



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ VYBRANÝCH KVASINKOVÝCH PROBIOTIK A POSTBIOTIK V KOSMETICE A POTRAVINÁŘSTVÍ

APPLICATION OF SOME YEAST PROBITICS AND POSTBIOTICS IN COSMETICS AND FOODS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Natália Kročianová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2025

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP2054/2024 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Natália Kročianová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Využití vybraných kvasinkových probiotik a postbiotik v kosmetice a potravinářství

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Literární rešerše na téma probiotika vs postbiotika; přehled probiotických kvasinek, podmínky kultivace, produkce metabolitů a možnosti jejich využití
- 2) Kultivace vybraných zástupců probiotických kvasinek, charakterizace probiotického účinku a kooperace s bakteriálními probiotiky.
- 3) Příprava preparátů s charakterem postbiotik
- 4) Možnosti enkapsulace probiotických kvasinek a postbiotik, stabilita.
- 5) Návrh a testování kosmetického výrobku nebo potravinového doplňku.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2025:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Natália Kročianová
studentka

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

V posledných rokoch rastie záujem o využitie netradičných probiotických mikroorganizmov, medzi ktoré patria aj kvasinky. Vzhľadom na ich priaznivé vlastnosti, ako je schopnosť prežívať v gastrointestinálnom trakte, produkcia bioaktívnych látok a potenciálne pozitívne účinky na zdravie, sa otvárajú nové možnosti ich aplikácie v potravinárskom, farmaceutickom aj kozmetickom priemysle.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo komplexne zhodnotiť vlastnosti vybraných druhov kvasiniek (*Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Yarrowia lipolytica* a *Saccharomyces cerevisiae*) a posúdiť ich využiteľnosť ako probiotických a postbiotických zložiek. V teoretickej časti boli rozpracované rozdiely medzi probiotickými a postbiotickými účinkami, rozpísané rozdiely medzi kmeňmi kvasiniek a perspektíva ich využitia v priemyselnej aplikácii. Druhá časť práce zahŕňala kultiváciu kvasiniek, prípravu ich extraktov, stanovenie obsahu bioaktívnych látok, testovanie antimikrobiálnych účinkov, ako aj modelové trávenie a testovanie enkapsulácie do lipozómov. Získané výsledky preukázali rozmanitý obsah bioaktívnych látok v kvasinkách, účinnosť enkapsulácie a prežitie v stresových podmienkach. Zároveň kvasinková biomasa podporila rast probiotických baktérií za súčasnej absencie životaschopných buniek po procese kultivácie, čo naznačuje postbiotický charakter testovaných extraktov. Na základe zistených výsledkov boli navrhnuté možnosti využitia vybraných druhov kvasiniek v oblasti doplnkov stravy a kozmetických prípravkov ako prirodzených a funkčných zložiek podporujúcich zdravie a mikrobiálnu rovnováhu. Práca prispieva k prehĺbeniu poznatkov o využiteľnosti netradičných mikroorganizmov v oblasti funkčných výrobkov a podporuje vývoj inovatívnych a prirodzene aktívnych zložiek pre zdravie človeka.

Kľúčové slová

Probiotické kvasinky, kultivácia, postbiotiká, bioaktívne látky, enkapsulácia, viabilita, kozmetika, potraviny

ABSTRACT

In recent years, there has been a growing interest in the use of non-traditional probiotic microorganisms, including yeasts. Due to their favourable properties, such as the ability to survive in the gastrointestinal tract, production of bioactive compounds, and potential health benefits, new opportunities are emerging for their application in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries.

The aim of this thesis was to comprehensively evaluate the properties of selected yeast species (*Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Yarrowia lipolytica*, and *Saccharomyces cerevisiae*) and assess their potential as probiotic and postbiotic components. The theoretical part discusses the differences between probiotic and postbiotic effects, the importance of bioactive compounds, and the potential for microbial application in industrial contexts. The experimental part involved yeast cultivation, extract preparation, analysis of bioactive compound content, antimicrobial activity testing, as well as model digestion and encapsulation into liposomes. The results revealed a diverse profile of bioactive compounds, effective encapsulation, and the ability of yeast components to withstand stressful conditions. In addition, the cell-free yeast extracts stimulated the growth of probiotic bacteria while showing no viable yeast cells after cultivation, which supports their postbiotic character. Based on the findings, potential applications of the studied yeast strains were proposed in the development of dietary supplements and cosmetic products as natural and functional ingredients that support health and microbial balance. This work contributes to a deeper understanding of the usability of non-conventional microorganisms in the field of functional products and supports the development of innovative and naturally active components for human health.

Keywords

Probiotic yeasts, cultivation, postbiotics, bioactive compounds, encapsulation, viability, cosmetics, food

KROČIANOVÁ, Natália. *Využití vybraných kvasinkových probiotik a postbiotik v kosmetice a potravinářství*. Online, diplomová práce. Ivana MÁROVÁ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/162018>.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

..... podpis študentky

PodĎakovanie

Na tomto mieste by som sa rada poďakovala svojej vedúcej diplomovej práce prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc., za cenné rady, odborné vedenie, ochotu a konštruktívne pripomienky počas písania mojej diplomovej práce. Zároveň by som chcela vyjadriť veľkú vďaku svojej konzultantke Ing. Michaele Kubalovej, za jej neoceniteľnú pomoc, trpezlivosť, ochotu a ľudský prístup, s ktorými ma sprevádzala počas celého procesu spracovania tejto diplomovej práce. V neposlednej rade sa chcem tiež poďakovať svojej rodine, priateľom a blízkym za ich neustálu podporu počas celého môjho štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1	Pôvod a definícia probiotík	10
2.1.1	Požadovaný charakter probiotík	11
2.2	Probiotické mikroorganizmy	12
2.3	Probiotické baktérie a ich účinok	13
2.3.1	Rod <i>Bifidobacterium</i>	14
2.3.2	Rod <i>Lactobacillus</i>	15
2.4	Probiotické kvasinky	16
2.4.1	Rod <i>Saccharomyces</i>	17
2.4.2	Rod <i>Rhodotorula</i>	18
2.4.3	Rod <i>Metschnikowia</i>	19
2.5	Postbiotiká	20
2.5.1	Vplyv postbiotík na črevnú mikroflóru	21
2.6	Bezpečnosť probiotických prípravkov	22
2.7	Formy spracovania kvasiniek do doplnkov stravy	24
3	CIELE PRÁCE	26
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
4.1	Použité chemikálie	27
4.1.1	Chemikálie použité ku kultiváciám	27
4.1.2	Chemikálie použité pre analýzy	27
4.2	Použité prístroje a laboratórne pomôcky	28
4.3	Použité mikroorganizmy	29
4.3.1	Kmene kvasiniek	29
4.3.2	Kmene baktérií	29
4.4	Kultivácia vybraných druhov kvasiniek	29
4.4.1	Inokulum	29
4.4.2	Produkčné médium	30
4.5	Spracovanie kultivovaných kvasiniek a analýza biomasy	32
4.5.1	Spracovanie biomasy	32
4.5.2	Analýza vzoriek pomocou kvapalinovej chromatografie	32
4.5.3	Analýza vzoriek pomocou plynovej chromatografie	33
4.6	Príprava vodných extraktov	34
4.7	Príprava ethanolových extraktov	34
4.8	Spektrofotometrické stanovenia a charakteristiky extraktov	34

4.8.1	Stanovenie antioxidačnej aktivity – roztoková metóda Trolox	34
4.8.2	Stanovenie celkových fenolických látok	35
4.8.3	Stanovenie celkových sacharidov podľa Duboisa.....	35
4.9	Enkapsulácia kvasinkových extraktov do lipozómov	36
4.10	Charakterizácia enkapsulačnej účinnosti, veľkosti a stability lipozómov.....	36
4.10.1	Analýza enkapsulačnej účinnosti lipozómov	36
4.10.2	Analýza veľkosti a stability lipozómov pomocou metódy DLS	36
4.11	Antimikrobiálne testy	37
4.11.1	Očkovanie na mikrotitračné doštičky.....	37
4.11.2	Resazurínový test	38
4.12	Prebiotický potenciál kvasinkových extraktov v synbiotických systémoch	38
4.13	Modelové trávenie.....	39
4.13.1	Testovanie gastrointestinálnej odolnosti extraktov	39
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	40
5.1	Stanovenie obsahu pigmentov v kvasinkovej biomase	40
5.1.1	Analýza koncentrácie sterolov v kvasinkách	40
5.1.2	Analýza koncentrácie karotenoidov v kvasinkách.....	41
5.1.3	Porovnanie celkového obsahu pigmentov	42
5.2	Stanovenie obsahu mastných kyselín v kvasinkovej biomase	43
5.3	Stanovenie antioxidačnej aktivity kvasinkových extraktov	45
5.4	Stanovenie obsahu fenolických látok v kvasinkových extraktoch.....	46
5.5	Enkapsulačná účinnosť lipozómov z kvasinkových extraktov	47
5.5.1	Charakterizácia veľkosti lipozómov.....	48
5.5.2	Stanovenie stability lipozómov	50
5.6	Antimikrobiálna aktivita extraktov kvasiniek	51
5.6.1	Testovanie pomocou baktérie <i>Staphylococcus epidermis</i>	51
5.6.2	Test pomocou baktérie <i>Escherichia coli</i>	53
5.6.3	Vyhodnotenie testovania antimikrobiálnej aktivity.....	56
5.7	Antimikrobiálne testy vybraných kvasinkových extraktov.....	56
5.7.1	Testovanie baktérie <i>Staphylococcus epidermis</i>	57
5.7.2	Testovanie baktérie <i>Escherichia coli</i>	59
5.7.3	Vyhodnotenie testovania vybraných kvasinkových extraktov	60
5.8	Stanovenie celkových sacharidov podľa Duboisa.....	61
5.9	Rast probiotických baktérií v prítomnosti kvasinkových extraktov.....	62
5.10	Vplyv modelového trávenia na životaschopnosť kvasiniek.....	65
5.11	Návrh aplikácie extraktov kvasiniek vo forme funkčného výrobku	67
6	ZÁVER.....	68

7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	70
8	POUŽITÉ SKRATKY	79
9	PRÍLOHY	80

1 ÚVOD

V posledných rokoch narastá záujem o využitie mikroorganizmov, najmä probiotických kmeňov, v rôznych oblastiach priemyslu. Okrem klasických bakteriálnych probiotík sa do popredia dostávajú aj menej tradičné mikroorganizmy, akými sú kvasinky. Predstavujú výhodu pre osoby s intoleranciou na laktózu či alergiou na mliečne bielkoviny, čo ich predurčuje na širšie využitie v potravinárstve aj v kozmetickom priemysle. Niektoré druhy kvasiniek vykazujú zaujímavý probiotický potenciál, schopnosť prežívať v gastrointestinálnom trakte, produkovať bioaktívne látky, vykazovať antimikrobiálne vlastnosti a pozitívne ovplyvňovať zdravie človeka. Navyše, kvasinky sú zdrojom tzv. postbiotík – produktov alebo metabolitov uvoľňovaných živými alebo inaktivovanými mikroorganizmami, ktoré môžu mať biologický účinok aj bez prítomnosti samotného mikroorganizmu.

Využitie probiotických a postbiotických kvasiniek sa ukazuje ako sľubný nástroj na vývoj nových funkčných potravín, kde môžu prispievať nielen k zdraviu čriev, ale aj k celkovej imunomodulácii, tvorbe bioaktívnych látok a znižovaniu patogénov v tráviacom trakte. Rovnako sú zaujímavé aj pre krmivársky priemysel, najmä ako doplnok výživy pre hospodárske zvieratá, kde môžu slúžiť ako prirodzená náhrada antibiotík. V neposlednom rade majú význam aj v kozmetickom priemysle, kde sa skúma ich využitie v produktoch pre starostlivosť o pokožku. Môžu tiež poskytovať antimikrobiálnu ochranu, čím pomáhajú v prevencii zápalov a iných kožných problémov, ako sú ekzémy a akné. Ich výhodou je produkcia rôznorodých bioaktívnych látok vrátane enzýmov, peptidov, antioxidantov či lipofilných pigmentov ako sú steroly a karotenoidy. Práve tieto látky môžu prispieť k ochrane buniek pred oxidačným stresom, podpore kožnej bariéry alebo zlepšeniu nutričnej hodnoty produktov.

Táto diplomová práca sa zameriava na posúdenie probiotických a postbiotických vlastností vybraných druhov kvasiniek: *Metschnikowia sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Yarrowia lipolytica* a *Saccharomyces cerevisiae*. Kultiváciou týchto mikroorganizmov boli pripravené vodné extrakty a biomasa, ktoré boli ďalej analyzované v oblasti obsahu bioaktívnych látok, antimikrobiálneho účinku, ako aj účinku enkapsulácie kvasiniek do lipozómov pre charakterizáciu stability a aktivity extraktov. Zároveň boli hodnotené postbiotické vlastnosti na základe metabolitov uvoľnených počas kultivácie. Testovala sa tiež odolnosť buniek voči simulovanému tráveniu a ich správanie v prostredí probiotických baktérií. Na posúdenie metabolického potenciálu kvasiniek je dôležité analyzovať aj obsah ich metabolitov, ako sú pigmenty a mastné kyseliny. Tieto lipofilné zlúčeniny zohrávajú významnú úlohu v biologickej aktivite a technologickom využití. Prítomnosť a zloženie pigmentov je možné stanoviť pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) a na zistenie obsahu mastných kyselín sa využíva plynová chromatografia (GC).

Výsledky získané v rámci práce môžu prispieť k lepšiemu pochopeniu vlastností týchto mikroorganizmov a ich možnému praktickému využitiu ako funkčných zložiek s biologicky priaznivými účinkami.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

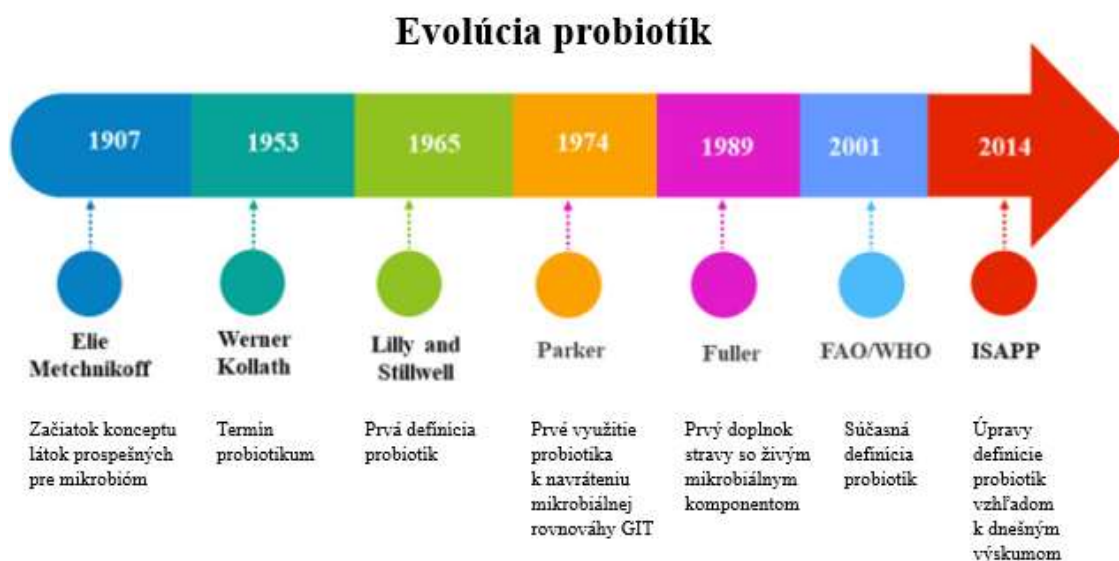
2.1 Pôvod a definícia probiotík

V priebehu minulého storočia sa začali rôzne mikroorganizmy cielene využívať pre ich potenciálnu schopnosť predchádzať a liečiť choroby, čo viedlo k zavedeniu termínu probiotikum. Termín probiotikum je síce relatívne nedávno zavedený pojem, avšak jeho pôvod nájdeme už v starovekej gréčtine a znamená „pre život“. Koncept probiotík sa vyvinul ako odozva na široké využívanie antibiotík, pričom býva často označovaný za ich funkčný protiklad [1].

História probiotík sa začala spolu s dejinami človeka. Potraviny ako syr a fermentované mlieko boli dobre známe už Grékom i Rímanom, ktorí ich konzumáciu odporúčali najmä deťom a rekonvalescentom. Myšlienku probiotík dal do popredia okolo roku 1900 nositeľ Nobelovej ceny Elie Metchnikoff, ktorý bol presvedčený, že dlhý a zdravý život bulharských farmárov je výsledkom konzumácie fermentovaných mliečnych výrobkov. Termín „probiotikum“ bol prvýkrát použitý v roku 1965 Lilly and Stillwellom, ktorí ho definovali ako „látku vylučovanú jedným mikroorganizmom, ktorá stimuluje rast iného mikroorganizmu“ [1, 2, 3].

V druhej polovici 20. storočia došlo k popularizácii tohto termínu a jeho definícia sa zmenila niekoľkokrát. Definícií existuje i dnes viacero. Medzi často citované patrí definícia z roku 1998, ktorú prijal odborný výbor expertov. Probiotiká sú v nej opísané ako „živé mikroorganizmy, ktoré pri podaní v primeranom množstve poskytujú hostiteľovi zdravotný prínos presahujúci základné výživové funkcie“ [2, 3].

Súhrnne sa probiotiká používajú na pomenovanie živých mikroorganizmov, ktoré sú spojené s priaznivými účinkami pre ľudí a zvieratá, čiže ak sú konzumované v primeranom množstve, poskytujú hostiteľovi zdravotné výhody. Toto znenie vychádza i z definície probiotík pre výživu a poľnohospodárstvo organizáciami OSN a Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO), ktoré píše: „Probiotiká sú živé mikroorganizmy, ktoré pri podávaní v dostatočnom množstve môžu hostiteľovi poskytnúť zdravotné výhody.“ Základná evolúcia probiotík je zhrnutá nižšie (viď. *Obrázok 1*). Najbežnejšie sa konzumujú ako doplnok stravy vo forme tabliet či sirupov alebo priamo ako súčasť niektorých potravín [4, 5].



Obrázok 1 Evolúcia probiotík [6]

2.1.1 Požadovaný charakter probiotík

Probiotiká účinkujú viacerými spôsobmi. Ako užitočné mikroorganizmy sa nachádzajú v črevách a súperia s patogénnymi mikroorganizmami o priestor na rast a vývoj. Hlavnou úlohou probiotík je predchádzať črevným infekciám. Existujú tri všeobecné mechanizmy účinku týchto prípravkov:

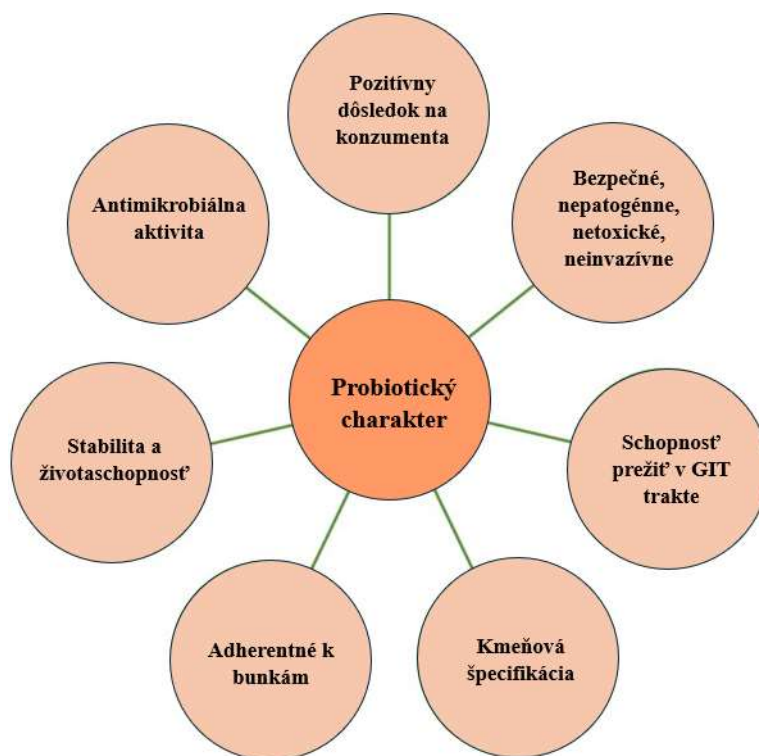
- antibakteriálne (proti patogénnym baktériám),
- posilňujúce črevnú sliznicu,
- imunomodulačné (napr. protizápalové) [7, 8].

Požiadavky na probiotiká sa môžu líšiť v závislosti od konkrétneho typu probiotík, ich účelu a prostredia, v ktorom sa používajú. Napriek tomu existujú určité základné body a charakteristiky, ktoré by kvalitné probiotiká mali spĺňať (viď. *Obrázok 2*). Tieto kritériá zahŕňajú v prvom rade prítomnosť živých mikroorganizmov. Probiotiká musia obsahovať živé baktérie či kvasinky, ktoré sú schopné prežiť v črevnom prostredí a vyvolať pozitívne účinky na zdravie hostiteľa. Taktiež musia mať dobré adhézne vlastnosti k epitelovým bunkám, čiže musia priľnúť k črevnej výstelke, aby mohli uplatniť svoje účinky. Platí, že čím vyššie sú ich adhézne vlastnosti, tým sa zvyšuje ich schopnosť kolonizovať a konkurovať patogénom [9, 10].

Výber správnych probiotických mikroorganizmov musí ďalej zahŕňať ich odolnosť voči gastrointestinálnym stavom. Účinné probiotiká dokážu totiž vydržať horšie podmienky, ako je prítomnosť žalúdočnej kyseliny a žlčových solí, čím sa zabezpečí ich prežitie v tráviacom systéme. Na dosiahnutie terapeutického účinku je taktiež nevyhnutné, aby produkt obsahoval adekvátne množstvo živých mikroorganizmov. Ich počet sa zvyčajne uvádza v miliardách CFU, čo je skratka pre anglický výraz „colony forming units“ (kolóniotvorné jednotky). Táto jednotka označuje množstvo mikroorganizmov schopných vytvoriť kolóniu na živnom médiu, a teda slúži ako ukazovateľ ich životaschopnosti a aktivity [10, 11].

Dostatočná produkcia antimikrobiálnych látok predstavuje ďalšie kritérium probiotického účinku. Probiotické organizmy produkujú látky ako bakteriocíny a organické kyseliny, ktoré inhibujú patogénne baktérie, čím zabraňujú infekciám. Môžu modulovať imunitnú odpoveď, čím sa posilňujú obranné mechanizmy hostiteľa proti infekciám a zápalovým ochoreniam. Výsledkom je zlepšenie vstrebávania živín a syntézy vitamínov, čím prispievajú k celkovému zdraviu. Vysoká produkcia antimikrobiálnych látok bola pozorovaná najmä u baktérií mliečneho kvasenia, ktoré sú bežne používané ako doplnky stravy [12, 13, 14].

Probiotiká musia byť bezpečné na užívanie, čo znamená, že nemajú negatívne účinky na zdravie, ak sú užívané v odporúčaných dávkach. Je vždy dôležité, aby sa užívali pod dohľadom odborníka, najmä u osôb s oslabeným imunitným systémom. Dôvodom je hlavne čoraz zvyšujúce sa množstvo mikroorganizmov rezistentných voči antibiotikám. Tiež by mali by mali preukázateľne pozitívne ovplyvňovať zdravie, ako napríklad podporou trávenia, posilnením imunity, prevenciou hnačiek, zlepšením rovnováhy črevnej mikroflóry alebo zmiernením príznakov niektorých ochorení, ako je syndróm dráždivého čreva (IBS). Tieto požiadavky zabezpečujú, že probiotiká budú účinné a bezpečné pri použití na zlepšenie zdravia a prevenciu rôznych zdravotných problémov [11, 14].



Obrázok 2 Charakteristické vlastnosti ideálneho probiotického mikroorganizmu [44]

2.2 Probiotické mikroorganizmy

Na základe definície probiotík stanovenej Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO) sa medzi probiotiká môžu zaradiť nielen tzv. „dobré“ baktérie, ale aj kvasinky či plesne. Medzi najčastejšie používané probiotické kultúry patria napríklad *Lactobacillus* (napr. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*) či *Bifidobacterium* (*B. animalis*, *B. breve*) [7, 14].

Dodnes sa medzi probiotiká radia hlavne už spomínané baktérie, ktoré z veľkej časti tvoria prirodzené prostredie tráviaceho traktu organizmov (90 %). To znamená, že väčšina súčasných probiotík patrí medzi prokaryoty. Najčastejšie sa ako probiotiká využívajú baktérie rodu *Bifidobacterium* a baktérie mliečneho kvasenia (BMK), ktoré tvoria rôznorodú skupinu Gram-pozitívnych baktérií s charakteristickými vlastnosťami [14].

Uplatňujú svoje priaznivé účinky prostredníctvom rôznych mechanizmov, vrátane znižovania črevného pH, znižovania kolonizácie a invázie patogénnych organizmov a modifikácie imunitnej odpovede hostiteľa. Okrem toho sú probiotické kmene schopné syntetizovať tráviace enzýmy (amyláza, lipáza, proteázy, pektinázy a endogluukanázy) a vitamíny A, B, E, C, K a ďalšie. Tiež produkujú metabolity, ako sú mastné kyseliny s krátkym reťazcom a histamín. Probiotické výhody spojené s jedným druhom alebo kmeňom nemusia nevyhnutne platiť pre iné [15, 17].

Vďaka rozsiahlym pozitívnym účinkom na organizmus si získali pozornosť v rámci rôznych biomedicínskych aplikácií. Zvyšujú súdržnosť črevnej bariéry a stimulujú produkciu mucínu, ktorý je životne dôležitý pre zdravie čriev [16].

Hoci sa výskum probiotík primárne sústreďuje na prokaryotické mikroorganizmy, v posledných rokoch rastie vedecký aj komerčný záujem o eukaryotické probiotiká. Klinické štúdie potvrdili ich účinnosť, pričom medzi najvýznamnejšie patrí *Saccharomyces cerevisiae*, kvasinka z rodu *Saccharomyces*, ktorá je v súčasnosti najčastejšie používaným eukaryotickým probiotikom. Názorné porovnanie ich základných vlastností a účinkov je uvedené nižšie

(viď. *Tabuľka 1*). Spektrum aplikácií probiotík sa súčasne rozširuje i výskumom iných kvasiniek či plesní ako potenciálne probiotických jedincov s rôznorodými fyziologickými vlastnosťami [17].

Tabuľka 1 Porovnanie základných charakteristík prokaryotických a eukaryotických probiotík

Charakteristika	Prokaryotické probiotiká (baktérie)	Eukaryotické probiotiká (kvasinky)
Typ organizmu	prokaryota (bez jadra)	eukaryota (s jadrom)
Príklady	<i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
Veľkosť a štruktúra	Malé (0,5–5 µm), jednoduchá štruktúra	Väčšie (5–40 µm), zložitejšia štruktúra
Metabolizmus a rast	Fermentujú sacharidy, proteíny, produkujú kyselinu mliečnu, SCFA	Vykonávajú fermentáciu, môžu zlepšovať trávenie a imunitný systém
Mechanizmus účinku	Konkurenčný rast, produkcia bakteriocínov, zlepšenie bariérovej funkcie	Stabilizácia mikroflóry, podpora imunitného systému
Bezpečnosť a vedľajšie účinky	Môže spôsobiť plynatosť, nadúvanie, v ojedinelých prípadoch infekcie	Zriedkavé, ale môže spôsobiť nadúvanie, interagovať s liekmi
Prírodný výskyt	Črevá, fermentované potraviny (jogurt, kefir)	fermentované potraviny, pivo, víno
Komplexnosť produktov	Kapsule, prášky, nápoje	Menej dostupné, ale aj vo forme doplnkov stravy

2.3 Probiotické baktérie a ich účinok

Ľudská mikroflóra pozostáva z množstva bakteriálnych buniek rôznych druhov, ktoré sa primárne nachádzajú na pokožke a slizniciach. Tieto baktérie vytvárajú komplexnú komunitu, ktorá sa viaže k povrchu a je obklopená ochrannou vrstvou. Črevný biofilm, nevyhnutný pre správnu výživu a zdravie človeka, sa začína formovať už krátko po narodení. Tráviaci trakt obsahuje najväčšie množstvo baktérií v tele, pričom ich zloženie, počet a rast ovplyvňujú faktory ako životný štýl, stravovacie návyky a genetická predispozícia jednotlivca. Každý probiotický kmeň má špecifické vlastnosti, a preto je nevyhnutné individuálne preukázať jeho zdravotné prínosy. Výsledky klinických štúdií na ľuďoch ukázali, že určité probiotické kmene môžu pomôcť predchádzať alebo skrátiť trvanie hnačky a infekcií dýchacích ciest. Okrem toho prispievajú k zníženiu rizika tráviacich ťažkostí u predčasne narodených detí, zmierneniu príznakov laktózovej intolerancie, liečbe potravinových alergií a odstraňovaniu toxínov a patogénov z potravy alebo gastrointestinálneho traktu [18, 19, 20].

Baktérie ako *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Propionibacterium* a *Escherichia coli* patria medzi základné rody, ktoré tvoria komunitu črevných baktérií [20].

Prehľad probiotických baktérií využívaných v priemyselnej výrobe je uvedený nižšie (viď. *Tabuľka 2*) [21].

Tabuľka 2 Prehľad probiotických baktérií využívaných v rámci priemyselnej výroby

Bakteriálny rod	Jednotlivé druhy
Rod <i>Lactobacillus</i>	<i>L.reuteri</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.bulgaricus</i> , <i>L.lactis</i> , <i>L.helveticus</i> , <i>L.fermentum</i> , <i>L.plantanum</i> , <i>L.salivarius</i>
Rod <i>Bifidobacterium</i>	<i>B.animalis</i> , <i>B.animalis subsp. lactis</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>B.breve</i> , <i>B.longum</i>
Ostatné baktérie mliečneho kvasenia	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>S. sanguis</i>

Najbežnejšie využívané probiotiká sú predovšetkým z kmeňov baktérií mliečneho kvasenia, ktorých druhy sú zobrazené i vyššie. Ide o skupinu grampozitívnych, fakultatívne anaeróbných alebo striktne anaeróbných baktérií [25].

Metabolickým produktom baktérií mliečneho kvasenia je kyselina mliečna, prípadne oxid uhličitý či za špecifických podmienok etanol. Podľa vzniku produktov sa delí mliečne kvasenie na homofermentatívne, kde sa zo sacharidov odbúrava kyselina mliečna ako hlavný produkt. Druhým typom fermentácie je heterofermentatívne kvasenie, ktoré sa vyskytuje pri obmedzenom prísune glukózy, v prítomnosti pentóz, alebo keď sa mikroorganizmy adaptujú na náročnejšie podmienky. Vzniká laktát, oxid uhličitý alebo etanol [18].

Baktérie mliečneho kvasenia majú veľký význam hlavne v potravinárskom priemysle, kde sú využívané na produkciu mliečnych výrobkov (jogurty, syry), či pri produkcii kvasných potravín (kyslá kapusta a fermentované nápoje). Výhodou je ich nepatogénnosť a ľahká manipulácia [11, 18].

Baktérie mliečneho kvasenia však nie sú jedinými baktériami, ktoré sa v súčasnosti používajú ako probiotiká z rady prokaryot. Využívajú sa aj iné rody ako *Bacillus*, *Clostridium butyricum* či *Propionibacterium*. Ich priemyselné využitie je však obmedzené kvôli riziku patogenity, náročnej kontrole výroby a konkurencii bezpečnejších probiotických baktérií [22].

2.3.1 Rod *Bifidobacterium*

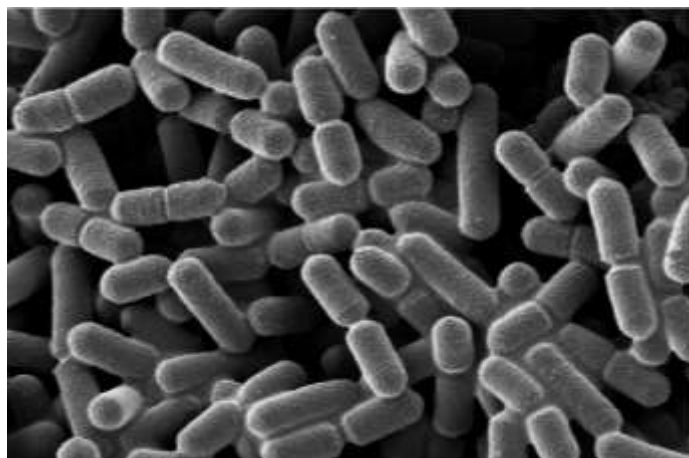
Rod *Bifidobacterium* patrí medzi grampozitívne, anaeróbne, heterotrofné baktérie z kmeňa *Actinobacteria*. Majú tyčinkovitý alebo rozvetvený tvar (často v tvare Y, V alebo palisád), ktorý je charakteristický pre tento rod (vid'. *Obrázok 3*). Ich bunková stena je tvorená peptidoglykánom. Neprodukujú spóry a nevykazujú pohyb, keďže im chýbajú bičíky. Ide o prísne anaeróbne organizmy s fermentatívnym metabolizmom, pričom hlavným produktom metabolizmu je kyselina octová a kyselina mliečna v pomere 2:3 (bez produkcie plynov). Sú schopné fermentovať široké spektrum sacharidov vrátane oligosacharidov z materského mlieka, ktoré zohrávajú významnú úlohu pri osídľovaní čreva novorodencov. Konkrétne je najbežnejšou baktériou v črevnom mikrobióme dojčiat. Ich prítomnosť v ľudskom tráviacom trakte je zvýhodnená schopnosťou využívať prebiotiká, ako sú fruktooligosacharidy (FOS) a galaktooligosacharidy (GOS). Tieto látky sú fermentované na metabolity, ktoré podporujú zdravé črevné prostredie a môžu ovplyvňovať mikrobiálne zloženie čreva. Optimálne teplotné hodnoty pre tieto baktérie sú v rozmedzí 36–38 °C a hodnoty pH sa pohybujú medzi 6,0–7,0. Medzi najdôležitejšie probiotické druhy patria *B.bifidum*, *B.breve* a *B. longum*. Využitie nachádzajú často vo výrobe mliečnych produktov, ako sú syry a jogurty [18, 23, 24, 25].



Obrázok 3 Rod *Bifidobacterium* [26]

2.3.2 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* predstavuje pomerne rozsiahlu skupinu bakteriálnych jedincov patriacich pod baktérie mliečného kvasenia. Ich samotný názov pochádza z gréckeho slova „*lac*“, čo v preklade znamená mlieko. Dodnes bolo identifikovaných vyše 250 druhov rodiny *Lactobacillaceae*, vyznačujú sa vysokou genotypovou, fenotypovou a ekologickou diverzitou. Je to rod tyčinkovitých, gram pozitívnych, nesporulujúcich, fakultatívne anaeróbných baktérií z kmeňa *Firmicutes*. Vďaka svojmu tyčinkovitému tvaru sa charakteristicky spájajú do reťazcov (viď. Obrázok 4) [27, 28].



Obrázok 4 Rod *Lactobacillus* [29]

Druhy *Lactobacillus* možno rozdeliť do skupín na základe ich metabolizmu. Obligátne homofermentatívna skupina fermentuje sacharidy za vzniku kyseliny mliečnej ako hlavného vedľajšieho produktu (napr. *L. acidophilus* a *L. salivarius*), zatiaľ čo fakultatívne heterofermentatívna skupina za určitých podmienok alebo s určitými substrátmi fermentuje sacharidy za vzniku kyseliny mliečnej, etanolu, kyseliny octovej a oxidu uhličitého ako vedľajších produktov (napr. skupina *L. fermentative plantarum*) [14, 27].

