek komerčního prebiotika Orafit GR (Beneo) byl použit jako pozitivní kontrola, a naopak čisté bazální médium bez přídavku cukerného zdroje jako kontrola negativní. Obohacené či čisté bazální médium bylo inokulováno 1,0 % (v/v) bakteriálních buněk, které byly po 18 hodinové kultivaci v MRS bujónu (37 °C, anaerobně) odstředěny (6000 rpm, 4 min.), dvakrát promyty fyziologickým roztokem a naředěny na

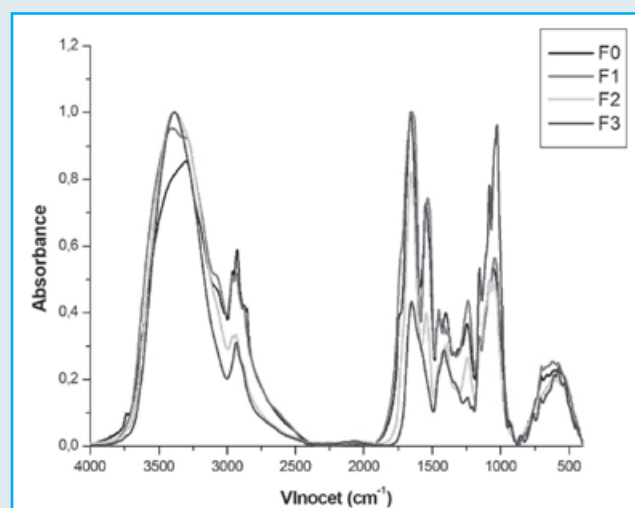
finální koncentraci cca 10⁴ KTJ/ml. Prebiotická aktivita byla posuzována na základě růstu vybraných laktobacilů v testovaných mediích pomocí optické denzity (OD) měřené při vlnové délce 620 nm po dobu 24 hod při teplotě 37 °C. Dále byla také stanovena produkce kyseliny mléčné a octové pomocí izotachoforézy.

Tab. 1 Bazální médium pro testování prebiotické aktivity (Caleffi a kol., 2015)

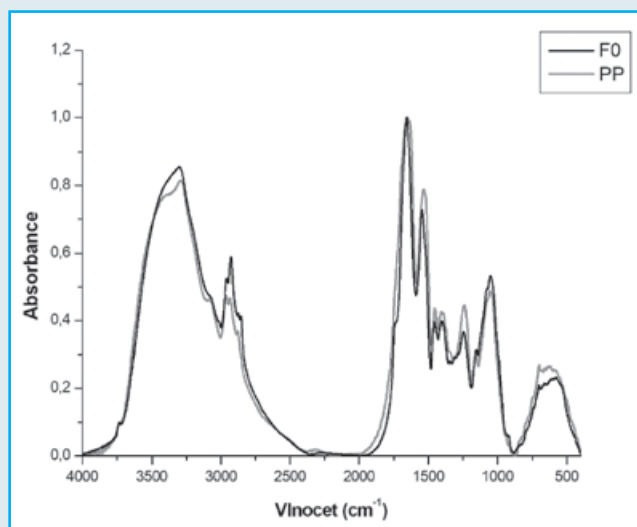
Složka	Množství
trypton (g)	10
pepton (g)	10
kvasničný extrakt (g)	5
Tween 80 (ml)	1
destilovaná voda (l)	1
pH 6,5	
sterilace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut	

