



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VÝVOJ POTRAVINOVÝCH DOPLŇKŮ S ENKAPSULOVANOU ZELENINOVOU A PROBIOTICKOU SLOŽKOU.

DEVELOPMENT OF FOOD SUPPLEMENTS WITH ENCAPSULATED VEGETABLE AND PROBIOTIC
COMPONENTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Veronika Svobodová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2025

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK2089/2024 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Veronika Svobodová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název bakalářské práce:

Vývoj potravinových doplňků s enkapsulovanou zeleninovou a probiotickou složkou.

Zadání bakalářské práce:

V rámci bakalářské práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše zaměřená na přehled aktuálně dostupných potravinových doplňků obsahujících současně zeleninovou a probiotickou složku; dále na synbiotika; enkapsulace – materiály a postupy
- 2) kultivace vybraných kmenů probiotik v přítomnosti různých druhů zeleniny (listová, kořenová, plody), charakterizace složení produktů a biologické aktivity
- 3) využití různých postupů zpracování směsných zeleninovo–probiotických produktů; enkapsulace do vhodných částic, charakterizace stability a biologických účinků
- 4) diskuse výsledků a návrh složení potravinového doplňku s nejlepšími vlastnostmi

Termín odevzdání bakalářské práce: 26.5.2025:

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

Veronika Svobodová
studentka

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce se zaměřuje na vývoj inovativního potravinového doplňku s obsahem enkapsulovaných probiotik a extraktů z pěti běžně dostupných druhů zeleniny – červené řepy, špenátu, řapíkatého celeru, mrkve a cukety – s prebiotickým potenciálem. Cílem bylo navrhnout a optimalizovat technologický postup výroby synbiotického přípravku, který zajistí synergický účinek probiotických mikroorganismů a rostlinnými bioaktivními látkami. Teoretická část se věnuje nejen charakteristice probiotik, prebiotik a synbiotik, ale také chemickému složení vybraných zástupců zeleniny jako potenciálních zdrojů prebiotik a možnostem zvýšení stability finálního produktu, například enkapsulací do alginátových částic. V experimentální části byly použity probiotické kmeny rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Chemické složení zeleninových extraktů bylo analyzováno spektrofotometrickými metodami pro stanovení antioxidační kapacity, celkových fenolických látek, chlorofylů, karotenoidů a cukrů, a dále kapalinovou chromatografií (HPLC) pro stanovení obsahu vitamínu C a kyseliny mléčné. Produkce kyseliny mléčné byla současně posuzována jako klíčový ukazatel antimikrobiální aktivity, která by mohla přispět ke zvýšení trvanlivosti výsledného produktu. Dále byla navržena metoda enkapsulace pomocí alginátu, která byla optimalizována s cílem zvýšit stabilitu a životaschopnost probiotik během skladování i trávení. Výsledky ukázaly, že vybrané zeleninové extrakty vykazují prebiotické vlastnosti. Vyvinutý synbiotický doplněk stravy tak představuje inovativní funkční potravinu s vysokým aplikačním potenciálem v oblasti podpory zdravé střevní mikrobioty a celkové imunity. Práce přispívá k rozvoji moderních synbiotických formulací a ukazuje možnosti jejich využití v potravinářském průmyslu i v oblasti individuální zdravotní prevence.

KLÍČOVÁ SLOVA

Probiotika, prebiotika, synbiotika, enkapsulace, zeleninové extrakty, kyselina mléčná, antimikrobiální aktivita, rod *Lactobacillus*, rod *Bifidobacterium*

ABSTRACT

This bachelor's thesis focuses on the development of an innovative dietary supplement containing encapsulated probiotics and extracts from five commonly available vegetables – beetroot, spinach, celery stalks, carrots, and zucchini – with prebiotic potential. The aim was to design and optimize a technological process for producing a synbiotic formulation that ensures a synergistic effect between probiotic microorganisms and plant-derived bioactive compounds. The theoretical part addresses not only the characteristics of probiotics, prebiotics, and synbiotics but also the chemical composition of selected vegetable representatives as potential prebiotic sources and strategies to enhance the stability of the final product, such as encapsulation into alginate particles. In the experimental part, probiotic strains from the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were used. The chemical composition of the vegetable extracts was analyzed using spectrophotometric methods to determine antioxidant capacity, total phenolic content, chlorophylls, carotenoids, and sugars, as well as high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine vitamin C and lactic acid content. Lactic acid production was also evaluated as a key indicator of antimicrobial activity, which could contribute to extending the shelf life of the final product. Furthermore, an alginate-based encapsulation method was proposed and optimized to enhance the stability and viability of the probiotics during storage and digestion. The results showed that the selected vegetable extracts exhibit prebiotic properties. The developed synbiotic dietary supplement thus represents an innovative functional food with high application potential for supporting gut microbiota health and overall immunity. The thesis contributes to the advancement of modern synbiotic formulations and demonstrates their potential use in the food industry as well as in personalized health prevention.

KEYWORDS

Probiotics, prebiotics, synbiotics, encapsulation, vegetable extracts, lactic acid, antimicrobial activity, genus *Lactobacillus*, genus *Bifidobacterium*

SVOBODOVÁ, Veronika. *Vývoj potravinových doplňků s enkapsulovanou zeleninovou a probiotickou složkou.* . Online, bakalářská práce. Ivana MÁROVÁ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/162025>. [cit. 2025-05-16].

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za možnost pracovat na tomto tématu, cenné rady a odborné vedení. Dále děkuji své konzultantce Ing. Paule Večeríkové za věnovaný čas, ochotu a vstřícný přístup.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Probiotika	10
2.1.1	Historie probiotik a jejich definice	12
2.1.2	Účinek probiotik	13
2.1.3	Význam probiotik	14
2.1.4	Probiotika jako doplněk stravy	15
2.1.5	Rizika užívání probiotik.....	16
2.1.6	Vybraná probiotika.....	17
2.2	Prebiotika	18
2.2.1	Historie prebiotik	19
2.2.2	Účinek prebiotik.....	20
2.2.3	Význam prebiotik.....	20
2.2.4	Bezpečnost prebiotik.....	21
2.2.5	Prebiotické potraviny	21
2.2.6	Vybrané druhy zeleniny	23
2.3	Synbiotika.....	24
2.3.1	Mechanismus účinku synbiotik.....	25
2.3.2	Aplikace synbiotik	26
2.4	Enkapsulace.....	26
2.4.1	Metody enkapsulace.....	27
2.4.2	Enkapsulátor	28
2.4.3	Materiály používané pro vytvoření vnější fáze.....	28
2.5	Stav současné problematiky v oblasti synbiotik	30
2.5.1	Příklady produktů dostupných na českém trhu.....	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1	Použité přístroje, chemikálie, kultivační materiály a mikroorganismy	32
3.1.1	Použité přístroje a pomůcky.....	32
3.1.2	Použité chemikálie	32
3.1.3	Použité kultivační materiály	33
3.1.4	Použité mikroorganismy	33

3.2	Kultivace bakterií mléčného kvašení v komerčním médiu	33
3.3	Charakterizace bakterií mléčného kvašení	34
3.3.1	Test viability a nárůstu probiotických kultur	34
3.3.2	Stanovení nárůstu kultury pomocí turbidimetru	34
3.4	Příprava zeleninových extraktů	34
3.5	Charakterizace zeleninových extraktů.....	35
3.5.1	Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi–Nelsona.....	35
3.5.2	Stanovení celkových cukrů podle Duboise	35
3.5.3	Stanovení antioxidační kapacity	35
3.5.4	Stanovení celkových fenolických látek	36
3.5.5	Stanovení chlorofylů	36
3.5.6	Stanovení karotenoidů	36
3.5.7	Stanovení vitamínu C.....	37
3.6	Kultivace bakterií mléčného kvašení v prebiotických extraktech.....	38
3.7	Příprava roztoků lyofilizátů.....	38
3.8	Kultivace na tuhém médiu.....	38
3.9	Charakterizace roztoků lyofilizátů bakteriálních kultur kultivovaných v zeleninových extraktech	39
3.9.1	Stanovení kyseliny mléčné vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)	39
3.9.2	Stanovení antimikrobiální aktivity.....	39
3.10	Enkapsulace vybraných probiotických bakterií se zeleninou.....	41
3.10.1	Příprava vzorků	41
3.10.2	Enkapsulace	41
3.10.3	Postupné uvolňování probiotik z částic	42
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
4.1	Charakterizace bakterií mléčného kvašení	43
4.1.1	Test viability a nárůstu probiotických kultur	43
4.1.2	Stanovení nárůstu kultury pomocí turbidimetrie	43
4.2	Charakterizace zeleninových extraktů.....	44
4.2.1	Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi–Nelsona.....	45
4.2.2	Stanovení celkových cukrů podle Duboise.....	46
4.2.3	Stanovení antioxidační kapacity	47

4.2.4	Stanovení celkových fenolických látek	49
4.2.5	Stanovení chlorofylů	50
4.2.6	Stanovení karotenoidů	51
4.2.7	Stanovení vitamínu C	53
4.3	Kultivace probiotických bakterií na tuhém mediu	54
4.4	Charakterizace roztoků lyofilizátů bakteriálních kultur kultivovaných v zeleninových extraktech	57
4.4.1	Stanovení kyseliny mléčné vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií	57
4.4.2	Stanovení antimikrobiální aktivity	59
4.5	Enkapsulace vybraných probiotických bakterií se zeleninou	68
4.6	Možné aplikační využití enkapsulovaných částic	74
5	ZÁVĚR	75
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	77
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	87

1 ÚVOD

V posledních desetiletích se stále více ukazuje, že zdraví člověka je úzce propojeno se stavem střevní mikrobioty, která významně ovlivňuje nejen trávicí procesy, ale i imunitní odpověď, metabolismus a celkovou psychickou pohodu. Rovnováha mikrobiálního osídlení trávicího traktu je proto klíčová pro udržení homeostázy organismu. V této souvislosti roste zájem o probiotika – živé mikroorganismy, které při podání v adekvátním množství přinášejí svému hostiteli zdravotní benefity [1]. Probiotika se stala předmětem intenzivního vědeckého výzkumu i komerčního využití, a to jak ve formě fermentovaných potravin, tak jako součást moderních doplňků stravy.

Účinnost probiotik však závisí na jejich schopnosti přežít nepříznivé podmínky během výroby, skladování a zejména při průchodu trávicím traktem. Jedním z osvědčených způsobů, jak tuto životaschopnost zvýšit, je jejich enkapsulace, tedy uzavření mikroorganismů do ochranné matrice, která zajišťuje jejich stabilitu až do místa účinku. Kromě samotné ochrany může být účinnost probiotik dále podpořena kombinací s prebiotiky, což jsou nestravitelné látky, které selektivně podporují růst a aktivitu prospěšných bakterií. Taková kombinace probiotik a prebiotik se označuje jako synbiotikum a může mít synergické účinky [2].

Zejména zelenina představuje vhodný zdroj bioaktivních látek s prebiotickým potenciálem. Obsahuje vlákninu, vitaminy, minerální látky a antioxidanty, které mohou pozitivně ovlivňovat střevní mikroflóru a zároveň rozšiřují nutriční hodnotu finálního produktu [3]. Inovativním přístupem je tedy vývoj funkčního potravinového doplňku, který spojuje probiotické kultury se zeleninovou složkou a využívá enkapsulační technologie k dosažení co nejvyšší stability a účinnosti.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na vývoj a optimalizaci potravinového doplňku s obsahem enkapsulovaných probiotických mikroorganismů a zeleninových složek s prebiotickým účinkem. V teoretické části je zpracována literární rešerše týkající se probiotik, prebiotik, synbiotik a metod enkapsulace. Praktická část se věnuje výběru vhodných bakteriálních kmenů, přípravě a charakterizaci zeleninových extraktů, jejich vlivu na růst probiotických kultur a ověření efektivity enkapsulačních technik. Výsledky této práce mohou přispět k rozšíření znalostí v oblasti vývoje funkčních potravin a nabídnout nové možnosti podpory střevního zdraví a celkové imunity konzumentů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotika

Probiotika jsou podle definice FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization*) živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství příznivě ovlivňují zdraví hostitele. Samotný termín probiotikum je odvozen z řeckých slov „pro“ a „bios“, tedy „pro život“ a poprvé byl použit v 60. letech 20. století [1].

Probiotika se nacházejí v různých potravinách, nejčastěji v mléčných výrobcích, ale jsou k dispozici také jako doplňky stravy nebo potravinové doplňky [4]. V těle tedy přirozeně osídlují trávicí soustavu a dochází tak k příznivému ovlivnění zdraví konzumenta zlepšením rovnováhy jeho střevní mikroflóry, protože podporují selektivně růst nebo aktivitu jednoho druhu bakterií nebo omezeného množství střevních bakterií. Forma, ve které je probiotikum aplikováno do trávicího ústrojí, by měla obsahovat dostatečné množství životaschopných bakterií, které mají schopnost přežít v trávicím ústrojí a které jsou metabolicky aktivní [5].

Aby se mohly bakterie zařadit mezi probiotika, musí splňovat několik požadavků. Bakteriální kmeny musí mít prokazatelně pozitivní vliv na zdraví hostitele a musí být zdravotně nezávadné, nesmí být toxické ani patogenní. Musí být odolné k působení kyselosti žaludeční šťávy a žluči a jsou aplikované v živém stavu [5].

Nejčastější zástupce probiotik nalezneme ve třech rodech, a to mezi rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*. Zástupci z rodu *Lactobacillus* byli první skupinou bakterií, která byla definována jako probiotika. Později byli mezi probiotika zařazeni také zástupci z rodu *Bifidobacterium*, *Streptococcus* a další. V každém rodu jsou pak dále specifikovány různé kmeny bakterií s probiotickými vlastnostmi, například u laktobacilů je to *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis* nebo *Lactobacillus fermentum*. U bifidobakterií jde o *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* a podobně. Uvedené kmeny probiotických bakterií se navíc vzájemně posilují. Například po podání bakterií rodu *Lactobacillus* dochází v trávicím traktu ke zvýšení počtu nejen těchto bakterií, ale bakterií ve skupině *Streptococcus*. Kromě výše uvedených bakterií patří mezi probiotika i jiné mikroorganismy. Jsou to například kvasinkové mikroorganismy jako *Saccharomyces boulardii* nebo plísně (*Aspergillus oryzae*). Přehled nejčastěji probioticky využívaných kmenů mikroorganismů je uveden v tabulce (

Tabulka 1)[6].

Tabulka 1: Přehled nejčastěji využívaných probiotických kmenů mikroorganismů [7]

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Jiné bakterie mléčného kvašení	Jiné typy mikroorganismů
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> kmen Nissele
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lastis</i>	<i>Sascharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Sacharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilis</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilium</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. planarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

2.1.1 Historie probiotik a jejich definice

Vize prospěšných mikroorganismů v lidském těle se poprvé objevila v roce 1908 díky práci *I. I. Mečnikova*, ruského držitele Nobelovy ceny za fyziologii, který přinesl nový pohled na imunomodulační funkci bakterií v trávicím traktu. Jeho objevy naznačily, že složení střevní mikrobioty je ovlivněno stravou, což vedlo k myšlence, že úpravou stravovacího režimu lze zlepšit stav trávicího systému. Paralelně s *Mečnikovem* pozoroval francouzský pediatr *Henry Tissier*, že děti trpící průjmem mají nedostatečný počet bifidobakterií ve stolici ve srovnání s těmi zdravými. *Tissier* tedy navrhl podávat těmto dětem bifidobakterie, což podpořilo obnovu mikroflóry střeva [8].

Tyto práce byly prvními vědeckými pokusy o využití probiotických bakterií, ačkoliv termín "probiotika" ještě nebyl znám. Termín byl formálně definován v roce 1965 *Lillym* a *Stilwellem* jako faktory produkované mikroorganismy, které mají příznivý účinek na celkový růst zvířat a zároveň na růst některých dalších mikroorganismů. *Parker* v roce 1974 poprvé použil termín "probiotika" pro organizmy pozitivně přispívající ke střevní mikrobiální rovnováze hostitele. *Fuller* v roce 1989 konkrétněji definoval probiotika jako živé mikrobiální doplňky stravy, které příznivě ovlivňují rovnováhu střevní mikrobioty [9]. Tato definice byla dále rozvinuta *Havenaarem* a *Huisem in 't Veldem* v roce 1992. *Guarner* a *Schaafsma* v roce 1998 upřesnili,

že probiotika jsou živé mikroorganismy, které pozitivně ovlivňují zdravotní stav hostitele při správném dávkování. Od té doby vzrostl zájem o probiotika a jejich potenciální využití. Hlavní definicí probiotik je ta, kterou představila FAO/WHO v roce 2001, přestože se vyskytují i jiné formulace. Důležité je, že podle současné definice jsou probiotika pouze živé mikroorganismy, nikoliv mrtvé [8, 10].

2.1.2 Účinek probiotik

Probiotika, která mají široké spektrum účinků, se vyznačují různými mechanismy působení. Důležitá je produkce látek, jako jsou organické kyseliny a peroxid vodíku, které inhibují růst gram pozitivních i gram negativních bakterií a snižují produkci toxinů. Například bakterie mléčného kvašení kmenů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* jsou důležitá pro prevenci invaze enteropatogenů. Zmíněné bakterie produkují kyselinu mléčnou, která pomáhá odstraňovat škodlivé patogeny, a dále adherují na střevní epitel, což blokuje adhezní místa pro patogenní bakterie a zlepšuje bariérovou funkci epitelální výstelky [11].

Probiotika jsou rovněž charakteristická produkcí aminokyselin s krátkým řetězcem, mezi které patří například kyselina γ -aminomáselná (tzv. GABA). Ta v organismu slouží jako neurotransmitter. Některá probiotika obsahují také geny kódující proteiny zodpovědné za některé biochemické cesty, kterých lidský organismus sám o sobě není schopný. Jde například o rozklad komplexního zdroje uhlíku. Některé kmeny produkují butyrát jako výsledek jejich fermentačního metabolismu. Právě butyrát je klíčovou molekulou k zajištění střevní homeostázy [12].

Pozitivní účinky probiotických organismů v mikrobiálním ekosystému jsou také spojeny s jejich schopností aktivovat určité geny v buňkách, což příznivě ovlivňuje široké spektrum střevních funkcí. Tento vliv je obvykle dočasný a projevuje se zejména během přijímání potravy obsahující probiotika. Současné výzkumy se zaměřují na zdravotní přínosy, jako je obrana proti infekcím, a dokonce ochrana před vznikem rakoviny. Probiotické bakterie totiž snižují pH ve střevech, což má za následek sníženou aktivitu enzymů spojených s vývojem rakoviny tlustého střeva, a také potlačují aktivitu prokarcinogenních enzymů [13].

Dosáhnout potřebné koncentrace probiotických bakterií ve střevech vyžaduje, aby množství bakterií v konzumovaných potravinách nebo doplňcích stravy bylo optimální. Důležité je, aby tyto bakterie byly odolné vůči působení žaludeční kyseliny a následně žlučových kyselin a pankreatických šťáv [13]. Probiotika obvykle nekolonizují gastrointestinální trakt trvale, proto je třeba jejich pravidelné užívání k doplnění mikroorganismů vylučovaných stolicí a k udržení trvalého exogenního probiotického účinku. Doporučuje se minimální populace probiotik v rozmezí 10^8 až 10^9 kolonie tvořících jednotek (CFU) na porci [14].

Probiotika jsou často součástí funkčních potravin a nachází se především v mléčných výrobcích. Jejich účinek se výrazně zvyšuje po enkapsulaci, protože to umožňuje pozvolné uvolňování buněk v potravíně, chrání probiotika před nepříznivými vlivy prostředí během zpracování a skladování potravin [15].

2.1.3 Význam probiotik

Probiotika hrají klíčovou roli v podpoře zdraví člověka díky svému pozitivnímu vlivu na střevní mikrobiom a celkovou funkčnost trávicího systému. Jako živé mikroorganismy, které při optimálním množství přinášejí hostiteli zdravotní benefity, jsou předmětem intenzivního výzkumu v oblastech prevence i léčby onemocnění, jako jsou gastrointestinální poruchy, metabolické syndromy nebo imunologické dysbalance [16].

2.1.3.1 Virové průjmové onemocnění

Rotavirus, virové průjmové onemocnění, je častým onemocněním trávicího traktu, které se vyskytuje zejména u batolat a malých dětí. Toto nebezpečné onemocnění postihuje epitelální buňky tenkého střeva a patří mezi hlavní příčiny akutní gastroenteritidy u dětí, zejména v rozvojových zemích, kde představuje významnou příčinu dětské morbidity a mortality [12].

Probiotika se v posledních letech ukázala jako slibná podpůrná terapie při léčbě rotavirových infekcí díky svým imunomodulačním a protizánětlivým vlastnostem. Tyto mikroorganismy nejen snižují závažnost průběhu onemocnění, ale také zkracují jeho trvání [17].

Mechanismus účinku probiotik při léčbě rotavirů spočívá především v kompetitivní inhibici patogenů, podpoře bariérové funkce střevního epitelu a stimulaci imunitní odpovědi hostitele. Kromě toho probiotika zvyšují produkci specifických imunoglobulinů A (IgA), což přispívá k ochraně před opakovanými infekcemi [17].

Důležité je také zdůraznit bezpečnost probiotik, která byla v klinických studiích opakovaně potvrzena. Probiotická léčba je vhodná jak pro děti, tak pro dospělé, a to i v kombinaci s rehydratační terapií, která je základním pilířem léčby rotavirové gastroenteritidy [18].

Probiotika se také využívají při léčbě antibiotiky, ty mají totiž celou řadu vedlejších účinků na zdraví pacienta. Antibiotika například mění prostředí gastrointestinální flóry tím, že kromě škodlivých bakterií ničí i ty zdraví prospěšné. To následně vede ke snížené odolnosti vůči patogenům, jako je například *Clostridium difficile*. Probiotika pak mohou pomoci navrátit zdraví prospěšné bakterie do střevní mikroflóry a zmírnit tak příznaky [19].

Přestože probiotika vykazují slibné výsledky, jejich účinnost se může lišit v závislosti na použitém kmenu a dávkování. Současné doporučení odborníků zahrnuje používání klinicky ověřených kmenů s prokázanými účinky při rotavirových infekcích [20].

2.1.3.2 Crohnova choroba

Crohnova choroba je autoimunitní chronické onemocnění střev, jehož příčina není dosud plně objasněna. Způsobuje zánětlivé procesy v různých částech trávicí soustavy, nejčastěji však v oblasti spojení tenkého a tlustého střeva [21].

Probiotika nabízejí potenciál ke zlepšení střevního mikroprostředí, stimulují produkci protizánětlivých cytokinů a snižují hladiny těch prozánětlivých, což může pomoci snížit aktivitu onemocnění [22].

V praxi jsou probiotika obvykle podávána jako podpůrná terapie spolu s tradičními léky, jako jsou kortikosteroidy, imunomodulátory nebo biologická léčba. Ačkoli zatím neexistuje univerzální doporučení pro jejich použití u všech pacientů s Crohnovou chorobou, jejich relativně nízké riziko a potenciální přínosy z nich činí zajímavou volbu, zejména pro pacienty hledající doplňkovou terapii [23].

2.1.3.3 Intolerance laktózy

Intolerance laktózy je stav, který vzniká v důsledku nedostatečné funkce nebo nízké aktivity enzymu β -galaktosidázy (také nazývaného laktáza), který je zodpovědný za štěpení laktózy na její základní složky, glukózu a galaktózu. Když je aktivita tohoto enzymu nedostatečná, tělo není schopno laktózu správně rozložit, což vede k jejímu neúplnému trávení a následnému hromadění v tlustém střevě. To může způsobit různé zažívací problémy, jako jsou nadýmání, bolest břicha, křeče a průjem [24].

Některé probiotické kmeny, zejména laktobacily, produkují enzym β -galaktosidázu, který napomáhá rozkládat laktózu, čímž usnadňuje její trávení a zmírňuje symptomy spojené s intolerancí [25].

2.1.4 Probiotika jako doplněk stravy

Probiotika jako doplněk stravy se stala v posledních letech velmi populární. Na trhu je široká škála probiotických produktů, mezi něž patří kapsle, tablety, prášky, nápoje, jogurty a další fermentované produkty. Nejběžnějšími formami jsou kapsle a prášky, které umožňují snadné a přesné dávkování, a jsou oblíbené díky své dlouhé trvanlivosti a pohodlnosti použití [26, 27].

Doplňky stravy jsou zařazovány do databáze RoHy (Registr hlavního hygienika) po prozkoumání bezpečnosti Státním zdravotním ústavem nebo na základě notifikace Ministerstvem zdravotnictví České republiky (MZd ČR). Aktuálně je evidováno více než 100 variant doplňků stravy, které obsahují probiotika a prebiotika, přičemž zhruba 40 % těchto produktů obsahuje obě tyto složky současně. Obsah mikroorganismů v jedné tobolce/kapsli je běžně označován jako 10^n . Nejčastěji se v doplňcích stravy vyskytují *Lactobacillus acidophilus* (73 %), *Bifidobacterium bifidum* (40 %), *Lactobacillus lactis* (15 %), *Lactobacillus casei* (15 %), *Lactobacillus plantarum* (15 %) [28, 29].

V mnoha komerčních výrobcích se vyskytují jak probiotika, tak prebiotika současně, viz na příkladech na obrázku (Obrázek 1) [30]. Konkrétně přípravek od firmy Blendea obsahuje *Bacillus coagulans* a polysacharid galaktomannan s vlákninou z kořene čekanky. V jedné kapsli

se nachází 2 miliardy termostabilních spór, které po aktivaci v kyselém prostředí žaludku mohou klíčit a produkovat preferovanou L(+) formu kyseliny mléčné [31]. Přírodní probiotikum GreenFood Nutrition obsahuje půdní probiotika *Bacillus coagulans* doplněná inulinem z čekanky, který slouží jako prebiotikum. Obsahují 15 miliard CFU na 1 gram [32]. Přípravek Probio24 obsahuje komplex probiotických 11 kmenů a v každé kapsli pak 11 miliard CFU. Jako prebiotikum je použit inulin [33]. Prebiotika od NaturalProtein obsahují kmen probiotik *Bacillus coagulans*. V každé kapsli je 500 milionů bakterií a pro jejich výživu je zde mikrokrytalická celulóza [34].



Obrázek 1: Příklady komerčních produktů obsahujících probiotika spolu s prebiotiky [30]

2.1.5 Rizika užívání probiotik

I když probiotika přinášejí hostiteli většinou pozitivní účinky, nelze automaticky předpokládat, že jsou zcela bezriziková. Mezi potenciální rizika užívání probiotik patří například alergie na kvasinky. Osoby trpící touto alergií by měly zvažovat vyhýbání se probiotikům obsahujícím kvasinky, jako je *Sacharomyces boulardii*, aby předešly nežádoucím reakcím [35].

V některých případech, kdy jsou probiotické bakterie nezdravě přítomny v těle, mohou vyvolat infekce, jako je bakteriémie nebo endokarditida. To by mohl být problém zvláště u osob se sníženou imunitní funkcí, jako jsou pacienti s chronickými nemocemi, transplantovaní pacienti nebo osoby užívající imunosupresivní léky [35].

Probiotika mají neznámé nebo nepředvídatelné účinky na zdraví, zejména při dlouhodobém užívání nebo nadměrném dávkování. Dochází k přemnožení bakterií nebo k převládnutí jednoho kmenu na úkor jiného, což vede k dysbióze, tedy stavu nevyváženosti mikroorganismů ve střevě. Výsledkem může být vznik zažívacích problémů [36].

Interakce probiotik s léky představují další potenciální riziko, přestože k takovým situacím dochází jen zřídka. Například kombinace probiotik s antikoagulačními léky nebo antibiotiky může ovlivnit účinnost léčby nebo zvýšit riziko vedlejších účinků. Důležitá je také kvalita samotného probiotického produktu, protože účinnost probiotik může značně kolísat mezi různými výrobci [37].

2.1.6 Vybraná probiotika

Pro vývoj synbiotického doplňku stravy byly vybrány probiotické kmeny z rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, které patří mezi nejvíce studované a nejčastěji využívané bakterie v oblasti funkčních potravin a doplňků stravy. Tyto mikroorganismy jsou přirozenou součástí lidské střevní mikrobioty a dlouhodobě se používají pro své pozitivní účinky na zdraví, jako je podpora imunitního systému, obnova rovnováhy střevního mikrobiomu a ochrana proti patogenům [38, 39]. Jejich výhodou je rovněž schopnost přežít kyselé prostředí žaludku a žlučové kyseliny, což je klíčové pro jejich účinnost po perorálním podání [40].

2.1.6.1 Rod *Lactobacillus*

Laktobacily patří mezi grampozitivní, fakultativně anaerobní bakterie, které netvoří spory. Mají tvar tyčinky a vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích nebo tvoří krátké řetězky [41]. Do roku 2020 rod zahrnoval více než 260 fylogeneticky, ekologicky a metabolicky rozmanitých druhů. Nejběžnějšími kmeny jsou *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus acidophilus* [42]. Typickým znakem těchto mikroorganismů je produkce kyseliny mléčné prostřednictvím fermentace sacharidů. Jsou široce distribuovány v přírodě, zejména v prostředích bohatých na sacharidy, jako jsou mléčné produkty, zelenina a trávicí trakt živočichů. Díky schopnosti fermentace se řadí mezi významné probiotické organismy [41].

Laktobacily hrají klíčovou roli v udržování zdravého mikrobiomu v lidském trávicím traktu. Podporují trávení, syntetizují některé vitamíny (B₂, B₉) a přispívají k posílení imunitního systému. Studie ukazují, že mohou snižovat riziko vzniku gastrointestinálních onemocnění a infekcí močových cest. Některé kmeny také produkují antimikrobiální látky, které inhibují růst patogenních bakterií [41, 43].

Laktobacily se intenzivně využívají v potravinářském průmyslu, především při výrobě fermentovaných potravin, jako jsou jogurty, sýry, kysané zelí nebo kimchi. Fermentací zlepšují chuťové vlastnosti a prodlužují trvanlivost potravin. Kromě toho se používají při výrobě probiotických doplňků stravy, které slouží k obnově střevní mikroflóry [41, 44].

2.1.6.2 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobacterium je grampozitivní anaerobní bakterie, která netvoří spory [45]. Patří mezi první mikroby, kteří kolonizují lidský trávicí trakt a předpokládá se, že mají pozitivní vliv na zdraví svého hostitele [46]. Mají tvar tyčinek a jsou přítomny jak jednotlivě, tak i v řetězcích nebo hvězdicovitě uspořádání. Příkladem jsou *B. bifidum*, *B. breve* a *B. longum*, které jsou běžně používané jako probiotika k prevenci a léčbě gastrointestinálních poruch, včetně střevních infekcí a rakoviny [45] a byly tak začleněny do mnoha funkčních potravin jako účinné složky [46].

Také bifidobakterie fermentují sacharidy za vzniku kyseliny mléčné, čímž přispívají k udržování kyselého prostředí ve střevě, které inhibuje růst patogenních mikroorganismů. Tento proces zároveň podporuje zdravou střevní mikroflóru a napomáhá lepšímu trávení.

Kyselé prostředí vytvářené bifidobakteriemi hraje klíčovou roli v ochraně střevní sliznice před kolonizací škodlivými bakteriemi a zánětlivými procesy. Kromě kyseliny mléčné mohou některé kmeny bifidobakterií produkovat také další bioaktivní látky, jako jsou bakteriociny, které mají antimikrobiální účinky [46].

2.2 Prebiotika

Název „prebiotikum“ pochází z řečtiny a skládá se ze dvou částí: „pre“ a „bios“, což v překladu znamená „před“ a „život“. Toto označení odkazuje na důležitost prebiotik pro život probiotik [47].

Prebiotika jsou látky, které podporují růst a aktivitu prospěšných bakterií ve střevě. Na rozdíl od probiotik, které jsou živé mikroorganismy, prebiotika samotná neobsahují živé bakterie, ale slouží jako potrava pro ty prospěšné bakterie, které již přirozeně obývají trávicí trakt. Naopak omezují růst bakterií, které produkují toxické sloučeniny amoniaku, dusíku a síry. Prebiotika mají také schopnost vázat některé vitamíny, stopové prvky a toxiny, takže nejenže pomáhají vstřebat důležité a zdravé prospěšné látky, ale také chrání střevní sliznici a v konečném důsledku chrání i celý lidský organismus. Dále se podílí na zpomalení vstřebávání jednoduchých sacharidů, podporují imunitní systém, působí protirakovinně a brání růstu choroboplodných bakterií (*Salmonella*, *Clostridium*, *Escherichia coli*) [47].

