



Kryoprotektivní efekt **laktulózy** a kvasničných **beta-glukanů** ve směsi se **sójovým lecitinem** vůči probiotickým taxonům **bifidobakterií** a **laktobacilů**

doc. Ing. Jiří Killer, Ph.D.*^{1,2} a kolektiv spoluautorů

* ¹ Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Laboratoř anaerobní mikrobiologie, Vídeňská 1083, Praha 4 – Krč, 142 20;

² Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU v Praze, Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Kamýcká 129, Praha 6 – Suchbátka, 165 00





Kryokonzervace (nejen) bakterií



Zajištění **Anabiózy** / **Kryptobiózy** při teplotách **pod bodem mrazu**.

Anabióza → **zakonzervovaný metabolický stav** organismu za nepříznivých environmentálních podmínek (mráz, sucho, bezkyslíkatá atmosféra) umožňující zachování vitality a stálosti vnitřního prostředí buněk po delší čas





Kryokonzervace (nejen) bakterií



zmrazení buněk při -90 do -18 °C

Kryogenní konzervace při $\downarrow -150$ °C

Vitrifikace v tekutém N_2 při $\downarrow -192$ °C

Energeticky, resp.
Ekonomicky
značně nákladné!!





Kryoprotektanty



...nezbytnou **součástí roztoku suspenze buněk** při zmrazování a kryokonzervaci → látky (obzvláště organické) zvyšující vitalitu buněk v průběhu a po zmrazení, resp. snižující míru nepříznivých vnějších i vnitřních podmínek (osmotický a oxidační stres, redukce vzniku krystalů vody, zabránění denaturace bílkovin...) vedoucích k odumírání buněk





Kryoprotektanty



MH

Nízkomolekulární (glycerol, DMSO, mono-, di-sacharidy, AK..)

Vysokomolekulární
(polysacharidy, proteiny, pepton, sušené mléko, kvasničný extrakt..)

Permeabilita

B.Stěna i C.Mem. →
nízkomolekulární: glycerol, DMSO

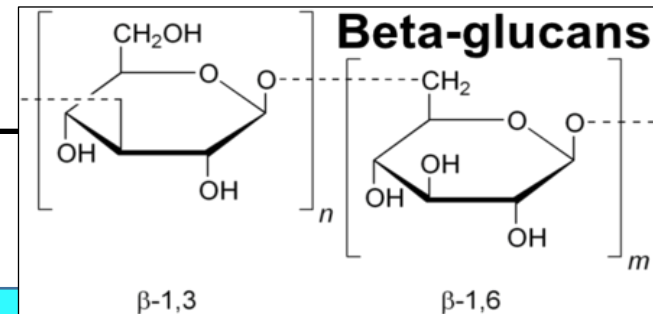
B.Stěna → monosacharidy, disacharidy, AK

Nepenetrující →
vysokomolekulární

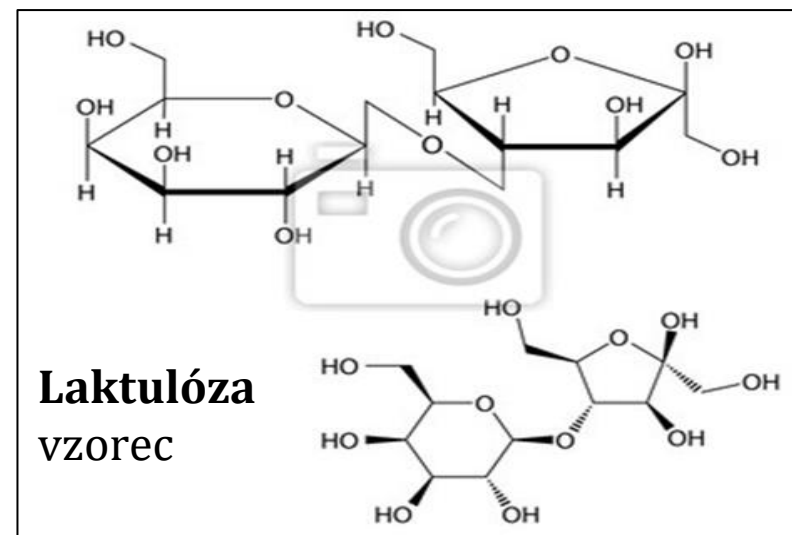




Hypotéza



Kvasničné **beta(1,3- a 1,6)-glukany** a **laktulóza** v kombinaci se sójovým **lecitinem** budou mít kryoprotektivní efekt na kultury **bifidobakterií** a **laktobacilů** za mírných, energeticky-ekonomicky výhodných podmínek skladování (- 20 °C).