Výsledky a diskuse

Na základě následujících FTIR spekter (Obr. 1) lze porovnat, jak se liší vstupní materiál (F0) nejen od finální frakce F3. Je patrné, že se naměřené spektrum výchozího materiálu (F0) od spektra frakce F3 výrazně liší. Široký pás charakteristický pro valenční vibrace OH vazeb a vody ν(OH) se nachází v oblasti kolem 3300 cm⁻¹. Velký pokles absorbance lze pozorovat u pásů typických pro lipidy při 2926 a 2845 cm⁻¹ přiřazených valenčním vibracím CH₂ skupin, a také u ramena kolem 1740 cm⁻¹ odpovídajícího valenčním vibracím C=O vazeb esterů. Intenzita těchto pásů se s jednotlivými frakcemi snižuje, nejvíce u frakce F3. Zároveň došlo k významnému poklesu pásů charakteristických pro bílkoviny při 1543 cm⁻¹ (amid II) a 1656 cm⁻¹ (amid I). Je ale zřejmé, že nedošlo k úplnému enzymatickému odstranění proteinů, protože tyto pásy jsou stále přítomny ve spektrech frakcí. Pásky typické pro polysacharidy v oblasti kolem 1200-950 cm⁻¹ (COC, CO a CC valenční vibrace glykosidových vazeb a pyranosových kruhů) značně narostly. Ze spekter je



Obr. 1 FTIR spektra frakcí F0, F1, F2 a F3 získaná infračervenou spektroskopií



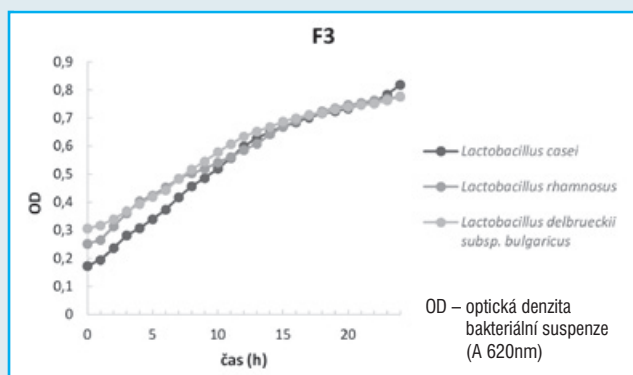
Obr. 2 FTIR spektra frakce F0 a pevného podílu (PP)

patrné, že se jedná hlavně o škrob, zásobní polysacharid řas a vyšších rostlin. Na obrázku č. 2 je FTIR spektrum surové biomasy (F0) ve srovnání s pevným podílem po extrakci (PP). Je patrné, že spektra obsahují pásy ve stejných oblastech vlnočtu. U pevného podílu lze pozorovat pokles pásů kolem oblasti 2926 a 2845 cm^{-1} (CH), které přísluší lipidům. Naopak vyšší hodnoty oproti biomase (F0) jsou v oblasti amidových vibrací bílkovin kolem 3300, 3100, 1650, 1543 cm^{-1} a 1243 cm^{-1} ; poslední pás má výrazný příspěvek valenčních vibrací CO vazeb.

Stanovením prebiotické aktivity, jakožto vlivu jednotlivých médií s obsahem frakcí, pevného podílu PP či komerčního prebiotika Orafiti GR na růst vybraných bakterií rodu *Lactobacillus*, byly získány jednotlivé grafy. Nárůst v daném médiu byl posuzován z hlediska rozdílu optické denzity na počátku a konci kultivace, což lze vyvodit z tabulky č. 2. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v médiu s frakcí F3 viz Obr. 3, kdy došlo k největšímu nárůstu v případě kmene *L. casei* a druhému největšímu nárůstu v případě zbývajících kmenů. Kmenu *L. rhamnosus* a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se nejlépe dařilo v médiu s přísadkou F2. U všech kmenů došlo v médiu s F3 k většímu nárůstu než v médiu s komerčním prebiotikem Orafiti GR jakožto pozitivní kontrolou. Frakce F2 a F3 byly jako jediné zbažené chlorofylu, tudíž lze usoudit, že chlorofyl jako takový nemá žádné stimulační účinky na růst testovaných bakterií z rodu *Lactobacillus*. Nejnižší nárůst nastal u *L. casei* s frakcí F1, v tomtéž médiu byl pozorován i velmi nízký nárůst v případě kmene *L. rhamnosus*. To mohlo být způsobeno např. přítomností zbytkových rozpouštědel ve frakci F1, které byly používány při izolaci a které mohly negativně ovlivnit růst testovaných bakterií. Zbývající kmen – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* rostl nejméně v médiu s přísadkou vstupní biomasy,