Zdrojem prebiotik, nestravitelné složky potravy označované jako vláknina, může být například česnek, cibule, chřest, oves, ječmen, pórak či další potraviny, které obsahují rezistentní škroby. Prvním, a pro člověka nejlepším, zdrojem prebiotik je mateřské mléko, které obsahuje až 15 tzv. oligosacharidů na litr [48]. Dále mohou být také získány mikrobiologickou produkcí, enzymatickou syntézou nebo enzymatickou degradací polysacharidů [49].

Aby se potraviny mohly označovat jako prebiotika, musí splňovat tři požadavky: nesmí být hydrolyzovány ani absorbovány v horní části gastrointestinálního traktu, musí být selektivním substrátem pro jeden nebo více druhů příznivé mikroflóry ve střevech (stimulace růstu probiotických bakterií) a musí mít schopnost měnit složení střevní mikroflóry ve prospěch žádoucích kultur [50].

Doporučený denní příjem prebiotik není v současnosti legislativně stanoven, a proto je vždy nutné se u doplňků stravy řídit doporučeným denním dávkováním dle výrobce a u potravin se řídit všeobecnými výživovými doporučeními. Běžně se doporučují dávky asi 5 až 8 gramů prebiotik za den. U pacientů se specifickými poruchami zažívacího traktu lze doporučit dávku až 15 gramů za den. Někdy jsou doporučované hodnoty denního příjmu prebiotik udávány jako 0,3 g/kg hmotnosti u mužů a 0,4 g/kg u žen. Rozdíly doporučeného denního příjmu záleží na zdroji informací [47].

Mezi nejčastěji používaná prebiotika patří fruktooligosacharidy (FOS), inulin, galaktooligosacharidy (GOS), laktulóza a oligofruktóza. Tyto látky jsou odolné vůči trávení ve střevě a mohou se fermentovat bakteriemi v tlustém střevě, což podporuje jejich růst a aktivitu. Nejvýznamnější typy prebiotik a jejich zdroje jsou uvedeny v tabulce (*Tabulka 2*) [49].

Prebiotika vykazují několik nutričních charakteristik. Mohou být začleněna do potravin s cílem podpořit růst mikrobiomu v gastrointestinálním traktu, čímž zlepšují kvalitu potravin.

Prebiotika také přispívají k větší čerstvosti potravin a udržují je po dlouhou dobu vlhké. Mohou být formulovány buď jako prášek nebo sirup a prodávány jako doplňky stravy, nebo začleněny do potravinářských produktů (např. jogurtů a chlebů) [51]. Vzhledem k pozitivnímu vlivu prebiotik na střevní mikrobiom se stávají stále populárnějšími doplňky stravy a jsou často kombinovány s probiotiky pro zvýšení jejich účinku [47].

Tabulka 2: Přehled prebiotik a jejich hlavních zdrojů (FOS=fruktooligosacharidy, GOS=galaktooligosacharidy) [49]

Typy prebiotik	Zdroje prebiotik
FOS	Chřest, čekanka, cukrová řepa, česnek, cibule, pšenice, med, banán, ječmen, rajčata, žito
GOS	Lidské mléko a kravské mléko
Laktulóza	Laktóza (mléko)
Xylooligosacharidy	Bambusové výhonky, ovoce, zelenina, mléko, med, pšeničné otruby
Maltooligosacharidy	Škrob
Isomaltooligosacharidy	Škrob
Arabinoxyloligosacharidy	Pšeničné otruby

2.2.1 Historie prebiotik

Termín "prebiotikum" byl poprvé použit až v roce 1990. Původní definice prebiotika označovala nestravitelné látky v potravě, které příznivě ovlivňují hostitele selektivní stimulací růstu a aktivity určitých bakterií v tlustém střevě, čímž přispívají k lepšímu zdraví. Definice prošla aktualizací v roce 2004. Prebiotikum se nyní chápe jako selektivně fermentovatelná látka, umožňující konkrétní změny ve složení a/nebo činnosti střevního mikrobiomu. Jinými slovy, prebiotika jsou potravní látky, které podporují růst probiotických mikroorganismů [7].

Historie používání prebiotik sahá až do minulosti, kdy lidé často konzumovali potraviny jako čekanku nebo topinambury, které obsahují prebiotické látky. Zelenina, ovoce, celozrnné potraviny a chléb byly také běžnou součástí stravy, což přispívalo k dostatečnému příjmu prebiotik. Nicméně, až později, spolu s objevem a výzkumem probiotik, lidé pochopili význam a funkci prebiotik pro lidský organismus [47].

I přes toto historické povědomí stále existuje mnoho otázek ohledně mechanismů účinků a synergických interakcí mezi prebiotiky a probiotiky. Provádění dalšího výzkumu a zkoumání problematiky je zásadní pro lepší porozumění vlivu na zdraví a léčbu různých onemocnění [47].

2.2.2 Účinek prebiotik

Prebiotika obecně patří mezi látky, které pro člověka jsou těžko stravitelné nebo nestravitelné. Přesto jsou významnou součástí naší stravy, neboť slouží jako potrava pro bakteriální mikrobiom v našem trávicím traktu. Střevní bakterie disponují enzymy, které umožňují fermentaci, tedy kvašení, prebiotik a tím získávání energie pro svůj růst a množení. Při této fermentaci vznikají jako vedlejší produkty organické kyseliny, jako je kyselina máselná, octová, propionová nebo mléčná, které hrají klíčovou roli v udržování optimálního pH a celkového prostředí v našem trávicím traktu. Pro dosažení maximálního prebiotického efektu, ať už pomocí potravin nebo doplňků stravy, je nezbytné, aby dané prebiotikum bylo odolné vůči proměnlivému pH a enzymům v trávicím traktu [47, 52].

Prebiotika můžeme rozdělit na 3 skupiny podle délky uhlíkatého řetězce.

- Prebiotika s krátkým řetězcem
Takzvané oligosacharidy s krátkým řetězcem jsou fermentovány především v pravé části tlustého střeva (tračník vzestupný – začátek tlustého střeva) a poskytují výživu pro bakterie, které osidlují právě tuto část střeva.
- Prebiotika se středně dlouhým řetězcem
Například inulin, který je oligosacharid se středně dlouhým řetězcem, fermentuje pomaleji a dostává se až do střední části tlustého střeva (tračník příčný až sestupný).
- Prebiotika s dlouhým řetězcem
Pokud je inulin obohacený o fruktooligosacharidy, jeho řetězec je dlouhý a působí takzvaně „širokospektrálně“ – ve všech úsecích tlustého střeva [47].

2.2.3 Význam prebiotik

Prebiotika přinášejí řadu příznivých účinků na lidský organismus, proto se využívají například při podpůrné léčbě alergické reakce, jako je astma, ekzém, kopřivka, rýma či senná rýma. Tato onemocnění jsou dnes velmi běžná jak u dětí, tak i dospělých. U některých dětí se tyto alergie mohou projevit již v raném věku během kojení. Výzkumy naznačují, že přidání prebiotik do kojenecké výživy může snížit riziko rozvoje ekzému u dětí. Mateřské mléko obsahuje přirozeně prebiotika, zejména nestravitelné oligosacharidy, jako jsou FOS a GOS, v poměru 1:9. Pro nekojené děti však může nedostatečný příjem těchto látek zvyšovat riziko alergických onemocnění [53].

Prebiotika mají vliv i na metabolismus lipidů. Podle některých studií fruktooligosacharidy a zejména inulin snižují hladinu triacylglycerolů a celkového cholesterolu tím, že ovlivňují aktivitu lipidogenních enzymů. Bylo také zjištěno, že prebiotika přispívají ke snížení hmotnosti. Zvyšují totiž pocit sytosti, což je i důvodem, proč jsou často součástí redukčních diet [7].

Kromě toho bylo prokázáno, že inulin významně zvyšuje vstřebávání vápníku a dalších minerálů a podporuje mineralizaci kostí během pubertálního růstu. Pravidelná konzumace prebiotik tedy v mladém věku může mít pozitivní vliv na zdraví kostí a metabolismus minerálů [7].

Fermentace prebiotik také vede k tvorbě SCFA (mastné kyseliny s krátkým řetězcem), které mohou mít několik příznivých účinků na sliznici tlustého střeva. Kyselina máselná, jedna

z SCFA, slouží jako růstový faktor pro epitelální buňky střevní sliznice a má potenciální protizánětlivé a protinádorové účinky [7].

Od roku 1980 se oligosacharidy také stále více používají v potravinářském průmyslu (nápoje, sladkosti) k úpravě viskozity, emulgační schopnosti, tvorby gelu, bodu mrznutí a barvy potravin. Vykazují vlastnosti důležité z hlediska výživy a zdraví, jako je mírná sladivost (obvykle 30-60 % hodnoty sacharózy), nízká kariogenita (schopnost určité látky nebo mikroorganismu způsobovat zubní kaz), nízká kalorimetrická hodnota a nízký glykemický index [7, 54].

2.2.4 Bezpečnost prebiotik

Vzhledem k tomu, že prebiotika jsou přirozenou součástí našeho jídelníčku a jsou nezbytně nutná pro správné fungování, existenci a rozmnožování střevní mikroflóry, jejich toxicita je prakticky vyloučena. Nejsou známy žádné vedlejší účinky nebo interakce s jinými léky, doplňky stravy nebo léčivými rostlinami. Výjimkou může být alergická reakce, pravděpodobně na některou složku potravin nebo doplňku stravy, nikoli však na samotné prebiotikum [47, 51].

Při běžném užívání prebiotik dle doporučení výrobce není možné, aby došlo k předávkování. Při nadměrném nebo neuváženém příjmu prebiotik, zejména ve velmi vysoké koncentraci prostřednictvím doplňků stravy, se mohou vyskytnout zažívací potíže jako průjem, zácpa, bolesti břicha, nadýmání nebo zvýšená střevní motilita (pohyb střev pro posun potravy trávicím traktem). Nicméně, většinou je suplementace prebiotiky dobře snášena bez negativních vedlejších účinků u všech věkových skupin a doporučuje se i v těhotenství [47, 55].

2.2.5 Prebiotické potraviny

Různé druhy potravin, potažmo prebiotik, ovlivňují růst různých střevních mikroorganismů a jejich zastoupení v gastrointestinálním traktu. Většina běžně konzumovaných potravin má nízký obsah vlákniny. Obecně platí, že přijatelné porce potravin obsahují 1 až 3 g vlákniny na porci. Vyšší obsah vlákniny mají potraviny rostlinného původu, celozrnné výrobky a fermentované potraviny. Mezi další zdroje vlákniny patří volně prodejná projímadla obsahující vlákninu, doplňky stravy s vlákninou a potraviny obohacené vlákninou [56].

Potenciální prebiotické účinky jsou spojovány s bohatým složením oligosacharidů, jako jsou fruktooligosacharidy a pektinové oligosacharidy, které jsou považovány za potenciální prebiotika. Kromě toho vědci rozpoznali potenciální prebiotický účinek polyfenolů z ovoce a zeleniny na zlepšení růstu zdravých cílových bakterií [57].

2.2.5.1 Ovoce a zelenina

Ovoce a zelenina tvoří rozmanitou skupinu rostlinných potravin, které se značně liší obsahem energie a živin. Například citrusové plody, jahody a zelené papriky jsou bohaté na vitamín C, zatímco avokádo, kukuřice, brambory a fazole obsahují více škrobu. Ovoce (s výjimkou banánů) a tmavě zelená zelenina obsahují škrob jen málo nebo vůbec. Ovoce a zelenina také dodávají do stravy vitaminy a minerální látky a jsou zdrojem fytoestrogenů a fytochemikálií, které působí jako antioxidanty [58].

Kromě toho ovoce a zelenina obsahují vlákninu, kdy je s jejím příjmem spojen nižší výskyt kardiovaskulárních onemocnění a obezity [58]. Původ vlákniny v ovoci a zelenině se nachází ve stěnách parenchymatických buněk. V technologické zralosti mají buněčné stěny schopnost poskytovat rozpustné polysacharidy, jako jsou pektinové polysacharidy, ale také celulózu- spolu s xyloglukany, nerozpustnými vlákny, heteroxylany a v malém množství galaktogukomanany. Zelenina poskytuje ve srovnání s ovocem vyšší příjem vlákniny, zejména nerozpustné, jako je celulóza a lignin [59].

Ovoce a zelenina se často nekonzumují v jejich přirozené syrové podobě, ale mohou být vařené, smažené nebo kombinované s dalšími ingrediencemi. Tyto způsoby úpravy však mohou významně ovlivnit jejich nutriční hodnotu. Například vařené brambory jsou bohaté na živiny, zatímco smažené brambory, jako hranolky, mohou do stravy přidat velké množství tuku. Podobně odstranění slupek z ovoce a zeleniny může výrazně snížit obsah vlákniny. Grapefruit bez membrán obsahuje výrazně méně vlákniny (0,4 g/porce) než grapefruit konzumovaný s membránami (1,4 g/porce). Domácí vaření má na obsah vlákniny obecně minimální dopad, a v některých případech může dokonce její obsah zvýšit. Vaření nebo jiné tepelné zpracování, jako je pečení, mohou odstranit vodu, což koncentruje vlákninu v konečném produktu. Tepelná úprava tedy může zvýšit biologickou dostupnost některých živin (například lykopenu v rajčatech), zatímco syrová zelenina může zachovat vyšší obsah některých vitamínů, jako je vitamín C, který je citlivý na teplo [58].

2.2.5.2 Fermentované produkty

Fermentované potraviny jsou výsledkem procesu, při kterém mikroorganismy, jako jsou bakterie, kvasinky a plísňe, přeměňují složité látky v potravinách na jednodušší sloučeniny. Tento proces nejen prodlužuje trvanlivost potravin, ale také zlepšuje jejich nutriční hodnotu a chuťové vlastnosti. Mezi nejběžnější fermentované potraviny patří jogurt, kefir, kysané zelí, kimchi, tempeh a kombucha. Tyto potraviny jsou cenným zdrojem prebiotik a jejich zařazením do stravy může přispět k lepšímu trávení, posílení imunitního systému a celkovému zlepšení zdraví [60].

Konečnými produkty fermentace jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), jako je acetát, butyrát a propionát. Ty mohou mít při produkci ve střevě příznivé lokální a systémové účinky na zdraví hostitele [57].

2.2.6 Vybrané druhy zeleniny

Výběr konkrétních druhů zeleniny byl založen na jejich běžné dostupnosti, nutričním složení a na přítomnosti bioaktivních látek s prebiotickým potenciálem. Tyto druhy zeleniny jsou bohaté na vlákninu, polyfenolické sloučeniny, antioxidanty, vitaminy a minerály, které mohou pozitivně ovlivňovat střevní mikrobiotu a podporovat růst probiotických mikroorganismů. Kromě toho se vyznačují, snadnou zpracovatelností a příznivým sensorickým profilem, což je činí vhodnými pro začlenění do funkčních potravin [38, 61, 62].

2.2.6.1 Červená řepa

Červená řepa je oblíbená kořenová plodina pěstovaná pro své dužnaté kořeny [63]. Obsahuje významné flavonoidy, betalain a také fosfor, jód, vápník, draslík, hořčík, měď a železo. Z vitamínů jsou zastoupeny vitamin A, a s ním spojený betakaroten, i vitaminy B a C [64].

Z červené řepy lze připravit šťávu, sušený prášek, polévkovou směs, chipsy atd [63]. Jejich zařazení do jídelníčku může dle studií podpořit detoxikaci a účinně tak pročistit játra [64].

2.2.6.2 Špenát

Špenát je velmi populární a univerzální zeleninou běžně používanou jako salát, vařená zelenina nebo jako součást mnoha dalších vařených masových a zeleninových pokrmů [65].

Špenát je jednou z nejžádanějších tmavě zelených listových zelenin, protože má vysoký obsah betakarotenu a kyseliny listové a je také dobrým zdrojem vitamínu C, vápníku, železa fosforu, sodíku a draslíku. Má vysoký obsah karotenoidu luteinu, který prokazatelně zabraňuje věkem podmíněné makulární degeneraci. Špenát je dobrým zdrojem antioxidantů a má jednu z nejvyšších hodnot ORAC (kapacita absorpce kyslíkových radikálů) ze všech druhů zeleniny [65].

2.2.6.3 Řapíkatý celer

Celer je nízkokalorická a netučná potravin, která je z 95 % hmotnosti tvořena vodou. Patří mezi potraviny s nízkým obsahem sacharidů, protože obsahuje pouze 3 celkové sacharidy v jedné porci. Asi 1,5 gramu z těchto sacharidů tvoří vláknina, která absorbuje vodu a bobtná v trávicím traktu, čímž zajišťuje objem a udržuje pohyb potravin v těle [66].

Konzumace celeru jako součásti vyvážené stravy pomáhá doplnit denní potřebu vitamínu K, vitamínu A i vitamínu B. Celer obsahuje také některé důležité minerální látky, včetně draslíku a vápníku [66].

Řapíkatý celer se využívá především do salátů nebo polévek. Úspěšně se uvádějí na trh i zpracované směsi celerové šťávy v kombinaci se zeleninou a stávají se oblíbenými jako výživné nápoje a uvádí se, že fungují jako očistný nápoj, který je vhodný při rekonvalescenci po mnoha chronických onemocněních [67].

2.2.6.4 Mrkev

Mrkev je jedním z nejoblíbenějších druhů zeleniny pěstovaných a konzumovaných v mnoha zemích světa. Existují různé kultivary včetně bílých, oranžových, červených a fialových odrůd [68].

Přestože je mrkev bohatá na vlákninu a minerální látky, je ceněna především pro vysoký obsah betakarotenu. Kromě toho kořen obsahuje některé další bioaktivní sloučeniny včetně dalších forem karotenoidů a fenolových sloučenin, vitamínu C a polyaktilenů [69].

Předpokládá se, že mrkev má díky svému nutričnímu složení a antioxidační kapacitě různě zdraví prospěšné účinky, včetně potenciálu předcházet kardiovaskulárním onemocněním a některým typům rakoviny [68].

2.2.6.5 Cuketa

Cuketa je nízkokalorická potravina bohatá na vlákninu, vitamíny a minerály. Obsahuje významné množství vitamínu C, draslíku, folátů a provitamínu A. Dále obsahuje vitamíny B₆, thiamin, riboflavin a menší množství vitamínu K. Díky vysokému obsahu vody (přibližně 95 %) je cuketa osvěžující a vhodná pro hydrataci organismu [70].

Pravidelná konzumace cukety podporuje trávení. Díky obsažené vláknině pomáhá při regulaci střevní peristaltiky a snižuje riziko zácpy. Obsah antioxidantů, jako jsou lutein a zeaxanthin, může pomoci chránit oči před věkem podmíněnou makulární degenerací. Nízký obsah sacharidů a kalorií činí cuketu vhodnou pro osoby s cukrovkou nebo na redukční dietě [70].

Cuketa je všestranná surovina, lze ji konzumovat syrovou, vařenou, pečenou nebo grilovanou. Je skvělou surovinou pro přípravu šťáv a smoothies, zejména díky svému vysokému obsahu vody a jemné chuti, která se snadno kombinuje s ostatními ingrediencemi. V průmyslu se cuketa používá k produkci nízkokalorických potravin a dietních produktů [70].

2.3 Synbiotika

V roce 1995 Glenn Gibson a Marcel Roberfroid poprvé představili koncept prebiotik a navrhli, že jejich kombinace s probiotiky by mohla vytvořit novou kategorii nazvanou synbiotika. V roce 2011 Gibson a Kolida rozšířili kritéria pro definici synbiotik a rozdělili je na dvě skupiny podle účinku – komplementární a synergické. Tento koncept se dále rozvíjel a vědci z oblasti zdraví střev a mikrobiomu se rozhodli definici synbiotik sjednotit. Panel odborníků sestavený ISAPP (Mezinárodní vědecká asociace pro probiotika a prebiotika) publikoval konsenzuální definici v prestižním časopise *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* [71, 72].

Nová definice synbiotik zní: „Směs obsahující živé mikroorganismy a substrát(y) selektivně využívaný(é) hostitelskými mikroorganismy, která přináší hostiteli zdravotní prospěch.“ Tato definice zahrnuje dva klíčové typy synbiotik. Synergická synbiotika jsou vytvořena tak, že substrát specificky podporuje růst či aktivitu podávaných mikroorganismů. Synbiotikum zde nemusí nutně splňovat všechna kritéria samostatného probiotika či prebiotika, pokud je jeho účinek pro hostitele prospěšný. Komplementární synbiotika kombinují známé probiotikum

s prebiotikem, které podporuje růst přirozených mikroorganismů hostitele. V tomto případě musí každá složka splňovat minimální požadavky na probiotika nebo prebiotika [71, 72].

Definice je navržena tak, aby byla široce použitelná. Synbiotika mohou být zaměřena nejen na lidské zdraví, ale také na zdraví zvířat, a to jak domácích, tak hospodářských. Mohou být přizpůsobena konkrétním podskupinám, například dětem, seniorům nebo jedincům se specifickými potřebami. Navíc lze synbiotika využít i mimo oblast střev, například pro péči o pokožku [71, 73].

Synbiotika se využívají nejen ke zlepšení přežití prospěšných mikroorganismů přidávaných do potravin, ale také k podpoře růstu specifických nativních bakteriálních kmenů přítomných v potravinách, krmivech nebo gastrointestinálním traktu. Jejich vliv na metabolické zdraví však zatím není zcela objasněn, pravděpodobně závisí na konkrétní kombinaci probiotik a prebiotik, která je použita. Díky širokým možnostem různých kombinací se aplikace synbiotik jeví jako slibný přístup k modulaci střevní mikroflóry u lidí. Tato variabilita zároveň otevírá prostor pro další výzkum a optimalizaci účinků synbiotik na lidské zdraví [73, 74].

2.3.1 Mechanismus účinku synbiotik

Prebiotika se používají především jako selektivní médium pro růst probiotického kmene, fermentaci a průchod střevem. V literatuře se objevují náznaky, že díky použití prebiotik získávají probiotické mikroorganismy vyšší toleranci k podmínkám prostředí, včetně: okysličení, pH a teploty ve střevě daného organismu. Tato kombinace složek vede k vytvoření životaschopných mikrobiologických doplňků stravy a zajištění vhodného prostředí umožňující pozitivní dopad na zdraví hostitele. Existují dva známé mechanismy působení synbiotik:

- Zlepšení životaschopnosti probiotických mikroorganismů.
- Poskytování specifických zdravotních přínosů [74].

Stimulace probiotik prebiotiky přispívá k modulaci metabolické aktivity ve střevě, udržuje střevní biostrukturu, podporuje rozvoj prospěšné mikrobioty a potlačuje potenciální patogeny přítomné v gastrointestinálním traktu. Synbiotika rovněž snižují koncentrace nežádoucích metabolitů, jako jsou nitrosaminy a karcinogenní látky, a přispívají k jejich inaktivaci. Důsledkem jejich užívání je zvýšení hladin mastných kyselin s krátkým řetězcem, ketonů, disulfidů uhlíku a methylacetátů, což může pozitivně ovlivnit zdraví hostitele [74].

Mezi žádoucí vlastnosti synbiotik patří antibakteriální, antikancerogenní a antialergické účinky. Dále omezují rozkladné procesy ve střevě, pomáhají předcházet zácpě a průjmům a mohou být účinné při prevenci osteoporózy, snižování hladiny tuků a cukru v krvi, regulaci imunitního systému a léčbě mozkových poruch spojených s dysfunkcí jater [74]. Vykazují pozitivní účinek při léčbě laktóзовé intolerance, syndromu dráždivého tračníku, zánětlivých střevních onemocnění a výzkum probíhá u různých negastrointestinálních onemocnění [73].

2.3.2 Aplikace synbiotik

Synbiotika nacházejí široké uplatnění v různých oblastech, zejména v potravinářství, zdravotnictví, farmakologii a živočišné výrobě. V potravinářství jsou synbiotika využívána především ve funkčních potravinách a doplňcích stravy. Tyto produkty pomáhají udržovat rovnováhu střevní mikrobioty, podporují imunitní systém a zlepšují celkové zdraví konzumenta [74]. Synbiotika jsou přidávána například do fermentovaných mléčných výrobků, jako jsou jogurty, kefiry nebo sýry, ale také do rostlinných alternativ a nápojů. Moderní technologie umožňují jejich zapracování do kapslí, prášků či žvýkacích tablet, čímž se rozšiřuje dostupnost těchto látek i mimo běžnou stravu [75].

Ve zdravotnictví a farmakologii se synbiotika uplatňují při prevenci a léčbě řady onemocnění. Mohou rovněž podporovat regeneraci mikrobioty po užívání antibiotik a přispívat ke zmírnění zánětlivých procesů v těle [76].

2.4 Enkapsulace

Enkapsulace je proces, při kterém je jeden materiál nebo směs materiálů potažena nebo zachycena jiným materiálem nebo systémem. Enkapsulovaná částice se tedy skládá ze dvou hlavních částí, vnitřní a vnější. Vnější fáze funguje jako obal nebo nosič (někdy nazývaný kapsle, matrice nebo membrána) [77]. Materiály, které se využívají pro vznik tohoto ochranného pláště, musí být schopné vytvořit bariéru mezi vnitřní fází a okolím, měly by být potravinářské kvality a biologicky odbouratelné. Nejčastěji se používají tuky, škroby, dextry, algináty, bílkoviny a lipidy [39]. Samotná látka nebo účinná složka tvoří druhou, vnitřní, fázi. Nejčastěji se jedná o kapalinu, ale může to být i pevná částice nebo plyn, a označuje se různými názvy, jako je vnitřní fáze, aktivní látka, jádro nebo výplň [77].

Technika enkapsulace se stále častěji používá v potravinářském průmyslu, protože zapouzdřené materiály lze chránit před vlhkostí, teplem nebo jinými extrémními podmínkami, čímž se zvyšuje jejich stabilita a zachovává životaschopnost. Zapouzdření v potravinách se také využívá k maskování pachů nebo chutí. Enkapsuluje se široká škála potravin - mimo jiné aromatické látky, kyseliny, zásady, umělá sladidla, barviva, konzervační látky, kypřící látky, antioxidanty, látky s nežádoucí chutí, vůní a živiny [78].

Uvolnění účinné látky z kapslí může probíhat různými způsoby v závislosti na použité technologii. Uvolnění může být specifické pro dané místo, specifické pro danou fázi nebo signalizované změnami pH, teploty, ozářením nebo osmotickým šokem. V potravinářském průmyslu se však nejčastěji využívá metoda, při níž dochází k uvolnění účinné složky aktivací rozpouštědlem [78]. Pokud jde o enkapsulaci probiotik, zapouzdření musí být navrženo tak, aby umožnilo úspěšné uvolnění životaschopných mikroorganismů až ve střevě po průchodu trávicím traktem. Mezi hlavní výhody enkapsulace probiotických buněk patří ochrana před působením žaludečních kyselin a bakteriofágů během tranzitu synbiotik trávicí soustavou, ale také zvýšená stabilita při technologických procesech, jako je lyofilizace, zmrazení a dlouhodobé skladování [79].

2.4.1 Metody enkapsulace

Existuje několik metod enkapsulace, které se používají v potravinářském průmyslu. Mezi nejběžnější techniky patří sprejové chlazení a sušení, emulgace, lyofilizace, koacervace, kokrytalizace, extruze, inkluze a uzavření do lipozomu. Každá z těchto technik má své specifické využití a výhody v závislosti na aplikaci a požadovaných vlastnostech enkapsulované látky [77, 78].

2.4.1.1 Sprejové sušení

Tradičně nejběžnější metodou zapouzdřování složek potravin je sušení rozprašováním. Sprejové sušení je stále neekonomičtější a nejpoužívanější metodou enkapsulace, kdy se kapalná surovina rozpraší do horkého vzduchu, čímž vznikají částice obvykle menší než 40 µm [39, 77].

Technika sprejového sušení se běžně používá pro výrobu stabilních přídatných látek a příchutí v potravinářském průmyslu. Obalový materiál, jako je arabská guma nebo maltodextriny, je rozpuštěný ve vodě a smíchán s aktivní látkou. Směs je pak sprejována do sušárny, kde dochází k vypařování vody a vzniku suchých částic [80, 81].

Sprejové sušení je také využíváno pro enkapsulaci probiotických kultur, kde jsou buňky smíchány s polymerním roztokem a vysušeny v horkém vzduchu. Takto získané mikrokapsle umožňují stabilní uchování probiotik a jsou snadno použitelné ve formě suchého prášku [82].

2.4.1.2 Sprejové chlazení

Metoda sprejového chlazení se využívá pro enkapsulaci aromat, enzymů, přípravků do sušených polévek a do pekařských produktů. Podobně jako u sprejového sušení, i zde se směs aktivní látky a obalového materiálu vstříkují do prostoru, ale v chladicí komoře, kde je používán studený vzduch a nižší teploty. Tím nedochází k odpařování vody ze vzorku [39, 83].

Při této metodě se aktivní látka obvykle rozpouští v lipidech, může být přítomná jako suchá částice nebo ve vodné emulzi. Jako obalový materiál se často používá rostlinný olej, jeho deriváty, tuky nebo glyceroly. V důsledku toho vzniklé mikrokapsle mají lipidový povlak a jsou nerozpustné ve vodě, což je vhodné pro enkapsulaci látek, které jsou ve vodě rozpustné, jako jsou minerály, enzymy, příchutě a vitamíny rozpustné ve vodě [39].

2.4.1.3 Lyofilizace

Lyofilizace, nebo také sušení mrazem, je metoda, při které se odstraňuje voda ze vzorku. Nosič a aktivní látka se nejprve rozpouští ve vodě a následně zmrazují. Za sníženého tlaku (vakua) je odstraněna voda pomocí sublimace. Sublimační sušení může trvat až 20 hodin. Tato metoda je tedy relativně nenáročná, ale vyžaduje dlouhou dobu dehydratace [84].

Technika lyofilizace je ideální pro materiály citlivé na teplo a těkavé aromatické látky, a často se využívá k zapouzdření přírodních látek, esencí, aromatických látek a léčiv [85].

Nové informace naznačují, že lyofilizace stále zůstává významnou metodou, která nachází široké uplatnění nejen ve farmaceutickém průmyslu, ale také v potravinářství a kosmetickém průmyslu. V potravinářském průmyslu se lyofilizace využívá k zachování vlastností potravin, jako jsou chuť, aroma a nutriční hodnota, a k prodloužení jejich trvanlivosti [86]. V kosmetickém průmyslu se lyofilizace používá pro výrobu kosmetických produktů s vysokou účinností a stabilitou aktivních složek. Tato technika umožňuje výrobu krémů, sérem a dalších produktů s konzistencí a vlastnostmi podobnými čerstvým ingrediencím [84, 87].

2.4.2 Enkapsulátor

Enkapsulátor je zařízení určené k zapouzdření aktivních látek – například probiotik, léčiv, enzymů, aromat nebo vitaminů – do ochranné matrice, která tvoří tzv. kapsli či částici. Tento proces slouží k ochraně těchto látek před vnějšími vlivy, ke zlepšení jejich stability, kontrolovanému uvolňování a cílenému transportu v organismu či v potravinářských, farmaceutických a kosmetických produktech [82, 88].

Moderní laboratorní enkapsulátory využívají metody, jako je vibrační technologie, kdy je roztok obsahující aktivní složky veden tryskou a rozbíjen na pravidelné kapičky, které dopadají do gelující lázně (např. alginát vápenatý), čímž vznikají sférické kapsle [88].

Enkapsulace může probíhat jako mikroenkapsulace (částice do 1 mm), nanoenkapsulace (částice pod 1000 nm), nebo multivrstvá enkapsulace, kde jsou složky chráněny několika vrstvami. Velikost jednotlivých částic reguluje několik parametrů, mezi něž se řadí frekvence vibrací, amplituda, velikost trysky, rychlost průtoku a fyzikální vlastnosti směsi produktu s polymerem [79, 88].

2.4.3 Materiály používané pro vytvoření vnější fáze

Zapouzdření probiotik ve vnější vrstvě umožňuje nejen změnu estetických a senzorických vlastností výrobku, ale zároveň poskytuje vysokou úroveň ochrany buňkám. Pro aplikaci se využívají různé typy polymerních materiálů [89]. Látky, které mohou být využity k enkapsulacím v potravinářském průmyslu musí být zařazeny mezi aditiva, které se řadí do skupiny „všeobecně považované za bezpečné“ (Generally Recognised As Safe – GRAS) [39].