Cíle studie



- Nalézt **uniformní** a technologicky **jednoduché podmínky** (růstové médium, atmosféra) pro **kultivaci bifidobakterií a laktobacilů** (nejen) pro účely **kryoprezervace**

- U **12 probiotických taxonů** bifidobakterií a laktobacilů otestovat a zhodnotit **možný kryoprotektivní efekt BG a laktulózy** v kombinaci se **sójovým lecitinem**



Charakteristika kvasničných beta-glukanů, laktulózy a lecitinu



Beta-glukany (kvasničné)

polysacharidy BS kvasinek (hub) vykazující **imunostimulační, imunomodulační** efekt; protizánětlivý, antioxidační, antikarcinogenní a prebiotický účinek je diskutován

Laktulóza

uměle syntetizovaný (enzymaticky, termicky) **disacharid** z laktózy používaný v medicíně jako osmotické **laxativum** (projímadlo) , **lék u hyperamonémie** → hepatické encefalopatii, s prokázaným **prebiotickým účinkem**; antikarcinogenní efekt diskutován

Lecitin (fosfatidylcholin)

nejčastěji používaný **potravinářský emulgátor**, součástí **eukaryotních a prokaryotních** buněk, esenciální nutriční komponenta → komponenta buněčných membrán, prekurzor neurotransmiteru acetylcholinu, E pro správnou funkci svalů a mozku, stabilizace hladiny cholesterolu v krvi...

Materiál a Metody



12 taxonů bifidobakterií a laktobacilů, často přítomných v probiotických a synbiotických preparátech, kultivovaných až do konce log fáze RK v upraveném M.R.S. bujónu s CO₂ (obyčejný, nepurifikovaný) atmosférou

Bifidobacteria	Lactobacillaceae strains
<i>B. adolescentis</i> DSM 20083T	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356T
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 Ch. Hansen	<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243T
<i>B. bifidum</i> JK11	<i>Lactobacillus johnsonii</i> DSM 10533T
<i>B. breve</i> ATCC 15700T	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 9595
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 17930	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> DSM 20391
<i>B. longum</i> DSM 20219T	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM 20016T

- V1 → laktulóza + sójový lecitin
- V2 → beta-glukany + sójový lecitin
- V3 → glycerol (25%), pozitivní kontrola
- C- → zmrazená kultura (-20 °C) bez přídavku kryoprotektiv, negativní kontrola

Počty živých buněk stanoveny **kultivačně** na upraveném M.R.S. agaru (37 °C, 48-72 h, anaerobní atmosféra Anaerogen v anaerostatu)