Tab. 2 Počáteční a finální optická denzita testovaných kmenů v jednotlivých médiích

Kmeny	<i>L. casei</i> Lafti L-26		<i>L. rhamnosus</i> CCDM 146		<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CCDM 364	
	Optická denzita (OD)					
Médium	počáteční	finální	počáteční	finální	počáteční	finální
F0	0,95	1,27	1,23	1,68	1,12	1,41
F1	0,46	0,65	0,46	0,82	0,42	0,75
F2	0,26	0,67	0,26	0,78	0,22	0,75
F3	0,17	0,82	0,25	0,73	0,30	0,78
PP	0,44	0,93	0,44	0,90	0,44	0,85
GR	0,20	0,77	0,25	0,59	0,22	0,55
BS	0,22	0,56	0,23	0,56	0,10	0,53



Obr. 3 Vliv frakce F3 na růst vybraných bakterií rodu *Lactobacillus*

tedy frakcí F0. Tento nárůst, stejně jako nárůst *L. casei* s F1, byl nižší než v bazálním médiu, jakožto negativní kontrola.

Bylo pozorováno, že výsledky měření OD korespondují s výsledky produkce kyselin měřených izotachoforeticky, kde obecně velmi nízký nárůst, jako i nejnižší celková koncentrace kyselin byly stanoveny u frakce F1. Nejnižší produkce kyselin svědčí o nejslabším bakteriálním nárůstu v daném médiu. Pozitivní vliv frakce F3 na testované kmeny byl potvrzen, jelikož z Tab. 3 je zřejmé, že kmen *L. rhamnosus* vyprodukoval nejvíce kyselin právě

Tab. 3 Výsledky produkce kyseliny octové a mléčné v médiu s přísadkou vstupní biomasy F0, frakcí F1 až F3, pevným podílem po extrakci (PP), komerčním prebiotikem Orafiti GR (GR) jako pozitivní kontrola či v čistém bazálním médiu jako negativní kontrola

Kmeny	<i>L. casei</i> Lafti L-26		<i>L. rhamnosus</i> CCDM 146		<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CCDM 364	
	octová kys. ²	mléčná kys. ³	octová kys. ²	mléčná kys. ³	octová kys. ²	mléčná kys. ³
Médium	průměrná koncentrace \pm Ucl [g/kg]					
F0	1300 \pm 25	310 \pm 10	1260 \pm 25	250 \pm 5	1220 \pm 25	270 \pm 5
F1	1040 \pm 20	300 \pm 5	960 \pm 20	250 \pm 5	1100 \pm 20	240 \pm 5
F2	1250 \pm 25	370 \pm 10	1270 \pm 25	340 \pm 10	1310 \pm 25	310 \pm 10
F3	1770 \pm 35	390 \pm 10	1500 \pm 30	720 \pm 20	1630 \pm 35	630 \pm 15
PP	1310 \pm 25	240 \pm 5	1260 \pm 25	230 \pm 5	1200 \pm 25	240 \pm 5
GR	580 \pm 10	2900 \pm 55	730 \pm 15	610 \pm 15	1040 \pm 20	1220 \pm 25
BS	1340 \pm 25	620 \pm 15	1000 \pm 20	350 \pm 10	1100 \pm 20	330 \pm 10

¹ rozšířená kombinovaná nejistota měření (koeficient rozšíření $k = 2$)

² kalibrováno na octan sodný trihydrát, min 99 %, š. 20892 0579 (Lachema Brno)

³ kalibrováno na lithium lactate, 98 %, Lot: 21K5301 (Sigma-Aldrich)