Mezi nejčastěji používané patří polysacharidy. Jsou to například škrob a jeho deriváty (amylóza, amylopektin, dextriny, maltodextriny, polydextróza), celulóza a její deriváty, a extrakty z rostlin (např. arabská guma, pektiny) jsou běžně využívány pro vytvoření vnější vrstvy enkapsulace. Z mořských řas jsou populární algináty, z mikrobiálních a zvířecích zdrojů jsou to například dextran, chitosan, xanthan nebo gellan. Proteiny, jako je kasein nebo želatina, a lipidy, jako jsou mastné kyseliny, vosky (včelí, karnaubský) a fosfolipidy, jsou dalšími možnostmi materiálů pro vnější vrstvu. Tato variabilita v použitých materiálech umožňuje přizpůsobit enkapsulaci specifickým potřebám produktu a zajistit optimální ochranu a stabilitu probiotických kultur [39].

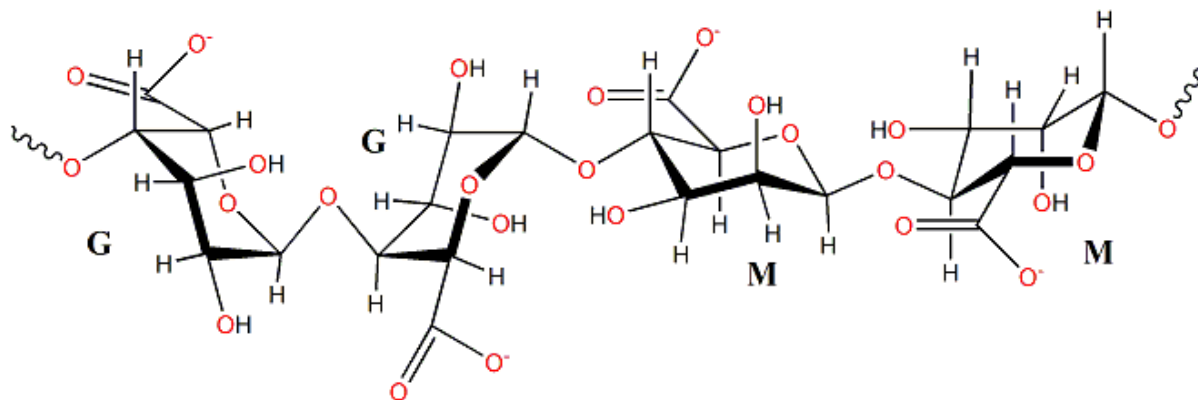
Všechny tyto látky musí být biologicky odbouratelné, požitelné, nesmí reagovat s aktivní látkou a zároveň ji musí být schopné v kapsli udržet během zpracování a skladování a musí vytvořit bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím. Pro enkapsulaci probiotik se nejčastěji využívá alginát a chitosan [39, 89].

2.4.3.1 Alginát

Alginát, známý také jako alginová sůl, patří mezi nejčastěji používané materiály pro vnější vrstvu enkapsulace probiotik, díky své schopnosti vytvářet stabilní gelové struktury. Struktura alginátu je zobrazena na obrázku (Obrázek 2). Jedná se o přírodní polysacharid získávaný extrakcí hnědých mořských řas alkáliemi, jako je NaOH. Tento polysacharid se poté sráží vápenatou solí pomocí přídavku CaCl_2 nebo okyselením HCl na alginovou kyselinu. Vápenatá sůl se následně přeměňuje zpět na sodnou sůl, která je finálním komerčním produktem alginátu. Alginát může být také produkován bakteriemi, jako jsou rody *Azotobacter* či *Pseudomonas* [90, 91].

V potravinářském průmyslu se alginát využívá zejména jako stabilizátor, zahušňovač nebo emulgátor, který pomáhá zlepšit konzistenci potravin [90].

Struktura alginátu je složena z nevětveného lineárního kopolymeru β -D-mannuronové a α -L-guluronové kyseliny, spojených glykosidickými vazbami. Tyto řetězce mohou být spirálovité nebo téměř lineární a obsahují obvykle 180 až 930 cukerných jednotek. Alginátová molekula může obsahovat úseky s pouze molekulami M, úseky s pouze molekulami G nebo smíšené úseky MG [92].



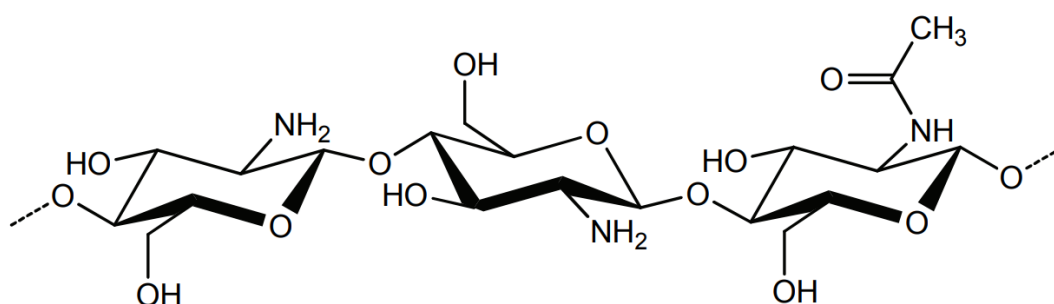
Obrázek 2: Struktura alginátu [92]

2.4.3.2 Chitosan

Chitosan je přírodní lineární polysacharid složený z 2-amino-2-deoxy-D-glukopyranosy a 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosy. Jeho struktura je zobrazena na obrázku (Obrázek 3). Nejčastěji se získává z N-acetylaci chitinu, který je následně odbourán koncentrovanou zásadou při teplotách 100 °C a vyšších. Tento proces vede k odstranění acetylových skupin, čímž vzniká chitosan [93–95].

Chitosan má řadu vlastností, včetně biokompatibility, snadné biodegradace a nízké toxicity, což umožňuje jeho široké využití v potravinářství, medicíně, farmacii a výrobě detergentů. Je nerozpustný ve vodě a organických rozpouštědlech, ale dobře se rozpouští v kyselině dusičné, octové, chlorovodíkové a dalších kyselinách [93].

Molekuly chitosanu mají kladné náboje, a proto dochází v přítomnosti záporných nábojů ke koagulaci. Tento princip se využívá i při enkapsulaci, kdy se chitosan sráží roztokem tripolyfosfátu sodného. V přítomnosti kovů může dojít k tvorbě komplexů. I když jsou jak chitosan, tak kovy pro člověka nestravitelné, chitosan má významný vliv na snížení hladiny cholesterolu a tuků v játrech a krevním séru [91, 93].



Obrázek 3: Struktura chitosanu [94]

2.5 Stav současné problematiky v oblasti synbiotik

Na trhu se objevuje široká škála přípravků, které kombinují probiotické kultury s rostlinnými složkami, zejména tzv. zelenými potravinami. Tyto doplňky často obsahují sušené extrakty z mladého ječmene, chlorelly, spiruliny, špenátu či brokolice, obohacené o kmeny bakterií mléčného kvašení, jako jsou *Lactobacillus* nebo *Bifidobacterium*. Cílem těchto přípravků je podpora střevní mikroflóry, imunity a celkové vitality. Zcela běžně se však probiotika vyskytují i v potravinách, které nejsou vysoce průmyslově zpracované jako ovoce, zelenina či celozrnné obiloviny [29, 96].

2.5.1 Příklady produktů dostupných na českém trhu

- Ormus Super Greens BIO natural

Jedná se o prášek ze zelených potravin rozpustný ve vodě prášek. Obsahuje alfalfu (tolice vojtěška), mladý ječmen, mladou pšenici, mladý oves, moringu, kořen zázvoru a směs probiotických kmenů [97].

- Garden of Life RAW Organic Probiotika pro děti

Přípravek obsahuje pět druhů probiotických bakterií doplněných prebiotickou směsí, která je tvořena extrakty z 23 druhů ovoce a zeleniny (například banánu, řepy, brokolice mrkve, špenátu, ostružiny a dalších [98].

- Kombucha nápoje

Lehce perlivý fermentovaný nápoj vzniklý z oslazeného čaje, který je užíván jako funkční potravina. K fermentaci je užívána symbiotická kolonie bakterií a kvasinek. Některé verze obsahují šťávy z kořenové zeleniny převážně řepy nebo mrkve. Dostupné jsou například od firem Magu nebo Wild and Coco [99, 100].

- Vilgain miso pasta

Japonská pasta vyráběná fermentací ječmene a cizrny společně se solí a ušlechtilou plísní *Aspergillus oryzae* [101].

- Kvašená zelenina

Kvašená zelenina je výsledek přirozeného fermentačního procesu, při kterém mikroorganismy, zejména laktobacily, přeměňují sacharidy v zelenině na kyselinu mléčnou. Tento proces nejen konzervuje zeleninu, ale také vytváří prostředí bohaté na přírodní probiotika. Řadí se sem například kimchi, čalamády, kysané zelí, nakládané okurky nebo cibule [102].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje, chemikálie, kultivační materiály a mikroorganismy

3.1.1 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Pioneer Ohaus (USA)
Automatické pipety různých objemů, Biohit (SRN), Discovery (SRN)
Automatický čítač kolonií Interscience Scan 300 (Francie)
Acura ® manual 855 multikanálová pipeta, Socorex (Švýcarsko)
Čtečka mikrotitračních destiček (ELISA Reader), BioTek Synergy HTX (CZ)
Denzitometr McFarland DEN-1, Biosan Ltd. (Lotyšsko)
Encapsulator B-395 Pro, Büchni (Švýcarsko)
Homogenizátor Vortex, Pioneer Ohaus (USA)
Horkovzdušná sušárna, Binder (SRN)
HPLC sestava Ultimate 3000 s UV/VIS a RI detektorem, Thermo Fisher (USA)
HPLC kolona Rezex ROA-Organic Acid H+ (8 %), New Column 250x 4,6 mm, Phenomenex (USA)
Laboratorní mikroskop Model LM 666 LED PC/∞
Laminární box Aura mini, BioAir (IT)
Lyofilizátor Freeze Dry System/FreeZone 4,5 l, Labconco (USA)
Nylonový injekční filtr 0,45 µm, CHS Filterpure (CZ)
Předvážky, Scout Ohaus (USA)
Spektrofotometr UV-1600PC, VWR International (Čína)
Stereomikroskop Zeiss Stemi 2000-C
Sterilní injekční filtr 0,2 µm PES, VWR International (Švýcarsko)
Třepačky Unimax 1010, Heidolph (SRN)
Vysokorychlostní centrifuga, Z 36 HK, HERMLE Labortenchnik (SRN)

3.1.2 Použité chemikálie

ABTS, 2,2-azinobis(3-ethylbenzothioazolin-6-sulfonová kyselina), Sigma-Aldrich (USA)
Aceton p.a., Penta s.r.o. (CZ)
Alginát sodný Sigma-Aldrich (Velká Británie)
Dihydrát chloridu vápenatého p.a., Lachema, a.s. (CZ)
Ethanol, Lach-Ner (CZ)
Folin-Ciocalteuovo činidlo, VWR Chemicals (Francie)
Heptahydrát hydrogenarseničnanu sodného 98%, Sigma-Aldrich (IND)
Hydrogenuhličitan sodný p.a., Lach:Ner (CZ)
Kyselina mléčná ≥ 98%, Sigma-Aldrich (Belgie)
Kyselina sírová 96%, Lach:Ner (ČR)
Methylenová modř (Certistain for microscopy), Sigma-Aldrich (USA)
Molybdenan amonný p.a., Lach:Ner (ČR)

Monohydrát D-glukózy, Penta s.r.o. (CZ)
Monohydrát kyseliny gallové, Sigma-Aldrich (Čína)
PBS, 10X, USP sterile pufr, VWR chemicals (USA)
Pentahydrát síranu měďnatého, VWR chemicals (USA)
Peroxisíran draselný, Sigma-Aldrich (Německo)
Resazurin sodný (Resazurin, Na salt), Sigma-Aldrich (USA)
ROTI®Phenol, Carl Roth (SRN)
Síran sodný bezvodý, Lach:NER (ČR)
Skleněné kuličky, průměr 0,25–0,5 mm, Carl Roth (SRN)
Tetrahydrát vlnanu sodno-draselného, Lachema (CZ)
Trolox, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
Uhlíčan sodný bezvodý, Penta s.r.o. (CZ)

3.1.3 Použité kultivační materiály

Agar práškový bakteriologický, HiMedia (Indie)
Lactobacillus MRS bujón, HiMedia (Indie)
LB bujón, Sigma-Aldrich (Německo)
Nutrient bujón s 1% peptonem, HiMedia (Indie)

3.1.4 Použité mikroorganismy

Probiotické bakteriální kmeny:
Lactobacillus acidophilus CCM 4833,
Lactobacillus plantarum CCM 7039,
Bifidobacterium bifidum CCM 3762,
Bifidobacterium breve CCM 7825.

Pro antimikrobiální testy byly použity mikroorganismy:
Escherichia coli CCM 3954,
Micrococcus luteus CCM 1569.

Všechny druhy použitých organismů byly získány z České sbírky Masarykovy univerzity v Brně a byly kultivovány dle doporučení poskytovatele.

3.2 Kultivace bakterií mléčného kvašení v komerčním médiu

Pro kultivaci probiotik bylo použito komerčně dostupné kultivační médium Lactobacillus MRS broth, připravené dle instrukcí výrobce. K přípravě kapalného média byla použita koncentrace 55,15 g práškového média na 1000 ml destilované vody. Připravené médium bylo sterilováno v tlakovém hrnci po dobu 20 minut při 120 °C. Po ochlazení živného média bylo v očkovacím boxu napipetováno sterilní médium do sterilních plastových 15ml zkumavek s uzávěrem. Do každé zkumavky bylo následně přidáno 10 objemových % vybrané bakteriální kultury

(*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*). Všechny bakteriální kmeny byly kultivovány anaerobně v inkubátoru při 37 °C po dobu 16 hodin a následně skladovány při 4 °C.

Vybrané kultury sloužily jako zásobní a pro porovnání nárůstu biomasy vybraných kmenů za stejných podmínek pro další měření. Uvedené inokulační dávky byly používány v průběhu celé práce a v procesu opakované přípravy kultur potřebných pro práci.

3.3 Charakterizace bakterií mléčného kvašení

3.3.1 Test viability a nárůstu probiotických kultur

Po dokončení kultivace byly zvolené podmínky ověřeny testem životaschopnosti bakterií. K provedení testu byl využit mikroskop a methylenová modř. Test je založen na rozdílném zbarvení bakteriálních buněk podle jejich viability – živé buňky s intaktní buněčnou membránou zůstávají bezbarvé, zatímco mrtvé buňky se vlivem průniku barviva přes narušenou membránu zbarvují modře. K testování bylo na podložní skličko pipetováno 0,5 ml bakteriální kultury a 0,5 ml methylenové modři. Směs byla důkladně promíchána pomocí automatické pipety a překryta krycím skličkem. Následně byly vzorky analyzovány pod mikroskopem.

3.3.2 Stanovení nárůstu kultury pomocí turbidimetru

Po ukončení kultivace mikroorganismů byl ke stanovení hustoty buněk využit turbidimetr, kterým byl změřen rozptyl světla jednotlivých vzorků. Před měřením byly vzorky vhodně naředěny tak, aby spadaly do měřitelného rozsahu přístroje. Výsledky byly získány ve formě jednotek McFarland, které představují standardizované hodnoty zákalu odpovídající určité koncentraci buněk. Tyto hodnoty byly následně přepočteny na koncentraci životaschopných buněk, vyjádřenou v jednotkách CFU/ml (*colony forming units per milliliter*).

3.4 Příprava zeleninových extraktů

Vybrané druhy zeleniny (červená řepa, mrkev, špenát, řapíkatý celer a cuketa) byly zakoupeny v čerstvém stavu a následně lyofilizovány. Po vysušení za sníženého tlaku a teploty byla zelenina mechanicky rozmělněna na jemný prášek. Z takto připraveného vzorku byly vytvořeny vodné extrakty pro další analýzu. Bylo naváženo 0,5 g zeleninového prášku a rozpuštěno v 10 ml destilované vody. Suspenze byla ponechána k extrakci na třepačce při 110 rpm, po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byly vzorky centrifugovány a získaný supernatant byl odebrán a použit pro následná stanovení.

3.5 Charakterizace zeleninových extraktů

3.5.1 Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi–Nelsona

Pro účely kvantifikace redukujících cukrů byla provedena kolorimetrická reakce s následujícími kroky. Jeden mililitr analyzovaného vzorku byl smíchán s 0,5 ml činidla I a 0,5 ml činidla II. Tato směs byla následně inkubována varem po dobu deseti minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo k reakční směsi přidáno 0,5 ml činidla III a destilovaná voda tak, aby celkový objem byl 10 ml. Kalibrační křivka byla sestavena pro glukózu v rozsahu koncentrací 0,01 až 0,1 g/l. Každý analyzovaný vzorek byl měřen triplikátně a výsledná koncentrace byla stanovena jako aritmetický průměr těchto tří měření.

- Činidlo I: Bylo připraveno rozpuštěním 12 g uhličitanu sodného, 8 g hydrogenuhličitanu sodného a 6 g vlnanu sodno-draselného ve 100 ml destilované vody. Samostatně bylo rozpuštěno 72 g síranu sodného ve 300 ml destilované vody. Oba tyto roztoky byly následně smíchány.
- Činidlo II: Bylo připraveno smícháním 4 g pentahydrátu síranu měďnatého s 24 g síranu sodného ve 200 ml destilované vody.
- Činidlo III: Nejprve bylo rozpuštěno 25 g molybdenanu amonného ve 450 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 21 ml koncentrované kyseliny sírové. V druhé nádobě byly rozpuštěny 3 g heptahydrátu hydrogenarseničnanu sodného ve 25 ml destilované vody. Oba připravené roztoky byly následně smíchány a výsledné činidlo bylo ponecháno po dobu 48 hodin ve tmě při laboratorní teplotě.

3.5.2 Stanovení celkových cukrů podle Duboise

Pro stanovení celkových cukrů byla provedena kolorimetrická metoda, při níž byl 1 ml analyzovaného vzorku smíchán s 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Tato směs byla promíchána a následně inkubována po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla změřena absorbance výsledného roztoku při vlnové délce 490 nm. Každý vzorek byl analyzován ve třech opakováních. Pro kvantitativní stanovení glukózy byla připravena kalibrační křivka s použitím standardních roztoků glukózy v koncentračním rozmezí 0,02 až 0,1 g/l, rovněž v triplikátech.

3.5.3 Stanovení antioxidační kapacity

Nejprve byl připraven roztok ABTS rozpuštěním v destilované vodě na koncentraci 7 mM. K tomuto roztoku byl přidán roztok peroxodisíranu draselného s koncentrací 2,45 mM. Tento roztok byl ponechán stát 24 hodin ve tmě pro vytvoření stabilního kationového radikálu $ABTS^{\cdot+}$. Následně byla provedena úprava roztoku $ABTS^{\cdot+}$ zředěným ethanolem tak, aby absorbance při 734 nm dosahovala hodnoty $0,70 \pm 0,02$. Dále byly připraveny kalibrační roztoky Troloxu o koncentracích 50, 100, 200, 300 a 400 $\mu\text{g/ml}$ v 60% ethanolu. Měření byla provedena v triplikátech, kdy k 10 μl vzorku byl přidán 1 ml roztoku $ABTS^{\cdot+}$. Po 10 minutách inkubace ve tmě byla změřena absorbance na spektrofotometru (A_{10}). Jako kontrolní měření

sloužil blank obsahující 10 µl ethanolu a 1 ml roztoku ABTS^{•+}, jehož absorbance byla změřena ihned (A_0). Antioxidační kapacita byla vypočítána z rozdílu mezi počáteční absorbancí (A_0) a absorbancí po 10 minutách (A_{10}). Pro výpočet byl použit průměr naměřených absorbancí.

3.5.4 Stanovení celkových fenolických látek

Bylo připraveno pět kalibračních roztoků kyseliny gallové o koncentracích 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 a 0,3 mg/ml rozpuštěním 1 mg/ml zásobního roztoku kyseliny gallové ve vodě a následným ředěním. Pro měření vzorků byl připraven roztok Folin-Ciocalteuova činidla zředěním s vodou v poměru 1:9. K 1 ml tohoto zředěného činidla bylo pipetováno 1 ml destilované vody a přidáno 50 µl vzorku. Směs byla vortexována a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného, roztok byl znovu vortexován a ponechán inkubovat dalších 15 minut. Následně bylo provedeno spektrofotometrické stanovení absorbance při 750 nm. Měření vzorků byla provedena v duplikátech a pro výpočet koncentrace fenolických látek byly dosaženy průměry hodnot absorbancí do kalibrační křivky získané z naměřených hodnot standardů kyseliny gallové.

3.5.5 Stanovení chlorofylů

Pro stanovení obsahu chlorofylů byly připraveny ethanolové extrakty. Jeden gram zeleniny byl extrahován pomocí 10 ml 96% ethanolu. Do každého vzorku byly přidány skleněné kuličky a směsi byly intenzivně promíchány na vortexu po dobu 15 minut. Následně byly zkumavky se vzorky zabaleny do alobalu kvůli ochraně před světlem a umístěny na laboratorní třepačku, kde probíhala extrakce za konstantního třepání po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby byly extrakty centrifugovány při 5000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Po odstředění byl supernatant oddělen od pevného zbytku. Byla měřena absorbance supernatantu při vlnových délkách 645 a 663 nm proti ethanolu. Každý vzorek byl měřen třikrát. Množství chlorofylu A a B bylo vypočteno pomocí rovnic:

$$\begin{aligned}ca &= 12,7 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645} \\cb &= 22,9 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{666}.\end{aligned}\tag{1,2}$$

3.5.6 Stanovení karotenoidů

Bylo naváženo 0,1 g zeleninového vzorku, který byl extrahován pomocí 10 ml acetonu. Směs byla promíchána na vortexu a následně inkubována po dobu 30 minut při teplotě 37 °C na laboratorní třepačce ve tmě. Po inkubaci byla suspenze centrifugována při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 6 minut. Získaný supernatant byl následně měřen spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Každý extrakt byl měřen třikrát, přičemž výsledné hodnoty byly zprůměrovány. Kalibrační křivka byla sestavena na základě standardního roztoku β-karotenu o koncentraci 1 mg/ml. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada v koncentračním rozmezí 0,2–1,0 µg/ml pomocí ředění acetonem a měřena rovněž v triplikátech.

3.5.7 Stanovení vitamínu C

Pro stanovení obsahu vitamínu C byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Ze vzorků lyofilizované zeleniny bylo naváženo 0,1 g, které bylo extrahováno pomocí 5 ml 2% roztoku kyseliny orthofosforečné. Směs byla důkladně promíchána pomocí vortexu. Před samotnou analýzou musely být vzorky přefiltrovány za použití nylonového injekčního filtru o pórovitosti 0,45 µm a injekční stříkačky, aby nedošlo k zanesení kolony pevnými částicemi. Následně byl filtrát v objemu 70 µl nanesen mikrostříkačkou do dávkovací smyčky HPLC systému, jehož parametry jsou uvedeny v tabulkách (*Tabulka 3*, *Tabulka 4*). Vyhodnocování probíhalo v programu Chromeleon Chromatography Data System.

Tabulka 3: Parametry HPLC kolony pro stanovení vitamínu

Název přístroje	HPLC Thermo Fischeer Scientific
Typ detekce	Spektrofotometrický s UV-Vis detekcí
Typ kolony	Kinetex® 2.6 µm Polar C18 100Å (150 x 4,6 mm)
Teplota na koloně	35 °C
Čas analýzy	20 min
Typ eluce	gradientová
Složení mobilní fáze (MF)	MF A – octan sodný, MF B – acetonitril
Průtok mobilní fáze	1 ml/min

Tabulka 4: Složení mobilní fáze v různých časových intervalech analýzy vitamínu

Čas [min]	0	6	12	14	15	16	20
MF A [obj. %]	100	90	30	10	10	100	100
MF B [obj. %]	0	10	70	90	90	0	0

Množství vitamínu C bylo zjištěno pomocí kalibrační křivky závislosti plochy píku na koncentraci vitamínu v roztoku.

$$y = 15\,348,148 x \quad (3)$$

Kde y je plocha píku (mAU · min) a x je koncentrace vitamínu C v roztoku (mg/ml). Analýzy i kalibrace byly provedeny v duplikátech a vyjádřeny jako průměrná hodnota ze dvou měření.

3.6 Kultivace bakterií mléčného kvašení v prebiotických extraktech

Pro kultivaci v prebiotických extraktech byly po kultivaci v komerčním médiu vybrány bakterie *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum*. Byly připraveny 5% navážky zeleniny do 15ml zkumavek, které byly doplněny sterilní destilovanou vodou na 15 ml. Zkumavky byly ozářeny UV světlem v očkovacím boxu a poté zaočkovány 0,5 ml inokula ze zásobní kultury. Uzavřené zkumavky se nechaly kultivovat v inkubátoru při 37 °C po dobu 24 hodin. Po ukončení kultivace byly sterilně odebrány 2 ml supernatantu s probiotiky na další kultivační testy na pevném médiu.

3.7 Příprava roztoků lyofilizátů

Po ukončení kultivace byly zkumavky s kulturami centrifugovány při 4 500 rpm po dobu 20 minut. Supernatant byl odpipetován do zkumavek, které byly dány do mrazáku o teplotě – 80 °C. Po 24 hodinách byly vzorky dány na lyofilizátor k vysušení na 48 hodin. Po lyofilizaci byl lyofilizát zvážen a rozpuštěn demineralizované vodě tak, aby vznikl koncentrát určený pro další stanovení.

3.8 Kultivace na tuhém médiu

Pro kultivaci probiotik bylo použito komerčně dostupné živné médium Lactobacillus MRS broth spolu s bakteriálním agarem. K přípravě tuhého média byla použita koncentrace 55,15 g práškového média a 15 g bakteriálního agaru na 1000 ml destilované vody. Připravené médium bylo sterilováno v tlakovém hrnci po dobu 20 minut při 120 °C. Po sterilizaci bylo médium ponecháno vychladnout na optimální teplotu a následně bylo v očkovacím boxu rozlito do sterilních Petriho misek. Po ztuhnutí bylo médium v miskách vystaveno UV záření v očkovacím boxu za účelem zabezpečení sterility médií. Následně bylo na povrch každé Petriho misky ve sterilním prostředí za použití sterilní hokejky rozetřeno 50 µl 100krát naředěné probiotické kultury kultivované v dané zelenině. Petriho misky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Každý druh zeleniny byl kultivován s oběma vybranými bakteriemi a každý vzorek byl v duplikátech. Po inkubaci byla kvantifikace bakteriálních kolonií provedena pomocí automatického čítače kolonií Interscience Scan 300.

Při prvotní kultivaci bylo zjištěno, že řada vzorků vykazovala přerůstání Petriho misek, což znemožňovalo přesné spočítání kolonií. Z tohoto důvodu byla kultivace opakována s vyšším stupněm ředění (1:1 000), aby bylo dosaženo optimálního rozmezí počtu kolonií umožňujícího spolehlivou kvantifikaci.

3.9 Charakterizace roztoků lyofilizátů bakteriálních kultur kultivovaných v zeleninových extraktech

3.9.1 Stanovení kyseliny mléčné vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)

K analýze obsahu kyseliny mléčné byla využita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC). Měření bylo prováděno na přístroji Ultimate 3000 za použití chromatografické kolony Rezex ROA-Organic Acid H+ (8 %), rozměrů 250 × 4,6 mm, při teplotě 30 °C. Detekce kyseliny mléčné byla realizována pomocí refraktometrického (RI) detektoru. Jako mobilní fáze sloužil 5 mM roztok kyseliny sírové s nastaveným průtokem 0,6 ml/min.

Pro analýzu byl připravený lyofilizát ještě 100krát naředěn demineralizovanou vodou. Tento roztok byl následně přefiltrován přes nylonový injekční filtr s velikostí pórů 0,45 µm. Po filtraci bylo 70 µl vzorku pomocí mikrostríkačky aplikováno do dávkovací smyčky.

Pro účely kvantitativního a kvalitativního stanovení kyseliny mléčné byla připravena kalibrační řada standardních roztoků kyseliny mléčné (≥ 98 %) v koncentracích od 0,2 do 5 mg/ml. Tyto standardy byly analyzovány za stejných podmínek jako vzorky a měřeny v duplikátech. Získaná data byla zpracována softwarem Chromeleon, který umožnil určit retenční čas, vyhodnotit plochy píků a sestavit kalibrační křivku. Koncentrace kyseliny mléčné ve vzorcích byla následně vypočtena na základě této kalibrační křivky jako průměr ze dvou měření.

3.9.2 Stanovení antimikrobiální aktivity

Pro stanovení antimikrobiální aktivity extraktů *B. bifidum* a *L. acidophilus* kultivovaných na různých prebiotických substrátech byl použit gramnegativní kmen *Escherichia coli* a grampozitivní kmen *Micrococcus luteus*. Antimikrobiální účinek byl hodnocen pomocí bujónové diluční metody a resazurinového testu. Všechny experimenty byly prováděny ve sterilních podmínkách očkovací místnosti.

Pro přesnější určení zdroje antimikrobiální aktivity lyofilizovaných bakteriálních extraktů byly paralelně analyzovány také roztoky kyseliny mléčné. Připravené roztoky měly koncentrace v rozmezí 1–200 mg/ml.

3.9.2.1 Kultivace mikroorganismů

Kultivace *Escherichia coli* probíhala v kapalném živném médiu LB Broth o koncentraci 20 g/l, které bylo připraveno dle instrukcí výrobce. Z připraveného média bylo odměřeno 50 ml do 100ml Erlenmeyerovy baňky pro kultivaci mikroorganismu, přičemž zbylý objem sterilního média byl uchován ve větší uzavíratelné pyrexové nádobě a následně použit při pipetování na mikrotitrační destičky v rámci antimikrobiálních testů.

Pro kultivaci *Micrococcus luteus* bylo obdobně připraveno kapalné médium Nutrient Broth o koncentraci 25 g/l. Médium bylo rozděleno stejně jako v předchozím případě pro kultivaci a antimikrobiální testy.

Všechna připravená média byla sterilována v tlakovém hrnci po dobu 20 minut při 120 °C a po sterilizaci ponechána vychladnout na laboratorní teplotu. Do sterilních médií v Erlenmeyerových baňkách bylo v laminárním boxu inokulováno 3 % (v/v) bakteriální suspenze. Baňky byly uzavřeny a inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C.

3.9.2.2 Bujónová diluční metoda

Diluční antimikrobiální testy byly prováděny v 96 jamkových mikrotitračních destičkách (12sloupců a 8 řad). Do jamek po obvodu bylo napipetováno 200 µl sterilní destilované vody, aby se zamezilo vysychání destičky. Do jamek určených pro vzorky bylo napipetováno po 100 µl odpovídajícího média pro daný mikroorganismus. Do první řady s médiem bylo přidáno 100 µl vzorku (vždy buď lyofilizátu nebo kyseliny mléčné), obsah jamky byl zamíchán špičkou pipety a 100 µl bylo odebráno do jamky pod ní. Postup byl opakován, dokud nevznikla koncentrační řada s celkovým objemem 100 µl v každé jamce. Nakonec bylo do každé jamky v těchto 8 sloupcích napipetováno 100 µl bakteriální kultury, která byla předtím naředěna na 0,5 McFarlanda a poté ještě 1 000x zředěna odpovídajícím médiem. Ve zbývajících jamkách byly provedeny kontroly. V prvních 4 jamkách byla kontrola pozitivní, jamky obsahovaly tedy 100 µl média a 100 µl kultury. Další čtyři byly pro kontrolu negativní a obsahovaly 50 µl média, 50 µl 70% ethanolu a 100 µl kultury. Do posledních 4 jamek bylo napipetováno 200 µl čistého média, což posloužilo jako kontrola média. Po připravení všech mikrotitračních destiček byla změřena v každé jamce absorbance při vlnové délce 630 nm pomocí přístroje ELISA Reader BioTek ELx808. Destičky byly uzavřeny, utěsněny pomocí parafilmu a ponechány inkubovat při 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí 24 hodin byla opět změřena absorbance každé jamky na mikrotitrační destičce při vlnové délce 630 nm. Na základě změny absorbance byla následně vypočítána antimikrobiální aktivita jednotlivých lyofilizátů.