Vďaka produkcii kyseliny mliečnej ako hlavného vedľajšieho produktu je ich optimálne prostredie pre rast kyslé, s pH v rozmedzí 5,0 – 6,0. To zodpovedá podmienkam tráviaceho traktu, v ktorom majú dominantné postavenie a inhibujú rast patogénnych mikroorganizmov. Okrem gastrointestinálneho traktu sa vyskytujú hlavne v ústnej dutine a vagíne, kde prispievajú

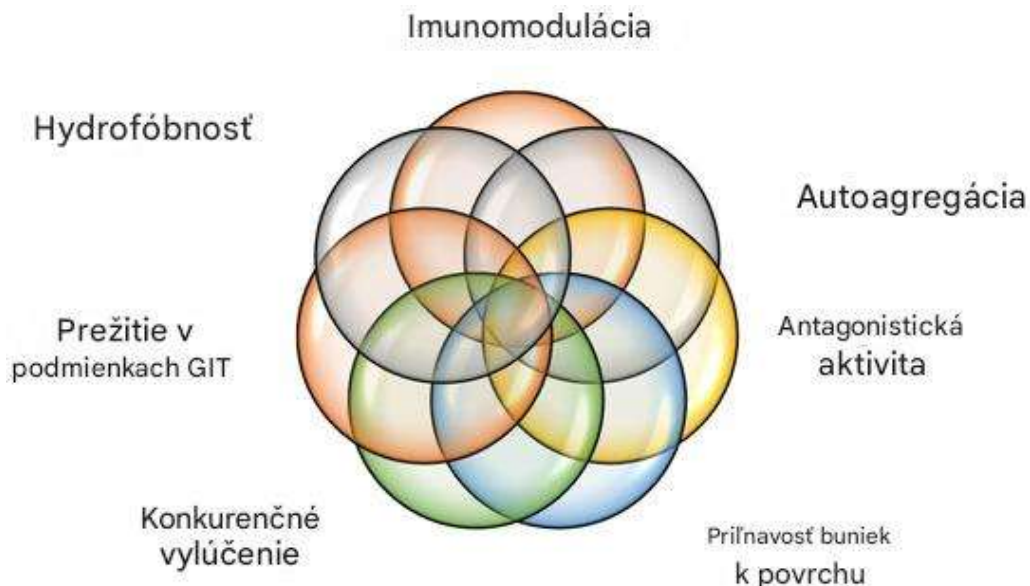
k udržaniu zdravého mikrobiálneho prostredia. Nachádzajú sa vo fermentovaných potravinách, ako sú jogurty, acidofilné mlieko a kyslá kapusta [28].

2.4 Probiotické kvasinky

Kvasinky patria medzi významných producentov v biotechnologických a priemyselných procesoch, kde sa využívajú na výrobu fermentovaných potravín, ako aj na produkciu enzýmov, kyselín a vitamínov. Zásadne sa líšia od baktérií, keďže patria do ríše *Fungi*, s rozmermi približne 10krát väčšími ako baktérie. Typická veľkosť kvasinkových buniek sa pohybuje v rozmedzí 5 – 10 mikrometrov v priemere. Ide o jednobunkové eukaryotické huby patriace do kmeňov *Ascomycota* (napr. *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida*) a *Basidiomycota* (napr. *Cryptococcus*, *Rhodotorula*) a môžu sa rozmnožovať pohlavne aj nepohlavne. Ich morfológia im umožňuje pôsobiť ako prekážka proti patogénnym baktériám, čím sa zvyšuje ich potenciál stať sa probiotickým kandidátom [30, 31, 32].

Kvasinky s probiotickým potenciálom sú čoraz populárnejšou skupinou mikroorganizmov, ktoré si v posledných rokoch získali pozornosť pre svoje potenciálne zdravotné benefity. Ľudský mikrobióm tvoria totiž nielen rôzne baktérie, ale aj huby a archeálne organizmy, ktoré spolu vytvárajú komplexný ekosystém. Zastúpenie kvasiniek v ľudskom mikrobióme predstavuje pritom menej ako 1 % z celkového množstva živých buniek. Avšak, prítomnosť húb v črevnom prostredí naznačuje, že niektoré druhy môžu byť pre ľudského hostiteľa prospešné. Ich pozitívny vplyv sa prejavuje reguláciou imunitnej rovnováhy alebo zabezpečením mikrobiálnej stability v čreve prostredníctvom špecifických interakcií [30, 32].

Jednotlivé kvasinky majú odlišné biologické funkcie a mechanizmy, ktoré môžu poskytnúť jedinečné zdravotné výhody (viď. *Obrázok 5*). Keďže prirodzene vykazujú odolnosť voči antibakteriálnym antibiotikám, čo je charakteristické pre huby, táto schopnosť je jedným z významných faktorov pre ich využitie ako probiotiká. Aby probiotiká účinne podporovali zdravie hostiteľa, musia zostať životaschopné, čím pomáhajú udržiavať symbiotickú rovnováhu v tráviacom trakte [31].



Obrázok 5 Názorný súhrn hlavných mechanizmov účinku kvasinkových probiotik. [69]

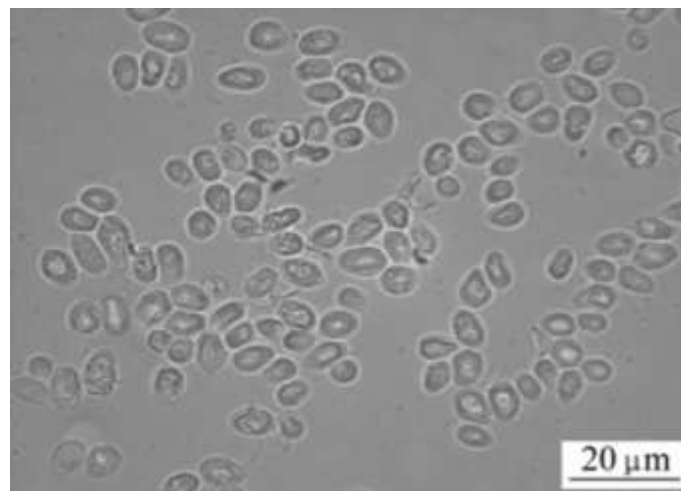
Doposiaľ je *Saccharomyces cerevisiae* jediný patentovaný kmeň kvasiniek určený na humánne použitie a je intenzívne skúmaný pre svoje probiotické účinky. Avšak podľa

nových štúdií majú aj iné kvasinkové kmene potenciálne probiotické vlastnosti. Ide o kvasinky z rodov *Pichia*, *Yarrowia*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* a ďalších, ktoré vykazujú potenciálne prospešné vlastnosti ako schopnosť odolávať podmienkam GIT, tolerovať osmotický stres či dokážu priľnúť k epitelovým bunkám. Produkujú prchavé organické zlúčeniny (VOC), mykocíny i antimikrobiálne látky, ktoré pôsobia proti škodlivým mikroorganizmom, ako sú niektoré druhy baktérií a húb [31, 32, 33].

Vďaka svojim antimikrobiálnym, antioxidantným, protirakovinovým a imunomodulačným účinkom, ako aj schopnosti znižovať hladinu cholesterolu, majú probiotické kvasinky veľký potenciál na využitie v oblasti bioterapie [33].

2.4.1 Rod *Saccharomyces*

Kvasinky rodu *Saccharomyces* sú eukaryotické huby triedy *Saccharomycetes*, ktoré majú zvyčajne oválny alebo guľovitý tvar (viď. Obrázok 6). Bunky sa nachádzajú jednotlivito alebo klastroch či pseudohýfach, vznikajúcich, keď sa bunky nerozdelia úplne, ale zostávajú pripojené, čo môže byť spojené so stresovými podmienkami alebo určitými fázami rastu. Rozmnožujú sa prevažne pučaním, v menej ideálnych podmienkach môžu tvoriť spóry [34, 35].



Obrázok 6 *Saccharomyces cerevisiae* pod mikroskopom [38]

Medzi najvyužívanejšie druhy tohto kmeňa patria *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Obe sa vyznačujú schopnosťou fermentovať glukózu, sacharózu, maltózu, galaktózu a tiež trisacharid rafinózu. Na druhej strane nie sú schopné metabolizovať laktózu, čo ich odlišuje od niektorých iných mikroorganizmov využívaných v potravinárstve. Táto vlastnosť zohráva už po stáročia dôležitú úlohu pri využití *Saccharomyces cerevisiae* k výrobe piva, vína, pekárenských výrobkov a ďalších fermentovaných produktov [34, 36].

Má významné postavenie aj v biotechnológii a vedeckom výskume. Je považovaná za modelový organizmus na štúdium eukaryotických buniek a genetiky. Vďaka rozsiahlym výskumom jej genetického zloženia a fyziologických procesov sa stala modelovým organizmom pre rôzne vedecké aplikácie, vrátane biomedicíny, farmácie a priemyselnej biotechnológie [33].

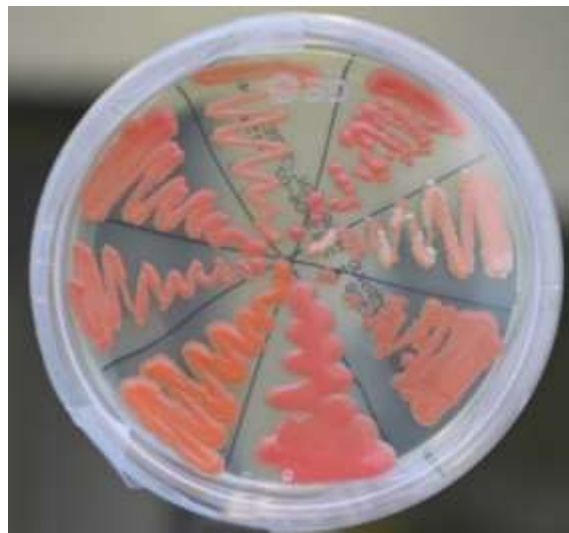
Saccharomyces boulardii bola v posledných desaťročiach intenzívne skúmaná z hľadiska jej probiotických vlastností. Táto kvasinka, ktorá je variantom *Saccharomyces cerevisiae*, je dodnes jediným uznaným a charakterizovaným kvasinkovým probiotikom. Ide o nepatogénnu kvasinku, ktorá bola izolovaná z liči v Indonézii a ktorá rastie pri nezvyčajne

vysokej teplote 37 °C. Je odolná voči žalúdočnej kyseline a proteolýze, inhibuje rast patogénnych baktérií, ako sú *Clostridium difficile*, *Salmonella* či *Escherichia coli* a má protizápalové účinky. Nie je súčasťou črevnej mikroflóry, teda neosídľuje črevo a jej koncentrácia po ukončení podávania klesá. V mnohých krajinách sa využíva na prevenciu a liečbu hnačky, najmä pri tráviacich ťažkostiach súvisiacich s podávaním antimikrobiálnych látok. Je komerčne dostupná ako lyofilizovaný životaschopný doplnok stravy [34, 35, 37].

2.4.2 Rod *Rhodotorula*

Kvasinky tohto rodu patria do čeľade *Rhodotorulaceae* a vďaka svojej nenáročnosti a schopnosti adaptovať sa na rozličné pH a teplotu je ich možné izolovať z viacerých prostredí, ako sú pôda, voda, vzduch, odpadové vody, potraviny, povrchy rastlín či koža a sliznice živočíchov aj ľudí. Dokážu prežiť aj v extrémnych podmienkach, napríklad v termálnych prameňoch, polárnych oblastiach alebo v prostredí s vysokým obsahom solí či kyselín. Medzi známe a stále skúmané druhy patria *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula toruloids*, *Rhodotorula kratochvilovae* a mnohé ďalšie. Ide o jednobunkové, aeróbne, nepohlavné kvasinky, ktoré sa rozmnožujú pučaním, no niektoré druhy sú schopné tvoriť pseudomycélium. Ich bunky sa vyznačujú guľovitým, elipsoidným či predĺženým tvarom [36, 39, 40].

Vyznačujú sa charakteristickou ružovou, oranžovou alebo červenou farbou vďaka produkcii karotenoidných pigmentov, čo sú lipofilné farbivá, ktoré nachádzajú uplatnenie v potravinárskom či farmaceutickom priemysle. Medzi najbežnejšie produkované pigmenty patria β -karotén, astaxantín, torulén či torularhodín. Pomer získavaných pigmentov závisí na prítomnosti kyslíka, a tiež na spôsobe a podmienkach kultivácie. Na agare tvoria kolónie ružovej, lososovej až koralovo červenej farby (viď. *Obrázok 7*). Dokážu metabolizovať široké spektrum sacharidov, alkoholy i organické kyseliny, no nie sú schopné fermentácie. Patria medzi oleogénne kvasinky vyznačujúce sa tým, že až 50 % ich sušiny dokážu tvoriť lipidy. Karotenoidy sú z tohto dôvodu nerozpustné vo vode, ale rozpustné v tukoch [39, 40, 41, 42].



Obrázok 7 Kolónie kvasinky *Rhodotorula* na agare [42]

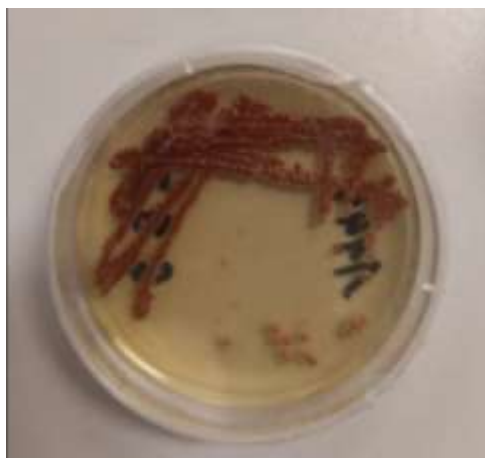
V biotechnológii sa využíva na produkciu už spomínaných karotenoidov, lipidov i biopolymérov. *Rhodotorula* má určité vlastnosti, ktoré naznačujú jej potenciál byť probiotickou kvasinkou, najmä vďaka svojím antioxidantným a imunomodulačným schopnostiam. Obyčajne je jej zastúpenie v ľudskom tele regulované, keďže jej optimálna

rastová teplota je nižšia ako teplota ľudského tela. Viaceré štúdie však uvádzajú, že v prípade premnoženia tohto druhu u zdravého jedinca, dokáže telo z ich prítomnosti i profitovať v dôsledku produkcie užitočných živín, ako sú proteíny, lipidy, folát a karotenoidy. Ďalej možno predpokladať probiotický účinok vďaka regulácií množenia patogénnych baktérií a neutralizáciou alebo zničením ich toxínov. Avšak všetky štúdie sa zhodujú na tom, že vzhľadom na potenciálnu patogenitu v niektorých prípadoch, najmä u imunokompromitovaných osôb, je potrebný ďalší výskum na potvrdenie jej bezpečnosti a účinnosti ako probiotického organizmu [36, 42, 43].

2.4.3 Rod *Metschnikowia*

Rod *Metschnikowia* patrí medzi kvasinky z čeľade *Metschnikowiaceae* a vyznačuje sa širokou ekologickou rozmanitosťou. Vyskytujú sa v rôznych prírodných prostrediach, pričom najčastejšie osídľujú kvety, ovocie a rôzne rastlinné tkanivá. Okrem toho sú často prítomné aj v tráviacom trakte či na povrchu hmyzu. Ich typickým morfológickým znakom je guľovitý až eliptický tvar buniek a mnohostranné pučanie. Niektoré druhy sú schopné vytvárať rudimentárne pseudomycélium, čo im umožňuje lepšiu adaptáciu na rozmanité podmienky prostredia [36, 45].

Rod *Metschnikowia* podľa dostupných štúdií obsahuje 85 rôznych druhov. Niektoré druhy sa prirodzene vyskytujú vo voľnej prírode, čo umožňuje ich rozdelenie na vodné a suchozemské druhy. Medzi významné druhy patrí *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia andauensis*, *Metschnikowia sinensis* či *Metschnikowia fructicola* a mnoho ďalších. Všetky majú značný potenciál využitia v rôznych oblastiach, pričom ich vlastnosti naznačujú široké možnosti aplikácie v biotechnológii, potravinárstve či zdravotníctve. Niektoré druhy totiž dokážu produkovať lipidy, enzýmy a ďalšie priemyselne využiteľné zlúčeniny. Predmetom rozsiahleho skúmania je *M. pulcherrima*, ktorá sa už roky využíva v potravinárskych aplikáciách, hlavne vo vinárskom priemysle. Záujem v biotechnologickom priemysle je spôsobený jej schopnosťou produkovať pigment pulcherrimín, ktorý má antimikrobiálne účinky. Tento pigment účinne pôsobí proti baktériám, kvasinkám a plesniam a eliminuje patogény prírodnou cestou. Vyznačuje sa charakteristickou tmavo červenou až hnedou farbou (viď. Obrázok 8). Výroba pulcherrimínu je ovplyvnená dostupnosťou kyslíka a množstvom voľného železa v kultivačnom médiu. Ak je koncentrácia železa vyššia ako 0,005 %, pigment sa produkuje priamo v bunkách, zatiaľ čo pri nižších koncentráciách železa sa pigment uvoľňuje do prostredia [45, 46, 47, 48].



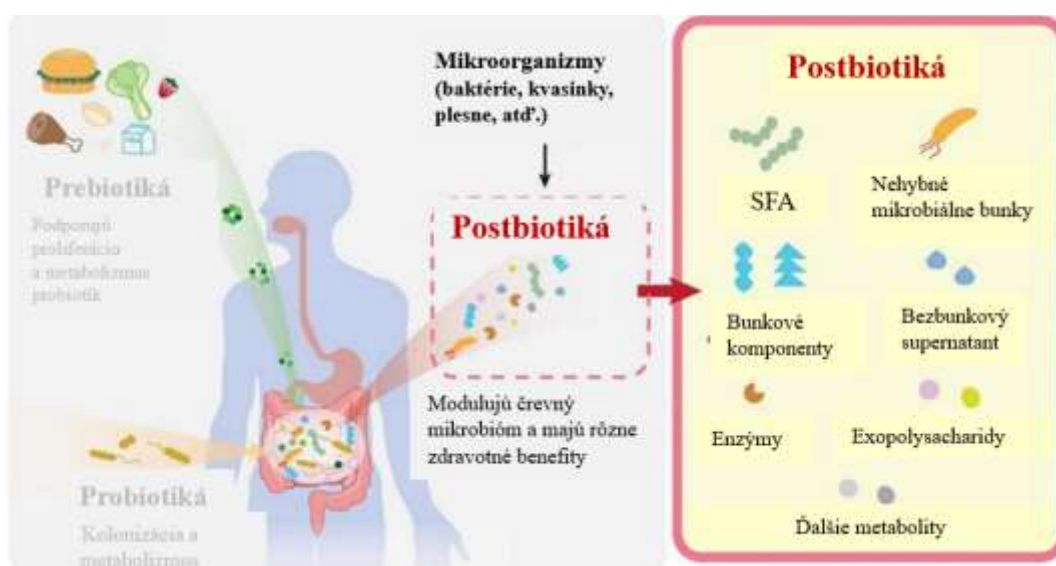
Obrázok 8 Produkcia kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* na agare

Medzi hlavné dôvody ich rastúceho významu patrí ich probiotický potenciál. Počiatočné testovanie vybraných kmeňov rodu *Metschnikowia* ako potenciálnych probiotík sa sústreďuje na ich schopnosť prežiť v nepriaznivých podmienkach gastrointestinálneho traktu (GIT), ktoré predstavuje prvú ochrannú bariéru tráviaceho systému. Tento rod prirodzene vykazuje probiotické vlastnosti, vrátane schopnosti regulovať rast iných mikroorganizmov aj v nehostinnom prostredí. Súčasné štúdie naznačujú, že *Metschnikowia* disponujú základnými probiotickými vlastnosťami, ako sú schopnosť prežívať v GIT, konkurencieschopná eliminácia patogénov a odolnosť voči žlčovým soľam. Okrem toho niektoré druhy produkujú bioaktívne zlúčeniny s antimikrobiálnymi účinkami, čo zvyšuje ich potenciálne využitie v potravinárskom, zdravotníckom a biotechnologickom priemysle. Napriek týmto sľubným vlastnostiam si využitie *Metschnikowia* ako probiotika vyžaduje ďalší výskum zameraný na jeho bezpečnosť a účinnosť v komerčných aplikáciách [48, 49].

2.5 Postbiotiká

Postbiotikum je termín odvodený z gréčtiny pre „post“, čo znamená po a „bios“, čiže zmysel života. Postbiotiká, označované ako metabolity probiotík, patria medzi biologicky aktívne látky, vznikajúce z metabolických procesov probiotických mikroorganizmov, medzi ktoré patria baktérie, kvasinky a iné mikroorganizmy. Tieto zlúčeniny ponúkajú celý rad zdravotných výhod, ako sú posilnenie imunitného systému, pomoc pri trávení alebo zmiernenie zápalu. Definujú sa tiež ako rozpustné faktory vylučované živými bunkami alebo uvoľňované bunkovou lýzou [50, 54].

Na rozdiel od probiotík, ktoré pozostávajú zo živých mikroorganizmov, postbiotiká sú buď neaktívne mikroorganizmy alebo ich metabolity, ako sú bakteriocíny, peptidy, kyseliny, enzýmy a polysacharidy. Vyznačujú sa tým, že môžu pomáhať pri podpore zdravia bez toho, aby museli byť nažive. V dôsledku toho sa považujú za bezpečnejšie v prípadoch, keď probiotické mikroorganizmy nemôžu prežiť alebo sa usadiť v tráviacom systéme. Charakteristické sú obsahom rôznych bioaktívnych molekúl, ako sú krátkoreťazcové mastné kyseliny (napr. butyrát, acetát, propionát), enzýmy a peptidy, bakteriocíny (antimikrobiálne proteíny), exopolysacharidy, vitamíny (napr. B-komplex, vitamín K) či antioxidanty (viď. Obrázok 9) [50, 51, 52].



Obrázok 9 Charakter príjmu biotík so zameraním na príklady postbiotických metabolitov v GIT [56]

Dve bežne spomínané kategórie postbiotík sú paraprobiotiká a „Fermented Food Ingredients“ (FIF), teda prísady fermentovaných potravín. Paraprobiotiká alebo inaktivované probiotiká, niekedy uvádzané i ako ghost-probiotiká, sú v súčasnosti často definované ako „neživotaschopné alebo inaktivované mikrobiálne bunky, ktoré, ak sú podávané v dostatočnom množstve, poskytujú hostiteľovi výhody“. Na druhej strane, FIF predstavujú počiatočnú dojčenskú výživu, ktorá bola fermentovaná baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu alebo inými baktériami a vo väčšine prípadov neobsahujú životaschopné baktérie [52, 55].

Tieto metabolity sa bežne vyskytujú v doplnkoch stravy a funkčných potravinách. Zohrávajú dôležitú úlohu najmä v dojčenskom veku, kedy ovplyvňujú správny rast a celkové zdravie imunitného i tráviaceho systému dieťaťa. Vyskytujú sa totiž prirodzene vo fermentovaných produktoch. Pri výrobe dojčenskej výživy na báze kravského mlieka sa využíva fermentácia baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu (napr. spomínané rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*), ktoré sú následne inaktivované tepelnou úpravou. Ich metabolity potom fungujú ako postbiotiká, ktoré môžu podporovať trávenie a pomáhať pri zmiernení gastrointestinálnych ťažkostí, ako sú dojčenské koliky či reflux. Na základe štúdií sa uvádza, že používanie postbiotík by mohlo byť atraktívnou alternatívou iných biotík u kriticky chorých pacientov, malých detí a predčasne narodených novorodencov [52, 53, 54].

Postbiotiká sú čoraz populárnejšie v oblasti výživy, medicíny a kozmetiky, pretože ponúkajú inovatívny spôsob, ako podporiť zdravie bez nutnosti podávania živých baktérií, keďže samotné majú antioxidantné, antimikrobiálne a imunomodulačné účinky. Ide o možný alternatívny spôsob užívania biotík v prípade, že pacient užíva antibiotiká. Sú schopné pomôcť odstrániť rezistenciu antibiotík tým, že dokážu zvýšiť účinnosť prospešných mikroorganizmov alebo ich transformovať na funkčné zložky. Zároveň eliminujú problém s kolonizáciou a stabilitou živých mikroorganizmov v produktoch, čím umožňujú jednoduchšie a efektívnejšie dodanie bioaktívnych látok do čreva a vyznačujú sa zníženou citlivosťou na teplotu, pH a skladovacie podmienky. Zlepšujú tiež trvanlivosť, uľahčujú balenie a distribúciu. Ich využitie je obzvlášť výhodné v podmienkach, kde je náročné zabezpečiť optimálne výrobné a skladovacie podmienky, napríklad v rozvojových krajinách [52, 55].

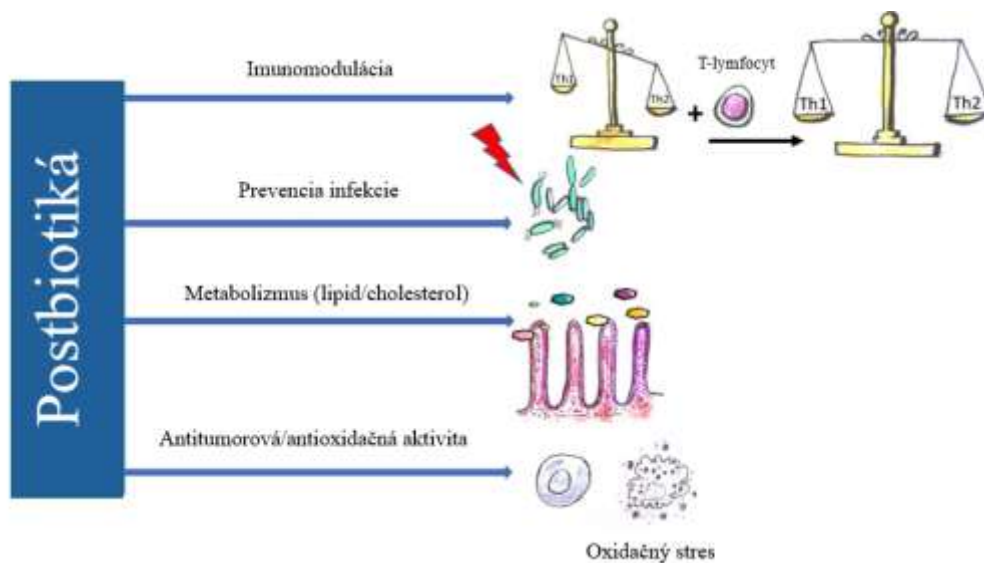
2.5.1 Vplyv postbiotík na črevnú mikroflóru

Postbiotiká zohrávajú kľúčovú úlohu v regulácii interakcií medzi hostiteľom a jeho črevnou mikroflórou. Vďaka bioaktívnym zlúčeninám, ktoré obsahujú, môžu pozitívne ovplyvňovať zloženie črevnej mikroflóry, funkciu črevnej bariéry a imunitnú odpoveď hostiteľa. Cieleny mechanizmus účinku postbiotík sa dá kategorizovať obsahom spomínaných rôznych bioaktívnych molekúl (napríklad SFA, organické kyseliny, enzýmy či bakteriocíny) a rozdeliť sa na niekoľko benefitov:

- Moduláciu črevnej mikroflóry
- Posilnenie črevnej bariéry
- Imunomodulačné účinky
- Ochrana pred patogénmi
- Metabolické a neurologické benefity [52, 54].

Primárny spôsob účinku postbiotík zahŕňa úpravu črevného prostredia, čím sa zlepšuje zloženie črevnej mikroflóry. Krátkoreťazcové mastné kyseliny (SFA), ako sú kyselina maslová, octová a propiónová, slúžia ako zdroj energie pre črevné bunky a zároveň podporujú rast prospešných mikroorganizmov, ako sú *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Ich prítomnosť prispieva k posilneniu črevnej bariéry, redukcii zápalových procesov a zvýšenej rezistencii voči

kolonizácii patogénmi. Exopolysacharidy a proteíny z postbiotík môžu zasa stimulovať tvorbu hlienu a ochranných vrstiev črevnej sliznice, čím bránia prieniku toxínov a patogénov do krvného obehu. Vytvárajú nepriaznivé prostredie pre patogény tým, že menia pH čreva a produkujú bakteriocíny – látky s antimikrobiálnym účinkom, ktoré blokujú adhéziu patogénov, ako sú *Escherichia coli*, *Salmonella* či *Clostridium perfringens*, na črevné bunky. Niektoré metabolity, ako sú lipopolysacharidy a fragmenty bunkových stien nepatogénnych baktérií, môžu pôsobiť ako signálne molekuly a stimulovať vrodenú imunitu. Podporujú rovnováhu medzi Th1 a Th2 imunitnou odpoveďou, čím môžu pomôcť pri autoimunitných ochoreniach a alergiách (viď. Obrázok 10). Z pohľadu neurológie taktiež existujú dôkazy, že postbiotiká môžu ovplyvňovať črevno-mozgovú os prostredníctvom neurotransmiterov (napr. serotonínu), čím podporujú duševné zdravie a znižujú úzkosť a depresiu [54, 57, 58, 59].



Obrázok 10 Príklad mechanizmov účinku charakteristických pre postbiotiká [59]

Produkcia týchto metabolitov zahŕňa kontrolované fermentačné procesy, po ktorých nasledujú techniky ako enzymatická hydrolýza, tepelné spracovanie a extrakcia, ktoré zabezpečujú izoláciu prospešných zlúčenín pri zachovaní ich biologickej účinnosti. Zloženie postbiotického produktu, a tým aj reakcia hostiteľa na jeho konzumáciu, je úzko spojené s celým procesom výroby potravín. Faktory, ako sú výber mikroorganizmov, podmienky fermentácie a následné spracovanie, ovplyvňujú výsledné bioaktívne zložky a ich biologickú dostupnosť, čo má priamy dopad na zdravotné účinky postbiotík. Napríklad niektoré proteíny pochádzajúce z baktérií, ktoré sú inaktivované teplom, môžu denaturovať, zatiaľ čo ožiarenie môže spôsobiť mutácie v nukleových kyselinách [52, 59].

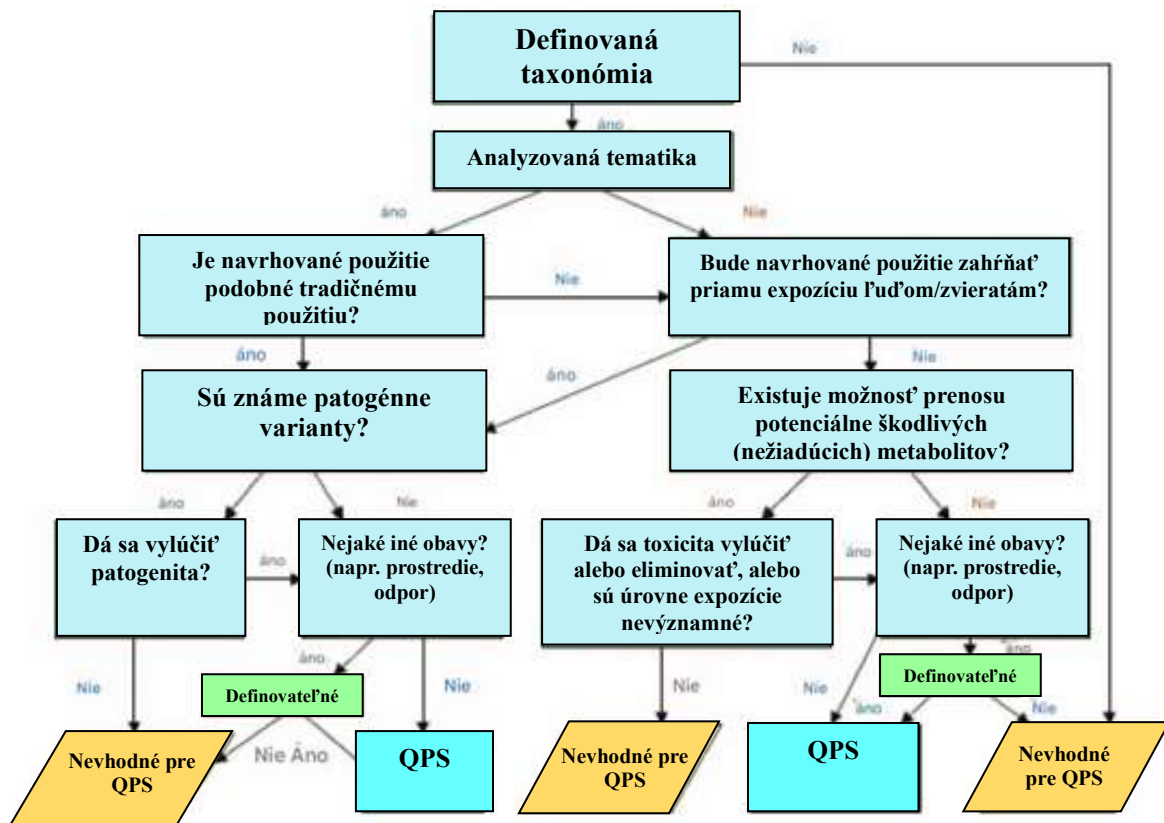
2.6 Bezpečnosť probiotických prípravkov

Bezpečnosť probiotických prípravkov je kľúčovým faktorom pri ich vývoji a používaní v klinickej praxi aj v potravinárskom priemysle. Probiotiká sú klasifikované ako bezpečné vďaka ich dlhšej histórii používania a minimálnemu výskytu zdravotných problémov. V prípadoch, keď sa vyskytli infekcie, išlo väčšinou o jedincov so zvýšenou predispozíciou na konkrétne ochorenia či boli podané dojčatám a novorodencom. Hodnotenie bezpečnosti musí brať do úvahy povahu používaného mikróbu, spôsob podávania, úroveň expozície, zdravotný stav používateľov a fyziologické funkcie, ktoré majú vykonávať [60, 62].

Presná genetická identifikácia mikroorganizmov je nevyhnutná na zabezpečenie bezpečnosti a predchádzanie kontaminácii patogénnymi druhmi. Napríklad probiotické baktérie nesmú obsahovať gény spojené s virulenciou alebo rezistenciou na antibiotiká, ktoré by mohli prispieť k šíreniu rezistencie. V tomto prípade majú výhodu kvasinkové probiotiká, keďže sú prirodzene odolné voči antibiotikám, vďaka čomu sú vhodné na použitie spolu s antibiotickou liečbou bez narušenia črevnej mikroflóry. Súčasťou bezpečnostného hodnotenia je ďalej aj testovanie hemolytickej aktivity, ktorá by mohla viesť k poškodeniu červených krviniek [60, 61, 65].