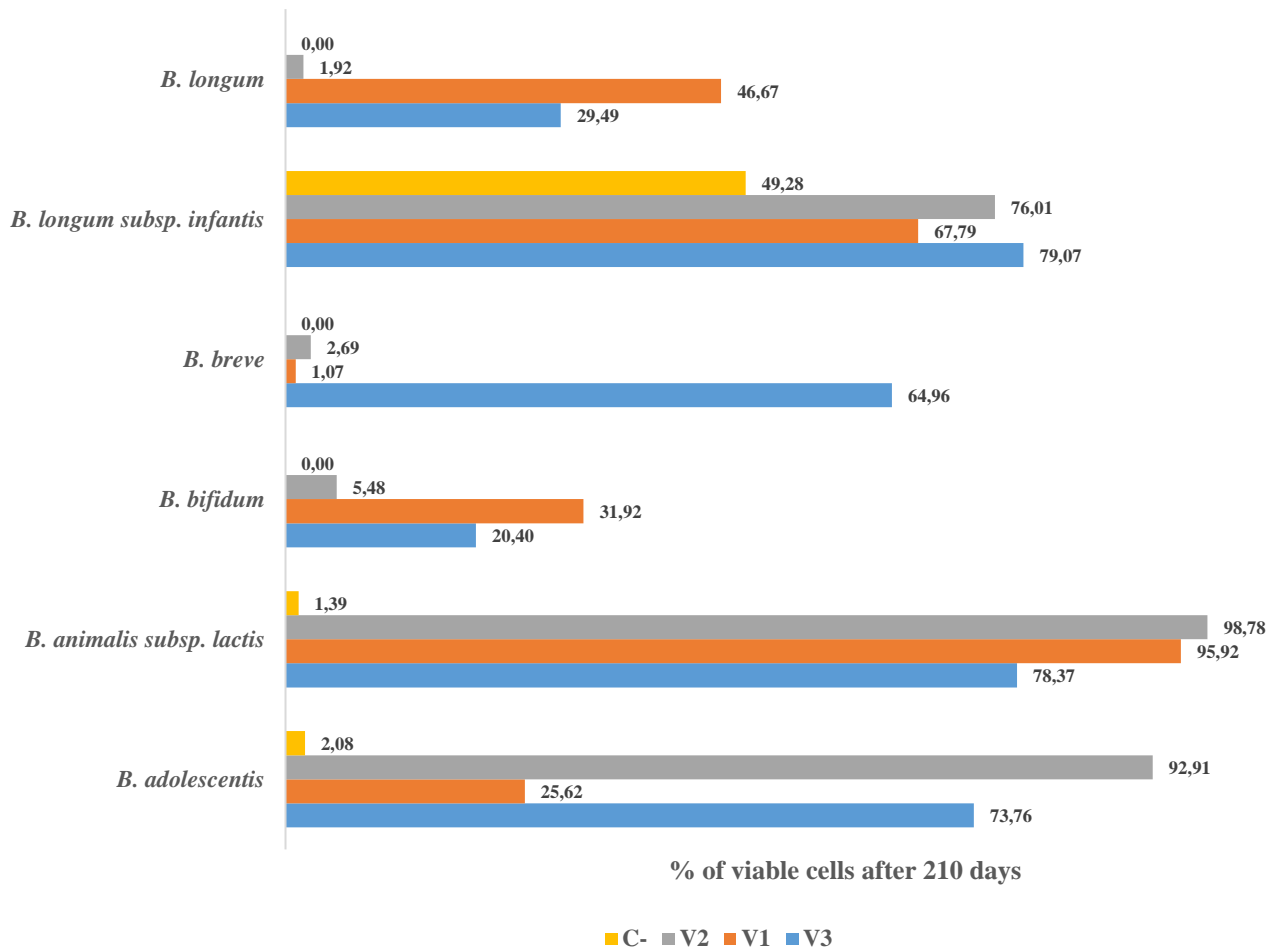




Výsledky: % přeživších buněk Bifidobakterií na konci experimentů (210.) den



Bifidobacteria A)



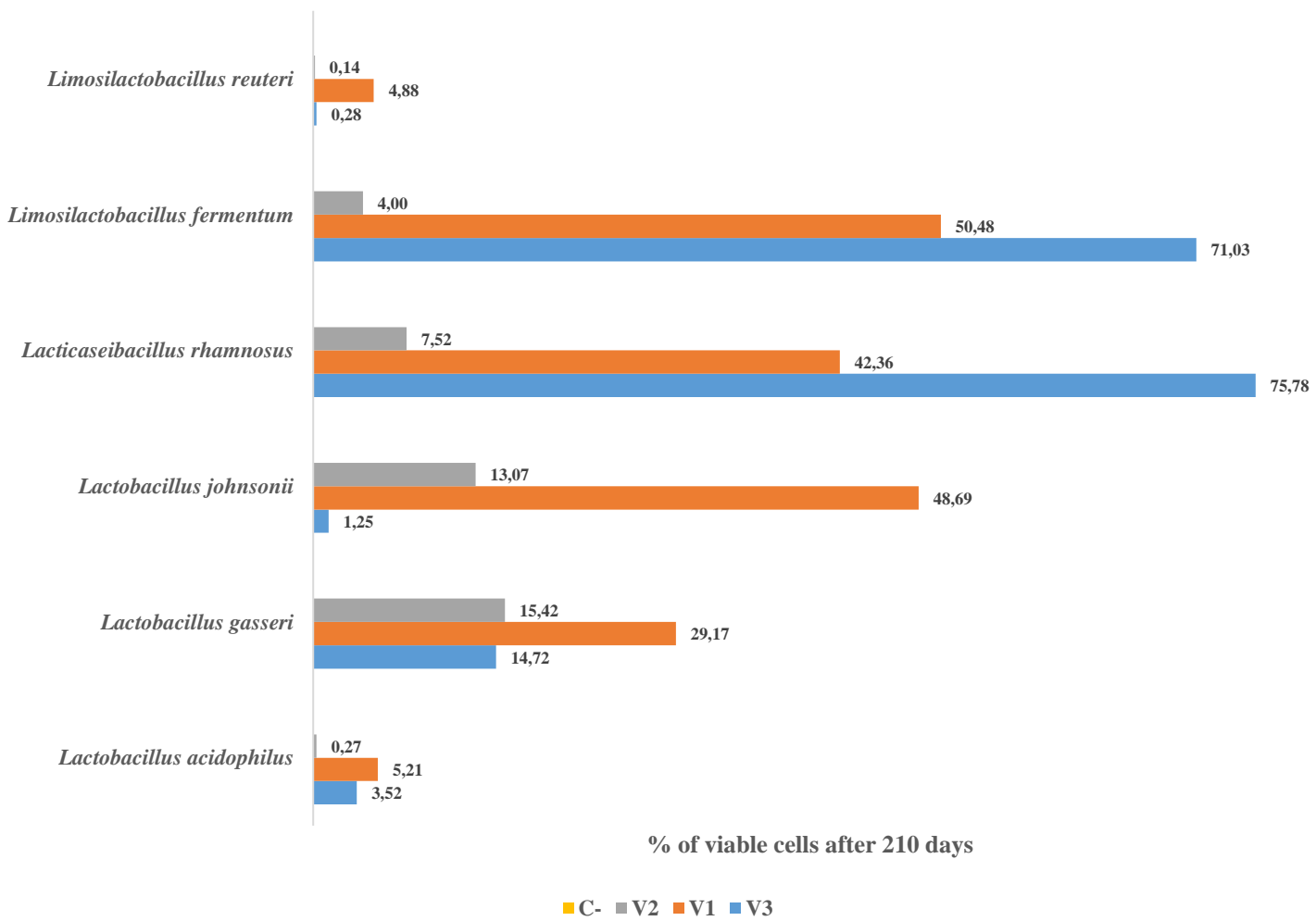
- Všechny experimentální varianty (V1, V2, V3) vykázaly kryoprotektivní efekt v porovnání s C-
- Kryoprotektivní efekt u všech experimentálních prokázán **především u *B. animalis subsp. lactis*, *B. longum subsp. infantis* a *B. adolescentis*** (vyšší míra kryorezistence)
- Obecně, všechny kmeny kryoprotektivně chráněny ve **V3** (glycerol, C+)
- **Kmeny** se mezi sebou značně liší