3.9.2.3 Resazurinový test

Resazurinový test byl použit k hodnocení viability buněk po provedení bujónového dilučního testu. Princip metody spočívá v kolorimetrické přeměně modrofialového resazurinu na růžově zbarvený resorufin, ke které dochází metabolickou aktivitou živých buněk. Po 24 hodinách kultivace byla nejprve změřena absorbance obsahu jednotlivých jamek mikrotitračních destiček při vlnové délce 630 nm. Následně bylo do každé jamky (s výjimkou obvodových, obsahujících pouze vodu) přidáno 20 µl roztoku resazurinu. Pro standardní měření byl použit roztok resazurinu o koncentraci 0,15 mg/ml, připravený rozpuštěním resazurinu v PBS pufru a destilované vodě v poměru 1:11. Roztok byl před použitím přefiltrován přes sterilní filtr s velikostí pórů 0,2 µm. Po přidání roztoku byly destičky inkubovány 30 minut při teplotě 37 °C na třepače. Následně byla v jednotlivých jamkách změřena absorbance při vlnové délce 570 nm.

3.10 Enkapsulace vybraných probiotických bakterií se zeleninou

3.10.1 Příprava vzorků

Na základě výsledků předchozích stanovení byly vybrány vhodné kombinace zeleniny a probiotických druhů pro enkapsulaci. Do 15ml plastových zkumavek bylo naváženo 0,75 g zeleninového prášku. Zkumavky byly vysvíceny UV světlem v očkovacím boxu a poté zaočkovány 1 ml inokula ze zásobní kultury a doplněny sterilní vodou na 15 ml. Zkumavky byly ponechány ke kultivaci v inkubátoru při 37 °C po dobu 20 hodin. Po ukončení kultivace byla změřena hodnota zákalu denzitometrem. Následně byla provedena předběžná enkapsulace celého kultivačního média včetně pevných částic zeleniny. Při tomto postupu však docházelo k ucpávání trysky enkapsulátoru, což znemožňovalo plynulý průběh enkapsulace. Metoda byla tedy optimalizována – vzorky byly odstředěny při 6 000 rpm po dobu 6 minut, aby došlo k odstranění velkých pevných částic. Z každého vzorku bylo následně odebráno 5 ml supernatantu do pyrexové nádoby pro enkapsulaci.

3.10.2 Enkapsulace

Byly připraveny roztoky 1% alginátu a 1% CaCl₂. Z odebraného supernatantu bylo připraveno 50 ml 10% roztoku v 1% alginátu. Připravené vzorky byly jednotlivě enkapsulovány pomocí enkapsulátoru s tryskou o maximální velikosti 750 μm. Před zahájením enkapsulace byly nastaveny hodnoty napětí, frekvence, míchání a po zapnutí byl nastaven tlak, tak aby vznikl Taylorův kužel. Jednotlivé parametry enkapsulace jsou uvedeny v tabulce (*Tabulka 5*).

Po zahájení enkapsulace kapky dopadaly na Petriho misku s magnetickým míchadlem, obsahující 1% roztok CaCl₂, který sloužil jako síťovací činidlo. Pro určení míry enkapsulace byl změřen zákal po enkapsulaci pomocí denzitometru. Vzniklé částice byly následně pozorovány a hodnoceny pod stereomikroskopem Zeiss Stemi 2000-C s okulárem 0,5x a objektivem 1,6x; celkové přibližovací rozmezí 0,65x–5x.

Tabulka 5: Parametry enkapsulace

VELIČINA	PARAMETR
FREKVENCE	3300 Hz
NAPĚTÍ	1600 V
MÍCHÁNÍ	100%
TLAK	160-200 mbar

3.10.3 Postupné uvolňování probiotik z částic

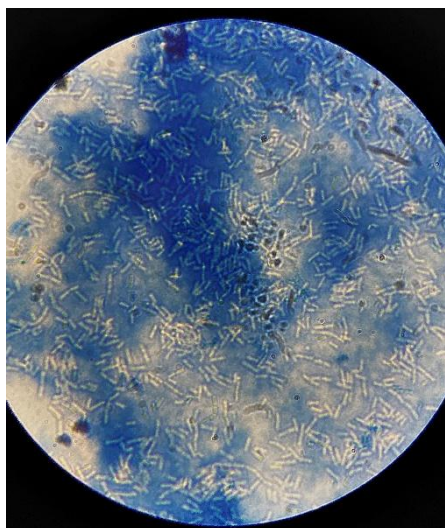
Po dokončení procesu enkapsulace byla připravena suspenze enkapsulovaných částic v MRS bujónu, ve které částice tvořily přibližně 10,6 % (w/w). Ve všech zkumavkách byl poté změřen zákal média pomocí denzitometru. Zkumavky byly dány ke kultivaci při teplotě 37 °C a každý všední den po dobu 11 dní byl měřen zákal média ve zkumavkách, pomocí kterého byl zjištěn nárůst bakteriální kultury uvolněné z částic.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

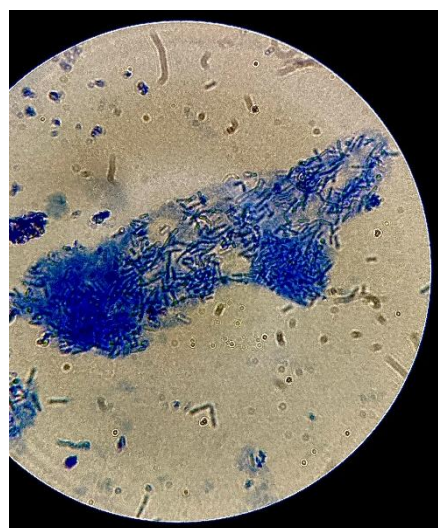
4.1 Charakterizace bakterií mléčného kvašení

4.1.1 Test viability a nárůstu probiotických kultur

Podmínky kultivace byly ověřeny z důvodu nastavení ideálního prostředí pro růst probiotik a pro zamezení chyb při měření nárůstu kultury denzitometrem. Touto kontrolou bylo ověřeno, zda zvolené živné médium, teplota a anaerobní podmínky jsou vyhovující pro zkoumané probiotické bakterie. Kontrola byla provedena testem viability, který je popsán v kapitole 3.3.1. Na základě mikroskopické analýzy bylo ve vzorcích pozorováno převážně velké množství bezbarvých (neobarvených) buněk, což svědčí o jejich životaschopnosti. Z toho lze usuzovat, že námi nastavené podmínky kultivace byly vhodně zvoleny. Mikroskopické snímky jsou uvedeny na obrázcích (*Obrázek 4, Obrázek 5*), kde lze vidět, že většina bakteriálních buněk je živá, má typický tyčinkovitý tvar a v některých případech vytváří shluky.



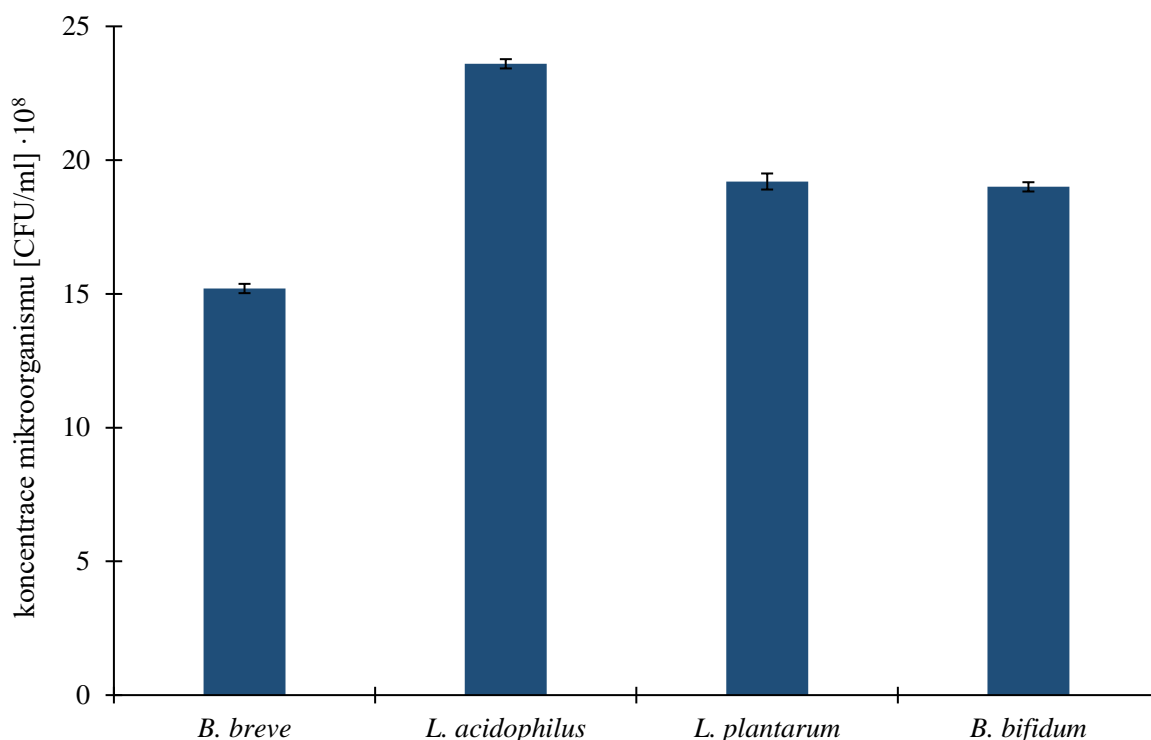
Obrázek 4: Mikroskopický snímek kultivovaných probiotických bakterií po barvení (CCM 4833)



Obrázek 5: Mikroskopický snímek kultivovaných probiotických bakterií po barvení (CCM 3762)

4.1.2 Stanovení nárůstu kultury pomocí turbidimetrie

Po ukončení kultivace v komerčním médiu byla proměřena turbidita jednotlivých kultur. Z naměřených McFarlandových jednotek byla pomocí tabelovaných standardů stanovena koncentrace buněk mikroorganismu v 1 ml kultury. Měření bylo provedeno v triplicátech, z naměřených hodnot byl určen průměrný nárůst biomasy a stanoveny směrodatné odchylky. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku (*Obrázek 6*).



Obrázek 6: Graf srovnávající nárůst buněčné biomasy probiotika v komerčním médiu

Z výsledků měření zákalu vyplývá, že nejvyšší růstovou hustotu dosáhly kmeny *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum*. Konkrétně *L. acidophilus* dosáhl průměrné koncentrace $(23,6 \pm 0,2) \cdot 10^8$ CFU/ml a *B. bifidum* $(19,0 \pm 0,2) \cdot 10^8$ CFU/ml. Tyto výsledky svědčí o jejich dobré schopnosti adaptace na podmínky kultivace a vysoké životaschopnosti, která byla potvrzena stanovením v kapitole 4.1.1. Na základě těchto údajů byly právě tyto dva kmeny vybrány pro navazující práce.

4.2 Charakterizace zeleninových extraktů

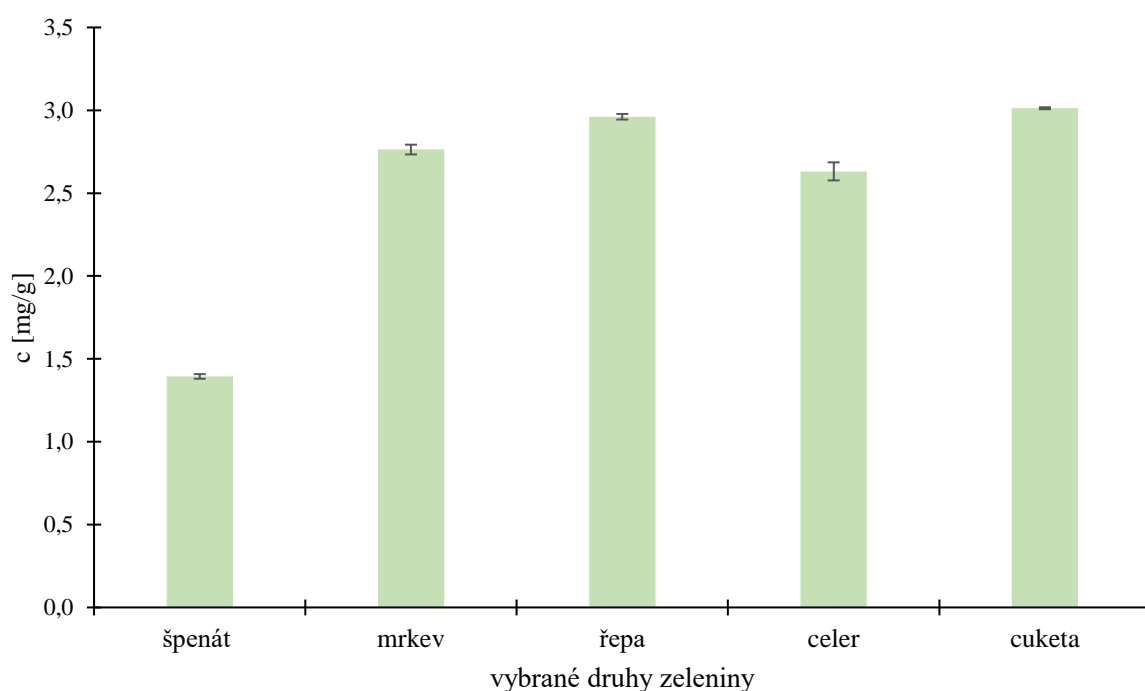
Charakterizace zeleninových extraktů byla provedena za účelem posouzení jejich vhodnosti jako nosičů a zdrojů živin pro růst probiotických mikroorganismů. Obsah redukujících cukrů byl sledován z důvodu, že cukry představují primární zdroj energie pro probiotika, a jejich přítomnost může přímo ovlivnit růstovou aktivitu bakterií. Antioxidační aktivita, společně s obsahem polyfenolů, byla hodnocena vzhledem k jejich schopnosti chránit bakteriální buňky před oxidačním stresem, čímž mohou zlepšovat podmínky pro přežití a proliferaci mikroorganismů. Mnoho ze sledovaných parametrů se navzájem ovlivňuje a podílí se na celkové antioxidační kapacitě extraktů, což podtrhuje význam jejich komplexního zhodnocení.

4.2.1 Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi–Nelsona

Postup stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi–Nelsona je uveden v kapitole 3.5.1. Nejprve byla sestrojena kalibrační křivka pro glukózu v rozsahu koncentrací 0,01 až 0,1 g/l, jejíž regresní rovnice má tvar:

$$\begin{aligned} A &= 4,3512x \\ R^2 &= 0,9958. \end{aligned} \quad (4)$$

Obsah redukujících cukrů byl stanoven u všech zkoumaných druhů zelenin. Každý analyzovaný vzorek byl měřen triplikátně a výsledná koncentrace byla stanovena jako aritmetický průměr těchto tří měření. Konečné výsledky jsou uvedeny na obrázku (Obrázek 7).



Obrázek 7: Graf srovnávající obsah redukujících sacharidů ve vzorcích zeleniny

Z grafu je zřejmé, že nejnižší koncentrace byla naměřena ve vzorku špenátu, kde činila ($1,39 \pm 0,01$ mg/g), zatímco nejvyšší koncentrace byla zjištěna u cukety s hodnotou ($3,012 \pm 0,006$ mg/g). Ostatní druhy zeleniny – konkrétně mrkev, červená řepa a celer – vykazovaly mezilehlé hodnoty, přičemž rozdíly mezi nimi byly menší než mezi krajními hodnotami.

Tyto výsledky částečně odpovídají předpokladům založeným na známém nutričním složení jednotlivých druhů zeleniny. Cuketa a červená řepa patří mezi druhy s vyšším obsahem sacharidů, a to především jednoduchých cukrů, jako je glukóza a fruktóza, což se odrazilo i v jejich vyšších zjištěných koncentracích redukujících cukrů. Naopak špenát, jakožto typická

listová zelenina, obsahuje přirozeně méně cukrů, jelikož jeho hlavní složkou je voda a vláknina [103–105].

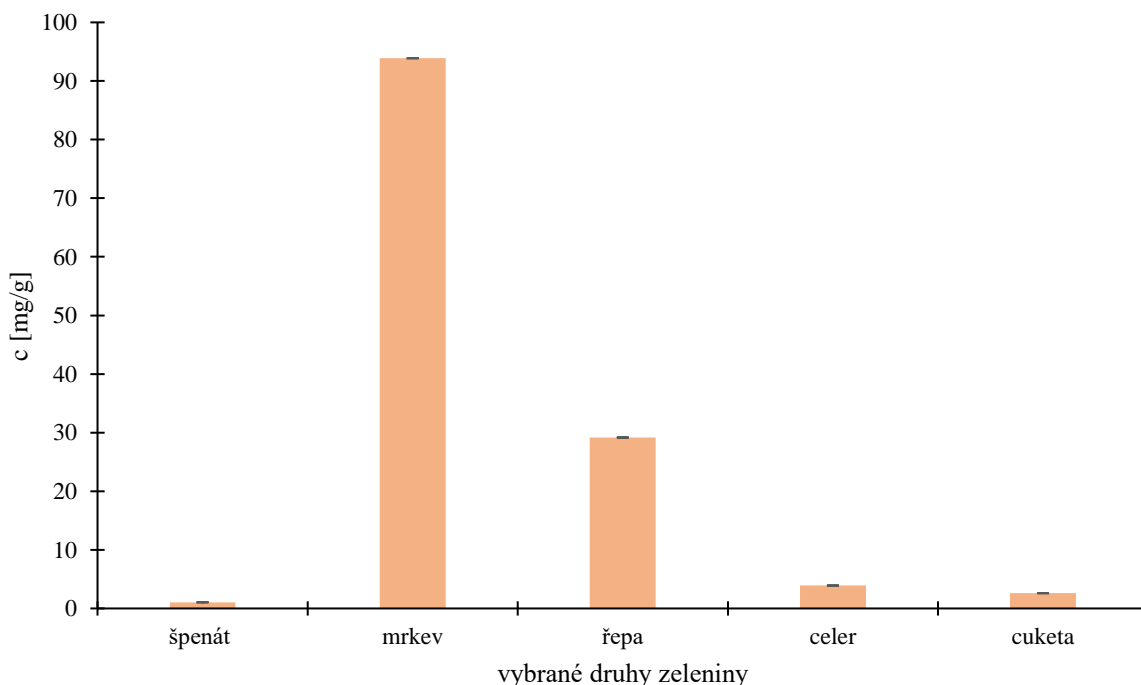
Byl zjištěn poměrně vysoký obsah redukujících cukrů u celeru ($2,63 \pm 0,05$ mg/g), který není běžně uváděn jako zelenina s vysokým obsahem jednoduchých sacharidů. Tento výsledek by mohl být způsoben několika faktory, například přirozenými odrůdovými rozdíly, vlivem zralosti použitého vzorku nebo podmínkami skladování před analýzou, kdy může dojít k rozkladu složitějších sacharidů na jednodušší formy.

4.2.2 Stanovení celkových cukrů podle Duboise

Měřením absorbance standardních roztoků glukózy při vlnové délce 490 nm byla sestavena kalibrační křivka, jejíž regresní rovnice má tvar:

$$\begin{aligned} A &= 8,1767 \\ R^2 &= 0,9972. \end{aligned} \quad (5)$$

Pomocí rovnice byly následně vypočteny koncentrace celkových redukujících cukrů ve vybraných vzorcích zeleniny. U každého vzorku byla absorbance měřena třikrát, přičemž z naměřených hodnot byla vypočtena průměrná hodnota a odpovídající směrodatná odchylka pro zajištění přesnosti a opakovatelnosti měření. Stanovené koncentrace celkových cukrů ve vzorcích zeleniny lze vidět na obrázku (Obrázek 8).



Obrázek 8: Graf porovnávající obsah celkových sacharidů ve vzorcích zeleniny

Z grafu je zřejmé, že mezi sledovanými druhy zeleniny existují výrazné rozdíly v obsahu celkových cukrů. Nejvyšší obsah byl zaznamenán u mrkve ($93,88 \pm 0,01$ mg/g), což je hodnota výrazně převyšující ostatní vzorky. Tento výsledek je v souladu s očekáváním, neboť mrkev je známá svým vysokým obsahem přírodních sacharidů, zejména glukózy, fruktózy a sacharózy. Množství cukrů v mrkvi může být navíc ovlivněno i podmínkami pěstování, dozrávání a skladování [106]. Poměrně vysokou hodnotu vykazovala také červená řepa ($29,17 \pm 0,01$ mg/g). Tento výsledek rovněž odpovídá známému složení této kořenové zeleniny, která se vyznačuje sladkou chutí právě díky vyššímu podílu sacharidů [104]. V obou případech bylo nutné aplikovat silné ředění extraktu, aby výsledné absorbance odpovídaly rozsahu kalibrační křivky, což dále potvrzuje vysoký obsah cukrů v těchto vzorcích.

Naopak špenát, celer a cuketa vykazovaly výrazně nižší hodnoty – konkrétně špenát ($1,042 \pm 0,008$ mg/g), cuketa ($2,596 \pm 0,004$ mg/g) a celer ($3,908 \pm 0,001$ mg/g). Tyto výsledky odpovídají jejich nutričnímu složení, které se vyznačuje vysokým podílem vody a vlákniny a obecně nízkým obsahem jednoduchých i komplexních cukrů. Špenát jakožto listová zelenina má přirozeně nejnižší obsah cukrů, zatímco cuketa a celer zaujímají mezilehlé hodnoty, které však stále zůstávají nízké.

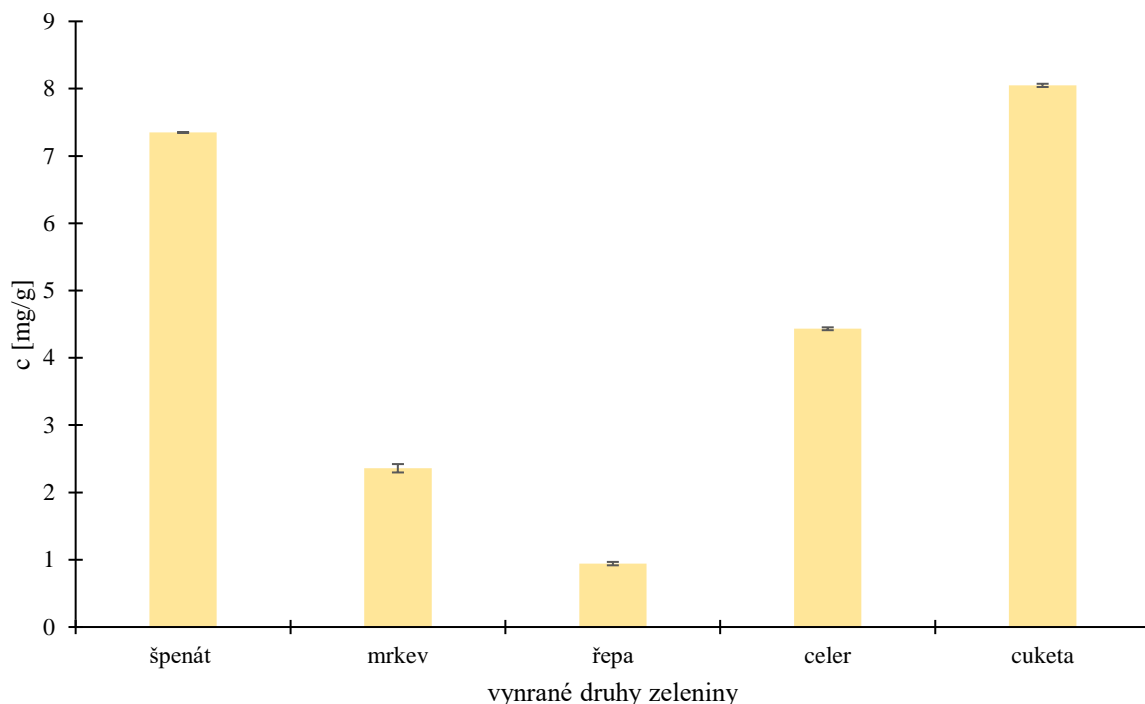
V porovnání se stanovením obsahu redukujících sacharidů, kde se hodnoty pohybovaly v rozmezí 1,39–3,01 mg/g, celkový obsah sacharidů dosahoval hodnot až 93,88 mg/g. Nejvyšší koncentrace celkových sacharidů byla naměřena u mrkve, což koresponduje s jejím vysokým obsahem polysacharidů. Naopak špenát vykazoval nejnižší obsah cukrů v obou metodách, což potvrzuje jeho nízký energetický profil. Výrazně vyšší hodnoty u metody podle Duboise potvrzují, že značná část cukrů v zeleninových extraktech není v redukující formě.

4.2.3 Stanovení antioxidační kapacity

Celková antioxidační kapacita sledovaných vzorků byla určena podle postupu popsánoho v kapitole 3.5.3. Pro výpočet kapacity byla použita regresní rovnice ve tvaru:

$$\begin{aligned} A &= 1,0969x \\ R^2 &= 0,9975. \end{aligned} \tag{6}$$

Rovnice byla získána na základě měření standardních roztoků Troloxu. Každý vzorek byl měřen v duplikátech, z naměřených hodnot byl vyhodnocen aritmetický průměr. Souhrnné výsledky antioxidační kapacity jednotlivých vzorků jsou uvedeny na obrázku (Obrázek 9).



Obrázek 9: Graf zobrazující výsledky stanovení antioxidační kapacity vzorků zeleniny

Výsledky stanovení antioxidační kapacity ukázaly výrazné rozdíly mezi jednotlivými vzorky zeleniny. Nejvyšší antioxidační kapacitu vykázala cuketa s hodnotou ($8,05 \pm 0,02$ mg/g). Tento výsledek je do určité míry překvapivý, neboť cuketa není obecně považována za významný zdroj antioxidantů. Vysoká kapacita může být ovlivněna konkrétní odrůdou nebo přítomností fenolických látek, které účinně reagují s radikálem $ABTS^{\cdot+}$ použitým v testu.

Druhou nejvyšší kapacitu vykázal špenát s hodnotou ($7,349 \pm 0,007$ mg/g), což odpovídá očekávání. Špenát je známý vysokým obsahem antioxidantů, především vitamínu C, karotenoidů (zejména luteinu) a flavonoidů. Naměřené hodnoty tak potvrzují, že špenát je bohatým zdrojem látek s antioxidačním potenciálem [103].

Střední hodnotu antioxidační aktivity vykázal celer. Tento výsledek je konzistentní s jeho složením, celer obsahuje různé bioaktivní látky včetně kumarinů, fenolických kyselin a vitamínu C, avšak v nižších koncentracích než listová zelenina [107].

Nižší hodnoty byly zaznamenány u mrkve ($2,36 \pm 0,06$ mg/g), což odpovídá jejímu typickému složení. Mrkev je charakteristická vysokým obsahem beta-karotenu, což je lipofilní antioxidant. Vzhledem k tomu, že extrakce byla prováděna ve směsi 60% ethanolu a vody, lze předpokládat, že lipofilní karotenoidy nebyly dostatečně extrahovány a jejich schopnost reagovat s hydrosolubilním $ABTS^{\cdot+}$ radikálem byla omezená. Výsledky tak mohly být zkresleny rozdílnou rozpustností přítomných antioxidantů a omezenou extrakcí těch, které nejsou kompatibilní s použitým rozpouštědlem.

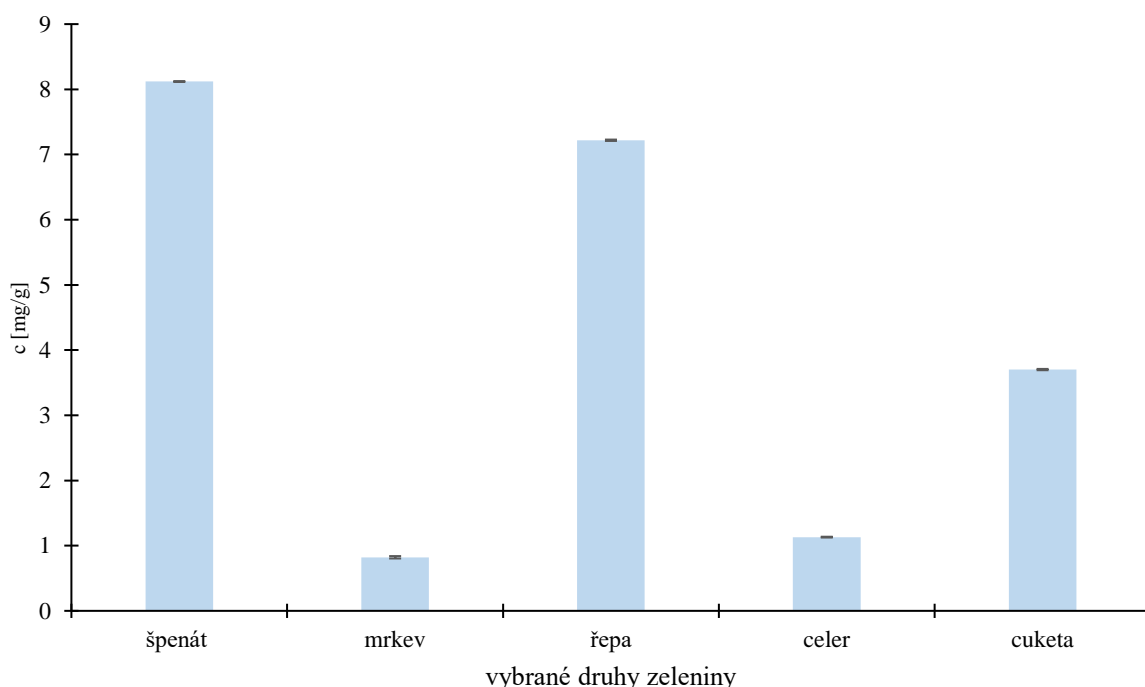
Nejnižší antioxidační kapacitu vykázala červená řepa, a to navzdory tomu, že je obecně považována za bohatý zdroj antioxidantů, zejména betacyaninů [104]. Možnou příčinou nízké aktivity může být zhoršená extrakce těchto sloučenin v použitém rozpouštědle nebo jejich částečná degradace během přípravy vzorku.

4.2.4 Stanovení celkových fenolických látek

Na základě pracovního postupu popsaného v kapitole 3.5.4 byla sestavena kalibrační křivka kyseliny gallové, přičemž výsledná rovnice lineární regrese byla ve tvaru:

$$\begin{aligned} A &= 1,6477x \\ R^2 &= 0,9983. \end{aligned} \quad (7)$$

Následně bylo přistoupeno ke stanovení obsahu fenolů v jednotlivých vzorcích zeleniny. U každého vzorku byla měřena absorbance ve třech opakováních a výsledná hodnota představuje průměr těchto měření. Obsah fenolů v jednotlivých druzích zeleniny byl následně vypočten pomocí regresní rovnice a doplněn o směrodatnou odchylku. Přehled vypočtených hodnot je uveden v grafu na obrázku (Obrázek 10).



Obrázek 10: Graf srovnávající stanovený obsah fenolických látek ve vzorcích zeleniny

V grafu lze vidět výrazné rozdíly v obsahu celkových fenolických látek mezi jednotlivými druhy testované zeleniny. Nejvyšší obsah byl zjištěn u špenátu ($8,119 \pm 0,004$ mg/g), což odpovídá jeho charakteru listové zeleniny, která je obecně bohatá na fenolické sloučeniny díky aktivní fotosyntetické činnosti. Podobně vysoký obsah byl nalezen také u červené řepy ($7,22 \pm 0,01$ mg/g), která je známá nejen obsahem fenolických látek, ale také dalších antioxidantů, například betalainů [104].

Střední obsah celkových fenolických látek byl zjištěn u cukety, což je v souladu s tím, že ačkoli nepatří mezi výrazné zdroje polyfenolů, může jejich obsah kolísat v závislosti na odrůdě, zralosti a pěstebních podmínkách.