Napriek ich prevažne priaznivému bezpečnostnému profilu existujú určité riziká spojené s používaním probiotík. V zriedkavých prípadoch môžu u pacientov s oslabenou imunitou spôsobiť systémové infekcie, najmä pri podávaní vysokých dávok. Množstvo probiotík sa vyjadruje v jednotkách tvoriacich kolónie (CFU), ktoré označujú počet životaschopných mikroorganizmov. Na obaloch produktov sa tieto hodnoty uvádzajú napríklad ako 1×10^9 (1 miliarda CFU) alebo 1×10^{10} (10 miliárd CFU). Bežné probiotické doplnky obsahujú dávky v rozmedzí 1 až 10 miliárd CFU, pričom niektoré prípravky môžu dosahovať 50 miliárd CFU a viac. Niektoré kmene môžu preniknúť črevnou bariérou do krvného obehu a spôsobiť nežiadúce reakcie. Existujú zaznamenané prípady, ktoré poukazujú na spojitost medzi užívaním probiotík a výskytom fungémie alebo bakteriémie, ale presný súvis týchto infekcií spojený s užívaním probiotík zatiaľ nebol dostatočne preskúmaný. Ďalším potenciálnym rizikom je genetický prenos rezistencie na antibiotiká, keďže niektoré probiotické mikroorganizmy môžu obsahovať mobilné genetické elementy prenášajúce rezistenciu do črevnej mikrobioty [60, 62].

Bezpečnosť a účinnosť probiotických organizmov sú však často podporované iba obmedzeným množstvom výskumov. Niektoré z nich sú považované za bezpečné len na základe ich prirodzeného výskytu v organizme bez preukázaných negatívnych vplyvov. Z hľadiska regulácie prechádzajú prísny hodnotením bezpečnosti. V USA mnohé probiotické mikroorganizmy spadajú pod kategóriu GRAS (Generally Recognized as Safe). V Európe sú zdravotné tvrdenia o probiotikách prísne kontrolované, pričom ich pozitívne účinky na výživu a fyziológiu musia byť vedecky dokázané. Európsky úrad pre bezpečnosť potravín hodnotí probiotiká na základe systému QPS (Qualified Presumption of Safety), pričom sa prihliada na ich históriu bezpečného používania (viď. *Obrázok 11*). Pred uvedením na trh musia probiotiká prejsť preklinickými a klinickými štúdiami, ktoré hodnotia ich bezpečnostný profil a účinnosť [60, 62, 63].



Obrázok 11 Všeobecná schéma hodnotenia vhodných mikroorganizmov pre QPS [60]

Po schválení probiotických prípravkov je dôležité monitorovať ich bezpečnosť v reálnej populácii prostredníctvom post-marketingového dohľadu. Niektoré štúdie naznačujú, že dlhodobé používanie probiotík môže viesť k systémovým zmenám črevnej mikroflóry, ktorých dôsledky ešte nie sú úplne preskúmané. Celkovo možno konštatovať, že hoci sú probiotické prípravky vo väčšine prípadov bezpečné a prínosné, ich používanie si stále vyžaduje dôkladné testovanie a sledovanie možných rizík. V prípade vývoja nových probiotických kmeňov sa musí brať v úvahu otázka ich bezpečnosti, účinnosti a pomeru rizika a prínosu. Je dôležité dbať na kvalitu kmeňa, jeho pôvod a aktuálne vedecké dôkazy [61, 62, 64].

2.7 Formy spracovania kvasiniek do doplnkov stravy

Kvasinkové probiotiká, v uplynulých rokoch najmä *Saccharomyces boulardii*, ponúkajú širokú škálu aplikácií v rôznych odvetviach vrátane zdravotníctva, potravinárstva, kozmetiky a veterinárnej medicíny. Spracovávajú sa do rôznych foriem, aby sa zabezpečila ich stabilita, účinnosť a jednoduchá konzumácia. Najbežnejšie dostupné sú ako kapsuly, tablety, prášky, tekuté suspenzie či ako súčasť mliečnych výrobkov a funkčných potravín, vďaka čomu sú vhodné na každodennú konzumáciu, keďže umožňujú presné dávkovanie. Pre zabezpečenie ich účinnosti je nevyhnutné, aby boli prítomné v dostatočne vysokej koncentrácii, ktorá kvasinkových bunkám umožní prekonať fyziologické bariéry organizmu a dosiahnuť požadované miesto pôsobenia, teda ochráni bunky pred nízkym pH žalúdočných kyselín a umožniť ich uvoľnenie až v črevách [66, 70].

Práškové formy, získavané lyofilizáciou, sú vhodné na rozpustenie v tekutinách, čím ponúkajú flexibilitu dávkovania. Kvapalné varianty, ako fermentované nápoje, umožňujú rýchlu absorpciu, avšak vyžadujú chladiace podmienky. Kvasinky sa pridávajú aj do funkčných potravín, napríklad do jogurtov a kefírov, čím sa zvyšuje ich nutričná hodnota. Okrem toho sa

kvasinkové lyzáty a extrakty používajú v imunomodulačných terapiách, kde bioaktívne zlúčeniny poskytujú zdravotné výhody bez potreby živých mikroorganizmov. Výhody kvasinkových probiotík sa rozširujú aj na starostlivosť o pleť a vlasy, kde pomáhajú vyrovnať mikrobióm pokožky. Nachádzajú sa v krémoch, sérach a šampónoch, pomáhajú pri liečbe akné, ekzémov a lupín. Taktiež sú široko používané v lekárskom prostredí na prevenciu a liečbu gastrointestinálnych porúch, vrátane hnačky spojenej s antibiotikami, infekcií *Clostridium difficile* a syndrómu dráždivého čreva (IBS), pričom rozsah ich účinku je stále rozoberaný a podnietil intenzívny výskum na riešenie prekážok produkcie a životaschopnosti [70, 71].

Moderné technológie umožňujú mikroenkapsuláciu, ktorá zlepšuje stabilitu a odolnosť probiotík voči nepriaznivým podmienkam tráviaceho traktu. Táto forma je čoraz populárnejšia hlavne v potravinárskom a farmaceutickom priemysle, keďže pred jej zavedením bola prevažne používaná tekutá forma prípravkov. Tá však mala obmedzenú trvanlivosť, bola náchylná na infekciu bakteriofágmi a vyžadovala vysoké výrobné a logistické náklady. Tento proces spočíva v uzavretí živých probiotických buniek do potravinárskych materiálov, ako sú polyméry, proteíny alebo tuky, čím sa vytvára ochranný obal okolo bunkového jadra. V závislosti od veľkosti častíc sa rozlišujú dve hlavné kategórie, a to mikroenkapsulácia (3 -800 μm) a nanoenkapsulácia (10–1000 nm). Keďže mikroorganizmy sú mikroskopickej veľkosti, mikroenkapsulácia je jedinou vhodnou technikou na ich ochranu, vrátane kvasinkových probiotík. Aktuálne sa na formuláciu probiotík využívajú rôzne metódy mikroenkapsulácie, ako sú extrúzia, emulzifikácia, sušenie rozprašovaním, chladenie rozprašovaním, fluidné lôžko, lyofilizácia, lipozómy či elektrosprej. Tieto techniky, populárne najmä v potravinovom priemysle, umožňujú účinné uzavretie probiotických buniek, čím sa zlepšuje ich stabilita a ochrana pred nepriaznivými podmienkami [66, 67, 68].

Mikroenkapsulácia zahŕňa tri hlavné fázy. V prvej fáze sa mikrobiálne bunky začleňujú do pevnej alebo kvapalnej matrice. Druhá fáza spočíva v rozprašovaní a dispergovaní tejto matrice. V tretej fáze sa stabilizácia systému dosahuje prostredníctvom fyzikálnych procesov, ako je odparovanie, tuhnutie a koalescencia, alebo chemickými procesmi, ako je polymerizácia a tvorba gélu. Medzi známe polyméry používané pri enkapsulácii probiotík patria alginát, škrob, κ -karagénan, pektín, chitosan, xantánová guma či želatína [66, 67, 68, 69].

3 CIELE PRÁCE

Cieľom uvedenej diplomovej práce je kultivovať a charakterizovať vybrané kvasinkové kmene, analyzovať a zhodnotiť ich potenciál ako kvasinkových probiotík a nimi produkovaných postbiotických látok pre aplikáciu v kozmetickom a potravinárskom priemysle.

Dielčie ciele:

- 1) Spracovanie teoretického prehľadu o kvasinkových probiotikách a postbiotikách, vrátane ich charakteristiky, mechanizmov účinku a možností kultivácie.
- 2) Identifikácia a produkcia vybraných druhov kvasiniek s probiotickým a postbiotickým potenciálom a ich kooperácia s bakteriálnymi probiotikami.
- 3) Príprava postbiotických preparátov – charakterizácia získaných extraktov/metabolitov z kvasiniek z hľadiska chemického zloženia a biologickej aktivity.
- 4) Analýza možností enkapsulácie probiotických kvasiniek a postbiotických látok vrátane hodnotenia ich stability v rámci vybraných podmienok relevantných pre kozmetický a potravinársky priemysel.
- 5) Návrh kozmetického výrobku alebo potravinového doplnku.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité ku kultiváciám

- Bakteriologický agar, Himedia (India)
- BHI médium, Himedia (IND)
- D-glukóza monohydrát p.a., Penta (ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
- Glycerol, Sigma-Aldrich (SRN)
- Hydrogenfosforečnan didraselný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
- Chlorid sodný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
- Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
- Chlorid železitý hexahydrát p.a., Katedra analytické Farmaceutické fakulty UK (SR)
- Kvasničný autolyzát, Himedia (India)
- LB médium, Sigma-Aldrich (USA)
- MRS agar, Sigma-Aldrich (SRN)
- Pepton aus Casein, Roth (SRN)
- Síran amónny p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
- Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)

4.1.2 Chemikálie použité pre analýzy

- ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzeno-thiazoline-6-sulfonic acid)), Sigma-Aldrich (USA)
- Acetonitril pre HPLC, Penta (ČR)
- Ergosterol (analytický štandard), Sigma-Aldrich (USA)
- Ethanol 96 %, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
- Ethanol pro UV/VIS, Penta (ČR)
- Ethylacetát pre HPLC, Penta (ČR)
- FAME Mix, Sigma-Aldrich (SRN)
- Fenol p.a. Lach-Ner s.r.o. (ČR)
- Folin-Ciaultovo činidlo, VWR Chemicals BDH (FR)
- Hexan pre HPLC, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
- Hydrogenuhlíčan sodný, Vitrum–LachNer (SRN)
- Hydroxid sodný, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
- Chloroform p.a., Penta (ČR)
- Cholesterol, Sigma-Aldrich (SRN)
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (SRN)
- Kyselina chlorovodíková 35%, Vitrum – LachNer (ČR)
- Kyselina sírová 96%, p.a., Penta (ČR)
- Kyslina sírová 96% p.a., Penta (ČR)
- Lecithin - sojový, Serva (SRN)
- McFarland Standard Set, BioMérieux (FR)
- Metanol p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
- Metanol pre HPLC, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
- Pankreatín z prasačieho pankreasu – Sigma-Aldrich (SRN)

- Pepsín z prasačej žalúdočnej sliznice – Sigma-Aldrich (SRN)
- Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (SRN)
- Propidium jodid, Invitrogen (UK)
- Resazurin sodium salt, Sigma-Aldrich (USA)
- Torularhodín (analytický štandard), Sigma-Aldrich (USA)
- Torulén (analytický štandard), Sigma-Aldrich (USA)
- Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8,-tetramethyl-chromane-2-carboxylic Aldrich (CHE)
- Ubichinón (analytický štandard), Sigma-Aldrich (USA)
- Uhličitan sodný, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Žlčové soli – zmes kyseliny cholovej a deoxycholovej – Sigma-Aldrich (SRN)
- β -karotén (analytický štandard), Sigma-Aldrich (USA)

4.2 Použité prístroje a laboratórne pomôcky

- Analytické váhy, Boeco (SRN)
- Automatické pipety, Discovery (SRN)
- Centrifúga MiniSpin, Eppendorf (SRN)
- Centrifúga U-32R, Boeco (SRN)
- Centrifúga Z36HK, Hermle Labortechnik GmbH (SRN)
- ELISA Reader Synergy HTX, BioTek (SRN)
- Filtre - MS® Nylon Syringe Filter, veľkosť pórov 0,45 μ m, Chromservis (ČR)
- Filtre – PTFE Syringe Filter, veľkosť pórov 0,45 μ m, Chromservis (ČR)
- GKB Color Digital CCD kamera (TWN)
- Chladiaci box, Guzzanti GZ19 (ČR)
- Inkubátor s trepačkou Unimax 1010, Heidolph (SRN)
- Koloidní DLS analyzátor Zetasizer ZS, Malvern (UK)
- Laminárny box Aura mini, BioTech (ČR)
- Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s.r.o. (ČR)
- Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer, (USA)
- McFarland densitometer Grant-bio DEN-1, Grant instruments (UK)
- Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
- Prietokový cytometer Cytex NL-2000, Cytex Biosciences (USA)
- Spektrofotometr UV-VIS, Helios α (Unicam, UK)
- Termoblok, VWR (SRN)
- Trepačka IKA Yellow Line (SRN)
- Ultrazvuk, PS0200, Powersonic s.r.o. (SK)
- Vortex, Vitrum (SRN)
- Zostava GC/FID:
 - Plynový chromatograf TRACE 1300, Thermo Scientific (IT)
 - Autosampler, Thermo Scientific AI 1310 (IT)
 - Detektor FID, (Thermo Fischer Scientific, USA)
 - Kolona Lion GC-FAME, 30 m x 0,25 mm x 0,20 μ m, Chromservis (ČR)
- Zostava HPLC/PDA:
 - HPLC/MS, Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific (USA)
 - Autosampler Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific (USA)
 - DAD detector Vanquish series, Thermo Fisher Scientific (USA)

- Kolona Kinetex C18-EVO, 150 mm x 4,6 mm x 5,0 µm c, Phenomenex (USA)
- Držiak predkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)
- Predkolona - C18-EVO (ČR)

4.3 Použité mikroorganizmy

4.3.1 Kmene kvasiniek

- *Metschnikowia andauensis* CCY 029-002-129
- *Metschnikowia chrysoperlae* CCY 980311-1158
- *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-149
- *Yarrowia lipolytica* CCY 29-26-4
- *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-81
- *Rhodotorula toruloides* CCY 62-2-4
- *Rhodotorula mucilaginosa* CCY 20-7-31
- *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26

Všetky druhy kvasiniek v tejto práci boli získané zo zbierky kultúr kvasiniek Culture Collection of Yeasts – Zbierka kultúr kvasiniek (CCY), Bratislava, Slovenská republika.

4.3.2 Kmene baktérií

- *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762
- *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 900
- *Escherichia coli* CCM 7359
- *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418

Použité bakteriálne kmene pochádzajú z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne.

4.4 Kultivácia vybraných druhov kvasiniek

Kultivačný proces začínal prípravou YPD média (vid'. *Tabuľka 3*) obsahujúceho agar (20 g agaru na 1 l média), po ktorej nasledovala sterilizácia. Po sterilizácii bolo tekuté kultivačné médium rozliate do Petriho misiek v dekontaminovanom UV boxe, kde sa nechalo stuhnúť. Po stuhnutí agaru tak vzniklo pevné médium, ktoré bolo následne zaočkované vybranými kmeňmi kvasiniek. Po náraste kolónií na povrchu agarových misiek sa pokračovalo v príprave kultivácie pri laboratórnej teplote.

4.4.1 Inokulum

Kultivácia prebiehala v dvoch po sebe nasledujúcich inokulačných krokoch. Najskôr sa pripravilo YPD médium (vid'. *Tabuľka 3*). Ďalej boli kvasinky zaočkované na celkový objem 50 ml v 250 ml Erlenmayerových bankách. Narastené kultúry boli zaočkované do tekutého produkčného média. Príprava média zahŕňala sterilizáciu v tlakovom hrnci pri 120 °C počas 30 minút. Po jeho vychladnutí sa inokulácia uskutočnila v sterilných podmienkach UV boxu. Po zaočkovaní boli banky umiestnené na trepacie prístroje. Prvé inokulum sa nechalo

kultivovať 24 hodín, po čom nasledovalo preočkovanie do druhého inokula a 24-hodinová kultivácia pri laboratórnej teplote. Vždy bol dodržaný očkovací pomer 1:5.

Tabuľka 3 Zloženie YPD média

Zložka média	Množstvo na 1 l [g]
Glycerol/Glukóza monohydráz	20
Bakteriologický peptón	20
Kvasničný autolyzát	10

4.4.2 Produkčné médium

Pred začiatkom kultivácie bolo potrebné vybrať produkčné médium pre optimálny rast kvasiniek. Pre kvasinky rodu *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Metschnikowia* a *Yarrowia* bolo vyselektované optimálne produkčné médium pre rast kvasinkových kultúr, ktorého zloženie je uvedené v Tabuľka 4. Výnimku tvoril rod *Metschnikowia pulcherrima*, pre ktorý bolo zvolené rozdielne produkčné médium uvedené nižšie (viď. Tabuľka 5). Produkčné médium pre kultiváciu *Metschnikowia pulcherrima* obsahuje totiž zdroj železa (Fe^{3+}), ktoré je nevyhnutné pre tvorbu sekundárneho metabolitu pulcherrimínu. Ten sa vyznačuje charakteristickým červenohnedým sfarbením a jeho prítomnosť prispieva k antimikrobiálnym účinkom kvasinky. Aby došlo k vizuálnemu porovnaniu zloženia *M. pulcherrima*, kvasinka bola kultivovaná v oboch zvolených médiách.

Tabuľka 4 Zloženie optimálneho produkčného média

Zložka média	Množstvo na 1 l [g]
Glycerol	92,92
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,696
KH_2PO_4	4,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,0

Tabuľka 5 Zloženie produkčného média s obsahom železa

Zložka média	Množstvo na 1 l [g]
D-glukóza	20,0
Bakteriálny peptón	5,0
Kvasnicový autolyzát	10,0
KH_2PO_4	1,0
K_2HPO_4	0,2
NaCl	0,1
CaCl_2	0,1
MgSO_4	0,5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1

Produkčné médiá boli pripravené v objeme 150 ml do 500 ml Erlenmayerových baniek. Opäť boli všetky médiá zaočkované v pomere 1:5 (inokulum : produkčné médium), v prostredí

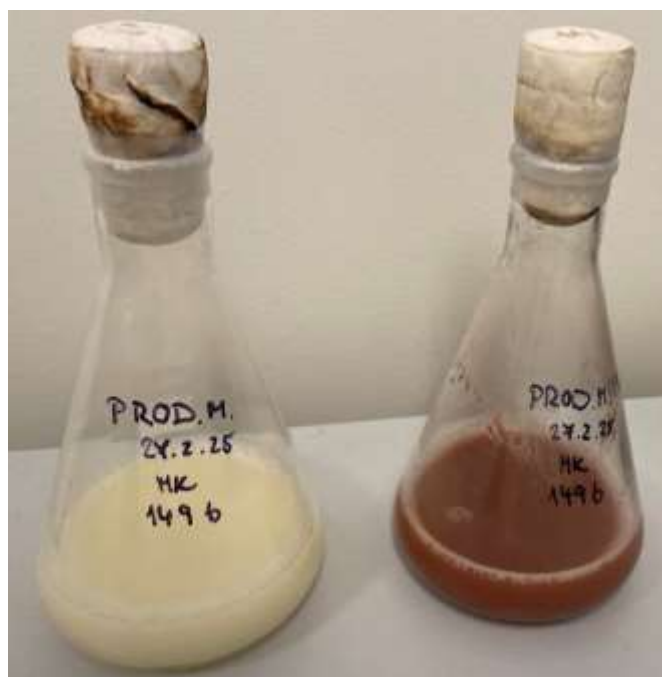
UV boxu. Kultivácia v rastovom produkčnom médiu prebiehala po dobu 96 hodín na trepacích zariadeniach za stáleho trepania, za podmienok laboratórnej teploty. Príklad vyprodukovaných kvasinkových kultúr je uvedený nižšie (viď. Obrázok 12 a Obrázok 13). Vizualne porovnanie kvasinky *M. pulcherrima* kultivovanej v dvoch rozdielnych médiách je taktiež uvedené nižšie (viď. Obrázok 14).



Obrázok 12 Vizualne charakteristika kvasiniek *S. cerevisiae*, *R. mucilaginosa* a *M. pulcherrima*



Obrázok 13 Vizualne porovnanie vyprodukovaných kvasiniek rodu *Rhodotorula*



Obrázok 14 Vizuálne porovnanie kvasinky *M. pulcherrima* produkovanej v rozdielnych médiách

4.5 Spracovanie kultivovaných kvasiniek a analýza biomasy

4.5.1 Spracovanie biomasy

Po ukončení kultivácie bola kultúra v 50 ml centrifugačných skúmavkách centrifugovaná pri 7000 otáčkach za minútu po dobu 3 minút. Po odstredení bol opatrne odstránený supernatant a biomasa na dne skúmavky bola premytá 20 ml destilovanej vody, aby sa odstránil nežiadúci zbytok média. Na dôkladnejšie rozrušenie usadených buniek, ktoré sa ťažko oddeľovali, bol použitý prístroj Vortex. Po rozsuspendovaní sedimentu boli skúmavky opäť odstredené pri rovnakých podmienkach a supernatant bol opäť odstránený. Takto pripravená biomasa bola zmrazená pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uschovaná pre následnú lyofilizáciu.

4.5.2 Analýza vzoriek pomocou kvapalinovej chromatografie

Analýza vzoriek pre zistenie obsahu farbív bola prevedená pomocou HPLC-DAD metódy. K príprave vzoriek bola použitá metóda extrakcie podľa Folcha. Do 2 ml eppendorfovej skúmavky bolo navážených 10 – 20 mg zlyofilizovanej biomasy a k navážkam sa pridal 1 ml destilovanej vody. Skúmavky sa nechali približne 30 minút stáť a následne boli centrifugované pri 14 000 otáčkach za minútu po dobu 4 minút. Supernatant bol odstránený. Následne sa k vzorke pridal 1 ml methanolu p.a. a príznačné množstvo sklenených guľčiek k porušeniu bunkových membrán. Zmes bola na 10 minút umiestnená na Vortex a následne kvantitatívne prevedená do 15 ml centrifugačných skúmaviek za prídavku 2 ml chloroformovej zmesi. Vzorky boli následne znova umiestnené na Vortex po dobu 10 minút a k dezintegrovanej zmesi bol ďalej pridaný 1 ml destilovanej vody. Takto pripravená vzorka bola zľahka premiešaná a centrifugovaná pri 2000 otáčkach za minútu po dobu 1 minúty. Došlo k očakávanému oddeleniu fáz a spodná fáza (chloroformová) bola opatrne odpipetovaná do 15 ml sklenených skúmaviek. Tá bola umiestnená na termoblok a odparená pomocou N_2 pri teplote $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzniknutá usadenina bola rozpustená v 1 ml korektnej zmesi ethylacetátu a acetonitrilu v pomere 1:2 a prefiltrovaná pomocou striekačky cez PTFE filter do sklenených vialiek. Takto

pripravené vzorky boli uschované do mraziaceho boxu a pripravené na analýzu pomocou kvapalinovej chromatografie. Na meranie bol použitý vysokovýkonný kvapalinový chromatograf vybavený detektorom s diódovým poľom (DAD), ktorý umožňuje súčasné sledovanie absorbancie vo viacerých vlnových dĺžkach. Jednotlivé parametre merania sú uvedené nižšie (viď. *Tabuľka 6*). Analýzy boli realizované v duplikátoch a získané výsledky boli spriemerované a vyhodnotené pomocou programu Chromeleon a MS Excel. Kalibračné krivky štandardov boli využité na výpočet koncentrácie pigmentov vo vzorkách.

Tabuľka 6 Parametre merania pomocou metódy HPLC-DAD

Kolona	Kinetex EvoC18 150 mm x 4,6 mm x 5 µm	
Detektor	DAD Vanquish series	
Zloženie mobilnej fázy	MF A: ACN:TrisHCl:MeOH	MF A: ACN:TrisHCl:MeOH
	84:14:02	60:40:00
Retenčný čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
24	100	0

4.5.3 Analýza vzoriek pomocou plynovej chromatografie

Nasledujúca analýza vzoriek pomocou metódy GC-MS bola prevedená s cieľom stanoviť a identifikovať spektrum mastných kyselín produkovaných kvasinkami. Ako prvé bolo na analytických váhach navážených 5–10 mg lyofilizovanej biomasy a tie boli prenesené do krimpovacích sklenených vialiek. K jednotlivým vzorkám bolo následne pridaných 1,8 ml transesterifikačnej zmesi, pozostávajúcej z 15 % kyseliny sírovej v methanole (p.a.) pre HPLC a 0,5 mg/ml kyseliny heptadekánovej, ktorá slúžila ako vnútorný štandard. Uzatvorené vialky so zmesou boli následne inkubované na termobloku pri teplote 85 °C počas 2 hodín, aby došlo k extrakcii a uvoľneniu mastných kyselín pre následnú analýzu. Po ochladení boli vzorky kvantitatívne prenesené do 5 ml sklenených vialiek. K jednotlivým vzorkám bolo pridaných 0,5 ml roztoku NaOH (0,5 M) a 1 ml hexánu v HPLC kvalite. Každá vzorka bola uzavretá a intenzívne pretrepaná na trepacom zariadení Vortex po dobu 10 minút. Po ustálení fáz bolo z hornej nepolárnej fáze odobratých 0,1 ml a premiestnených do sklenených vialiek. Na záver bolo ku každej vzorke pridaných 0,9 ml hexánu pre HPLC. Takto pripravené vzorky boli uschované do mraziaceho boxu a pripravené na analýzu pomocou plynovej chromatografie. Jednotlivé parametre merania sú uvedené nižšie (viď. *Tabuľka 7*). Pri analýze pomocou GC boli všetky vzorky merané v duplikátoch, pričom výsledky boli spriemerované a vyhodnotené pomocou programov Chromeleon a MS Excel. Na kvantifikáciu sa použil interný štandard, ktorý bol pridaný už počas transesterifikačnej reakcie. Kalibrácia prebiehala pomocou komerčne dostupnej zmesi štandardov Supelco FAME Mix, na základe ktorej sa stanovili koncentrácie jednotlivých mastných kyselín.

Tabuľka 7 Parametre merania pomocou metódy GC-MS

Kalipárna kolona	LION LN-FAME 30 m x 0,25 mm x 0,20 μm	
Dávkovanie	Autosampler Thermo Scientific AI 1310	
Objem nástreku vzorky	1 μl	
Pomer nástreku deliča toku	10	
Prietok nosného plynu H₂	1 ml/min	
Teplota	240 °C	
Detektor	FID	
Palivo FID detektoru	Prietok vzduchu [ml·min ⁻¹]	350
	Prietok H ₂ [ml·min ⁻¹]	30
	Prietok N ₂ [ml·min ⁻¹]	40

4.6 Príprava vodných extraktov

Z lyofilizovanej biomasy kvasiniek boli pripravené vodné extrakty nasledujúcim postupom. K 0,1 g biomasy danej vzorky bolo pridané značné množstvo sklenených guľičiek k rozrušeniu pevných častí biomasy. Zmes bola zaliata 10 ml destilovanej vody, ponechaná na dispergátore 30 minút a následne prenesená na trepacie zariadenie, kde prebiehal proces extrakcie po dobu 24 hodín. Nakoniec bola extrahovaná zmes centrifugovaná pri 4000 otáčkach za minútu po dobu 2 minút. Supernatant bol preliaty do čistej skúmavky a ďalej analyzovaný.

4.7 Príprava ethanolových extraktov

Z lyofilizovanej biomasy kvasiniek boli pripravené etanolové extrakty nasledujúcim postupom. Navážka 0,1 g biomasy danej vzorky bola rozpustená v 10 ml 96 % ethanolu, ďalej bola taktiež premiešaná na vortexe po dobu 30 minút a následne prenesená na trepačku, kde rovnako prebehol proces extrakcie po dobu 24 hodín. Nakoniec bola extrahovaná zmes tiež centrifugovaná pri 4000 otáčkach za minútu po dobu 2 minút. Supernatant bol preliaty do čistej skúmavky a ďalej analyzovaný.

4.8 Spektrofotometrické stanovenia a charakteristiky extraktov

Za účelom chemickej charakterizácie extraktov kvasinkových biomás boli realizované spektrofotometrické stanovenia vybraných skupín biologicky aktívnych látok. Prevedené analýzy pozostávali z hodnotenia antioxidačnej aktivity, vyhodnotenia celkového obsahu sacharidov podľa Duboisa a taktiež zo stanovenia celkových fenolických látok.

4.8.1 Stanovenie antioxidačnej aktivity – roztoková metóda Trolox

Antioxidačná aktivita kvasinkových extraktov bola hodnotená pomocou kolorimetrickej metódy založenej na zhášaní stabilného radikálového kationu ABTS^{·+} (2,2'-azino-bis(3-

etylbenzotiazolín-6-sulfónová kyselina)). Tento radikál vykazuje intenzívne modrozelené sfarbenie, ktoré sa po pridaní antioxidantov znižuje. Miera poklesu absorpcie závisí od obsahu antioxidantov vo vzorke.

Roztok ABTS (7 mmol/l) bol aktivovaný oxidáciou s peroxodisíranom draselným (2,45 mmol/l) a nechal sa stáť 12 hodín v tme pri laboratórnej teplote. Pred použitím bol zriedený ethanolom tak, aby jeho absorpcia pri vlnovej dĺžke 734 nm bola $0,700 \pm 0,020$. Do zúženej kyvety sa napipetovalo 1 ml ABTS^{•+} a 10 μ l vzorky. Po 10-minútovej inkubácii za laboratórnej teploty na tmavom mieste, bola zaznamenaná hodnota absorpcie (A_{10}). Pokles absorpcie (ΔA) bol vypočítaný podľa rovnice $\Delta A = A_0 - A_{10}$, kde A_0 predstavuje absorpciu roztoku ABTS^{•+} s 10 μ l 60 % ethanolu (blank).

Na vyhodnotenie výsledkov bola použitá kalibračná krivka pripravená zo štandardu Troloxu v koncentráciách 50–400 μ g/ml (v 60 % ethanole). Výsledky boli vyjadrené ako ekvivalenty derivátu vitamínu E – Troloxu (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová), čo predstavuje množstvo Troloxu s rovnakou antioxidačnou aktivitou ako testovaná vzorka. Rovnica zhotovenej kalibračnej krivky je $y = 0,0015x$. Analýzy boli vykonané v troch meraniach, pričom výsledky boli spriemerované a smerodajná odchýlka bola vypočítaná z jednotlivých meraní. Tento postup bol použitý aj pri meraní kalibračnej závislosti.

4.8.2 Stanovenie celkových fenolických látok

Celkový obsah polyfenolových zlúčenín v zhotovených extraktoch bol stanovený spektrofotometricky pomocou Folin-Ciocalteuovej metódy. Táto metóda využíva reakciu Folin-Ciocalteuovho činidla s polyfenolmi, za vzniku modro sfarbeného produktu. Bol pripravený roztok Folin-Ciocalteuovho činidla nariadený destilovanou vodou v pomere 1:9. Do skúmavky bolo pridané 1 ml Folin-Ciocalteuovho činidla, spolu s 1 ml destilovanej vody a 50 μ l analyzovanej vzorky. Po dôkladnom premiešaní bola zmes inkubovaná po dobu 5 minút pri laboratórnej teplote (25 °C), následne bol pridaný 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného (Na_2CO_3). Po ďalšom premiešaní nasledovala 15-minútová inkubácia, po ktorej bola meraná absorpcia pri 750 nm pomocou UV-Vis spektrofotometra. Kalibračná krivka bola zostavená na základe štandardných roztokov kyseliny gallovej (o koncentrácii 1 mg/ml) v koncentračnom rozmedzí 0,05 – 0,3 mg/ml. Ako slepý pokus (blank) bola použitá voda v objeme 50 μ l namiesto vzorky. Výsledná koncentrácia celkových fenolických látok bola vypočítaná z rovnice kalibračnej krivky zhotovenej zo závislosti koncentrácie kyseliny gallovej na absorpcii. Rovnica zhotovenej kalibračnej krivky je $y = 1,3355x$. Analýza bola realizovaná v troch opakovaníach, z ktorých sa vypočítal priemer a smerodajná odchýlka. Rovnakým postupom bola meraná i kalibračná závislosť.

4.8.3 Stanovenie celkových sacharidov podľa Dubois

Celkový obsah sacharidov v kvasinkových extraktoch bol stanovený kolorimetrickou metódou podľa Dubois, ktorá je založená na reakcii cukrov s fenolom a koncentrovanou kyselinou sírovou. Táto reakcia vedie k vzniku farebného komplexu, ktorého intenzita je úmerná koncentrácii cukrov vo vzorke a meria sa spektrofotometricky.

Do sklenenej skúmavky bol napipetovaný 1 ml extraktu, následne 1 ml 5 % roztoku fenolu a nakoniec 5 ml koncentrovanej H_2SO_4 . Po dôkladnom premiešaní sa zmes nechala stáť pri izbovej teplote po dobu 30 minút. Následne bola meraná absorpcia pri 490 nm. Ako slepý pokus (blank) bola použitá voda v objeme 1 ml namiesto vzorky.

Na vytvorenie kalibračnej krivky bol použitý štandardný vodný roztok glukózy o koncentračnom rozmedzí 0,02 – 0,1 mg/ml. Z tejto série boli pipetované objemy 0; 0,25; 0,5; 0,75 a 1 ml, ktoré boli doplnené extrakčným činidlom do konečného objemu 1 ml. Na základe

tejto kalibračnej krivky boli výsledky stanovené ako ekvivalenty glukózy v mg/ml. Rovnica zhotovenej kalibračnej krivky je $y = 11,221x$. Analýza bola vykonaná v troch meraniach, pričom hodnoty sa spriemerovali a bola z nich vypočítaná smerodajná odchýlka. Rovnaký postup bol použitý aj pri zhotovovaní kalibračnej rovnice.

4.9 Enkapsulácia kvasinkových extraktov do lipozómov

Lipozómy obsahujúce vodný extrakt z kvasiniek boli pripravené pomocou ultrazvuku. Keďže išlo o vodné extrakty, nebolo potrebné použitie organických rozpúšťadiel. Na enkapsuláciu vodných extraktov sa použila zmes pozostávajúca z 10 ml vodného extraktu, 90 mg sójového lecitínu, 10 mg cholesterolu a 10 ml destilovanej vody. Zložky boli zmiešané v kádinke a následne podrobené ultrazvukovej dispergácii pomocou ultrazvukového homogenizátora (Bandelin Sonodrex Technik Soni). Ultrazvukovanie prebiehalo pri programe č. 5, intenzite 50 %, v 15-sekundových cykloch, ktoré sa niekoľkokrát opakovali v priebehu jednej minúty, čím sa zabezpečila tvorba stabilných lipozomálnych vezikúl s enkapsulovanými bioaktívnymi látkami.

4.10 Charakterizácia enkapsulačnej účinnosti, veľkosti a stability lipozómov

Zhotovené lipozómy boli charakterizované z hľadiska enkapsulačnej účinnosti, veľkosti a stability. Tieto parametre determinovali ich vhodnosť ako nosičov bioaktívnych látok.

4.10.1 Analýza enkapsulačnej účinnosti lipozómov

Enkapsulačná účinnosť vyjadruje percentuálne množstvo aktívnych látok, ktoré sa podarilo efektívne uzavrieť do vnútra alebo do membrány lipozómov počas procesu enkapsulácie. Tento parameter úzko súvisí s chemickými vlastnosťami enkapsulovaných látok, použitými zložkami lipozómov a samotnou technikou ich prípravy.