v médiu s F3. S touto frakcí došlo i k nejvyšší produkci kyseliny octové u kmenů *L. casei* a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Z hlediska produkce kyseliny mléčné se u těchto dvou kmenů osvědčilo médium s komerčním prebiotikem Orafiti GR. Zajímavým poznatkem však je produkce kyseliny octové na úkor kyseliny mléčné v médiích s jednotlivými frakcemi či pevným podílem přesto, že testované kmeny se řadí mezi bakterie homofermentativního kvašení a hlavním produktem by tedy měla být kyselina mléčná. Podobný trend byl pozorován ve studii, která sledovala vliv *Spirulina platensis* na růst probiotického homofermentativního kmene *Lactobacillus plantarum*. Stejně jako v našem případě byla v přítomnosti přídatku Spiruliny po 24-hodinové kultivaci naměřena větší koncentrace kyseliny octové než kyseliny mléčné na rozdíl od kultivace v médiu bez přídatku sinice (Niccolai a kol., 2020). Lze uvažovat nad tím, že přídatky mikrořas a sinic mohou modulovat metabolismus některých bakteriálních kmenů. Toto zjištění bude předmětem dalšího zkoumání.

Závěr

Byla stanovena prebiotická aktivita frakcí sledováním jejich vlivu na růst vybraných bakterií rodu *Lactobacillus*. Významný prebiotický efekt byl pozorován u frakce F3, kdy byl zaznamenán ve většině případů větší nárůst testovaných kmenů laktobacilů než v jiných médiích, a dokonce i než v médiu s komerčně používaným prebiotikem Orafiti GR. Jedná se o frakci, která byla získána promýváním organickými rozpouštědly, extrakcí vodou o teplotě 100 °C a jako jediná byla enzymaticky částečně očištěna od proteinů. Tato frakce obsahovala největší podíl polysacharidů, což bylo patrné i z naměřených spekter pomocí infračervené spektroskopie. Pozorována byla také odlišná metabolická aktivita testovaných kmenů laktobacilů v médiích s přídatkem frakcí, kde hlavním metabolickým produktem těchto bakteriálních kmenů byla kyselina octová namísto kyseliny mléčné. Byla potvrzena hypotéza, že polysacharidy či polysacharidové frakce získané z řasy *Chlorella vulgaris* mohou vykazovat prebiotickou aktivitu. Je zřejmé, že frakce F3 mnohokrát více stimuluje testované kmeny v růstu, a tudíž v produkci kyselin, než kompletní biomasa řasy *C. vulgaris*. Z důvodu překvapivě vysoké produkce kyseliny octové testovanými kmeny laktobacilů v médiích s polysacharidovými frakcemi bude potřeba vyloučit možný negativní vliv kyseliny octové na senzorké vlastnosti finálních výrobků. Aplikace získaných polysacharidových frakcí z *Chlorelly* do fermentovaných mléčných výrobků a ověření jejich vhodných senzorkých vlastností bude tedy předmětem dalšího výzkumu.

Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou Národní agentury pro zemědělský výzkum (MZe ČR) při řešení projektu QK1910300 a za podpory MZE-RO1421.

Literatura

- 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 (vol 235, pg 719, 2012). *European Food Research and Technology*. 235, str. 1213-1213.
- 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, str. 144-154.
- Belasco W. (1997) Algae burgers for a hungry world? The rise and fall of *Chlorella cuisine*. *Technology and Culture*. 38, str. 608-634.
- Caleffi E. R., Krausová G., Hyršlová I., Paredes L. L. R., dos Santos M. M., Sasaki G. L., Gonçalves R. A. C., de Oliveira A. J. B. (2015) Isolation and prebiotic activity of inulin-type fructan extracted from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen roots. *International Journal of Biological Macromolecules*. 80, str. 392-399.
- de Borja Gurpilhares D., Cinelli L. P., Simas N. K., Pessoa Jr A., Sette L. D. (2019) Marine prebiotics: Polysaccharides and oligosaccharides obtained by using microbial enzymes. *Food Chemistry*. 280, str. 175-186.
- De Jesus Raposo M. F., De Moraes A. M. B., De Moraes R. M. S. C. (2015) Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine Drugs*. 13, str. 2967-3028.
- Ferreira A. S., Ferreira S. S., Correia A., Vilanova M., Silva T. H., Coimbra M. A., Nunes C. (2020) Reserve, structural and extracellular polysaccharides of *Chlorella vulgaris*: A holistic approach. *Algal Research*. 45, str. 101-1757.
- Gotteland M., Riveros K., Gasaly N., Carcamo C., Magne F., Liabeuf G., Beattie A., Rosenfeld S. (2020) The Pros and Cons of Using Algal Polysaccharides as Prebiotics. *Frontiers in Nutrition*.
- Hyršlova I., Krausova G., Smolova J., Stankova B., Branyik T., Malinska H., Huttli M., Kana A., Curda L., Dorskocil I. (2021) Functional Properties of *Chlorella vulgaris*, *Colostrum* and *Bifidobacteria* and Their Potential for Application in Functional Foods. *Applied Sciences*. 11, str. 5264.
- Chen Y.-X., Liu X.-Y., Xiao Z., Huang Y.-F., Liu B. (2016) Antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Chlorella pyrenoidosa* via different ethanol concentrations. *International Journal of Biological Macromolecules*. 91, str. 505-509.
- Kapaun E., Reisser W. (1995) A chitin-like glycan in the cell wall of a *Chlorella* sp. (*Chlorococcales*, *Chlorophyceae*). *Planta*. 197, str. 577-582.
- Kaplan D., Christiaen D., Arad S. M. (1987) Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 53, str. 2953-2956.
- Laurienzo P. (2010) Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Marine Drugs*. 8, str. 2435-2465.
- Lopez-Santamarina A., Miranda J. M., Mondragon A. d. C., Lamas A., Cardelle-Cobas A., Franco C. M., Cepeda A. (2020) Potential use of marine seaweeds as prebiotics: A review. *Molecules*. 25, str. 1004.
- Lordan S., Ross R. P., Stanton C. (2011) Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine Drugs*. 9, str. 1056-1100.
- Maksimova I., Bratkovskaya L., Plekhanov S. (2004) Extracellular carbohydrates and polysaccharides of the alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*. 31, str. 175-181.
- Markowiak P., Śliżewska K. (2017) Effects of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*. 9, str. 1021.
- Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14, str. 217-232.
- Niccolai A., Bažec K., Rodolfi L., Biondi N., Zlatic E., Jamnik P., Tredici M. R. (2020) Lactic acid fermentation of *Arthrospira platensis* (spirulina) in a vegetal soybean drink for developing new functional lactose-free beverages. *Frontiers in Microbiology*. 11, str.
- O'Sullivan L., Murphy B., McLoughlin P., Duggan P., Lawlor P. G., Hughes H., Gardiner G. E. (2010) Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Marine Drugs*. 8, str. 2038-2064.
- Ogawa K., Ikeda Y., Kondo S. (1999) A new trisaccharide, α -D-glucopyranuronosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranose from *Chlorella vulgaris*. *Carbohydrate Research*. 321, str. 128-131.

- Priyadarshani I., Rath B. (2012) Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*. 3, str. 89-100.
- Priyan Shanura Fernando I., Kim K.-N., Kim D., Jeon Y.-J. (2019) Algal polysaccharides: Potential bioactive substances for cosmeceutical applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 39, str. 99-113.
- Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P.-Y., Vaca-Garcia C. (2014) Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 35, str. 265-278.
- Sajtos F., Hajkó J., Kövér K. E., Lipták A. (2001) Synthesis of the α -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-L-Rha trisaccharide isolated from the cell wall hydrolyzate of the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Carbohydrate Research*. 334, str. 253-259.
- Sardari R. R., Nordberg Karlsson E. (2018) Marine poly- and oligosaccharides as prebiotics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 66, str. 11544-11549.
- Ścieszka S., Klewicka E. (2020) Influence of the Microalga *Chlorella vulgaris* on the Growth and Metabolic Activity of *Lactobacillus* spp. *Bacteria Foods*. 9, str. 959.
- Sheng J., Yu F., Xin Z., Zhao L., Zhu X., Hu Q. (2007) Preparation, identification and their antitumor activities in vitro of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chemistry*. 105, str. 533-539.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101, str. 87-96.
- Sylvia S., Elzbieta K. (2020) Algae *Chlorella vulgaris* as a factor conditioning the survival of *Lactobacillus* spp. in adverse environmental conditions. *LWT*. 133, str. 109936.
- Tokuşoglu Ö., Ünal M. (2003) Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*. 68, str. 1144-1148.
- Yu M., Chen M., Gui J., Huang S., Liu Y., Shentu H., He J., Fang Z., Wang W., Zhang Y. (2019) Preparation of *Chlorella vulgaris* polysaccharides and their antioxidant activity in vitro and in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*. 137, str. 139-150.
- Zhang J., Liu L., Chen F. (2019) Production and characterization of exopolysaccharides from *Chlorella zofingiensis* and *Chlorella vulgaris* with anti-colorectal cancer activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 134, str. 976-983.

Korespondující autor:

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

Přijato do tisku: 9. 8. 2021

Lektorováno: 30. 9. 2021

“CO JE ZAJÍMAVÉHO VE VĚDECKÉ LITERATUŘE”

Kontakt: State Agricultural Academy, Kemerovo, Russia. E-mail: zaharova_Im@mail.ru

Mléko a mléčné výrobky jsou neustále centrem pozornosti výzkumu. Výběr z vědecké literatury pro toto číslo zahrnuje následující publikace:

VLIV BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ A FOSFOLIPIDŮ NA ZDRAVÍ GASTROINTESTINÁLNÍHO TRAKTU

Fosfolipidy membrán globulí mléčného tuku upravují adhezi laktobacilů na pohárové buňky Caco-2 produkující hlen tím, že modifikují obal buňky

Ortega-Anya, J., Marciniak, A., Jimenez-Florez, R. (2021): Milk fat globule membrane phospholipids modify adhesion of *Lactobacillus* to mucus-producing Caco2/Goblet cells by altering the cell envelope. *Food Research International*, 146, s. 110471.

Význam různých kmenů laktobacilů a mléčných složek, jako jsou membrány globulí mléčného tuku, byl zkoumán z různých hledisek a bylo prokázáno, že mají pozitivní roli pro lidské zdraví. Bakterie mléčného kvašení produkují metabolity s přímým vlivem na imunitní systém, změny pH ve střevě a antagonistické látky pro patogenní bakterie, stejně jako konkurence. Membrány z globulí mléčného tuku zlepšují stav gastrointestinálního traktu podporou buněčné proliferace, vývoje epiteliálních buněk a těsných spojení mezi nimi. Interakce mezi prospěšnými bakteriemi a mléčným tukem je v mléčných výrobcích přirozeně se vyskytující jev, který ale nebyl ještě dostatečně prozkoumán. V této práci se zkoumal vliv mléčných fosfolipidů při adhezi laktobacilů na hlen produkující pohárové buňky Caco-2 a bylo zjištěno, že ošetření fosfolipidy produkovalo bakteriální buňky se zvýšenou elektronegativitou povrchu, což korelovalo s jejich zvýšenou adhezí k intestinálnímu modelu. Navíc byly použity originální prostředky k charakterizování adheze s pomocí mikrováhy z křemenných krystalů. Adhezi modifikovaly všechny studované kmeny, což bylo zachyceno fyziologickými nebo kinetickými parametry. Díky zobrazování mikrobiálních buněk elektronovým mikroskopem bylo navíc zjištěno, že některé kmeny, jako *L. acidophilus* a *L. casei* metabolizovaly MPL, což zlepšilo jejich adhezi k hydrofilním povrchům. Byla také identifikována další skupina bakterií, jako *L. delbrueckii* a *L. plantarum*, které namísto metabolizování MPL držely fosfolipidy nevratnou vazbou na povrchu buněčného obalu, čímž snižovaly jejich adhezi k zlatým povrchům. Jedním z nejdůležitějších rysů probiotických bakterií mléčného kvašení, kromě jejich přežití v žaludku, je kolonizace a prodloužená doba pobývání v intestinálním traktu, což účinně mění střevní mikrobiom. Bylo zjištěno, že ošetření bakteriemi s mléčnými fosfolipidy posiluje adhezi k intestinálním modelům a bude na druhou stranu zvyšovat dobu jejich pobývání s průvodními benefity pro spotřebitele.