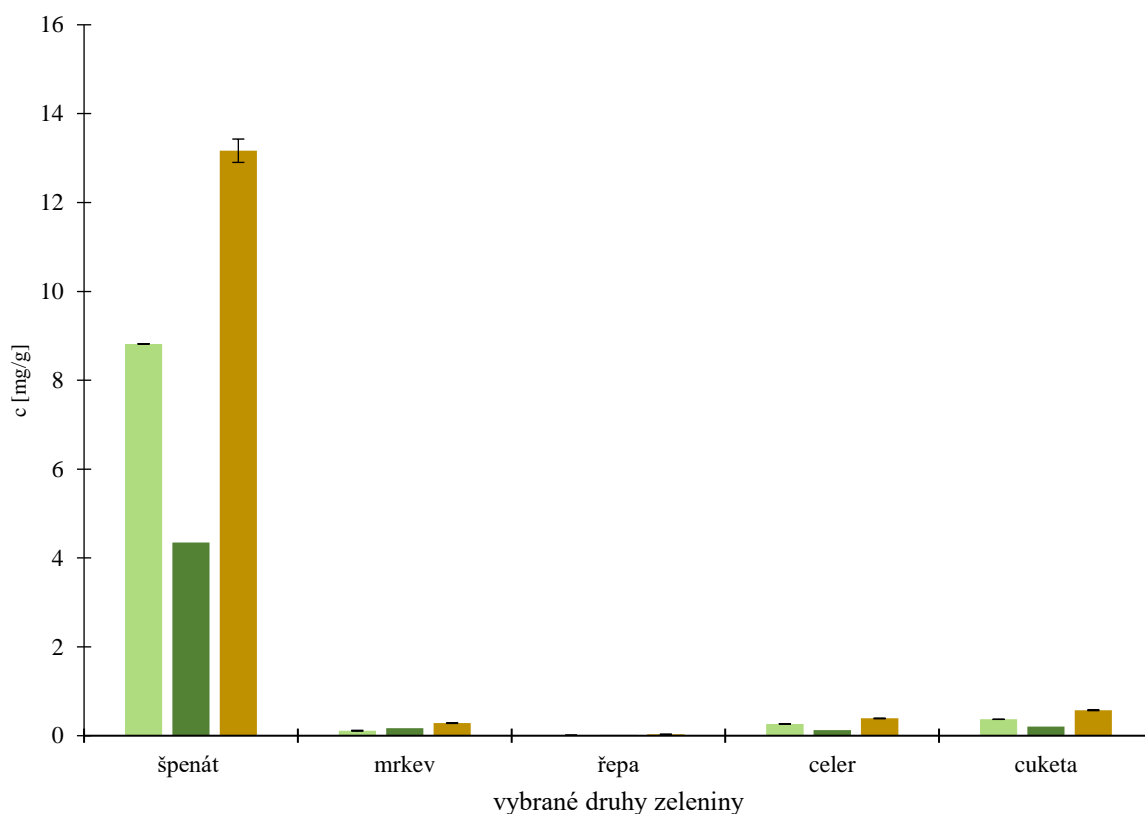
Výrazně nižší hodnoty byly naměřeny u celeru ($1,131 \pm 0,006$ mg/g) a mrkve ($0,82 \pm 0,02$ mg/g). U celeru lze nižší obsah fenolických sloučenin vysvětlit rozdílným složením a přítomností jiných typů bioaktivních látek, jako jsou furanokumariny. Mrkev je známa spíše jako zdroj karotenoidů, což může vysvětlovat nízkou koncentraci stanovených fenolických látek.

4.2.5 Stanovení chlorofylů

Obsah chlorofylu A a B byl stanoven dle postupu popsáno v 3.5.5. Absorbance supernatantu byla měřena ve třech opakováních při vlnových délkách 645 a 663 nm proti slepému ethanolovému vzorku. Výsledné hodnoty byly zprůměrovány a pro výpočet koncentrace chlorofylu A a B byly použity rovnice:

$$\begin{aligned} ca &= 12,7 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645} \\ cb &= 22,9 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{666}. \end{aligned} \quad (8, 9)$$

Stanovené koncentrace jsou zobrazeny v grafu na obrázku (Obrázek 11).



Obrázek 11: Graf srovnávající stanovený obsah chlorofylů ve vzorcích

Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že nejvyšší obsah chlorofylu A i B vykazoval špenát, a to s hodnotami $(8,818 \pm 0,001 \text{ mg/g})$ a $(4,348 \pm 0,001 \text{ mg/g})$, přičemž celkový obsah chlorofylů dosáhl $(13,166 \pm 0,001 \text{ mg/g})$. Tyto hodnoty výrazně převyšují koncentrace zjištěné u ostatních analyzovaných druhů zeleniny, což lze vysvětlit jeho intenzivní zelenou barvou a listovou strukturou, která je bohatá na chloroplasty.

Naopak nejnižší koncentrace chlorofylů byly stanoveny u řepy ($0,010 \pm 0,002 \text{ mg/g}$ chlorofylu A a $0,021 \pm 0,002 \text{ mg/g}$ chlorofylu B), což odpovídá tomu, že se jedná primárně o kořenovou zeleninu, přičemž chlorofyl slouží primárně k fotosyntéze v nadzemních částech rostliny. Podobně nízké koncentrace byly ze stejných důvodů zjištěny i u mrkve ($0,110 \pm 0,001 \text{ mg/g}$ chlorofylu A a $0,170 \pm 0,001 \text{ mg/g}$ chlorofylu B), jejíž oranžová barva rovněž naznačuje vysoký obsah jiných typů pigmentů.

Celer a cuketa vykazovaly střední hodnoty chlorofylů ve srovnání s ostatními vzorky. Tyto hodnoty korespondují s jejich částečně zeleným zbarvením a přítomností fotosynteticky aktivních tkání.

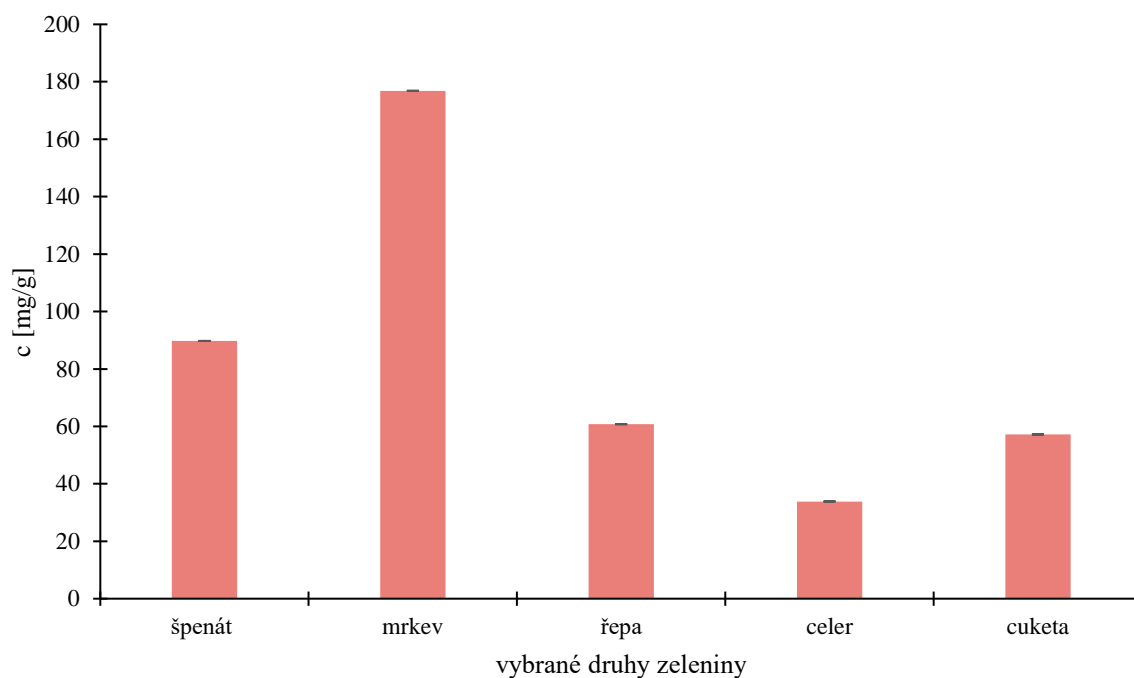
Z grafu je patrné, že zastoupení chlorofylu A je ve většině vzorcích vyšší než chlorofylu B, což odpovídá známému poměru těchto pigmentů v zelených rostlinných částech. Výrazné rozdíly mezi druhy zeleniny ukazují na rozmanitost v obsahu fotosyntetických pigmentů v závislosti na druhu a části rostliny, která byla analyzována.

4.2.6 Stanovení karotenoidů

Koncentrace karotenoidů sledovaných vzorků byla určena podle postupu popsaného v kapitole 3.5.6 Pro výpočet byla použita regresní rovnice ve tvaru:

$$\begin{aligned} A &= 0,5312x \\ R^2 &= 0,9982. \end{aligned} \tag{10}$$

Každý vzorek byl měřen v triplicátech, z naměřených hodnot byl spočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Souhrnné výsledky obsahu karotenoidů jednotlivých vzorků jsou uvedeny v grafu na obrázku (*Obrázek 12*).



Obrázek 12: Graf srovnávající stanovený obsah karotenoidů ve vzorcích zeleniny

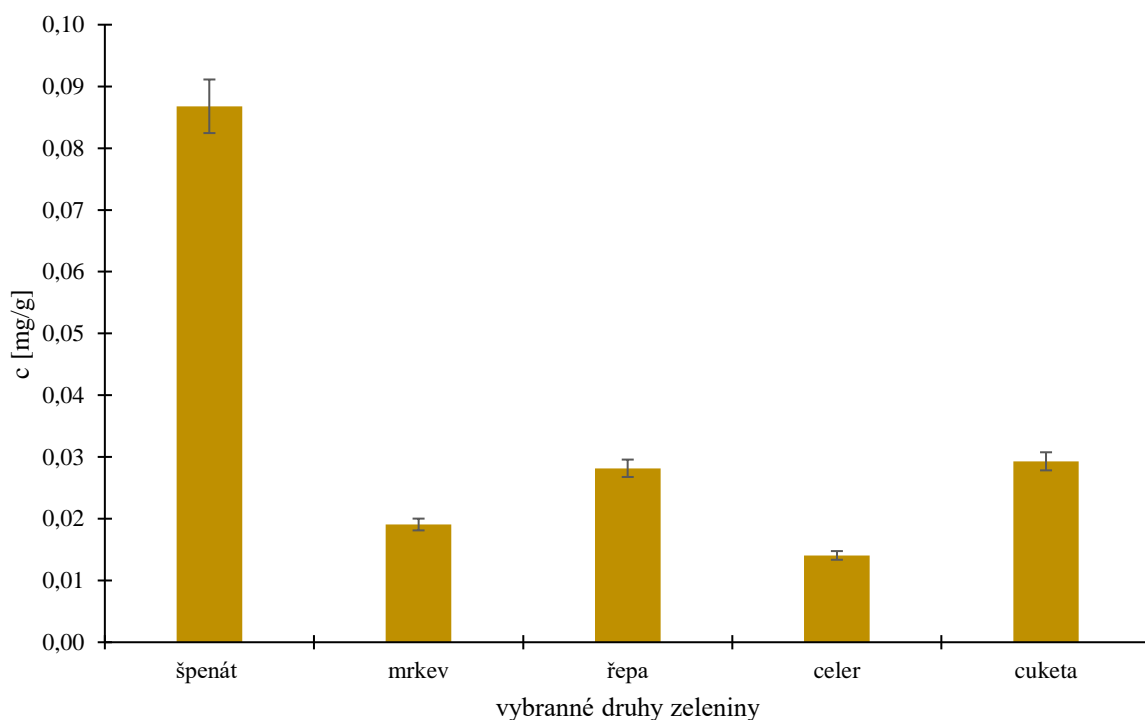
Z grafu je zřejmé, že nejvyšší koncentrace karotenoidů byla zjištěna u mrkve, a to s výrazným odstupem oproti ostatním druhům. Po započtení ředění činil skutečný obsah karotenoidů v mrkvi ($176,860 \pm 0,007$ mg/g). Vysoká hodnota byla očekávána vzhledem k přirozeně vysokému obsahu betakarotenu, který je dominantním karotenoidem v mrkvi a je rovněž zodpovědný za její typicky oranžové zbarvení.

Naopak řepa, celer a cuketa vykazovaly nízký obsah karotenoidů, v rozmezí přibližně 34 až 61 mg/g. U těchto druhů zeleniny lze nižší koncentrace vysvětlit tím, že karotenoidy nejsou hlavními pigmenty přítomnými v jejich pletivech. Řepa je charakteristická především obsahem betacyaninů, které jí propůjčují sytě červenou barvu. Celer a cuketa mají světlé, případně zeleno-bílé části, kde bývá biosyntéza karotenoidů minimální, což odpovídá i jejich méně výraznému zbarvení.

Poměrně vysoká koncentrace byla zaznamenána u špenátu ($89,755 \pm 0,001$ mg/g), který je známý především obsahem luteinu a dalších xantofylových karotenoidů. I když jeho listy nejsou zbarveny oranžově, jak je běžné u zeleniny bohaté na β -karoten, jedná se o listovou zeleninu s aktivní fotosyntézou, kde se karotenoidy vyskytují v chloroplastech jako pomocné fotosyntetické pigmenty. Tyto látky jsou tedy přítomny ve vyšší míře, než by mohlo napovídat vnější zbarvení listů.

4.2.7 Stanovení vitamínu C

3.5.1 Obsah vitamínu C ve vzorcích lyofilizované zeleniny byl stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Parametry analýzy jsou popsány v kapitole 3.5.7. Během analýzy na chromatogramu byly nalezeny odpovídající plochy piků, ze kterých pomocí kalibrační rovnice byla vypočítána koncentrace vitamínu C v roztocích vzorků. Výsledné koncentrace byly přepočítány na mg vitamínu C na gram sušiny a jsou zobrazeny na obrázku (Obrázek 13).



Obrázek 13: Graf zobrazující výsledky stanovení vitamínu C ve vzorcích zeleniny

Výsledky stanovení koncentrace vitamínu C v jednotlivých vzorcích zeleniny ukazují poměrně nízké hodnoty. Nejvyšší obsah ze všech sledovaných vzorků byl naměřen u špenátu, a to ($0,087 \pm 0,004$ mg/g). Tento výsledek odpovídá předpokladům, neboť špenát je považován za relativně dobrý zdroj tohoto vitamínu, zejména díky své listové struktuře a nízkému stupni zralosti při sklizni. Ostatní analyzované druhy zeleniny obsahovaly nižší množství tohoto vitamínu. Mrkev, řepa a cuketa vykazovaly podobné koncentrace vitamínu C, pohybující se v rozmezí ($0,019 \pm 0,001$ až $0,029 \pm 0,001$ mg/g). Nejnižší obsah byl zaznamenán u celeru, kde koncentrace dosáhla pouze ($0,014 \pm 0,001$ mg/g), což je v souladu s jeho obecně nízkým obsahem vitamínů a vysokým obsahem vody.

4.3 Kultivace probiotický bakterií na tuhém mediu

Vzhledem k tomu, že turbidimetrické měření nárůstu probiotických kultur bylo ovlivněno přítomností nerozpustných částic z rostlinných extraktů, nebyla tato metoda vyhodnocena jako dostatečně přesná pro kvantifikaci bakteriálního růstu. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k metodě počítání kolonií po kultivaci na pevných kultivačních médiích. Touto metodou bylo umožněno přesnější stanovení životaschopných buněk (CFU), neboť byl eliminován vliv zakalení způsobeného jinými složkami než samotnými mikroorganismy.

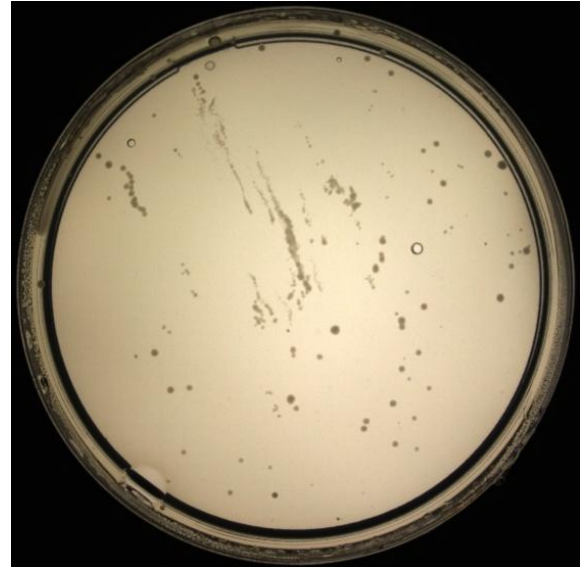
Petriho misky s tuhým živným médiem byly připraveny dle postupu popsaneho v kapitole 3.8. Na sterilní povrch každé misky bylo ve sterilních podmínkách aplikováno 50 µl 1000x naředěné probiotické kultury, získané po předchozí kultivaci v jednotlivých druzích zeleniny. Kultivace probíhala za použití dvou probiotických kmenů: *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum*. Po 24hodinové inkubaci byla kvantifikace vzniklých kolonií provedena pomocí automatického čítače kolonií Interscience Scan 300 při zvětšení 1:1. Výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 6), která zachycuje srovnání růstu obou kmenů v závislosti na typu použité zeleniny. Niže jsou rovněž přiloženy fotografie vybraných Petriho misek s narostlými koloniemi (Obrázek 14, Obrázek 15, Obrázek 16, Obrázek 17).

Tabulka 6: Výsledky kultivace na tuhém médiu

zelenina	mikroorganismus	počet narostlých kolonií	CFU/ml	průměr [CFU/ml]
špenát	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	124	$1,47 \cdot 10^6$	$1\ 849\ 500 \pm 381\ 500$
		187	$2,23 \cdot 10^6$	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	78	$9,23 \cdot 10^5$	
		94	$1,11 \cdot 10^6$	
cuketa	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	11	$1,30 \cdot 10^5$	$159\ 800 \pm 29\ 600$
		16	$1,89 \cdot 10^5$	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	154	$1,84 \cdot 10^6$	
		80	$9,47 \cdot 10^5$	
celer	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	7	$8,32 \cdot 10^4$	$106\ 940 \pm 23\ 760$
		11	$1,31 \cdot 10^5$	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	4	$4,73 \cdot 10^4$	
		11	$1,31 \cdot 10^5$	
mrkev	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	155	$1,84 \cdot 10^6$	$2\ 355\ 500 \pm 520\ 500$
		243	$2,88 \cdot 10^6$	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	42	$4,97 \cdot 10^5$	
		96	$1,14 \cdot 10^6$	
řepa	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	31	$3,67 \cdot 10^5$	$289\ 950 \pm 76\ 950$
		18	$2,13 \cdot 10^5$	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	82	$1,01 \cdot 10^6$	
		72	$8,56 \cdot 10^5$	



Obrázek 14: Kolonie *Bifidobacterium bifidum* po kultivaci vzorku z červené řepy (1 000× ředění), počet kolonií: 82, zvětšení 1:1



Obrázek 15: Kolonie *Bifidobacterium bifidum* po kultivaci vzorku z cukety (1 000× ředění), počet kolonií: 154, zvětšení 1:1



Obrázek 16: Kolonie *Lactobacillus acidophilus* po kultivaci vzorku ze špenátu (1 000× ředění), počet kolonií: 187, zvětšení 1:1



Obrázek 17: Kolonie *Lactobacillus acidophilus* po kultivaci vzorku z mrkve (1 000× ředění), počet kolonií: 155, zvětšení 1:1

Výsledky uvedené v tabulce (Tabulka 6) ukazují, že růst obou použitých probiotických kmenů (*Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum*) byl výrazně ovlivněn druhem použité zeleniny. Nejvyšší počet narostlých kolonií byl pozorován při kultivaci *Lactobacillus acidophilus* na mrkvi (243 CFU) a špenátu (187 CFU), což může souviset s vyšším obsahem cukrů a antioxidantů, zejména vitamínu C a fenolických látek, jak bylo prokázáno v předchozích kapitolách. Tyto látky pravděpodobně vytvářejí příznivější mikroprostředí pro růst bakterií, ať už jako zdroj energie nebo díky ochraně buněk před oxidačním stresem. Naopak nejnižší růst byl zaznamenán při použití celeru, kde došlo pouze k tvorbě 7 kolonií *Lactobacillus acidophilus* a 11 kolonií *Bifidobacterium bifidum*. Tento výsledek pravděpodobně souvisí s nízkým obsahem cukrů a bioaktivních látek v celeru. Data tak potvrzují, že složení zeleninových extraktů hraje klíčovou roli v podpoře životaschopnosti probiotik.

Bifidobacterium bifidum dosahovalo obecně nižšího počtu kolonií než *Lactobacillus acidophilus*, s výjimkou cukety, kde byl počet kolonií relativně vysoký (154 CFU). To může ukazovat na specifickou kompatibilitu mezi tímto kmenem a složením cukety. Na ostatních druzích zeleniny se *B. bifidum* pohybovalo spíše ve středních až nižších hodnotách (např. 78 CFU na špenátu, 42 CFU na mrkvi, 72 CFU na řepě), což potvrzuje rozdílné nároky obou bakteriálních kmenů na růstové podmínky.

Celkově lze konstatovat, že mezi jednotlivými druhy zeleniny existují výrazné rozdíly v podpoře růstu probiotických mikroorganismů. Tyto výsledky poukazují na možnost využití některých druhů zeleniny jako vhodného nosiče pro probiotické kultury v rámci funkčních potravin nebo doplňků stravy.

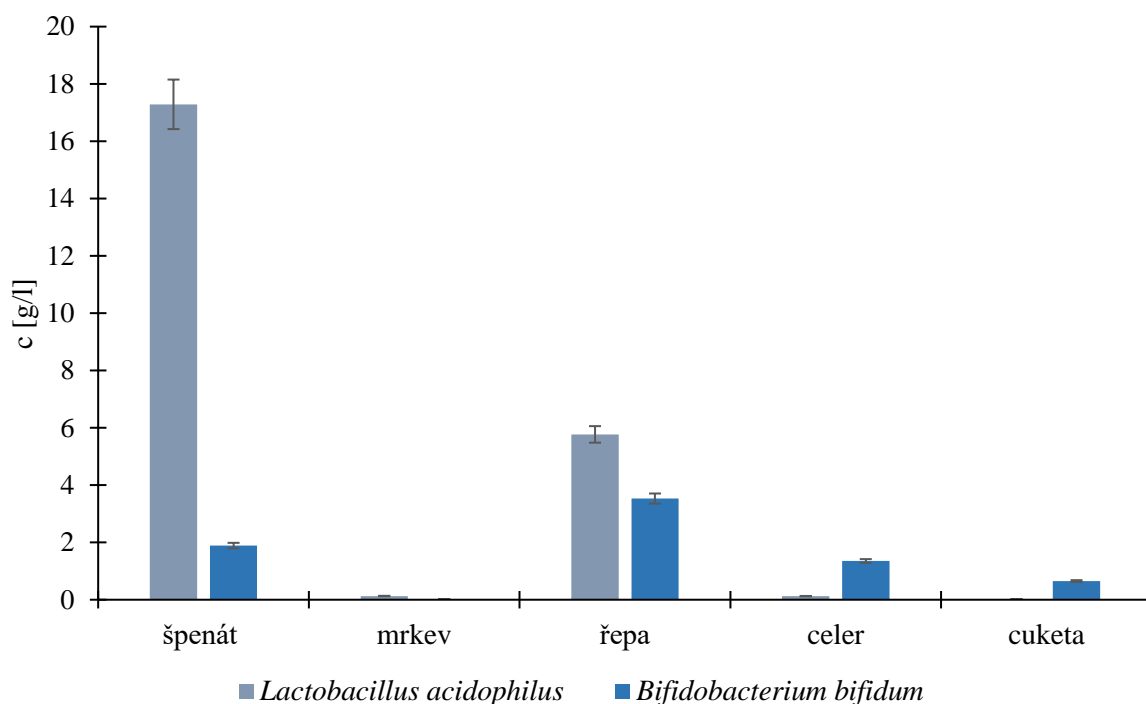
4.4 Charakterizace roztoků lyofilizátů bakteriálních kultur kultivovaných v zeleninových extraktech

4.4.1 Stanovení kyseliny mléčné vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Analýza obsahu kyseliny mléčné ve vzorcích lyofilizátů supernatantů kultur byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), přičemž podrobný popis analytického postupu je uveden v kapitole 3.9.1. Získaná chromatografická data byla zpracována pomocí softwaru Chromeleon, který umožnil identifikovat retenční časy, vyhodnotit plochy píků a vytvořit kalibrační křivku, která má tvar:

$$\begin{aligned}y &= 1,8333x \\R^2 &= 0,998.\end{aligned}\tag{11}$$

Průměrný retenční čas kyseliny byl 2,49 minut. Byla vypočtena koncentrace kyseliny mléčné ve všech analyzovaných vzorcích. Výsledky jsou grafickým způsobem znázorněny na obrázku (Obrázek 18).



Obrázek 18: Graf srovnávající stanovený obsah kyseliny mléčné ve vzorcích

Získané výsledky ukazují výrazné rozdíly v produkci kyseliny mléčné v závislosti jak na druhu použité zeleniny, tak na bakteriálním kmeni. Nejvyšší koncentrace kyseliny mléčné byla naměřena u vzorku špenátu fermentovaného kmenem *Lactobacillus acidophilus*, kde dosáhla hodnoty ($17,3 \pm 0,9$ g/l). Tato hodnota výrazně převyšuje ostatní vzorky a naznačuje, že špenát poskytuje velmi vhodné podmínky pro růst a metabolickou aktivitu tohoto bakteriálního druhu.

Naopak nejnižší produkce kyseliny mléčné byla zjištěna u mrkve, a to jak při fermentaci *Lactobacillus acidophilus* ($0,129 \pm 0,006$ g/l), tak *Bifidobacterium bifidum* ($0,016 \pm 0,001$ g/l). Tento výsledek může souviset s obsahem antimikrobiálně působících látek, pevnější buněčnou strukturou nebo nižší dostupností jednoduchých sacharidů, které jsou nezbytné pro fermentační aktivitu. Vzhledem k tomu, že při fermentaci mrkve byl zároveň zaznamenán dobrý růst bakterií při kultivaci na tuhém médiu, může nízká produkce kyseliny mléčné naznačovat převahu jiného metabolického produktu.

Při fermentaci červené řepy *L. acidophilus* byla koncentrace kyseliny mléčné ($5,8 \pm 0,3$ g/l), zatímco *B. bifidum* produkoval ($3,5 \pm 0,2$ g/l). Tento výsledek potvrzuje, že i *Bifidobacterium bifidum* je schopen efektivní fermentace za příznivých podmínek, nicméně *L. acidophilus* zůstává ve své produkci efektivnější.

Opačný trend byl zaznamenán u celeru (LA: ($0,125 \pm 0,006$ g/l), BB: ($1,35 \pm 0,07$ g/l) a cukety (LA: ($0,016 \pm 0,001$ g/l, BB: ($0,65 \pm 0,03$ g/l), kde naopak převažovala produkce kyseliny mléčné u kmene *Bifidobacterium bifidum*, ačkoliv rozdíly mezi oběma bakteriemi nebyly tak výrazné.

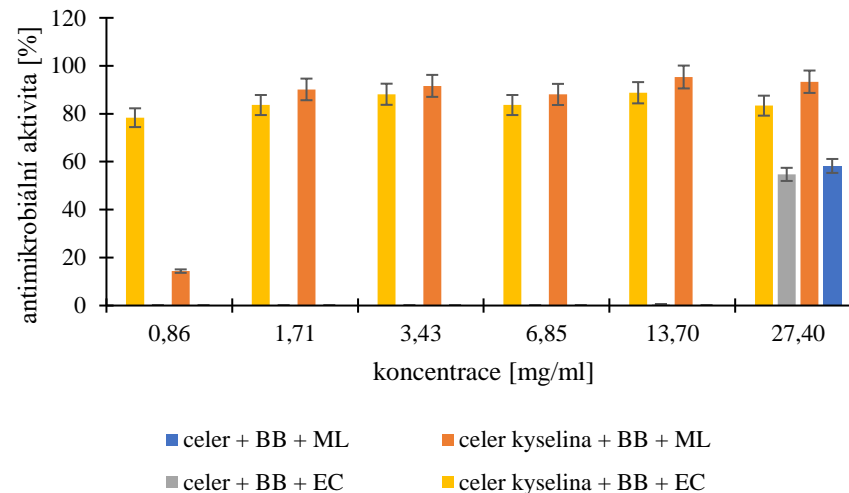
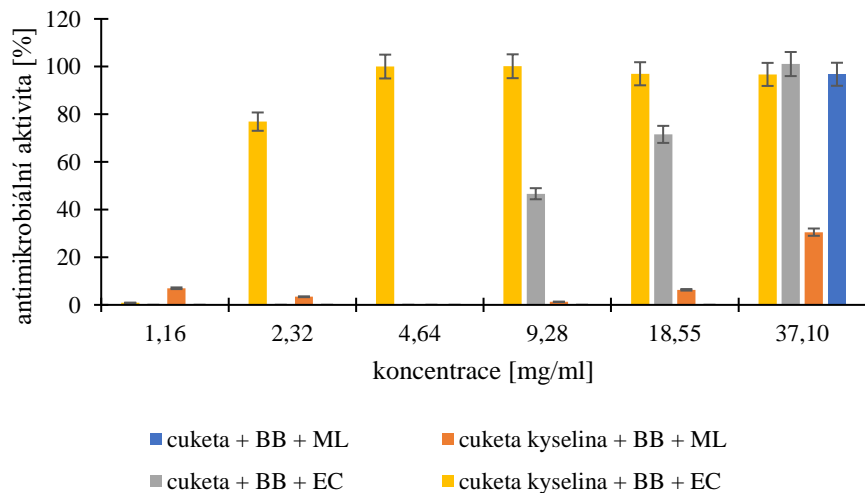
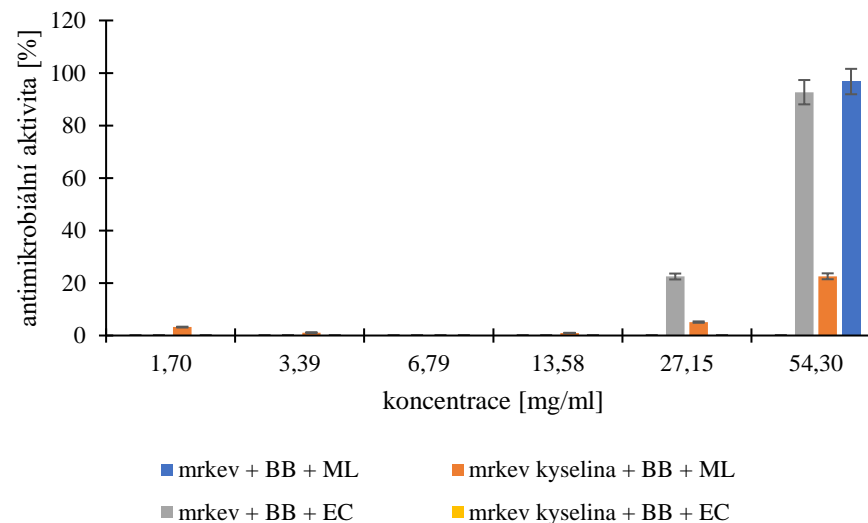
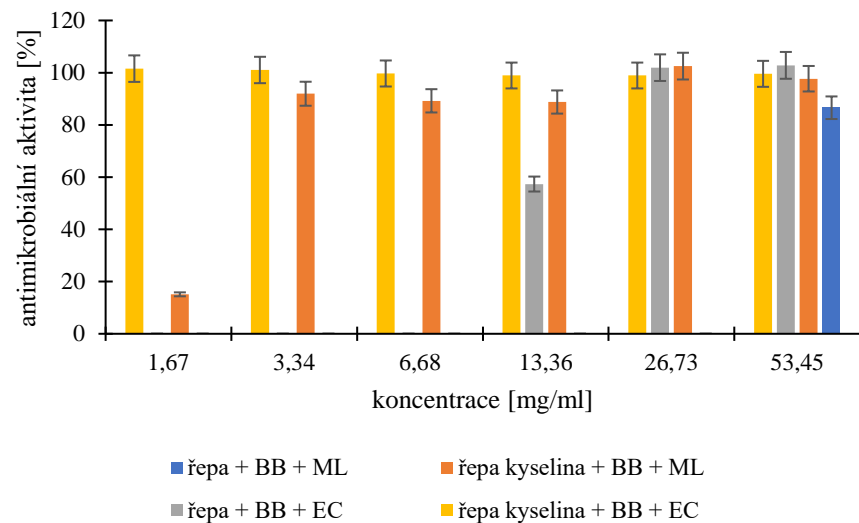
Z porovnání výsledků vyplývá, že *Lactobacillus acidophilus* obecně vykazuje vyšší schopnost produkce kyseliny mléčné než *Bifidobacterium bifidum*, a to téměř ve všech vzorcích

s výjimkou celeru a cukety, kde byly hodnoty vyšší u *B. bifidum*. Tyto výsledky mohou být ovlivněny rozdílnou adaptabilitou obou kmenů na dané podmínky fermentace, včetně pH, obsahu vody, dostupnosti živin a dalších složek zeleniny. Rozdíly v produkci kyseliny mléčné navíc odpovídají základním fyziologickým charakteristikám obou mikroorganismů: zatímco *L. acidophilus* je homofermentativní a převážně produkuje kyselinu mléčnou, *B. bifidum* je heterofermentativní a vedle kyseliny mléčné vytváří i další metabolity, například kyselinu octovou.