Z pripravených lipozómov z extraktov bol odobratý 1 ml do eppendorfovej skúmavky. Vzorky boli následne centrifugované po dobu 1 hodiny pri 11 000 otáčkach za minútu, za účelom oddelenia voľnej, nezapuzdrenej časti extraktu (supernatant) od samotných lipozómov. Supernatant predstavuje frakciu extraktu, ktorá nebola zapuzdrená do lipidovej matrice lipozómov. Potom bol supernatant odliaty a použitý pre spektrofotometrickú analýzu antioxidačnej aktivity podľa postupu v kapitole 4.8.1, rovnako ako pôvodný extrakt. Na základe rozdielu medzi celkovou antioxidačnou aktivitou extraktu pred enkapsuláciou a aktivitou voľnej fázy po enkapsulácii bola následne vypočítaná enkapsulačná účinnosť, znázornená percentuálnym rozdielom hodnôt. Merania boli vykonané v duplikátoch, pričom výsledky boli spriemerované a smerodajná odchýlka bola vypočítaná z jednotlivých meraní.

4.10.2 Analýza veľkosti a stability lipozómov pomocou metódy DLS

Veľkosť pripravených lipozómov bola stanovená pomocou metódy dynamického rozptylu svetla (DLS) na prístroji ZetaSizer Nano. Tento parameter je kľúčový z hľadiska biologickej funkcie lipozómov, keďže ovplyvňuje ich stabilitu, schopnosť prestupu cez biologické membrány a kinetiku uvoľňovania enkapsulovaných látok. Popri veľkosti bol pomocou rovnakého zariadenia hodnotená i stabilita lipozómov prostredníctvom určenia zeta potenciálu, ktorý slúži ako indikátor stability koloidných systémov.

K precipitátu centrifugovaných vzoriek (kapitola 4.11.1) bol pridaný 1 ml destilovanej vody a zmes bola rozsuspendovaná pomocou vortexu. Pred meraním boli vzorky nariadené 100krát destilovanou vodou, aby sa predišlo viacnásobnému rozptylu svetla. Meranie bolo

realizované v kyvetách pomocou prístroja ZetaSizer Nano v troch cykloch a 12 opakovaníach v každom z jednotlivých cyklov. Pre všetky vzorky prebehlo meranie dvakrát, rovnako pre neriedené i riedené vzorky.

4.11 Antimikrobiálne testy

Na stanovenie antimikrobiálnej aktivity kvasinkových extraktov bol aplikovaný bujónový dilučný test s využitím 96-jamkových mikrotitračných doštičiek. Táto metóda je založená na sledovaní rastu indikátorových mikroorganizmov prostredníctvom merania optickej hustoty (absorbancie) pomocou spektrofotometrie. Na testovanie boli vybraní reprezentanti grampozitívnych aj gramnegatívnych baktérií, ktorých kultivácia prebiehala pri teplote 37 °C v Erlenmayerových bankách s použitím špecificky zvolených rastových médií. Pred inokuláciou boli médiá sterilizované a následne sa z nich sterilne odobralo 50 ml do baniek, kde boli inokulované mikroorganizmami z kryoskúmaviek. Zoznam použitých mikroorganizmov a ich príslušných kultivačných médií je uvedený nižšie (viď. *Tabuľka 8*).

Tabuľka 8 Použité mikroorganizmy a ich charakteristické médium

Zvolená baktéria	Rastové médium
<i>Escherichia coli</i>	LB
<i>Staphylococcus epidermis</i>	BHI

4.11.1 Očkovanie na mikrotitračné doštičky

Po uplynutí 24 hodín boli kultivované kultúry mikroorganizmov nariedené na optickú hustotu 0,5 McFarlandovej stupnice, čo zodpovedá približne 1×10^8 CFU/ml, a následne bola suspenzia zriedená 2000krát na konečnú koncentráciu 1×10^6 CFU/ml pre testovanie.

Do okrajových jamiek mikrotitračnej doštičky bola najskôr pipetovaná destilovaná voda s cieľom minimalizovať odparovanie a zabezpečiť rovnomerné podmienky počas inkubácie. Do každej jamky mikrotitračnej doštičky bolo následne pridaných 100 µl sterilného média zodpovedajúceho mikroorganizmu, ďalej bolo pridaných 100 µl extraktu do prvej jamky v rade, a potom bola vykonaná sériová dvojnásobná dilúcia, čím sa vytvoril koncentračný gradient s celkovým objemom 100 µl v každej jamke. Následne bolo do všetkých jamiek pridaných 100 µl nariedenej mikrobiálnej suspenzie. Ako pozitívna kontrola bola použitá jamka obsahujúca len mikroorganizmus s médiom bez extraktu (100 µl média a 100 µl kultúry), zatiaľ čo negatívna kontrola obsahovala zmes média (50 µl), 70 % ethanolu (50 µl) a kultúru mikroorganizmov. Pre kontrolu sterility bolo do niektorých jamiek pridané iba médium v konečnom objeme 200 µl.

Po založení bola zmeraná absorbancia v čase 0 pri 630 nm, pomocou ELISA readeru a doštičky boli následne inkubované pri 37 °C počas 18–24 hodín. Po inkubácii bola absorbancia jednotlivých jamiek meraná znova pri 630 nm pomocou ELISA readeru. Miera inhibície rastu mikroorganizmov bola vyhodnotená na základe zmeny zákalu v čase 0 a 24 hodín v porovnaní s negatívnou kontrolou, ktorá neobsahovala testovaný extrakt. Bola určená minimálna inhibičná koncentrácia (MIC), teda najnižšia koncentrácia extraktu, pri ktorej došlo k inhibícii rastu testovaného mikroorganizmu v porovnaní s kontrolou.

Na základe predbežných výsledkov antimikrobiálnych testov bol pre jednu sadu pokusov zvolený upravený postup, ktorého cieľom bolo odstrániť živé kvasinkové bunky

z extraktov. V sterilnom prostredí laminárneho boxu bol z každej vzorky kvasinkového extraktu odobratý objem 1 ml do eppendorfových skúmaviek, a to v duplikátoch. Jedna sada vzoriek bola vystavená UV žiareniu po dobu 20 minút s cieľom usmrtiť kvasinkové bunky. Druhá sada bola sterilne prefiltrovaná cez bakteriocídne membránové filtre, čím sa zabezpečilo mechanické odstránenie živých mikroorganizmov. Takto pripravené vzorky boli následne aplikované v stanovených objemoch do jamiek mikrotitračných doštičiek na ďalšie antimikrobiálne testovanie.

Obe analýzy prebiehali v dvoch paralelných meraniach, pre zabezpečenie spoľahlivosti výsledkov, pričom výsledky boli spriemerované a doplnené o smerodajnú odchýlku. Percentuálny rast mikroorganizmov i metabolická aktivita boli vyjadrené v percentách, v pomere absorbancie voči kontrole.

4.11.2 Resazurínový test

Ako doplnková metóda pre stanovenie životaschopnosti mikroorganizmov bol použitý resazurínový test, ktorý využíva farbivo resazurín ako indikátor umožňujúci hodnotiť metabolickú aktivitu mikroorganizmov na základe ich schopnosti redukovať farbivový redoxný indikátor. Oxidovaná forma resazurínu je modrej farby, avšak v prostredí s aktívnymi mikroorganizmami dochádza k jeho redukcii na ružový resorufín. Tento farebný prechod umožňuje vizuálne alebo spektrofotometrické sledovanie vitality buniek, a tým aj účinnosti testovaných antimikrobiálnych látok.

Do každej jamky mikrotitračnej doštičky, v ktorej prebiehal bujónový dilučný test, bolo po 24-hodinovej inkubácii pri 37 °C pridaných 20 µl roztoku resazurínu. Roztok bol pripravený zmiešaním PBS pufru a destilovanej vody v pomere 1:11. Potom bol pridaný resazurín tak, aby koncentrácia vzniknutého roztoku resazurínu bola 0,15 mg/ml. Následne bol roztok prefiltrovaný cez biocídny filter s veľkosťou pórov 0,2 µm. Po pridaní roztoku do jamiek bol obsah jemne premiešaný a následne inkubovaný ďalších 30 minút za rovnakých podmienok. Zmeny farby boli sledované vizuálne a následne aj pomocou ELISA readeru pri vlnovej dĺžke 570 nm. Jamky, ktoré si zachovali modré zafarbenie, boli vyhodnotené ako miesta bez metabolickej aktivity – teda ako jamky, kde bola rast mikroorganizmov úplne inhibovaný. Ako 100 % metabolickej aktivity bola určená vzorka mikroorganizmov rastúcich v čistom médiu bez akýchkoľvek pridaných látok. Ak bola aktivita buniek v prítomnosti testovaného extraktu nižšia než táto hodnota, znamenalo to, že extrakt negatívne ovplyvnil životaschopnosť buniek – teda spomalil ich metabolizmus alebo ich usmrtil. Čím je nižšia nameraná absorbancia, tým menej živých buniek ostalo schopných premieňať resazurín na ružový resorufín, čo signalizuje účinok testovanej látky. Aj v tomto prípade bola analýza realizovaná na dvoch paralelných vzorkách, pričom hodnoty boli počas vyhodnotenia výsledkov spriemerované.

4.12 Prebiotický potenciál kvasinkových extraktov v synbiotických systémoch

Za účelom zhodnotenia vplyvu vodných kvasinkových extraktov na rast a životaschopnosť probiotických mikroorganizmov boli uskutočnené kultivačné experimenty s využitím kmeňov *Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium bifidum* (kapitola 4.3.2). Kultivácia prebiehala v komerčnom *Lactobacillus* MRS médiu, za pridaní vodných kvasinkových extraktov. Najskôr bolo MRS médium zaočkované probiotickými baktériami *Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium brevis*, ktoré boli prenesené z kryoskúmaviek. Zaočkovanie prebiehalo v laminárnom boxe za sterilných podmienok, pričom bol použitý 10 % inokulačný pomer danej kultúry. Po naočkovaní boli skúmavky uzavreté tak, aby v nich nezostávalo prebytočné množstvo vzduchu. Tento druh baktérií totiž vyžaduje nízky alebo žiadny obsah kyslíka pre optimálny rast. Prítomnosť kyslíka by mohla ich rast obmedziť, prípadne spôsobiť stres a

ovplyvniť výsledky kultivácie. Kultivácia prebiehala v inkubátore pri teplote 37 °C po dobu 24 hodín.

Po ukončení kultivácie probiotických baktérií boli sterilne pripravené kvasinkové extrakty inokulované príslušným množstvom nakultivovanej probiotickej kultúry v sterilnom prostredí laminárneho boxu. Ihneď po naočkovaní bol zmeraný počiatkový zákal jednotlivých kultúr pomocou McFarlandových štandardov a prebehla ďalšia kultivácia v inkubátore pri teplote 37 °C, po dobu 18 hodín. Rast probiotických kmeňov bol celkovo hodnotený porovnaním zákalu kultúr pred a po inkubácii pomocou McFarlandových štandardov. Výsledky boli zároveň hodnotené nárastom kolónií na Petriho miskách s MRS médiom, ktoré boli očkované 50 µl zmesi extraktov s probiotickými baktériami. Po 24 hodinách bol stanovený nárast buniek pomocou automatickej čítačky kolónií.

Určenie viability a rozdelenia bunkovej populácie bolo následne prevedené pomocou prietokovej cytometrie. Vzorky obsahujúce probiotické baktérie v kombinácii s kvasinkovými extraktami boli pred meraním nariadené sterilnou destilovanou vodou. K 1 ml každej nariadenej vzorky bolo následne pridaných 5 µl propidiumjodidu (1 g/l), čo je fluorescenčné farbivo, ktoré preniká iba do buniek s narušenou membránou a umožňuje tak rozlíšenie neživých buniek. Po aplikácii farbiva boli vzorky inkubované 5 minút v tme pri izbovej teplote. Meranie prebehlo na prietokovom cytometri s cieľom potvrdiť prítomnosť a identifikovať živú bunkovú populáciu.

4.13 Modelové trávenie

Za účelom simulácie podmienok ľudskeho tráviaceho traktu boli vybrané vzorky kvasinkových extraktov podrobené modelovému tráveniu in vitro. Ako prvé boli pripravené modelové tráviace šťavy podľa Českého liekopisu.

Modelová žalúdočná šťava bola pripravená rozpustením 0,25 g pepsínu v 100 ml destilovanej vody. Následne sa pridalo 0,84 ml 35 % kyseliny chlorovodíkovej a pH roztoku sa upravilo na hodnotu 0,9 [72].

Modelová pankreatická šťava vznikla rozpustením 0,25 g pankreatínu a 1,5 g NaHCO₃ v 100 ml destilovanej vody s následnou úpravou pH na 8,9 [72].

Modelová žľčová šťava bola pripravená pridaním 0,8 g žľčových solí do 200 ml fosfátového pufru s pH 8 [72].

4.13.1 Testovanie gastrointestinálnej odolnosti extraktov

Najskôr boli extrakty zmiešané so simulovanou žalúdočnou šťavou v pomere 1:1. Trávenie v žalúdočnej fáze prebiehalo dokopy 20 minút. Následne boli pridané pankreatické a žľčové šťavy, ktoré boli predtým pripravené v pomere 1:1 a následne pridané k už natrávenému obsahu taktiž v pomere 1:1. Táto črevná fáza prebiehala ďalšie 2 hodiny, za konštantného miešania a inkubácie pri 37 °C. Po ukončení umelého trávenia sa ďalej pracovalo v sterilnom laminárnom boxe. Najprv boli všetky vzorky centrifugované pri 4000 otáčkach za minútu po dobu 3 minút, následne bol supernatant opatrne odliaty. Vzniknutý precipitát bol rozsuspendovaný v malom objeme destilovanej vody. Zo vzniknutej suspenzie bolo sterilne odobratých 50 µl, ktoré boli naočkované na agarové Petriho misky s YPD médiom. Misky boli následne umiestnené do inkubátora a inkubované pri teplote 37 °C po dobu 24 hodín. Rast kvasinkových kolónií po inkubácii slúžil ako ukazovateľ ich schopnosti prežiť podmienky simulovaného tráviaceho traktu.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci tejto diplomovej práce boli skúmané možnosti využitia rôznych druhov kvasiniek ako potenciálnych probiotík a postbiotík s uplatnením v potravinárskom a kozmetickom priemysle. Analyzované boli druhy *Rhodotorula toruloides*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula kratochvilovae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia andauensis*, *Metschnikowia chrysoperlae*, *Yarrowia lipolytica* a *Saccharomyces cerevisiae*. Po ich kultivácii boli pripravené extrakty, ktoré slúžili ako východiskový materiál pre testovanie ich probiotického potenciálu.

Vybrané kvasinky boli podrobené analýze obsahu bioaktívnych látok. Súčasťou práce bola aj enkapsulácia vodných extraktov do lipozómov za účelom potenciálneho kozmetického využitia. Antimikrobiálne vlastnosti extraktov boli testované voči vybraným baktériám (*E. coli* a *S. epidermidis*). Porovnávané boli nielen jednotlivé kvasinkové druhy navzájom, ale aj efekt enkapsulácie a rozdiely v obsahu celkových cukrov v postbiotickom supernatante. Ďalej bola hodnotená životaschopnosť buniek, ako aj ich schopnosť prežiť v simulačných podmienkach tráviaceho traktu. Preverovali sa aj interakcie medzi kvasinkovými extraktmi a probiotickými baktériami (*L. rhamnosus* a *B. brevis*) počas spoločnej kultivácie. Zloženie kvasinkovej biomasy bolo ďalej analyzované z hľadiska obsahu pigmentov pomocou HPLC a mastných kyselín pomocou GC.

Analyzované boli biologicky aktívne zložky získané z uvedených druhov probiotických kvasiniek, ktoré by mohli nájsť uplatnenie ako výživový doplnok alebo kozmetický prípravok. Výsledné preparáty by mohli slúžiť ako aktívne látky v kozmetických produktoch určených na starostlivosť o pleť, najmä v oblasti ochrany kožnej bariéry, regenerácie a podpory prirodzenej mikroflóry.

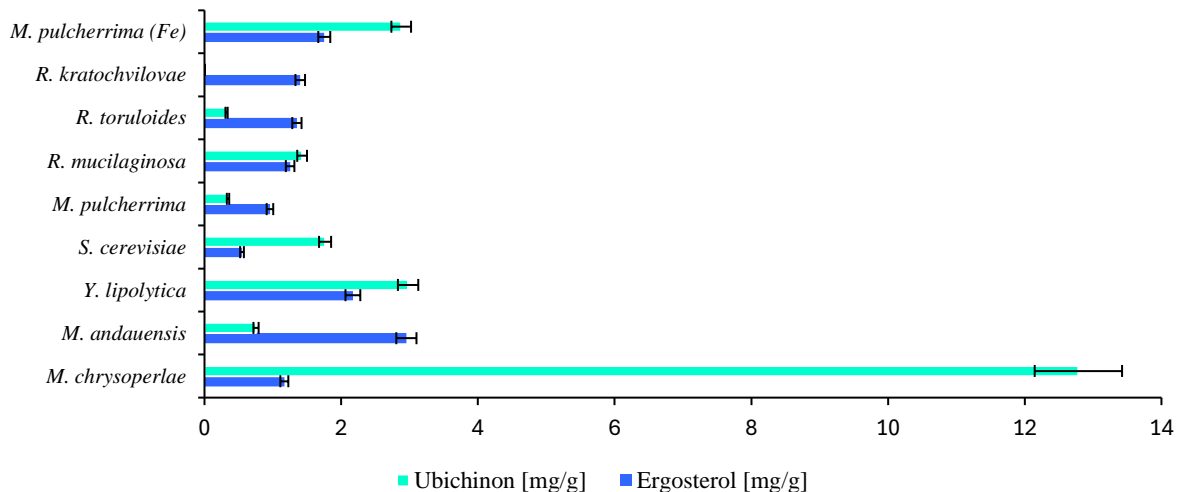
5.1 Stanovenie obsahu pigmentov v kvasinkovej biomase

Stanovenie obsahu lipofilných látok, predovšetkým pigmentov, v biomase vybraných druhov kvasiniek prebehlo za využitia vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). Postup prípravy vzoriek je uvedený v kapitole 4.5.2. Výsledky analýzy obsahu pigmentov boli rozdelené do dvoch hlavných skupín – na karotenoidy a steroly. Toto rozdelenie umožnilo zrozumiteľnejšie spracovanie získaných dát, keďže koncentrácie niektorých zlúčenín sa medzi sebou výrazne líšili a spoločné zobrazenie všetkých hodnôt by bolo vizuálne neprehľadné.

5.1.1 Analýza koncentrácie sterolov v kvasinkách

V rámci analýzy sterolov boli detekované dva druhy lipofilných látok, a to ergosterol a ubichinón (viď. *Obrázok 15*). Vyznačujú sa špecifickými biologickými funkciami a figurujú najmä v metabolických procesoch buniek. Predstavujú dôležitú súčasť bunkovej membrány, pričom ich hlavnou funkciou je zabezpečenie jej stability a priepustnosti [74].

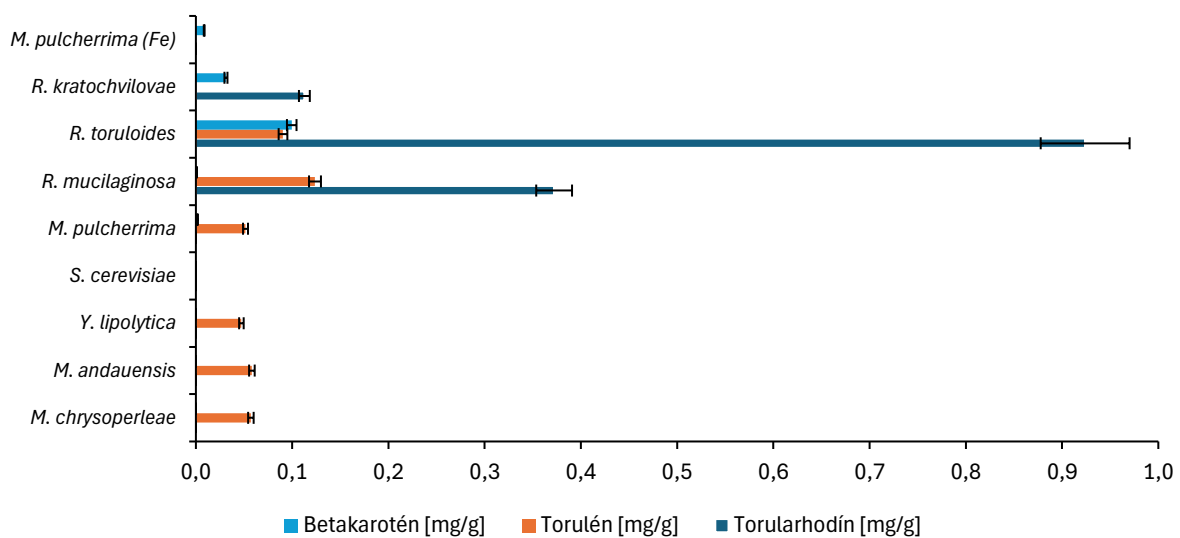
Pri analýze HPLC boli vzorky merané v duplikátoch, výsledky boli následne spriemerované a z dvoch meraní bola vyhodnotená smerodatná odchýlka. Kalibrácia bola vykonaná na základe použitia kalibračných štandardov a vyhodnocovanie výsledkov sa realizovalo v jednotkách mg/g sušiny.



Obrázok 15 Graf koncentrácie jednotlivých pigmentov v kvasinkovej biomase

Ako je možné pozorovať z grafu, vo všetkých analyzovaných vzorkách bola detegovaná prítomnosť ergosterolu, ktorý je typickým sterolom pre kvasinky. Najvyšší obsah ergosterolu bol zistený u *Metschnikowia andauensis* (2,95 mg/g), nasledovaný *Yarrowia lipolytica* (2,17 mg/g) a *Rhodotorula toruloides* (1,35 mg/g). Ďalšou sledovanou lipofilnou látkou bol ubichinón (koenzým Q10). Ubichinón bol detegovaný vo viacerých vzorkách. Výrazne vysoké množstvo líšiace sa takmer desaťnásobne od ostatných vzoriek bolo detekované u *M. chrysoperlae* (12,78 mg/g). Ďalšie významné koncentrácie boli zaznamenané tiež u kvasiniek *Y. lipolytica* (2,98 mg/g) a *S. cerevisiae* (1,76 mg/g), čo poukazuje na výraznú variabilitu medzi jednotlivými kmeňmi. Jeho prítomnosť naznačuje antioxidačný potenciál týchto druhov (viď. kapitola 5.3), ktorý môže byť využitý pri ochrane pokožky pred pôsobením voľných radikálov.

5.1.2 Analýza koncentrácie karotenoidov v kvasinkách



Obrázok 16 Graf prítomnosti jednotlivých pigmentov v kvasinkovej biomase

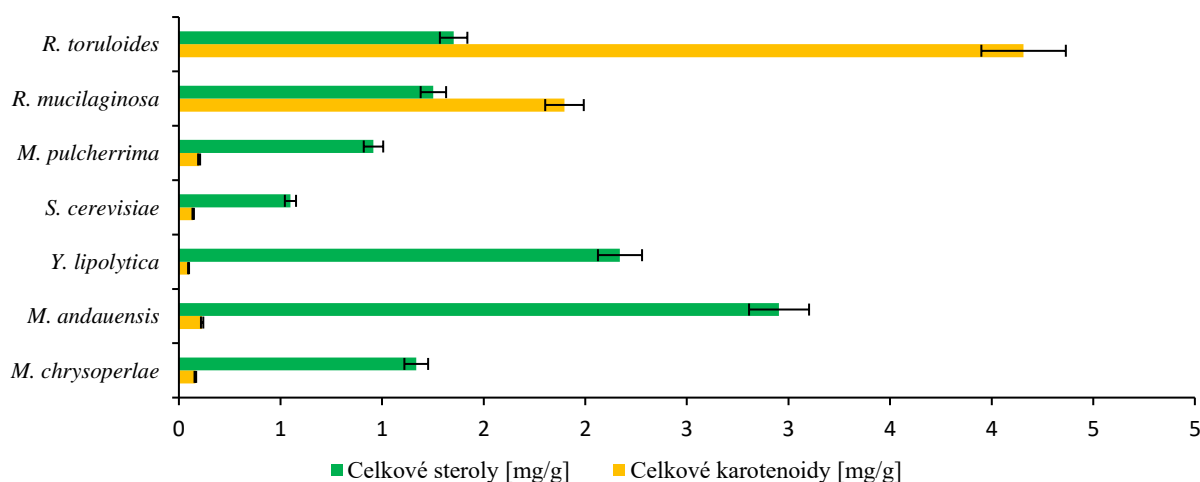
Na druhej strane, karotenoidy predstavujú farebné pigmenty, známe svojimi antioxidantnými vlastnosťami a možným využitím v kozmetike (napr. ako ochrana proti UV žiareniu alebo pri spomalení starnutia pokožky) ale aj ako prídavné látky v potravinárskom priemysle (napr. na zvýšenie nutričnej hodnoty ako prekurzory vitamínu A) [73].

Prítomnosť jednotlivých pigmentov vo vzorkách je uvedená v grafe vyššie (viď. Obrázok 16). Z nameraných koncentrácií vyplýva, že kvasinky rodu *Rhodotorula*, konkrétne *R. toruloides*, vykazovala najvyšší a väčšinový obsah červených pigmentov. Táto kvasinka dosiahla najvyšší obsah celkových karotenoidov (4,16 mg/g sušiny), pričom dominantný podiel tvoril torularhodín (0,92 mg/g), nasledovaný betakaroténom a torulénom. Podobne *R. mucilaginosa* produkovala významné množstvá torularhodínu, ale i menšie množstvo torulénu (0,57 mg/g), čo naznačuje schopnosť týchto kvasiniek syntetizovať viacero typov pigmentov súčasne. Naopak, ostatné druhy kvasiniek produkovali len stopové množstvá karotenoidov, prevažne torulénu, a vo veľmi nízkych koncentráciách. *S. cerevisiae* neprodukovala žiadny z karotenoidných pigmentov, nemá v metabolickej výbave príslušnú vetvu izoprenoidnej dráhy, produkuje však steroly. Karotenoidnú dráhu zrejme nemajú ani kvasinky rodu *Metchnikowia*. Je možné vypozerovať, že β -karotén bol detegovaný v menšom množstve len u kvasiniek *Rhodotorula*, zatiaľ čo u ostatných druhov kvasiniek sa nevyskytoval vôbec. Tento rozdiel v schopnosti produkcie pigmentov je v súlade s poznatkami z literatúry, ktorá uvádza, že biosyntéza karotenoidov je typická najmä pre rod *Rhodotorula*. Zdôrazňuje sa, že tieto kvasinky disponujú špecifickým metabolizmom, ktorý im umožňuje syntetizovať karotenoidy akými sú β -karotén, γ -karotén, torulén a torularhodín. Tento metabolizmus je odlišný od iných druhov kvasiniek, ktoré nemajú rovnaké enzymatické vybavenie na syntézu týchto pigmentov, ako je zrejme z výsledných dát [86].

Ďalším možným faktorom je vplyv kultivačných podmienok, ktoré síce podporili tvorbu niektorých pigmentov v stopových množstvách, no nemuseli byť optimálne pre akumuláciu karotenoidov, v prípade rodu *Rhodotorula* i β -karoténu. Ďalšou možnosťou je intenzívna premena betakaroténu na iné, viacej oxidované pigmenty.

5.1.3 Porovnanie celkového obsahu pigmentov

Výsledky poukazujúce na celkové množstvo karotenoidov a sterolov v kvasinkových vzorkách boli spracované do grafu (viď. Obrázok 17).



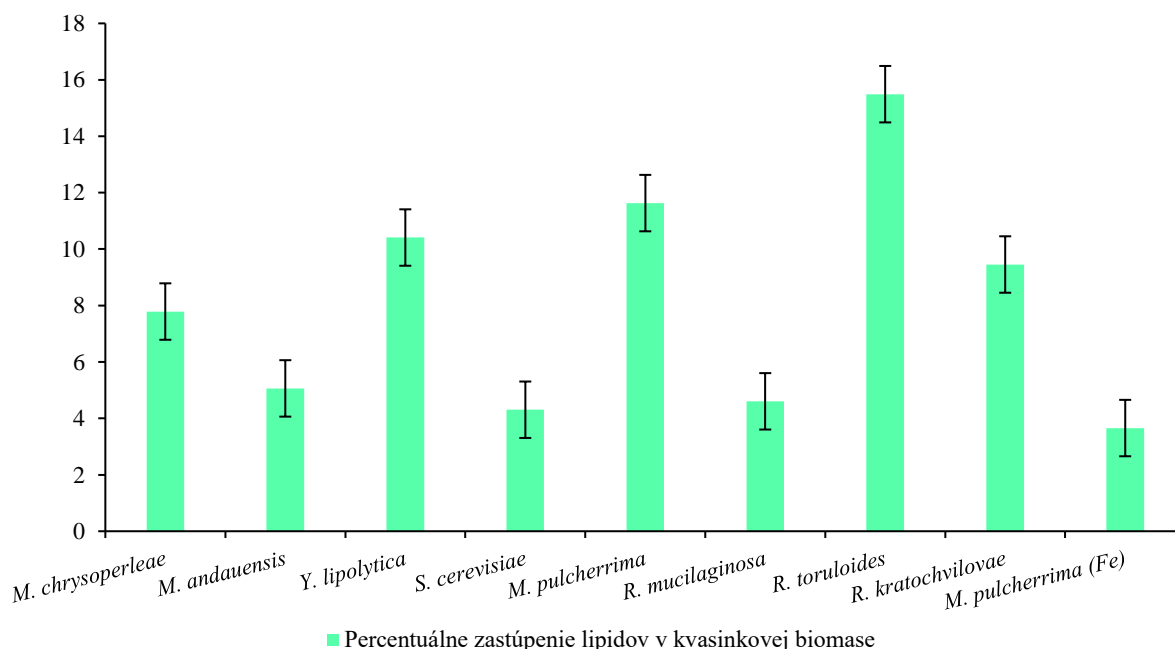
Obrázok 17 Graf obsahu celkových lipofilných látok v kvasinkovej biomase

Zo získaných výsledkov vyplýva, že vo väčšine analyzovaných vzoriek bol celkový obsah karotenoidov nižší v porovnaní so sterolmi. Tento výsledok súvisí s tým, že steroly, ako napríklad ergosterol, sú esenciálne zložky bunkovej membrány kvasiniek a ich biosyntéza prebieha kontinuálne počas rastu, bez ohľadu na vonkajšie podmienky. Ich produkcia je teda stabilná a prirodzene vysoká naprieč rôznymi druhmi. Naopak, karotenoidy patria medzi sekundárne metabolity, ktorých produkcia je výrazne druhovo špecifická a navyše závislá od vonkajších podmienok, ako sú intenzita svetla, dostupnosť živín či stresové faktory [73, 74].

Aj keď boli kvasinky kultivované za prítomnosti svetla, nie všetky použité druhy sú prirodzene karotenogénne alebo nemajú aktívnu biosyntetickú dráhu vedúcu k produkcii týchto pigmentov, ako bolo uvedené vyššie. Výnimkou boli iba druhy *R. toruloides* a *R. mucilaginosa*, ktoré vykázali výrazne vyšší obsah torularhodínu a ďalších pigmentov.

5.2 Stanovenie obsahu mastných kyselín v kvasinkovej biomase

Pre presné stanovenie mastných kyselín bola využitá plynová chromatografia (GC), ktorá umožnila analýzu profilu jednotlivých mastných kyselín v kvasinkových vzorkách. Zahŕňa identifikáciu jednotlivých mastných kyselín prítomných v kvasinkách, ich kvantifikáciu a hodnotenie ich pomeru a distribúcie, čo je kľúčové pre hodnotenie kvality produkovaných lipidov a ich možného uplatnenia v rôznych odvetviach. Postup prípravy vzoriek je uvedený v kapitole 4.5.3. U všetkých typov kvasiniek bolo sledované celkové percentuálne zastúpenie lipidov v suchej biomase (viď. Obrázok 18). Taktiež boli určované percentuálne zastúpenia nasýtených a nenasýtených mastných kyselín v celkových lipidoch pre jednotlivé vzorky (viď. Obrázok 19). Vzorky boli merané v duplikátoch, výsledky boli následne spriemerované a z dvoch meraní bola vyhodnotená smerodajná odchýlka.

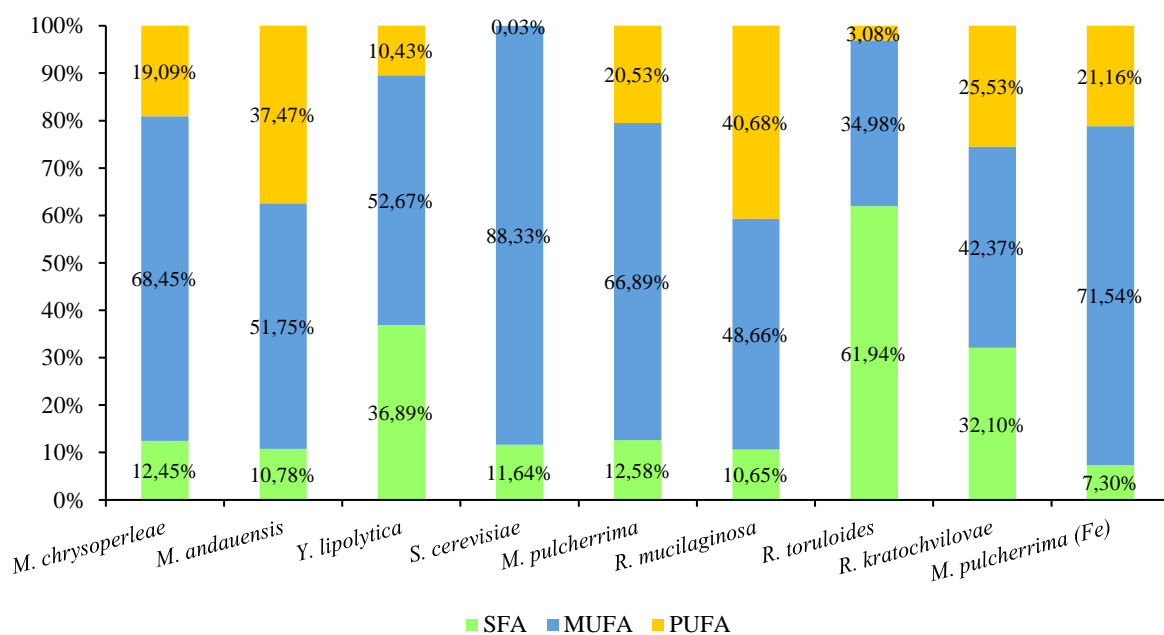


Obrázok 18 Graf znázorňujúci percentuálne zastúpenie lipidov v kvasinkovej biomase

Z uvedeného grafu je možné pozorovať značné rozdiely v obsahu lipidov v analyzovaných vzorkách. Najvyššie percentuálne zastúpenie lipidov bolo zaznamenané u vzorky *Rhodotorula toruloides*, ktorá dosiahla hodnotu približne 16 %. Tento výsledok sa zhoduje s literatúrou, kde je *R. toruloides* často uvádzaná ako významný producent lipidov

so schopnosťou akumulácie i nad 60 % suchej hmotnosti za optimálnych podmienok [76]. Zvýšená produkcia lipidov bola taktiež zaznamenaná u *Yarrowia lipolytica*, čo sa znova zhoduje s informáciami z literatúry, kde je táto kvasinka známa svojou schopnosťou efektívne produkovať lipidy za rôznych kultivačných podmienok [77].