Výsledky: % přeživších buněk *Lactobacillaceae* na konci experimentů (210.) den



Lactobacillaceae B)



- **Všechny experimentální varianty (V1, V2, V3) vykázaly kryoprotektivní efekt v porovnání s C-**
- **Varianta V1 (laktulóza), a poté V3 (glycerol, C+) vykázaly obecně nejlepší kryoprotektivní efekt u všech kmenů**
- **Kmeny se mezi sebou značně liší**

Závěry



- i) **Jednoduchá kultivace** obou skupin, resp. různých taxonů Bifidobakterií (anaerobové) a Laktobacilů (mikroaerofilové – anaerobové), za použití **upraveného M.R.S. média s CO₂** (nepurifikovaného!!) je možná
- ii) **Laktulóza** a kvasničné **Beta-glukany** v kombinaci se sójovým lecitinem **vykazují kryoprotektivní** efekt na kultury bifidobakterií i laktobacilů, odezva se značně **liši mezi jednotlivými kmeny**
- iii) Nejlepší (obecně) kryoprotektivní efekt zjištěn u varianty **V1 (Laktulóza)** a **V3 (Glycerol, pozitivní kontrola)**
- iv) kupodivu!, u **bifidobakterií prokázána lepší kryorezistence a odezva na experimentální varianty vs. *Lactobacillaceae***
- v) Pro dlouhodobou kryokonzervaci bifidobakterií a laktobacilů lze použít **běžnou (domácí) mrazicí teplotu – 20 °C.**

Návrhy, Doporučení



- **Mrazení** za mírných, ekonomicky méně náročných teplot (-20 až -15 °C) představuje vhodnou formu pro **udržení vitality** buněk hlavních probiotik: **zmrazená probiotika** (synbiotika) v podobě např. **mrazeného jogurtu, zmrzliny** jako vhodná a **alternativní forma vůči lyofilizovaným**.
- Naše výsledky prokázaly, že za jednoduchých, ekonomicky **příhodných podmínek lze po delší čas** v přítomnosti určitých kryoprotektiv **udržet vitalitu i lidských, citlivých kmenů bifidobakterií**.
- **Pozitivní (až léčebný) a nutriční efekt** určitých substancí (zde laktulózy, beta-glukanů a lecitinu) a zároveň jejich kryoprotektivní účinek může být využit pro vývoj nových forem doplňků stravy:
nutri(syn)probiotik: *„současné podání probiotik, (a) prebiotik spolu s výživově esenciálními látkami a látkami prokazatelně zlepšující alespoň jednu z následujících charakteristik probiotik: fyziologickou, technologickou a zdraví podporující“*





Děkuji za poslech!