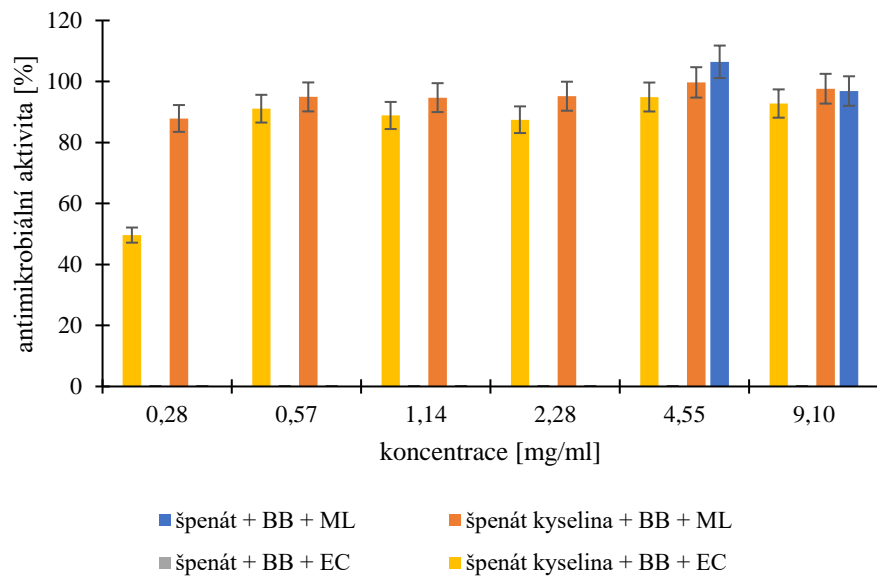
4.4.2 Stanovení antimikrobiální aktivity

4.4.2.1 Bujónová diluční metoda

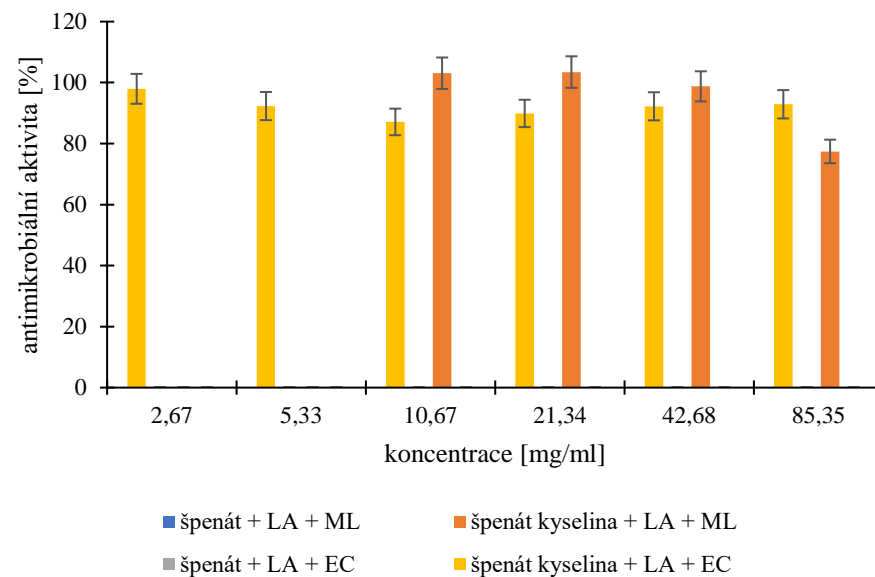
Bujónová diluční metoda byla v této práci použita k určení antimikrobiální aktivity lyofilizovaných probiotických extraktů připravených ze supernatantů kultur probiotických bakterií kultivovaných v zeleninových extraktech. Metoda funguje na principu měření optické hustoty při vlnové délce 630 nm v čase 0 hodin a v čase 24 hodin kultivace. Výsledkem této metody je rozdíl absorbancí, který říká, jak velký byl nárůst bakterií za 24 hodin. Vzorky byly testovány proti gramnegativnímu kmeni *Escherichia coli* a grampozitivnímu kmeni *Micrococcus luteus*. Stanovení bylo provedeno dle postupu popsaného v kapitole 3.9.2. Hodnoty antimikrobiální aktivity jsou znázorněny na obrázcích (Obrázek 19, Obrázek 20, Obrázek 21, Obrázek 22) v grafech v závislosti na koncentraci jednotlivých lyofilizovaných vzorků. Současně byla vyhodnocena antimikrobiální účinnost koncentrační řady kyseliny mléčné, přičemž jednotlivé koncentrace byly zvoleny tak, aby odpovídaly množství kyseliny mléčné stanovenému ve vzorcích pomocí HPLC. Vzorky spolu s odpovídajícími adekváty kyseliny mléčné byly vyneseny do grafů. Porovnáním antimikrobiálního účinku vzorku a jeho adekvátu kyseliny mléčné bylo možné určit, zda během kultivace docházelo k tvorbě jiných antimikrobiálních látek kromě kyseliny mléčné, nebo naopak, zda podpůrné látky (například cukr) podpořily růst testovaných mikroorganismů (*E. coli*, *M. luteus*) i přes přítomnost kyseliny mléčné. Antimikrobiální aktivita je ve výsledcích vyjádřena v procentech a ukazuje, jak účinně testovaná látka brání růstu mikroorganismů (*E. coli*, *M. luteus*). Antimikrobiální aktivita byla vztažena k ideálnímu růstu mikroorganismu za 24 hodin (v tomto bodě je antimikrobiální aktivita 0 %). Hodnoty v rozmezí 0–100 % znamenají, že testovaná látka částečně potlačila růst mikroorganismů – čím vyšší procento, tím vyšší antimikrobiální účinek. Hodnota 100 % znamená úplnou inhibici růstu mikroorganismu, tedy změřená hodnota zákalu na počátku měření (hned po naočkování mikroorganismu) byla totožná se zákaelem po 24 hodinách. Hodnota vyšší než 100 % pak představuje tak vysokou antimikrobiální účinnost, že dochází k úplné inhibici růstu a navíc může docházet k rozpadu buněčných stěn, koagulaci nebo změnám v absorpci, takže změřený zákal je ještě nižší než na počátku měření.



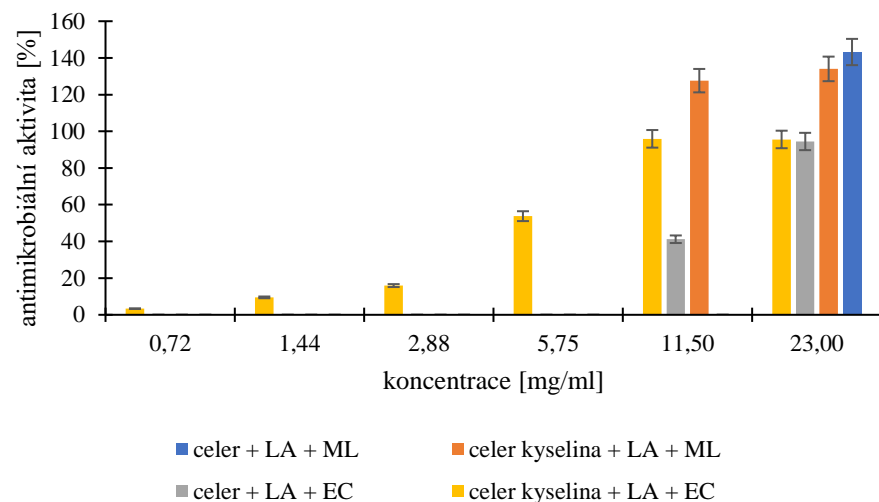
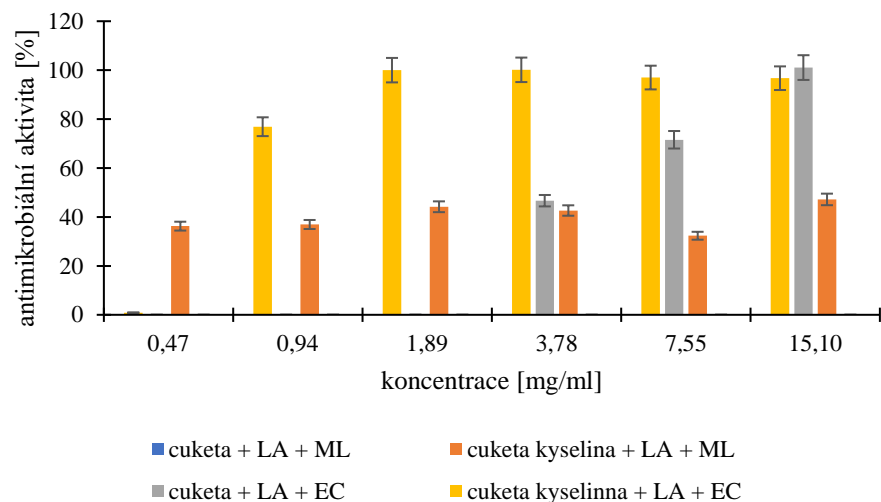
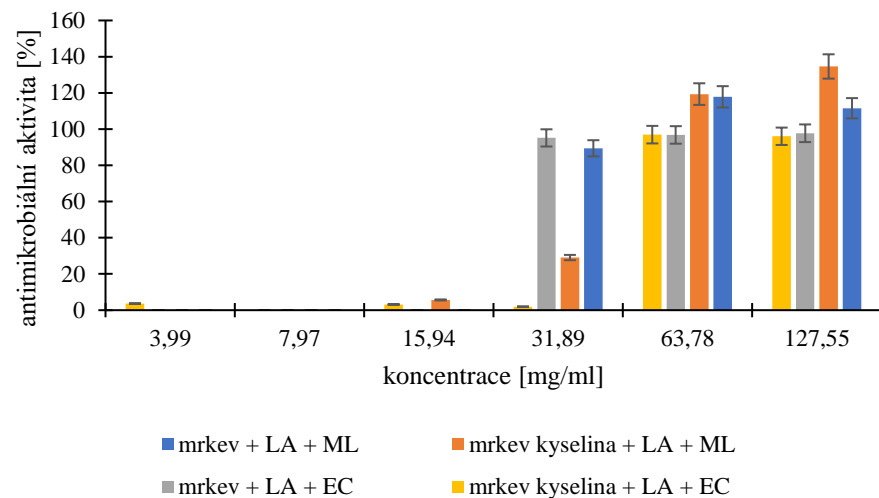
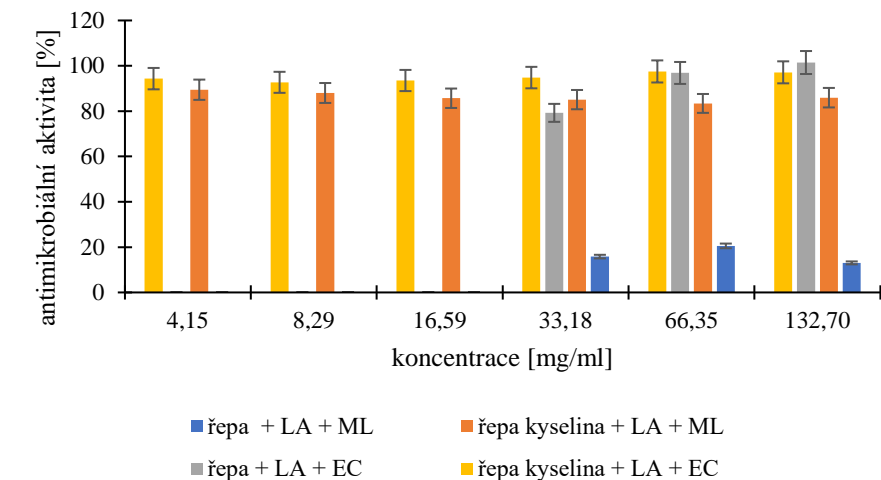
Obrázek 19: Grafy zobrazující antimikrobiální aktivitu lyofilizátů supernatantů kultury *Bifidobacterium bifidum* (BB) kultivované na vybrané zelenině a kyseliny mléčné adekvátní k tomuto lyofilizátu (v grafu označeno "zelenina kyselina") a to vždy proti *E. coli* (EC, šedé a žluté sloupce) a *M. luteus* (ML, modré a oranžové sloupce)



Obrázek 20: Graf zobrazující antimikrobiální aktivitu lyofilizátu supernatantu kultury *Bifidobacterium bifidum* (BB) kultivované na špenátu a kyseliny mléčné adekvátní k tomuto lyofilizátu (v grafu označeno "špenát kyselina") a to proti *E. coli* (EC, šedé a žluté sloupce) a *M. luteus* (ML, modré a oranžové sloupce)



Obrázek 21: Graf zobrazující antimikrobiální aktivitu lyofilizátu supernatantu kultury *Lactobacillus acidophilus* (LA) kultivované na špenátu a kyseliny mléčné adekvátní k tomuto lyofilizátu (v grafu označeno "špenát kyselina") a to proti *E. coli* (EC, šedé a žluté sloupce) a *M. luteus* (ML, modré a oranžové sloupce)



Obrázek 22: Grafy zobrazující antimikrobiální aktivitu lyofilizátu supernatantů kultury *Lactobacillus acidophilus* (LA) kultivované na vybrané zelenině a kyseliny mléčné adekvátní k tomuto lyofilizátu (v grafu označeno "zelenina kyselina") a to vždy proti *E. coli* (EC, šedé a žluté sloupce) a *M. luteus* (ML, modré a oranžové sloupce)

Z výsledků vyplynulo, že většina lyofilizovaných extraktů vykazovala antimikrobiální aktivitu, přičemž aktivita byla závislá na použité koncentraci. V některých případech byla antimikrobiální aktivita extraktů vyšší než aktivita odpovídající koncentrace čisté kyseliny mléčné. To naznačuje možnou přítomnost dalších antimikrobiálně aktivních metabolitů, jako jsou bakteriociny nebo fenolické látky uvolněné z rostlinného substrátu během fermentace.

Z grafického znázornění výsledků je také patrná saturační tendence, kdy po dosažení určité koncentrace extraktu již nedochází k dalšímu nárůstu antimikrobiální účinnosti, což svědčí o dosažení maximální inhibiční koncentrace (MIC). V některých případech se zdá, že i nižší koncentrace byly dostatečné k úplné inhibici růstu, a tedy dosahovaly antimikrobiální aktivity blízke 100 %, což může být důležité pro budoucí formulace doplňků stravy, kde je cílem efektivní dávkování. Naopak u některých vzorků byl pozorován jen částečný inhibiční účinek (např. <50 %), což může být způsobeno nízkým obsahem kyseliny mléčné nebo nižší tvorbou antimikrobiálních látek během kultivace. Výsledky zároveň potvrzují důležitost volby vhodného prebiotického substrátu, protože některé zeleninové extrakty zřejmě pozitivně ovlivnily produkci bioaktivních metabolitů u probiotických bakterií.

Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla pozorována u extraktů připravených z cukety kultivované s *Bifidobacterium bifidum*. Při koncentraci 37,1 mg/ml byla inhibice růstu *M. luteus* 97 %, zatímco kyselina mléčná při stejné koncentraci dosáhla pouze 31 %. Podobně i vůči *E. coli* vykazoval lyofilizát z cukety velmi vysokou aktivitu (101 %) v porovnání s 97 % u kyseliny mléčné. Tyto hodnoty naznačují, že během fermentace v tomto substrátu mohlo dojít k produkci dalších antimikrobiálně aktivních metabolitů, jako jsou například bakteriociny. Účinek byl však koncentračně závislý a u nižších koncentrací výrazně klesal.

Výrazné výsledky byly zaznamenány rovněž u mrkve. Vzorky fermentované *B. bifidum* vykazovaly proti *M. luteus* při koncentraci 54,3 mg/ml inhibici 97 %, zatímco kyselina mléčná při stejné koncentraci inhibovala růst pouze z 23 %. U *E. coli* byl efekt ještě výraznější, lyofilizát dosáhl inhibice 93 %, zatímco kyselina mléčná nevykazovala žádnou aktivitu. Tato pozorování potvrzují, že mrkev mohla podporovat produkci specifických metabolitů s výrazným účinkem vůči testovaným mikroorganismům. Výsledky nicméně ukázaly prudký pokles účinku při snižující se koncentraci, což je důležitý faktor pro budoucí praktické aplikace. Mrkev fermentovaná *L. acidophilus* vykazovala velmi dobrou antimikrobiální aktivitu proti *M. luteus*, kde byla inhibice 112 % při 127,55 mg/ml, což je téměř shodné s účinkem kyseliny mléčné. Proti *E. coli* dosáhl extrakt inhibice 98 %, zatímco kyselina mléčná měla 96 %, tedy téměř identický efekt. Tato data potvrzují, že mrkev je vhodným prebiotickým substrátem a zřejmě podporuje tvorbu antimikrobiálně aktivních metabolitů i při vyšších koncentracích.

Extrakt z červené řepy fermentovaný *B. bifidum* rovněž vykázal vysokou aktivitu, ačkoli ve srovnání s kyselinou mléčnou ji nepřekonal. Proti *M. luteus* dosáhl lyofilizát inhibice 87 %, zatímco kyselina mléčná 98 %. U *E. coli* byly hodnoty téměř totožné. Tento výsledek potvrzuje vysokou účinnost probiotické fermentace řepy, nicméně bez produkce výrazně silnějších sekundárních metabolitů nad rámec kyseliny mléčné.

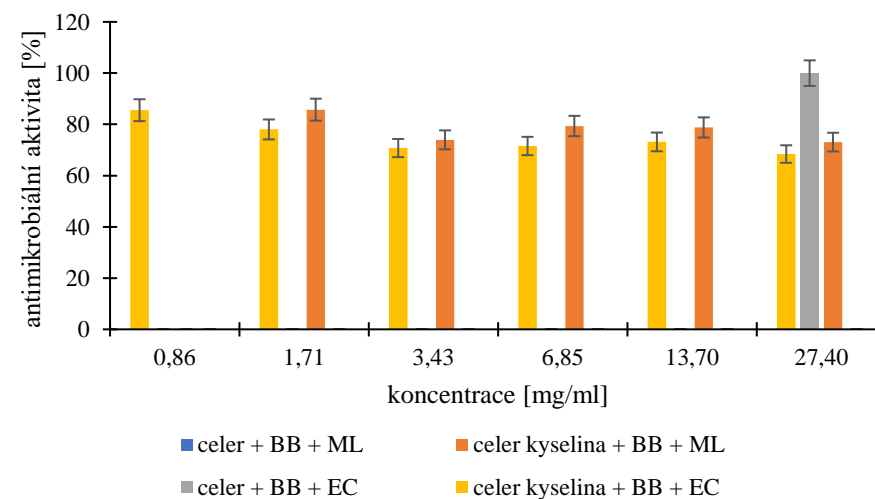
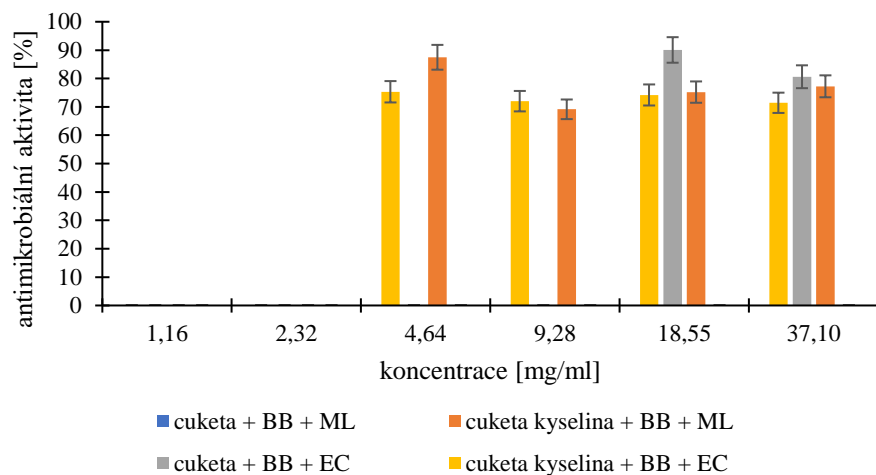
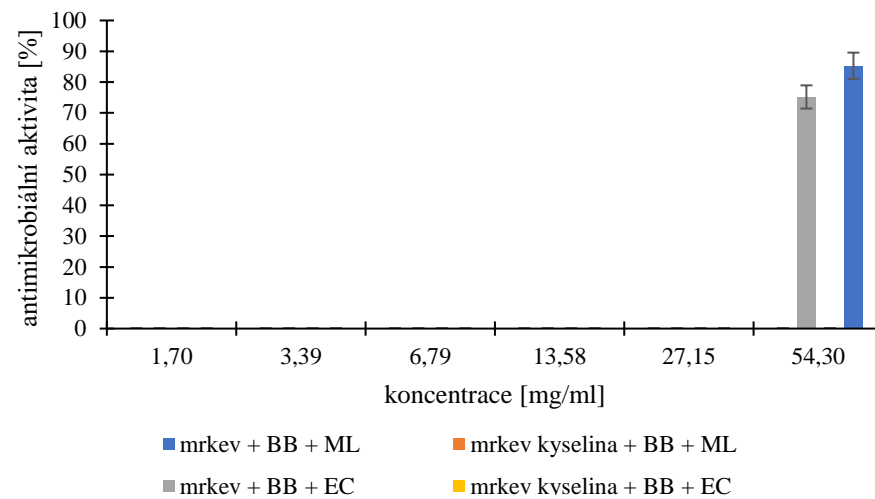
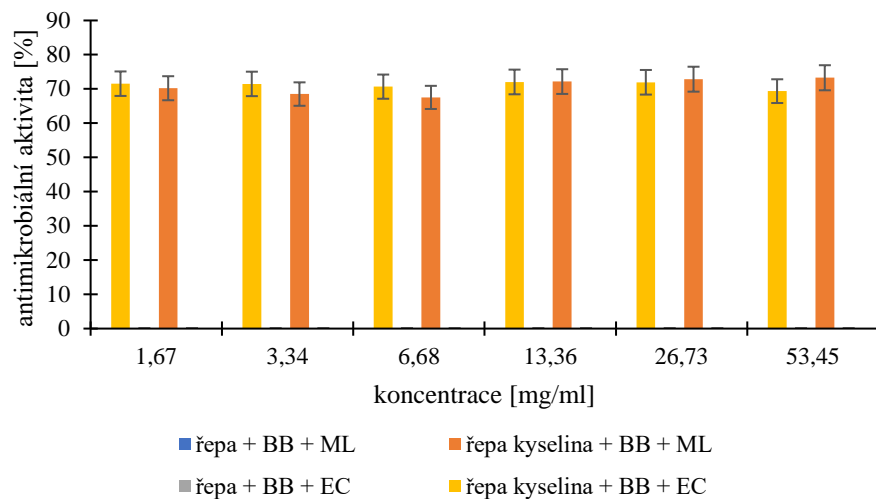
Na rozdíl od výše uvedených vzorků vykázal řapíkatý celer proměnlivou aktivitu. Při fermentaci s *B. bifidum* bylo u *M. luteus* pozorováno 58% inhibice, oproti 93 % u kyseliny mléčné, což svědčí o nižší účinnosti. U *E. coli* byla inhibice lyofilizátu 55 % a kyseliny mléčné 83 %. Naproti tomu fermentace celeru s *L. acidophilus* vykázala u *M. luteus* dokonce inhibici

143 %. Tyto výsledky ukazují, že účinek celerových extraktů je závislý na použitých bakteriálních kulturách a podmínkách fermentace.

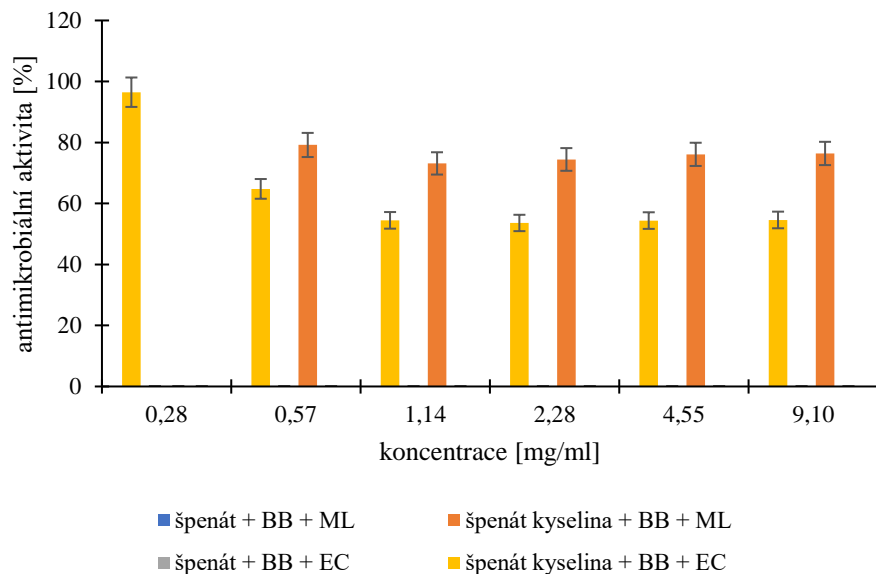
Nejnižší antimikrobiální účinnost byla prokázána u špenátu, a to fermentovaného jak s *L. acidophilus*, tak i *B. bifidum*. Zatímco kyselina mléčná dosahovala proti *E. coli* inhibice okolo 93 %, všechny koncentrace špenátového lyofilizátu vykazovaly nulovou aktivitu. Proti *M. luteus* byla inhibice lyofilizovaného vzorku 97 %, což je pouze o 1 % méně než u kyseliny mléčné, ale pouze při nejvyšší koncentraci. V nižších koncentracích účinek rychle klesal. Při fermentaci s *L. acidophilus* byla aktivita nulová i ve vyšších koncentracích. Absence účinku může být způsobena nízkým obsahem fermentovatelných cukrů a nedostatečnou stimulací tvorby antimikrobiálních metabolitů.

4.4.2.2 Resazurinový test

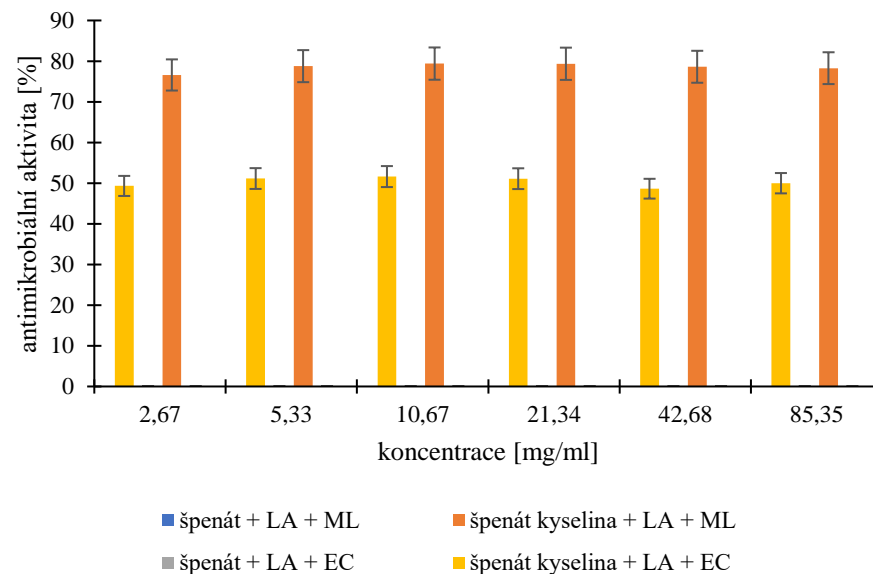
Resazurinový test je založen na změně barvy resazurinu v důsledku metabolické aktivity mikroorganismů. Test tedy umožňuje hodnotit životaschopnost a metabolickou aktivitu bakterií v přítomnosti testovaných látek. V tomto případě test fungoval jako doplňkový kontrolní nástroj k upřesnění, zda testované extrakty vykazují antimikrobiální účinek ve smyslu inhibice růstu, nebo dochází až k usmrcení bakterií. Stanovení proběhlo dle postupu popsáno v kapitole 3.9.2.3 a antimikrobiální aktivita byla spočítána z rozdílného zbarvení vzorku a kontrolní kultury neobsahující antimikrobiální složku, přičemž byl zároveň odečten vliv samotného kultivačního média. Paralelně byla testována i kyselina mléčná v koncentracích odpovídajících těm, které byly ve vzorcích stanoveny pomocí HPLC. Tato kontrola byla zařazena za účelem posouzení podílu kyseliny mléčné na celkovém antimikrobiálním účinku. Výsledky byly vyjádřeny jako procentuální hodnota antimikrobiální aktivity pro každou koncentraci a jsou zobrazeny na obrázcích (Obrázek 23, Obrázek 24, Obrázek 25, Obrázek 26). Procenta na ose y udávají antimikrobiální účinnost. Hodnota 0 % představuje plnou životaschopnost – tedy žádný antimikrobiální účinek. Hodnoty mezi 0-100 % ukazují na částečnou inhibici – čím nižší procento viability, tím vyšší antimikrobiální účinek. Hodnota 100 % znamená úplné usmrcení mikroorganismů. Hodnoty nad 100 % značí nejen úplnou inhibici růstu, ale i následný rozpad buněk, což může být způsobeno silným narušením buněčných struktur nebo změnami v absorpčních vlastnostech, které vedou k ještě nižší detekované aktivitě než na počátku testu.