Vyšší obsah lipidov bol pozorovaný aj u kmeňa *Metschnikowia pulcherrima*, a to v porovnaní s bežnými neoleogénnymi kvasinkami, ako je napríklad *Saccharomyces cerevisiae*, ktorá vykazovala len približne 4 % lipidov. Prekvapivo, *M. pulcherrima* kultivovaná s prídavkom železa mala najnižší obsah lipidov, čo naznačuje, že železo mohlo inhibovať lipidovú biosyntézu, pravdepodobne v dôsledku zvýšenej potreby zvládať oxidačný stres. U tejto kvasinky je aj v literatúre opísaná odlišná morfológia buniek a sfarbenie v závislosti na zložení média; obsah železa v médiu vedie k produkcii pulcherrimínu, zatiaľ čo médium bez železa a s vysokým pomerom C/N vedie k vysokej produkcii lipidov [78].



Obrázok 19 Graf znázorňujúci percentuálne zastúpenie nasýtených a nenasýtených mastných kyselín v lipidoch kvasinkovej biomasy

Výsledky analýzy profilu mastných kyselín ukázali výrazné rozdiely medzi jednotlivými kmeňmi kvasiniek. Väčšina analyzovaných kmeňov mala dominantné zastúpenie mononenasýtených mastných kyselín (MUFA), ktoré v niektorých prípadoch predstavovali viac ako 50 % celkového profilu (napríklad *Metschnikowia chrysoperleae* a *Saccharomyces cerevisiae*). Prevalencia MUFA je z technologického hľadiska priaznivá, pretože zvyšuje stabilitu lipidov a ich potenciálnu využiteľnosť v potravinárskych a kozmetických aplikáciách [78].

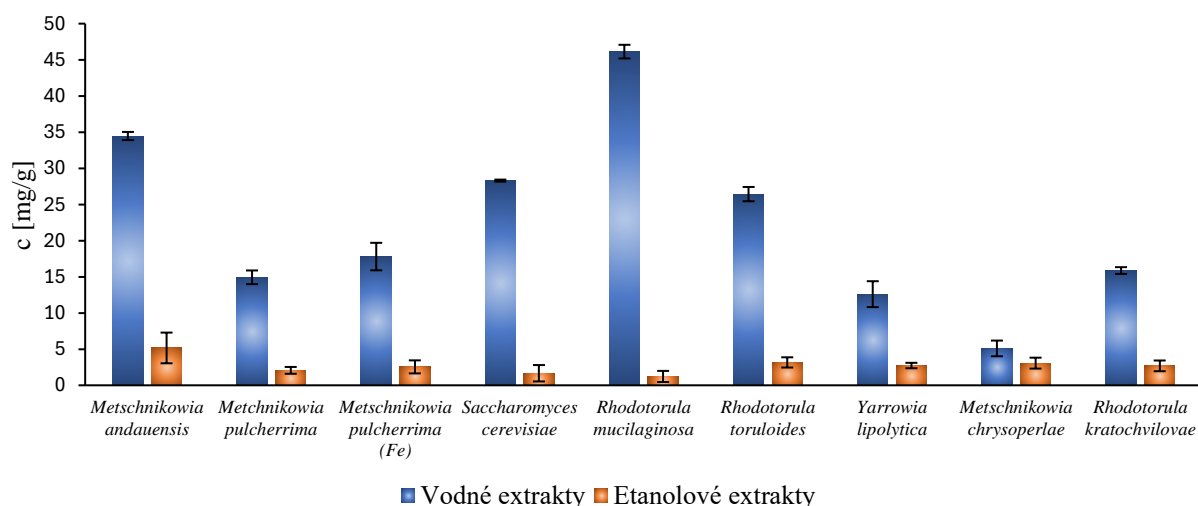
Čo sa týka kmeňa *Metschnikowia*, pomer zastúpenia mastných kyselín bol podobný. Všetky druhy obsahovali najvyšší obsah MUFA a najnižší obsah SFA. Tieto výsledky sú v súlade s literatúrou, ktorá naznačuje, že oleogénne kvasinky, ako *Metschnikowia*, môžu preferovať vyšší obsah MUFA [78].

U *Rhodotorula toruloides* tvorili najvyššie percentuálne zastúpenie nasýtené mastné kyseliny (SFA), kde tvorili približne 62 % celkového obsahu mastných kyselín. Tento profil je typický pre kvasinky produkujúce lipidy určené na technické alebo biopalivové aplikácie, kde je vyšší podiel SFA žiaduci kvôli ich oxidačnej stabilite. Výsledky sa zhodujú s literatúrou, ktorá uvádza, že pri optimálnych podmienkach kmeň *Rhodotorula* obsahuje najviac SFA

a MUFA, konkrétne kyselinu palmitovú a olejovú. Výnimku tvorila vzorka *Rhodotorula mucilaginosa*, kde bolo pozorované najvyššie percentuálne zastúpenie polynenasýtených mastných kyselín (PUFA) zo všetkých vzoriek. PUFA majú rôzne biologické výhody, ako je ich schopnosť podporovať bunkovú membránu, zlepšiť flexibilitu a stabilitu v rôznych podmienkach [79].

5.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity kvasinkových extraktov

K stanoveniu antioxidačnej aktivity bol využitý postup uvedený v kapitole 4.8.1. Výsledky boli spracované prostredníctvom kalibračnej krivky Troloxu $y = 0,0015x$, ktorá slúžila na výpočet antioxidačnej aktivity testovaných extraktov. Výsledky stanovenia antioxidačnej aktivity testovaných kvasinkových extraktov (viď. Obrázok 20) taktiež ukázali výrazné rozdiely medzi vodnými a etanolovými extraktmi. Vzorky boli merané v triplikátoch, výsledky boli následne spriemerované a z meraní bola vyhodnotená smerodajná odchýlka.



Obrázok 20 Graf znázorňujúci antioxidačnú aktivitu kvasinkových extraktov

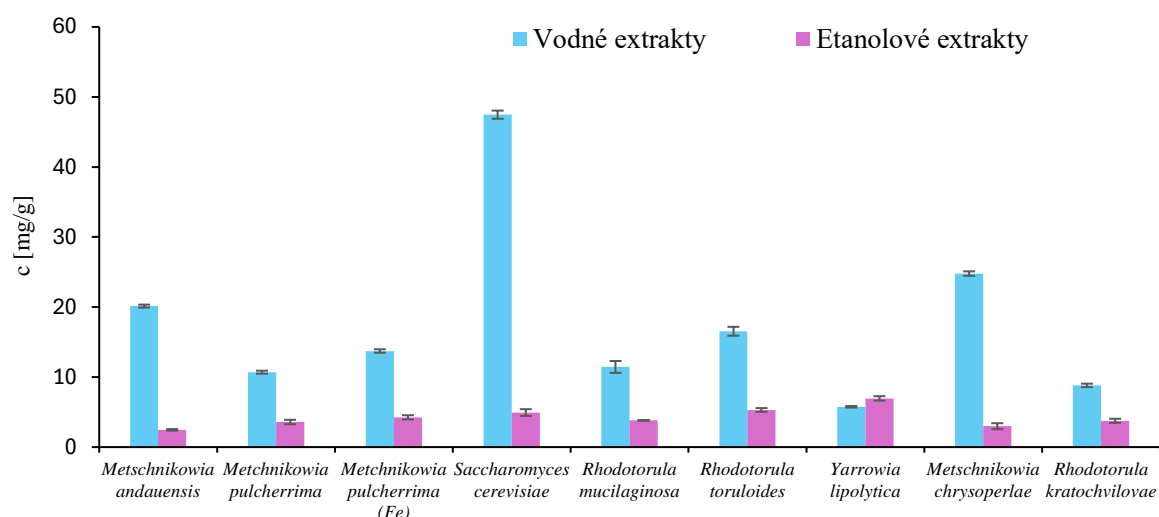
Vo všeobecnosti mali vodné extrakty podstatne vyššiu antioxidačnú aktivitu ako etanolové extrakty, čo sa prejavilo u všetkých testovaných druhov kvasiniek (Príloha 2). Tento trend bol najvýraznejší v prípade *Rhodotorula mucilaginosa*, kde antioxidačná aktivita dosiahla hodnotu 46,13 mg/g v prípade vodného extraktu, zatiaľ čo v etanolovom extrakte to bolo len 1,22 mg/g. Podobný rozdiel bol zaznamenaný aj pri *Metschnikowia andauensis*, kde vodný extrakt vykázal hodnotu 34,47 mg/g, zatiaľ čo etanolový extrakt iba 5,17 mg/g. *Rhodotorula toruloides* a *Saccharomyces cerevisiae* tiež vykazujú výrazný rozdiel medzi vodnými a etanolovými extraktmi. Zaujímavý rozdiel sa objavil aj medzi dvomi variantmi *Metschnikowia pulcherrima*. Zatiaľ čo klasická forma vykazovala vo vodnom extrakte hodnotu 14,93 mg/g, varianta kultivovaná na médiu s prídavkom železa dosiahla vyššiu aktivitu 17,80 mg/g, čo môže súvisieť s aktiváciou antioxidačnej obrany kvasinky v prítomnosti iónov železa.

Vyššia antioxidačná aktivita vo vodných extraktoch môže byť spôsobená už spomínanou lepšou extrakciou bioaktívnych zlúčenín, ako sú polyfenoly (kapitola 5.4) a iné antioxidanty, ktoré sú viac rozpustné v polárnych rozpúšťadlách, akým je voda. Zaujímavé však je, že zistený

obsah karotenoidov pomocou HPLC (kapitola 5.1.2) by podporoval skôr potenciál etanolových extraktov, keďže tieto lipofilné látky sú vo všeobecnosti viac rozpustné v etanole, sú však produkované vo veľmi nízkych koncentráciách. I napriek tomu však výrazne prevažovali koncentrácie vodných extraktov. Výsledky tak naznačujú, že vodné extrakty môžu mať väčší potenciál na využitie v oblasti prírodných antioxidantov.

5.4 Stanovenie obsahu fenolických látok v kvasinkových extraktoch

K stanoveniu obsahu celkových fenolických látok boli využité vodné i etanolové kvasinkové extrakty a meranie prebiehalo podľa postupu v kapitole 4.8.2. Výsledky boli spracované prostredníctvom kalibračnej krivky kyseliny gallovej $y = 1,3355x$, ktorá slúžila na výpočet koncentrácie polyfenolov v jednotlivých vzorkách. Hodnoty boli porovnávané z hľadiska využitých extraktov (vid'. Obrázok 21) a boli vyhodnotené na základe spriemerovania troch meraní, pomocou ktorých bola vypočítaná i smerodajná odchýlka.



Obrázok 21 Graf koncentrácie fenolických látok v kvasinkových extraktoch

Na základe získaných výsledkov stanovenia celkového obsahu fenolických látok je zrejmé, že vo väčšine prípadov mali vodné extrakty výrazne vyšší obsah polyfenolov v porovnaní s etanolovými extraktmi (Príloha 1). Tento trend bol najvýraznejší u kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, kde bol nameraný obsah vo vodnom extrakte až 47,88 mg/g, zatiaľ čo v etanolovom extrakte to bolo iba 4,60 mg/g. Výsledok je zaujímavý najmä v porovnaní s údajmi z literatúry, kde sa koncentrácia fenolických látok v *S. cerevisiae* často pohybuje v nižšom rozmedzí, približne 10 až 30 mg/g sušiny. Niektoré štúdie však uvádzajú, že za určitých podmienok je táto kvasinka schopná produkovať významné množstvá fenolických látok. Napríklad bolo preukázané, že špecifické kmene môžu akumulovať vyšší podiel fenolových kyselín a ďalších bioaktívnych zlúčenín v závislosti od fermentačných podmienok, ako sú typ média, pH, teplota či prítomnosť prekursorov [84, 85].

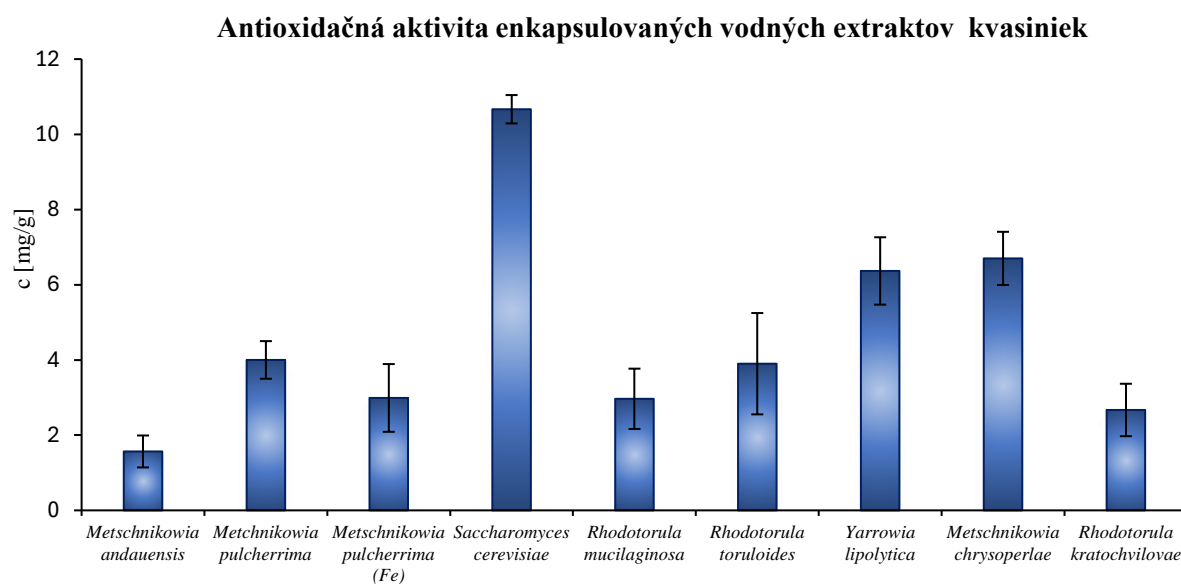
To naznačuje, že *S. cerevisiae* má genetický aj metabolický potenciál na syntézu vyšších koncentrácií fenolov, pokiaľ sú zabezpečené vhodné podmienky, čo by mohlo vysvetľovať zistenú hodnotu v rámci tejto práce. Podobný rozdiel v obsahu fenolov v typoch extraktov bolo možné vidieť aj v kvasinkách *M. andauensis* (19,99 mg/g vs. 2,39 mg/g) či aj *M. chrysoperlae* (24,55 mg/g vs. 2,69 mg/g). Pri kvasinke *Metschnikowia pulcherrima* bol vo vodnom extrakte

z klasického YPD média nameraný obsah 10,55 mg/g, pričom etanolový extrakt obsahoval len 3,81 mg/g. Pri porovnaní s variantom kultivovaným na médiu obohatenom o železo, ktorý podporoval produkciu pigmentu pulcherrimínu, bola hodnota vodného extraktu približne 13,20 mg/g, čo je mierne zvýšenie oproti kultivácií bez železa a môže súvisieť s produkciou sekundárnych metabolitov v prítomnosti železa. Vyššia účinnosť vodnej extrakcie môže byť spôsobená lepšou rozpustnosťou niektorých fenolických zlúčenín vo vode. Fenolické látky sú často vysoko polárne a preto sa prirodzene extrahujú efektívnejšie do polárnych rozpúšťadiel, akým je voda. Zároveň bola pri príprave extraktov použitá mechanická disrupcia buniek, čo je efektívna metóda na narušenie bunkovej steny a uvoľnenie intracelulárne viazaných látok. Táto technika mohla zabezpečiť vyšší výťažok vo vode rozpustných bioaktívnych látok, ako sú napríklad jednoduché fenolové kyseliny, niektoré aminokyseliny, peptidy alebo antioxidanty, ktoré môžu interferovať s Folin-Ciocalteuovým činidlom. Výnimku predstavovala *Yarrowia lipolytica*, kde bol vyšší obsah polyfenolov zaznamenaný pri etanolovom extrakte (7,18 mg/g) v porovnaní s vodným (5,68 mg/g). Tento rozdiel môže byť spôsobený odlišným zložením fenolových zlúčenín produkovaných touto kvasinkou, z ktorých niektoré môžu byť menej polárne a teda lepšie extrahovateľné v prítomnosti etanolu. Nakoniec je treba zmieniť pomerne nízku špecificitu použitej metódy pre stanovenie fenolických látok, kedy je popísaný celý rad interferencií.

5.5 Enkapsulačná účinnosť lipozómov z kvasinkových extraktov

Na základe výsledkov stanovenia antioxidantnej aktivity (kapitola 5.3) a celkových polyfenolov (kapitola 5.4) bolo zistené, že etanolové extrakty nevykazovali uspokojivé hodnoty. Z tohto dôvodu boli pre ďalšie analýzy zvolené výlučne vodné extrakty. Tie totiž vykazovali výrazne vyššie koncentrácie v oboch stanoveniach.

Vodné kvasinkové extrakty boli enkapsulované do lipozómov podľa postupu v kapitole 4.9 a bola zameraná enkapsulačná účinnosť pomocou merania antioxidantnej aktivity vzoriek (viď. *Obrázok 22*). Došlo k porovnaniu antioxidantnej aktivity čistých extraktov s enkapsulovanými extraktmi (viď. *Tabuľka 9*).



Obrázok 22 Graf znázorňujúci antioxidantnú aktivitu enkapsulovaných extraktov kvasiniek

Tabuľka 9 Porovnanie enkapsulačnej účinnosti kvasinkových extraktov

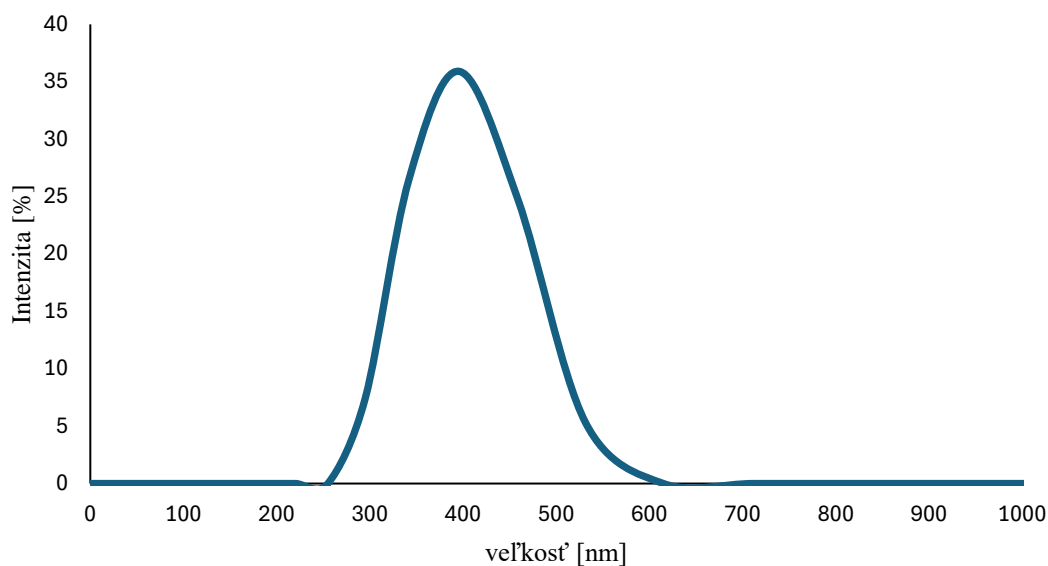
Vzorka	Antioxidačná aktivita čistých extraktov [mg/g]	Antioxidačná aktivita enkapsulovaných extraktov [mg/g]	Rozdiel [%]
<i>Metschnikowia andauensis</i>	34,47	1,57	+95,45
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	14,93	4,00	+73,21
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (Fe)	17,80	2,99	+83,20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28,30	10,67	+62,30
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	46,13	2,97	+93,56
<i>Rhodotorula toruloides</i>	26,43	3,90	+85,24
<i>Yarrowia lipolytica</i>	12,60	6,37	+49,44
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	5,10	6,70	-31,37
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	15,87	2,67	+83,18

Z výsledkov enkapsulačnej účinnosti je zrejme, že u väčšiny kvasinkových extraktov došlo po enkapsulácii k výraznému poklesu antioxidačnej aktivity. Tento pokles znamená, že enkapsulácia bola úspešná a bioaktívne látky boli z veľkej časti uzavreté do lipozómov. Všeobecne totiž platí, že čím nižšia bola nameraná oxidačná aktivita v roztoku po enkapsulácii, tým účinnejšia bola ochrana účinných látok pred vonkajším prostredím.

Najefektívnejšia enkapsulácia bola zaznamenaná u *Metschnikowia andauensis* (pokles o viac než 95 %). Veľmi dobré výsledky však dosiahli aj všetky testované druhy rodu *Rhodotorula*, ktorých účinnosť sa pohybovala v rozmedzí 83-93 % a taktiež obe testované vzorky *Metschnikowia pulcherrima* (73-83 %). Výnimkou bola vzorka *Metschnikowia chrysoperlae*, pri ktorej bola antioxidačná aktivita po enkapsulácii dokonca vyššia ako v prípade čistého extraktu. Je možné, že fosfolipidy použité pri tvorbe lipozómov zlepšili stabilitu a reaktivitu antioxidantov počas testovania [67].

5.5.1 Charakterizácia veľkosti lipozómov

Na charakterizáciu vytvorených lipozómov bola použitá metóda dynamického rozptylu svetla (DLS), ktorá umožňuje určiť veľkosť lipozomálnych častíc. Využitý bol prístroj ZetaSizer Nano a vzorky boli pripravené postupom uvedených v kapitole 4.10.2. Pre každú vzorku s enkapsulovaným extraktom bola vykonaná triplikácia merania. Výsledné hodnoty boli spriemerované a všetky vzorky boli vynesené do grafov závislosti intenzity rozptýleného svetla na veľkosti častíc (viď. Obrázok 23). Ako výstupná hodnota bola získaná priemerná veľkosť častíc (Z-Average). Ďalšie grafy veľkostí častíc sú uvedené v prílohe (viď. Príloha 4).



Obrázok 23 Graf znázorňujúci veľkosť lipozómov na základe intenzity rozptýleného svetla pre vzorku *Metschnikowia pulcherrima*

Pri vzorke lipozómov pripravených z vodného extraktu *Metschnikowia pulcherrima* uvedeného vyššie v grafe bola pozorovaná pomerne úzka distribúcia veľkostí častíc. To by mohlo značiť o jednotnej štruktúre častíc v suspenzii. Veľkosti častíc sa pohybovali v rozsahu približne od 250 do 700 nm, pričom maximum rozptýlenej svetelnej intenzity zodpovedalo časticiam s veľkosťou okolo 400 nm. Na základe výsledkov merania bola určená stredná hodnota veľkosti častíc, čo je vlastne štatisticky vážený priemer častice podľa nameranej intenzity. Hodnota Z-Average pre vzorku *M. pulcherrima* však dosiahla 854,7 nm, čo je vyššie ako hlavné rozmedzie znázornené v grafe. Táto odchýlka môže byť spôsobená prítomnosťou malého množstva väčších častíc alebo agregátov, ktoré napriek svojmu nižšiemu zastúpeniu výrazne ovplyvňujú vážený priemer veľkostí, keďže Z-Average je silne citlivý na intenzitu rozptylu svetla. Podobná odchýlka nastala pri vzorkách *R. kratochvilovae* a *M. andauensis* (viď. Príloha 4). Všetky stredné hodnoty častíc sú zobrazené nižšie (viď. Tabuľka 10).

Tabuľka 10 Namerané hodnoty strednej veľkosti častíc

Vzorka	Stredná hodnota veľkosti častíc [nm]
<i>Metschnikowia andauensis</i>	1126,0
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	854,7
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (Fe)	900,8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1578,5
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	522,4
<i>Rhodotorula toruloides</i>	2929,5
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1095,4
<i>Metschnikowia chrysoperleae</i>	614,3
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	765,2

Najmenšiu priemernú veľkosť častíc vykazovala vzorka lipozómov s extraktom *Rhodotorula mucilaginosa* (522,4 nm), nasledovaná *Metschnikowia andauensis* (614,4 nm) a *Rhodotorula kratochvilovae* (765,2 nm). Tieto hodnoty môžu naznačovať lepšiu stabilitu systému a homogénnejšiu štruktúru. Naopak, najväčšiu veľkosť častíc dosiahla vzorka

obsahujúca extrakt *Rhodotorula toruloides* (2929,5 nm), čo môže byť dôsledkom vyššej tvorby agregátov alebo menej efektívneho zabudovania účinnej látky do štruktúry lipozómov.

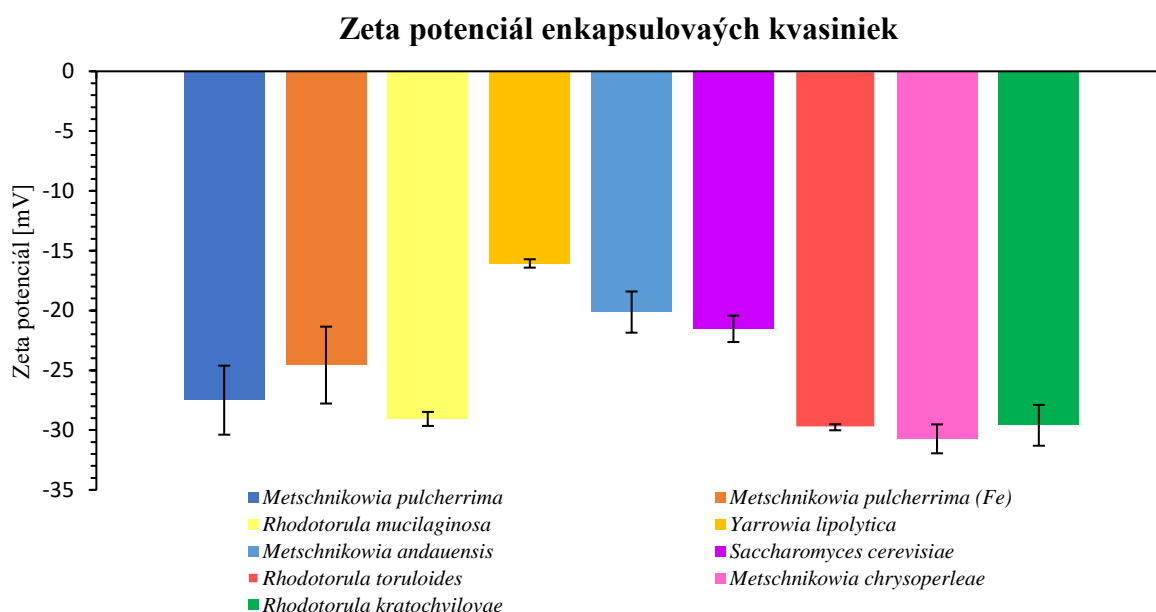
5.5.2 Stanovenie stability lipozómov

Stabilita získaných lipozómov bola taktiež stanovená pomocou prístroja Zeta-Sizer Nano, podľa postupu uvedeného v kapitole 4.10.2. Vyjadruje elektrický náboj na povrchu častíc a tým ovplyvňuje ich vzájomné odpudzovanie. Čím vyššia je absolútna hodnota zeta potenciálu (zvyčajne nad ± 30 mV), tým je systém považovaný za stabilnejší, keďže častice sa menej zhlukujú a ostávajú dispergované v roztoku. Všeobecne sú častice považované za menej stabilné až nestabilné, ak sa nachádzajú v rozmedzí -30 mV až 30 mV [75].

Namerané hodnoty zeta potenciálu pre enkapsulované extrakty sú všetky uvedené v tabuľke nižšie (viď. *Tabuľka 11*) a tiež zobrazené prostredníctvom grafu (viď. *Obrázok 24*).

Tabuľka 11 Namerané hodnoty zeta potenciálu

Vzorka	Zeta potenciál [mV]
<i>Metschnikowia andauensis</i>	-20,13
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	-27,50
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (Fe)	-24,57
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-21,53
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-29,07
<i>Rhodotorula toruloides</i>	-29,77
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-16,07
<i>Metschnikowia chrysoperleae</i>	-30,73
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	-29,6



Obrázok 24 Graf zobrazujúci rozsah nameraných hodnôt zeta potenciálu

Z uvedených výsledkov vyplýva, že boli zistené záporné hodnoty zeta potenciálu vo všetkých vzorkách, čo je typické pre fosfolipidové membrány. Najvyššiu stabilitu

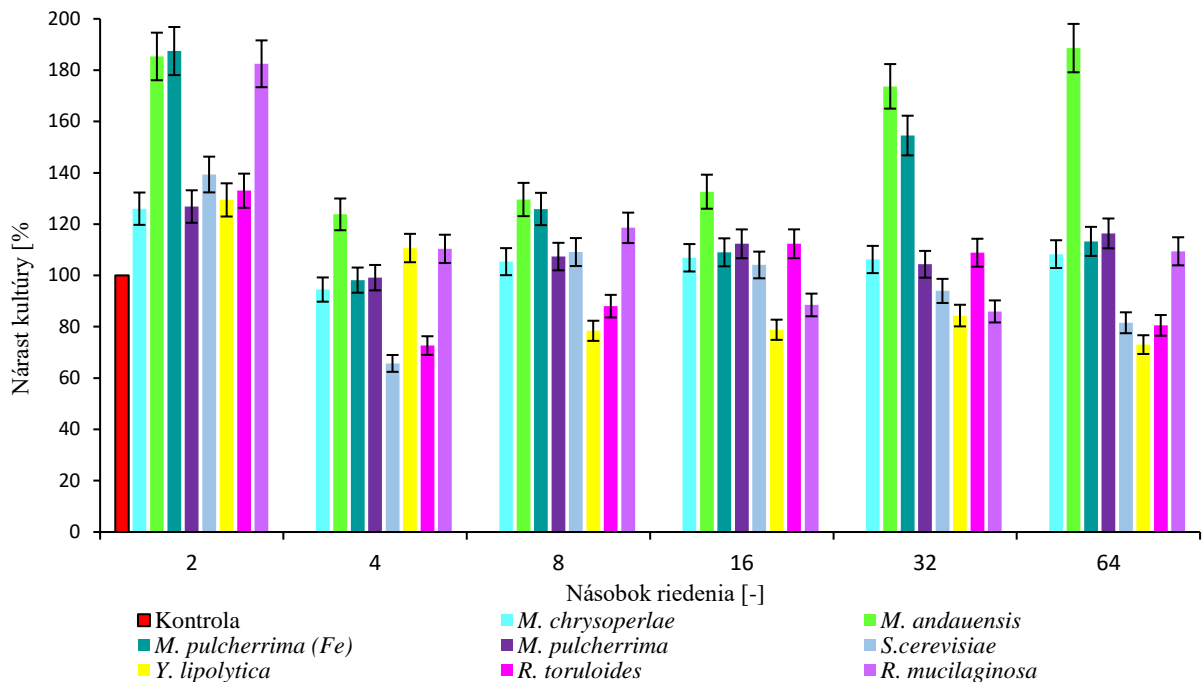
naznačovali vzorky *Metschnikowia chrysoperleae* (−30,73 mV), a všetky vzorky rodu *Rhodotorula*, ktoré dosahovali hodnoty blízke alebo prekračujúce hranicu považovanú za stabilnú. Vysoký záporný náboj pravdepodobne bránil agregácii častíc a pomáhal zachovať homogénnu štruktúru. Naopak, najnižšiu hodnotu zeta potenciálu vykazovali lipozómy extraktu *Yarrowia lipolytica* (−16,07 mV), čo môže naznačovať nižšiu elektrostatickú stabilitu a vyššiu tendenciu k tvorbe agregátov. Tieto výsledky sa zhodujú aj s údajmi o veľkostiach častíc, pričom vzorky s vyšším záporným zeta potenciálom mali často menšie a rovnomernejšie rozložené častice. Opak však ukazovala vzorka *Rhodotorula toruloides*, ktorá dosiahla jeden z najnižších priemerov zeta potenciálu, a teda aj vysokú predpokladanú stabilitu, avšak zároveň vykazovala najvyššiu strednú hodnotu veľkosti častíc (kapitola 5.5.1). Hypoteticky to mohlo byť tým, že vzorka obsahovala aj bunkové fragmenty, ktoré systém DLS zmeral ako veľké častice a zvýšil sa priemerný počet častíc, aj keď väčšina častíc je možno malá a stabilná.

5.6 Antimikrobiálna aktivita extraktov kvasiniek

Účinok testovaných vzoriek na mikroorganizmy bol hodnotený pomocou dvoch komplementárnych metód – meraním inhibície rastu a testom životaschopnosti buniek pomocou farbiva resazurínu. Výsledky antimikrobiálnych testov zhotovených podľa postupu uvedeného v kapitole 4.11 sú uvedené nižšie. Bola prevedená bujónová dilučná metóda za využitia *Escherichia coli* ako zástupcu gramnegatívnych baktérií a *Staphylococcus epidermis* ako grampozitívnej baktérie. Pre prehľadnosť dát boli výsledky rozdelené podľa vykonaných testov na *E. coli* (kapitola 5.6.2) a podľa testov na *S. epidermis* (kapitola 5.6.1). Všetky výsledky testov boli vyjadrené ako percentuálny rast mikrobiálnej kultúry po 24 hodinách v porovnaní s kontrolnou hodnotou, ktorá zobrazuje 100 % rast mikroorganizmov v čistom médiu. Táto kontrola slúži ako referenčný bod, od ktorého sa odvodzujú všetky hodnoty. V prípade, že rast mikroorganizmov v prítomnosti testovaného vzorku neprekročil hodnotu 100 %, znamená to, že vzorka vykazuje určitú úroveň antimikrobiálnej aktivity. V rámci merania boli použité vodné extrakty kvasiniek, pričom ako kontrola pre tieto extrakty poslúžilo práve spomínané čisté médium. Vzorky boli merané v dvoch paralelných meraniach a riedené postupným dvojitým riedením v rozsahu 2 až 64krát, pričom východisková koncentrácia sušiny extraktu bola stanovená na 0,01 g/ml.

5.6.1 Testovanie pomocou baktérie *Staphylococcus epidermis*

Antimikrobiálny účinok vodných extraktov jednotlivých kvasinkových kmeňov bol najskôr hodnotený voči grampozitívnej baktérii *Staphylococcus epidermidis*. Výsledky ukazujú, že niektoré extrakty vykazovali miernu inhibičnú aktivitu, ktorá bola závislá od koncentrácie použitého extraktu. Percentuálny rast mikroorganizmu bol vo väčšine prípadov znížený oproti kontrole (100 %), čo naznačuje prítomnosť bioaktívnych látok s antimikrobiálnym účinkom (viď. Obrázok 25).

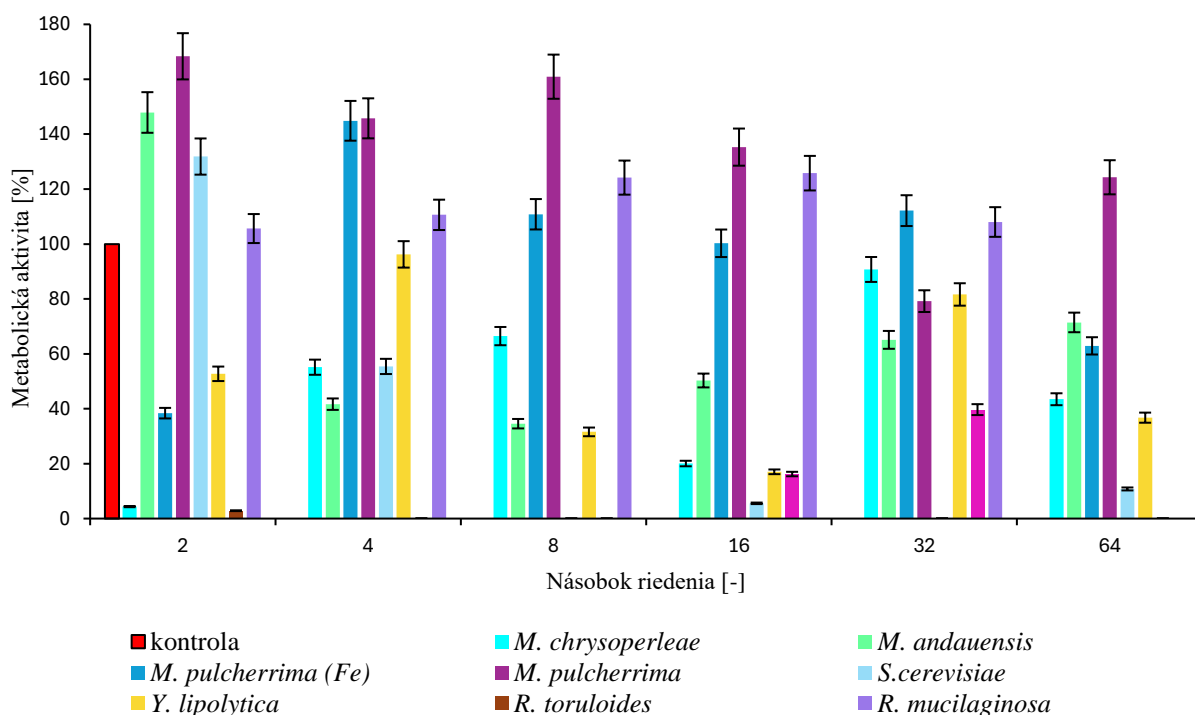


Obrázok 25 Graf znázorňujúci nárast bakteriálnej kultúry *S. epidermidis* na riedených vzorkách po 24 hodinách

Výsledky z grafu ukázali, že žiaden z testovaných extraktov úplne neinhiboval rast *S. epidermidis*. Väčšina z nich viedla k jeho stimulácii, a to i pri nižších riedeniach. Najvýraznejší efekt bol pozorovaný pri extraktoch z *M. andauensis* a *M. pulcherrima* (Fe), ktoré pri 2-násobnom riedení prekročili 180 % rast oproti kontrole a udržali si vysokú aktivitu aj pri 64-násobnom riedení. Zvýšený rast bol pozorovaný aj pri extrakte *R. mucilaginosa*, najmä pri nižších riedeniach, pričom pri vyšších riedeniach sa účinok znižoval, ale stále zostával nad úrovňou kontroly. *S. cerevisiae* ako jediná kvasinka pri 4-násobnom zriedení vyvolala pokles rastu pod 70 %, čo poukazuje na možný mierny inhibičný účinok v tejto koncentrácii. Niektoré extrakty (napr. *Y. lipolytica* a *R. toruloides*) vykazovali kolísavé hodnoty, ktoré sa striedali nad a pod kontrolou v závislosti od riedenia. To môže súvisieť s koncentráciou aktívnych látok v extrakte.

Pri vyhodnocovaní týchto výsledkov je dôležité zohľadniť aj možné skreslenie spôsobené fyzikálnymi vlastnosťami extraktov. Viaceré z nich, najmä z pigmentovaných kvasinkových kmeňov, mali výrazné sfarbenie alebo zákal, čo mohlo ovplyvniť optické merania absorbancie a umelo navýšiť hodnoty rastu. Tento predpoklad podporujú aj výsledky testov životaschopnosti buniek, ktoré pri týchto extraktoch nepreukázali úmerný nárast metabolickej aktivity. Okrem toho bol pozorovaný nezvyčajný trend, kedy vyššie riedenia viedli k silnejšiemu stimulačnému efektu ako nižšie riedenia, čo nie je typické pre správanie antimikrobiálnych látok a naznačuje možný vplyv pigmentov na presnosť merania.

Graf s resazurínovým testom znázorňuje životaschopnosť kultúr v závislosti od zriedenia vzorky (viď. Obrázok 26). Ide o vzťah medzi riedením vzorky a metabolickou aktivitou mikroorganizmov.

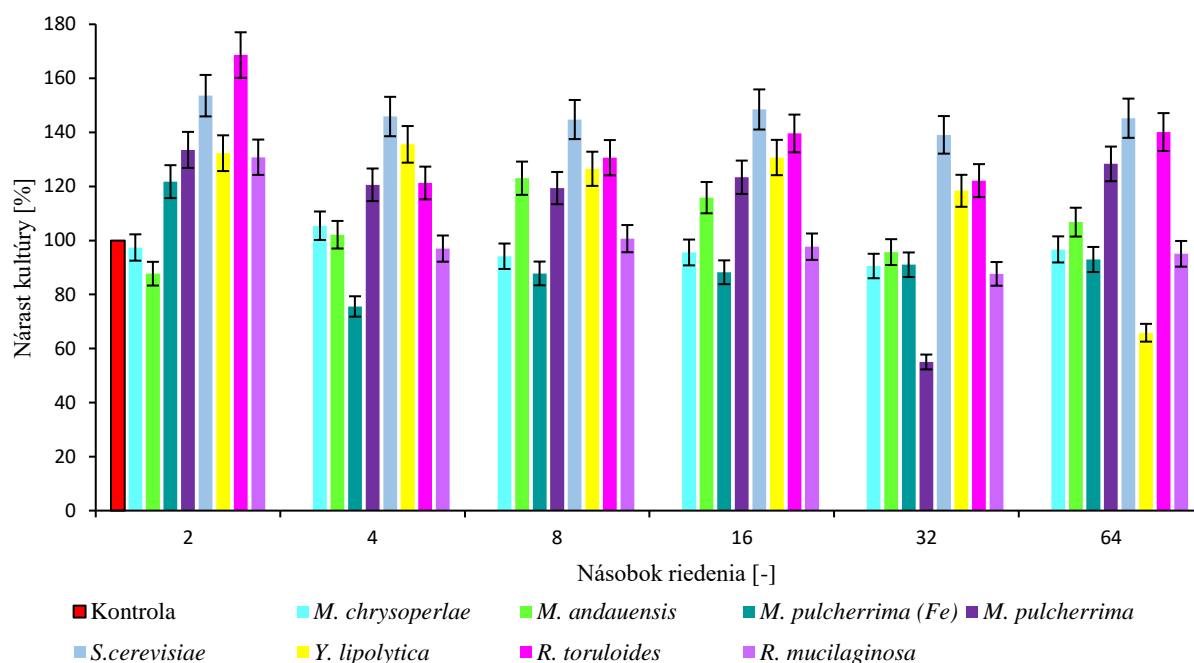


Obrázok 26 Graf vyjadrujúci metabolickú aktivitu *S. epidermidis* pri rôznych riedeniach vzoriek (resazurínový test)

Graficky znázornené výsledky resazurínového testu detekovali rozdiely v metabolickej aktivite baktérie *S. epidermidis* s vodnými extraktmi kvasiniek. Na rozdiel od testu rastu, kde bola najčastejšie zaznamenaná stimulácia, podľa tohto testu viaceré extrakty výrazne znížili metabolickú aktivitu baktérií, najmä pri nižších riedeniach. Najsilnejší inhibičný efekt, teda najväčšie zníženie metabolickej aktivity, bol pozorovaný pri extraktoch *S. cerevisiae* a *R. toruloides*. V ich prítomnosti metabolická aktivita klesala až takmer na nulu, čo naznačuje, že obsahujú účinné látky, ktoré narušajú činnosť bakteriálnych buniek, pravdepodobne blokovaním ich metabolizmu alebo poškodením bunkových štruktúr. Naopak, extrakty *M. pulcherrima*, a najmä jej variant kultivovaný s prídavkom železa, podľa výsledkov vykazovali výraznú stimuláciu metabolickej aktivity baktérie. Taktiež došlo k zvýšeniu u extraktu *R. mucilaginosa*, čo môže naznačovať prítomnosť látok s prebiotickým účinkom. V prípade extraktu *Y. lipolytica* bola metabolická aktivita veľmi nízka pri nižších riedeniach, no pri vyšších riedeniach sa výrazne zvýšila. To naznačuje, že pri vyšších koncentráciách mohla byť prítomná inhibičná látka, ktorá sa však pri zriedení stala menej účinnou. Extrakt *M. andauensis* vykazoval celkom stabilný účinok pri väčšine riedení, okrem prvého, čo by mohlo znamenať potenciálne mierne antimikrobiálne účinky. Pre zhrnutie, najsilnejší efekt bol pozorovaný pri nízkych riedeniach, čo zodpovedá vyššej koncentrácii bioaktívnych látok v extraktoch. Celkovo možno povedať, že účinok extraktov na baktérie sa líšil nielen podľa použitého kmeňa, ale aj podľa koncentrácie.

5.6.2 Test pomocou baktérie *Escherichia coli*

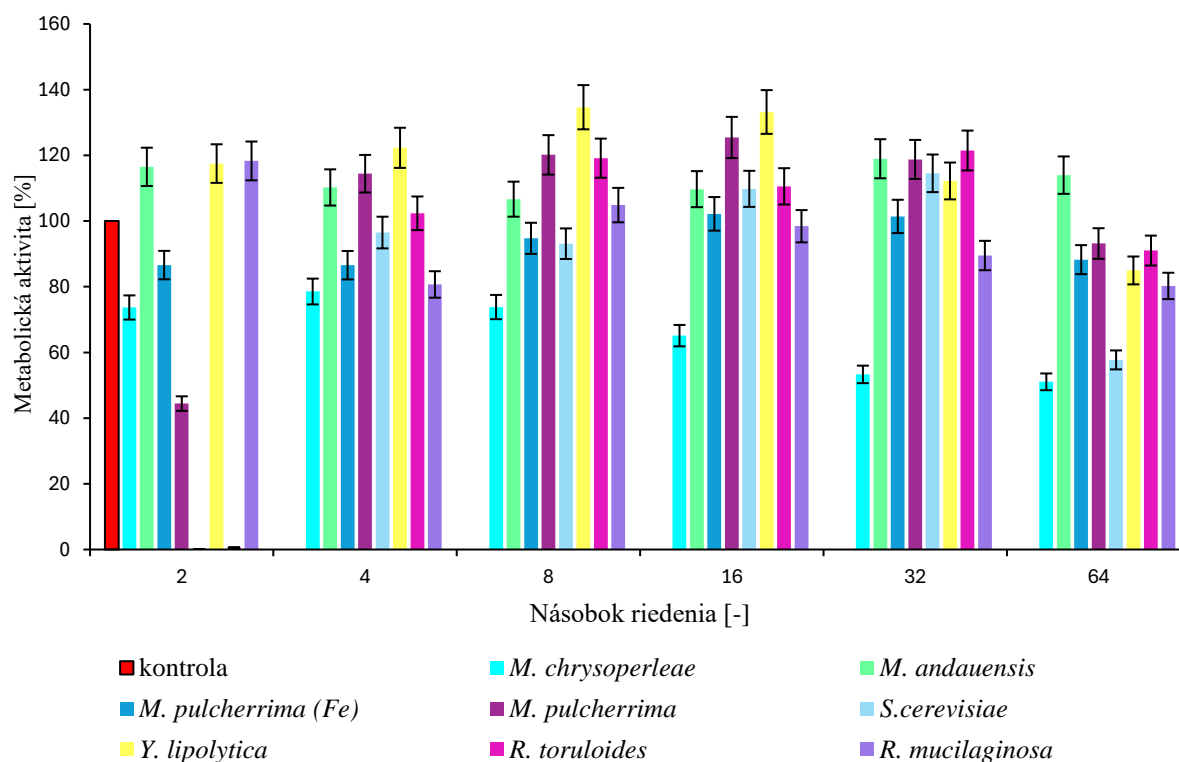
Rovnakým spôsobom ako v predošlej kapitole 5.6.1 bol hodnotený antimikrobiálny účinok voči gramnegatívnej baktérii *Escherichia coli*. Výsledku sú opäť zobrazené pomocou grafického znázornenia (vid'. Obrázok 27).



Obrázok 27 Graf znázorňujúci nárast bakteriálnej kultúry *E. coli* na riedených vzorkách po 24 hodinách

Ako vyplýva z uvedeného grafu, medzi testovanými kvasinkovými extraktmi sa prejavil rozdielny vplyv na rast *E. coli*. Pri extraktoch *M. chrysoperlae* a *M. andauensis* sa pri vyšších koncentráciách (2x a 4x riedené) pozoroval iba mierny pokles rastu mikroorganizmov oproti kontrole, pričom hodnoty rastu zostali pomerne vysoké, čo naznačuje, že tieto extrakty nemajú výrazný inhibičný účinok na *E. coli*. Naopak, extrakt *M. pulcherrima (Fe)* vykazoval silnejší inhibičný účinok. *Saccharomyces cerevisiae* vykazovala najvyšší rast zo všetkých testovaných vzoriek, a to až 153,58 %. Podobne vysoký rast bol pozorovaný aj pri *Y. lipolytica*, kde hodnoty rastu dosiahli 145,86 %. Rast kultúry a ojedinelú inhibíciu vykazovali i *R. toruloides* a *R. mucilaginosa*. Podobne ako pri výsledkoch pre *S. epidermidis*, aj v tomto prípade je potrebné zvážiť možný vplyv optických vlastností extraktov (farebnosť, zákal), ktoré mohli ovplyvniť presnosť merania a prispieť k nadhodnoteniu rastu.

Nižšie uvedený graf s resazurínovým testom opäť znázorňuje životaschopnosť kultúr v závislosti od zriedenia vzorky (viď. Obrázok 28). Nižšie hodnoty indikujú vyšší inhibičný účinok a silnejší pokles životaschopnosti buniek.



Obrázok 28 Graf vyjadrujúci metabolickú aktivitu *E. coli* pri rôznych riedeniach vzoriek (resazurínový test)

Z výsledkov vyplýva, že najvýraznejší stabilný inhibičný účinok na metabolickú aktivitu *E. coli* mal extrakt *M. chrysoperleae*, ktorý vykazoval mierne znižovanie životaschopnosti s rastúcou riedenou kultúrou. Extrakt *S. cerevisiae* sa síce pri najvyššej koncentrácii prejavil ako najviac inhibičný, keďže bola nameraná životaschopnosť 0 %, avšak v ďalších riedeniach sa hodnoty pohybovali nad 90 %. Silnejší účinok bol pozorovaný aj pri extrakte *R. toruloides*, kde životaschopnosť dosiahla hodnotu len 0,6 %, avšak ďalšie hodnoty sa pohybovali taktiež nad 90 %. Nižšiu aktivitu dosiahol i extrakt *M. pulcherrima* (44,4 % pri dvojnásobnom riedení), avšak s rastúcim riedením účinok klesal. Podobne aj *M. pulcherrima* (Fe) stratila časť svojej aktivity pri vyšších riedeniach, avšak mierny inhibičný efekt zostával zreteľný. Pritom práve tento extrakt vykazoval v rámci bujónovej metódy najnižší nárast baktérie. Inhibícia sa z menšej časti prejavila i u *R. mucilaginosa*, s najnižšou aktivitou okolo 80 %. *Y. lipolytica* a *M. andauensis* nevykazovali takmer žiadnu inhibíciu. Z pohľadu výsledkov je možné konštatovať, že pri najvyššej koncentrácii extraktov došlo zrejme k inhibícii u najväčšieho počtu vzoriek. Mohlo to byť spôsobené tým, že vysoká koncentrácia extraktu obsahuje najviac bioaktívnych látok, ktoré môžu narušiť bunkové procesy mikroorganizmov. A teda nižšie koncentrácie touto schopnosťou už neoplyvali.

5.6.3 Vyhodnotenie testovania antimikrobiálnej aktivity

Z prvého testovania antimikrobiálnej aktivity vodných extraktov z kvasiniek vyplýva, že najväčší inhibičný účinok na *S. epidermidis* a *E. coli* mali extrakty *M. pulcherrima* (Fe) a *M. pulcherrima*, ktoré vykazovali silný pokles rastu a metabolickej aktivity pri vyšších koncentráciách. Tieto extrakty môžu obsahovať látky s antimikrobiálnymi účinkami. Extrakty *R. toruloides* a *S. cerevisiae* sa ukázali ako najviac inhibičné pri testovaní metabolickej aktivity.

Celkové hodnotenie výsledkov z prvého testovania však neprinieslo očakávaný inhibičný efekt. Dodatočné kultivácie vzoriek na YPD agarových miskách preukázali rast kvasinkových kolónií, čo naznačuje, že extrakty pravdepodobne obsahovali živé alebo životaschopné bunky. Jedným z možných dôvodov bola nedostatočná dispergácia kvasiniek počas prípravy extraktov, čo mohlo viesť k skresleniu výsledkov. Kvasinky sú totiž schopné rásť aj v médiách primárne určených na kultiváciu baktérií, čo potvrdzuje ich metabolickú flexibilitu. Vzorky vykazovali po 24-hodinovej inkubácii vysoké hodnoty absorbancie, často presahujúce hodnotu 1, čo poukazuje na možný rast kvasinkových buniek v testovacích podmienkach, ale i podporujú hypotézu, že zvýšené hodnoty absorbancie nemuseli byť spôsobené len rastom bakteriálnych buniek, ale aj prítomnosťou pigmentov a zakalenia samotných kvasinkových extraktov, ktoré mohli opticky interferovať s meraním [80].

Z uvedených dôvodov bola príprava extraktov v druhom kole testovania upravená s cieľom eliminovať prítomnosť životaschopných kvasinkových buniek. Pre opakované testovanie boli vybrané štyri druhy kvasiniek: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula toruloides*, *Rhodotorula kratochvilovae* a *Metschnikowia pulcherrima* – v dvoch kultivačných podmienkach (s a bez prídavku železa). Výber bol založený na ich atraktívnych vlastnostiach z hľadiska probiotického a postbiotického potenciálu, vrátane produkcie bioaktívnych pigmentov, ako sú pulcherrimín alebo karotenoidy. Napríklad *R. mucilaginosa* je známa schopnosťou uvoľňovať veľké množstvo exopolysacharidov, čo môže podporovať rast probiotických baktérií [81].

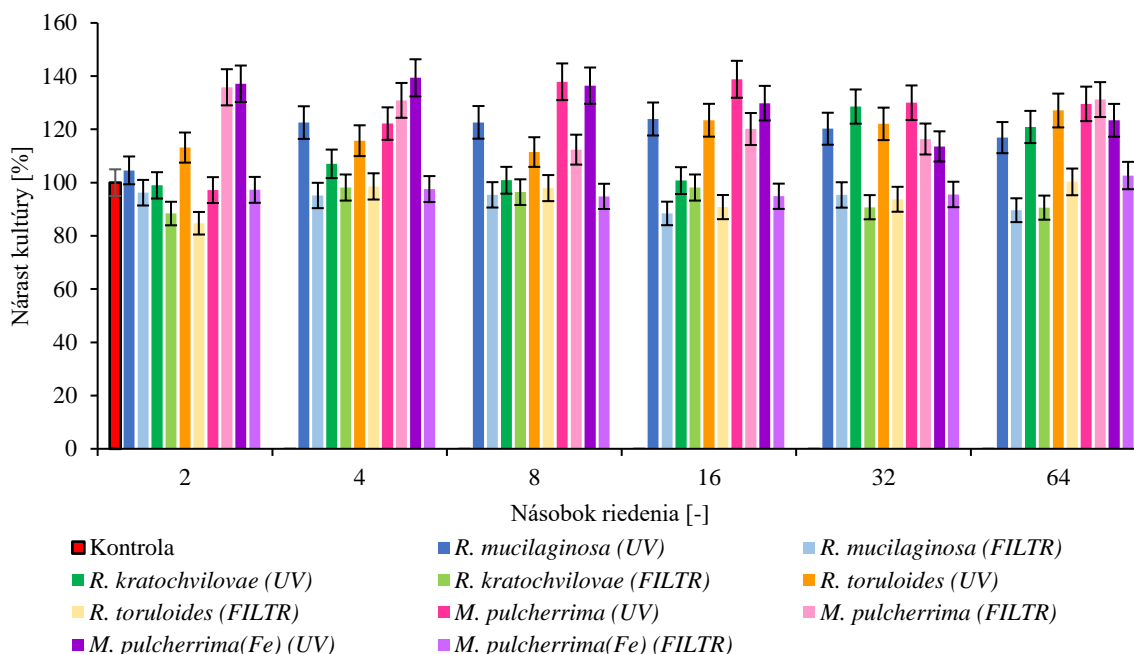
Aby sa minimalizovalo riziko kontaminácie živými bunkami, extrakty boli podrobené dlhšiemu procesu dispergácie s dôrazom na dôkladné narušenie bunkových stien. Okrem toho sa aplikovali dve rôzne techniky prípravy, podrobne opísané v kapitole 4.11.1. Prvým prístupom bolo vystavenie extraktov UV žiareniu, ktoré však môže mať nevýhodu v podobe degradácie citlivých antimikrobiálnych pigmentov. Z tohto dôvodu sa paralelne testovali aj vzorky upravené pomocou sterilizačného bakteriocídneho filtra. Filtračná metóda bola zvolená na základe veľkostných rozdielov medzi bunkami baktérií a kvasiniek. Zatiaľ čo bakteriálne bunky majú typicky veľkosť do 2 μm , kvasinky dosahujú veľkosť 1 až 10 μm . Použitý filter tak umožňuje priechod len menších molekúl, ako sú fragmenty bunkových stien, pigmenty alebo iné bioaktívne látky, zatiaľ čo bunky kvasiniek by mali zostať zachytené. Cieľom týchto úprav bolo zabezpečiť, aby antimikrobiálne testy vyhodnocovali skutočný účinok extraktu bez skresľovania výsledkov.

5.7 Antimikrobiálne testy vybraných kvasinkových extraktov

Vybrané druhy extraktov boli testované v dvoch variantách. Prvá zahŕňala UV ošetrované vzorky a druhá filtrované vzorky. Grafy nižšie zobrazujú porovnanie výsledkov testovania týchto dvoch rôznych techník prípravy vzoriek.

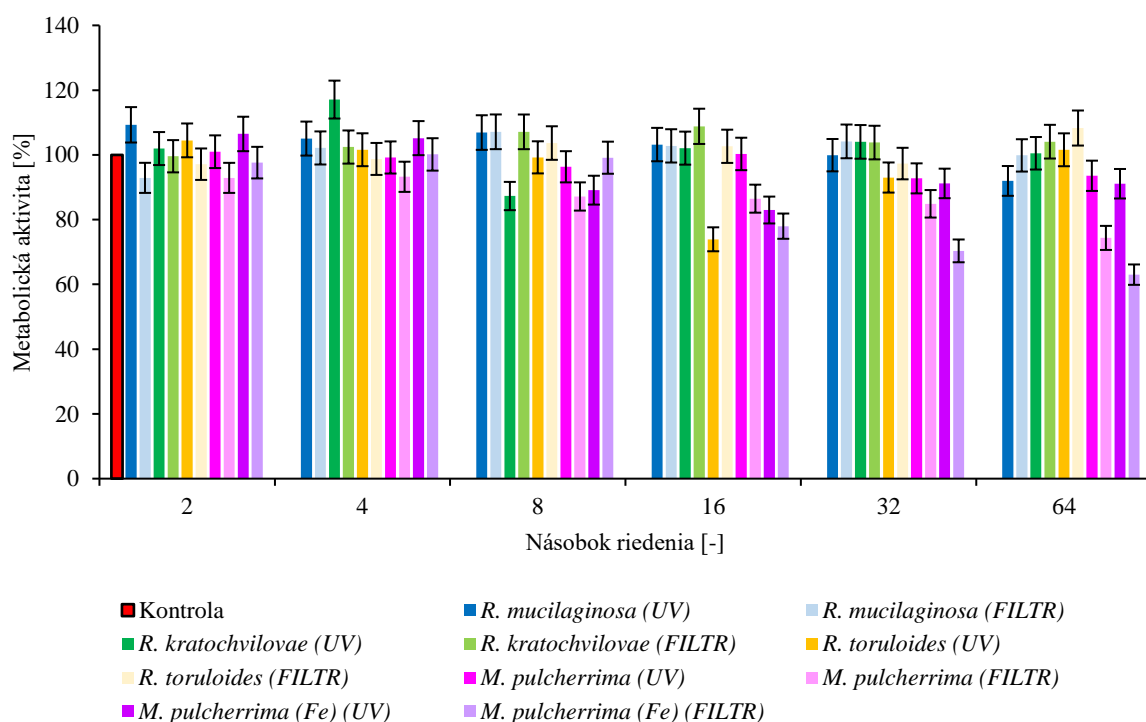
5.7.1 Testovanie baktérie *Staphylococcus epidermis*

Uvedený graf zobrazuje nárast bakteriálnej kultúry po 24 hodinách, pričom uvádza výsledky kvasinkových extraktov vystavených UV žiareniu a tiež výsledky, ktoré vychádzajú zo vzoriek filtrovaných extraktov (vid'. Obrázok 29).



Obrázok 29 Graf znázorňujúci porovnanie nárast bakteriálnej kultúry *S. epidermis* na UV ošetrovaných vzorkách a filtrovaných vzorkách

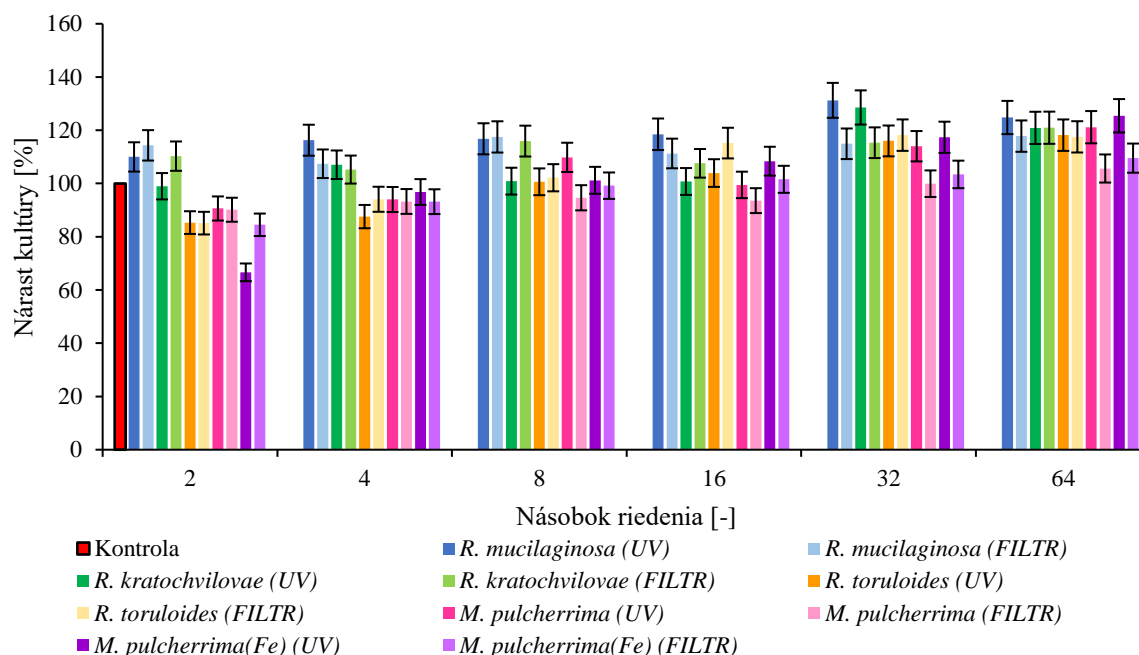
Výsledky z grafu ukázali, že ani v druhom kole testovania, za využitia dekontaminačných techník, žiaden z použitých extraktov úplne neinhiboval rast *S. epidermidis*. Z nameraných dát vyplýva, že filtrované vzorky mali lepšie inhibičné účinky na *Staphylococcus epidermidis* v porovnaní s UV ožiarenými vzorkami, aj keď hodnoty inhibície boli stále relatívne nízke, pričom nárast kultúry baktérie bol vysoký aj pri najnižšej hodnote inhibície. Spomedzi filtrovaných vzoriek vykazovali najvýraznejšiu inhibíciu kvasinky *Rhodotorula*, čo naznačuje, že tieto kvasinky majú silnejšie antimikrobiálne vlastnosti v porovnaní s inými testovanými druhmi. Naopak, UV ožiarené vzorky vykazovali prevažne výsledky nad 100 % kontrolou, čo naznačuje, že UV žiarenie mohlo spôsobiť spomínaný rozklad citlivých pigmentov, ako karotenoidy, čo viedlo k vysokej strate bioaktívnych zložiek a k výslednému prejavu podpory rastu baktérie. Zaujímavým zistením je, že *M. pulcherrima* v oboch prípadoch prípravy (UV žiarenie aj filtrácia) nevykazovala žiadny inhibičný účinok na *S. epidermidis*.



Obrázok 30 Graf znázorňujúci porovnanie metabolickej aktivity *S. epidermidis* na UV ošetrovaných vzorkách a filtrovaných vzorkách v rámci resazurínového testu

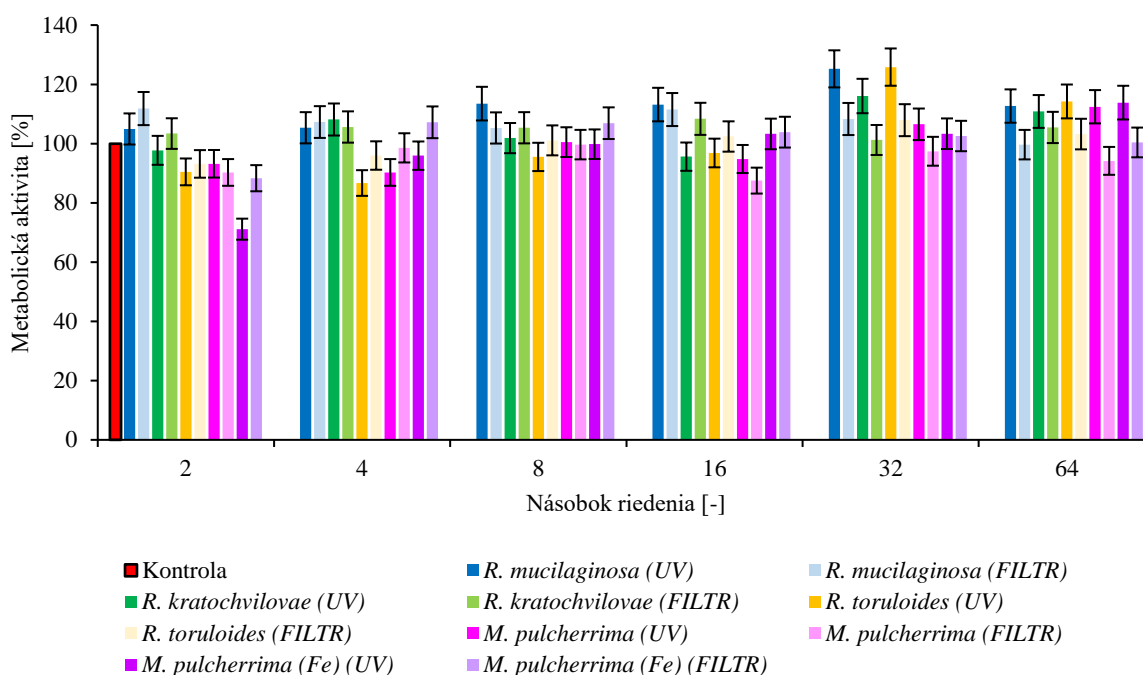
Graficky znázornené výsledky resazurínového testu (viď. Obrázok 30) detekovali podobné trendy ako pri teste inhibície rastu. Väčšina vzoriek vykazovala iba mierne zníženie metabolizmu alebo dokonca zvýšenie v porovnaní s kontrolou. Filtrované extrakty v prípade niektorých vzoriek (*M. pulcherrima*, *M. pulcherrima* (Fe)) preukázali výraznejší inhibičný efekt, najmä pri vyšších riedeniach, kde bol zaznamenaný pokles metabolickej aktivity až na približne 63 % pri extrakte *M. pulcherrima* (Fe). Naopak, pri UV ožiarených vzorkách bola vo väčšine prípadov metabolická aktivita porovnateľná alebo dokonca mierne vyššia ako v kontrole, čo potvrdzuje predchádzajúce pozorovania. Celkovo tieto výsledky naznačujú, že filtrácia extraktov môže mať mierne väčší inhibičný efekt na *S. epidermidis* než UV ožiarenie, ale účinnosť zostáva nízka.

5.7.2 Testovanie baktérie *Escherichia coli*



Obrázok 31 Graf znázorňujúci porovnanie nárast bakteriálnej kultúry *E. coli* na UV ošetrených vzorkách a filtrovaných vzorkách

Z grafu testovania inhibičného účinku extraktov (viď. Obrázok 31) vyplýva, že v porovnaní s prvým testovaním, kde neboli extrakty upravené uvedenými technikami, sa v tomto druhom experimente vo väčšine prípadov nedosiahli o dosť lepšie inhibičné účinky. Dispergácia spojená s UV žiarením mala len veľmi mierny inhibičný efekt, ktorý sa prejavil najmä pri extrakte *M. pulcherrima* (Fe) (UV) pri riedení 2krát, kde bol zaznamenaný najnižší rast spomedzi všetkých vzoriek (66,62 %). Pri vyšších riedeniach však aj tento extrakt začal podporovať rast baktérií. Ďalej i extrakty *R. mucilaginosa* a *R. toruloides*, pri oboch typoch prípravy vzoriek, často podporovali rast *E. coli*. V rámci pigmentov v extraktoch, najmä karotenoidov, mohlo dôjsť k spomínanému rozkladu vplyvom UV žiarenia, čo by vysvetľovalo, prečo UV žiarením ošetrené vzorky nemali inhibičné účinky pri kvasinkách rodu *Rhodotorula*. Filtrácia vo všeobecnosti v prípade *E. coli* neznižovala stimulačný účinok, čo znamená, že pre silnejší inhibičný účinok bude zrejme potrebné zamerať sa na koncentrovanejšie extrakty, prípadne kombináciu viacerých antimikrobiálnych látok.



Obrázok 32 Graf znázorňujúci porovnanie metabolickej aktivity *E. coli* na UV ošetrovaných vzorkách a filtrovaných vzorkách v rámci resazurínového testu

Výsledky resazurínového testu metabolickej aktivity *E. coli* (viď. Obrázok 32) potvrdzujú závery diskutované pri hodnotení rastu kultúry. Väčšina extraktov, najmä po UV ožiarení, nevykazovala výrazný inhibičný účinok, pričom metabolická aktivita baktérií často prevyšovala hodnoty kontroly. Výnimkou bol extrakt *M. pulcherrima* (Fe) (UV) pri dvojnásobnom riedení, kde bola zaznamenaná najnižšia metabolická aktivita (71,1 %), čo koreluje s najnižším nárastom kultúry práve u tejto vzorky. Filtrované vzorky vykazovali mierne lepšie výsledky než UV ošetrované, avšak inhibícia zostávala nízka. Rovnako ako pri raste kultúry, aj tu filtrácia mierne znižovala stimulačný efekt, no na dosiahnutie výraznejšej inhibície by bolo potrebné zvážiť už spomínané koncentrovanejšie extrakty alebo ich kombinácie.