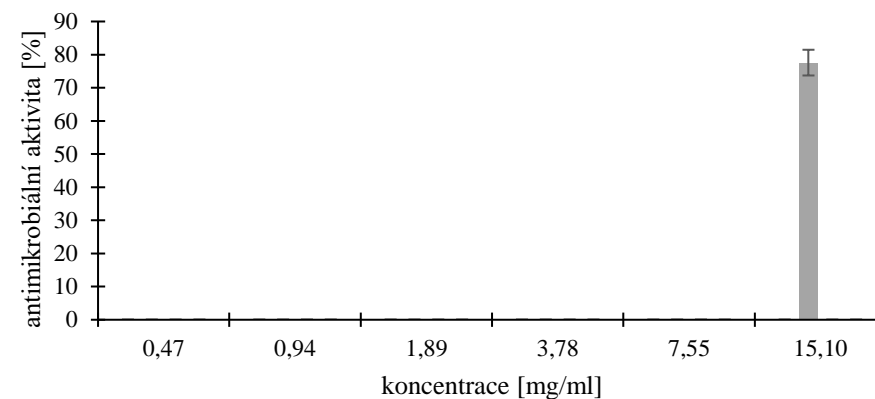
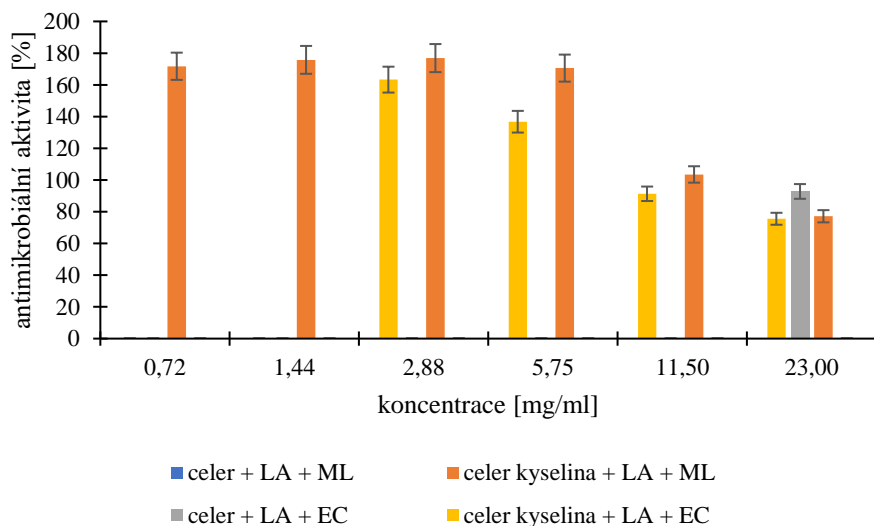
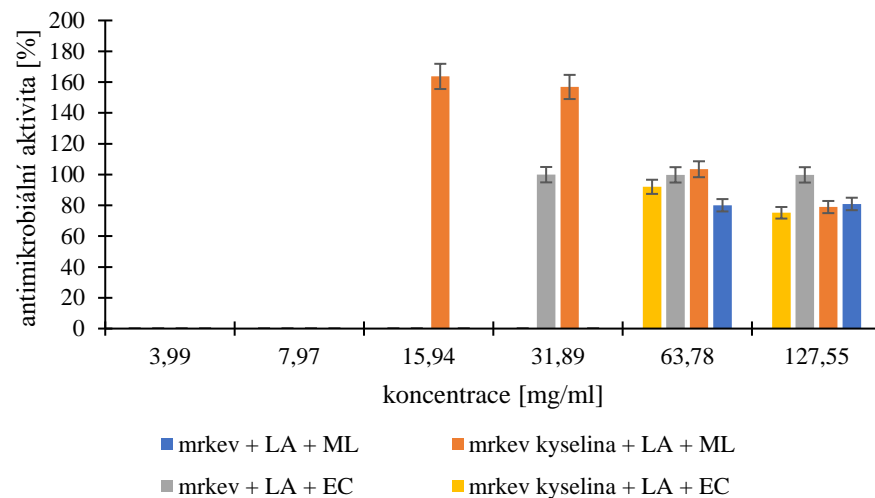
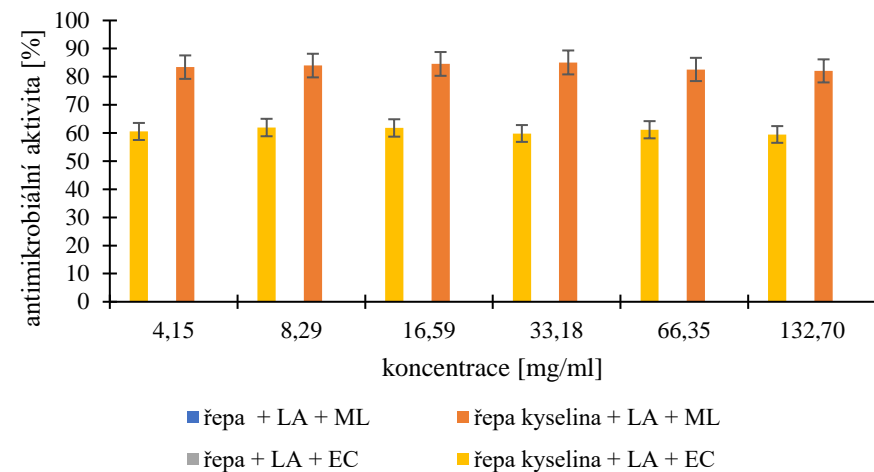
Obrázek 23: Grafy zobrazující antimikrobiální aktivitu lyofilizátu supernatantů kultury *Bifidobacterium bifidum* (BB) kultivované na vybrané zelenině a kyseliny mléčné adekvátní k tomuto lyofilizátu (v grafu označeno "zelenina kyselina") a to vždy proti *E. coli* (EC, šedé a žluté sloupce) a *M. luteus* (ML, modré a oranžové sloupce), stanoveno resazurinovým testem



Obrázek 24: Graf zobrazující antimikrobiální aktivitu lyofilizátu supernatantu kultury *Bifidobacterium bifidum* (BB) kultivované na špenátu a kyseliny mléčné adekvátní k tomuto lyofilizátu (v grafu označeno "špenát kyselina") a to proti *E. coli* (EC, šedé a žluté sloupce) a *M. luteus* (ML, modré a oranžové sloupce), stanoveno resazurinovým testem



Obrázek 25: Graf zobrazující antimikrobiální aktivitu lyofilizátu supernatantu kultury *Lactobacillus acidophilus* (LA) kultivované na špenátu a kyseliny mléčné adekvátní k tomuto lyofilizátu (v grafu označeno "špenát kyselina") a to proti *E. coli* (EC, šedé a žluté sloupce) a *M. luteus* (ML, modré a oranžové sloupce), stanoveno resazurinovým testem



Obrázek 26: Grafy zobrazující antimikrobiální aktivitu lyofilizátu supernatantů kultury *Lactobacillus acidophilus* (LA) kultivované na vybrané zelenině a kyseliny mléčné adekvátní k tomuto lyofilizátu (v grafu označeno "zelenina kyselina") a to vždy proti *E. coli* (EC, šedé a žluté sloupce) a *M. luteus* (ML, modré a oranžové sloupce), stanoveno resazurinovým testem

Výsledky rezazurinového testu prokázaly rozdíly v antimikrobiální aktivitě lyofilizovaných extraktů zelenin a přidané kyseliny mléčné. U většiny vzorků (např. řepa, špenát) lyofilizované extrakty nevykazovaly významnou antimikrobiální aktivitu (0 % inhibice) vůči *Micrococcus luteus* i *Escherichia coli* v testovaném rozsahu koncentrací. Naproti tomu kyselina mléčná prokázala inhibiční účinky nad 50 %, což naznačuje, že pozorovaná antimikrobiální aktivita je pravděpodobně způsobena převážně touto složkou.

U vzorku mrkve s *Bifidobacterium bifidum* byla zaznamenána částečná aktivita lyofilizovaného extraktu proti *E. coli* (75 %) i proti *M. luteus* (85 %), tato aktivita však s klesající koncentrací rychle mizela. Podobně tomu bylo i s *Lactobacillus acidophilus*, kdy při vyšších koncentracích je aktivita i 100 %, ale s nižší koncentrací byla opět nulová. Možným zdrojem chyb mohla být interference pigmentů, kdy silná barevnost některých extraktů (např. řepa nebo mrkev) mohla zkreslit absorbance měření.

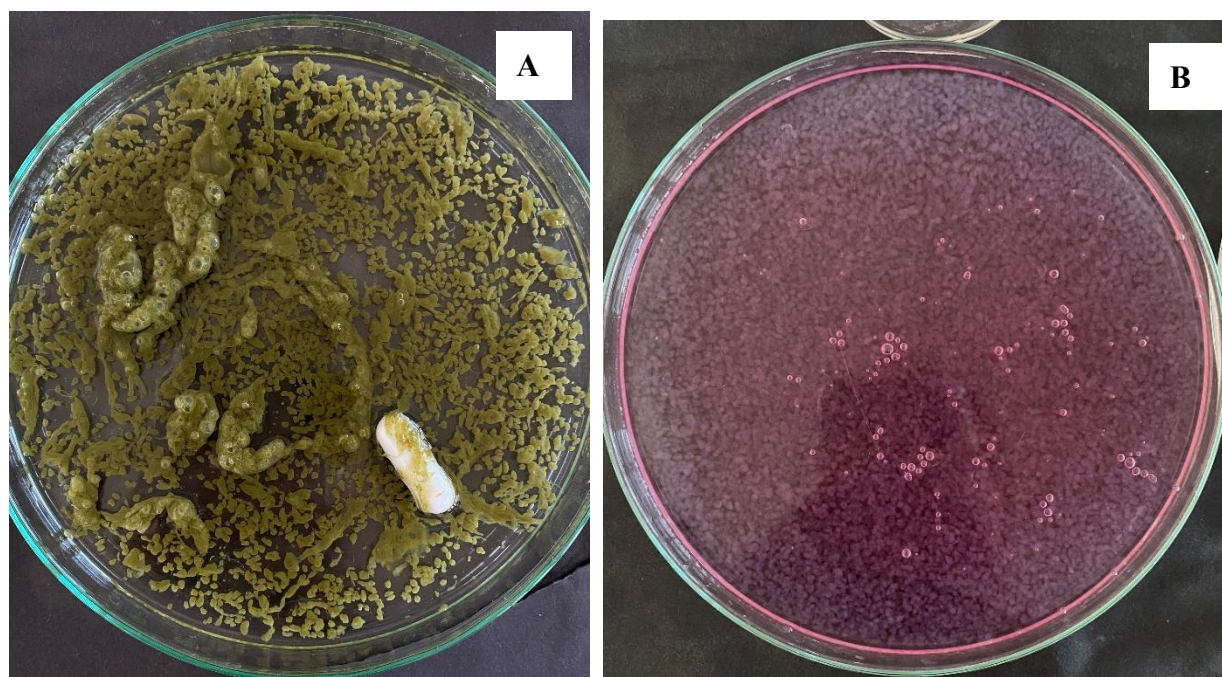
Gramnegativní *Escherichia coli* byla obecně odolnější než grampozitivní *Micrococcus luteus*, což odpovídá rozdílům ve struktuře buněčné stěny. Grampozitivní bakterie byly citlivější na působení některých extraktů. *E. coli* byla schopna přežít i ve vyšších koncentracích kyseliny mléčné, zatímco růst *M. luteus* byl za těchto podmínek už inhibován.

4.5 Enkapsulace vybraných probiotických bakterií se zeleninou

Pro enkapsulaci byly použity čtyři různé varianty kombinace zeleniny s probiotickými bakteriemi. Výběr konkrétních kombinací vycházel ze sensorických vlastností, obsahu bioaktivních látek a schopnosti podporovat růst probiotických kultur, přehled vybraných kombinací je v tabulce (Tabulka 7). Enkapsulace probíhala podle postupu popsáního v kapitole 3.10, přičemž výsledkem byly alginátové částice obsahující probiotické bakterie a zeleninovou složku viz obrázek (Obrázek 27). Částice byly také pozorovány pod stereomikroskopem, přičemž snímky jsou uvedeny na obrázcích (Obrázek 28, Obrázek 29, Obrázek 30, Obrázek 31, Obrázek 32). Míra enkapsulace byla určena na základě hodnot zákalu kultury a roztoku CaCl_2 po enkapsulaci, výsledky ukazuje tabulka (Tabulka 8).

Tabulka 7: Přehled zvolených kombinací pro enkapsulaci spolu s odůvodněním

Vybraná zelenina/kombinace	Použitý druh bakterií	Důvody pro výběr
Mrkev + červená řepa	<i>B. bifidum</i> , <i>L. acidophilus</i>	Očekávaná dobrá chuť, vyšší obsah cukrů, běžné použití ve smoothies, vysoký obsah vitamínu C (řepa), podpora růstu <i>B. bifidum</i> (řepa) a <i>L. acidophilus</i> (mrkev).
Mrkev + cuketa	<i>B. bifidum</i> , <i>L. acidophilus</i>	Sladkost (mrkev), dobrý růst <i>L. acidophilus</i> (mrkev), podpora růstu obou kmenů (cuketa).
Špenát	<i>L. acidophilus</i>	Nejvyšší obsah vitamínu C, vysoký antioxidační účinek, běžné použití ve smoothies, nejlepší růst <i>L. acidophilus</i> .
Cuketa	<i>B. bifidum</i>	Neutrální chuť, dobrý růst <i>B. bifidum</i>

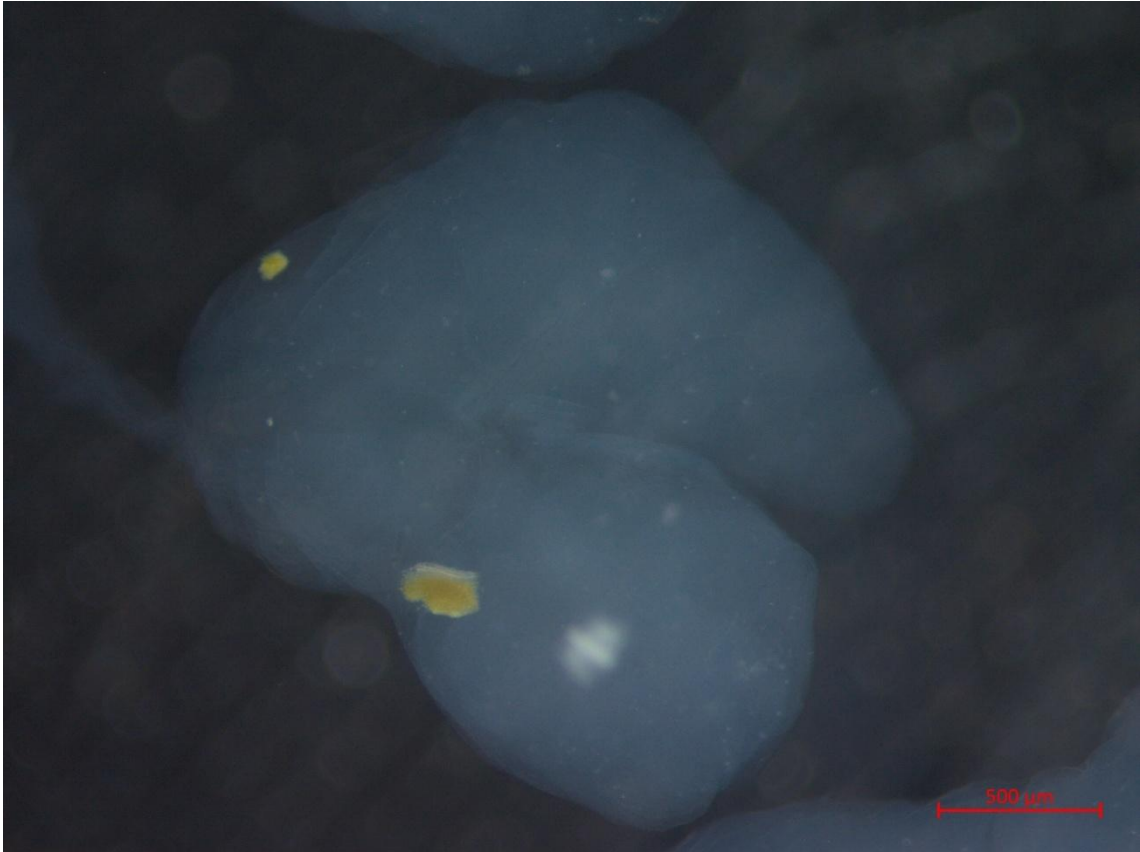


Obrázek 27: Vzniklé alginátové částice A) špenát bez předchozí centrifugace, B) řepa + mrkev

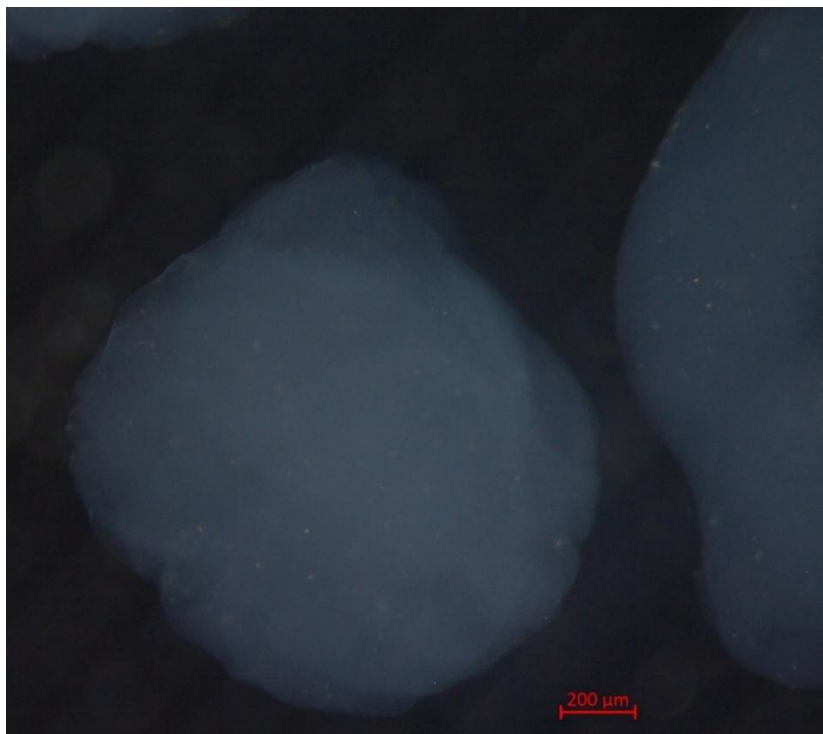
Pro ilustraci celého postupu enkapsulace a jeho optimalizace byly vybrány dva příklady – vzorky A a B. Původním záměrem bylo připravit částice z celého objemu po kultivaci se zeleninou. Jak však ukazuje obrázek A, při použití celého objemu docházelo k tvorbě nerovnoměrně velkých částic. Tento jev byl způsoben častým ucpáváním trysky, ke kterému docházelo v důsledku přítomnosti větších nerozpustných částic zeleniny po rehydrataci. Z tohoto důvodu byl následně zaveden krok centrifugace a oddělení pevné frakce. Pro enkapsulaci byla poté použita pouze jemnější frakce, tedy supernatant obsahující probiotika a postbioticky aktivní složky. Tento upravený postup vedl k vytvoření opakovatelných a rovnoměrných částic, jak je patrné na obrázku B. Postup s centrifugací byl následně aplikován na všechny vzorky stejným způsobem. Výsledné částice byly následně zobrazeny pomocí stereomikroskopu, aby bylo možné posoudit, zda přítomnost různých druhů zeleniny výrazně ovlivnila jejich velikost, případně zda je možné vizuálně identifikovat zastoupení rostlinných složek přímo v enkapsulovaných strukturách.



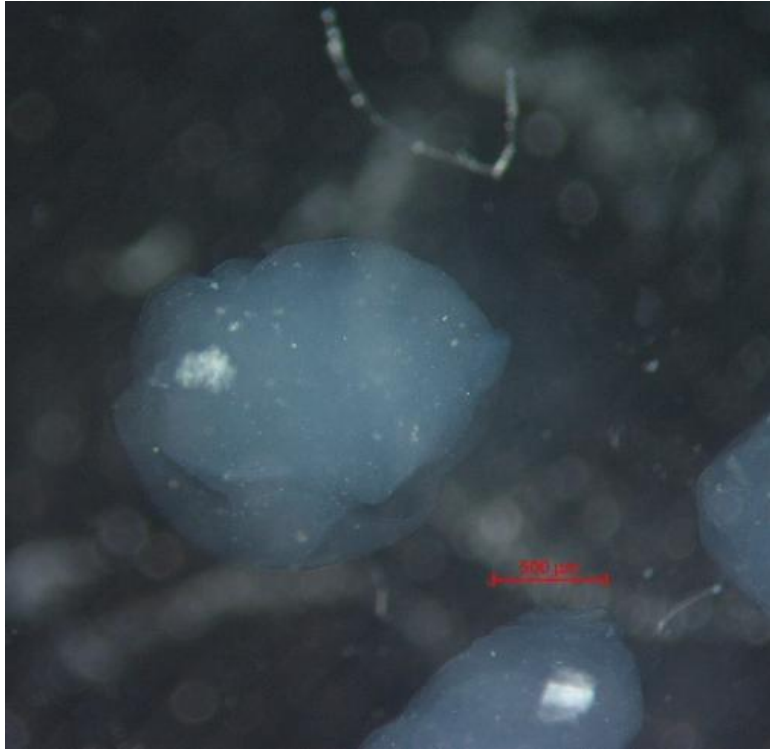
Obrázek 28: Fotografie částice se špenátem bez centrifugace pod stereomikroskopem se zvětšením 5×



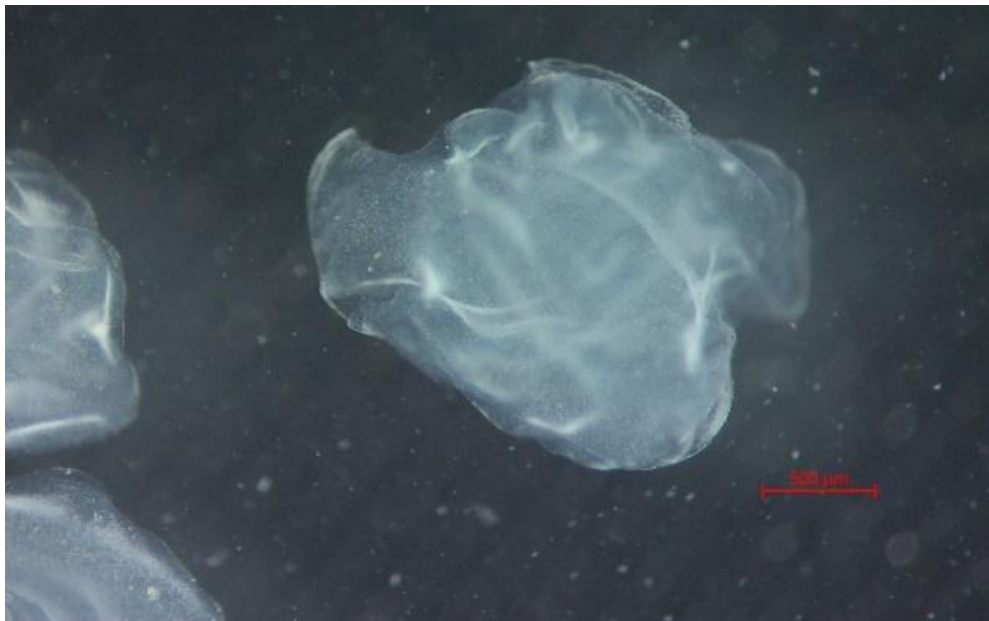
Obrázek 29: Fotografie částice s cuketou pod stereomikroskopem se zvětšením 5×



Obrázek 30: Fotografie částice se špenátem pod stereomikroskopem se zvětšením 5×



Obrázek 31: Fotografie částice s mrkví a cuketou pod stereomikroskopem se zvětšením 5×



Obrázek 32: Fotografie částice s řepou a mrkví pod stereomikroskopem se zvětšením 5×

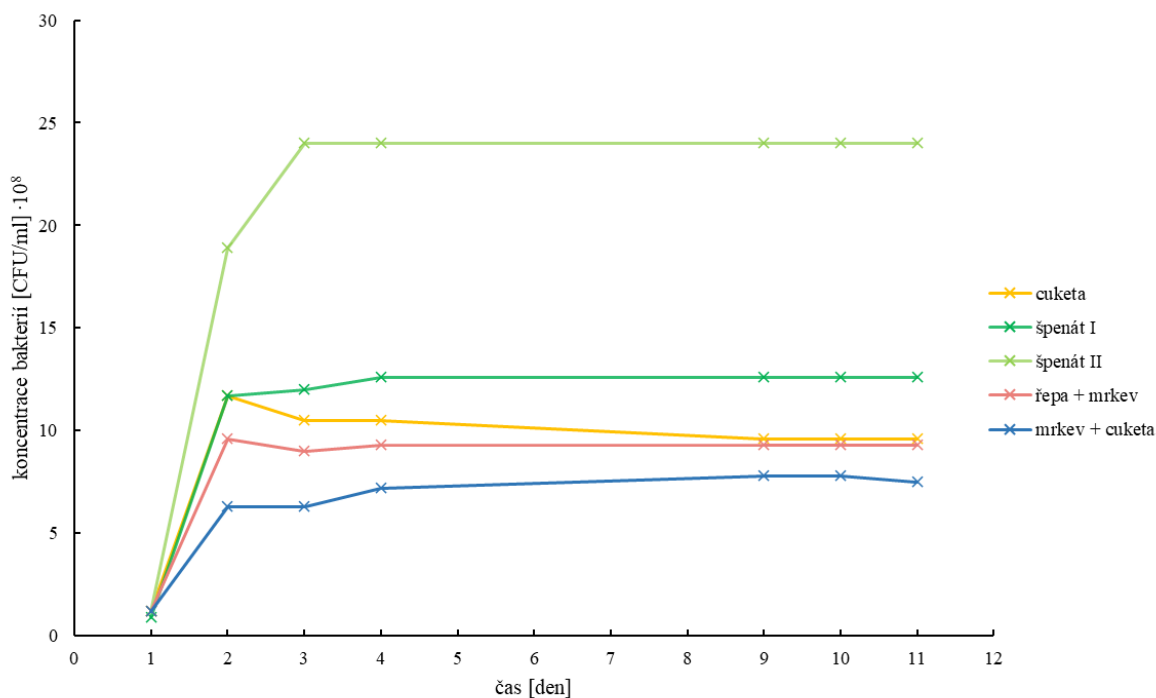
Stereomikroskopická pozorování zkoumaných částic poukázala na to, že přítomnost různých druhů zeleniny ovlivňuje jejich velikost a strukturu. Každá částice se lišila vzhledem a tvarem, což je pravděpodobně způsobeno kombinací mechanických vlastností rostlinných složek a různým zastoupením postbioticky aktivních látek. Tyto látky mohou interagovat s alginátem a ovlivňovat tvorbu gelové matrice. Do budoucna by bylo vhodné tyto vlivy podrobněji prozkoumat, protože vizuální rozdíly mezi jednotlivými vzorky poukazují na komplexní vliv složení na výsledný tvar a vlastnosti enkapsulovaných částic.

Byla pozorována také extrakce pigmentu, například u částic z řepy a mrkve, kde částice na obrázku 27B byly růžové, ale na obrázku 32 lze vidět pouze bílé kousky připomínající vločky. To naznačuje, že se pigment pravděpodobně uvolnil do vody.

Tabulka 8: Účinnost enkapsulace

	účinnost [%]
cuketa	100
špenát I	100
špenát II	10
řepa + mrkev	97
mrkev + cuketa	100

U alginátových částic vzniklých enkapsulací bylo následně sledováno uvolňování probiotických bakterií a jejich růst v MRS médiu. Měření probíhalo podle postupu uvedeného v kapitole 3.10.3 a výsledky jsou znázorněny na obrázku (*Obrázek 33*). Byl pozorován postupný nárůst počtu bakterií v živném médiu, což svědčí o jejich průběžném uvolňování z alginátové matrice. Díky enkapsulaci si bakterie zároveň zachovaly životaschopnost po delší dobu a byly schopny kontinuálně růst v kultivačním prostředí.



Obrázek 33: Graf zobrazující nárůst probiotické kultury z enkapsulovaných částic

4.6 Možné aplikační využití enkapsulovaných částic

Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že připravené enkapsulované částice obsahující probiotické kultury a zeleninové extrakty s prebiotickým účinkem vykazují slibný aplikační potenciál v oblasti funkčních potravin a doplňků stravy. Díky zajištěné stabilitě a životaschopnosti probiotik jsou tyto mikrokapsle vhodné k začlenění do různých typů produktů, které podporují střevní mikrobiotu a celkové zdraví. Mezi nejvhodnější aplikační formy patří:

- Probiotická smoothie – mikrokapsle lze snadno vmíchat do zeleninovo-ovocných nápojů, kde nejen obohatí nutriční profil, ale také přispějí ke zdravému trávení.
- Výživové doplňky ve formě kapslí nebo prášků – enkapsulovaná forma je stabilní a vhodná pro suché přípravky určené k perorálnímu podávání.
- Obohacení kaší, jogurtů nebo fermentovaných mléčných produktů – synbiotická složka může zvýšit funkční hodnotu těchto potravin.
- Instantní směsi pro přípravu zdravých snídaní nebo nutričních tyčinek – kapsle lze integrovat do suchých směsí, kde budou chráněny před vlhkostí a aktivovány až během konzumace.
- Funkční potraviny určené specifickým skupinám populace – jako jsou senioři, sportovci nebo rekonvalescenti, kteří mohou těžit z cílené podpory střevního mikrobiomu a imunity.

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala vývojem inovativního synbiotického potravinového doplňku, který kombinuje enkapsulovaná probiotika s extrakty z běžně dostupné zeleniny s prebiotickým potenciálem. Cílem bylo vytvořit synbiotický produkt s co nejvyšší stabilitou, životaschopností probiotik a pozitivním vlivem na střevní mikrobiotu.

V teoretické části práce jsou popsány základní charakteristiky probiotik, jejich historie, mechanismy účinku a zdravotní přínosy, včetně bezpečnosti. Dále je vysvětlen význam prebiotik a synbiotik, přičemž zvláštní pozornost je věnována zelenině jako zdroji bioaktivních látek s prebiotickým potenciálem. Součástí teoretické části je také přehled metod enkapsulace, které zvyšují stabilitu a životaschopnost probiotických mikroorganismů během skladování i průchodu trávicím traktem.

V úvodu experimentální části této práce byly kultivovány čtyři druhy bakterií mléčného kvašení ve standardním kultivačním médiu. Konkrétně se jednalo o druhy *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus plantarum*, které patří mezi nejčastěji využívané probiotické mikroorganismy. Po ukončení kultivace byla u všech kultur změřena optická hustota, což umožnilo stanovit nárůst buněčné biomasy jednotlivých bakteriálních kmenů. Současně byly bakterie barveny methylenovou modří za účelem posouzení jejich viability, tedy podílu živých a mrtvých buněk v populaci. Tento postup poskytl základní informace o růstové aktivitě zvolených probiotik ve zvolených podmínkách a byl klíčový pro následné experimenty zaměřené na jejich metabolickou aktivitu a životaschopnost v synbiotickém přípravku.

V další fázi experimentální části byly testovány vybrané druhy zeleniny, konkrétně mrkev, červená řepa, špenát, řapíkatý celer a cuketa. Motivací pro tento výběr byla jejich dostupnost a především chuť vhodná pro použití v doplňku stravy. U zeleninových extraktů byla stanovována celá řada chemických a biologických parametrů s cílem ověřit jejich vhodnost jako prebiotické složky a růstového média pro probiotické bakterie. Konkrétně byl pomocí spektrofotometrických a chromatografických metod analyzován obsah sacharidů, antioxidantů, fenolických látek, rostlinných barviv a vitamínu C, protože tyto látky jsou klíčové pro podporu růstu a metabolické aktivity probiotik. Výsledky ukázaly, že jednotlivé druhy zeleniny se výrazně liší obsahem bioaktivních látek. Nejvyšší obsah redukujících i celkových sacharidů byl zjištěn u červené řepy ($2,96 \pm 0,02$ a $29,17 \pm 0,01$ mg/g), mrkve ($2,76 \pm 0,03$ a $93,88 \pm 0,01$ mg/g) a cukety ($3,012 \pm 0,006$ a $2,596 \pm 0,004$ mg/g), což naznačuje jejich vysoký nutriční přínos pro metabolickou aktivitu probiotických bakterií. Antioxidační kapacita byla nejvýraznější u špenátu ($7,349 \pm 0,007$ mg/g) a cukety ($8,05 \pm 0,02$ mg/g), což odpovídá jejich vysokému obsahu fenolických sloučenin a přírodních barviv, jako jsou a chlorofyly a karotenoidy. Tyto dva druhy zeleniny se zároveň řadily mezi nejvýznamnější i v rámci samostatného stanovení obsahu těchto barviv, čímž dále potvrdily svůj potenciál jako zdroj bioaktivních látek s antioxidačním účinkem. Celkově bylo zjištěno, že všechny testované zeleniny obsahují bioaktivní látky, které mohou synergicky podporovat růst a vitalitu probiotik.

Následně byly vybrané kmeny bakterií mléčného kvašení *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum* kultivovány v prostředí zeleninových extraktů. Cílem této fáze bylo zjistit, jak zeleninové extrakty ovlivňují růst a metabolickou aktivitu probiotických bakterií

v podmínkách blízkých reálnému produktu. U připravených vzorků byly testovány tři parametry: schopnost růstu na tuhém kultivačním médiu, produkce kyseliny mléčné a antimikrobiální aktivita vůči indikátorovým mikroorganismům. Výsledky ukázaly, že všechny testované vzorky umožnily probiotickým bakteriím růst na tuhém médiu, přičemž nejvyšší růstová aktivita byla pozorována u vzorků s přidavkem mrkve a špenátu. Poté byly bakteriální supernatanty podrobeny lyofilizaci a v připravených probiotických extraktech byl stanoven obsah kyseliny mléčné pomocí HPLC, výrazně nejvyšší obsah byl stanoven u špenátu ($17,3 \pm 0,9$ g/l). Antimikrobiální testy pak prokázaly, že některé lyofilizáty vykazovaly zvýšenou schopnost inhibovat růst indikátorových bakterií, což naznačuje synergický efekt kombinace probiotik a zeleninových bioaktivních látek.