5.7.3 Vyhodnotenie testovania vybraných kvasinkových extraktov

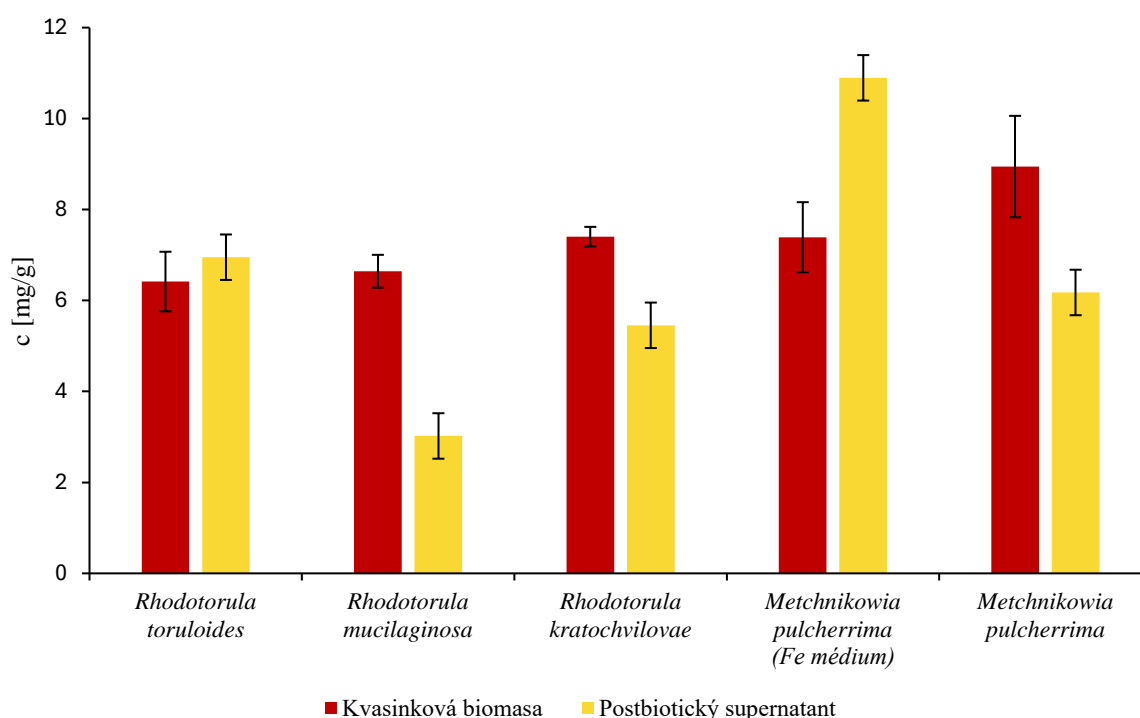
Výsledky testovania inhibičného účinku extraktov na baktérie *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli* ukázali podobné trendy pri oboch mikroorganizmoch, pričom väčšina testovaných extraktov, aj po použití dekontaminačných techník, nepreukázala výrazný inhibičný účinok. V prípade *S. epidermidis* filtre preukázali lepšie inhibičné účinky než UV ožiarenie, ale hodnoty inhibície zostali stále relatívne nízke, pričom nárast kultúry baktérie bol vysoký aj pri najnižšej hodnote inhibície. Medzi filtrovanými vzorkami sa najvýraznejšiu inhibíciu prejavili kvasinky rodu *Rhodotorula*. Podobné výsledky sa pozorovali aj pri *Escherichia coli*, kde UV žiarenie malo len veľmi mierny inhibičný účinok. Výraznejšie inhibičné účinky boli zaznamenané pri extrakte *M. pulcherrima* (Fe) (UV). Výsledky resazurínového testu metabolickej aktivity bakteriálnych kultúr potvrdzujú tieto zistenia. Filtrácia extraktov sa ukázala ako mierne efektívnejšia než UV ožiarenie, ale na zlepšenie antimikrobiálneho účinku bude potrebné ďalej optimalizovať podmienky testovania.

Z praxe vyplýva, že výraznejšie antimikrobiálne účinky sa dajú očakávať pri testovaní celej imortalizovanej kvasinkovej biomasy obsahujúcej všetky prítomné aktívne zložky.

Problémom prevedených testov je pravdepodobne aj malá citlivosť spektrofotometrických a turbidimetrických meraní, kde sa dá očakávať celý rad interferencií zákalom, pigmentáciou a ďalšími faktormi.

5.8 Stanovenie celkových sacharidov podľa Duboisa

Obsah celkových sacharidov bol stanovený spektrofotometrickou metódou podľa Duboisa vo vodných extraktoch a zároveň aj v supernatantoch získaných po kultivácii kvasiniek (tzv. postbiotikách). Všetky vzorky boli pripravené rovnakým spôsobom podľa postupu uvedeného v kapitole 4.8.2. Na zostavenie kalibračnej krivky bol použitý štandardný roztok glukózy, pričom kalibračná rovnica nadobudla tvar $y = 11,221x$. Namerané hodnoty koncentrácií sú uvedené v prílohe (viď. *Príloha 3*) a znázornené v grafe (viď. *Obrázok 33*). Výsledky sú uvedené ako priemerné hodnoty s výpočtom smerodajných odchýlok troch meraní.



Obrázok 33 Graf znázorňujúci stanovenie obsahu celkových sacharidov a porovnanie výsledkov v kvasinkových extraktoch a postbiotickom supernatate

Z uvedeného grafu vyplýva, že väčšina testovaných kvasiniek vykazovala vyšší obsah sacharidov v kvasinkových extraktoch v porovnaní s postbiotickými supernatantmi, čo je v súlade s očakávaniami, že kvasinkové bunky obsahujú značné množstvo polysacharidov, ktoré sú koncentrované v bunkových stenách. Na druhej strane, postbiotický supernatant obsahuje prevažne oligosacharidy a ďalšie rozpustné metabolity, ktoré vznikajú počas kultivácie [81]. Rozdiely však prekvapivo neboli príliš veľké a všetky testované kmene produkovali exopolyméry.

Pre kvasinky rodu *Rhodotorula* bolo potvrdené očakávanie, že kvasinkové extrakty budú obsahovať vyšší obsah sacharidov než postbiotické supernatanty. *Rhodotorula toruloides*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula kratochvilovae* - všetky vykazovali vyšší obsah sacharidov v extraktoch, čo potvrdzuje spomínaný fakt akumulácie polysacharidov v bunkových stenách. Tieto polysacharidy sú ťažko rozpustné, a preto sa nachádzajú prevažne

v bunkách, zatiaľ čo supernatant obsahuje rozpustnejšie metabolity, nie bunkové štruktúry. V prípade *Metschnikowia pulcherrima* na železitom médiu bol zaznamenaný nezvyčajný výsledok, keď obsah sacharidov v postbiotickom supernatante bol vyšší než v kvasinkovom extrakte. Tento efekt môže byť spojený s prítomnosťou pulcherrimínu, ktorý je produkovaný v prítomnosti železa, a ktorý môže ovplyvniť metabolizmus kvasiniek. Pulcherrimín mohol stimulovať produkciu rozpustných sacharidov, ktoré sa následne uvoľnili do média. Železité médium mohlo podporiť tiež stresové metabolické dráhy, čo mohlo viesť k vyššej produkcii a vylučovaniu ochranných polysacharidov do supernatantu. Potvrdzovalo by to i fakt, že u *Metschnikowia pulcherrima* kultivovanej bez prítomnosti železa tento efekt nenastal a výsledky boli v súlade s očakávaniami. Celkovo však mal tento typ kvasinky najvyšší pomer zastúpenia exopolysacharidov, čo naznačuje jeho potenciál v rámci vývoja funkčných potravín ako prebiotiká, ktoré podporujú rast zdravých črevných mikroorganizmov.

5.9 Rast probiotických baktérií v prítomnosti kvasinkových extraktov

Na základe potenciálne priaznivého účinku vybraných kvasinkových extraktov boli realizované pokusy zamerané na ich interakciu s probiotickými baktériami *Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium bifidum*. Cieľom bolo sledovať, či prítomnosť extraktov ovplyvní rast a životaschopnosť mikroorganizmov počas spoločnej kultivácie. Rast kultúr bol sledovaný meraním zákalu pred a po kultivácii, a to podľa postupu uvedeného v kapitole 4.12. Meranie zákalu poskytlo orientačné hodnotenie rastu v jednotlivých vzorkách. Pre kultiváciu za využitia baktérií boli výsledky uvedené ako percentuálny nárast alebo pokles kultúry (viď. *Tabuľka 12* a *Tabuľka 13*). Po meraní zákalu kultúry boli vzorky inokulované na MRS agarové misky. Po inkubácii pri teplote 37 °C po dobu 24 hodín bol zaznamenaný nárast kultúry, čo sa prejavilo tvorbou kolónií na agarových miskách. Kolónie boli následne spočítané pomocou čítačky kolónií, čo umožnilo zaznamenať počet rastúcich kolónií (viď. *Tabuľka 12* a *Tabuľka 13*).

Tabuľka 12: Namerané hodnoty zákalu pre extrakty kultivované v prostredí L. rhamnosus

Vzorka	Rozdiel OD	CFU/ml
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	5,5	$9,45 \times 10^3$
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	6,7	$4,55 \times 10^3$
<i>Rhodotorula toruloides</i>	5,0	$7,37 \times 10^3$
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	5,0	$1,07 \times 10^4$
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (Fe)	4,9	$1,34 \times 10^4$

V tabuľke je dokumentovaná sledovaná zmena optickej hustoty (OD) pred a po kultivácii s cieľom vyhodnotiť rast *Lactobacillus rhamnosus* v prítomnosti kvasinkových extraktov, spolu so stanovením počtu kolóniotvorných jednotiek pre porovnanie výsledkov. Vo všetkých vzorkách bol pozorovaný výrazný nárast zákalu, čo poukazuje na rast probiotickej kultúry. Najvyšší zákal bol zaznamenaný pri vzorke *R. kratochvilovae* ($\Delta OD = 6,7$), pričom najnižší bol pri vzorke *M. pulcherrima* (Fe) ($\Delta OD = 4,9$). Pri porovnaní s výsledkami CFU/ml sa však ukázalo, že počet životaschopných buniek nebol vždy priamo úmerný zmene zákalu. Najvyššia koncentrácia baktérií po kultivácii bola zistená vo vzorke *M. pulcherrima* (Fe) ($1,34 \times 10^4$ CFU/ml), nasledovaná *M. pulcherrima* ($1,07 \times 10^4$ CFU/ml). Naopak, nižšie počty CFU boli pozorované u kvasiniek *Rhodotorula*, aj napriek najvyššiemu zistenému zákalu u týchto vzoriek. Výsledky poukazujú na fakt, že samotné meranie zákalu nemusí dostatočne odrážať životaschopnosť kultúr a viabilita môže byť ovplyvnená aj prítomnosťou neaktívnych buniek, bunkových fragmentov alebo metabolických produktov. Zaujímavé však je, že všetky kvasinky vykázali pozitívny vplyv na rast baktérie. Tento efekt môže byť výsledkom interakcií

medzi bioaktívnymi zložkami v extraktoch kvasiniek, ako sú oligosacharidy, exopolysacharidy alebo ďalšie metabolity, ktoré môžu potenciálne fungovať ako prebiotiká pre *Lactobacillus rhamnosus* [82].

Rozdiely v počte kolónií medzi jednotlivými vzorkami sú ilustrované na obrázkoch nižšie (viď. Obrázok 34 a Obrázok 35).



Obrázok 34 Vizualná ukážka počtu kolónií pre kvasinku *M. pulcherrima* (*L. rhamnosus*) - vľavo *M. pulcherrima* (Fe) (s najvyšším detekovaným množstvom kolónií) a vpravo *M. pulcherrima*



Obrázok 35 Vizualná ukážka počtu kolónií pre kvasinky *Rhodotorula* (*L. rhamnosus*): A – *R. mucilaginosa*; B – *R. kratochvilovae*; C – *R. toruloides*

Tabuľka 13: Namerané hodnoty zákalu pre extrakty kultivované v prostredí *B. bifidum*

Vzorka	Rozdiel OD	CFU/ml
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	5,4	$2,01 \times 10^4$
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	6,0	$2,04 \times 10^4$
<i>Rhodotorula toruloides</i>	4,9	$7,45 \times 10^3$
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	3,5	$5,60 \times 10^3$
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (Fe)	3,2	$9,94 \times 10^3$

Výsledky pre *Bifidobacterium bifidum* uvedené v tabuľke ukazujú, že kvasinky *Rhodotorula*, výrazne podporili rast baktérie nárastom zákalu až do 6,0 OD a i najvyšším počtom kolónií. Výsledky pre *Metschnikowia pulcherrima* ukázali menší, ale stále viditeľný nárast kultúry. Aj tu bolo pozorované, že zmena zákalu nie vždy presne korešpondovala s počtom životaschopných buniek. Rozdiely v počte kolónií sú taktiež ilustrované na obrázkoch nižšie (viď. Obrázok 36 a Obrázok 37).



Obrázok 36 Vizualna ukážka počtu kolónií pre kvasinky *Rhodotorula* (*B. bifidum*):
A – *R. mucilaginosa*; B – *R. kratochvilovae*; C – *R. toruloides*



Obrázok 37 Vizualna ukážka počtu kolónií pre kvasinku *M. pulcherrima* (*B. bifidum*) - vľavo
M. pulcherrima (Fe) a vpravo *M. pulcherrima*

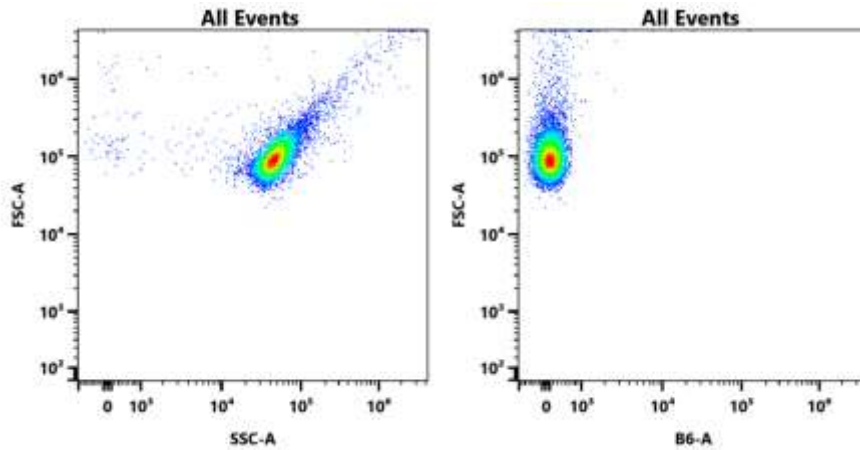
Výsledky z testov rastu probiotických baktérií po aplikácii vodných extraktov z vybraných kvasinkových kmeňov boli taktiež vyhodnotené semikvantitatívne na základe počtu kolónií. V prípadoch, keď počet kolónií spadal do rozmedzia 30–300, bývajú výsledky uvádzané presne číselne. Keďže však väčšina hodnôt prekročila túto hranicu, prehľadnosť výsledkov bola zabezpečená zavedením kvalitatívneho či semikvantitatívneho hodnotenia rastu pomocou trojstupňovej škály: „+“ (nízky počet kolónií), „++“ (stredný počet kolónií), a „+++“ (vysoký počet kolónií) (vid'. *Tabuľka 14*). *Tabuľka* sumarizuje výsledky počtu kolónií, ktoré boli analyzované vyššie, a slúži ako prehľadná forma ich porovnania medzi jednotlivými vzorkami.

Tabuľka 14 Hodnotenie počtu kolónií u jednotlivých vzoriek

Vzorka	Hodnotenie počtu kolónií (<i>L. rhamnosus</i>)	Hodnotenie počtu kolónií (<i>B. bifidum</i>)
<i>R. mucilaginosa</i>	++	+++
<i>R. kratochvilovae</i>	+	+++
<i>R. toruloides</i>	++	++
<i>M. pulcherrima</i>	+++	+
<i>M. pulcherrima</i> (Fe)	+++	+++

V rámci zisťovania životaschopnosti kultivovaných mikroorganizmov bol prevedený test pomocou prietokovej cytometrie, kedy bolo sledované, či je populácia buniek uniformná alebo zmiešaná, podľa postupu v kapitole 4.12. Tie boli totiž po stanovení zákalu kultúry kultivované

na agarových miskách po dobu 24 hodín a bol zistený súvislý nárast kultúry u všetkých vzoriek. Cieľom bolo zistiť, či kvasinky prežili v týchto kultúrach a aká bunka (probiotická baktéria alebo kvasinka) prevládala v kultúre po inkubácii. Výstupy boli porovnané s modelovým výstupom pre kvasinku a prišlo sa k záveru, že všetky vzorky reagovali veľmi podobne (viď. Obrázok 38).



Obrázok 38 Grafy znázorňujúce výstupy z merania bunkovej kultúry *L. rhamnosus* a *M. pulcherrima*

Všade sa potvrdil nárast kultúry bakteriálnych buniek, avšak kvasinkové bunky neboli zachytené. Ich životaschopnosť mohla byť ovplyvnená aj predchádzajúcou mechanickou dispergáciou pri príprave vzoriek, ktorá mohla viesť k narušeniu bunkovej štruktúry. Všetky vzorky znázorňovali prežitie bakteriálnej kultúry, čo naznačuje, že kvasinky neprežili počas kultivácie v prítomnosti probiotických baktérií. Výstupy z cytometra sú ukážkovo znázornené v prílohách pre kvasinku *Rhodotorula toruloides*, keďže u všetkých vzoriek došlo k rovnakému výsledku (viď. Príloha 5). Tieto výsledky ukazujú, že rozrušené bunkové štruktúry kvasiniek z rodov *Rhodotorula* a *Metchnikowia* neboli schopné prežiť v konkurenčnom prostredí s probiotickými baktériami, ako sú *Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium bifidum*. Je pravdepodobné, že probiotické baktérie vytvorili prostredie, ktoré bolo nevhodné pre ich prežitie, zrejme v dôsledku metabolických produktov, ako sú kyseliny alebo iné inhibičné látky, ktoré baktérie vylučujú počas rastu. Probiotické baktérie sa zdali byť v danom prostredí kultivácie s kvasinkami životaschopné, čo podporuje ich potenciál v rôznych aplikáciách, ako sú prebiotiká či probiotické i postbiotické doplnky stravy.

5.10 Vplyv modelového trávenia na životaschopnosť kvasiniek

Na simuláciu podmienok ľudského tráviaceho traktu boli vzorky kvasinkovej biomasy vystavené špecifickým podmienkam, ktoré replikovali fyziologické prostredie počas trávenia, ako je popísané v kapitole 4.13.1. Tento postup zahŕňal vystavenie vzoriek rôznym pH, enzýmom a žľčovým kyselinám, ktoré sú prítomné v tráviacom trakte. Cieľom bolo simulovať podmienky, ktorým by kvasinky čelili počas prechodu cez tráviaci systém a určiť ich schopnosť prežiť a následne rásť v týchto podmienkach. Preto boli po prechode tráviacim systémom kvasinky inokulované na YPD agarové misky a kultivované pri telesnej teplote po dobu jedného dňa. Výsledky ukázali, že na všetkých vzorkách bol zaznamenaný nárast kvasinkovej kultúry, čo naznačuje, že kvasinky prežili podmienky simulujúce trávenie a dokázali sa rozmnožiť na agarovom médiu. Tento nárast bol stanovený vizuálne.

Výsledky ukázali, že najsúvislejšie narastená vrstva kvasiniek bola zaznamenaná pri vzorkách *Metschnikowia pulcherrima*, a to ako v médiu obsahujúcom železo, tak aj v médiu bez železa (viď. Obrázok 39).



Obrázok 39 Nárast kvasinky *M. pulcherrima* po prežití simulovaných GIT podmienok

Kvasinka *M. pulcherrima* je známa svojou schopnosťou prispôbiť sa rôznym environmentálnym stresom, vrátane podmienok tráviaceho traktu, a jej schopnosť produkovať už spomínané exopolysacharidy môže zohrávať významnú úlohu pri jej odolnosti. Sú totiž schopné vytvárať ochranné vrstvy okolo buniek, čo zlepšuje ich schopnosť prežiť v nepriaznivých podmienkach, ako je kyslé pH, prítomnosť žľčových kyselín a tráviacich enzýmov. Okrem toho *M. pulcherrima* produkuje tiež už spomínaný pulcherrimín, ktorý môže ovplyvniť nielen metabolizmus kvasinky, ale aj jej interakcie s mikroflórou GIT. Jeho prítomnosť môže tiež stimulovať kvasinky k produkcii ďalších metabolitov, ktoré podporujú ich prežitie v stresových podmienkach.

Na druhej strane, kvasinky rodu *Rhodotorula* vykázali nárast, ale v podstatne nižšom pomere u všetkých troch vzoriek (viď. Obrázok 40).



Obrázok 40 Nárast kvasinky *R. toruloides* po prežití simulovaných GIT podmienok

Obmedzený rast môže byť dôsledkom niekoľkých faktorov. Tieto kvasinky síce produkujú významné pigmenty, ktoré môžu poskytovať ochranu proti oxidačnému stresu, ale

ich odolnosť voči podmienkam tráviaceho traktu je nižšia, čo môže súvisieť s ich menšou odolnosťou voči stresovým faktorom.

Schopnosť mikroorganizmov prežiť takéto stresové podmienky je kľúčovým predpokladom pre ich označenie ako probiotických. Získané výsledky ukázali, že všetky testované kvasinkové kmene túto podmienku do určitej miery spĺňali, čo poukazuje na ich potenciál pre aplikáciu v oblasti probiotík. Preukázaná životaschopnosť pri simulovanom trávení, ako aj schopnosť rásť pri teplote 37 °C, ktorá zodpovedá podmienkam v ľudskom tele, podporujú ich ďalšie hodnotenie ako kandidátov na probiotické mikroorganizmy.

5.11 Návrh aplikácie extraktov kvasiniek vo forme funkčného výrobku

Na základe výsledkov získaných v tejto práci bol ako perspektívny kandidát pre vývoj funkčného výrobku identifikovaný extrakt z kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*. Tento druh kvasiniek vykazoval vyšší obsah fenolických látok, dobrú antioxidačnú aktivitu a určitú antimikrobiálnu účinnosť voči testovaným patogénnym baktériám. Zároveň preukázal dobrú odolnosť voči simulovanému modelu gastrointestinálneho trávenia, čo podporuje jeho využitie v oblasti funkčných potravín alebo doplnkov stravy.

S ohľadom na biologické vlastnosti extraktu a jeho stabilitu sa ako vhodnejšia javí aplikácia vo forme potravinového doplnku zameraného na podporu antioxidačnej ochrany organizmu a zdravia črevnej mikroflóry. Alternatívne by bolo možné uvažovať aj o výrobe kozmetického prípravku (napr. pleťového séra) zameraného na ochranu pokožky pred oxidačným stresom, avšak vzhľadom na kompozíciu extraktu je výhodnejšia perorálna aplikácia.

Navrhovaný výrobný postup by zahŕňal zakomponovanie lyofilizovaného extraktu do formy kapsúl, prášku alebo tekutého doplnku. Na overenie kvality a stability navrhnutého výrobku by bolo vhodné vykonať napríklad tieto testovania:

- Stanovenie stability bioaktívnych látok v čase pri rôznych podmienkach skladovania (teplota, vlhkosť)
- Senzorická analýza extraktu a finálneho výrobku (farba, vôňa, chuť, rozpustnosť)
- Test rozpustnosti práškovej alebo kapsulovej formy vo vode
- Testovanie biologickej aktivity in vitro (napr. antioxidačná aktivita, antimikrobiálna účinnosť po skladovaní)
- Hodnotenie stability enkapsulovaných foriem, pokiaľ by bol použitý lipozomálny transportný systém.

V rámci rodu *Rhodotorula* by sa ako najvhodnejší kandidát na praktické využitie zrejme hodila kvasinka *Rhodotorula toruloides*, ktorá je známa vysokou produkciou karotenoidných pigmentov, ako je β -karotén a torularhodín. Tento druh je podľa výsledkov práce a i na základe preskúmaných poznatkov schopný produkovať lipidy, čo zvyšuje jeho potenciál pre využitie v kozmetických prípravkoch alebo v doplnkoch stravy zameraných na podporu antioxidačnej obrany organizmu. Jej aplikácia by si však vyžadovala dodatočné potvrdenie bezpečnostných parametrov. Zároveň sa ukázalo, že lipozomálne formy extraktov z rodu *Rhodotorula* boli medzi testovanými jedny z najstabilnejších a najúčinnějších, čo z nich robí zaujímavých kandidátov na využitie v kozmetických produktoch, napríklad ako nosiče bioaktívnych látok, ktoré môžu zlepšiť ich vstrebávanie a stabilitu v kožných prípravkoch.

6 ZÁVER

V rámci tejto diplomovej práce boli hodnotené probiotické a postbiotické vlastnosti vybraných druhov kvasiniek. Išlo o druhy *Rhodotorula toruloides*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula kratochvilovae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia andauensis*, *Metschnikowia chrysoperlae*, *Yarrowia lipolytica* a *Saccharomyces cerevisiae*. V prvej časti práce bola pozornosť venovaná príprave extraktov z kvasinkových kmeňov a analýze ich obsahu bioaktívnych látok. Bolo prevedené stanovenie obsahu lipofilných látok, stanovenie obsahu fenolických zlúčenín, testy antioxidačnej aktivity i hodnotenie antimikrobiálnej aktivity jednotlivých extraktov.

Najskôr boli stanovené lipofilné látky pomocou analytických metód. Pigmenty v biomase, konkrétne karotenoidy a steroly, boli analyzované pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Bol potvrdený vysoký obsah ergosterolu, čo je pre kvasinky typické vzhľadom na jeho funkciu hlavného sterolu v bunkovej membráne. Zvýšené množstvá ubichinónu boli detegované vo viacerých vzorkách, pričom *Metschnikowia chrysoperlae* vykazovala až desaťnásobne vyššiu koncentráciu oproti ostatným druhom. Najvyšší obsah karotenoidov bol zistený u kvasiniek rodu *Rhodotorula*, čo súvisí s ich známou schopnosťou syntetizovať pigmenty ako adaptívnu odpoveď na stresové podmienky. Najvyššie hodnoty boli zaznamenané u *Rhodotorula toruloides* (torularhodín a β -karotén). Dominantnými pigmentmi u *R. mucilaginosa* boli torularhodín a β -karotén, ktoré majú silné antioxidačné vlastnosti a významne prispievajú k vysokej antioxidačnej aktivite tejto kvasinky.

Pomocou plynovej chromatografie bol stanovený obsah lipidov v biomase. Najvyššia hodnota (15,5 %) bola nameraná u *Rhodotorula toruloides* a vyšší obsah vykazovala aj *Metschnikowia pulcherrima* (11,6 %), čo korešpondovalo s ich oleogénnym charakterom. Profil mastných kyselín ukázal dominanciu mononenasýtených mastných kyselín (MUFA) vo všetkých vzorkách, pričom *Metschnikowia chrysoperlae* a *Saccharomyces cerevisiae* dosiahli podiel nad 60 %. Ten predstavuje výhody pre lepšiu oxidačnú stabilitu a priaznivý účinok na zdravie. Najvyššie zastúpenie nasýtených mastných kyselín bolo zasa zistené u *Rhodotorula toruloides* (61,9 %), čo môže zvyšovať stabilitu biomasy pri skladovaní. Polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA), významné pre ich biologickú hodnotu, dosahovali najvyššie hodnoty u *Rhodotorula mucilaginosa* (40,7 %).

Najvyšší obsah fenolických látok bol zistený u *Saccharomyces cerevisiae* (48 mg/g), čo je zaujímavé vzhľadom na potenciálne antioxidačné a protizápalové účinky. Nezanedbateľné množstvo bolo pozorované aj u druhov *Metschnikowia*, kde hodnoty dosahovali 25 mg/g. Vodné extrakty vykazovali vyššie hodnoty ako etanolové, čo môže byť spôsobené lepšou rozpustnosťou fenolických zlúčenín vo vode, ktorá je polárnejšia ako etanol. I stanovením antioxidačnej aktivity sa potvrdila lepšia účinnosť vodných extraktov, pričom najvyššia hodnota bola nameraná u *Rhodotorula mucilaginosa* (46,13 mg/g).

Na základe týchto výsledkov boli na ďalšie analýzy použité výhradne vodné extrakty. Následne bola hodnotená enkapsulačná účinnosť meraním antioxidačnej aktivity enkapsulovaných častíc. Najlepšie výsledky účinnosti dosiahla *Metschnikowia andauensis* (95 %), pričom *Rhodotorula* a *Metschnikowia pulcherrima* tiež vykázali vysokú účinnosť pre zachytenie aktívnych látok v lipozómoch. Pomocou DLS metódy bola stanovená veľkosť a stabilita lipozómov. Najmenšie častice boli zaznamenané u *Rhodotorula mucilaginosa*, čo koreluje s vysokou antioxidačnou účinnosťou. Všetky vzorky vykázali záporný zeta potenciál, čo je charakteristické pre fosfolipidové membrány kvasiniek. Najvyššiu stabilitu mali vzorky *Rhodotorula* a *Metschnikowia chrysoperlae* s hodnotami okolo -30 mV, čo naznačuje dobrú elektrostatickú stabilitu a nižšie riziko agregácie.

V prípade antimikrobiálnych testov mali najväčší inhibičný účinok na rast baktérií extrakty *Metschnikowia pulcherrima*. Napriek tomu nebola dosiahnutá očakávaná

antimikrobiálna aktivita, keďže vzorky vykazovali rast kvasinkových kolónií, čo naznačuje prítomnosť životaschopných buniek. Bolo preto vykonané druhé testovanie za využitia štyroch druhov kvasiniek (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula toruloides*, *Rhodotorula kratochvilovae* a *Metschnikowia pulcherrima*), ktoré boli vybrané na základe ich probiotických a postbiotických vlastností, ako aj na základe výsledkov z predchádzajúcich analýz, ktoré zahŕňali antioxidačnú aktivitu, účinnosť enkapsulácie a obsah lipofilných látok. Po dekontaminácii UV žiarením a filtráciou sa výsledky mierne zlepšili. Filtrácia bola účinnejšia ako UV žiarenie, pričom najlepšie výsledky dosiahli extrakty *R. toruloides* a *M. pulcherrima* kultivované v prítomnosti železa. Metabolická aktivita potvrdila tieto trendy, no na dosiahnutie vyššej antimikrobiálnej účinnosti bude potrebné optimalizovať podmienky testovania.

Ďalšie analýzy boli realizované už len so štyrmi vybranými druhmi kvasiniek. Obsah celkových sacharidov bol stanovený vo vodných extraktoch aj v supernatantoch získaných po kultivácii kvasiniek (tzv. postbiotikách). Výsledky ukázali, že všetky testované extrakty aj postbiotiká obsahovali významné množstvá sacharidov, pričom vysoké obsahy boli namerané u všetkých druhov. Tento nález naznačuje prítomnosť exopolysacharidov, ktoré môžu podporovať probiotické vlastnosti extraktov. Pričom niektoré druhy, predovšetkým *Metschnikowia pulcherrima*, ukázali schopnosť produkovať a uvoľňovať rozpustné sacharidy do kultivačného média, čo zvyšuje ich hodnotu ako potenciálnych zdrojov postbiotík.

Testovanie interakcie kvasinkových extraktov s probiotickými baktériami preukázalo pozitívny vplyv všetkých extraktov na rast baktérií. Najvyšší podporený rast bol pozorovaný pri extraktoch rodu *Rhodotorula*. Test prietokovou cytometriou zároveň potvrdil, že po spoločnej kultivácii preživali iba probiotické baktérie, zatiaľ čo kvasinky neprežili, pravdepodobne v dôsledku nepriaznivého prostredia vytvoreného bakteriálnym metabolizmom, ako aj v dôsledku predchádzajúcej mechanickej dispergácie bunkového materiálu pri príprave extraktu. Zistené výsledky podporujú využitie extraktov z vybraných kvasinkových druhov ako možných prebiotických alebo postbiotických zložiek na podporu rastu prospešných mikroorganizmov.

Vykonaný test simulácie tráviaceho procesu potvrdil, že všetky sledované kvasinky dokázali prežiť pôsobenie stresových podmienok napodobňujúcich prostredie tráviaceho traktu. Najvyššiu mieru prežitia a rastu vykázala *Metschnikowia pulcherrima*, čo pravdepodobne súvisí s jej schopnosťou produkovať ochranné exopolysacharidy a metabolity ako pulcherrimín, ktoré zvyšujú odolnosť buniek. Kvasinky rodu *Rhodotorula* preukázali síce schopnosť prežiť, avšak ich rast bol výrazne slabší.

Výsledky tejto práce naznačujú, že testované kvasinkové extrakty obsahujú bioaktívne látky, ktoré majú významný potenciál pre aplikáciu v oblasti funkčných potravín a doplnkov stravy. Vďaka svojim antioxidačným vlastnostiam a schopnosti ovplyvniť črevnú mikroflóru sa ukazujú ako vhodné zložky pre produkty podporujúce zdravie. Vykazovali antimikrobiálny účinok, produkciu exopolysacharidov a ďalších postbiotík a podporovali rast probiotických baktérií. Simulácia trávenia potvrdila ich odolnosť voči podmienkam tráviaceho systému, čím sa zvyšuje ich potenciál v perorálnych formách aplikácie. Medzi najperspektívnejších kandidátov patria kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*, ako aj *Rhodotorula toruloides*. Bioaktívne zložky týchto kvasiniek môžu nájsť uplatnenie nielen v doplnkoch stravy a funkčných potravinách, ale aj v kozmetike, kde by hlavne *R. toruloides* mohla byť využitá na ochranu pokožky pred oxidačným stresom. Tieto zistenia otvárajú možnosti ďalšieho výskumu a vývoja produktov, ktoré by využívali tieto kvasinky ako cenný zdroj bioaktívnych látok pre komerčné aplikácie.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P., Spier, M.R., Medeiros, A.B., Yamaguishi, C.T., Lindner, J.D., Pandey, A., & Thomaz-Soccol, V. (2010). The potential of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 413-434.
- [2] FULLER, Roy a FULLER, Roy. History and development of probiotics. Online. In: Probiotics. Dordrecht: Springer Netherlands, 1992, s. 1-8. ISBN 978-94-010-5043-2. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-94-011-2364-8_1.
- [3] Arthur C. Ouwehand, Seppo Salminen, et al. Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, 2002. ISBN : 978-90-481-6141-6.
- [4] RAJASEKARAN, Roja a LIU, Dongyou. Probiotics and Prebiotics. Online. In: *Handbook of Molecular Biotechnology*. Boca Raton: CRC Press, 2024, s. 485-492. ISBN 9781003055211. Dostupné z: <https://doi.org/10.1201/9781003055211-51>.
- [5] K, Arunavarsini; V, Yuvansasi; M, Sekar; L, Durga Devi. a R, Mahenthiran. Probiotics and its Application in Humans: An Overview. Online. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2024, roč. 36, č. 7, s. 220-237. ISSN 2456-9119. Dostupné z: <https://doi.org/10.9734/jpri/2024/v36i77552>.
- [6] CHAUDHARI, Archana a DWIVEDI, Mitesh Kumar. The concept of probiotics, prebiotics, postbiotics, synbiotics, nutriotics, and pharmabiotics. Online. In: *Probiotics in the Prevention and Management of Human Diseases*. Elsevier, 2022, s. 1-11. ISBN 9780128237335. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823733-5.00013-1>.
- [7] INTERNATIONAL PROBIOTIC ASSOCIATION. About Probiotics. Online. Dostupné z: <https://internationalprobiotics.org/home/resources/about-probiotics>.
- [8] PIQUÉ, Núria; BERLANGA, Mercedes a MIÑANA-GALBIS, David. Health Benefits of Heat-Killed (Tyndallized) Probiotics: An Overview. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 10. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20102534>. [Bioactive Foods in Promoting Health | ScienceDirect](#).
- [9] BUBNOV, Rostyslav V.; BABENKO, Lidiia P.; LAZARENKO, Liudmyla M.; MOKROZUB, Victoria V. a SPIVAK, Mykola Ya. Specific properties of probiotic strains: relevance and benefits for the host. Online. *EPMA Journal*. 2018, roč. 9, č. 2, s. 205-223. ISSN 1878-5077. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13167-018-0132-z>.
- [10] GHASEMIAN, Abdolmajid; ESLAMI, Majid; SHAFIEI, Morvarid; NAJAFIPOUR, Sohrab a RAJABI, Ali. Probiotics and their increasing importance in human health and infection control. Online. *Reviews in Medical Microbiology*. 2018, roč. 29, č. 4, s. 153-158. ISSN 0954-139X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/MRM.000000000000147>.

- [11] SADAQAT, Mohammad Hussain. Antibacterial, antiviral, antifungal, and immunomodulatory properties of probiotics. Online. *Afghanistan Journal of Basic Medical Science*. 2024, roč. 2, č. 2, s. 111-120. ISSN 30056632. Dostupné z: <https://doi.org/10.62134/ajbms/v2.i2.khatamuni.10>.
- [12] SURENDRAN NAIR, M.; AMALARADJOU, M.A. a VENKITANARAYANAN, K. Antivirulence Properties of Probiotics in Combating Microbial Pathogenesis. Online. In: . *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, 2017, s. 1-29. ISBN 9780128120521. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.12.001>.
- [13] LYE HUEY SHI; KUNASUNDARI BALAKRISHNAN; KOKILA THIAGARAJAH; NOR ISMALIZA MOHD ISMAIL a OOI SHAO YIN. Beneficial Properties of Probiotics. Online. *Tropical Life Sciences Research*. 2016, roč. 27, č. 2, s. 73-90. ISSN 2180-4249. Dostupné z: <https://doi.org/10.21315/tlsr2016.27.2.6>.
- [14] K, Arunavarsini; V, Yuvansasi; M, Sekar; L, Durga Devi. a R, Mahenthiran. Probiotics and its Application in Humans: An Overview. Online. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2024, roč. 36, č. 7, s. 220-237. ISSN 2456-9119. Dostupné z: <https://doi.org/10.9734/jpri/2024/v36i77552>.
- [15] ZHANG, Wenbao; LI, Jun; LIU, Dongyou a LIU, Dongyou. DNA Amplification. Online. In: *Handbook of Molecular Biotechnology*. Boca Raton: CRC Press, 2024, s. 34-42. ISBN 9781003055211. Dostupné z: <https://doi.org/10.1201/9781003055211-5>.
- [16] KLAENHAMMER, T; BARRANGOU, R; BUCK, B; AZCARATEPERIL, M a ALTERMANN, E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. Online. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, roč. 29, č. 3, s. 393-409. ISSN 01686445. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.007>.
- [17] *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome: World Health Organization, 2006, viii, 50 p. ISBN 92-510-5513-0.
- [18] GÖRNER, Fridrich a VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava: Malé Centrum, 2004. ISBN 80-967064-9-7.
- [19] SALMINEN, S.; KENIFEL, W. a OUWEHAND, A.C. Bacteria, Beneficial | Probiotics, Applications in Dairy Products. Online. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 2011, s. 412-419. ISBN 9780123744074. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00048-0>.
- [20] VERMA, Anil Kumar; VERMA, Ravi; AHUJA, Vineet a PAUL, Jaishree. Real-time analysis of gut flora in Entamoeba histolytica infected patients of Northern India. Online. *BMC Microbiology*. 2012, roč. 12, č. 1. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-183>.
- [21] FOLIGNÉ, Benoit; DANIEL, Catherine a POT, Bruno. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. Online. *Current Opinion in Microbiology*. 2013, roč. 16, č. 3, s. 284-292. ISSN 1369-5274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.008>.

- [22] RADA, Vojtěch. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. Online. *Interní Medicína pro praxi*. 2010, roč. 12, č. 2, s. 92-97. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/artkey/inf-999902-0002.php>
- [23] KREJSEK, Jan; KUDLOVÁ, M.; KOLÁČKOVÁ, M. a NOVOSAD, J. Nutrice, prebiotika, probiotika a imunitní systém (II. část: Imunitní systém, principy fungování). Online. *Pediatric pro praxi*. 2007, roč. 8, č. 2, s. 80-87. ISSN 1803-5264. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2007/02/04.pdf>.
- [24] SINDEREN, Douwe van, MAYO, Baltasar (ed.). *Bifidobacteria: genomics and molecular aspects*. Norfolk: Caister Academic Press, 2010. ISBN 978-1-904455-68-4.
- [25] CHAUDHARI, Archana a DWIVEDI, Mitesh Kumar. The concept of probiotics, prebiotics, postbiotics, synbiotics, nutraceuticals, and pharmabiotics. Online. In: *Probiotics in the Prevention and Management of Human Diseases*. Elsevier, 2022, s. 1-11. ISBN 9780128237335. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823733-5.00013-1>.
- [26] MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD. Bifidobacteria. Research on Functional Ingredients In: *Morinaga Milk R&D - Innovation Story*. [online]. Dostupné z: <https://www.morinagamilk.co.jp/english/research/story/bifidus/>
- [27] DEMPSEY, Elaine a CORR, Sinéad C. Lactobacillus spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. Online. *Frontiers in Immunology*. 2022, roč. 13. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840245>.
- [28] ZHENG, Jinshui; WITTOUCK, Stijn; SALVETTI, Elisa; FRANZ, Charles M.A.P.; HARRIS, Hugh M.B. et al. A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. Online. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020, roč. 70, č. 4, s. 2782-2858. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>.
- [29] LEE, Sulhee; JANG, Dong-Hun; CHOI, Hyuk Jun a PARK, Young-Seo. Optimization of Soymilk Fermentation by the Protease-producing Lactobacillus paracasei. Online. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2013, roč. 45, č. 5, s. 571-577. ISSN 0367-6293. Dostupné z: <https://doi.org/10.9721/KJFST.2013.45.5.571>.
- [30] LOVAYOVÁ, Viera. Funkčné potraviny, probiotiká, prebiotiká a ich význam [online]. *Multimediálna podpora výučby klinických a zdravotníckych odborov :: Portál Lekárskej fakulty Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach*. ISSN 1337-7000. Dostupné z: <https://portal.lf.upjs.sk/clanky.php?aid=482>.
- [31] GIL-RODRÍGUEZ, Ana María; CARRASCOSA, Alfonso V. a REQUENA, Teresa. Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. Online. *LWT - Food Science and Technology*. 2015, roč. 64, č. 2, s. 1156-1162. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.042>.
- [32] SEN, Swastik a MANSELL, Thomas J. Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. Online. *Fungal Genetics and Biology*. 2020, roč. 137. ISSN 10871845. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103333>.

- [33] SHRUTHI, B.; DEEPA, N.; SOMASHEKARAI AH, Rakesh; ADITHI, G.; DIVYASHREE, S. et al. Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. Online. *Biotechnology Reports*. 2022, roč. 34. ISSN 2215017X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00716>.
- [34] ALBERTS, Bruce; HEALD, Rebecca; JOHNSON, Alexander; MORGAN, David Owen; RAFF, Martin C. et al. *Molecular biology of the cell*. Seventh edition. New York: W.W. Norton & Company, [2022]. ISBN 978-0-393-88485-2.
- [35] CZERUCKA, D.; PICHE, T. a RAMPAL, P. Review article *Saccharomyces boulardii*: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. Online. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2007, roč. 26, č. 6, s. 767-778. ISSN 0269-2813. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>.
- [36] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. Praha, Academia, 2002. Kvasinky, s. 57. ISBN 80-200-1024-6.
- [37] PAIS, Pedro; ALMEIDA, Vanda; YILMAZ, Melike a TEIXEIRA, Miguel C. *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic? Online. *Journal of Fungi*. 2020, roč. 6, č. 2. ISSN 2309-608X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jof6020078>.
- [38] HLIHOR, Raluca; GAVRILESCU, Maria. Biosorption of heavy metals from the environment using yeasts as biosorbents [online]. *Bulletin of the Polytechnic Institute of Iași, Section Chemistry and Chemical Engineering*. 2009, roč. LV, s. 21–37. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/314207518_BIOSORPTION_OF_HEAVY_METALS_FROM_THE_ENVIRONMENT_USING_YEASTS_AS_BIOSORBENTS
- [39] JOHNSON, Eric A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the basidiomycetes. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, roč. 97, č. 17, s. 7563-7577. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5046-z>.
- [40] BULLERMAN, L.B. SPOILAGE | Fungi in Food – An Overview. Online. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, 2003, s. 5511-5522. ISBN 9780122270550. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01129-9>.
- [41] MAROVA, Ivana; CERTIK, Milan a BREIEROV, Emilia. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. Online. In: MATOVIC, Miodrag Darko (ed.). *Biomass - Detection, Production and Usage*. InTech, 2011. ISBN 978-953-307-492-4. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/19235>.
- [42] HOF, Herbert. *Rhodotorula* spp. in the gut – foe or friend? *GMS Infectious Diseases* [online]. 2019, roč. 7, článek č. Doc02. Dostupné z: <https://www.egms.de/static/en/journals/id/2019-7/id000042.shtml>
- [43] SAHAY, Sanjay. *Rhodotorula Mucilaginosa*: Two Faces of the Yeast. Online. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENTIFIC RESEARCH IN ENGINEERING AND MANAGEMENT*. 2022, roč. 06, č. 08. ISSN 25823930. Dostupné z: <https://doi.org/10.55041/IJSREM16196>.

- [44] NORFUAD, Farisha Alia; MOKHTAR, Mohd Helmy a NUR AZURAH, Abdul Ghani. Beneficial Effects of Probiotics on Benign Gynaecological Disorders: A Review. Online. *Nutrients*. 2023, roč. 15, č. 12. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu15122733>.
- [45] LACHANCE, Marc-André. Metschnikowia. Online. In: *The Yeasts*. Elsevier, 2011, s. 575-620. ISBN 9780444521491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00046-X>.
- [46] MELVYDAS, Vytautas; STANEVICIENE, Ramune; BALYNAITE, Algima; VAICIUNIENE, Jurate a GARJONYTE, Rasa. Formation of self-organized periodic patterns around yeasts secreting a precursor of a red pigment. Online. *Microbiological Research*. 2016, roč. 193, s. 87-93. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.007>.
- [47] KLUYVER, A. J.; VAN DER WALT, J. P. a VAN TRIET, A. J. Pulcherrimin, The Pigment of *Candida Pulcherrima*. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1953, roč. 39, č. 7, s. 583-593. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.39.7.583>.
- [48] HANIFFADLI, Ariranur; BAN, Yeongjun; RAHMAT, Endang; KANG, Chang Ho a KANG, Youngmin. Unforeseen current and future benefits of uncommon yeast: the *Metschnikowia* genus. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2024, roč. 108, č. 1. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13369-y>.
- [49] YILDIRAN, Hatice; BAŞYİĞİT KILIÇ, Gül den a KARAHAN ÇAKMAKÇI, Aynur Gül. Characterization and comparison of yeasts from different sources for some probiotic properties and exopolysaccharide production. Online. *Food Science and Technology*. 2019, roč. 39, č. suppl 2, s. 646-653. ISSN 1678-457X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/fst.29818>.
- [50] TARIQ, Areeba; OZTURKOGLU-BUDAK, Sebnem; GOYAL, Megh R.; MALIK, Junaid Ahmad a KUMARI, Anu. Postbiotics: Types, Mechanism of Action, and Applications. Online. In: *The Functional Foods*. New York: Apple Academic Press, 2024, s. 247-271. ISBN 9781032684055. Dostupné z: <https://doi.org/10.1201/9781032684055-15>.
- [51] VINDEROLA, Gabriel; SANDERS, Mary Ellen a SALMINEN, Seppo. The Concept of Postbiotics. Online. *Foods*. 2022, roč. 11, č. 8. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods11081077>.
- [52] WEGH, Carrie A. M.; GEERLINGS, Sharon Y.; KNOL, Jan; ROESELERS, Guus a BELZER, Clara. Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 19. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20194673>.
- [53] BOŽENSKÝ, Jan. The development in the composition of infant formulas with regard to the latest scientific findings. Online. *Pediatric pro praxi*. 2020, roč. 21, č. 1, s. 63-66. ISSN 12130494. Dostupné z: <https://doi.org/10.36290/ped.2020.013>.

- [54] KUMAR, Anand; GREEN, Katelyn M. a RAWAT, Manmeet. A Comprehensive Overview of Postbiotics with a Special Focus on Discovery Techniques and Clinical Applications. Online. *Foods*. 2024, roč. 13, č. 18. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods13182937>.
- [55] MA, Linxi; TU, Huaijun a CHEN, Tingtao. Postbiotics in Human Health: A Narrative Review. Online. *Nutrients*. 2023, roč. 15, č. 2. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu15020291>.
- [56] SONG, Dingka; WANG, Xiuli; MA, Yongjing; LIU, Ning-Ning a WANG, Hui. Beneficial insights into postbiotics against colorectal cancer. Online. *Frontiers in Nutrition*. 2023, roč. 10. ISSN 2296-861X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1111872>.
- [57] IKRAM, Ali; SAFDAR, Sheikh Zain; ARSHAD, Muhammad Tayyab; RASHEED, Areeba a GNEDEKA, Kodjo Théodore. An overview of postbiotics: unveiling their distinct role in gut health. Online. *Food and Agricultural Immunology*. 2024, roč. 35, č. 1. ISSN 0954-0105. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/09540105.2024.2434463>.
- [58] KUMAR MALESU, Vijay. The Rise of Postbiotics for Gut Health. *News-Medical* [online]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/health/The-Rise-of-Postbiotics-for-Gut-Health.aspx>.
- [59] ŻÓLKIEWICZ, Jakub; MARZEC, Aleksandra; RUSZCZYŃSKI, Marek a FELESZKO, Wojciech. Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics. Online. *Nutrients*. 2020, roč. 12, č. 8. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu12082189>.
- [60] SANDERS, Mary Ellen; AKKERMANS, Louis M.A.; HALLER, Dirk; HAMMERMAN, Cathy; HEIMBACH, James T. et al. Safety assessment of probiotics for human use. Online. *Gut Microbes*. 2014, roč. 1, č. 3, s. 164-185. ISSN 1949-0976. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127>.
- [61] MERENSTEIN, Daniel; POT, Bruno; LEYER, Gregory; OUWEHAND, Arthur C.; PREIDIS, Geoffrey A. et al. Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives. Online. *Gut Microbes*. 2023, roč. 15, č. 1. ISSN 1949-0976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2185034>.
- [62] ASHAOLU, Tolulope Joshua; GREFF, Babett a VARGA, László. Action and immunomodulatory mechanisms, formulations, and safety concerns of probiotics. Online. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. 2025, roč. 44, č. 1, s. 4-15. ISSN 2186-3342. Dostupné z: <https://doi.org/10.12938/bmfh.2024-006>.
- [63] ROE, Amy L.; BOYTE, Marie-Eve; ELKINS, Chris A.; GOLDMAN, Virginia S.; HEIMBACH, James et al. Considerations for determining safety of probiotics: A USP perspective. Online. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2022, roč. 136. ISSN 02732300. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105266>.
- [64] OFFICE OF DIETARY SUPPLEMENTS. Probiotics - Health Professional Fact Sheet. *Office of Dietary Supplements, National Institutes of Health* [online]. Dostupné z: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Probiotics-HealthProfessional/>

- [65] MCFARLAND, L.V. Common Organisms and Probiotics: *Saccharomyces boulardii*. Online. In: *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*. Elsevier, 2017, s. 145-164. ISBN 9780128040249. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00018-5>.
- [66] MOONSAMY, Ghaneshree; ROETS-DLAMINI, Yrielle; LANGA, Cebeni Nkosihawukile a RAMCHURAN, Santosh Omrajah. Advances in Yeast Probiotic Production and Formulation for Preventative Health. Online. *Microorganisms*. 2024, roč. 12, č. 11. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12112233>.
- [67] RODRIGUES, F.J.; CEDRAN, M.F.; BICAS, J.L. a SATO, H.H. Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review. Online. *Food Research International*. 2020, roč. 137. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>.
- [68] VIVEK, Kambhampati; MISHRA, Sabyasachi; PRADHAN, Rama Chandra; NAGARAJAN, Meena; KUMAR, Pavitra Krishna et al. A comprehensive review on microencapsulation of probiotics: technology, carriers and current trends. Online. *Applied Food Research*. 2023, roč. 3, č. 1. ISSN 27725022. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100248>.
- [69] RAJAM, R. a SUBRAMANIAN, Parthasarathi. Encapsulation of probiotics: past, present and future. Online. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2022, roč. 11, č. 1. ISSN 2314-8543. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00228-w>.
- [70] WANG, Guangqiang; CHEN, Yunhui; XIA, Yongjun; SONG, Xin a AI, Lianzhong. Characteristics of Probiotic Preparations and Their Applications. Online. *Foods*. 2022, roč. 11, č. 16. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods11162472>.
- [71] HABEEBUDDIN, Mohammed; KARNATI, Ranjith Kumar; SHIROORKAR, Predeepkumar Narayanappa; NAGARAJA, Sreeharsha; ASDAQ, Syed Mohammed Basheeruddin et al. Topical Probiotics: More Than a Skin Deep. Online. *Pharmaceutics*. 2022, roč. 14, č. 3. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030557>.
- [72] *Český lékopis 2023*. 1. díl, Evropská část. Praha: Grada Publishing, 2023. ISBN 978-80-271-5059-5.
- [73] ALLAHKARAMI, Somayeh; SEPAHI, Abbas Akhavan; HOSSEINI, Hedayat a RAZAVI, Mohamad Reza. Isolation and identification of carotenoid-producing *Rhodotorula* sp. from Pinaceae forest ecosystems and optimization of in vitro carotenoid production. Online. *Biotechnology Reports*. 2021, roč. 32. ISSN 2215017X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00687>.
- [74] RENCKEN, I.; FLEMING, V.; MEIJERING, I. a AXCELL, B. Determination of Selected Sterols and Fatty Acids in Yeast. Online. *Journal of Chromatographic Science*. 1995, roč. 33, č. 9, s. 525-530. ISSN 0021-9665. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/chromsci/33.9.525>.

- [75] NÉMETH, Zsófia; CSÓKA, Ildikó; SEMNANI JAZANI, Reza; SIPOS, Bence; HASPEL, Henrik et al. Quality by Design-Driven Zeta Potential Optimisation Study of Liposomes with Charge Imparting Membrane Additives. Online. *Pharmaceutics*. 2022, roč. 14, č. 9. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091798>.
- [76] KIM, Junyeob; LEE, Eun-Jung; LEE, Kyung-Eun; NHO, Youn-Hwa; RYU, Jeoungjin et al. Lipid extract derived from newly isolated *Rhodotorula toruloides* LAB-07 for cosmetic applications. Online. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2023, roč. 21, s. 2009-2017. ISSN 20010370. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.03.018>.
- [77] BEOPOULOS, Athanasios; CESCUT, Julien; HADDOUCHE, Ramdane; URIBELARREA, Jean-Louis; MOLINA-JOUVE, Carole et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. Online. *Progress in Lipid Research*. 2009, roč. 48, č. 6, s. 375-387. ISSN 01637827. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.005>.
- [78] NĚMCOVÁ, Andrea; SZOTKOWSKI, Martin; SAMEK, Ota; CAGÁŇOVÁ, Linda; SÍPICZKI, Matthias et al. Use of Waste Substrates for the Lipid Production by Yeasts of the Genus *Metschnikowia*—Screening Study. Online. *Microorganisms*. 2021, roč. 9, č. 11. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112295>.
- [79] SUBRAMANIAM, Ramalingam; DUFRECHE, Stephen; ZAPPI, Mark a BAJPAI, Rakesh. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. Online. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2010, roč. 37, č. 12, s. 1271-1287. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0884-5>.
- [80] SANDVEN, Per a LASSEN, Jørgen. Importance of Selective Media for Recovery of Yeasts from Clinical Specimens. Online. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, roč. 37, č. 11, s. 3731-3732. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JCM.37.11.3731-3732.1999>.
- [81] OKORO, Oseweuba Valentine; GHOLIPOUR, Amir Reza; SEDIGHI, Faezeh; SHAVANDI, Amin. Optimization of Exopolysaccharide (EPS) Production by *Rhodotorula mucilaginosa* sp. Online. *ChemEngineering*. 2021, roč. 5, č. 3. ISSN 2305-7084. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/chemengineering5030039>.
- [82] BAEK, Kwang-Rim; RANI RAMAKRISHNAN, Sudha; KIM, Soo-Jung a SEO, Seung-Oh. Yeast cell wall mannan structural features, biological activities, and production strategies. Online. *Heliyon*. 2024, roč. 10, č. 6. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27896>.
- [83] BERTSCH, Annalisse; ROY, Denis a LAPOINTE, Gisèle. Enhanced Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus rhamnosus* in Co-Culture with *Saccharomyces cerevisiae*. Online. *Applied Sciences*. 2019, roč. 9, č. 19. ISSN 2076-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app9194026>.
- [84] BANACH, Adam A. a OOI, Beng Guat. Enhancing the Yield of Phenolic Compounds during Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae* Strain 96581. Online. *Food and Nutrition Sciences*. 2014, roč. 05, č. 21, s. 2063-2070. ISSN 2157-944X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4236/fns.2014.521218>.

- [85] CARIDI, Andrea; SIRADI, Rossana; GIUFFRÉ, Angelo Maria; PELLICANÓ, Teresa Maria; SICARI, Vincenzo et al. Test of four generations of *Saccharomyces cerevisiae* concerning their effect on antioxidant phenolic compounds in wine. Online. *European Food Research and Technology*. 2017. roč. 243, č. 7. s. 1287-1294. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2840-8>.
- [86] TANG, W., WANG, Y., ZHANG, J., CAI, Y., HE, Z. Biosynthetic pathway of carotenoids in *Rhodotorula* and strategies for enhanced their production. Online. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019. roč. 29, č. 4, s. 507–517. Dostupné z: <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01022>.

8 POUŽITÉ SKRATKY

ABTS ⁺⁺	2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
BHI	Brain Heart Infusion (médiu)
CFU	Colony Forming Units (jednotky vytvárajúce kolónie)
DLS	Dynamický rozptyl svetla
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FILTR	filtrované vzorky
GC	Plynová chromatografia
GRAS	Generally Recognized As Safe (všeobecne uznávané ako bezpečné)
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
LB	Lysogeny Broth (médiu)
MP (Fe)	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> kultivovaná na médiu s prídavkom železa
MUFA	mononenасыtené mastné kyseliny
OD	optická hustota
PUFA	polynenasыtené mastné kyseliny
QPS	Qualified Presumption of Safety (kvalifikovaná domnienka bezpečnosti)
SFA	nasыtené mastné kyseliny
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
UV	ultrafialové žiarenie
VIS	žiarenie vo viditeľnej oblasti spektra
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose

9 PRÍLOHY

Príloha 1: Výsledný obsah fenolických látok v kvasinkových extraktoch

Kvasinka	Vodné extrakty (mg/g)	Etanolové extrakty (mg/g)
<i>Metschnikowia andauensis</i>	19,99±0,21	2,386±0,11
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	10,55±0,21	3,809±0,32
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (Fe médium)	13,72±0,25	4,25±0,30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47,88±0,58	4,595±0,48
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	10,849±0,85	3,809±0,00
<i>Rhodotorula toruloides</i>	16,99±0,64	5,494±0,26
<i>Yarrowia lipolytica</i>	5,68±0,11	7,179±0,32
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	24,553±0,32	2,686±0,42
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	8,811±0,25	3,757±0,29

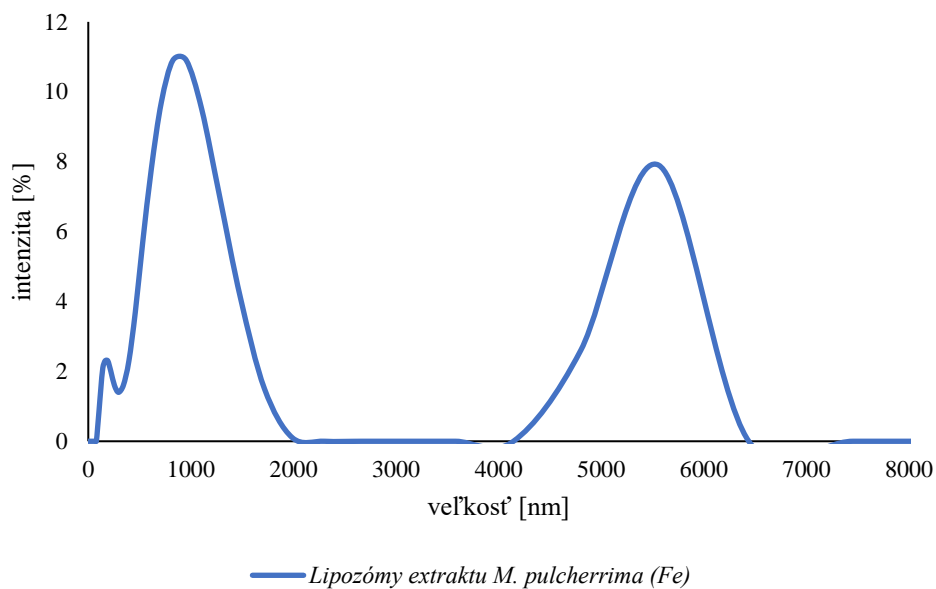
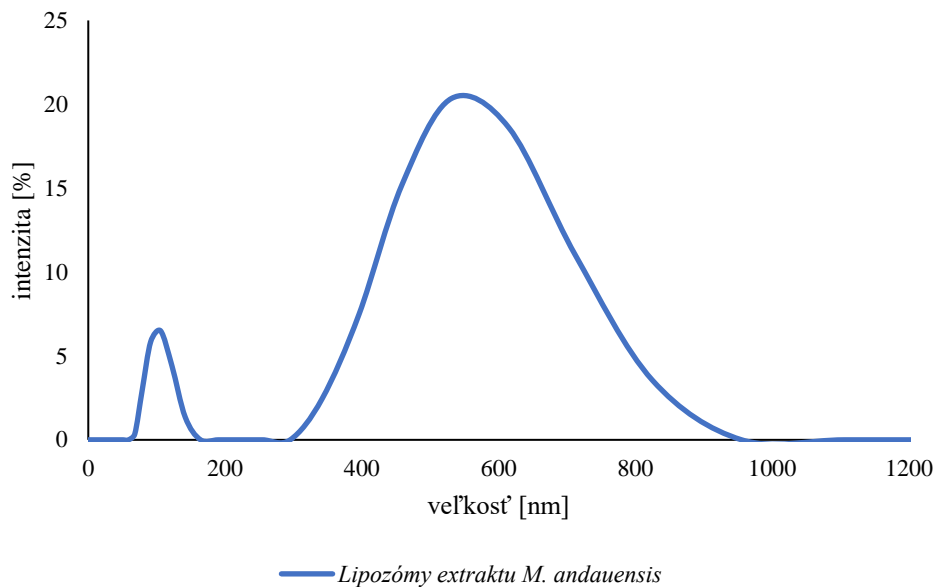
Príloha 2: Antioxidačná aktivita vo všetkých kvasinkových extraktoch

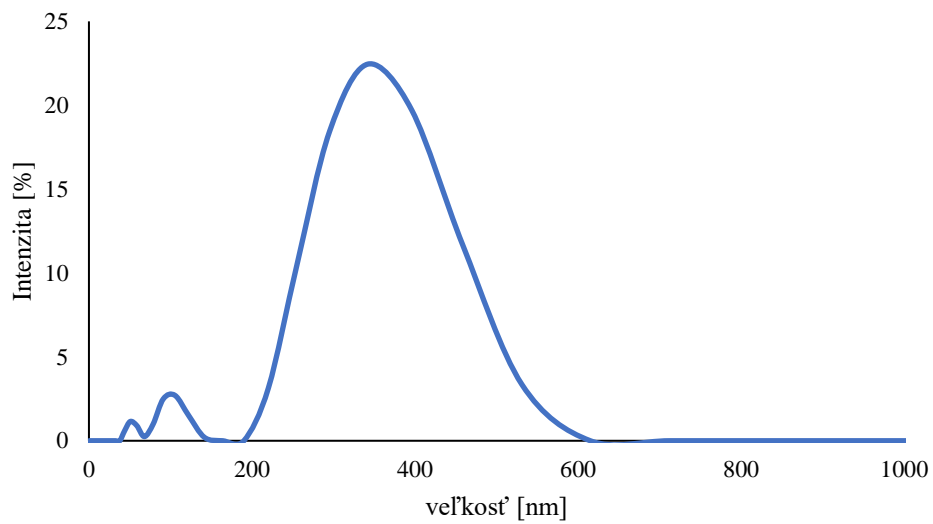
Kvasinka	Vodné extrakty (mg/g)	Etanolové extrakty (mg/g)
<i>Metschnikowia andauensis</i>	34,47±0,57	5,17±2,12
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	14,93±0,95	2,07±0,47
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (Fe médium)	17,80±1,90	2,55±0,93
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28,30±0,14	1,67±1,13
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	46,13±0,94	1,22±0,77
<i>Rhodotorula toruloides</i>	26,43±0,99	3,17±0,71
<i>Yarrowia lipolytica</i>	12,60±1,79	2,73±0,38
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	5,10±1,18	3,07±0,75
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	15,87±0,47	2,69±0,74

Príloha 3: Obsah celkových sacharidov v kvasinkových extraktoch a postbiotickom supernatante

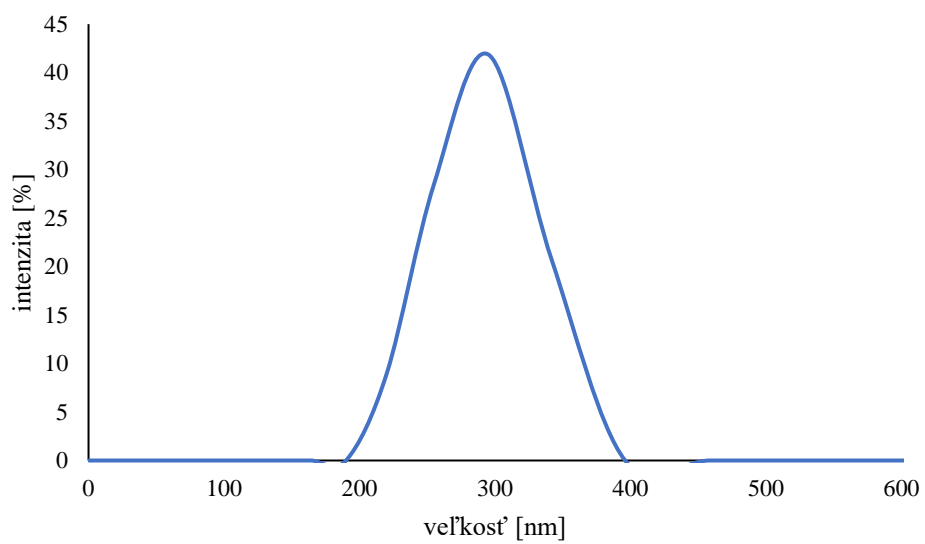
Kvasinka	Kvasinkové extrakty (mg/g)	Supernatant (mg/g)
<i>Rhodotorula toruloides</i>	6,42±0,66	6,95±0,35
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	6,64±0,36	3,02±0,15
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	7,40±0,22	5,45±0,27
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (Fe médium)	7,39±0,77	10,89±0,55
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	8,95±1,11	6,18±0,31

Príloha 4: Distribučné krivky veľkosti lipozómov na základe intenzity rozptýleného svetla pre kvasinkové extrakty



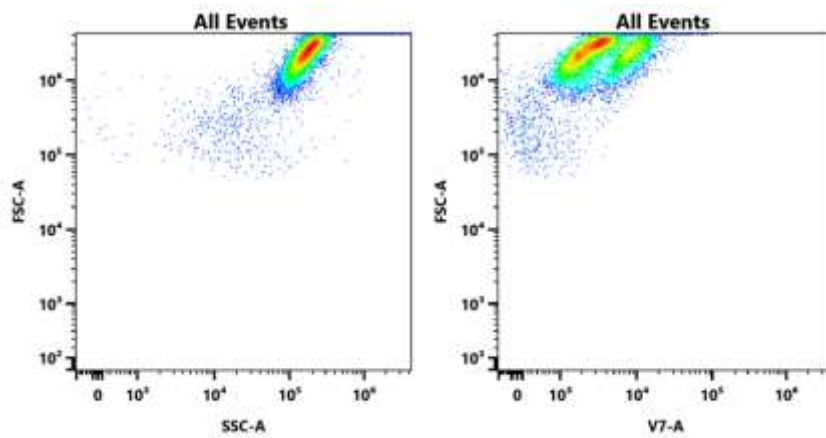


— Lipozómy extraktu *R. mucilaginosa*

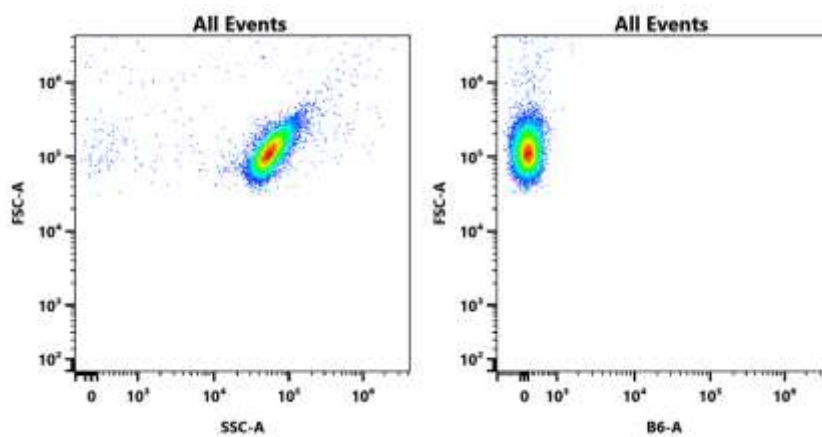


— Lipozómy extraktu *R. kratochvilovae*

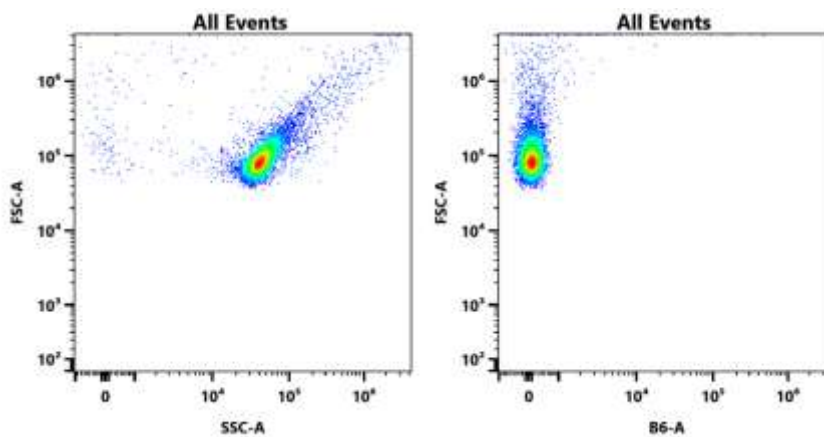
Príloha 5: Výstupy z prietokovej cytometrie – grafy podľa veľkosti a vnútornej komplexnosti (ľavý graf) a podľa veľkosti a intenzity fluorescenčného signálu (pravý graf)



Grafy znázorňujúce distribúciu buniek kvasinky *Rhodotorula toruloides*



Grafy znázorňujúce výstupy z merania bunkovej kultúry *L. rhamnosus* a *R. toruloides*



Grafy znázorňujúce výstupy z merania bunkovej kultúry *B. bifidum* a *R. toruloides*