V závěrečné fázi experimentální části byly připraveny alginátové částice obsahující kombinaci probiotických bakterií a zeleninových extraktů. Pro enkapsulaci byly zvoleny čtyři různé varianty těchto kombinací. Po dobu jedenácti dnů byl sledován nárůst počtu probiotických buněk uvolňovaných z alginátové matrice. Výsledky prokázaly postupné uvolňování bakterií, které svědčí o funkčnosti zvoleného enkapsulačního systému. Zároveň bylo potvrzeno, že enkapsulace významně přispívá k udržení životaschopnosti probiotik a umožňuje jejich kontinuální růst v kultivačním prostředí. Připravené částice byly rovněž vizuálně hodnoceny pomocí stereomikroskopu, což umožnilo posoudit jejich morfologii, tvarovou jednotnost a celkovou kvalitu provedené enkapsulace.

Vyvinutý synbiotický doplněk stravy založený na kombinaci probiotických mikroorganismů a extraktů z běžně dostupné zeleniny vykazuje vysoký aplikační potenciál v oblasti funkčních potravin a doplňků výživy. Díky použité enkapsulační technologii je zajištěna stabilita a životaschopnost probiotik, což umožňuje jejich začlenění do různorodých produktových forem. Mikrokapsle lze využít například k obohacení smoothie, pomazánek, humusů, instantních kaší nebo jako součást výživových doplňků ve formě kapslí či prášků. Synbiotický přípravek tak může sloužit jako účinný nástroj pro podporu střevní mikrobioty, posílení imunity i celkového zdraví, a představuje perspektivní řešení pro personalizovanou výživu i moderní funkční potraviny.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SENOK, A. C., A. Y. ISMAEEL a G. A. BOTTA. Probiotics: Facts and myths. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2005, **11**(12), 958–966 [vid. 2025-05-18]. ISSN 14690691. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01228.x
- [2] *Synbiotika – dvě složky ruku v ruce - Vitamíny bez cenzury* [online]. [vid. 2025-05-18]. Dostupné z: <https://www.vitaminybezcentury.cz/nezarazene/synbiotika>
- [3] KUMAR, Suresh, Riya MUKHERJEE, Pratibha GAUR, Élcio LEAL, Xiaoming LYU, Saheem AHMAD, Paridhi PURI, Chung Ming CHANG, V. Samuel RAJ a Ramendra Pati PANDEY. Unveiling roles of beneficial gut bacteria and optimal diets for health. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2025, **16**, 1527755 [vid. 2025-05-18]. ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/FMICB.2025.1527755/XML/NLM
- [4] GARG, Vandana, Deepapriya VELUMANI, Yu Chieh LIN a Abdul HAYE. A comprehensive review of probiotic claims regulations: Updates from Asia-Pacific, United States, and Europe. *PharmaNutrition* [online]. 2024, **30**, 100423 [vid. 2024-12-22]. ISSN 2213-4344. Dostupné z: doi:10.1016/J.PHANU.2024.100423
- [5] NEVORAL JIŘÍ. Prebiotika, probiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*. 2005, **8**(2), 59–65. Dec. 22, 2024. [Online]. Available: <https://www.solen.sk/storage/file/article/Nevoral.pdf>
- [6] MUDR. PETR TLÁSKAL, CSc. VYUŽITÍ PROBIOTIK V PEDIATRII. *Pediatric pro praxi* [online]. 2008, **9**(5), 288–291 [vid. 2024-12-22]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2008/05/04.pdf>
- [7] SAAD, N., C. DELATTRE, M. URDACI, J. M. SCHMITTER a P. BRESSOLLIER. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2013, **50**(1), 1–16 [vid. 2024-12-22]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: doi:10.1016/J.LWT.2012.05.014
- [8] FAO a WHO. Probiotics in food health and nutritional properties and guidelines for evaluation: report. Rome: [Food and agriculture organization of the United nations (FAO) [etc.], 2006. ISBN 9251055130. nedatováno.
- [9] DAGLIA, Maria, Lorenzo DRAGO, Hammad ULLAH, Alessandro DI MINNO, Giulia BRINDISI, Francesco Paolo BRUNESE, Giulio DINARDO, Alessandra GORI, Cristiana INDOLFI, Matteo NASO, Enrico TONDINA, Chiara TRINCIANTI, Attilio VARRICCHIO, Anna Maria ZICARI a Giorgio CIPRANDI. Effects of the supplementation of single and multi-strain probiotics, alone or in combination with other treatments, on asthma in children: A systematic review of the randomized, placebo-controlled clinical studies. *Journal of Functional Foods* [online]. 2024, **123**, 106599 [vid. 2024-12-22]. ISSN 1756-4646. Dostupné z: doi:10.1016/J.JFF.2024.106599
- [10] SANDERS, Mary Ellen. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2008, **46**(s2), S58-S61 [cit. 2024-04-13]. DOI: 10.1086/523341. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article/lookup/doi/10.1086/523341>. nedatováno.
- [11] CANDELA, M., F. PERNA, P. CARNEVALI, et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells:

- Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2008, 125(3), 286-292 [cit. 2024-04-13]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.012. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160508001967>. nedatováno.
- [12] SÁNCHEZ, Borja, Susana DELGADO, Aitor BLANCO-MÍGUEZ, Anália LOURENÇO, Miguel GUEIMONDE a Abelardo MARGOLLES. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research* [online]. 2017, 61(1), 1600240- [cit. 2024-04-13]. DOI: 10.1002/mnfr.201600240. ISSN 16134125. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201600240>. nedatováno.
- [13] BEZKOROVAINY, Anatoly. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* [online]. 2001, č. 73, s. 399-405 [cit. 2024-04-13]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157348>. nedatováno.
- [14] PARHI, Priyanka, Shao Quan LIU a Wee Sim CHOO. Synbiotics: Effects of prebiotics on the growth and viability of probiotics in food matrices. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* [online]. 2024, 32, 100462 [vid. 2024-12-23]. ISSN 2212-6198. Dostupné z: [doi:10.1016/J.BCDF.2024.100462](https://doi.org/10.1016/J.BCDF.2024.100462)
- [15] ŠPELINA, Vladimír a Daniela WINKLEROVÁ. Principy hodnocení účinnosti a bezpečnosti probiotik a charakteristika registrovaných doplňků stravy s obsahem probiotik a prebiotik. *Pediatric pro praxi*, 2009, roč. 10, s.247-250. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2009/04/08.pdf>. nedatováno.
- [16] Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002 Aug;82(1-4):279-89. PMID: 12369194. nedatováno.
- [17] • Szajewska, H., & Mrukowicz, J. Z. (2013). Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: A systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 33(2), 17–25. nedatováno.
- [18] • Allen, S. J., Martinez, E. G., Gregorio, G. V., & Dans, L. F. (2010). Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (11). nedatováno.
- [19] MAZIADE, Pierre Jean, Noam SHIP, Jason C. SNIFFEN a Ellie J.C. GOLDSTEIN. Enhanced Clostridioides difficile Infection Prevention With a Pharmacy-Controlled Policy That Adds a 3-Strain Lactobacillus Probiotic Concomitantly to Antibiotic Therapy. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2021, 73(8), 1524–1527 [vid. 2024-12-23]. ISSN 1058-4838. Dostupné z: [doi:10.1093/CID/CIAB414](https://doi.org/10.1093/CID/CIAB414)
- [20] • WHO (2017). Probiotics and prebiotics in preventing and treating infectious diseases. *World Health Organization Guidelines*. nedatováno.
- [21] Sartor, R. B. (2011). Probiotics and inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140(6), 1756–1767. nedatováno.
- [22] • Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., & et al. (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*, 53(11), 1617–1623. nedatováno.

- [23] • Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2020). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: From biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(11), 605–616. nedatováno.
- [24] Aro, H., et al. (2010). „The role of probiotics in the treatment of lactose intolerance." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 31(9), 963-970. nedatováno.
- [25] 4. Chandran, P., et al. (2014). „Probiotics and lactose intolerance." *Journal of Clinical Gastroenterology*, 48(7), 641-648. nedatováno.
- [26] Hill, C., et al. (2014). „The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of Probiotics in Food and Food Products." *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 9(4), 161-168. nedatováno.
- [27] *Kapsle vs. prášek: Jakou formu doplňků stravy zvolit?* | *Natima* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: <https://www.natima.cz/blog/kapsle-vs--prasek--jakou-formu-doplнку-stravy-zvolit/>
- [28] ŠPELINA, Vladimír a Daniela WINKLEROVÁ. Principy hodnocení účinnosti a bezpečnosti probiotik a charakteristika registrovaných doplňků stravy s obsahem probiotik a prebiotik. *Pediatric pro praxi*, 2009, roč. 10, s.247-250. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2009/04/08.pdf>. nedatováno.
- [29] *Blog - blendea.cz* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: <https://www.blendea.cz/blog/>
- [30] *Nejlepší probiotika a prebiotika 2025* | *Testado.cz* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: https://www.testado.cz/probiotika/?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=21114890062-168580881108&utm_term=nejlep%C5%A1%C3%AD%20probiotika&gad_source=1&gbraid=0AAAAAqrUCILlePxsJYQmSOq4sRS36zAkE&gclid=CjwKCAjwwe2_BhBEIiwAM1I7sR_KF8jiAD1AMMb2qt55paBqH62xvZDXvMM1_VkPheOZq7QYhBL6qxoC7ksQAvD_BwE
- [31] *Probiotika + Prebiotika 60 kapslí - blendea.cz* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: https://www.blendea.cz/probiotika/?utm_medium=affiliate&utm_campaign=affial.com&utm_source=pap&a_aid=5e3040ea934fa&a_bid=43619a9d&data1=tstdcz_01962f18-a2c6-72ef-a3a8-d741d0ee38ac&chan=tstdcz
- [32] *GreenFood Nutrition Probiotics LactoSpore + Prebiotics 60 kapslí* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: https://www.drmax.cz/greenfood-nutrition-probiotics-lactospore-prebiotics-60-kapsli?cjdata=MXxZfDB8WXww&utm_medium=affiliate&utm_source=CJ&utm_campaign=drmax.cz&cjevent=6de89c89186111f082c601040a18b8f8&utm_content=8024628&utm_term=6de89c89186111f082c601040a18b8f8&loyalty=0
- [33] *Probio24.cz - nejsilnější probiotika* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: https://probio24.nutraceutics.cz/?gad_source=1&gbraid=0AAAAADqQabvrW6OOSY8M5VdE3FsyfPXHn&gclid=CjwKCAjwwe2_BhBEEiwAM1I7sejkJqFt_jIZD_iWn3anyFQ-Un3bxl23yELr3lFqc-BBhRdrPMsHcBoCVoMQAvD_BwE#tab-slozeni
- [34] *Probiotika a prebiotika 1 kus* | *NaturalProtein.cz* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: <https://www.naturalprotein.cz/probiotika-a-prebiotika-1->

kus?utm_source=eHub&utm_medium=affiliate&ehub=e75a560958524633b06515a1b96c956a#description

- [35] LEFKOVITZ, Allen L. a Barbara J. ZAROWITZ. It's a microscopic world after all: Prebiotics, probiotics, and synbiotics. *Geriatric Nursing* [online]. 2013, **34**(4), 323–325 [vid. 2024-12-23]. ISSN 0197-4572. Dostupné z: doi:10.1016/J.GERINURSE.2013.06.007
- [36] Ouwehand, A. (2017). „Probiotics and gastrointestinal health." *Food Research International*, 103, 128-135. nedatováno.
- [37] de Vrese, M., et al. (2019). „Probiotics and antibiotics: interactions and implications." *Antibiotics*, 8(4), 213. nedatováno.
- [38] HILL, Colin, Francisco GUARNER, Gregor REID, Glenn R. GIBSON, Daniel J. MERENSTEIN, Bruno POT, Lorenzo MORELLI, Roberto Berni CANANI, Harry J. FLINT, Seppo SALMINEN, Philip C. CALDER a Mary Ellen SANDERS. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2014, **11**(8), 506–514 [vid. 2025-05-18]. ISSN 17595053. Dostupné z: doi:10.1038/NRGASTRO.2014.66;SUBJMETA=1503,2135,2741,565,692,698,699,700;KWRD=GASTROINTESTINAL+DISEASES,MICROBIOTA,THERAPEUTICS
- [39] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. 2011, **1**, 1806–1815 [vid. 2025-04-18]. ISSN 2211-601X. Dostupné z: doi:10.1016/J.PROFOO.2011.09.265
- [40] DUNNE, C., L. O'MAHONY, L. MURPHY, G. THORNTON, D. MORRISSEY, S. O'HALLORAN, M. FEENEY, S. FLYNN, G. FITZGERALD, C. DALY, B. KIELY, G. C. O'SULLIVAN, F. SHANAHAN a J. K. COLLINS. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2001, **73**(2 SUPPL.) [vid. 2025-05-18]. ISSN 00029165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/73.2.386s
- [41] SLOVER, Christine M. Lactobacillus: a Review. *Clinical Microbiology Newsletter* [online]. 2008, **30**(4), 23–27 [vid. 2024-12-29]. ISSN 0196-4399. Dostupné z: doi:10.1016/J.CLINMICNEWS.2008.01.006
- [42] ZHENG, Jinshui, Stijn WITTOUCK, Elisa SALVETTI, Charles M.A.P. FRANZ, Hugh M.B. HARRIS, Paola MATTARELLI, Paul W. O'TOOLE, Bruno POT, Peter VANDAMME, Jens WALTER, Koichi WATANABE, Sander WUYTS, Giovanna E. FELIS, Michael G. GÄNZLE a Sarah LEBEER. 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2020, **70**(4), 2782–2858 [vid. 2024-12-29]. ISSN 14665034. Dostupné z: doi:10.1099/IJSEM.0.004107/CITE/REFWORKS

- [43] LEBLANC, Jean Guy, Christian MILANI, Graciela Savoy DE GIORI, Fernando SESMA, Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current opinion in biotechnology* [online]. 2013, **24**(2), 160–168 [vid. 2025-04-13]. ISSN 1879-0429. Dostupné z: doi:10.1016/J.COPBIO.2012.08.005
- [44] DUAR, Rebecca M., Xiaoxi B. LIN, Jinshui ZHENG, Maria Elena MARTINO, Théodore GRENIER, María Elisa PÉREZ-MUÑOZ, François LEULIER, Michael GÄNZLE a Jens WALTER. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2017, **41**(Supp_1), S27–S48 [vid. 2024-12-29]. ISSN 0168-6445. Dostupné z: doi:10.1093/FEMSRE/FUX030
- [45] CHEN, Jun, Xinyi CHEN a Chun Loong HO. Recent Development of Probiotic Bifidobacteria for Treating Human Diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2021, **9**, 770248 [vid. 2024-12-29]. ISSN 22964185. Dostupné z: doi:10.3389/FBIOE.2021.770248/FULL
- [46] O'CALLAGHAN, Amy a Douwe VAN SINDEREN. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7**(JUN), 925 [vid. 2024-12-29]. ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/FMICB.2016.00925
- [47] *Prebiotika – „potrava“ pro bakterie ve Vašem trávicím traktu - Vitamíny bez cenzury* [online]. [vid. 2024-12-23]. Dostupné z: <https://www.vitaminybezczury.cz/nezarazene/prebiotika>
- [48] *Znáte rozdíl mezi probiotiky, prebiotiky a synbiotiky? | Blog | EUC Lékárna* [online]. [vid. 2024-12-23]. Dostupné z: <https://www.euclekarna.cz/blog/znate-rozdil-mezi-probiotiky-prebiotiky-a-synbiotiky>
- [49] AL-SHERAJI, Sadeq Hasan, Amin ISMAIL, Mohd Yazid MANAP, Shuhaimi MUSTAFA, Rokiah Mohd YUSOF a Fouad Abdulrahman HASSAN. Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods* [online]. 2013, **5**(4), 1542–1553 [vid. 2024-12-23]. ISSN 1756-4646. Dostupné z: doi:10.1016/J.JFF.2013.08.009
- [50] *Prebiotika – Bezpečnost potravin* [online]. [vid. 2024-12-23]. Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/termin/prebiotika/>
- [51] MOHANTY, Debapriya, Snigdha MISRA, Swati MOHAPATRA a Priyadarshi Soumyaranjan SAHU. Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. *Food Bioscience* [online]. 2018, **26**, 152–160 [vid. 2024-12-27]. ISSN 2212-4292. Dostupné z: doi:10.1016/J.FBIO.2018.10.008
- [52] BAMIGBADE, Gafar Babatunde, Athira Jayasree SUBHASH, Afaf KAMAL-ELDIN, Laura NYSTRÖM a Mutamed AYYASH. An Updated Review on Prebiotics: Insights on Potentials of Food Seeds Waste as Source of Potential Prebiotics. *Molecules* [online]. 2022, **27**(18), 5947 [vid. 2025-04-13]. ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/MOLECULES27185947
- [53] VIEIRA, Angélica T., Mauro M. TEIXEIRA a Flaviano S. MARTINS. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Frontiers in Immunology* [online].

- 2013, 4(DEC), 68162 [vid. 2024-12-27]. ISSN 16643224. Dostupné z: doi:10.3389/FIMMU.2013.00445/BIBTEX
- [54] *kariogenní bakterie | NZIP* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/5636>
- [55] *motilita | NZIP* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/4749>
- [56] SLAVIN, Joanne. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients* [online]. 2013, 5(4), 1417 [vid. 2024-12-27]. ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/NU5041417
- [57] ANDRADE, Roberta Melquiades Silva de, Sara SILVA, Célia Maria da Silva Freitas COSTA, Mariana VEIGA, Eduardo COSTA, Mariana Simões Larraz FERREIRA, Edira Castello Branco de Andrade GONÇALVES a Manuela Estevez PINTADO. Potential prebiotic effect of fruit and vegetable byproducts flour using in vitro gastrointestinal digestion. *Food Research International* [online]. 2020, 137, 109354 [vid. 2024-12-27]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: doi:10.1016/J.FOODRES.2020.109354
- [58] SLAVIN, Joanne L. a Beate LLOYD. Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* [online]. 2012, 3(4), 506–516 [vid. 2024-12-27]. ISSN 2156-5376. Dostupné z: doi:10.3945/AN.112.002154
- [59] MUDGIL, Deepak a Sheweta BARAK. Classification, technological properties, and sustainable sources. *Dietary Fiber: Properties, Recovery, and Applications* [online]. 2019, 27–58 [vid. 2024-12-27]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816495-2.00002-2
- [60] ZHAO, Mingwei, Xinying CAO, Yuzheng WU, Sibao ZOU, Zhigao LI, Xiping LIN, Chaofan JI, Liang DONG, Sufang ZHANG, Chenxu YU a Huipeng LIANG. Effects of prebiotics on the fermentation of traditional suancai of Northeast China. *Food Science and Human Wellness* [online]. 2024, 13(3), 1358–1367 [vid. 2024-12-27]. ISSN 2213-4530. Dostupné z: doi:10.26599/FSHW.2022.9250114
- [61] SLAVIN, Joanne. Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients* [online]. 2013, 5(4), 1417–1435 [vid. 2025-05-18]. ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/NU5041417,
- [62] DHINGRA, Devinder, Mona MICHAEL, Hradesh RAJPUT a R. T. PATIL. Dietary fibre in foods: a review. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2011, 49(3), 255 [vid. 2025-05-18]. ISSN 00221155. Dostupné z: doi:10.1007/S13197-011-0365-5
- [63] RAMAPPA, D., Kavan KUMAR V, Mohith Kumar MOHITH, V. KUMARGOUDA, Sachin C. HALLAD, T. N. ARUNA, Y. RAVI a P. MURALI. Standardization of vacuum frying techniques for the development of low-fat beetroot finger chips. *Food and Humanity* [online]. 2024, 3, 100424 [vid. 2024-12-29]. ISSN 2949-8244. Dostupné z: doi:10.1016/J.FOOHUM.2024.100424
- [64] *Červená řepa, prášek | MámeChut' Organic* [online]. [vid. 2024-12-29]. Dostupné z: <https://eshop.mamechut.cz/cervena-repa-prasek/>
- [65] MORELOCK, Teddy E. a James C. CORRELL. Spinach. *Vegetables I* [online]. 2008, 189–218 [vid. 2024-12-29]. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-30443-4_6

- [66] *Celery – Stalk or Rib? – Community Vitality & Health* [online]. [vid. 2024-12-29]. Dostupné z: <https://uwyoextension.org/uwnutrition/newsletters/celery-stalk-or-rib/>
- [67] MALHOTRA, S. K. Celery. *Handbook of Herbs and Spices* [online]. 2006, **3**, 317–336 [vid. 2024-12-29]. Dostupné z: doi:10.1533/9781845691717.3.317
- [68] NAGRAJ, Geetha Shree, Swarna JAISWAL, Niamh HARPER a Amit K. JAISWAL. Carrot. *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables* [online]. 2020, 323–337 [vid. 2024-12-29]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-812780-3.00020-9
- [69] ERGUN, Muharrem a Zahide SÜSLÜOĞLU. EVALUATING CARROT AS A FUNCTIONAL FOOD. *Middle East Journal of Science* [online]. 2018, **4**(2), 113–119 [vid. 2024-12-29]. ISSN 2618-6136. Dostupné z: doi:10.23884/MEJS.2018.4.2.07
- [70] LIUBOV BEN-NUN. *CHARACTERISTICS OF ZUCCHINI*. Israel: B. N. Publication House, 2019.
- [71] *New synbiotic definition lays the groundwork for continued scientific progress - International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)* [online]. [vid. 2024-12-28]. Dostupné z: <https://isappscience.org/new-synbiotic-definition-lays-the-groundwork-for-continued-scientific-progress/>
- [72] KOLIDA, Sofia a Glenn R. GIBSON. Synbiotics in health and disease. *Annual Review of Food Science and Technology* [online]. 2011, **2**(Volume 2, 2011), 373–393 [vid. 2025-04-18]. ISSN 19411413. Dostupné z: doi:10.1146/ANNUREV-FOOD-022510-133739/CITE/REFWORKS
- [73] *Prebiotics, probiotics and synbiotics: an overview.* | EBSCOhost [online]. [vid. 2025-04-18]. Dostupné z: https://openurl.ebsco.com/EPDB%3Agcd%3A7%3A33720823/detailv2?sid=ebsco%3Aplink%3Ascholar&id=ebsco%3Agcd%3A59543341&crl=c&link_origin=scholar.google.com
- [74] MARKOWIAK, Paulina a Katarzyna ŚLIZEWSKA. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients 2017, Vol. 9, Page 1021* [online]. 2017, **9**(9), 1021 [vid. 2024-12-28]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/NU9091021
- [75] *What Are Synbiotics? Benefits, Dosage, Side Effects, Supplement - Dr. Axe* [online]. [vid. 2024-12-28]. Dostupné z: https://draxe.com/nutrition/synbiotics-supplements/?utm_source=chatgpt.com
- [76] KASATPIBAL, Nongyao, Joanne D WHITNEY, Surasak SAOKAEW, Kirati KENGKLA, Margaret M HEITKEMPER a Anucha APISARNTHANARAK. Effectiveness of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotic Therapies in Reducing Postoperative Complications: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases Reducing Postoperative Complications • CID* [online]. 2017, **2017**(S2), 153–60 [vid. 2024-12-28]. Dostupné z: doi:10.1093/cid/cix114
- [77] RISCH, Sara J. Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients [online]. 1995 [vid. 2025-04-18]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [78] GIBBS, Bernard F., Selim KERMASHA, Intez ALLI a Catherine N. MULLIGAN. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and*

- Nutrition* [online]. 1999, **50**(3), 213–224 [vid. 2025-04-18]. ISSN 09637486. Dostupné z: doi:10.1080/096374899101256
- [79] MARTÍN, María José, Federico LARA-VILLOSLADA, María Adolfiná RUIZ a María Encarnación MORALES. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [online]. 2015, **27**, 15–25 [vid. 2025-04-18]. ISSN 1466-8564. Dostupné z: doi:10.1016/J.IFSET.2014.09.010
- [80] SHISHIR, Mohammad Rezaul Islam a Wei CHEN. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2017, **65**, 49–67 [vid. 2025-04-18]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: doi:10.1016/J.TIFS.2017.05.006
- [81] DANTAS, Adriana, Diogo Pontes COSTA, Xavier FELIPE a Pere GOU. Innovations in spray drying technology for liquid food processing: Design, mechanisms, and potential for application. *Applied Food Research* [online]. 2024, **4**(1), 100382 [vid. 2025-04-18]. ISSN 2772-5022. Dostupné z: doi:10.1016/J.AFRES.2023.100382
- [82] RAJAM, R. a Parthasarathi SUBRAMANIAN. Encapsulation of probiotics: past, present and future. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences 2022 11:1* [online]. 2022, **11**(1), 1–18 [vid. 2025-04-18]. ISSN 2314-8543. Dostupné z: doi:10.1186/S43088-022-00228-W
- [83] CHENG, Wen Long, Wei Wei ZHANG, Hua CHEN a Lei HU. Spray cooling and flash evaporation cooling: The current development and application. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2016, **55**, 614–628 [vid. 2025-04-18]. ISSN 1364-0321. Dostupné z: doi:10.1016/J.RSER.2015.11.014
- [84] JENNINGS INFORMA, TholllaS A a New YORK LONDON. Lyophilization : Introduction and Basic Principles [online]. 1999 [vid. 2025-04-18]. Dostupné z: doi:10.1201/B14424
- [85] WANG, Wei. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2000, **203**(1–2), 1–60 [vid. 2025-04-18]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(00)00423-3
- [86] KAWASAKI, Hidenori, Toshinori SHIMANOUCI a Yukitaka KIMURA. Recent Development of Optimization of Lyophilization Process. *Journal of Chemistry* [online]. 2019, **2019**(1), 9502856 [vid. 2025-04-18]. ISSN 2090-9071. Dostupné z: doi:10.1155/2019/9502856
- [87] YI, Zuxin, Mei YANG a Baolin LIU. Stabilization of Labile Active Ingredients in an Oil-Water Emulsion Cosmetics by Freeze-Drying. *Cryoletters* [online]. 2023, **44**(2), 76–79 [vid. 2025-04-18]. ISSN 01432044. Dostupné z: doi:10.54680/FR23210110312
- [88] Encapsulator B-390 The valued bead and capsule producer User friendly [online]. nedatováno [vid. 2025-04-18]. Dostupné z: www.buchi.com/encapsulation
- [89] SATHYABAMA, S., M. RANJITH KUMAR, P. BRUNTHA DEVI, R. VIJAYABHARATHI a V. BRINDHA PRIYADHARISINI. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated

- gastric environment. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2014, **57**(1), 419–425 [vid. 2025-04-19]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: doi:10.1016/J.LWT.2013.12.024
- [90] ALBOOFETILEH, Mehdi, Samira JEDDI a Mehdi ABDOLLAHI. Sequential recovery of alginate from fucoidan extraction by-products of *Nizamuddinia zanardinii* seaweed using green extraction methods. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2025, **117**, 107343 [vid. 2025-04-19]. ISSN 1350-4177. Dostupné z: doi:10.1016/J.ULTSONCH.2025.107343
- [91] VELIŠEK, J., HAJŠLOVA, J. *Chemie potravin I. Vyd. 3. Tabor: OSSIS, 2009, 580 s. ISBN 978-80-86659-15-2.* nedatováno.
- [92] LEMBRE, Pierre, Cécile LORENTZ, Patrick Di MARTINO, Pierre LEMBRE, Cécile LORENTZ a Patrick Di MARTINO. Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World. *The Complex World of Polysaccharides* [online]. 2012 [vid. 2025-04-19]. Dostupné z: doi:10.5772/51213
- [93] EVA VAVŘÍKOVÁ A JARMILA VINŠOVÁ. nedatováno.
- [94] DE ALVARENGA, Elson Santiago. Characterization and Properties of Chitosan. *Biotechnology of Biopolymers* [online]. 2011 [vid. 2025-04-19]. Dostupné z: doi:10.5772/17020
- [95] ISLAM, S., M. A. Rahman BHUIYAN a M. N. ISLAM. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *Journal of Polymers and the Environment* 2016 25:3 [online]. 2016, **25**(3), 854–866 [vid. 2025-04-19]. ISSN 1572-8900. Dostupné z: doi:10.1007/S10924-016-0865-5
- [96] *Přírodní probiotika v potravinách: 8 nejlepších zdrojů | Aktin* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: <https://aktin.cz/prirodni-probiotika-8-nejlepsich-zdroju-v-potravinach>
- [97] *Ormus Super Greens BIO natural, prášek, Sunwarrior - Vitalvibe* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: <https://www.vitalvibe.eu/cs/zelene-potraviny/807-ormus-super-greens-bio-natural-prasek.html>
- [98] *Garden of Life RAW Organic Probiotika pro děti na podporu zažívání, s příchutí banánu 96g* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: <https://naturapura.cz/doplňky-stravy/1414-garden-of-life-raw-organic-probiotika-pro-deti-na-podporu-zazivani-s-prichuti-bananu-96g.html>
- [99] *Fenomén M®* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: https://magu.co/cs/shop/m?gad_source=1&gbraid=0AAAAAC50i9wmgcUsRJnyy5xV1CbxW6Q_q&gclid=CjwKCAjwwe2_BhBEEiwAM1I7sQ18FWLW7w57VRrQSPMciH1VoILf-BNtcL1O-NOR6-6nNKgxNIY7LhoC4A0QAvD_BwE&invitation=b4a6e1c0-b2aa-42cc-3530-08db92878d34
- [100] *Kombucha – Citronová tráva | Wild & Coco CZ* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: <https://www.wildandcoco.com/kombucha-citronova-trava-330ml>
- [101] *Vilgain Miso BIO – 230 g | Aktin* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: <https://aktin.cz/vilgain-miso-bio/230-g-42354?gQT=1>
- [102] *Kvašená zelenina je zážrak plný probiotik a vitamínů | Ferwer* [online]. [vid. 2025-04-13]. Dostupné z: <https://www.ferwer.cz/blog/kvasena-zelenina>

- [103] MURCIA, M. Antonia, Antonia M. JIMÉNEZ-MONREAL, Julia GONZALEZ a Magdalena MARTÍNEZ-TOMÉ. Spinach. *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables* [online]. 2020, 181–195 [vid. 2025-05-19]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-812780-3.00011-8
- [104] VARSHNEY, Khyati a Kirti MISHRA. An Analysis of Health Benefits of Beetroot. *International Journal of Innovative Research in Engineering & Management* [online]. 2022, 207–210 [vid. 2025-05-19]. Dostupné z: doi:10.55524/IJIREM.2022.9.1.39
- [105] POMARES-VICIANA, Teresa, Damián MARTÍNEZ-VALDIVIESO, Rafael FONT, Pedro GÓMEZ a Mercedes DEL RÍO-CELESTINO. Characterisation and prediction of carbohydrate content in zucchini fruit using near infrared spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2018, **98**(5), 1703–1711 [vid. 2025-05-19]. ISSN 10970010. Dostupné z: doi:10.1002/JSFA.8642;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:10970010;WGROU: STRING:PUBLICATION
- [106] BARANSKI, Rafal, Charlotte ALLENDER a Magdalena KLIMEK-CHODACKA. Towards better tasting and more nutritious carrots: Carotenoid and sugar content variation in carrot genetic resources. *Food Research International* [online]. 2012, **47**(2), 182–187 [vid. 2025-05-19]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: doi:10.1016/J.FOODRES.2011.05.006
- [107] YAN, Jun, Xiaofeng YANG, Lizhong HE, Zhiwu HUANG, Mingfen ZHU, Linhua FAN, Han LI, Lingyun WU, Li YU a Weimin ZHU. Comprehensive Quality and Bioactive Constituent Analysis of Celery Juice Made from Different Cultivars. *Foods* [online]. 2022, **11**(18), 2719 [vid. 2025-05-19]. ISSN 23048158. Dostupné z: doi:10.3390/FOODS11182719/S1

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

μ RIU·min	jednotka plochy píku
A	absorbance, plocha píku
BB	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
c	koncentrace
CCM	Czech Collection of Microorganisms
CFU	Colony Forming Units (Kolonii Tvořící Jednotka)
EC	<i>Escherichia coli</i>
FAO/WHO	Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization)
FOS	fruktooligosacharidy
GOS	galaktooligosacharidy
GRAS	Generally Recognised As Safe (všeobecně považované za bezpečné)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Hz	hertz
LA	<i>Lactobacillus asidophilus</i>
ML	<i>Micrococcus luteus</i>
ORAC	kapacita absorpce kyslíkových radikálů
RoHy	Registr hlavního hygienika
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem