



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## PROBIOTIKA PRO DĚTSKOU VÝŽIVU

PROBIOTICS FOR CHILDREN'S NUTRITION

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Martina Pokorná

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2019

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1310/2018  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Martina Pokorná**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**  
Akademický rok: 2018/19

### Název diplomové práce:

Probiotika pro dětskou výživu

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Kultivace vybraných kmenů probiotických bakterií a ověření zachování jejich viability při průchodu trávicím traktem
- 2) Výběr vhodné probiotické směsi do dětských přípravků a zvýšení její odolnosti enkapsulací a lyofilizací
- 3) Návrh optimálního složení dětských doplňků stravy s obsahem probiotických bakterií

### Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

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

-----  
Bc. Martina Pokorná  
student(ka)

-----  
Ing. Petra Matoušková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá studiem probiotických bakterií, a to se zaměřením na dětskou výživu. Navrhuje probiotický doplněk stravy s optimalizovanou probiotickou směsí složenou z kmenu z rodu *Lactobacillus* a především z rodu *Bifidobacterium*, která by byla nejvhodnější pro dětské spotřebitele.

Teoretická část práce se zaměřuje na charakterizaci probiotických bakterií, složení dětského traktu a na screeningu probiotických a želatinových doplňků stravy již uvedených na trhu. V experimentální části práce pak byly probiotické bakterie podrobeny modelovému trávení, kdy na základě výsledků byly vytvořeny vhodné směsi z kmenů, které měly nejnižší snížení viability po trávení. Jako nejvhodnější směs byla zvolena směs o složení *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>, *Bifidobacterium longum* CCM 4990 a *Lactobacillus casei* CCM 4798. Následná optimalizovaná metoda PCR v reálném čase navíc prokázala přítomnost všech kmenů přidaných do směsi i po modelovém trávení.

Na závěr byl ze zjištěných údajů navržen probiotický doplněk stravy ve formě alginát-agarového medvídku pro děti od tří let, který byl podroben senzoričké analýze. Navržený probiotický přípravek byl navíc obohacen o další výživové složky, produkt tak obsahuje aktivní látky obsažené v Chlorelle a Spirulině a vyšší obsah omega 3 a 6 mastných kyselin z konopného oleje.

Klíčová slova: probiotika, rod *Bifidobacterium*, dětské doplňky stravy, PCR v reálném čase

## Abstract

This Diploma thesis deals with probiotic bacterias for children nutrition. It proposes a probiotic food supplement with a probiotic blend composed of a strain of the genus *Lactobacillus* and of the genus *Bifidobacterium*, which would be most suitable for infant consumers.

The theoretical part is focused on probiotics, constitution of the children's gastrointestinal tract and screening of probiotic and gelatine supplements which are already sold on the market. In the experimental part, probiotic bacteria were subjected to model digestion, whereby mixtures of strains having the lowest reduction in viability after digestion were blend based on the results. The blend of *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>, *Bifidobacterium longum* CCM 4990 and *Lactobacillus casei* CCM 4798 was chosen as the most suitable blend of the lowest viability reduction. PCR in real time was demonstrated the presence of all strains added to the blend after model digestion.

Finally, from the data was suggested a more comprehensive probiotic food supplement in the form of an alginate-agar gummy-bear for children over three years of age. The probiotic food supplement was subjected to sensory analysis too. The proposed probiotic food supplement also contained Chlorella and Spirulina active compounds and higher content of omega 3 and 6 fatty acids in hemp oil.

**Keywords:** probiotics, *Bifidobacterium*, food supplements for children, PCR in real time

POKORNÁ, Martina. *Probiotika pro dětskou výživu* [online]. Brno, 2019. [cit. 2019-05-06]. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113487>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ing. Petra Matoušková, PhD.

#### PROHLÁŠENÍ:

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

.....  
podpis studenta

#### PODĚKOVÁNÍ:

*Ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odborné vedení, všestrannou pomoc při řešení problémů a cenné rady, své konzultantce Ing. Julii Hoové a Ing. Denise Romanovské za celkovou pomoc při experimentální části. Dále děkuji prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za umožnění pracovat s jejím skvělým týmem lidí. V neposlední řadě děkuji své rodině za celkovou podporu během studia a při zpracování diplomové práce.*

1	ÚVOD .....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1	Probiotické bakterie .....	10
2.2	Historie probiotik a jejich definice .....	11
2.3	Složení mikroflóry trávicího traktu .....	12
2.4	Mikroflóra u dětí .....	14
2.5	Nejčastěji využívané probiotické bakterie .....	15
2.5.1	Rod <i>Lactobacillus</i> .....	15
2.5.2	Rod <i>Bifidobacterium</i> .....	16
2.6	Prebiotika .....	17
2.7	Doplňky stravy pro děti .....	18
2.7.1	Probiotické doplňky dostupné na českém trhu .....	19
2.7.1.1	PROBIO-FIX 60 želatinových tobolek .....	19
2.7.1.2	BEBA OPTIPRO Comfort 2 .....	19
2.7.1.3	Walmark Biopron LAKTOBACILY Baby BiFi+ .....	19
2.7.2	Želatinové doplňky stravy bez probiotik dostupné na českém trhu .....	20
2.7.2.1	Mart'ánci Gummy .....	20
2.7.2.2	Dr.Max Kids Gummies AIRPLANES .....	21
2.7.2.3	Vibovit FARMA želé multivitaminy .....	21
2.8	Metody analýzy .....	22
2.8.1	Polymerázová řetězová reakce .....	22
2.8.2	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase .....	24
2.8.2.1	Průběh reakce, složení směsi qPCR a detekce produktu reakce ..	24
2.8.2.2	Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) .....	24
2.8.3	Enkapsulace .....	25
2.8.3.1	Enkapsulátor .....	25
2.8.4	Lyofilizace .....	26
2.8.5	Chromatografie .....	26
2.8.5.1	Plynová chromatografie .....	27
2.8.5.2	Kapalinová chromatografie .....	27
3	CÍLE PRÁCE .....	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	29
4.1	Použité chemikálie .....	29
4.2	Použité přístroje a pomůcky .....	29
4.3	Roztoky pro PCR .....	30
4.4	Použité mikroorganismy .....	30
4.5	Použité materiály .....	30

4.6	Metodické postupy.....	31
4.6.1	Kultivace probiotických bakterií.....	31
4.6.2	Modelové trávicí šťávy .....	31
4.6.2.1	Složení modelové žaludeční šťávy .....	31
4.6.2.2	Složení modelové pankreatické šťávy .....	31
4.6.2.3	Složení modelové žlučové šťávy.....	31
4.6.3	Stanovení počtu buněk pomocí zákalu .....	31
4.6.3.1	Kalibrační křivka .....	31
4.6.3.2	Růstová křivka.....	32
4.6.3.3	Stanovení jednotlivých kmenů a směsí .....	32
4.6.3.4	Vliv řas a sinic na viabilitu probiotických bakterií .....	32
4.6.4	Nepřímé stanovení počtu buněk kultivační metodou.....	32
4.6.5	Příprava hrubých lyzátů bakteriálních buněk .....	32
4.6.6	Izolace DNA fenolovou extrakcí .....	33
4.6.7	Přesrážení DNA ethanolem.....	33
4.6.8	Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky.....	33
4.6.9	Provedení polymerázových řetězových reakcí .....	34
4.6.9.1	Primery pro PCR .....	34
4.6.9.2	Příprava směsí pro PCR .....	35
4.6.9.3	Programy amplifikace DNA.....	35
4.6.10	Detekce produktů PCR agarosovou gelovou elektroforézou.....	36
4.6.11	Enkapsulace .....	37
4.6.11.1	Příprava alginátových částic s konopným olejem/probiotikem ..	37
4.6.12	Specifikace konopného oleje, Chlorelly a Spiruliny v doplňku stravy.....	38
4.6.12.1	Stanovení celkových polyfenolů .....	38
4.6.12.2	Kvantifikace lipidů pomocí plynové chromatografie.....	38
4.6.13	Senzorická analýza.....	38
4.6.13.1	Senzorické hodnocení.....	38
4.6.13.2	Analyzované vzorky .....	38
4.6.13.3	Metody využití při senzorickém hodnocení.....	39
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	40
5.1	Kalibrační závislost .....	40
5.2	Rod <i>Lactobacillus</i> .....	41
5.2.1	Růstové křivky .....	41
5.2.2	Modelové trávení jednotlivých kmenů .....	44
5.3	Rod <i>Bifidobacterium</i> .....	45
5.3.1	Růstové křivky .....	45
5.3.2	Modelové trávení jednotlivých kmenů .....	47
5.4	Modelové trávení směsí kmenů rodu <i>Lactobacillus</i> a <i>Bifidobacterium</i> .....	49
5.5	Vliv enkapsulace a lyofilizace na viabilitu probiotických bakterií .....	52
5.6	Vliv řas a sinic na viabilitu probiotických bakterií.....	53

5.7	Stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA spektrofotometricky .....	55
5.8	PCR v reálném čase .....	55
5.8.1	Prokázání přítomnosti DNA domény <i>Bacteria</i> metodou PCR .....	55
5.8.2	Prokázání přítomnosti DNA rodu <i>Lactobacillus</i> metodou PCR.....	61
5.8.3	Prokázání přítomnosti DNA rodu <i>Bifidobacterium</i> metodou PCR.....	65
5.8.4	Druhově specifická PCR pro druh <i>Bifidobacterium breve</i> .....	69
5.8.5	Druhově specifická PCR pro druh <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	73
5.8.6	Druhově specifická PCR pro druh <i>Bifidobacterium longum</i> .....	76
5.9	Charakterizace Chlorelly, Spiruliny a konopného oleje .....	79
5.9.1	Stanovení celkových polyfenolů.....	79
5.9.2	Stanovení obsahu mastných kyselin u konopného oleje pomocí GC .....	79
5.10	Senzorická analýza .....	80
5.11	Návrh vlastního probiotického produktu .....	85
6	ZÁVĚR .....	87
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	89
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	94
8.1	Použité jednotky .....	94
8.2	Zkratky.....	94
9	PŘÍLOHY .....	95



# 1 ÚVOD

Potravinové doplňky v dnešní době jsou již plně užívány dospělými, tak i dětmi. Probiotických produktů určených pro děti je na trhu čím dál tím víc. Tyto produkty jsou složeny hlavně z probiotických bakterií a oligosacharidů. Hlavní funkcí těchto produktů je osídlit oslabenou střevní mikroflóru těmito prospěšnými bakteriemi, a tím obnovit její rovnováhu. Jsou určeny tedy hlavně pro děti, které nemají tuto mikroflóru ve správné rovnováze, kdy k tomu nejčastěji dochází nerozením císařským řezem či nekojením dítěte mateřským mlékem, protože jak ve vaginálních cestách matky, tak i v mateřském mléce se vyskytují významné probiotické bakterie. Jedná se hlavně o bakterie rodu *Bifidobacterium*. Tyto bakterie jsou ovšem náchylné na změny pH prostředí, tudíž je o nich všeobecně známo, že jejich viabilita je při průchodu trávicím traktem více snížena než např. u bakterií z rodu *Lactobacillus*.

Oproti dospělým spotřebitelům, musíme u dětí řešit formu, jakou jsou tyto bakterie dětem podávány. Malé děti tobolku s probiotickými bakteriemi, která je chrání před žaludečními šťávami, nejsou totiž schopni spolknout. U malých dětí se tedy doporučuje obsah této tobolky vysypat, v tomto případě ovšem není zjištěno, zda bakterie z tobolky přežijí průchod trávicím traktem, tak aby nedošlo k razantnímu snížení jejich viability.

Dalším problémem je, že děti obecně nemají moc rády užívání jakýchkoliv léků. Jsou pro ně nevhledné a chuťově ne moc dobré až chuťově nepřijatelné (odporné).

Předložená diplomová práce se zabývá hledáním směsi složené hlavně z bakterií rodu *Bifidobacterium*, která nebude mít, i bez použití enkapsulace, razantně sníženou viabilitu po průchodu trávicím traktem. Následně se zabývá návrhem více komplexního probiotického doplňku stravy, který bude obohacen o další výživově hodnotné látky, a nejen o probiotické bakterie a oligosacharidy. Při hledání je brán v potaz i vzhled potravinového doplňku a jeho celková chuť.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Probiotické bakterie

Probiotika definuje Organizace pro výživu a zemědělství a Světovou zdravotnickou organizací (FAO/WHO) jako živé organismy, které jsou v přiměřeném množství pro člověka zdraví prospěšné. Jsou to nepatogenní mikroorganismy, které při požití osidlují střevo, zlepšují jeho mikrobiální rovnováhu a působí prospěšně pro zdraví a fyziologické pochody hostitele [1][2].

Probiotika dosud v USA a ani v EU nemají platný status léčiv či zdravotní tvrzení. Výroba probiotik se proto řídí předpisy pro potraviny. V České republice je používání probiotik vymezeno Vyhláškou č. 446/2004 Sb. [3], kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin potravními doplňky. Množství a druh mikroorganismů obsažených v mléčných výrobcích vymezuje Vyhláška č. 77/2003 Sb.[4]. Mezi probiotika patří laktobacily, bifidobakterie, streptokoky, enterokoky a saccharomyces [2].

Tabulka 1: Nejčastěji používaná probiotika[2][5]

Lactobacily	Bifidobakterie	Jiné bakterie mléčného kvašení	Jiné
<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>L. acidophilus</i></li><li>• <i>L. amylovorus</i></li><li>• <i>L. brevis</i></li><li>• <i>L. casei</i></li><li>• <i>L. cellobiosus</i></li><li>• <i>L. crispatus</i></li><li>• <i>L. curvatus</i></li><li>• <i>L. delbrueckii</i></li><li>• <i>L. fermentum</i></li><li>• <i>L. gasseri</i></li><li>• <i>L. rhamnosus</i></li><li>• <i>L. johnsonii</i></li><li>• <i>L. paracasei</i></li><li>• <i>L. plantarum</i></li><li>• <i>L. reuteri</i></li><li>• <i>L. rhamnosus</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>B. adolescentis</i></li><li>• <i>B. animalis</i></li><li>• <i>B. bifidum</i></li><li>• <i>B. breve</i></li><li>• <i>B. infantis</i></li><li>• <i>B. lactis</i></li><li>• <i>B. longum</i></li><li>• <i>B. thermophilum</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Enterococcus faecium</i></li><li>• <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremonis</i></li><li>• <i>Leuconostoc mesenteroides</i></li><li>• <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i></li><li>• <i>Streptococcus diacetylactis</i></li><li>• <i>Streptococcus intermedius</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>E. coli</i> (sérotyp O83:K24:H1; <i>Nissle</i>)</li><li>• <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li><li>• <i>Saccharomyces boulardii</i></li></ul>

Výběr probiotik je přísný a probiotika musí splňovat spoustu podmínek. Musí mít prokazatelně pozitivní vliv na člověka. Nesmí být patogenní, toxické a zdravotně závadné. Testy patogenity se prokazují *in vitro* testy. Těmito testy se dále testuje rezistence na žaludeční kyseliny a žluč, adherence na střevní buňky a produkce specifických metabolitů. Až po všech těchto testech dochází k výrobě probiotických potravin. Důležité je zohlednit i technologické vlastnosti, určují se podmínky skladování a koncentrace živých buněk v potravině či v potravním doplňku. V případě fermentovaných mléčných, probiotických výrobků se za účinný obsah považuje  $10^6$  životaschopných buněk v gramu výrobku [6][7][8].

Tabulka 2 : Nejdůležitější charakteristika probiotik [9]

Prospěšnost pro zdraví
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schopnost kolonizace a adherence</li> <li>• Antagonistický vliv na patogenní flóru</li> <li>• Schopnost tvorby antimikrobiálních substancí</li> <li>• Schopnost imunomodulace</li> <li>• Měřitelná a klinicky dokumentovatelná užitečnost pro zdraví příjemce</li> </ul>
Mikrobiologické bezpečnostní požadavky
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Možnost přesného taxonomického zařazení</li> <li>• Humánní původ</li> <li>• Netoxické a nepatogenní geneticky stabilní</li> <li>• Schopnost přežívat, růst a být metabolicky aktivní v trávicím ústrojí příjemce</li> <li>• Potencionálně resistantní proti antimikrobiálním substancím původní mikroflóry příjemce</li> <li>• Resistentní proti žaludeční kyselině a žlučovým kyselinám</li> </ul>
Průmyslové parametry
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stabilita žádaných vlastností během výroby, transportu a skladování</li> <li>• Příznivé organoleptické vlastnosti</li> </ul>

## 2.2 Historie probiotik a jejich definice

Začátkem 20. století předložil ruský vědec, pracovník Pasteurova ústavu a nositel Nobelovy ceny I. I. Mečnikov. Jako první upozornil na probiotickou léčbu, kdy tvrdil, že konzumace fermentovaných mléčných výrobků zlepšuje zdravotní stav. Stárnutí dal do souvislosti s chemickou intoxikací mikrobiální flórou tlustého střeva. Toto vše vyzoroval ze způsobu života bulharských venkovanů. Navrhnul výměnu proteolytických mikrobů produkujících toxické látky (včetně fenolu, indolu a amoniaku po trávení proteinů) za jiné mikroorganismy. Vyvinul dietu za použití mléka fermentovaného bakteriemi, které pojmenoval „*Bulgarian bacillus*“. Ve stejné době Henry Tissier poukázal na význam bifidobakterií. Vyzoroval významné rozdíly u fekální mikroflóry kojenců a nekojených dětí, kdy kojenci trpěli méně častými průjmy než nekojení, uměle živění novorozenci. Navrhnul, aby bifidobakterie byly uměle podávány dětem postiženým průjmem, aby jim tak bylo obnoveno rovnovážné složení střevní mikroflóry [10][11][12].

Za významného badatele problematiky mikroflóry trávicího traktu je považován i Alfred Nišle, který roku 1917 publikoval svou práci, která vedla k patentu na nepatogenní kmen *Escherichia coli*, který má inhibiční vliv na růst jiných mikrobů. Bakterie byla pojmenována podle svého objevitele a roku svého popsání. Lyofilizovaná biomasa *Escherichia coli* kmene Nišle 1917, sérotypu O6:K5:H1, se v klinické praxi používá jako probiotikum pod názvem Mutaflor. Tento kmen izoloval ze stolice vojáka, který jako jediný odolával infekci úplavice [13][14].

Termín probiotika poprvé použili Lilly a Stilwell v roce 1965. Ti definovali probiotika jako faktory, které jsou produkovány mikroorganismy a mají příznivý účinek na podporu růstu zvířat. Zvířata, která jsou živena zakysanými mléčnými výrobky obsahujícími tyto faktory, byly celkově zdravější a lépe rostla. 1974 Parker probiotikum charakterizoval jako organismy a substance, jež přispívají k mikrobiální rovnováze ve střevech. Jako substance byly zahrnuty i mikrobiální metabolity, enzymy, aminokyseliny apod. Podle této definice však mezi probiotika zapadala i některá antibiotika. Ovšem při překlada pojmu

probiotikum znamená „pro život“, získáváme pravý opak významu slova antibiotikum. Antibiotikum lze totiž definovat jako látku, která působí proti bakteriím [15][16][17].

První definici platnou ve svém smyslu a platící do dnes formuloval roku 1991 R. Fuller. Definoval, že probiotika jsou živé mikrobiální doplňky stravy, které příznivě ovlivňují zdraví člověka zlepšením jeho střevní mikroflóry. Dává tedy důraz na použití živých buněk mikroorganismů. Havenaar a Huis in't Veld roku 1992 označovali probiotika za životaschopnou mono či směnou kulturu bakteriálních buněk, která při aplikaci zvířeti či člověku pozitivně ovlivňuje jeho střevní mikroflóru [18][19].

Michael de Vrese roku 1996 probiotikem rozuměl přípravek nebo výrobek, který obsahuje živé, definované mikroorganismy, které v dostatečném množství jsou schopny změnit mikroflóru hostitele a vyvolají příznivý zdravotní efekt [20].

V současné době je všeobecně přijímána definice, že probiotikum je mikrobiální součást potravy, která při konzumaci dostatečného množství vykazuje příznivé účinky na zdraví konzumenta. Konečná definice ovšem nebyla potvrzena a stále se vyvíjí a neustále dochází k jejím obměnám [1].

### 2.3 Složení mikroflóry trávicího traktu

Normální fyziologická mikroflóra je definována jako soubor mikroorganismů, které mohou být přítomny v gastrointestinálním traktu (GIT) zdravého člověka. Je velmi důležité rozlišovat patogenní mikroflóru mikroorganismů, jenž v tomto prostředí za fyziologických okolností nesmí být přítomna [12].

V ústech je nejčastější komponentou zubního plaku bakterie *Streptococcus metans*. Pod okrajem zubní sliznice, a i v nosohrtanu můžeme nalézt velmi početnou anaerobní flóru nesporelujících druhů (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichie*, *Wollinela*, *Veillonela*, *Aktinomycety*, *Bifidobacterie*, *Eubacterium*, *Arachnie*, *Treponema*) [12].

V jícnu se, patrně velmi rychlou pasáží obsahu do žaludku, obvykle normální flóra neprokazuje. Výskyt bakterií v žaludečním obsahu účinně omezuje působení pepsinu a kyseliny chlorovodíkové. Není ovšem pochyb, že celá řada bakteriálních druhů může žaludkem projít do dalších částí zažívacího traktu (např. acidoresistentní bakterie - laktobacily, enterokoky či kandidy a plísně). Dále také přežívají druhy, které svým metabolismem neutralizují kyselé prostředí [12][21][22][23].

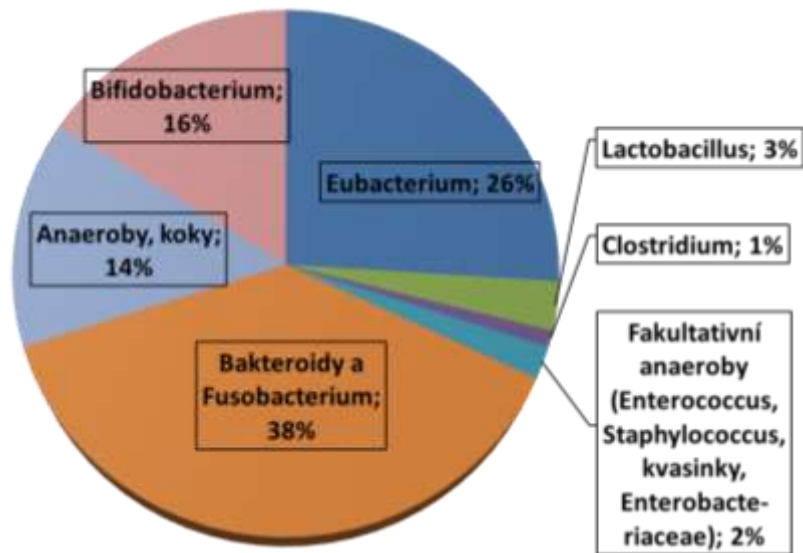
Distálním směrem přibývá bakteriálního osídlení. Způsobem výživy (vegetariáni), podle geografických oblastí (tropy) apod. se dá ovlivnit osídlení střeva, je proto u každého odlišné. Množství bakterií je ovlivněno aciditou žaludku, pohyblivostí střeva, kdy jejich snížení je spojeno se zvýšením množství bakterií. Pro nepatogenní mikroby jsou žlučové soli toxické, neboť na ně působí jako „čistič“. Běžné střevní mikroby jako enterobakterie a enterokoky jsou na žlučové soli „zvyklé“, a proto se s nimi v nepatrných počtech setkáváme již v dvanáctníku. Pro salmonely je ovšem žluč výborným selektivním kultivačním prostředím. Vlivem kyseliny žaludeční, žlučových solí a rychlé peristaltiky je v tenkém střevu bakterií relativně málo. Nelze ovšem říci, že je sterilní [12][21][22][23].

Naproti tomu obsah tlustého střeva je alespoň z poloviny představován bakteriemi. V jednom gramu stolice je přítomno asi  $10^{12}$  bakterií, kdy bylo identifikováno více než 400 druhů, které je možno považovat za normální flóru tlustého střeva. Z tohoto množství více než 95 % tvoří bakterie striktně anaerobních druhů *Bacteroides*, *Bifidobacterium*,

*Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* a *Clostridium*. Z ostatních druhů při aerobní kultivaci pravidelně prokazovány enterobakterie, především *Escherichia coli*. Jiné druhy gramnegativních tyčinek jsou kvantitativně zastoupeny a prokazují se až ve chvíli, kdy byla zejména podáním antibiotik rovnováha porušena, jsou tedy při výraznějším zastoupení dokladem dysmikrobie (*Morganella*, *Providentia*, *Proteus*, *Pseudomonas*). V trávicím systému se postupně zvětšuje poměr anaerobních mikroorganismů vůči aerobním. Aeroby vychytávají volné kyslíkové radikály a tím připravují vhodné podmínky pro růst anaerobů. Tabulka 3 informuje jaké mikroorganismy a v jakém počtu jsou zastoupeny v částech trávicího traktu. Obrázek 1 znázorňuje procentuální zastoupení jednotlivých mikroorganismů v tlustém střevě [12][21][22][23].

Tabulka 3: Kvantitativní rozložení a kvalitativní zastoupení MO v trávicím traktu [12]

Oddíl	Kvantitativní rozložení	Kvalitativní zástupci
Žaludek a dvanáctník	$10^1-10^3$ / ml mikroorganismů	laktobacily, streptokoky, kvasinky
Lačník a kyčelník	$10^4-10^8$ / ml mikroorganismů	laktobacily, koliformní bakterie, streptokoky, bakteroidy, bifidobakterie, fusobakterie
Tračník	$10^{10}-10^{12}$ / ml mikroorganismů	bakteroidy, bifidobakterie, streptokoky, eubakterie, fusobakterie, koliformní bakterie, klostridia, veillonely, laktobacily, proteus, stafylokoky, pseudomonády, kvasinky



Obrázek 1: Složení mikroflóry v tlustém střevě člověka [24]

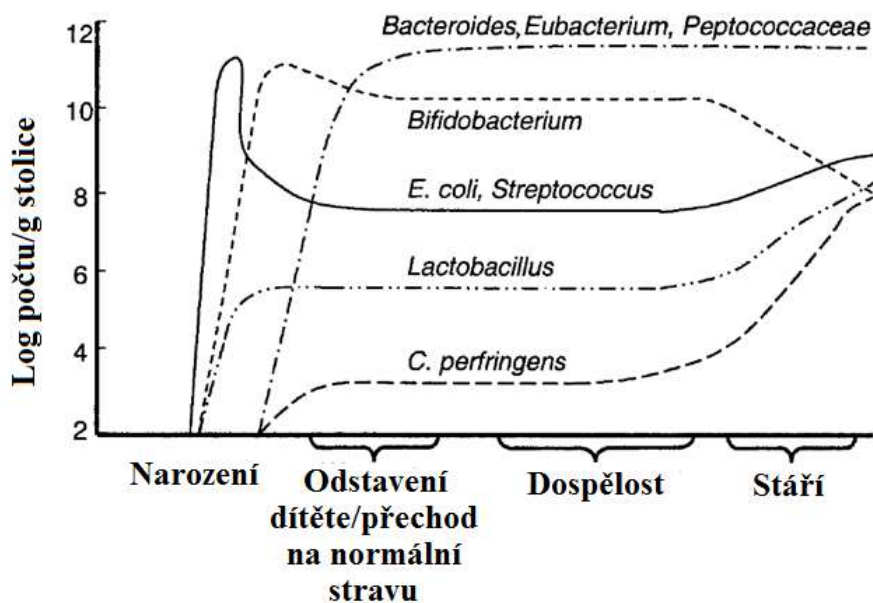
## 2.4 Mikroflóra u dětí

Střeva novorozenců jsou před narozením zcela sterilní, neobsahují žádné mikroorganismy. Krátce po narození dochází ke kolonizaci celé řady bakterií, jedná se převážně o fakultativně anaerobní a striktně anaerobní mikroorganismy. To, jak bude střevní mikroflóra složena, závisí na několika faktorech [25].

Jedním z hlavních faktorů je, zda přišlo dítě na svět přirozenou cestou nebo císařským řezem. Dalším důležitým faktorem je způsob výživy, tedy zda je dítě od začátku krmeno mateřským mlékem nebo umělou výživou [25].

Dítě, které přišlo na svět přirozenou cestou, se při průchodu vaginální cestou matky setkává s její mikroflórou. Nejdříve jsou střeva osídleny aerobními, fekálními mikroorganismy z rodu *Enterobacter*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*, které mají původ v mateřské vaginální a fekální bakteriální flóře a spotřebovávají kyslík a tím vytvářejí vhodné prostředí pro mikroorganismy z mateřského mléka, tedy anaerobní bakterie. Děti narozené císařským řezem začínají svůj život s úplně bakteriologicky čistým stavem, protože nepřichází do styku s vaginální mikroflórou matky. Tyto děti získávají hlavně mikroaerofilní mikroorganismy a fakultativně-anaerobní mikroorganismy z pokožky matky nebo z rukou nemocničních pracovníků, jako je třeba bakteriální kmen *Clostridium*. Ve srovnání s přirozeným porodem je jejich počet mnohonásobně nižší. Takto narozené děti bývají také častěji ihned po porodu hospitalizovány a jsou tak vystaveny poměrně sterilnímu prostředí. Tím, že miminka jsou hospitalizována v poměrně sterilním prostředí, dochází k opoždění kolonizace laktobacily a ostatními prospěšnými bakteriemi [25][26][27][27].

U dětí, které jsou krmené mateřským mlékem, je prokázán vyšší počet střevních bakterií než u dětí krmených umělou mléčnou výživou. Mateřské mléko matky obsahuje celou řadu nepatogenních bakterií, jako jsou *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* a *Bifidobacterium*. Díky tomu jsou bifidobakterie převládajícími bakteriemi ve střevní mikroflóře dítěte. Dále například lysozym a laktoferrin v mateřském mléce, které obsahují látky antimikrobiálního účinku, způsobují nízký růst fakultativních anaerobů. U dětí krmených umělou mléčnou výživou je vyšší zastoupení fakultativních anaerobů, bakteroidů a klostridií. Bifidobakterie u nich také převládají, ovšem nejsou zastoupeny v tak hojném počtu jako u kojených dětí. V některých případech mohou být spíše převládajícími mikroorganismy bakteroidy, koliformní bakterie nebo enterokoky [25][26][27].



Obrázek 2: Druhy bakterií ve stolici u lidí v různém věku [24]

U dětí narozených císařským řezem či nekojených, tak není osídlení střev správné a může docházet k problémům s imunitou a častou nemocností. Jsou výrazně náchylnější ke vzniku alergií, astmatu a infekčním onemocněním střevního traktu. Zde mohou probiotika, které jsou uměle podávána, pomoci a umožní vytvoření rovnováhy ve střevě a tím i napravit imunitní systém [26].

Tabulka 4: Onemocnění dětského věku, u kterých byla použita probiotika (alespoň 1 publikovaná randomizovaná kontrolovaná studie) [5]

<ul style="list-style-type: none"> <li>• průjemová onemocnění spojená s užíváním antibiotik</li> <li>• <i>H. pylori</i> infekce</li> <li>• alergie</li> <li>• idiopatické střevní záněty (idiopatické střevní záněty, idiopatická proktokolitida, Crohnova choroba)</li> <li>• nekrotizující enterokolitida</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• akutní průjemová onemocnění (virové, bakteriální)</li> <li>• prevence nozokomiálních průjmů</li> <li>• prevence infekcí horních cest dýchacích a trávicího traktu</li> <li>• syndrom dráždivého tračníku</li> <li>• funkční obstrukce</li> </ul>
--	---

## 2.5 Nejčastěji využívané probiotické bakterie

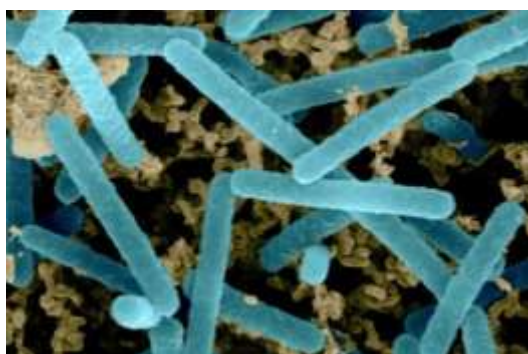
### 2.5.1 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* jsou mikroaerofilní nebo fakultativně anaerobní bakterie mléčného kvašení. Patří do skupiny pravidelných nesporulujících gram pozitivních tyčinek. Vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích nebo tvoří krátké řetězky. Fermentují glukózu a laktózu a hlavním výchozím produktem této fermentace je kyselina mléčná a v menším množství kyselina jantarová, kyselina octová, etanol a CO<sub>2</sub> [28].

Optimální teplota pro jejich růst je 15–45 °C podle druhu bakterie. Optimální hodnota pH je 4,5–6,4. Rod je poměrně náročný na živiny v médiu, kromě zmíněné laktózy a glukózy také vyžaduje aminokyseliny, nukleotidy a některé vitaminy. V přírodě je velmi rozšířen. Je

součástí lidské střevní mikroflóry, hojně se vyskytuje v trávicím traktu a v ústech u zvířat a u lidí. Déle se vyskytuje v mléce, kde vyvolává přirozené kysání, v travinách, v obilí a v půdě [28][29].

Z potravinářského a z biotechnologického hlediska je nejdůležitějším rodem. Využívají se z toho důvodu, že kyselina mléčná snižuje pH v prostředí a tím zamezuje množení hnilobných a patogenních bakterií. Bylo popsáno asi 128 druhů, ale jen několik málo kmenů je používáno jako probiotikum. Mezi homofermentativní bakterie řadíme např. druhy *Lactobacillus acidophilus* či *Lactobacillus helveticu*, mezi fakultativně hererofermentaní např. druh *Lactobacillus fermentum* a mezi obligátně heterofermentativní např. druh *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum* [30][31].



Obrázek 3: *Lactobacillus acidophilus* [32]

### 2.5.2 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* jsou striktně anaerobní heterofermentativní bakterie, které patří mezi nepravidelné, nesporulující, nepohyblivé, grampozitivní tyčinky. Některé druhy snesou přítomnost kyslíku jenom, pokud je přítomný oxid uhličitý či bifidogenní faktory. Na Petriho misce za aerobních podmínek nerostou. Tvar mají kokovitý, kyjovitý nebo tyčinkovitý. Rostou jednotlivě, v řetízkách, v hvězdicovitém nebo v palisádovém uspořádání. Někdy bývají na jednom konci rozštěpené [28].

Optimální teplota pro růst je 37–41 °C, minimum se pohybuje od 25 °C do 28 °C a maximální potom od 43 °C do 45 °C. Optimální hodnota pH se nachází v rozmezí 6,5–7. Nesnášejí velmi kyselé prostředí [28][29].

Kolonie jsou na polotuhých médiích hladké, smetanově bílé, vypuklé a měkké konzistence. Pro tento rod je charakteristická tvorba kyseliny octové a kyseliny mléčné v poměru 3:2, kdy obě kyseliny inhibují nežádoucí bakterie. Kyselina octová má oproti kyselině mléčné silnější antagonistický účinek než nevídané gramnegativní bakterie. Dále v malém množství vzniká ethanol, sukcinát a mravenčan [30][31].

Vyskytují se v dutině ústní a v trávicím traktu. Využívají se pro přípravu mléčných nápojů. U kojených dětí tvoří většinu, až 95 % střevních bakterií. U dospělých lidí je to pouze 25 %. V současnosti je definováno 38 bakteriálních druhů. Nejčastější jsou druhy *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium thermophilum* [30][31].





Obrázek 4: *Bifidobacterium longum* [33]

## 2.6 Prebiotika

Prebiotika poprvé definovali v roce 1995 Gibson a Roberfroid jako nestravitelné potravní ingredience, které příznivě ovlivňují hostitele prostřednictvím selektivní stimulace růstu a/nebo aktivity určitých bakterií v tlustém střevě. V roce 2004 navrhnul Glenn Gibson upravenou definici: „Prebiotika jsou selektivně fermentované ingredience, které umožňují specifické změny ve složení a/nebo aktivitě střevní mikroflóry, což má příznivý vliv na hostitelovo prospívání a zdravotní stav.“ V roce 2007 Marcel Roberfroid formuloval tři kritéria pro prebiotické substance:

- 1) musí to být látky rezistentní vůči žaludečním kyselinám a vůči hydrolytickým enzymům v trávicím traktu
- 2) musí být naopak fermentovatelné střevními bakteriemi za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem
- 3) musí selektivně stimulovat růst a/nebo aktivitu střevních bakterií, které mají příznivý vliv na hostitelovo prospívání a zdravotní stav. Pro prospěšné bakterie slouží jako zdroj energie a hlavně zdroj uhlíku, který podporuje jejich viabilitu.

Zdrojem prebiotik je zelenina, obiloviny, různé rostliny či ovoce. Prebiotika mohou být tedy získána z těchto přírodních zdrojů a dále také mikrobiologickou produkcí, enzymatickou syntézou nebo enzymatickou degradací polysacharidů [34][35][36].

Tabulka 5: Prebiotické sloučeniny ovlivňující střevní mikroflóru [24]

Prebiotický faktor	Původ	Stimulované mikroby	Účinky
Oligosacharidy	Cibule, česnek, kořen čekanky, lopuch, chřest, Jeruzalémský artyčok, sója, pšeničné otruby, banány	Druhy <i>Bifidobacterium</i>	Zvýšení počtu bifidobakterií, potlačení hnilobných bakterií, prevence zácpy a průjem
Frukto-oligosacharidy, inulin, oligofruktósa	Cibule, česnek, kořen čekanky, lopuch, chřest, Jeruzalémský artyčok, sója, pšeničné otruby, banány	Druhy <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Růst bifidobakterií a podpora kyselin
Fruktany	Bělící bílý prášek z hlíz Jeruzalémského artyčoku	Druhy <i>Bifidobacterium</i>	Podpora růstu bifidobakterií
Lidský kappa kasein a odvozený glykomakropeptid	Lidské mléko: chymotrypsin a hydrolyzát pepsinu	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Podpora růstu
Stachyósa a rafinósa	Výtažek ze sójových bobů	Druhy <i>Bifidobacterium</i>	Růstový faktor
Kaseinový makropeptid	Hovězí mléko	Druhy <i>Bifidobacterium</i>	Podpora růstu
Laktitol (4-O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-D-glucitol	Syntetický cukrový alkohol z laktózy	Druhy <i>Bifidobacterium</i>	Podpora růstu
Lactulosa (4-O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-D-fruktósy	Syntetický derivát druhů laktózy	Druhy <i>Bifidobacterium</i>	Podpora růstu

## 2.7 Doplnky stravy pro děti

Obecně na potravinové doplňky nejsou kladeny tak velké nároky jako na léky. V ČR je výrobce či dovozce povinen oznámit Ministerstvu zemědělství uvedení potravinového doplňku na trh. Není zde nutné přikládat výsledky jakýchkoliv testů či kontrol o nezávadnosti. Existuje pouze tzv. postmarketingová kontrola od Státní zemědělské a potravinářské inspekce. Česká pediatrická společnost se vyjadřuje k výrobkům určených pro děti do 3 let. Pouze malá část výrobců či dovozců nechává své výrobky schválit Státnímu zdravotnímu ústavu.

V posledních letech se velice rozmohlo podávat potravinové doplňky kojencům a dětem. Pomocí statistiky bylo prokázáno, že v USA více než 30 % dětí pravidelně konzumuje potravinové doplňky. Nejčastěji se jedná o multivitaminy a přípravky s minerálními látkami. Důvodem konzumace potravinových doplňků dětmi jsou k:

- zlepšení celkového zdraví – 41 %
- udržení celkového zdraví – 37 %
- doplnění stravy – 23 %
- prevenci zdravotních potíží – 20 %
- zlepšení imunity – 14 %

Pouze v 15 % byly potravinové doplňky doporučeny lékaři nebo poskytovateli zdravotní péče. Je důležité si uvědomit, že děti, které mají vyváženou zdravou výživu, nepotřebují potravinové doplňky. Výjimka je pouze v prvních letech života dítě, např. probiotika, kdy matka nemůže své dítě kojit, nebo vitamin D [37].

### **2.7.1 Probiotické doplňky dostupné na českém trhu**

Existuje spousta probiotických doplňků stravy pro děti. Níže jsou vypsány a popsány některé z nich.

#### **2.7.1.1 PROBIO-FIX 60 želatinových tobolek**

PROBIO-FIX obsahuje laktobacily a bifidobakterie. Probiotické kultury se po užití produktu PROBIO-FIX rozmnoží v trávicím traktu, kde dočasně kolonizují zejména tlusté střevo. Přípravek je určen pro kojence od ukončeného 4. měsíce, pro děti a dospělé.

- Pro kojence od ukončeného 4. měsíce obsah 1 tobolek. Tobolku lze otevřít a obsah vysypat do vlažného mléka nebo příkrmu (kaše, přesnídávka, jogurt), ne do vody.
- Dospělí a děti od 3 let: 1–3 tobolek denně, zapít vodou.

Jedna tobolek obsahuje lyofilizované kultury *Lactobacillus acidophilus* La-5<sup>®</sup> 47 mg a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> 18 mg (4 miliardy životaschopných bakterií uložených v jedinečném polysacharidovém matrixu). Pomocné látky v Probiofixu: dextróza, výtažek z kvasnic, stearan hořečnatý (prevence hrudkovatění), askorban sodný (antioxidant) inositol (antioxidant), glutamát sodný (stabilizátor), alginát sodný (stabilizátor), odstředěné sušené mléko, želatina, oxid titaničitý (barvivo) [38].

#### **2.7.1.2 BEBA OPTIPRO Comfort 2**

BEBA OPTIPRO Comfort 2 prémiová výživa od Nestlé vyvinutá na základě 60 let výzkumu mateřského mléka.

Obsahuje unikátní kombinaci složek:

- OPTIPRO – speciální proces k získání směsi bílkovin s cílem přiblížit se mateřskému mléku
- Probiotické bakterie – *L. reuteri*
- Prebiotickou směs GOS/FOS
- Vitamíny a minerální látky

Pokud je vaše miminko s naším výrobkem spokojené, od 10. měsíce doporučujeme přejít na naši navazující novinku BEBA OPTIPRO Comfort 3 [39].

#### **2.7.1.3 Walmark Biopron LAKTOBACILY Baby BiFi+**

Walmark Biopron LAKTOBACILY Baby BiFi+ je probiotikum s vysokým podílem Bifidobaktérií. 1 miliarda CFU v denní dávce. Pro děti již od narození. Probiotické kmeny preparátu BIOPRON Laktobacily Baby Bifi+ jsou přirozenou součástí dětské střevní mikroflóry, proto je přípravek bezpečný při dlouhodobém používání. Doporučuje se 1 tobolek denně během jídla.

Způsob užívání u dětí od narození do 3 let: Tobolku mírným stiskem a pootočením snadno otevřete a obsah smíchejte bezprostředně před požitím s mlékem či jiným jídlem. Nepřekračujte doporučené denní dávkování. Děti od 3 let mohou tobolku spolknout.

Obsah v 1 tobolce: *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*  $1 \times 10^9$  CFU\*, Fruktooligosacharidy 165,6 mg, (CFU je počet živých probiotických mikroorganismů), probiotický komplex (obsahuje mléčné a sójové složky), tobolka: želatina, barvivo oxid titaničitý [40].



Obrázek 5: Dostupné probiotické doplňky pro děti [38][39][40]

## 2.7.2 Želatinové doplňky stravy bez probiotik dostupné na českém trhu

Existuje několik želatinových doplňků stravy pro děti. Níže jsou vypsány a popsány některé z nich.

### 2.7.2.1 Mart'ánci Gummy

Mart'ánci Gummy obsahují doporučené množství důležitých vitaminů v denní dávce pro podporu zdraví, imunity a vitality Vašich dětí. Navíc jsou obohaceny o extrakt z černého bezu/echinacey. Chutné želatinové tablety s různými příchutěmi (jahoda, třešeň, jablko, černý rybíz). Vhodné pro děti od 3 let. Obsahují pouze přírodní barviva. Neobsahují lepek, konzervační látky a laktózu.

- výtažek z černého bezu přispívá k normální funkci dýchacího a napomáhá přirozené obranyschopnosti
- výtažek z třapatky nachové (*Echinacea purpurea*) přispívá k normální funkci dýchacího systému a podporuje přirozenou obranyschopnost

Doporučená denní dávka jsou dvě želatinové tablety, které dohromady obsahují *Echinacea purpurea* sušená rostlina (extrakt z rostliny min. 6:1 –40 mg) 240 mg / Černý bez (*Sambucus nigra* extrakt z květů min. 10:1–40 mg) 400 mg, vitamin B3 16 mg (100 % DRHP), vitamin B5 6 mg (100 % DRHP), vitamin B12 2,5 µg (100 % DRHP), vitamin D3 5 µg (100 % DRHP), vitamin C 80 mg (100 % DRHP), vitamin E 12 mg (100 % DRHP), vitamin K 25 µg (33 % DRHP), biotin 50 µg (100 % DRHP), kyselina listová 200 µg (100 % DRHP), zinek 10 mg (100 % DRHP). DRHP je denní referenční hodnota příjmu.

Dále obsahuje: glukózový sirup, sacharóza, želatina, voda, kyselina L-askorbová, regulátor kyselosti (kyselina citrónová), echinacea extrakt/černý bez extrakt, citrát zinečnatý, D-alfa-tokoferyl acetát, aroma jahoda, nikotinamid, koncentrát černé mrkve, aroma třešeň, barvivo (rostlinná uhlíková čern - příchut' třešeň)/ aroma černý rybíz, koncentráty (černá mrkev–příchut' černý rybíz, spirulina a světlice–příchut' jablko), aroma jablko, maltodextrin, kokosový olej, kyanokobalamin, cholekalciferol, fytomenadion, lešticí látka (karnaubský vosk), kyselina pteroylmonoglutamová, D-biotin [41].

### **2.7.2.2 Dr.Max Kids Gummies AIRPLANES**

Jedná se o doplněk stravy s vyváženou kombinací vitaminů a minerálních látek speciálně určených pro potřeby dětí. Jsou vhodné pro děti od 3 let a doporučené dávkování je 1–2 tablety denně.

Dr.Max Kids Gummies želatinové vitaminy obsahují:

- Vitamin C 40 mg, niacin 8 mg, vitamin E 6 mg, riboflavin 0,35 mg, vitamin A 400 µg, kyselina listová 100 µg, biotin 25 µg, vitamin D3 2,5 µg, vitamin B12 1,25 µg, zinek 2,5 mg, rutin 5 mg v jednom želé.
- Glukózový sirup, sacharóza, voda, vepřová želatina, kyselina citronová, L-askorbová kyselina, přírodní aromata (pomerančové, citronovo-limetkové), jablečné aroma, malinové aroma, rostlinné koncentráty (fialová mrkev, mrkev, jablko), koncentrovaná pomerančová šťáva, nikotinamid, DL- $\alpha$ -tokoferyl-acetát, rutin, citrát zinečnaný, karnaubský vosk, měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů, riboflavin, retinyl-palmitát, kyselina pteroylmonoglutamová, D-biotin, cholekalciferol, kyanokobalamin [42].

### **2.7.2.3 Vibovit FARMA želé multivitaminy**

Vibovit obsahuje komplex 11 vitaminů a minerálních látek s vynikající ovocnou chutí pro všechny aktivní děti. Jedno želé obsahuje 50 % doporučené denní dávky vitamínu C, niacinu, vitamínu E, zinku, kyseliny pantothenové, vitamínu A, kyseliny listové, selenu, biotinu, vitamínu D a vitamínu B12. Vibovit je doporučován hlavně všem aktivním dětem, jejichž pravidelná fyzická zátěž zvyšuje požadavky na příjem těchto látek. Obsahuje pouze přírodní barviva. Doporučená denní dávka je 1–2 želé.

Dále obsahuje glukózový sirup, cukr, voda, vepřová želatina, kyselina citrónová, karnaubský vosk, aroma, pomerančový koncentrát, šťáva z černého kořene, výtažek z pepře-barvivo, měďnatý komplex chlorofylinu-barvivo, vitamín C (kyselina L-askorbová). niacin (nikotinamid). vitamín E (DL-alfa-tokoferyl-acetát). kyselina pantothenová (D-pantothenan vápenatý), vitamín A (retinyl-acetát). foláty (kyselina pteroylmonoglutamová). biotin (D-biotin). vitamin D (cholekalciferol), vitamín B12 (kyanobalamin). zinek (síran zinečnatý), selen (selenan sodný). Přípravek může obsahovat stopová množství vaječných proteinů [43].



Obrázek 6: Dostupné želatinové doplňky na trhu [41][42][43]

## 2.8 Metody analýzy

### 2.8.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je molekulárně diagnostická metoda. PCR je založena na amplifikaci požadovaných specifických sekvencí nukleových kyselin (především DNA). Podstatou je cyklicky opakující se enzymová syntéza nových řetězců, kdy se k opačným koncům vybraných úseků řetězců denaturované DNA, ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy, hybridizují dva krátké oligonukleotidy (primery) a utváří se nová vlákna. V tabulce 6 je uvedeno složení reakční směsi pro PCR [44][45].

Tabulka 6: Složky reakční směsi pro PCR [44][45]

Matrice DNA (DNA templát)	Makromolekula DNA, podle které se komplementárně syntetizují nové řetězce. Obsahuje cílová místa pro primery.
Primery	Synteticky připravené oligonukleotidy komplementární k templátové DNA, která má být amplifikovaná. Jsou sekvencně specifické a nesmí být mezi sebou komplementární. Jejich délka je 18 – 30 nukleotidů.
DNA-polymerasa	Syntetizuje novou DNA ve směru 5' → 3'. Ke katalýze se používají termostabilní polymerasy, kdy musí odolávat vysokým teplotám při denaturaci. Často se používá např. <i>Taq</i> DNA-polymeráza izolovaná z termofilní bakterie <i>Thermus aquaticus</i> žijící v horkých pramenech
3'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dNTP)	Stavební kameny pro syntézu nové DNA. Optimální koncentrace je 200 μM. Koncentrace od 4 mM a výše vyvazuje hořčnaté ionty a tím působí inhibičně.
Mg <sup>2+</sup> ionty	Jsou nezbytné pro aktivitu DNA-polymerasy. Obvykle se používá koncentrace 1,5 mM Mg <sup>2+</sup> . Vyšší koncentrace iontů snižuje specifitu PCR.
Pufir pro PCR	Vytváří optimální prostředí pro DNA-polymerasu. Standardní reakční pufir obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3–8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> .
Voda pro PCR	Slouží k doplnění směsi pro PCR na požadovaný objem. Nejvhodnější je voda o odporu 18 mΩ.

V 80. letech vrcholil rozruch způsobený revolucí v oblasti klonování genů. Zavedení polymerázové řetězové reakce je inspirací Kary B. Mullise, který dostal v roce 1985 nápad. Přišel na jednoduchou metodu doplňující klonování genů [46].

PCR se provádí v jediné mikrozkušavce, kdy se DNA smíchá se souborem reagentů a mikrozkušavka se vloží do termocykléru. Základními kroky PCR jsou:

- Zahřátí směsi na teplotu 94 °C, kdy se poruší vodíkové můstky. Vodíkové můstky k sobě pojí vlákna dvouvláknové molekuly DNA. Porušením se způsobí denaturace molekuly. Je důležité, aby došlo k úplnému rozdělení, protože by jinak molekuly DNA rychle renaturovaly a docházelo by tak k nespecifickým vazbám primerů a ke zkreslení výsledků. Z tohoto důvodu bývá denaturace templátové DNA v počátečním a konečném cyklu prodloužena na několik minut. V dalších cyklech probíhá tato fáze po dobu 15–45 s.
- Směs je následně ochlazena na 50-60 °C a primery jsou komplementárně připojeny k odděleným řetězcům DNA. Děj probíhá 30–60 s. Teplota vhodná pro hybridizaci závisí na teplotě tání primerů i DNA, na délce oligonukleotidů a na zastoupení párů bází.
- Zvýšením teploty na 74 °C, která je optimální pro aktivitu enzymu Taq DNA polymeráza přítomného ve směsi, se tento enzym připojuje k jednomu konci každého primeru a syntetizuje nová vlákna DNA, která jsou komplementární k templátovým molekulám DNA. Po tomto kroku máme z původních dvou vláken čtyři vlákna molekuly DNA. Tato fáze probíhá 60–120 s. V posledním cyklu bývá též prodloužena na několik minut, aby se zajistilo kompletní syntetizování DNA [44][46].

Z jedné dvouvláknové molekuly na začátku po opakování cyklu 25krát vznikne více než 50 milionů nových dvouvláknových molekul. Každá je kopií úseku původní molekuly, vymezeného místy, na které se připojily oba primery [44].

Výsledným produktem PCR jsou amplikony, úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle desítky až tisíce párů bází (bp). Jejich přítomnost v reakční směsi se prokazuje elektroforézou na agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu. Přítomnost naamplifikovaných úseků DNA v reálném čase detekujeme pomocí intenzity fluorescenčního záření. V tabulce 7 jsou uvedena další využití PCR [46].

Tabulka 7: Využití PCR a jejich modifikací ve výzkumu a praxi [46]

Základní výzkum	Aplikovaný genetický výzkum	Klinické disciplíny	Ostatní
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Izolace genů nebo jejich částí</li> <li>• Sekvenování DNA</li> <li>• Mutagenese in vitro, modifikace konců DNA</li> <li>• Analýza klonů z genových knihoven</li> <li>• Příprava značených sond</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prenatální diagnostika dědičných chorob</li> <li>• Detekce mutací v genech</li> <li>• Studium polymorfizmu genů</li> <li>• Populační genetika</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detekce patogenních bakterií, virů, prvoků a hub</li> <li>• Typizace patogenních mikroorganismů</li> <li>• Identifikace onkogenů</li> <li>• Typizace nádorů</li> <li>• Stanovení pohlaví</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Archeologie</li> <li>• Soudnictví</li> <li>• Kriminalistika</li> </ul>

## 2.8.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase je modifikací konvenční PCR. Jedná se o metodu moderní, rychle se rozvíjející a citlivou. U této metody je umožněno monitorování vznikajícího produktu PCR přímo během reakce prostřednictvím fluorescenčního signálu v každém jednotlivém cyklu.

Další velkou výhodou je schopnost kvantifikace, tedy přesného určení výchozího množství požadované sekvence templátové DNA v analyzovaném vzorku (odtud též označení kvantitativní PCR–qPCR) [46].

### 2.8.2.1 Průběh reakce, složení směsi qPCR a detekce produktu reakce

Průběh qPCR je podobný jako u konvenční PCR. Základem je cyklicky se opakující denaturace templátu, hybridizace primerů a syntéza nových řetězců cílového úseku DNA. Kromě komponent pro konvenční PCR, obsahuje qPCR navíc fluorescenční molekuly, z důvodu monitorování vzniku produktů PCR již během reakce. Fluorescence je měřena v každém cyklu, přičemž intenzita fluorescenčního záření je přímo úměrná množství produktu přítomného v reakční směsi [6]. Fluorescenční látky jsou děleny do 3 charakteristických skupin:

- Interkalační barvivo vážící se na DNA. Nejčastěji se používá fluorescenční barvivo SYBR Green I. Samostatně v qPCR směsi emituje záření jen velmi malé intenzity, jakmile se však začlení do nově vzniklé dvoušroubovice DNA, dochází k výrazné emisi fluorescenčního záření, která se zvyšuje s rostoucím množstvím produktu. Měření intenzity signálu probíhá na konci fáze elongace nebo průběžně. Hlavní nevýhodou fluorescenčních barviv je nemožnost odlišení nespecifických produktů, protože se mohou vázat do jakékoli dvoušroubovice DNA. Jsou jednoduché na použití a finančně dostupné.
- Fluorescenčně značené sondy vážících se na střední část amplifikovaného produktu. Sondy TaqMAN<sup>TM</sup> jsou oligonukleotidy. Mají vyšší hodnotou teploty tání ( $T_m$ ) asi o 10 °C než je  $T_m$  primerů. Na 5' - konci obsahují fluorescenční látku a na 3' - konci zhášeč. Zhášeč se nachází v blízkosti fluoroforu, a proto pohlcuje fluorescenci emitovanou fluorescenční látkou. Sondy detekují výhradně specifické produkty. Jejich hlavní nevýhodou je vysoká cena a komplikovaná optimalizace, nelze je užít při analýze křivky tání.
- Fluorescenčně značené primery jako např. AmpliFluor<sup>TM</sup> nebo technologie LUX, s vlásenkovou strukturou fungují na podobném principu jako sondy (k výrazné emisi dochází až při narušení struktury primeru během syntézy DNA u specifických produktů)[46][47].

### 2.8.2.2 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)

Vysokorozlišovací analýza křivky tání (HRM - High Resolution Melting) je nová, citlivější verze analýzy křivek tání. Detekuje velmi malé rozdíly ve tvaru křivek tání a v hodnotách teploty tání ( $T_m$ ), kdy teplota tání závisí jak na délce DNA řetězce, tak na počtu párů bází guaninu a cytosinu. Jelikož guanin a cytosin jsou v antiparalelních řetězcích molekuly nukleové kyseliny vázány třemi vodíkovými můstky, zatímco adenin s thyminem pouze



dvěma, je teplota tání řetězce tím vyšší, čím více obsahuje párů bází guaninu a cytosinu. HRM je tedy vhodná i k rozlišení úseků DNA lišících se pouze o jednu bázi.

Pro analýzu je nutno použít saturační interkalační barviva, která plně obsazují všechna místa na vznikajících dvoušroubovicích. Tato barviva nepůsobí inhibičně na DNA polymerázu ani ve vysoké koncentraci, např. LC Green PLUS, Eva Green nebo SYTO9.

Při vytváření primerů pro PCR-HRM je kladen hlavně důraz na to, aby spolu dvojice příslušných primerů netvořily dimery primerů. Teplota tání a tvar křivky tání jsou ovlivněny délkou amplikonu, kdy by neměly být příliš dlouhé (ideálně kolem 300 bp), protože čím delší amplikony vzniknou, tím menší budou rozdíly v jejich křivkách tání, což by mělo za následek pokles citlivosti analýzy. Dalším ovlivněním jsou sekvence bází a množství obsažených párů bází guaninu a cytosinu [48][49].

### **2.8.3 Enkapsulace**

Enkapsulace neboli zapouzdření je proces, při kterém jsou buňky obaleny do biopolymerních matic. Slouží k ochraně buněk během zpracování, skladování a při průchodu trávicím soustavou, tedy před působením kyselého prostředí žaludku, před žlučovými solemi a před trávicími enzymy. K uvolnění probiotických buněk dojde následně až v tlustém střeva, v místě účinku. Přidáním prebiotik do kapsle navíc můžeme ještě více zvýšit životaschopnost buněk.

Materiály použité pro ochranný obal částice musí být potravinářské, biologicky rozložitelné a schopné tvořit bariéru mezi vnitřní fází a jeho okolím. Rozdělujeme je do několika skupin, jako jsou polysacharidy, proteiny a lipidy. Mezi nejčastěji používané polysacharidy patří algináty, karagenany, agar, arabská guma, xanthanová guma, škrob a jeho modifikace, celulóza, pektin inulin, chitosan a jiné. Z proteinů se využívá hlavně polypeptid polylysin a proteiny jako želatina, syrovátka, rostlinné a mléčné proteiny. Z lipidů se nejčastěji využívají vosky, fosfolipidy a oleje [50].

#### **2.8.3.1 Enkapsulátor**

Enkapsulátor je poloautomatický přístroj, který slouží k polymernímu zapouzdření chemických látek, biologických molekul, extraktů, buněk a mikroorganismů za sterilních nebo nesterilních podmínek. Zvolením velikosti trysky zajistíme výslednou velikost částic, která se pohybuje od 0,15 do 2 mm. Pro vytvoření probiotických částic s prebiotiky pro děti je ideální zvolit velikost trysek okolo 300  $\mu\text{m}$ , aby částice nedělaly při polykání dětem problémy.

Enkapsulovaná látka se smíchá s polymerem, který tvoří vnější obal a vše se umístí do tlakové lahve. Pomocí stlačeného vzduchu je směs dodávána do pulzační komory. Následně prochází směs systémem trysek o definované velikosti a na jeho výstupu dochází k rozdělování a výsledkem jsou kapičky o stejné velikosti. Mezi tryskou a elektrodou se nachází elektrické pole a průchodem přes něj získávají kapky povrchový náboj. Působením elektrostatické odpudivé síly dojde k rozptýlení kapek. Ty následně dopadají do vytvrzovacího roztoku  $\text{CaCl}_2$ , který je uzemněn. Vytvrzovací roztok je neustále míchán magnetickým míchadlem, aby se zabránilo shlukování částic. Přístroj se skládá z regulační jednotky se stříkačkovým čerpadlem, elektrickým a pneumatickým systémem a reakční nádoby [51].

Tabulka 8: Techniky a postupy používané pro zapouzdření probiotických mikroorganismů [52]

Mikroenkapsulační technika	Druhy materiálů na obal	Hlavní kroky v procesu
<b>Sprejové sušení</b>	Ve vodě rozpustné polymery	<ol style="list-style-type: none"> <li>i. Příprava roztoků, včetně mikroorganismů</li> <li>ii. Rozprašování produktu zaváděného do spreje</li> <li>iii. Sušení spreje</li> <li>iv. Separace sušené látky ve formě produktu</li> </ol>
<b>Sprejové tuhnutí</b>	Vosky, mastné kyseliny, ve vodě rozpustné a ve vodě nerozpustné polymery, monomery	<ol style="list-style-type: none"> <li>i. Příprava roztoků, obsahujících jádro (např. probiotika)</li> <li>ii. Tuhnutí povrchu tuhnutím rozpuštěných materiálů tvořících obal</li> <li>iii. Odstranění nerozpustných materiálů sorpcí, používá se extrakce nebo odpařovací techniky</li> </ol>
<b>Fluidní vrstva</b>	Ve vodě nerozpustné a ve vodě rozpustné polymery, lipidy, vosky	<ol style="list-style-type: none"> <li>i. Příprava povlakových roztoků</li> <li>ii. Fluidizace částic tvořících jádro</li> <li>iii. Pokrývání částic povlakovými roztoky</li> </ol>
<b>Vytlačování</b>	Ve vodě rozpustné a ve vodě nerozpustné polymery	<ol style="list-style-type: none"> <li>i. Příprava roztoků povlakových materiálů</li> <li>ii. Disperze materiálů tvořící jádro</li> <li>iii. Chlazení nebo pokrytí směsí pomocí dehydratační kapaliny</li> </ol>
<b>Koacervace</b>	Ve vodě rozpustné polymery	<ol style="list-style-type: none"> <li>i. Materiály tvořící jádro se dispergují v roztoku potahovacího polymeru</li> <li>ii. Nanášení povlaku, je toho dosaženo kontrolovaným, fyzikální mísení a pokrytím</li> <li>iii. Ztuhnutí povlaku teplem nebo desolvací za vzniku funkčních mikrokapslí</li> <li>iv. Vytlačování směsi pokrývných materiálů v opačně nabitých roztocích</li> <li>v. Lyofilizace mikrokapslí nebo jejich sušení v peci</li> </ol>

#### 2.8.4 Lyofilizace

Lyofilizace se řadí mezi enkapsulační techniky. Používá se k enkapsulaci ve vodě rozpustných přírodních aromatických látek, esencí a materiálů citlivých na teplo. Lyofilizací dojde k odstranění částic ledu nebo zmražených komponent materiálu sublimací. Lyofilizací dojde k uchování materiálu citlivého na teplo, jako jsou bílkoviny, mikroorganismy, farmaceutika, tkáň nebo plasma.

Nosič a aktivní látka se nejprve rozpouští ve vodě a následně zamrazují. Za vakua je voda odstraněna pomocí sublimace. Sublimace je přeměna pevné látky přímo na plynou, bez přechodu přes kapalnou skupenství. V některých případech se používají i tzv. kryoprotektanty, které mají za úkol chránit a stabilizovat citlivé složky při mražení.

Přístroj se skládá z chladicí jednotky, vakuového systému, kontrolní jednotky, rozdělovací komorou a kondenzátorem [53].

#### 2.8.5 Chromatografie

Chromatografie patří mezi separační metoda, při které dochází k separaci složek obsažených ve vzorku. Vzorek se nanáší mezi mobilní a stacionární fázi, které jsou vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek se umístí na začátek stacionární fáze. Pohyblivou mobilní fází je potom vzorek přes stacionární fázi unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány a tím se různě zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Na detektoru jsou potom postupně vidět

složky seřazené od nejméně zadržovaných po nejvíce zadržované. Svým určením je chromatografie metodou kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku [54].

#### **2.8.5.1 Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie je metoda, kde je vzorek kolonou unášen proudem vzduchu tzv. nosným plynem. Kvůli dalšímu transportu musí být vzorek ihned přeměněn na plyn. V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Složky opouštějící kolonu následně indikuje detektor. Pro nutnost přeměny analytů v plyny mohou být separované jen takové látky, které mají dostatečný tlak syté páry, jsou tepelně stálé a mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1 000. Obecně může být plynová chromatografie použita k separaci plynů, většiny nedisociovaných kapalin a pevných organických molekul a mnoha kovových látek. Není použitelná pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí [54].

#### **2.8.5.2 Kapalinová chromatografie**

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejenom jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi. Čas, jaký stráví v jedné nebo v druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Tato metoda je vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin, protože můžeme pracovat za laboratorní teploty a není zde nutné převádět vzorek na plyn [54].

### **3 CÍLE PRÁCE**

Cílem práce byl vývoj a charakterizace doplňků stravy s obsahem probiotických bakterií pro dětskou výživu. Za tímto účelem byly řešeny následující dílčí úkoly:

1. Kultivace vybraných kmenů probiotických bakterií a ověření zachování jejich viability při průchodu trávicím traktem
2. Výběr vhodné probiotické směsi do dětských přípravků a zvýšení její odolnosti enkapsulací a lyofilizací
3. Návrh optimálního složení dětských doplňků stravy s obsahem probiotických bakterií

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

Agar powder, Himedia (IND)  
Agarosa pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)  
Alginát sodný, Sigma-Aldrich (USA)  
Bile salts – směs kyseliny cholové a deoxycholové, Sigma-Aldrich (D)  
D-glukosa monohydrát p.a., Lach:NER (ČR)  
Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát p.a., Vitrium-Lach:NER (ČR)  
DNA standard (Malamité, Moravské Prusy, ČR)  
Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)  
*Escherichia coli* strain B (ultra pure, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).  
Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)  
Ethyldiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)  
Fenol p.a., Lach:NER (ČR)  
GelRed (Biotium, USA)  
Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a., Vitrium-Lach:NER (ČR)  
Hydrogenuhličitan sodný p.a., Lach:NER (ČR)  
Hydroxid sodný p.a., Lach:NER (ČR)  
Chlorid vápenatý p.a., Lachema (ČR)  
Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)  
Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)  
Kyselina chlorovodíková 35%: Lach:NER (ČR)  
Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)  
Midori Green (Elisabeth Pharmacon, Brno, ČR)  
MRS Broth médium, Himedia (IND)  
Nanášecí pufř Yeallow load (Top-Bio, Praha, ČR)  
Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)  
Pankreatin (vepřový pankreas), Sigma-Aldrich (D)  
Pepsin, Sigma-Aldrich (D)  
Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)  
Tris-báze (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) (Serva, Heidelberg, SRN)

### 4.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy: Boeco (D)  
Centrifuga, Sartorius, Biotech (ČR)  
Cycler Rotor-gene 6000 (Corbett Life Science, Concord, USA)  
ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (SRN)  
Enkapsulátor Büchi B-395 Pro (CH)  
Mikrovlnná trouba PROLINE SM117  
MiniInkubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)  
NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA)  
Předvážky Kern 440-33 (D)

Termostat INCU-Line, VWR (USA)

Vortex: Genius 3, IKA Vortex (D)

Zařízení pro elektroforézu OWL D2, (OWL Separation Systems, Inc., Portsmouth, NH, USA)

Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)

### 4.3 Roztoky pro PCR

1M TrisHCl (121,1 g Tris-báze, koncentrovaná HCl pro úpravu pH 7,8 (8,0) a destilovaná voda do 1 000 ml)

0,5 M EDTA, pH 8,0 (186,1 g EDTA, 20 g NaOH a destilovaná voda do 1 000 ml)

Lyzační pufr I (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0)

Lyzační pufr II (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0; lysozym 3 mg/ml)

TE pufr (1 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) a destilovaná voda do 100 ml)

CIZ (směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1)

5×TBE pufr (54 g Tris-báze, 27,5 g kyselina boritá, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a destilovaná voda do 1 000 ml)

### 4.4 Použité mikroorganismy

V práci byly použity probiotické bakteriální kultury *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>, *Bifidobacterium adolescentis* CCM 4987, *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762, *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup> a *Bifidobacterium longum* CCM 4990. Kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

### 4.5 Použité materiály

Pro testování byly v práci dále použity komerčně prodávané řasy a sinice: Chlorella, Spirulina, Kombu, Arame, Hijiki, Wakame. Dále byly použity: Sirup Hello mango, sirup Yo lesní plody, domácí bezinková šťáva. Na sensorickou analýzu byl využit probiotický přípravek Biopron Junior a loupaná konopná semínka, viz obrázek 7.



Obrázek 7: Použité probiotika a konopné semínka

## 4.6 Metodické postupy

### 4.6.1 Kultivace probiotických bakterií

Pro kultivaci bakterií *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>, *Bifidobacterium adolescentis* CCM 4987, *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762, *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup> a *Bifidobacterium longum* CCM 4990 byl používán komerční MRS bujón. V Erlenmayerově baňce bylo smícháno 55,15 g MRS bujónu, jak udává výrobce, s 1000 ml destilované vody. Baňka byla následně sterilována 30 minut v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem. Kultury byly zaočkovány ve sterilním boxu vždy 1 ml kultury do 15 ml bujónu do plastových zkumavek. Kultury byly kultivovány 24 hodin v termostatu při 37 °C. Po kultivaci byly buňky nejprve zcentrifugovány při 5 000 otáčkách po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl ze zkumavek slit supernatant a do zkumavek bylo přidáno 10 ml sterilní vody pro promytí. Následně byly buňky opět zcentrifugovány při 5 000 otáčkách po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl opět slit supernatant a buňky byly ponechány k dalším experimentům.

### 4.6.2 Modelové trávicí šťávy

Modelové trávicí šťávy byly používány pro testování viability bakteriálních buněk v simulovaném prostředí lidského trávení. Probiotické buňky v potravině byly v poměru 1:1 vloženy nejprve do žaludeční šťávy, zde trávení probíhalo po dobu 20 minut. Následně byly přidány šťávy pankreatická a žlučová (v poměru 1:1). Přídavek střevních šťáv byl v poměru 1:1 k potravině a šťávě žaludeční. Trávení ve střevě probíhalo 2 hodiny. V průběhu celého trávení byly vzorky míchány a inkubovány na temperované třepačce při teplotě 37 °C. Ve zvolených intervalech byly odebírány vzorky k analýze.

#### 4.6.2.1 Složení modelové žaludeční šťávy

0,25 g pepsinu bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody a následně bylo přidáno 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. Celkové pH bylo upraveno na hodnotu 0,9 [55].

#### 4.6.2.2 Složení modelové pankreatické šťávy

0,25 g pankreatinu a 1,5 g hydrogenuhličitanu sodného bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Celkové pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 8,9 [55].

#### 4.6.2.3 Složení modelové žlučové šťávy

0,8 g žlučových solí bylo rozpuštěno ve 200 ml fosfátového pufru. Celkové pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 8 [55].

### 4.6.3 Stanovení počtu buněk pomocí zákalu

#### 4.6.3.1 Kalibrační křivka

1 ml nakultivovaných buněk rozsuspendovaných v médiu byl postupně ředěn pro sestavení kalibrační závislosti. Jednotlivé vzorky byly nejdříve stanoveny pomocí spektrofotometricky

s využitím 96 jamkové mikrotitrační destičky, byla změřena absorbance při 630 nm, vzorky byly následně stanoveny i nepřímou kultivační metodou uvedenou v kapitole 4.6.4.

#### **4.6.3.2 Růstová křivka**

Nejprve byly u všech kmenů změřeny růstové křivky, kdy byly buňky v triplicátech každého kmene napipetovány na 96 jamkovou destičku a to vždy 30  $\mu$ l daného kmene a 300  $\mu$ l MRS tekutého média do jedné jamky a po dobu 24 hodin byla v 30minutových intervalech měřena absorbance při 630 nm.

#### **4.6.3.3 Stanovení jednotlivých kmenů a směsí**

Vzorky promytých buněk jednotlivých kmenů dle postupu v kapitole 4.6.1 byly rozsuspendovány v 10 ml destilované vody. Následně byl odebrán 1 ml vzorku (u směsí bylo napipetováno 0,5 ml daného kmene a celkový objem byl upraven podle počtu kmenů ve směsi), který byl přidán do 9 ml destilované vody.

Po 15 minutách byl odebrán 1 ml vzorku k analýze a do směsi bylo přidáno 9 ml žaludeční šťávy. Po 20 minutách trávení bylo přidáno k 18 ml směsi 9 ml pankreatické šťávy a 9 ml žlučové šťávy. Směs byla ponechána na temperované třepačce 2 hodiny. Po trávení byly buňky nejprve zcentrifugovány při 5 000 otáčkách po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl ze zkumavek slit supernatant a do zkumavek bylo přidáno 10 ml sterilní vody a buňky ve vodě byly ponechány k analýze. Všechny vzorky byly následně naneseny na 96 jamkovou destičku, kdy do každé jamky bylo napipetováno 300  $\mu$ l čistého MRS média a 30  $\mu$ l daného vzorku vždy v triplicátech. Po dobu 24 hodin byla v 30minutových intervalech měřena absorbance při 630 nm.

#### **4.6.3.4 Vliv řas a sinic na viabilitu probiotických bakterií**

Nejdříve byly připraveny extrakty testovaných řas. Od každé řasy byl navážen vždy 1 g, který byl přidán k 10 ml destilované vody. Takto připravená směs byla ponechána na třepačce 24 hodin. Pro vyhodnocení vlivu účinků jednotlivých řas bylo na 96 jamkovou destičku po tripletech napipetováno 230  $\mu$ l MRS tekutého média, 75  $\mu$ l buněk a 25  $\mu$ l extraktu. Následně byla po dobu 24 hodin v 30minutových intervalech měřena absorbance při 630 nm.

#### **4.6.4 Nepřímé stanovení počtu buněk kultivační metodou**

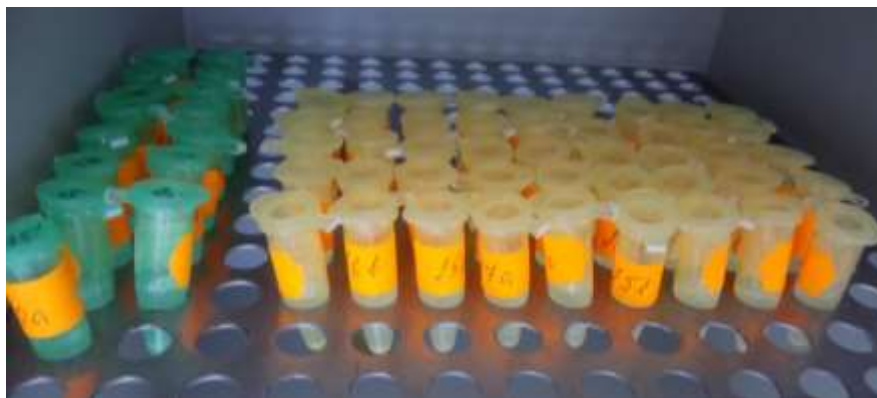
Pro nepřímé stanovení počtu buněk kultivační metodou byla použita metoda přelivem. Pro tuto metodu byly použity vzorky uvedené v kapitole 4.6.3.1. Z každé jamky bylo odebráno 330  $\mu$ l vzorku, které byly napipetovány do Petriho misek a zality sterilním MRS agarem (55,15 g MRS média a 20 g agaru ve 1 000 ml vody) o teplotě 45 °C. Po rozlití se agar krouživým pohybem promíchal a nechal ztuhnout. Poté byly misky kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin a následně byl vyhodnocen počet buněk.

#### **4.6.5 Příprava hrubých lyzátů bakteriálních buněk**

Příprava hrubých lyzátů byla provedena z narostlých bakteriálních buněk z 96 jamkové destičky uvedené v kapitolách 4.6.3.3. Z 96 jamkové destičky bylo do zkumavky Eppendorf napipetováno 330  $\mu$ l vzorku, následně byly vzorky zcentrifugovány při 14 500 otáčkách po dobu 5 minut. Supernatant byl slit a sediment byl rozsuspendován v 500  $\mu$ l lyzačního



pufri I. Po promíchání byla suspenze opět zcentrifugována při 14 500 otáčkách po dobu 5 minut. Po slítí supernatantu bylo k sedimentu přidáno 500  $\mu$ l lyzačního pufri II. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě. Následně bylo do každé zkumavky Eppendorf přidáno 25  $\mu$ l 10% SDS a 5  $\mu$ l proteinasy K (0,1 mg/ml). Vzorky byly inkubovány v inkubátoru při teplotě 55 °C do druhého dne, viz obrázek 8. Z hrubých lyzátů buněk byla izolována DNA.



Obrázek 8: Vzorky v inkubátoru při teplotě 55 °C

#### 4.6.6 Izolace DNA fenolovou extrakcí

K 500  $\mu$ l lyzátu buněk bylo přidáno 500  $\mu$ l fenolu (předestilovaný, pH 7,8). Směs byla kývavým pohybem míchána 4 minuty. Poté byla směs zcentrifugována při 14 500 otáčkách po dobu 5 minut. Do čisté zkumavky Eppendorf byla odebrána vodní fáze obsahující DNA a byla doplněna TE pufrem na celkový objem 500  $\mu$ l. Do každé zkumavky bylo následně přidáno 700  $\mu$ l roztoku CIZ (chloroform:isoamylalkohol, 24:1) a směs byla opět kývavým pohybem promíchávána po dobu 4 minut. Směs byla opět zcentrifugována při 14 500 otáčkách po dobu 5 minut a poté byla odebrána vodní fáze do čisté zkumavky Eppendorf.

#### 4.6.7 Přesrážení DNA ethanolem

Objem vzorků DNA získaných fenolovou extrakcí byl upraven TE pufrem na celkový objem 400  $\mu$ l. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 20  $\mu$ l 3M octanu sodného a roztok byl promíchán. Ke každému vzorku bylo přidáno po 1 ml vychlazeného 96% ethanolu (-20 °C), směs byla poté promíchána a ponechána k inkubaci při -20 °C po dobu 20 minut. Po ukončení inkubace byla směs zcentrifugována při 14 500 otáčkách po dobu 15 minut. Supernatant byl odlit a sediment DNA byl vysušen v exsíkátoru (15 minut) a byl rozpuštěn ve 100  $\mu$ l TE pufri. Takto přečištěná DNA byla uchovávána při teplotě 4 °C.

#### 4.6.8 Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

Pomocí přístroje NanoDrop 2000 byla proměřena absorbance izolované DNA v TE pufri proti čistému TE pufri. K měření bylo použito 2  $\mu$ l vzorku. Absorbance byla odečtena pro vlnové délky 230 nm (minimum absorbance pro DNA), 260 nm (maximum absorbance pro DNA), 280 nm (maximum absorbance pro proteiny). Z hodnoty absorbance pro 260 nm byla stanovena koncentrace DNA ve vzorku. Z hodnoty  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  byla určena čistota

vzorku DNA. Hodnoty  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  by se měla pohybovat v rozmezí 1,8–2,0, pokud je vyšší než 2,0, indikuje to znečištění vzorku RNA, pokud je nižší hodnota než 1,8, indikuje to znečištění vzorku proteiny.

#### 4.6.9 Provedení polymerázových řetězových reakcí

Byly připraveny směsi pro PCR, následně byly provedeny PCR reakce a byly detekovány produkty PCR elektroforeticky. Jednotlivé reakce se odlišovaly použitými primery.

##### 4.6.9.1 Primery pro PCR

Pro přípravu PCR směsí byly použity primery specifické pro doménu *Bacteria* (F\_eub, R\_eub) [56], pro rod *Lactobacillus* (F\_all lact, R\_all lact) [56] a pro rod *Bifidobacterium* (Bif164 a Bif662) [57].

Pro druhově specifickou PCR byly použity primery pro *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup> (BiBRE1, BiBRE2) [58], *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762 (BiBIF1, BiBIF2) [58] a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCM 4990 (BiLON-1, BiLON-2; BiINF-1, BiINF-2) [58].

Sekvence primerů specifických pro doménu *Bacteria*, pro rod *Lactobacillus*, pro rod *Bifidobacterium* a druhově specifické PCR se nachází v tabulce 9.

Tabulka 9: Specifické primery pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus*, rod *Bifidobacterium* a druhově specifické PCR

Primer		Sekvence (5' - 3')	Velikost produktu (bp)
<b>Doména <i>Bacteria</i> [56]</b>			
1	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466
2	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	
<b>Rod <i>Lactobacillus</i> [56]</b>			
1	F_alllact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92
2	R_alllact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT	
<b>Rod <i>Bifidobacterium</i> [57]</b>			
1	Bif164	GGG TGG TAA TGC CGG ATG	523
2	Bif662	CCA CCG TTA CAC CGG GAA	
<b><i>Bifidobacterium bifidum</i> CCM 3762 [58]</b>			
1	BiBIF1	CCA CAT GAT CGC ATG TGA TT	278
2	BiBIF2	CCG AAG GCT TGC TCC CAA A	
<b><i>Bifidobacterium breve</i> CCM 7825<sup>T</sup> [58]</b>			
1	BiBRE1	CCG GAT GCT CCA TCA CAC	288
2	BiBRE2	ACA AAG TGC CTT GCT CCC T	
<b><i>Bifidobacterium longum</i> CCM 4990 [58]</b>			
1	BiLON-1	TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC	831
2	BiLON-2	GGG AAG CCG TAT CTC TAC GA	
<b><i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> CCM 4990 [58]</b>			
1	BiINF-1	TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC	828
2	BiINF-2	GGA AAC CCC ATC TCT GGG AT	

#### 4.6.9.2 Příprava směsí pro PCR

Všechny komponenty pro PCR byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce zcentrifugovány.

Pro PCR specifickou pro doménu *Bacteria* byla jako DNA matrice použita DNA zředěná na koncentraci 10,0 ng/μl. Pro PCR specifickou pro rod *Lactobacillus* byla jako DNA matrice použita nezředěná DNA, pro rod *Bifidobacterium* byla DNA zředěná na koncentraci 10,0 ng/μl a pro druhově specifickou PCR byla jako DNA matrice použita nezředěná DNA. Do reakční směsi byla DNA přidávána jako poslední, viz tabulka 10.

Analogicky byla připravena negativní kontrola (NK), matrice DNA byla nahrazena stejným množstvím vody pro PCR. Pozitivní kontrola (PK) byla připravena obdobným způsobem, kdy jako matrice byla použita DNA izolovaná z čisté bakteriální kultury (koncentrace 10–1 ng/μl).

Pro kmen *Bifidobacterium longum* CCM 4990 byla pro optimalizaci použita upravená směs pro PCR, která je uvedena v tabulce 11.

Tabulka 10: Příprava směsi pro PCR v reálném čase dle doporučení výrobce Master Mix

Krok	Komponenta	Objem [μl]
1	Voda pro PCR	9,5
2	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
3	Primer 1 (10 pmol/μl)	1,0
4	Primer 2 (10 pmol/μl)	1,0
5	Matrice DNA	1,0
Celkem		25,0

Tabulka 11: Příprava směsi pro PCR v reálném čase pro druh *Bifidobacterium longum*

Krok	Komponenta	Objem [μl]
1	Voda pro PCR	7,5
2	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
3	Primer 1 (10 pmol/μl)	2,0
4	Primer 2 (10 pmol/μl)	2,0
5	Matrice DNA	1,0
Celkem		25,0

#### 4.6.9.3 Programy amplifikace DNA

Byla provedena amplifikace izolované DNA. Teplotní programy byly zvoleny v závislosti na použitých primerech, viz tabulka 9. Teplotní program pro doménu *Bacteria*, pro rod *Lactobacillus* a druhově specifické PCR se nachází v tabulce 12.

Teplotní programy optimalizované pro druhově specifické PCR *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum* se nachází v tabulce 13.

Tabulka 12: Teplotní programy

Prodloužená denaturace DNA v prvním cyklu	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA v posledním cyklu	Melt analýza	
<b>Doména <i>Bacteria</i></b>						
94 °C/5 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min	50–99 °C/ 5 s pro každý °C	
	30 cyklů					
<b>Rod <i>Lactobacillus</i></b>						
95 °C/5 min	94 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min		
	30 cyklů					
<b>Rod <i>Bifidobacterium</i></b>						
94 °C/5 min	94 °C/1 min	55 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/5 min		
	35 cyklů					
<b><i>Bidobacterium bifidum</i>, <i>Bifidobacterium breve</i>, <i>Bifidobacterium longum</i></b>						
94 °C/5 min	94 °C/20 s	55 °C/20 s	72 °C/30 s	72 °C/5 min		
	35 cyklů					

Tabulka 13: Optimalizace teplotního programu pro *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum*

Prodloužená denaturace DNA v prvním cyklu	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA v posledním cyklu	Melt analýza	
<b>1. optimalizace <i>Bifidobacterium bifidum</i> a <i>Bifidobacterium longum</i></b>						
94 °C/5 min	94 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/40 min	72 °C/5 min	50–99 °C/ 5 s pro každý °C	
	40 cyklů					
<b>2. optimalizace <i>Bifidobacterium longum</i></b>						
94 °C/5 min	94 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min		
	40 cyklů					

#### 4.6.10 Detekce produktů PCR agarosovou gelovou elektroforézou

Byl připraven 1,2%, 1,5% nebo 1,8% agarosový gel pro detekci ampliconů navážením 1,2 g, 1,5 g či 1,8 g agarosy a jejím rozpuštěním ve 100 ml 0,5×TBE pufru. Suspenze byla rozvařena v mikrovlnné troubě. Po vychladnutí na teplotu cca 60 °C byla suspenze promíchána a bylo přidáno fluorescenční barvivo GelRed (10 µl barviva/100 ml). Suspenze byla nalita do připravené formy. Gel byl ponechán k tuhnutí po dobu 30 minut a do komůrek vzniklých po vyjmutí hřebínku byly nanášeny produkty PCR smíšené v poměru 5:1 s nanášecím pufrům Yeallow load. Do jedné z komůrek byl nanášen DNA standard (100 bp) o objemu 5 µl (dle doporučení výrobce), obsahující fragmenty DNA o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp. Po vložení do elektroforetické vany byl gel převrstven 0,5 × TBE pufrům do výšky 0,5 cm nad gel. Elektroforéza probíhala po dobu 1,5 hodiny při konstantním napětí 60 V. Po té byl gel vyhodnocen v UV světle na transiluminátoru TVR- 3121 při vlnové délce 305 nm. Na obrázku 9 je znázorněn průběh elektroforézy.

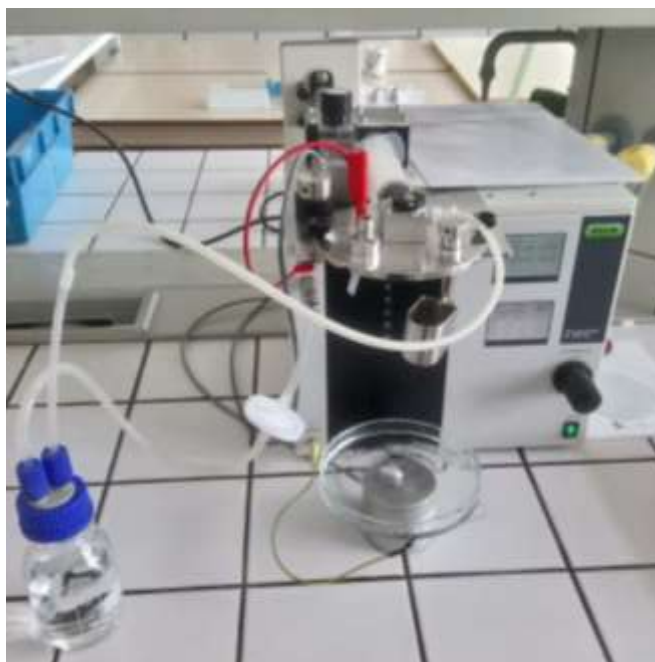


Obrázek 9: Názorná ukázka elektroforézy pro rod *Lactobacillus*

## 4.6.11 Enkapsulace

### 4.6.11.1 Příprava alginátových částic s konopným olejem/probiotikem

Konopná semínka byla za studena lisována. Z konopného oleje a 2% alginátu sodného byla připravena alginát-olejová emulze. Alginátové částice byly následně připraveny z emulze na enkapsulátoru B-395 Pro od firmy BÜCHI, viz obrázek 10, byla využita tryska o velikosti 400  $\mu\text{m}$ . Vytvrzovacím roztokem byl 2% roztok  $\text{CaCl}_2$ . Částice byly následně ponechány ve vytvrzovacím roztoku po dobu 30 minut. Poté byly částice zfiltrány, promyty vodou a uchovány pro senzorickou analýzu. Obdobným způsobem, ale s využitím trysky s velikostí 300  $\mu\text{m}$  byly připraveny i alginátové částice s obsahem probiotik.



Obrázek 10: Enkapsulátor B-395 Pro

## **4.6.12 Specifikace konopného oleje, Chlorelly a Spiruliny v doplňku stravy**

### **4.6.12.1 Stanovení celkových polyfenolů**

Do zkumavek byl napipetován 1 ml 10krát ředěného Follin-Ciocaltautova činidla, 1 ml vody a 50  $\mu$ l vzorku Chlorelly a Spiruliny. Roztok byl promíchán a ponechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. Pak byl do zkumavky přidán 1 ml nasyceného roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Roztok byl opět promíchán a nechán 15 minut stát při laboratorní teplotě. Po 15 minutách byla měřena absorbance roztoku při  $\lambda = 750$  nm oproti blanku, kdy se místo vzorku přidala voda.

Pro sestrojení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada kyseliny gallové od 0,1 do 0,7 mg/ml.

### **4.6.12.2 Kvantifikace lipidů pomocí plynové chromatografie**

Extrakty lipidických vzorků (Folch, Soxhlet apod.) byly rozpuštěny v 10 ml chloroformu. Z takovéto připravené směsi byl do vialky napipetován 1 ml, ke kterému bylo následně přidáno 0,8 ml transesterifikační směsi. Transesterifikační směs tvořila 15%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v methanolu (p.a.) a 0,5 mg/ml C17 jako vnitřního standardu. Vialky byly inkubovány při teplotě 85 °C po dobu 2 hodin. Po uplynutí této doby se nechaly vialky volně vychladnout na laboratorní teplotu. Do 4 ml vialek bylo poté napipetováno 0,5 ml 0,005 M roztoku NaOH, následně byl vlit celý obsah vialek po transesterifikaci a k této směsi byl přidán 1 ml hexanu. Směs byla intenzivně promíchána, aby došlo k dokonalému oddělení jednotlivých fází. Po oddělení fází bylo z horní fáze odpipetováno 0,1 ml do čisté vialky se závitkem pro plynovou chromatografii. Do této vialky bylo poté ještě napipetováno 0,9 ml hexanu. Takto připravený vzorek byl analyzován na plynovém chromatografu.

## **4.6.13 Senzorická analýza**

### **4.6.13.1 Senzorické hodnocení**

Senzorická analýza proběhla 14. 3. 2019 v čase od 9 do 14 hodin. Senzorické hodnocení bylo zaměřeno hlavně na chuťový a zrakový vjem. Zúčastnilo se celkem 43 hodnotitelů. Hodnotitelé byli studenti, doktorandi a akademičtí pracovníci Fakulty chemické VUT v Brně. Jejich hodnocení odpovídá hodnocení proškoleným hodnotitelům.

### **4.6.13.2 Analyzované vzorky**

Pro hodnocení byly vzorky připraveny z 2% alginátu a 2% agaru v poměru 1:1 a s dalšími přidanými složkami, ve tvaru gumových medvídků. Složení preparátů je popsáno v tabulce 14. Na obrázku 11 je znázorněna výroba probiotických preparátů.

Tabulka 14: Složení probiotických preparátů k sensorické analýze

Kód vzorku	Složení preparátu
A01	alginát:agar (1:1); domácí bezinková šťáva; cukr; vodný extrakt ze Spiruliny
B01	alginát:agar (1:1); probiotická směs Biopron Junior; sirup lesní plody
C01	alginát:agar (1:1); alginát - olejové kuličky z konopného oleje; mangový sirup
D01	alginát:agar (1:1); Spirulina; mangový sirup; cukr
E01	alginát: agar (1:1); Chlorella; mangový sirup; cukr
F01	alginát: agar (1:1); Spirulina; probiotická směs Biopron Junior; alginát - olejové kuličky z konopného oleje; mangový sirup; cukr



Obrázek 11: Ukázka výroby probiotických preparátů – plnění do silikonových forem

#### 4.6.13.3 Metody využité při sensorickém hodnocení

Hodnocení se skládalo ze stupnicového hodnocení a byla hodnocena celková přijatelnost vzorku. Pro hodnocení vzhledu, barvy a vůně byla použita pětibodová stupnice (1 vynikající → 5 nevyhovující). Pro intenzitu sladkosti a celkové chuti byla použita obrácená pětibodová stupnice (1 nevyhovující → 5 vynikající).

Posledním testem byl pořadový test, kdy hodnotitelé seřazovali vzorky dle vlastních preferencí.

Protokol/formulář hodnocení naleznete v příloze 1, viz kapitola 9.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předložená práce se zabývá studiem probiotik určených především pro děti, z hlediska viability těchto probiotických buněk v průběhu trávení. V práci byly testovány probiotické bakterie rodu *Bifidobacterium*, ke kterým byl vybrán a dále s nimi analyzován jeden kmen z rodu *Lactobacillus*, s cílem navrhnout vhodný produkt pro dětskou výživu o nejlepším složení probiotických bakterií z rodu *Bifidobacterium* a s přidavkem aktivních látek, jako jsou například mastné kyseliny, nebo extrakty z řas.

### 5.1 Kalibrační závislost

Na základě změřené absorbance viz kapitola 4.6.3.1 a nepřímého stanovení počtu buněk kultivační metodou viz kapitola 4.6.4 byla sestavena kalibrační závislost absorbance na počtu živých buněk. Na obrázku 12 je znázorněna ukázka narostlé kultury na Petriho misce.



Obrázek 12: Ukázka kultury jednoho kmene narostlá při ředění  $10^6$

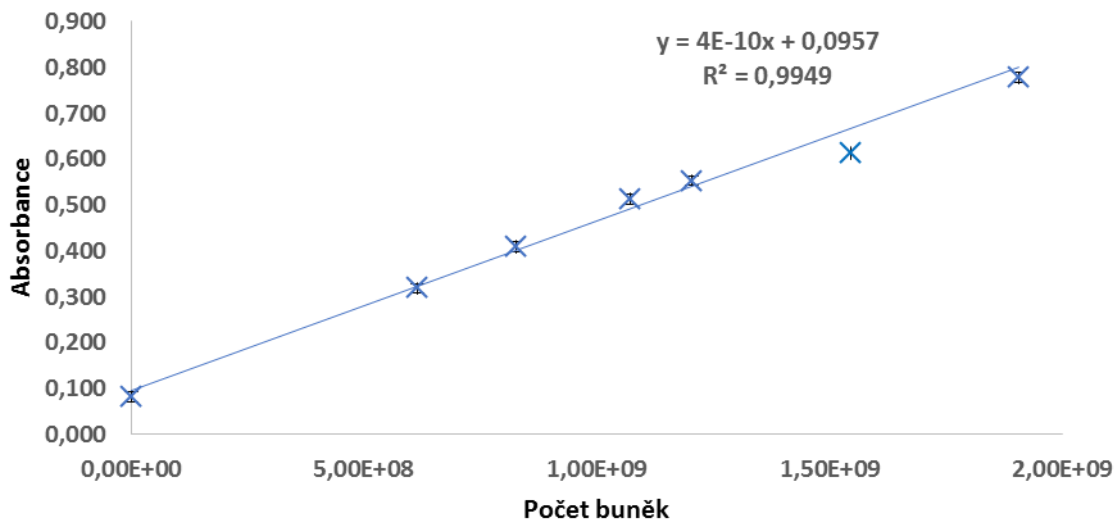
Naměřená data jsou uvedené v tabulce 15. Kdy jako nulový bod, bylo stanoveno čisté MRS médium. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

Tabulka 15: Hodnoty kalibrační křivky

Číslo	Průměr A	Počet buněk z kultivační metody			Průměr počtu buněk
1	0,081	0	0	0	0
2	0,317	$6,15 \cdot 10^8$	$6,03 \cdot 10^8$	$6,24 \cdot 10^8$	$6,14 \cdot 10^8 \pm 8,60 \cdot 10^6$
3	0,408	$8,23 \cdot 10^8$	$8,49 \cdot 10^8$	$8,03 \cdot 10^8$	$8,25 \cdot 10^8 \pm 1,88 \cdot 10^7$
4	0,513	$1,10 \cdot 10^9$	$9,99 \cdot 10^8$	$1,12 \cdot 10^9$	$1,07 \cdot 10^9 \pm 5,08 \cdot 10^7$
5	0,552	$1,20 \cdot 10^9$	$1,20 \cdot 10^9$	$1,21 \cdot 10^9$	$1,20 \cdot 10^9 \pm 6,16 \cdot 10^6$
6	0,612	$1,55 \cdot 10^9$	$1,57 \cdot 10^9$	$1,52 \cdot 10^9$	$1,55 \cdot 10^9 \pm 1,93 \cdot 10^7$
7	0,777	$1,89 \cdot 10^9$	$1,93 \cdot 10^9$	$1,90 \cdot 10^9$	$1,90 \cdot 10^9 \pm 2,02 \cdot 10^7$

Z grafického znázornění zobrazeného na obrázku 13 je vidět, že bod 6 je nejvíce odchylen od lineární závislosti, proto byl z kalibrační závislosti vyrazen.





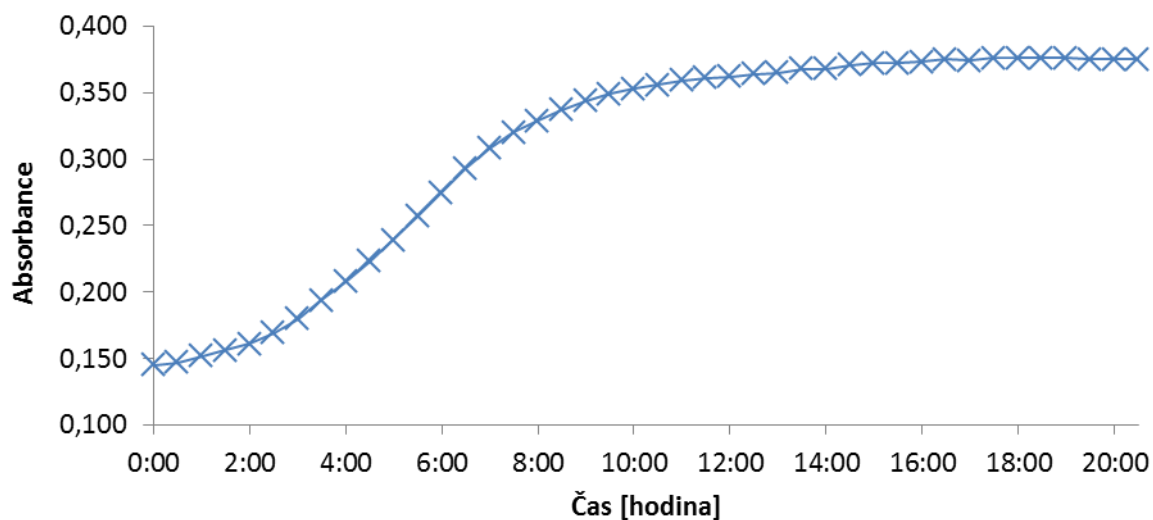
Obrázek 13: Kalibrační závislost absorbance na počtu buněk

## 5.2 Rod *Lactobacillus*

### 5.2.1 Růstové křivky

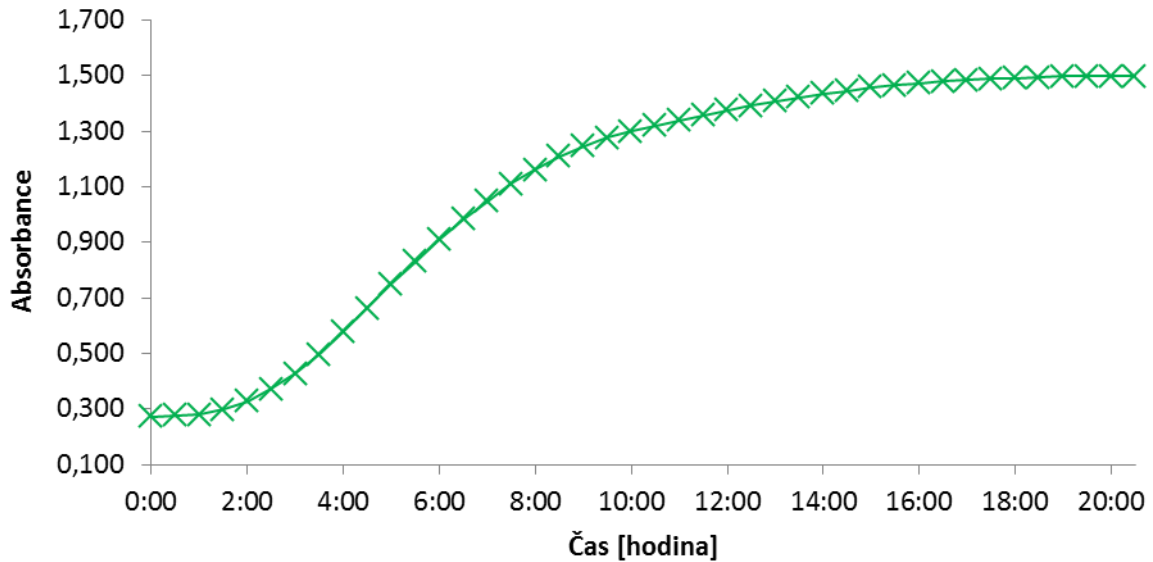
Nejdříve byly sestaveny růstové křivky na základě změřených absorbancí pro rod *Lactobacillus*, postup uveden v kapitole 4.6.3.2. Na všech křivkách není vidět fáze odumírání buněk. Je to z toho důvodu, že pro následující měření bylo pro nás důležité především stanovení hranice mezi exponenciální a stacionární fází.

Na obrázku 14 je znázorněna růstová křivka kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833. Na růstové křivce tohoto kmene je vidět, že přechod mezi exponenciální a stacionární fází se nachází mezi 10 a 12 hodinou růstu. Maximální hodnota naměřené absorbance byla 0,376.



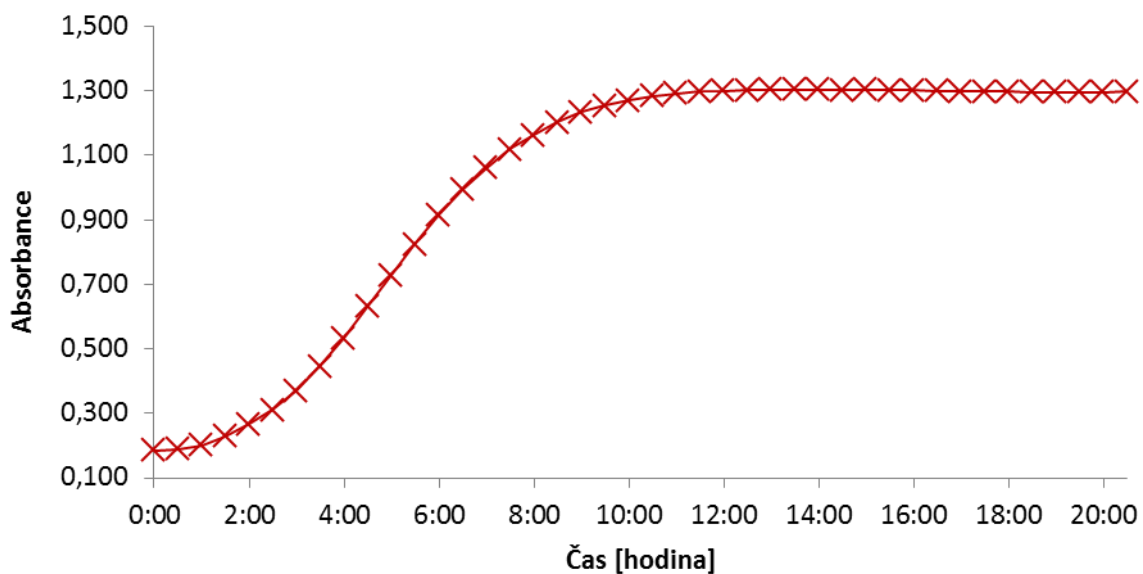
Obrázek 14: Růstová křivka kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833

Na obrázku 15 je znázorněna růstová křivka kmene *Lactobacillus casei* CCM 4798. Na růstové křivce tohoto kmene je vidět, že přechod mezi exponenciální a stacionární fází se nachází mezi 8 a 14 hodinou růstu. Přechod na stacionární fází není ovšem tak zřetelný a je pozvolnější. Maximální hodnota naměřené absorbance byla 1,499.



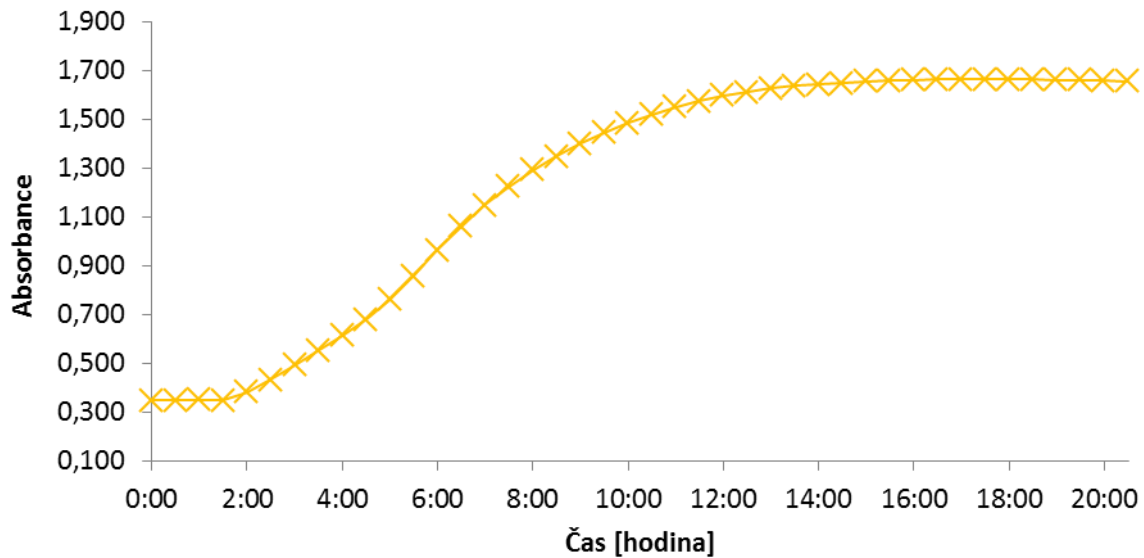
Obrázek 15: Růstová křivka kmene *Lactobacillus casei* CCM 4798

Na obrázku 16 je znázorněna růstová křivka kmene *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 7190. Na růstové křivce tohoto kmene je vidět, že přechod mezi exponenciální a stacionární fází se nachází mezi 8 a 10 hodinou růstu. Maximální hodnota naměřené absorbance byla 1,304.



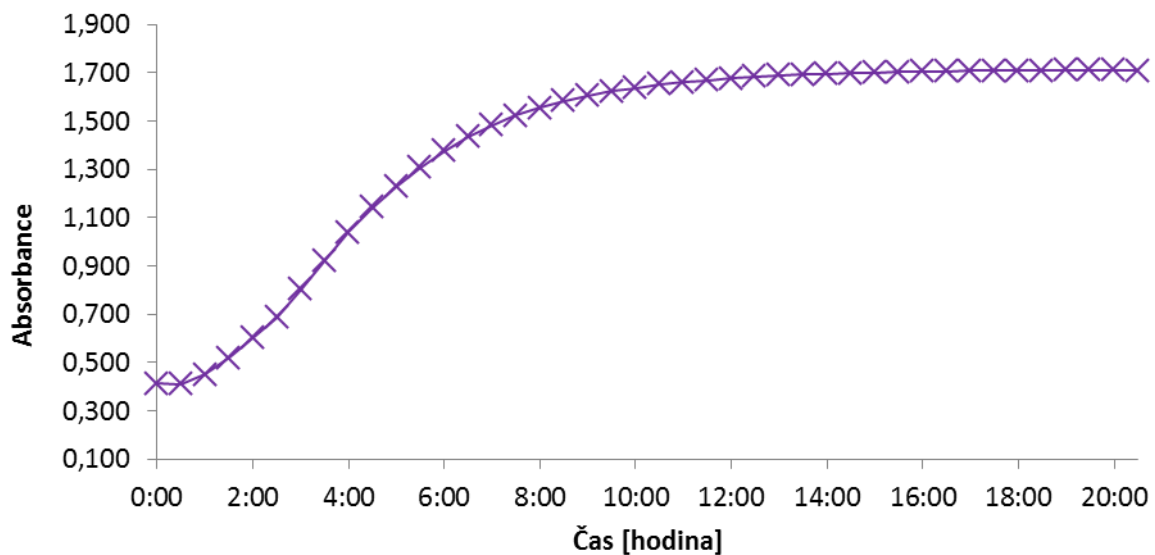
Obrázek 16: Růstová křivka kmene *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 7190

Na obrázku 17 je znázorněna růstová křivka kmene *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>. Na růstové křivce tohoto kmene je vidět, že přechod mezi exponenciální a stacionární fází se nachází mezi 10 a 12 hodinou růstu. Maximální hodnota naměřené absorpance byla 1,664.



Obrázek 17: Růstová křivka kmene *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>

Na obrázku 18 je znázorněna růstová křivka kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>. Na růstové křivce tohoto kmene je vidět, že přechod mezi exponenciální a stacionární fází se nachází mezi 8 a 10 hodinou růstu. Maximální hodnota naměřené absorpance byla 1,711.



Obrázek 18: Růstová křivka kmene *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>

Na základě růstových křivek bylo dále pracováno s kmeny po 10 hodinách kultivace v médiu.

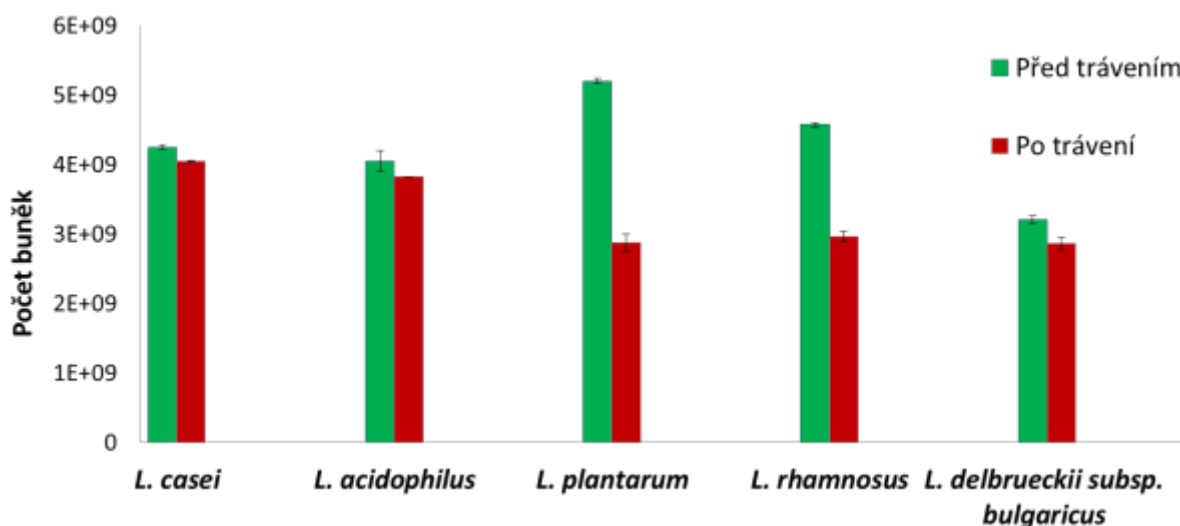
## 5.2.2 Modelové trávení jednotlivých kmenů

Na základě růstových křivek byly nakultivovány všechny kmeny, tak aby se nacházely v horní části exponenciální fáze, pro správné určení vhodného kmene k dalším experimentům. Kmeny byly podrobeny modelovému trávení uvedenému v kapitole 4.6.3.3. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16: Modelové trávení kmenů z rodu *Lactobacillus*

Před trávením			Po trávení			Procento snížené viability [%]
A	Průměr	Počet buněk	A	Průměr	Počet buněk	
<b><i>Lactobacillus casei</i> CMM 4798</b>						
1,677	1,665	$4,25 \cdot 10^9 \pm 2,56 \cdot 10^7$	1,589	1,589	$4,04 \cdot 10^9 \pm 1,44 \cdot 10^7$	<b>4,84 ± 0,52</b>
1,654			1,582			
1,663			1,595			
<b><i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833</b>						
1,624	1,590	$4,05 \cdot 10^9 \pm 1,49 \cdot 10^8$	1,509	1,508	$3,83 \cdot 10^9 \pm 2,55 \cdot 10^6$	<b>5,44 ± 3,62</b>
1,512			1,509			
1,633			1,507			
<b><i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 7039<sup>T</sup></b>						
2,032	2,015	$5,20 \cdot 10^9 \pm 4,13 \cdot 10^7$	1,207	1,155	$2,87 \cdot 10^9 \pm 1,22 \cdot 10^8$	<b>44,79 ± 2,26</b>
2,018			1,097			
1,995			1,162			
<b><i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825<sup>T</sup></b>						
1,793	1,785	$4,57 \cdot 10^9 \pm 2,64 \cdot 10^7$	1,197	1,189	$2,96 \cdot 10^9 \pm 7,45 \cdot 10^7$	<b>35,27 ± 1,31</b>
1,771			1,152			
1,790			1,218			
<b><i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> CCM 7190</b>						
1,304	1,280	$3,21 \cdot 10^9 \pm 5,31 \cdot 10^7$	1,195	1,151	$2,86 \cdot 10^9 \pm 9,14 \cdot 10^7$	<b>10,89 ± 1,39</b>
1,280			1,145			
1,256			1,113			

V tabulce 16 je uvedený počet buněk před a po trávení, výpočet byl proveden na základě kalibrační závislosti uvedené v kapitole 5.1. Z těchto hodnot bylo následně spočítáno procento počtu buněk po trávení a procento o kolik se snížila viabilita buněk po trávení. Pro lepší znázornění procenta snížení viability buněk po trávení, byl sestaven graf, viz obrázek 19.



Obrázek 19: Porovnání jednotlivých kmenů rodu *Lactobacillus* po modelovém trávení

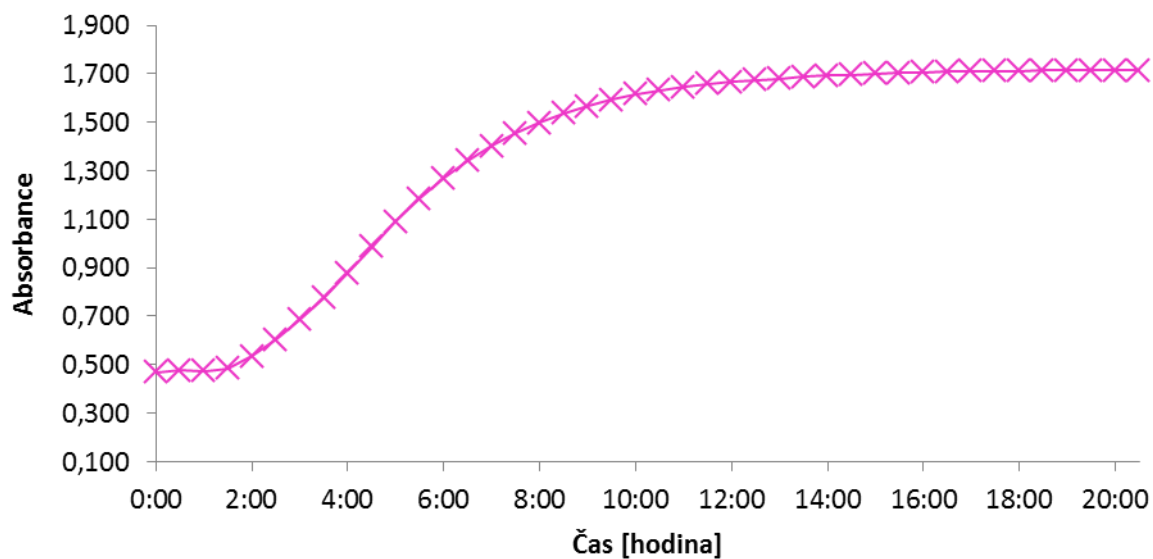
Z grafu je patrné, že nejmenší rozdíl po trávení mají dva kmeny *Lactobacillus casei* CCM 4798 a *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833. Viabilita kmene *Lactobacillus casei* CCM 4798 po trávení byla o 4,84 % menší ve srovnání se začátkem trávení a u kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 byla o 5,44 % menší. A jelikož hledáme nejlepší směs probiotických bakterií pro děti, byl jako nejlepší kmen z rodu *Lactobacillus* vybrán *Lactobacillus casei* CCM 4798. Nejlepší směsí je myšlena ta směs, která bude mít nejmenší snížení viability buněk po trávení, bez použité enkapsulační metody. Jelikož hledáme směs vhodnou pro děti, je z rodu *Lactobacillus* vybrán pouze jeden kmen. Kmen *Lactobacillus casei* CCM 4798 byl dále využíván i v dalších experimentech.

## 5.3 Rod *Bifidobacterium*

### 5.3.1 Růstové křivky

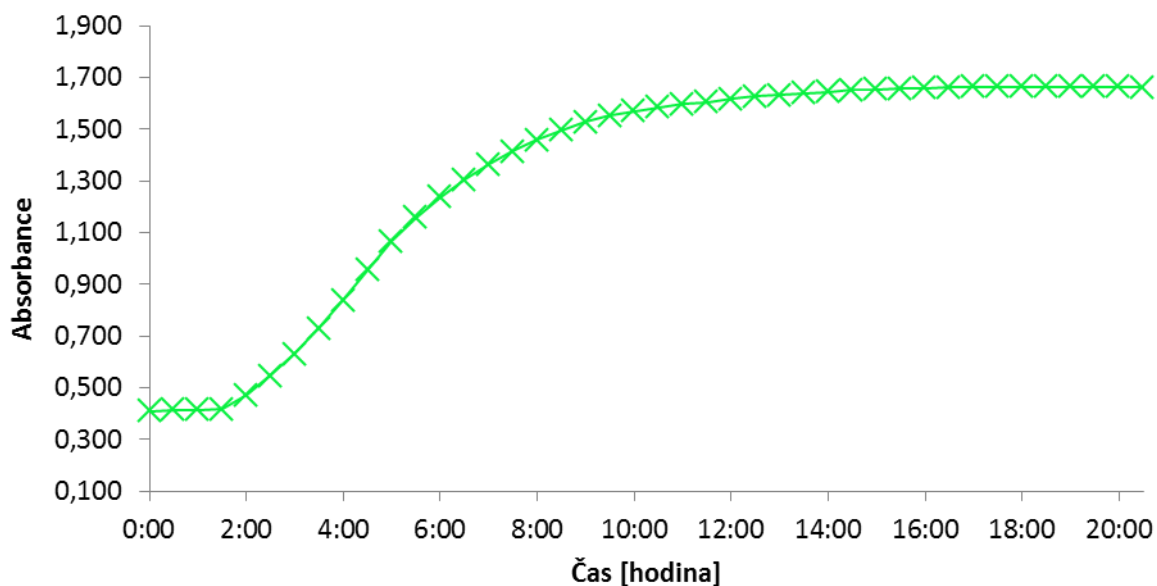
Tak jako u rodu *Lactobacillus* byly sestrojeny růstové křivky na základě změřených absorbancí pro rod *Bifidobacterium*, podle postupu uvedeného v kapitole 4.6.3.2, kde bylo opět stanovení růstové křivky ukončeno před nástupem fáze odumírání, z důvodu hledání hranice exponenciální a stacionární fáze, kvůli dalším experimentům.

Na obrázku 20 je znázorněna růstová křivka kmene *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>. Na růstové křivce tohoto kmene je vidět, že přechod mezi exponenciální a stacionární fází se nachází mezi 8 a 10 hodinou růstu. Maximální hodnota naměřené absorbance byla 1,714.



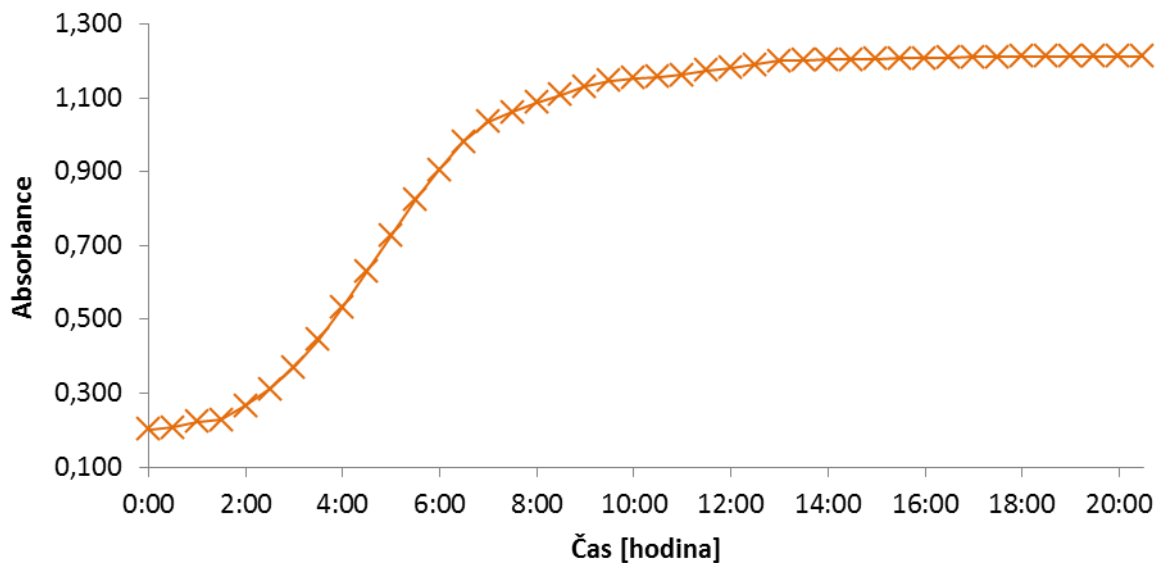
Obrázek 20: Růstová křivka kmene *Bifidobacterium breve* 7825<sup>T</sup>

Na obrázku 21 je znázorněna růstová křivka kmene *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762. Na růstové křivce tohoto kmene je vidět, že přechod mezi exponenciální a stacionární fází se nachází mezi 8 a 10 hodinou růstu. Maximální hodnota naměřené absorbance byla 1,665.



Obrázek 21: Růstová křivka kmene *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762

Na obrázku 22 je znázorněna růstová křivka kmene *Bifidobacterium longum* CCM 4990. Na růstové křivce tohoto kmene je vidět, že přechod mezi exponenciální a stacionární fází se nachází mezi 6 a 8 hodinou růstu. Maximální hodnota naměřené absorbance byla 1,213.



Obrázek 22: Růstová křivka kmene *Bifidobacterium longum* CCM 4990

U kmene *Bifidobacterium adolescentis* CCM 4987, nedocházelo ke zvýšení viability po dobu 24 hodin, ani po několika opakováních, i přes vytvoření optimálních podmínek pro jeho růst.

Proto byl tento kmen již na základě růstové křivky z dalších analýz vyřazen jako nevhodný pro nalezení nejlepší směsi probiotických bakterií pro děti. Jelikož kmeny, které budou do nejlepší směsi vybrány by měly, kromě již zmíněných informací v kapitole 5.2.2, ideálně mít co nejlepší vlastnosti. Na základě růstových křivek bylo dále pracováno s kmeny po 10 hodinách kultivace v médiu.

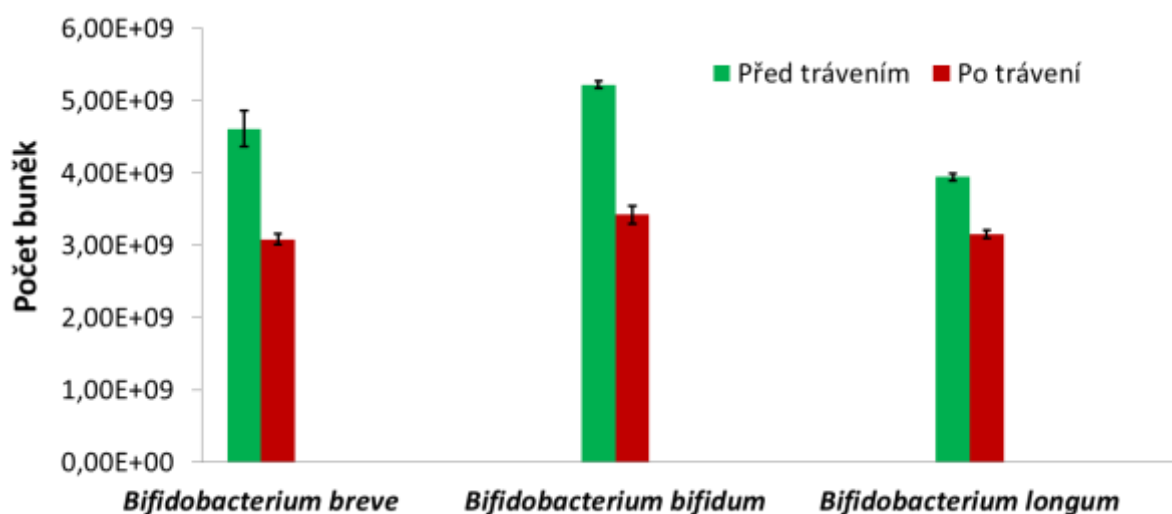
### 5.3.2 Modelové trávení jednotlivých kmenů

Na základě růstových křivek stejně jako u rodu *Lactobacillus*, byly kmeny rodu *Bifidobacterium* nakultivovány, tak aby se nacházely v horní části exponenciální fáze. Kmeny byly podrobeny modelovému trávení uvedenému v kapitole 4.6.3.3 Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 17.

Tabulka 17: Modelové trávení kmenů z rodu *Bifidobacterium*

Před trávením			Po trávení			Procento snížené viability [%]
A	Průměr	Počet buněk	A	Průměr	Počet buněk	
<i>Bifidobacterium breve</i> CCM 7825 <sup>T</sup>						
1,832	1,797	$4,61 \cdot 10^9 \pm 2,49 \cdot 10^8$	1,218	1,234	$3,08 \cdot 10^9 \pm 7,03 \cdot 10^7$	<b>33,07 ± 2,80</b>
1,671			1,214			
1,888			1,271			
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CCM 3762						
2,048	2,022	$5,22 \cdot 10^9 \pm 5,12 \cdot 10^7$	1,302	1,358	$3,42 \cdot 10^9 \pm 1,21 \cdot 10^8$	<b>34,47 ± 2,94</b>
2,016			1,362			
2,003			1,411			
<i>Bifidobacterium longum</i> CCM 4990						
1,524	1,551	$3,94 \cdot 10^9 \pm 5,52 \cdot 10^7$	1,233	1,260	$3,15 \cdot 10^9 \pm 5,11 \cdot 10^7$	<b>20,04 ± 0,38</b>
1,573			1,274			
1,557			1,272			

V tabulce 17 je uvedený počet buněk před a po trávení spočítaný na základě kalibrační závislosti uvedené v kapitole 5.1. Z těchto hodnot bylo následně spočítáno procento počtu buněk po trávení a procento o kolik se snížila viabilita buněk ve srovnání se začátkem trávení. Pro lepší znázornění procenta snížení viability buněk po trávení, byl sestaven graf, viz obrázek 23.



Obrázek 23: Porovnání jednotlivých kmenů rodu *Bifidobacterium* po modelovém trávení

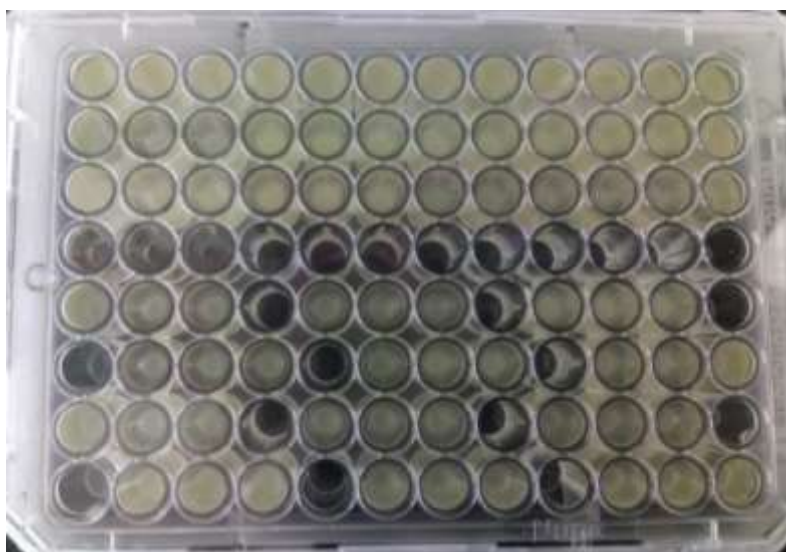
Z grafu je patrné, že nejmenší rozdíl po trávení má kmeny *Bifidobacterium longum* CCM 4990. Snížení viability po trávení tohoto kmene bylo o 11,14 %. U kmene *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup> bylo zaznamenáno snížení viability buněk o 33,07 % a u kmene *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762 o 34,47 %. Zde nebyl vybírán nejlepší kmen. Měření bylo potvrzeno, že rod *Bifidobacterium* hůře snáší velké změny pH, ke kterým během trávení dochází, takže vyšší procento snížení viability buněk oproti rodu *Lactobacillus*, zde není velkým překvapením. Především s ohledem na přípravu vhodné probiotické směsi pro dětskou výživu, ve které byl kladen důraz na přítomnost velkého podílu buněk z rodu *Bifidobacterium*, byly všechny tři tyto kmeny využívány v dalších experimentech. Přičemž



viabilita buněk po trávení bude následně zvýšena, právě přidáním do směsi, nebo následnou enkapsulací či lyofilizací.

#### 5.4 Modelové trávení směsí kmenů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*

Na základě měření, které jsou popsány výše v kapitolách 5.2 a 5.3, byly dále na experimenty použity tyto čtyři kmeny: *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762, *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup> a *Bifidobacterium longum* CCM 4990. Všechny kmeny z rodu *Bifidobacterium* měly daleko vyšší procento snížení viability buněk po průchodu trávicím traktem než nejlepší kmen z rodu *Lactobacillus*. Je to z důvodu velké změny pH, jak již bylo zmíněno výše. Tyto čtyři kmeny byly proto následně mezi sebou míseny tak, aby vždy u každé směsi byly alespoň dva kmeny z rodu *Bifidobacterium*. Byly tedy sestaveny směsi o různém složení kmenů z rodu *Bifidobacterium*. Následně ke všem takto vytvořeným směsím byl přidán nejlepší kmen z rodu *Lactobacillus*, tedy *Lactobacillus casei*. Kmeny byly mezi sebou míseny z toho důvodu, abychom zjistili, zda je jejich úmrtnost sníží nebo zvýší. Domníváme, se totiž, že by kmeny spolu mohly spolupracovat, a tedy v porovnání směsí a čistých kmenů z rodu *Bifidobacterium* by měla být lépe zachována jejich viability po skončení trávení. Na obrázku 24 je názorně vidět 96 jamková destička po trávení směsí.

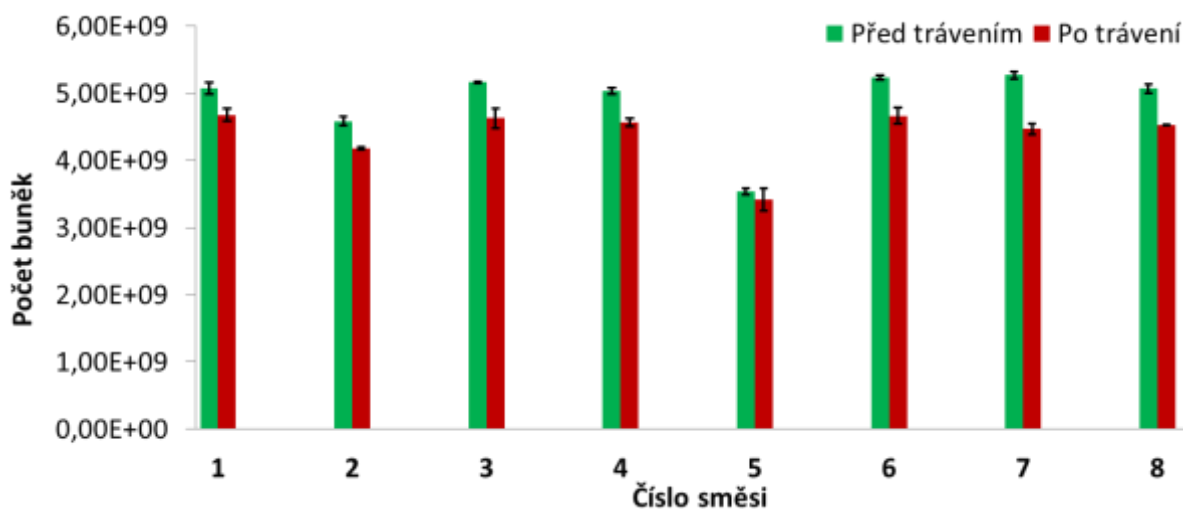


Obrázek 24: 96 jamková destička po trávení směsí

Výsledné složení směsí probiotik a jejich naměřené hodnoty absorbancí před a po trávení je uvedeno v tabulce 18. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Z naměřených hodnot v tabulce 18 bychom mohli směsi probiotik seřadit podle procenta snížení viability takto: 5, 1, 2, 4, 3, 8, 6, 7, kde směs probiotik číslo 5 má nejnižší procento snížení viability a směs probiotik číslo 7 nejvyšší. Pokud bychom porovnávaly směsi probiotik s rodem *Lactobacillus* a čistě směsi probiotik pouze s rodem *Bifidobacterium*, tak ze směsí probiotik s kmenem z rodu *Lactobacillus* je na tom nejhůře směs probiotik č. 6 s procentem snížení viability o 10,91 % a nejlépe vychází směs probiotik č. 5 s procentem snížení viability o pouhých 3,37 %. U směsí probiotik pouze

čistě s rodem *Bifidobacterium* vychází nejhůře směs probiotik č. 7 s procentem snížení viability o 15,23 % a nejlépe směs probiotik č. 1 o 7,88 %.

Pro lepší znázornění byl vytvořen graf, viz obrázek 25.



Obrázek 25: Porovnání jednotlivých směsí po modelovém trávení

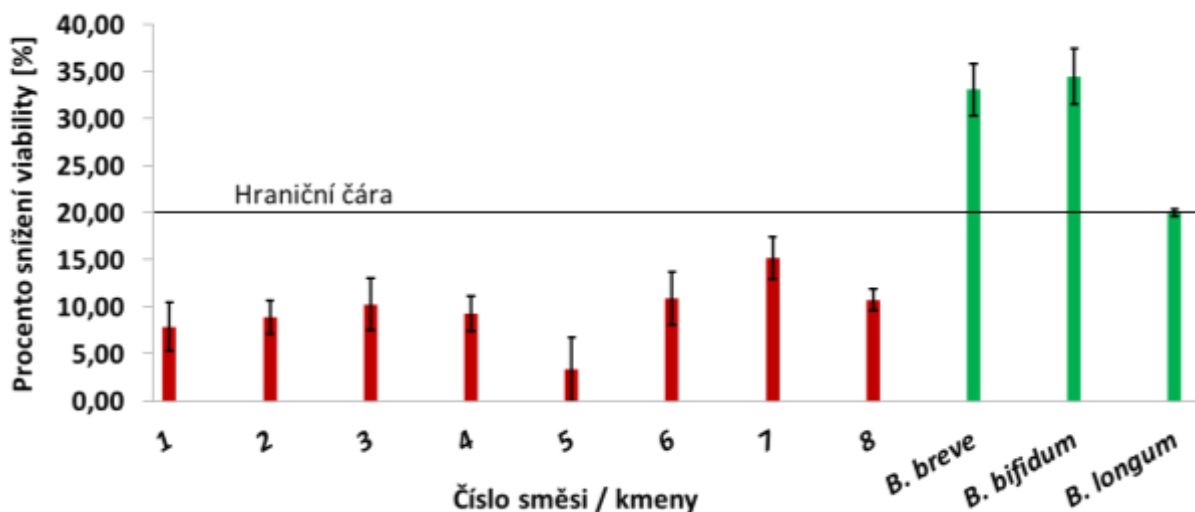
V grafu je vidět, že směs probiotik č. 5, tedy ta, která má nejnižší procento snížení viability, má ovšem i nejnižší nárůst buněk před trávením.

V porovnání všech směsí probiotik se samostatnými kmeny z rodu *Bifidobacterium*, uvedených v tabulce 17, vyšla pozitivně naše domněnka, že by spolu kmeny probiotik mohly spolupracovat, jelikož všechny směsi probiotik vyšly v porovnání s procentem snížení viability lépe než samostatné kmeny probiotik. Nejnižší procento snížení viability z kmenů probiotik bylo u *Bifidobacterium longum* CCM 4990, a to o 20,04 %. Tato hodnota je však pořád vyšší i v porovnání s nejvyšším procentem snížení viability u směsí probiotik. Nejvyšší hodnota u směsí probiotik vyšla u směsi č. 7 a to 15,23 % snížení viability.

Tabulka 18: Modelové trávení směsí

Č. s.	Složení směsi	Před trávením			Po trávení			Procento snížení viability [%]
		A	Průměr	Počet buněk	A	Průměr	Počet buněk	
1	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>	1,932	1,970	$5,07 \cdot 10^9 \pm 8,29 \cdot 10^7$	1,852	1,822	$4,67 \cdot 10^9 \pm 9,46 \cdot 10^7$	<b>7,88 ± 2,58</b>
		1,970			1,773			
		2,007			1,841			
2	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	1,800	1,787	$4,58 \cdot 10^9 \pm 6,65 \cdot 10^7$	1,632	1,637	$4,17 \cdot 10^9 \pm 2,04 \cdot 10^7$	<b>8,87 ± 1,78</b>
		1,753			1,648			
		1,809			1,632			
3	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	2,001	2,002	$5,16 \cdot 10^9 \pm 1,77 \cdot 10^7$	1,878	1,806	$4,63 \cdot 10^9 \pm 1,46 \cdot 10^8$	<b>10,27 ± 2,77</b>
		1,994			1,748			
		2,010			1,792			
4	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	1,971	1,954	$5,03 \cdot 10^9 \pm 4,89 \cdot 10^7$	1,750	1,781	$4,56 \cdot 10^9 \pm 6,06 \cdot 10^7$	<b>9,29 ± 1,84</b>
		1,962			1,801			
		1,929			1,793			
5	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	1,378	1,402	$3,54 \cdot 10^9 \pm 4,68 \cdot 10^7$	1,273	1,358	$3,42 \cdot 10^9 \pm 1,63 \cdot 10^8$	<b>3,37 ± 3,38</b>
		1,410			1,394			
		1,418			1,407			
6	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	2,046	2,029	$5,23 \cdot 10^9 \pm 3,65 \cdot 10^7$	1,794	1,818	$4,66 \cdot 10^9 \pm 1,22 \cdot 10^8$	<b>10,91 ± 2,84</b>
		2,013			1,881			
		2,028			1,779			
7	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	2,057	2,042	$5,27 \cdot 10^9 \pm 5,00 \cdot 10^7$	1,709	1,746	$4,47 \cdot 10^9 \pm 7,86 \cdot 10^7$	<b>15,23 ± 2,24</b>
		2,016			1,780			
		2,053			1,748			
8	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	1,990	1,969	$5,07 \cdot 10^9 \pm 6,52 \cdot 10^7$	1,768	1,768	$4,53 \cdot 10^9 \pm 1,28 \cdot 10^6$	<b>10,73 ± 1,13</b>
		1,981			1,768			
		1,935			1,767			

Pro lepší znázornění byl sestaven graf, viz obrázek 26, kde je znázorněna po trávení jednotlivých kmenů z rodu *Bifidobacterium* a směsí probiotik. Hraniční čára určuje hranici, která je dána hodnotou nejnižšího procenta snížení viability u rodu *Bifidobacterium*, a to o 20,04 %. Ta názorně ukazuje fakt, že u směsí probiotik bylo, díky spolupráci jednotlivých kmenů, daleko nižší procento snížení viability.



Obrázek 26: Porovnání procenta snížení viability po trávení směsí a jednotlivých kmenů z rodu *Bifidobacterium*

## 5.5 Vliv enkapsulace a lyofilizace na viabilitu probiotických bakterií

V další části práce bylo provedeno modelové trávení u lyofilizovaných alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými buňkami, které bylo srovnáno s modelovým trávením neenkapsulovaných probiotických buněk. Enkapsulace probiotických buněk byla provedena do alginátových částic dle postupu uvedeného v kapitole 4.6.11.1. Testování bylo provedeno pouze pro kmen *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>.

Stanovení počtu buněk před a po trávení bylo v tomto případě provedeno nepřímým stanovením, tedy kultivační metodou dle postupu uvedeného v kapitole 4.6.4. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

Získané hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce 17. Před vlastním provedením modelového trávení u enkapsulovaných buněk byly lyofilizované alginátových částic nejprve rehydratovány.

Tabulka 19: Srovnání modelové trávení neenkapsulované a enkapsulované varianty kmene *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>

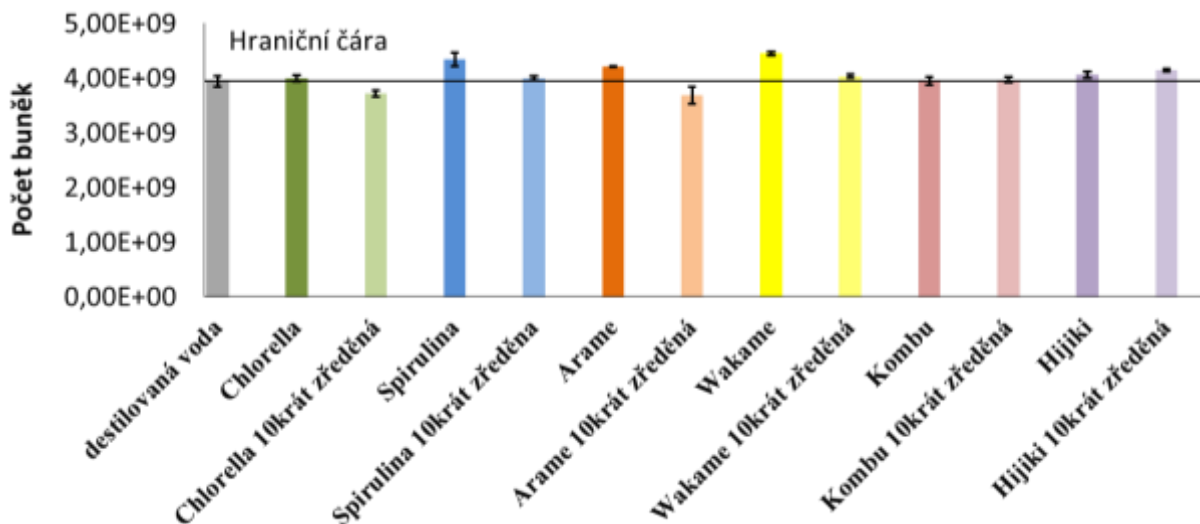
Počet buněk před trávením	Počet buněk po trávení	Procento snížené viability [%]
<b><i>Bifidobacterium breve</i> CCM 7825<sup>T</sup></b>		
$4,61 \cdot 10^9 \pm 2,49 \cdot 10^8$	$3,08 \cdot 10^9 \pm 7,03 \cdot 10^7$	<b>33,07 ± 2,80</b>
<b><i>Bifidobacterium breve</i> CCM 7825<sup>T</sup> enkapsulovaný do alginátových částic s následnou lyofilizací</b>		
$2,39 \cdot 10^9 \pm 4,33 \cdot 10^7$	$2,08 \cdot 10^9 \pm 4,21 \cdot 10^7$	<b>12,96 ± 1,76</b>

Dle dosažených výsledků lze potvrdit i náš další předpoklad, a to ten, že enkapsulací lze významně zvýšit viabilitu buněk rodu *Bifidobacterium* po průchodu trávicím traktem.

## 5.6 Vliv řas a sinic na viabilitu probiotických bakterií

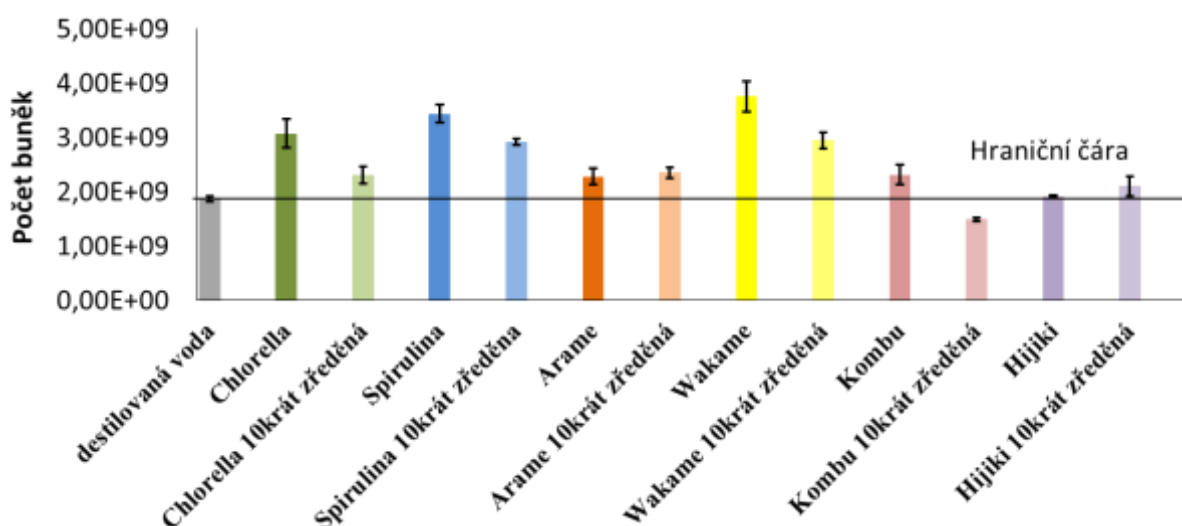
Z růstových křivek z postupu uvedeného v kapitole 4.6.3.4 a pomocí kalibrační závislosti z kapitoly 5.1 byly sestrojeny dva grafy, viz obrázek 27 a obrázek 28. Sledován byl antimikrobiální účinek testovaných řas a sinic na probiotické buňky. Tato závislost byla testována z důvodu možného přidávání těchto komponent do probiotických preparátů připravovaných k senzoričké analýze, kdy bylo nutné ověřit, zda nebude negativně ovlivněna viabilita použitých probiotických buněk. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

Na obrázku 27 je vidět vliv řas a sinic na kmen *Lactobacillus casei* CCM 4798. Hraniční čára nám ukazuje maximální počet buněk, kterého bylo dosaženo kultivací bez přídavku testovaných vzorků. V porovnání blanku s kultivacemi s extrakty z řas a sinic můžeme říci, že použité řasy a sinice nevykazují negativní vliv na viabilitu probiotického kmene, i když mají potenciálně antimikrobiální účinek [59]. V případě extraktů Chlorelly a Arame, kdy oba tyto extrakty byly 10krát zředěny, byla v době ukončení měření ve srovnání s kontrolou stanovena nižší koncentrace buněk. Obě růstové křivky se však stále ještě nacházely v exponenciální fázi růstu. Lze tedy předpokládat, že probiotické bakterie byly pouze slabě inhibovány a jejich růst byl pouze malinko zpomalen. Naopak u použití koncentrovanějších extraktů bylo ve srovnání s kontrolní kultivací zaznamenáno zvýšení koncentrace probiotických buněk. Tento fakt mohl být způsoben využitím aktivních látek extraktu probiotickou kulturou.



Obrázek 27: Vliv řas a sinic na *Lactobacillus casei*

Na obrázku 28 je vidět vliv řas a sinic na kmen *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. I zde nám hraniční čára ukazuje maximální počet buněk, kterého bylo dosaženo v kontrolní kultivaci. V porovnání blanku s extrakty z řas a sinic můžeme tvrdit, že použité řasy a sinice zde opět nevykazují negativní vliv na viabilitu testovaného probiotického kmene. V případě extraktu Kombu, který byl 10krát zředěn, bylo zaznamenáno zpomalení růstu stejně, jak tomu bylo u kmene *Lactobacillus casei*. V grafu je, kromě Arame a Hijiki, opět vidět trend pozorovaný v předchozím případě, kdy byl větší nárůst probiotických buněk zaznamenán u extraktů s vyšší koncentrací aktivních látek. Ovšem v porovnání s kmenem *Lactobacillus casei*, zde není celkový nárůst buněk tak vysoký.



Obrázek 28: Vliv řas a sinic na *Bifidobacterium breve*

Na základě obou grafů, můžeme teda tvrdit, že všechny použité řasy a sinice, nemají na probiotické bakterie antimikrobiální účinek a ve většině případů mají na jejich růst pozitivní vliv. Lze, je tedy použít do probiotických doplňků stravy.

## 5.7 Stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA spektrofotometricky

Na přístroji NanoDrop 2000 byla proměřena absorbance vyizolované DNA, dle postupu uvedeného v kapitole 4.6.8, v rozmezí vlnových délek 220–280 nm. Výsledky stanovení pro jednotlivé směsi a kmenů probiotických bakterií jsou uvedeny v tabulce 19. Písmenka a, b, c značí opakování. Pokud poměr  $A_{260/280 \text{ nm}}$  vyšel v rozmezí 1,8–2,0, byl považován za čistou DNA, poměr vyšší než 2,0 značil znečištění RNA. Nižší hodnota než cca 1,8 indikovala znečištění proteiny. Z tabulky 20 vyplývá, že ani jeden ze vzorků nebyl znečištěn proteiny.

Tabulka 20: Spektrofotometrické stanovení DNA

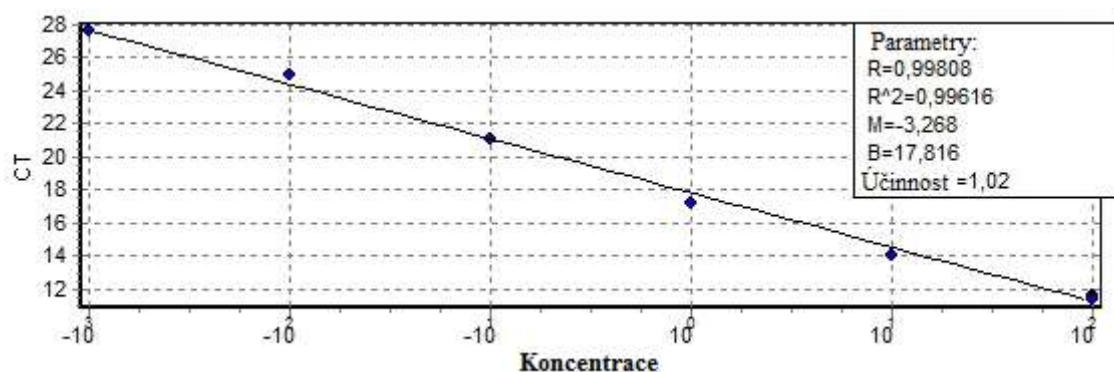
Vz.	A <sub>260 nm</sub>	A <sub>280 nm</sub>	A <sub>260/280 nm</sub>	C <sub>DNA</sub> [ng/μl]	Vz.	A <sub>260 nm</sub>	A <sub>280 nm</sub>	A <sub>260/280 nm</sub>	C <sub>DNA</sub> [ng/μl]
1a	1,502	0,745	2,02	75,1	7a	4,559	2,543	1,79	227,9
1b	2,498	1,224	2,04	124,9	7b	3,663	1,984	1,85	183,1
1c	2,425	1,255	1,93	121,3	7c	2,389	1,283	1,86	119,4
2a	1,999	1,022	1,96	100,0	8a	1,987	0,996	1,99	99,3
2b	1,984	1,014	1,96	99,2	8b	2,695	1,381	1,95	134,7
2c	1,673	0,902	1,86	83,6	8c	2,459	1,216	2,02	122,9
3b	3,129	1,518	2,06	156,4	9a	6,879	3,361	2,05	277,0
3c	2,330	1,179	1,98	116,5	9b	5,539	2,772	2,00	183,2
4a	2,357	1,272	1,85	117,9	9c	3,663	1,760	2,08	343,9
4b	1,947	0,981	1,98	97,4	10a	5,409	2,606	2,08	270,5
4c	1,895	0,956	1,98	94,8	10b	6,801	3,337	2,04	340,0
5a	1,690	0,928	1,82	84,5	10c	7,236	3,626	2,00	361,8
5b	2,223	1,138	1,95	111,1	11a	5,099	2,442	2,09	255,0
5c	1,966	1,034	1,90	98,3	11b	5,279	2,579	2,05	264,0
6a	2,517	1,291	1,95	125,9	11c	4,235	2,059	2,06	211,7
6b	2,302	1,127	2,04	115,1	12a	5,106	2,584	1,98	255,3
6c	2,537	1,283	1,98	126,9	12b	4,867	2,386	2,04	243,4
					12c	2,615	1,321	1,98	130,7

## 5.8 PCR v reálném čase

Vyizolovaná DNA směsí probiotik a jednotlivých kmenů z kapitol 4.6.6 a 4.6.7, byla přidána do směsi pro PCR, viz tabulka 10 a tabulka 11, a byla provedena PCR podle kapitoly 4.6.9.

### 5.8.1 Prokázání přítomnosti DNA domény *Bacteria* metodou PCR

Purifikovaná DNA *E.coli* byla vyředěna desítkovým ředěním TE pufrém na koncentrace v rozmezí od 0,001 ng/μl do 100 ng/μl. Takto zředěná DNA byla použita pro sestavení kalibrační křivky. Následně byla provedena PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria*. Pomocí kalibrační křivky byla určena koncentrace DNA vyizolované z čistých kultur kmenů *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762, *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup> a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCM 4990. Kalibrační křivka standardů *E.coli* je na obrázku 30. Naměřené amplifikační křivky jsou znázorněny na obrázku 29.



Obrázek 29: Kalibrační závislost *E.coli*

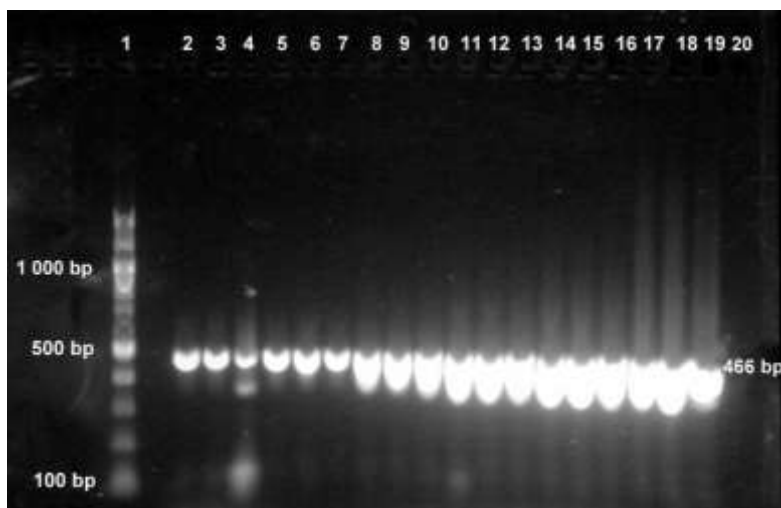
Z parametrů uvedených na obrázku 29 byla sestrojena rovnice:  $y = M \cdot x + B$ , kde M určuje sklon a B průsečík. Z této rovnice po dosazení parametrů byly spočítány jednotlivé koncentrace DNA, uvedené v tabulce 21. Jelikož byly použity naředěné vzorky pro měření, koncentrace byla vynásobena původním zředěním. Tyto koncentrace byly následně použity pro vytvoření jednotlivých kalibračních závislostí pro rodově specifické PCR a poté i pro specifickou PCR jednotlivých druhů.

Tabulka 21: Spočítané koncentrace DNA odpovídající specifické sekvenci domény Bacteria pro jednotlivé kmeny (nezřaděné)

Vzorek	C <sub>T</sub>	Spočítaná koncentrace ng/μl	Vzorek	C <sub>T</sub>	Spočítaná koncentrace ng/μl	Vzorek	C <sub>T</sub>	Spočítaná koncentrace ng/μl
9a	23,24	0,7312	10c	18,29	25,2100	12b	23,78	0,3501
9a	23,65	0,5476	10c	21,20	3,2436	12b	23,66	0,3804
9a	23,39	0,6578	10c	20,31	6,0861	12b	23,67	0,3758
9b	18,11	14,0361	11a	15,32	142,2421	12c	23,02	0,3090
9b	18,13	13,9253	11a	18,56	14,5261	12c	23,43	0,2305
9b	19,03	7,3489	11a	19,83	5,9290	12c	22,63	0,4068
9c	15,44	142,2923	11b	19,48	7,8842	100 ng/μl	11,65	77,3263
9c	17,25	39,8684	11b	16,22	78,2345			
9c	13,48	566,2990	11b	17,68	27,9019			
10a	16,27	77,6524	11c	19,03	8,5985	100 ng/μl	11,4	92,2524
10a	16,57	62,6737	11c	18,46	12,8362	10 ng/μl	14,01	14,6431
10a	17,31	37,1056	11c	20,69	2,6564	1 ng/μl	17,23	1,5162
10b	22,81	0,9768	12a	22,92	0,6746	0,1 ng/μl	21,04	0,1032
10b	21,44	2,5740	12a	21,55	1,7711	0,01 ng/μl	24,86	0,007
10b	21,07	3,3231	12a	21,30	2,0998	0,001 ng/μl	27,58	0,001

Pro zjištění velikosti produktů byla provedena agarosová gelová elektroforéza, podle postupu uvedeného v kapitole 4.6.10. V obou případech, uvedených na obrázku 30 a na obrázku 31, byla velikost produktů 466 bp. Byly detekovány produkty PCR o velmi silné intenzitě. Intenzita detekovaných produktů pro jednotlivé kmeny a kalibrační závislost je uvedena v tabulce 22 a v tabulce 23.

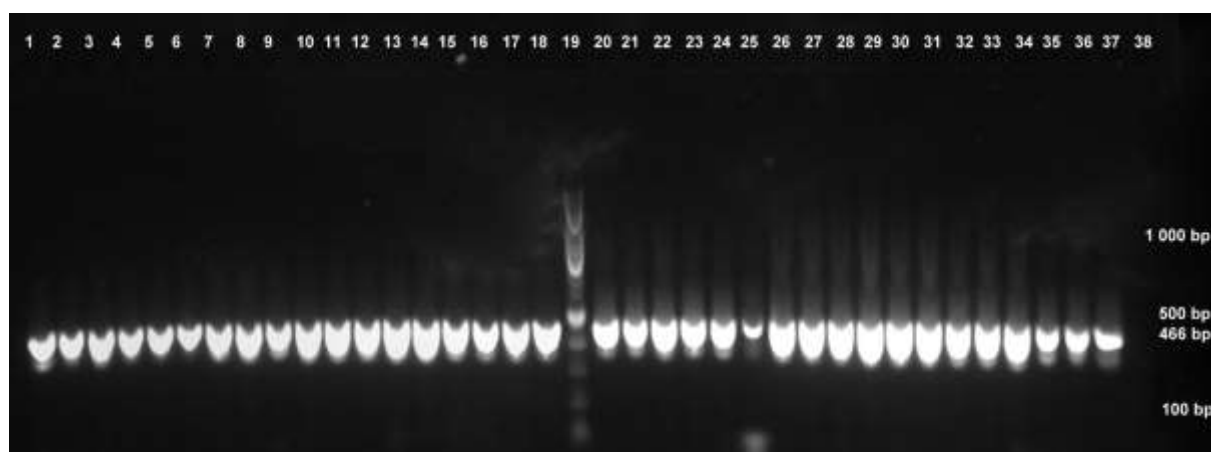




Obrázek 30: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR, kalibrační závislost *E.coli*, specifických pro doménu *Bacteria*

Tabulka 22: Vyhodnocení produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria* z agarosového gelu, kalibrační závislost *E.coli* (- nedetekováno, PCR produkt: +++ silné intenzity)

Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR
1	DNA standart (100 bp)	-	8	0,1 ng/μl	+++	15	10 ng/μl	+++
2	0,001 ng/μl	+++	9	0,1 ng/μl	+++	16	10 ng/μl	+++
3	0,001 ng/μl	+++	10	0,1 ng/μl	+++	17	100 ng/μl	+++
4	0,001 ng/μl	+++	11	1 ng/μl	+++	18	100 ng/μl	+++
5	0,01 ng/μl	+++	12	1 ng/μl	+++	19	100 ng/μl	+++
6	0,01 ng/μl	+++	13	1 ng/μl	+++	20	NK	-
7	0,01 ng/μl	+++	14	10 ng/μl	+++			

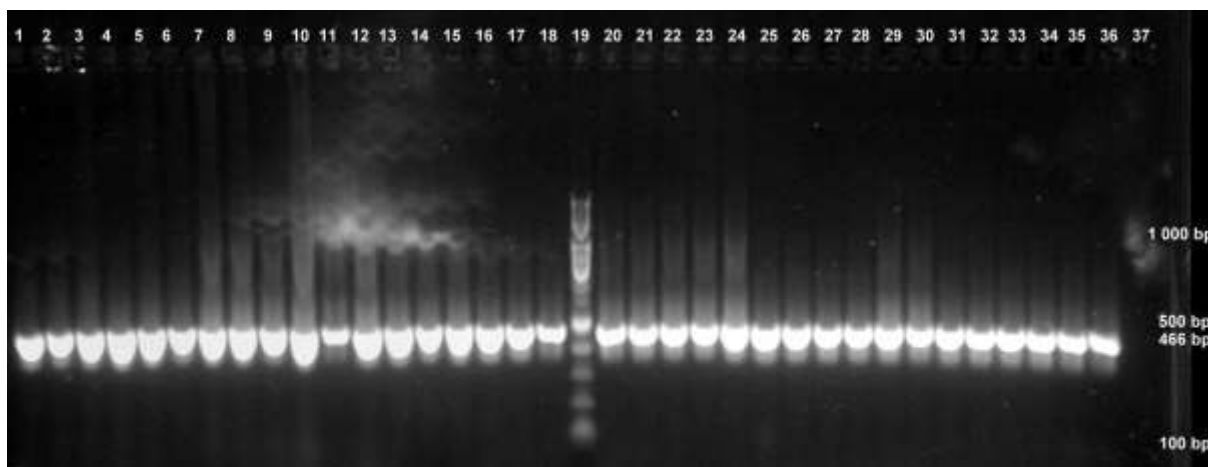


Obrázek 31: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR, jednotlivých, samostatných kmenů, specifických pro doménu *Bacteria*

Tabulka 23: Vyhodnocení produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria* z agarosového gelu, samostatné kmeny (- nedetekováno, PCR produkt: +++ silné intenzity)

Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR
1	12c	+++	14	11b	+++	27	10a	+++
2	12c	+++	15	11b	+++	28	10a	+++
3	12c	+++	16	11a	+++	29	9c	+++
4	12b	+++	17	11a	+++	30	9c	+++
5	12b	+++	18	11a	+++	31	9c	+++
6	12b	+++	19	DNA standart (100 bp)	-	32	9b	+++
7	12a	+++	20	10c	+++	33	9b	+++
8	12a	+++	21	10c	+++	34	9b	+++
9	12a	+++	22	10c	+++	35	9a	+++
10	11c	+++	23	10b	+++	36	9a	+++
11	11c	+++	24	10b	+++	37	9a	+++
12	11c	+++	25	10b	+++	38	NK	-
13	112	+++	26	10a	+++			

Dále byla provedena PCR na prokázání přítomnosti DNA domény *Bacteria* pro neřaděné vzorky jednotlivých kmenů a jednotlivých směsí probiotik. Velikost produktů byla 466 bp, viz obrázek 32. U všech vzorků byla detekována silná intenzita produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria*, viz tabulka 24.

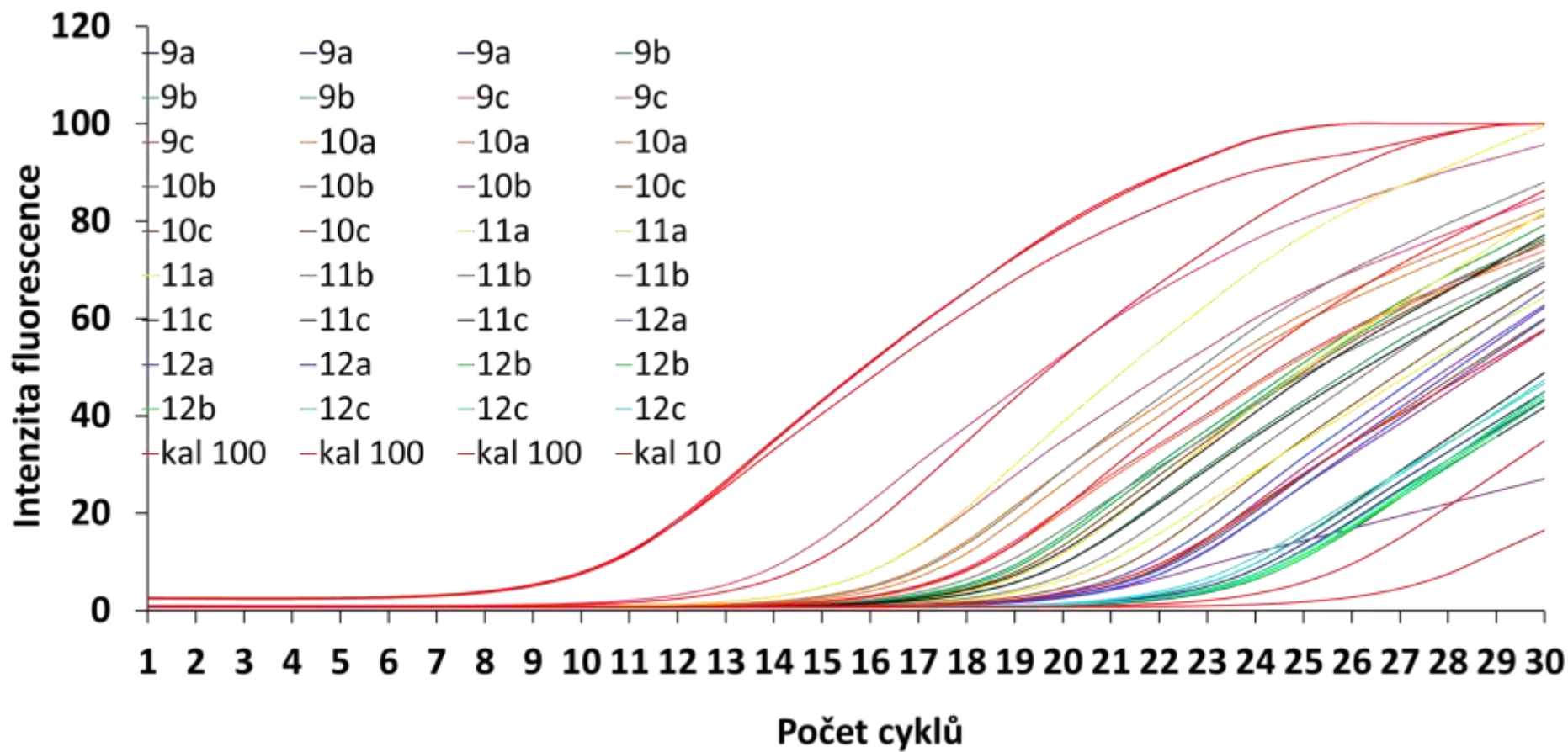


Obrázek 32: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR, samostatných kmenů i směsí, specifických pro doménu *Bacteria*

Tabulka 24: Vyhodnocení produktů PCR specifických pro doménu Bacteria z agarosového gelu, jednotlivé směsi (- nedetekováno, PCR produkt: +++ silné intenzity)

Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR
1	12c	+++	14	8b	+++	27	4b	+++
2	12b	+++	15	8a	+++	28	4a	+++
3	12a	+++	16	7c	+++	29	3c	+++
4	11c	+++	17	7b	+++	30	3b	+++
5	11b	+++	18	7a	+++	31	2c	+++
6	11a	+++	19	DNA standart (100 bp)	-	32	2b	+++
7	10c	+++	20	6c	+++	33	2a	+++
8	10b	+++	21	6b	+++	34	1c	+++
9	10a	+++	22	6a	+++	35	1b	+++
10	9c	+++	23	5c	+++	36	1a	+++
11	9b	+++	24	5b	+++	37	NK	-
12	9a	+++	25	5a	+++			
13	8c	+++	26	4c	+++			

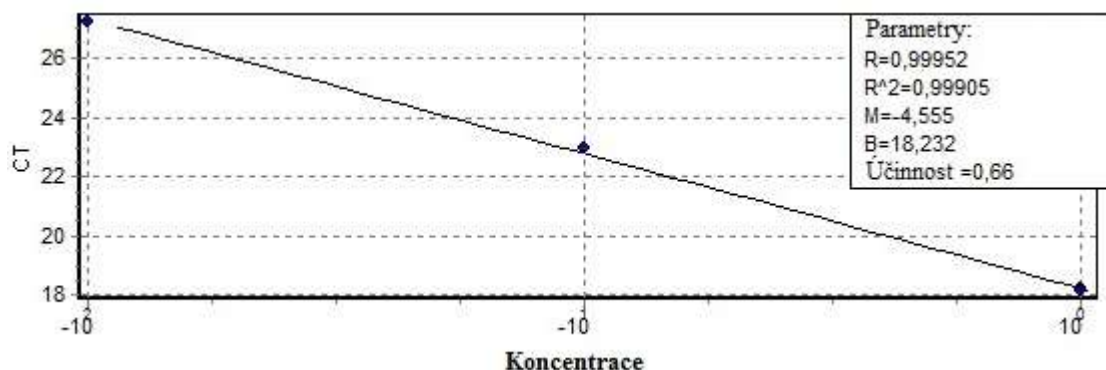
V jednotlivých směsích i v jednotlivých kmenech byla prokázána přítomnost bakteriální DNA. Obrázek 33 zobrazuje amplifikační křivky.  $C_T$  je označení pro tzv. „threshold cycle“ (cyklus prahu). Čím nižší je koncentrace DNA, tím vyšší je hodnota  $C_T$ . Pokud je tedy hodnota  $C_T$  příliš velká, amplifikační křivka nestihne v rámci 30 cyklů dosáhnout 100% intenzity fluorescence. Sklon amplifikačních křivek je větší, což způsobuje snížení korelačního koeficientu při výpočtu koncentrace DNA.



Obrázek 33: Amplifikační křivky kalibrační křivky E.coli a jednotlivých kmenů

## 5.8.2 Prokázání přítomnosti DNA rodu *Lactobacillus* metodou PCR

Pro sestavení kalibrační křivky pro PCR specifickou pro rod *Lactobacillus* byl vybrán vzorek DNA 12a (*Lactobacillus casei* CCM 4798). DNA byla zředěna desítkovým ředěním TE pufrům na koncentrace v rozmezí od 0,01 do 1 ng/μl a přidána do směsi PCR. Naměřenou kalibrační závislost lze vidět na obrázku 34.



Obrázek 34: Kalibrační závislost rodu *Lactobacillus*

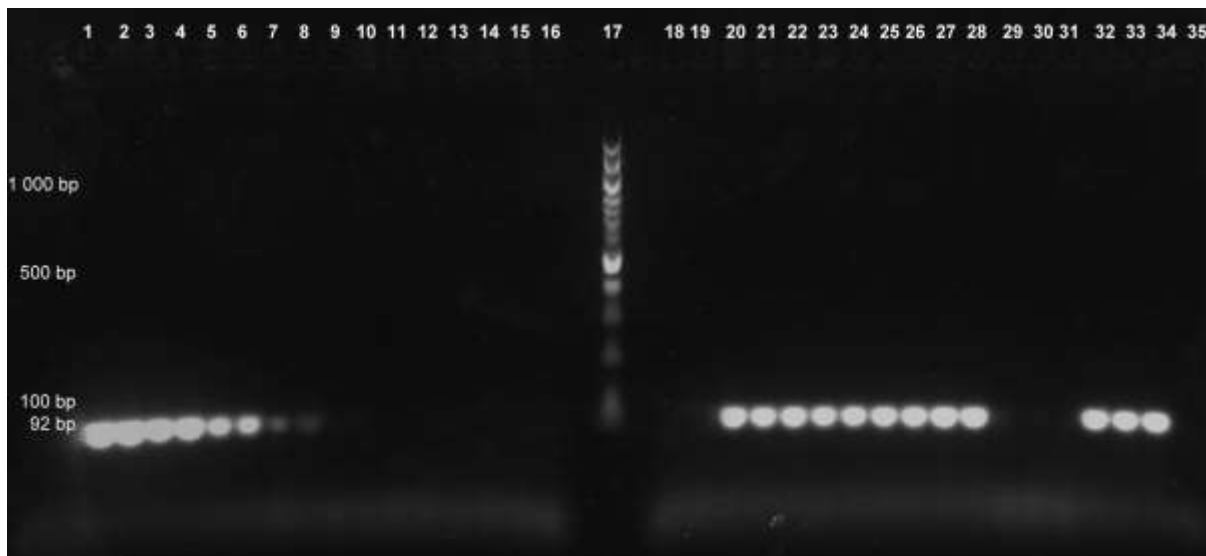
Byla sestavena rovnice:  $y = M \cdot x + B$ . Na základě této rovnice byla vypočítána původní koncentrace DNA ve směsi probiotik přidané do PCR směsi, která odpovídá specifické sekvenci rodu *Lactobacillus*, viz tabulka 25.

Tabulka 25: Spočítaná koncentrace DNA odpovídající specifické sekvenci rodu *Lactobacillus* ve vzorcích směsí probiotik

Vzorek	Ct	Spočítaná koncentrace ng/μl	Vzorek	Ct	Spočítaná koncentrace ng/μl
1a	-	-	6a	26,15	0,018 3 ± 0,000 5
1b	-	-	6b	25,50	0,025 3 ± 0,000 7
1c	-	-	6c	25,63	0,023 8 ± 0,000 6
2a	-	-	7a	-	-
2b	-	-	7b	-	-
2c	-	-	7c	-	-
3b	-	-	8a	25,86	0,021 2 ± 0,000 7
3c	-	-	8b	26,20	0,017 8 ± 0,000 6
4a	26,34	0,016 6 ± 0,000 5	8c	27,64	0,008 6 ± 0,000 2
4b	26,55	0,014 9 ± 0,000 4	kal 1	18,21	1,010 7 ± 0,028 1
4c	26,38	0,016 2 ± 0,000 4	kal 1	18,15	1,039 7 ± 0,029 9
5a	27,08	0,011 4 ± 0,000 3	kal 0,1	22,98	0,090 6 ± 0,002 5
5b	26,79	0,013 2 ± 0,000 3	kal 0,01	27,25	0,010 5 ± 0,000 2
5c	26,64	0,014 2 ± 0,000 4	NK	-	-

Dle výsledků PCR nebyla ve vzorcích 1a až 3c a 7a až 7c detekována přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus*, což je v souladu s tabulkou 18, kde je uvedeno složení směsí bakteriálních kultur. Do vzorků 1a až 3c a 7a až 7c nebyla přidána bakteriální kultura *Lactobacillus casei* CCM 4798. Tabulka 24 ukazuje, že ve vzorcích 1a až 3c a 7a až 7c, nebyla určena žádná koncentrace rodu *Lactobacillus*. Pokud tuto informaci porovnáme s tabulkou 18, ve které je uvedeno složení směsí, dojdeme k závěru, že v těchto vzorcích správně nemůže být spočítána koncentrace rodu *Lactobacillus*, neboť v těchto vzorcích se kmen *Lactobacillus casei*

CCM 4798 nenachází. Složení směsi i zvolený teplotní program byl správný. Jednotlivé vzorky spolu s intenzitou popisuje tabulka 26. Z agarosové gelové elektroforézy, viz obrázek 35, je vidět, že vzorky, které neobsahují rod *Lactobacillus*, nevykazují žádnou intenzitu vyhodnocených produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus*. Velikost produktů byla 92 bp.

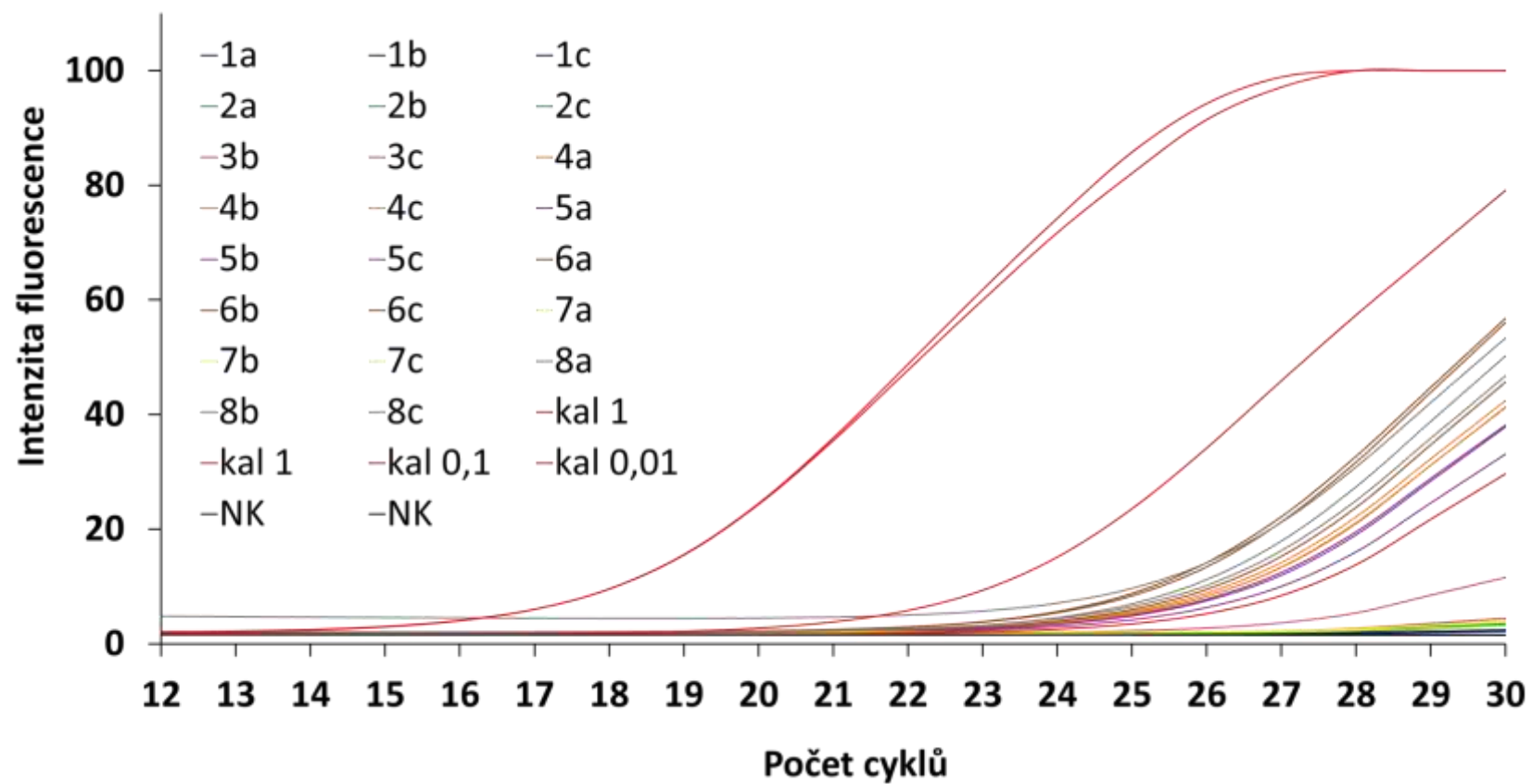


Obrázek 35: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR, vzorků směsi, specifických pro rod *Lactobacillus*

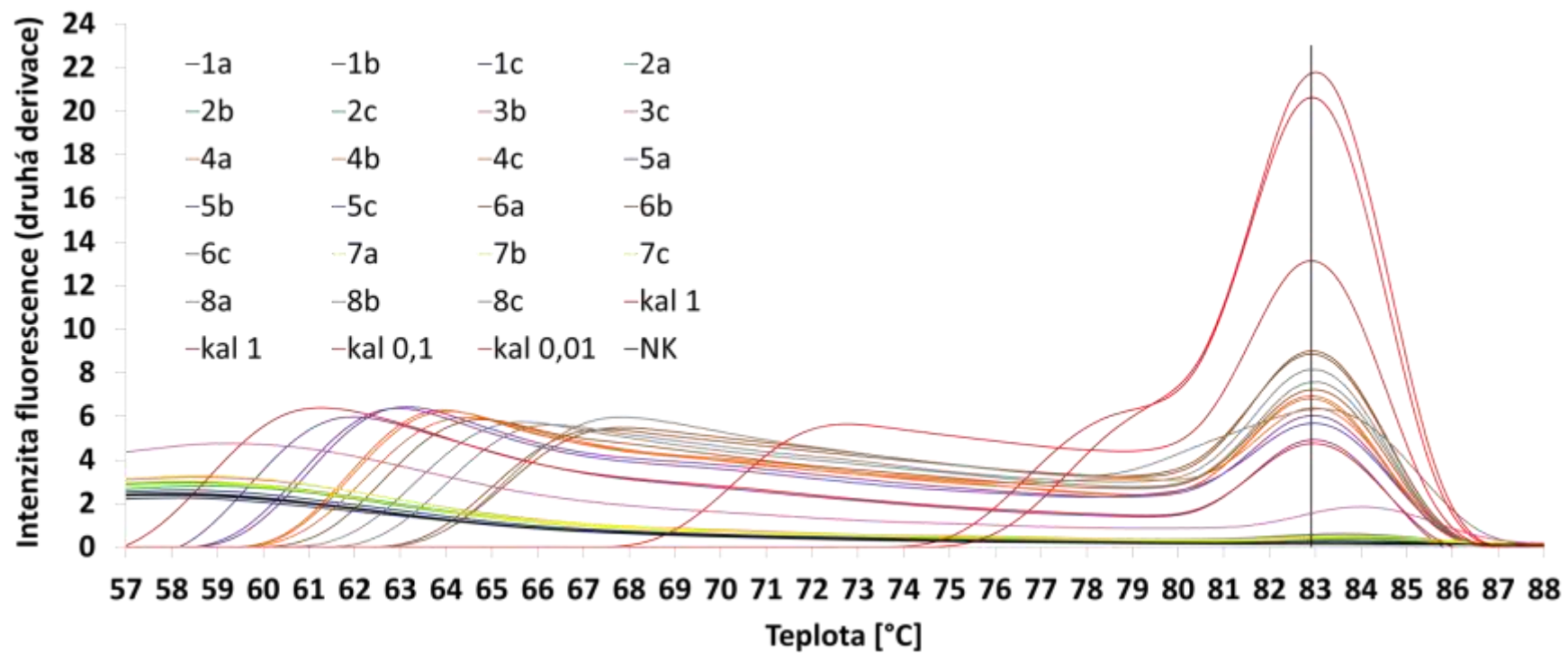
Tabulka 26: Vyhodnocení produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* z agarosového gelu, jednotlivé směsi (- nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR
1	1 ng/μl	+++	13	1c	-	25	5c	+++
2	1 ng/μl	+++	14	2a	-	26	6a	+++
3	0,1 ng/μl	+++	15	2b	-	27	6b	+++
4	0,1 ng/μl	+++	16	2c	-	28	6c	+++
5	0,01 ng/μl	+++	17	DNA standart (100 bp)	-	29	7a	-
6	0,01 ng/μl	+++	18	3b	-	30	7b	-
7	0,001 ng/μl	+++	19	3c	-	31	7c	-
8	0,001 ng/μl	+++	20	4a	+++	32	8a	+++
9	0,0001 ng/μl	+	21	4b	+++	33	8b	+++
10	0,0001 ng/μl	+	22	4c	+++	34	8c	+++
11	1a	-	23	5a	+++	35	NK	-
12	1b	-	24	5b	+++			

Obrázek 36 zobrazuje amplifikační křivky pro rod *Lactobacillus*. Sklon amplifikačních křivek je větší, což způsobuje snížení korelačního koeficientu při výpočtu koncentrace DNA. Obrázek 37 znázorňuje analýzu křivek tání. Melt analýza slouží pro potvrzení přítomnosti bakteriální DNA rodu *Lactobacillus* a vyloučení možné kontaminace PCR směsi. Tyto křivky potvrzují přítomnost DNA z rodu *Lactobacillus*. Teplota tání specifických produktů PCR byla určena na 82,91 °C.



Obrázek 36: Amplifikační křivky kalibrační křivky pro rod *Lactobacillus* a jednotlivých vzorků směsí probiotik

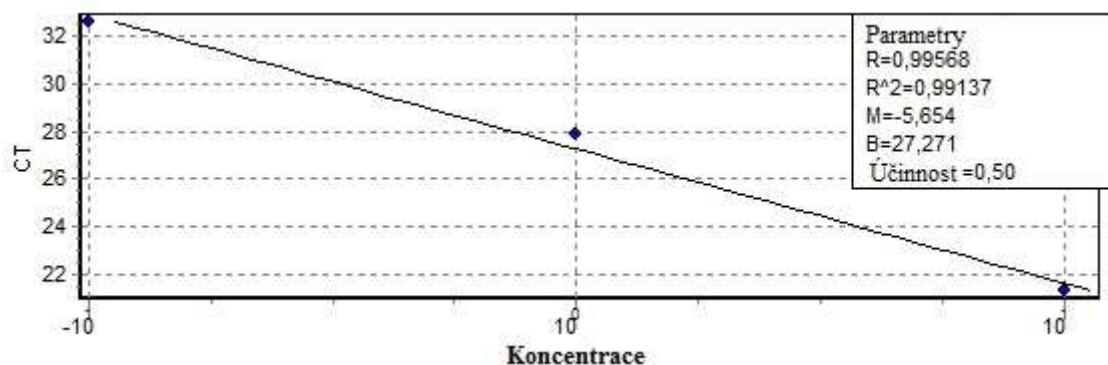


Obrázek 37: Melt analýza DNA pro rod *Lactobacillus* ( $T_m = 82,91$  °C)



### 5.8.3 Prokázání přítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium* metodou PCR

Pro sestavení kalibrační křivky pro PCR specifickou pro rod *Bifidobacterium* byl vybrán vzorek DNA 9b (*Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>). DNA byla zředěna desítkovým ředěním TE puřrem na koncentrace v rozmezí od 0,1 do 10 ng/μl a přidána do směsi PCR. Naměřenou kalibrační závislost lze vidět na obrázku 38.



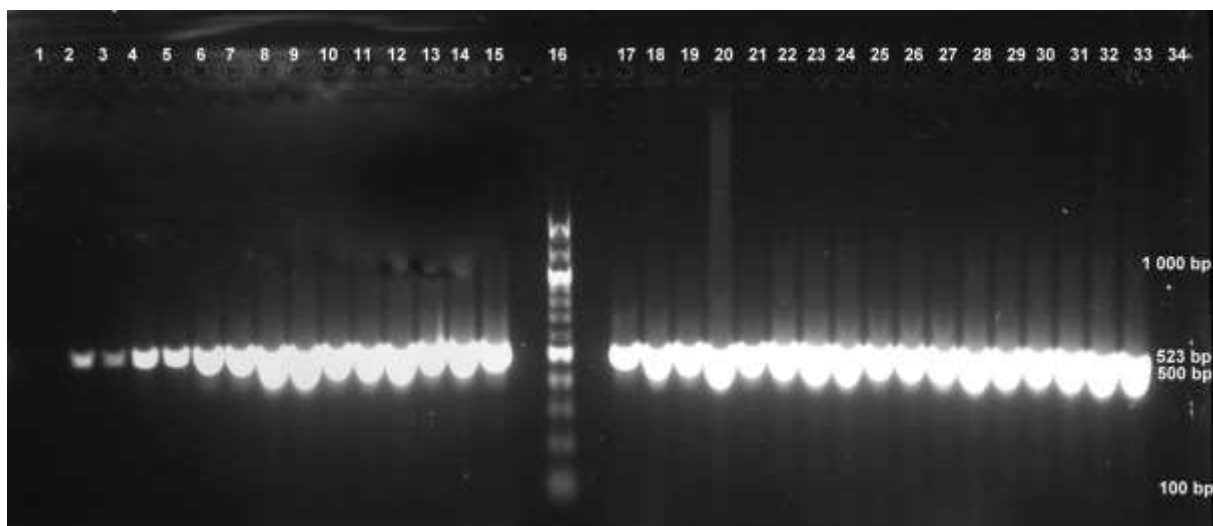
Obrázek 38: Kalibrační závislost rodu *Bifidobacterium*

Byla sestavena rovnice:  $y = M \cdot x + B$ . Na základě této rovnice byla vypočítána původní koncentrace DNA ve směsi probiotik přidané do PCR směsi, která odpovídá specifické sekvenci rodu *Bifidobacterium*, viz tabulka 27.

Tabulka 27: Spočítaná koncentrace DNA odpovídající specifické sekvenci rodu *Bifidobacterium* ve vzorcích směsi probiotik

Vzorek	Ct	Spočítaná koncentrace ng/μl	Vzorek	Ct	Spočítaná koncentrace ng/μl
1a	25,21	15,040 7 ± 0,601 6	6a	26,70	14,618 5 ± 0,397 5
1b	23,66	49,989 5 ± 1,428 6	6b	25,94	18,076 1 ± 0,526 8
1c	22,34	83,049 8 ± 2,290 9	6c	26,61	15,303 4 ± 0,428 0
2a	24,89	23,755 5 ± 0,853 7	7a	24,14	77,979 9 ± 2,022 3
2b	24,54	27,127 5 ± 0,895 6	7b	24,69	49,577 6 ± 1,516 7
2c	24,94	19,022 7 ± 0,760 9	7c	23,94	42,488 8 ± 1,164 1
3b	27,45	13,616 7 ± 0,540 1	8a	23,21	46,638 7 ± 1,310 0
3c	25,83	19,138 1 ± 0,764 7	8b	22,29	94,713 4 ± 2,450 6
4a	24,46	33,930 2 ± 0,932 8	8c	22,55	88,318 4 ± 2,292 8
4b	21,22	102,896 0 ± 2,058 0	kal 10	21,31	11,320 5 ± 0,314 5
4c	24,77	23,473 5 ± 0,674 4	kal 1	27,88	0,780 3 ± 0,022 3
5a	24,07	27,406 3 ± 0,756 9	kal 0,1	32,62	0,113 2 ± 0,003 1
5b	23,69	43,542 8 ± 1,116 4	NK	-	-
5c	24,56	26,632 2 ± 0,809 7	NK	-	-

DNA náležící do rodu *Bifidobacterium* byla identifikována ve všech vzorcích PCR v reálném čase i detekcí produktů PCR agarosovou gelovou elektroforézou, kde byla u všech vzorků identifikovaná silná intenzita PCR produktů pro rod *Bifidobacterium*, viz obrázek 39 a tabulka 28. Vzorky 1 a 2 nebyly detekovány, protože koncentrace DNA přítomné v PCR směsi byla příliš nízká na to, aby byla amplifikována. Velikost produktů byla 523 bp.

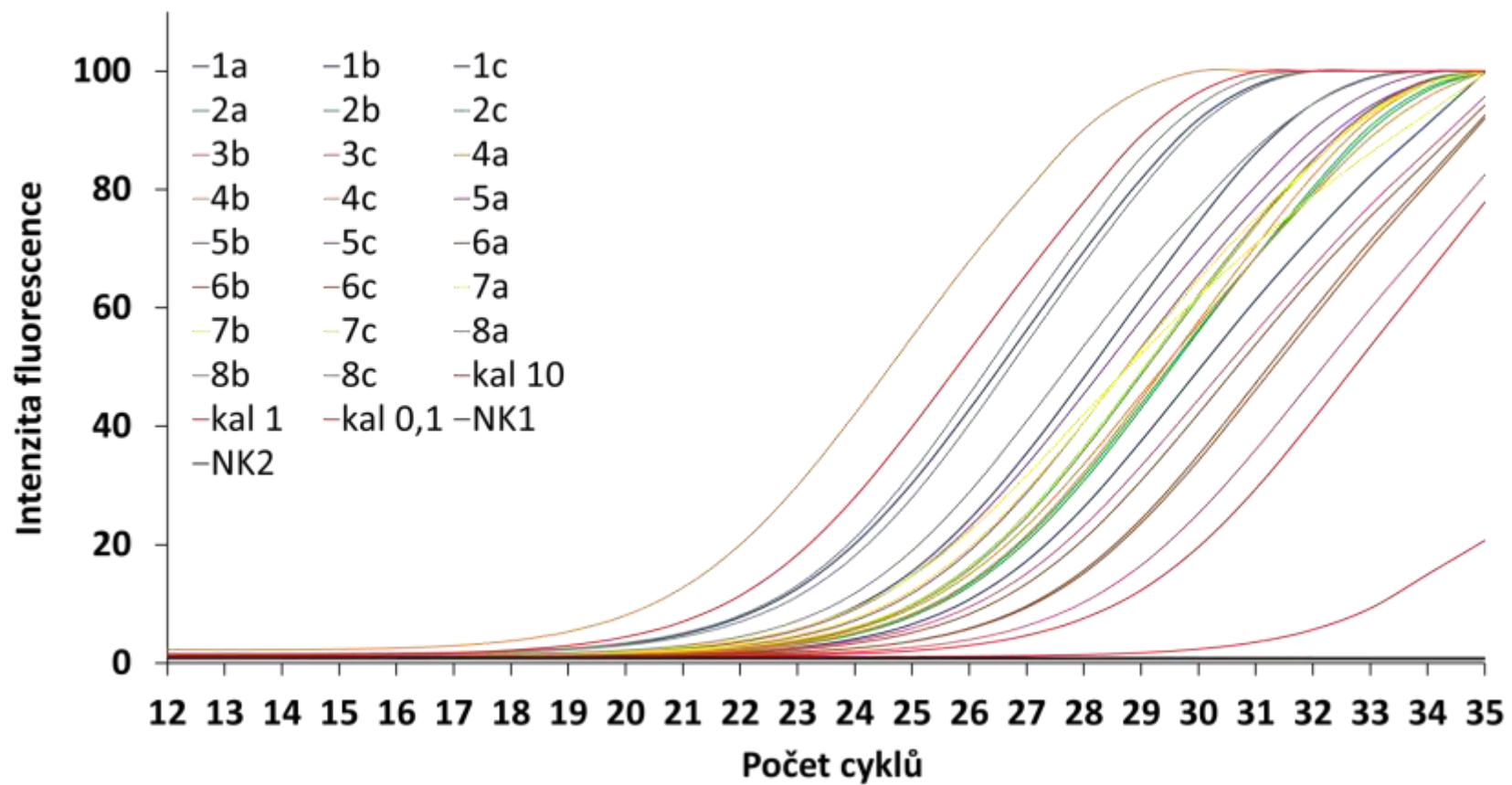


Obrázek 39: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR, jednotlivých směsí, specifických pro rod *Bifidobacterium*

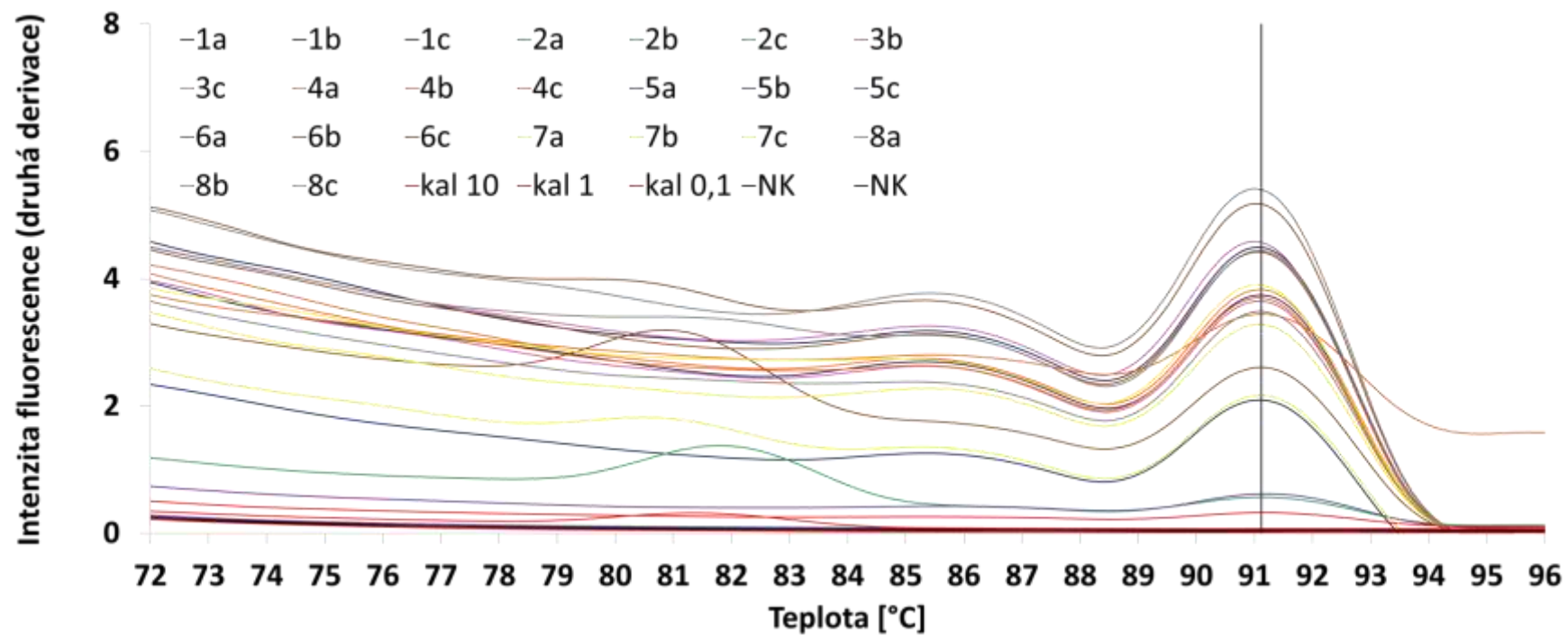
Tabulka 28: Vyhodnocení produktů PCR specifických pro rod *Bifidobacterium* z agarosového gelu, jednotlivé směsi (- nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR
1	0,001 ng/μl	-	13	2a	+++	25	6a	+++
2	0,01 ng/μl	++	14	2b	+++	26	6b	+++
3	0,01 ng/μl	++	15	2c	+++	27	6c	+++
4	0,1 ng/μl	+++	16	DNA standart (100 bp)	-	28	7a	+++
5	0,1 ng/μl	+++	17	3b	+++	29	7b	+++
6	1 ng/μl	+++	18	3c	+++	30	7c	+++
7	1 ng/μl	+++	19	4a	+++	31	8a	+++
8	10 ng/μl	+++	20	4b	+++	32	8b	+++
9	10 ng/μl	+++	21	4c	+++	33	8c	+++
10	1a	+++	22	5a	+++	34	NK	-
11	1b	+++	23	5b	+++			
12	1c	+++	24	5c	+++			

Obrázek 40 znázorňuje amplifikační křivky pro rod *Bifidobacterium*. Zde není patrný sklon amplifikačních křivek, tudíž nedochází k ovlivnění korelačního koeficientu při výpočtu koncentrace DNA. Obrázek 41 zobrazuje analýzu křivek tání. Tyto křivky potvrzují přítomnost DNA z rodu *Bifidobacterium*. Teplota tání specifických produktů PCR byla určena na 91,48 °C.



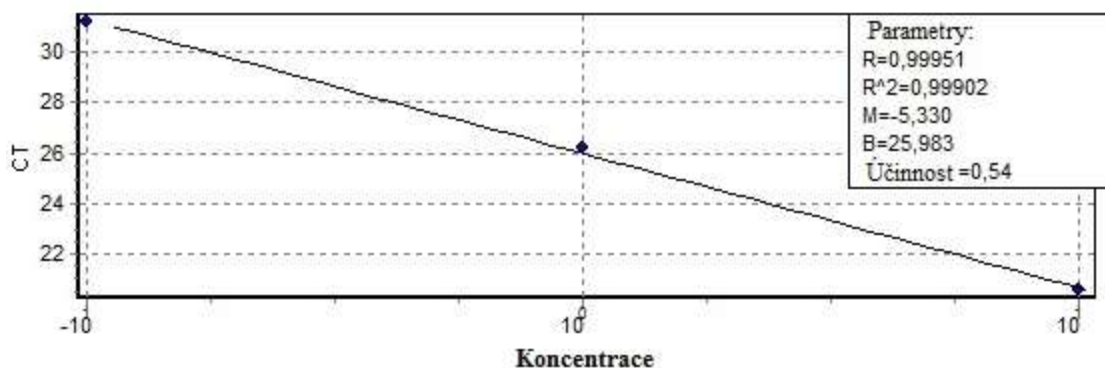
Obrázek 40: Amplifikační křivky kalibrační křivky pro rod *Bifidobacterium* a jednotlivých vzorků směsí probiotik



Obrázek 41: Melt analýza DNA pro rod *Bifidobacterium* ( $T_m = 91,48$  °C)

### 5.8.4 Druhově specifická PCR pro druh *Bifidobacterium breve*

Pro sestavení kalibrační křivky pro PCR specifickou pro druh *Bifidobacterium breve* byl vybrán vzorek DNA 9b (*Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>). DNA byla zředěna desítkovým ředěním TE pufrům na koncentrace v rozmezí od 0,1 do 10 ng/μl a přidána do směsi PCR. Naměřenou kalibrační závislost lze vidět na obrázku 42.



Obrázek 42: Kalibrační závislost *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>

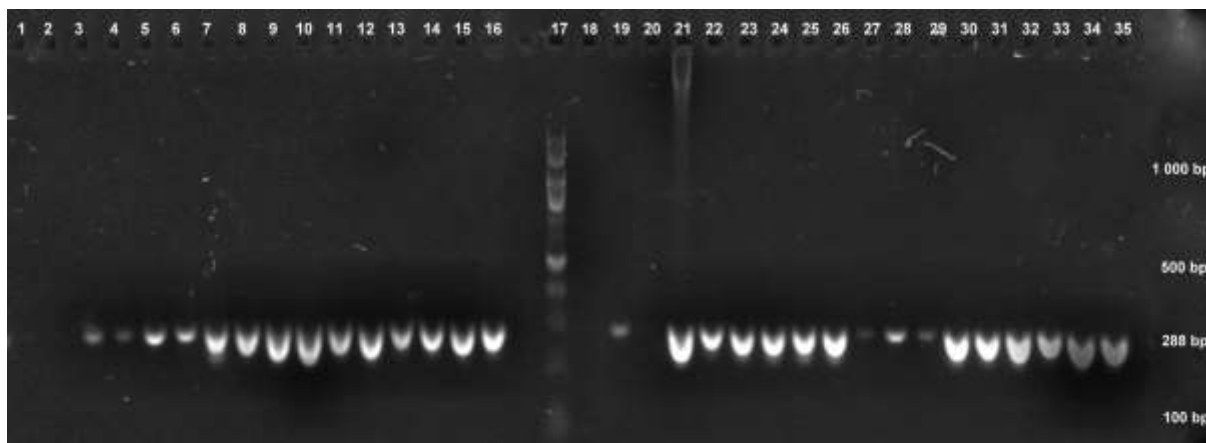
Byla sestavena rovnice:  $y = M \cdot x + B$ . Na základě této rovnice byla vypočítána původní koncentrace DNA přidané do PCR směsi, která odpovídá specifické sekvenci druhu *Bifidobacterium breve*, viz tabulka 29.

Tabulka 29: Spočítaná koncentrace DNA odpovídající specifické sekvenci druhu *Bifidobacterium breve* ve vzorcích směsí probiotik

Vzorek	Ct	Spočítaná koncentrace ng/μl	Vzorek	Ct	Spočítaná koncentrace ng/μl
1a	24,17	2,188 9 ± 0,062 3	6a	-	-
1b	22,12	5,294 9 ± 0,146 9	6b	32,41	0,062 2 ± 0,001 5
1c	24,28	2,085 1 ± 0,056 5	6c	-	-
2a	24,43	1,958 6 ± 0,059 9	7a	23,71	2,667 0 ± 0,074 6
2b	24,61	1,805 9 ± 0,062 5	7b	24,89	1,602 9 ± 0,044 2
2c	24,81	1,657 9 ± 0,047 4	7c	24,02	2,335 1 ± 0,064 3
3b	-	-	8a	23,26	3,243 1 ± 0,088 6
3c	-	-	8b	23,02	3,594 0 ± 0,099 7
4a	20,53	10,553 8 ± 0,587 9	8c	23,11	3,454 1 ± 0,095 8
4b	24,71	1,733 8 ± 0,039 3	kal 10	20,56	10,424 5 ± 0,324 4
4c	23,97	2,380 7 ± 0,078 2	kal 1	26,18	0,920 2 ± 0,025 6
5a	23,88	2,481 1 ± 0,072 4	kal 0,1	31,22	0,104 2 ± 0,002 9
5b	23,24	3,277 1 ± 0,091 1	NK	-	-
5c	24,14	2,219 4 ± 0,061 6	NK	-	-

Dle výsledků PCR byl kmen *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup> identifikovaný ve všech vzorcích, ve kterých měl tento kmen být v souladu s tabulkou 18. Ve vzorku 6 můžeme říct, že v tomto vzorku se kmen *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup> nevyskytuje, protože byla přítomnost DNA kmene *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup> identifikována jen v jednom (6b) ze tří opakování a jednalo se tedy s nejvyšší pravděpodobností o kontaminaci. Z agarosové gelové elektroforézy, viz obrázek 43, je vidět, že vzorky, které neobsahují kmen *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>, nevykazují téměř žádnou intenzitu vyhodnocených

produktů PCR specifických pro kmen *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>, viz tabulka 30. Velikost produktů byla 288 bp.

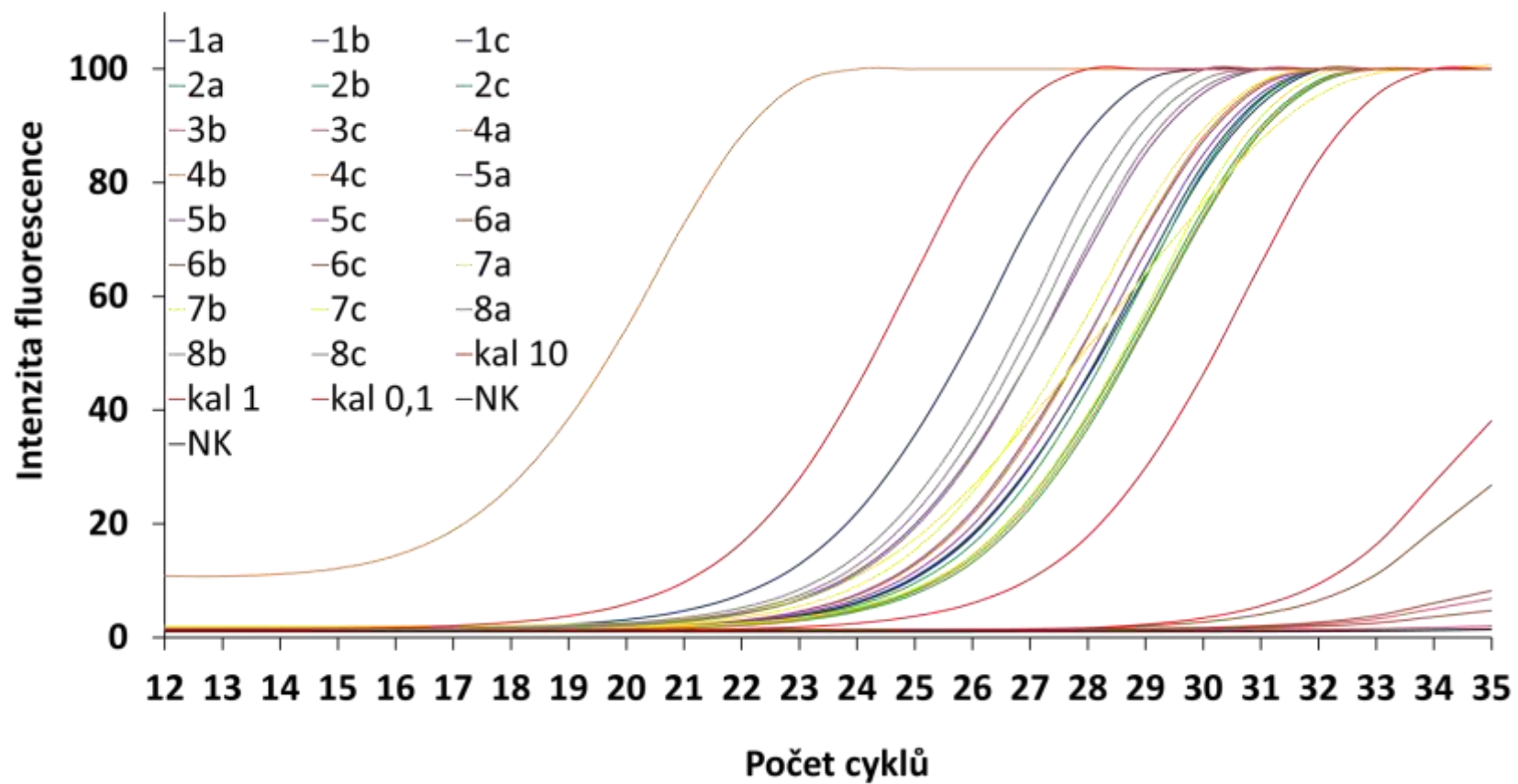


Obrázek 43: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR, jednotlivých směsí, specifických pro druh *Bifidobacterium breve*

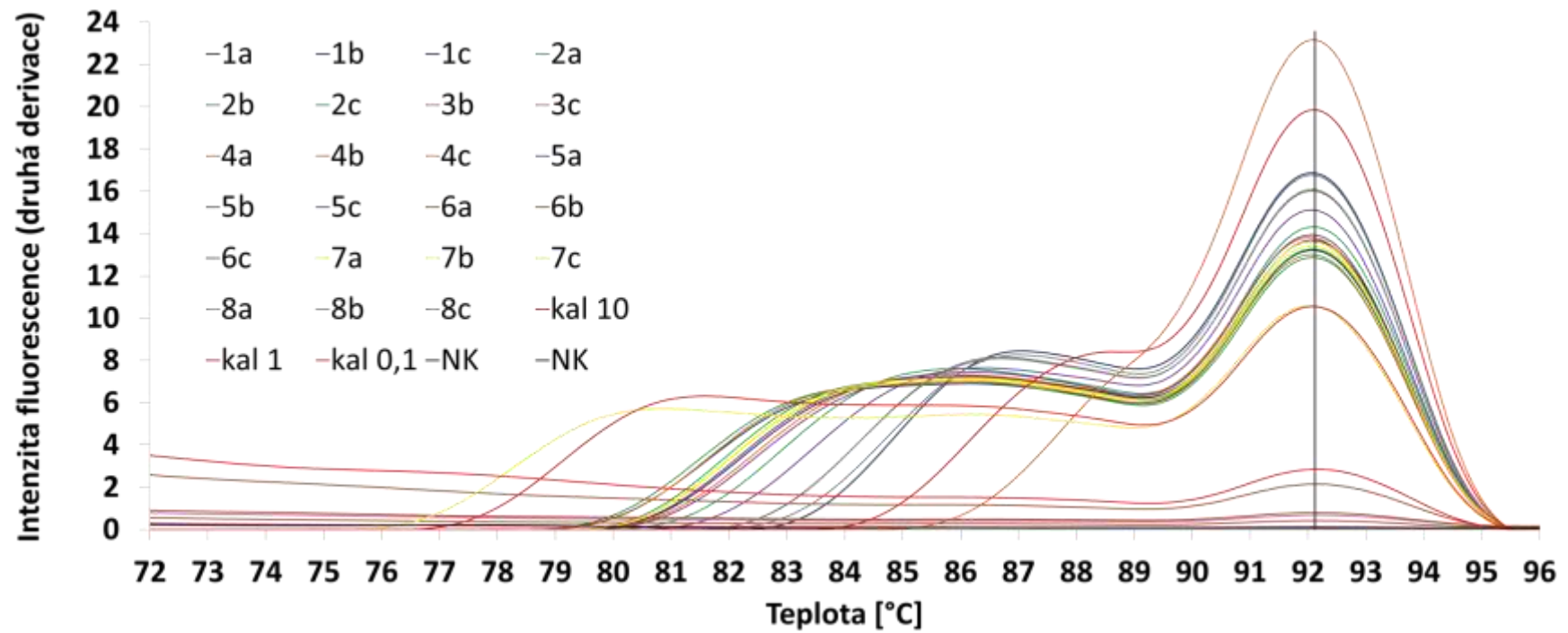
Tabulka 30: Vyhodnocení produktů PCR specifických pro druh *Bifidobacterium breve* z agarosového gelu, jednotlivé směsi (- nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR
1	0,001 ng/μl	-	13	1c	+++	25	5b	+++
2	0,001 ng/μl	-	14	2a	+++	26	5c	+++
3	0,01 ng/μl	++	15	2b	+++	27	6a	+
4	0,01 ng/μl	++	16	2c	+++	28	6b	++
5	0,1 ng/μl	+++	17	DNA standart (100 bp)	-	29	6c	+
6	0,1 ng/μl	+++	18	NK	-	30	7a	+++
7	1 ng/μl	+++	19	3b	+	31	7b	+++
8	1 ng/μl	+++	20	3c	-	32	7c	+++
9	10 ng/μl	+++	21	4a	+++	33	8a	+++
10	10 ng/μl	+++	22	4b	+++	34	8b	+++
11	1a	+++	23	4c	+++	35	8c	+++
12	1b	+++	24	5a	+++			

Obrázek 44 znázorňuje amplifikační křivky pro kmen *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>. Zde není patrný sklon amplifikačních křivek, tudíž nedochází k ovlivnění korelačního koeficientu při výpočtu koncentrace DNA. Obrázek 45 zobrazuje analýzu křivek tání. Tyto křivky potvrzují přítomnost DNA specifického produktu PCR pro druh *Bifidobacterium breve*. Teplota tání specifických produktů PCR byla určena na 92,12 °C.



Obrázek 44: Amplifikační křivky kalibrační křivky pro druh *Bifidobacterium breve* a jednotlivé vzorky směsí probiotik

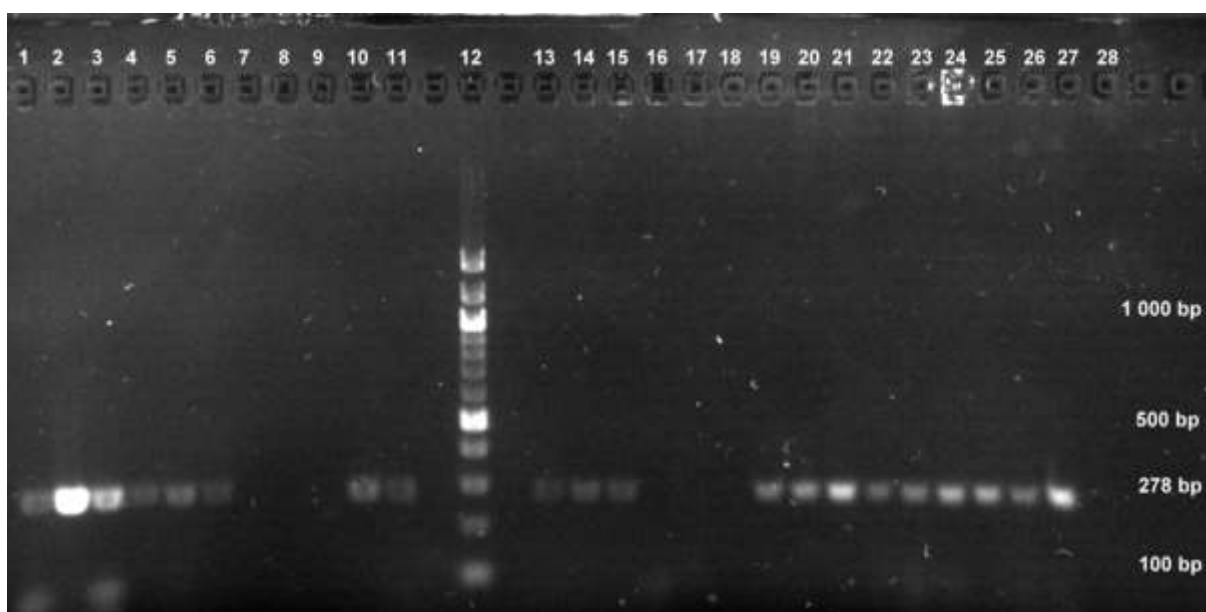


Obrázek 45: Melt analýza DNA pro druh *Bifidobacterium breve* ( $T_m = 92,12$  °C)



### 5.8.5 Druhově specifická PCR pro druh *Bifidobacterium bifidum*

Pro sestrojení kalibrační křivky pro PCR specifickou pro kmen *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762 byl vybrán vzorek DNA 10a (*Bifidobacterium bifidum* CCM 3762). DNA byla zředěna desítkovým ředěním TE pufrem na koncentrace v rozmezí 0,001 do 10 ng/μl. U toho kmene ovšem nebylo možné sestrojit kalibrační závislost. Amplifikační křivky standardů nedosáhly ani po 40 cyklech dostatečné intenzity fluorescence pro spolehlivé vyhodnocení kvantifikace. Byla provedena agarosová gelová elektroforéza produktů PCR a byly detekovány produkty specifické velikosti (278 bp) pro druh *Bifidobacterium bifidum*. Lze tedy potvrdit přítomnost kmene *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762 ve všech vzorcích, dle tabulky 18. Agarosová gelová elektroforéza je znázorněna na obrázku 46. Velikost produktů byla 278 bp. Tabulka 31 uvádí intenzitu produktů PCR pro jednotlivé vzorky.



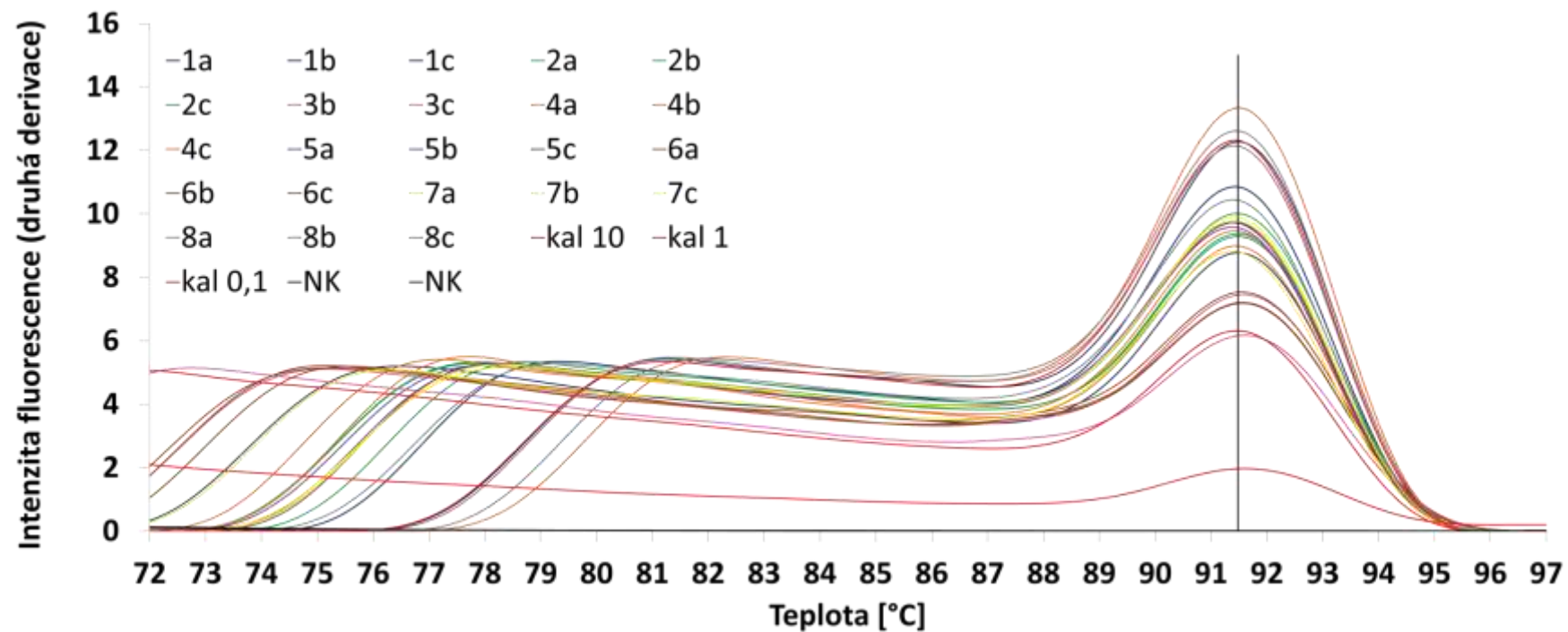
Obrázek 46: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR, jednotlivých směsí, specifických pro druh *Bifidobacterium bifidum*

Tabulka 31: Vyhodnocení produktů PCR specifických pro druh *Bifidobacterium bifidum* z agarosového gelu, jednotlivé směsi (- nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR
1	10a	++	10	3b	++	19	6a	++
2	10b	+++	11	3c	+	20	6b	+++
3	10c	+++	12	DNA standart (100 bp)	-	21	6c	+++
4	1a	+	13	4a	+	22	7a	++
5	1b	++	14	4b	+	23	7b	++
6	1c	+	15	4c	+	24	7c	+++
7	2a	-	16	5a	-	25	8a	+++
8	2b	-	17	5b	-	26	8b	++
9	2c	-	18	5c	-	27	8c	+++
						28	NK	-

Pro možnost kvantifikace by bylo vhodné optimalizovat úpravou teplotního programu nebo PCR směsi.

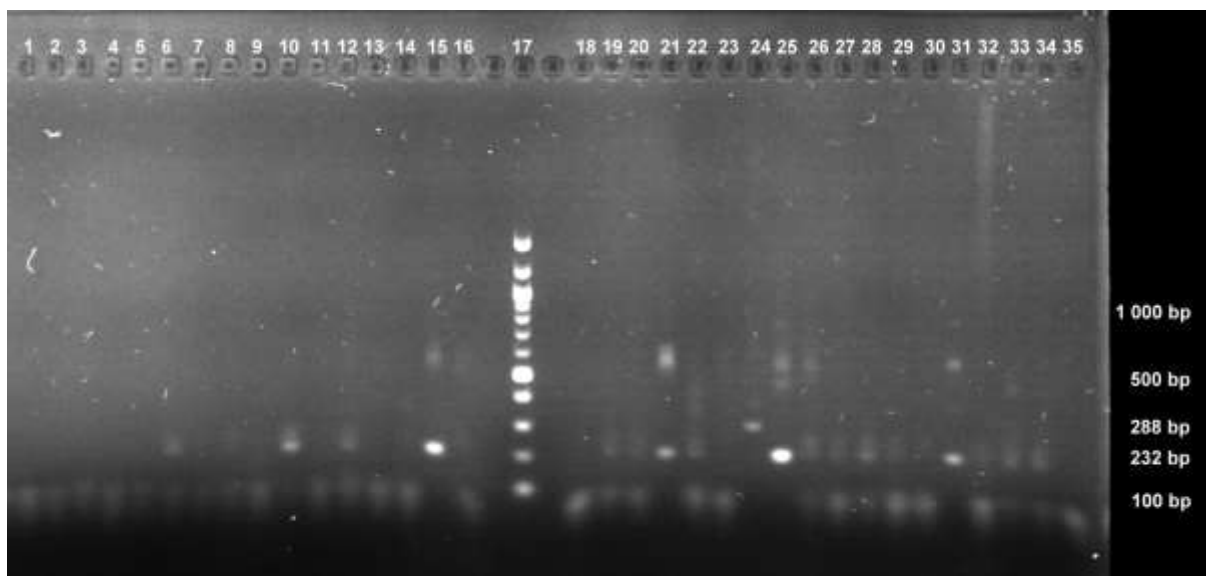
Obrázek 47 zobrazuje analýzu křivek tání. Teplota tání specifických produktů PCR byla určena na 91,12 °C.



Obrázek 47: Melt analýza DNA pro druh *Bifidobacterium bifidum* ( $T_m = 91,12$  °C)

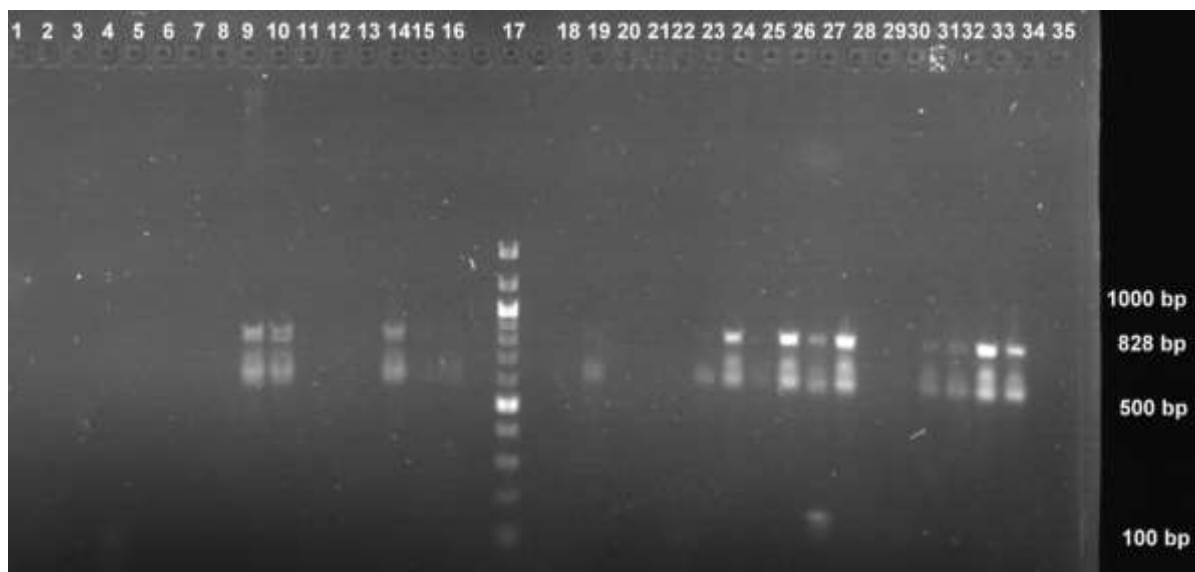
### 5.8.6 Druhově specifická PCR pro druh *Bifidobacterium longum*

Pro sestavení kalibrační křivky pro PCR specifickou pro druh *Bifidobacterium longum* byl vybrán vzorek DNA 11a (*Bifidobacterium longum* CCM 4990). DNA byla zředěna desítkovým ředěním TE pufrům na koncentrace v rozmezí od 0,0001 do 1 ng/μl. Amplifikační křivky nedosáhly ani po 40 cyklech dostatečné intenzity fluorescence pro spolehlivé vyhodnocení kvantifikace. Bylo zjištěno, že *Bifidobacterium longum*, který byl použit, je v České sbírce mikroorganismů uveden pod číslem CCM 4990. Jedná se však o *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. Z důvodu negativních výsledků PCR s primery specifickými pro *Bifidobacterium longum* BiLON-1 a BiLON-2 (tabulka 11, obrázek 48) byly použity primery specifické pro *Bifidobacterium infantis*.



Obrázek 48: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR, jednotlivých směsí, specifických pro druh *Bifidobacterium longum*

Bylo provedeno další měření, a to se specifickými primery pro *Bifidobacterium infantis*, tedy BiINF-1 a BiINF-2. Opět byla použita kalibrační závislost jako u primerů BiLON-1 a BiLON-2. Amplifikační křivky standardů nedosáhly ani po 40 cyklech dostatečné intenzity fluorescence pro spolehlivé vyhodnocení kvantifikace. Byla provedena agarosová gelová elektroforéza produktů PCR a byly detekovány produkty specifické velikosti (828 bp) pro *Bifidobacterium infantis* téměř u všech vzorků, podle kterých dle tabulky 18 měl být, viz obrázek 50 a tabulka 32. U směsí probiotik 2, 3 a 7, byl kmen *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCM 4990 prokázán, alespoň u jednoho z triplikátů. Velikost produktů byla 828 bp. Na obrázku 49 lze pozorovat nespecifický produkt, který by bylo možné odstranit úpravou PCR směsi a teplotního programu.



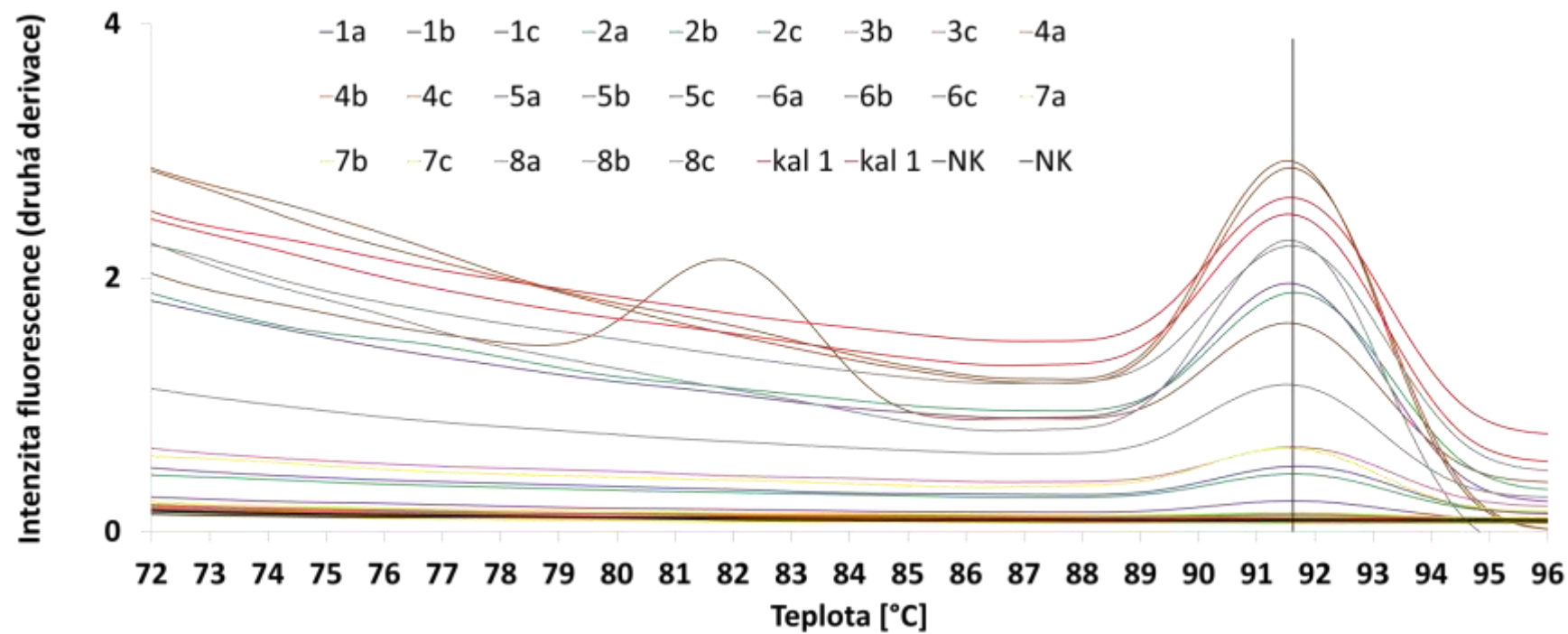
Obrázek 49: Agarosová elektroforéza při použití primerů specifických pro druh *Bifidobacterium subsp. infantis* (BiINF-1, BiINF-2)

Tabulka 32: Vyhodnocení produktů PCR specifických pro druh *Bifidobacterium longum subsp. infantis* z agarosového gelu, jednotlivé směsi (- nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR	Běh č.	DNA	Produkt PCR
1	0,0001 ng/μl	-	13	1c	-	25	5c	-
2	0,0001 ng/μl	-	14	2a	++	26	6a	+++
3	0,001 ng/μl	-	15	2b	+	27	6b	++
4	0,001 ng/μl	-	16	2c	+	28	6c	+++
5	0,01 ng/μl	-	17	DNA standart (100 bp)	-	29	7a	-
6	0,01 ng/μl	-	18	3b	-	30	7b	-
7	0,1 ng/μl	-	19	3c	+	31	7c	++
8	0,1 ng/μl	-	20	4a	-	32	8a	++
9	1 ng/μl	++	21	4b	-	33	8b	+++
10	1 ng/μl	++	22	4c	-	34	8c	+++
11	1a	-	23	5a	+	35	NK	-
12	1b	-	24	5b	+++			

Pro možnost kvantifikace by bylo vhodné optimalizovat úpravou teplotního programu nebo PCR směsi.

Obrázek 50 zobrazuje analýzu křivek tání. Teplota tání specifických produktů PCR byla určena na 91,62 °C.



Obrázek 50: Melt analýza DNA pro druh *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ( $T_m = 91,62$  °C)

## 5.9 Charakterizace Chlorelly, Spiruliny a konopného oleje

V rámci použití v senzorické analýze byly charakterizovány komerčně dostupné výrobky Chlorella, Spirulina a loupaná konopná semínka. U Chlorelly a Spiruliny bylo sledováno množství polyfenolů. U konopného semínka, které bylo lisováno za studena, byl charakterizován obsah mastných kyselin

### 5.9.1 Stanovení celkových polyfenolů

Podle pracovního postupu uvedeného v kapitole 4.6.12.1 byla stanovena kalibrační křivka kyseliny gallové. Rovnice regrese má tvar:  $y = 1,5934 \cdot x$ . Dále bylo provedeno stanovení polyfenolů pro Chlorellu a Spirulinu. Pomocí rovnice regrese byl vypočítán obsah polyfenolů v Chlorelle a Spirulině i se směrodatnou odchylkou. Získané hodnoty v jednotkách polyfenolů v mg/g jsou uvedeny v tabulce 33. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Absorbance 1 u Spiruliny nebyla z důvodu velké odchylky od ostatních do výpočtů zařazena.

Tabulka 33: Obsah polyfenolů v Chlorelle a Spirulině

Složka	A1	A2	A3	Průměr A	c [mg/g]
Chlorella	0,424	0,443	0,435	0,435 0	2,723 7 ± 0,004 9
Spirulina	1,173	1,305	1,312	1,308 5	8,212 0 ± 0,002 2

Z výsledků uvedených v tabulce 33 vyplývá, že celkový obsah polyfenolů je vyšší u Spiruliny. Toto stanovení bylo u těchto vzorků provedeno z důvodu, že sloučeniny ze skupiny polyfenolů mohou vykazovat antimikrobiální účinek, a tudíž by mohly mít negativní vliv na probiotické bakterie. Ovšem při porovnání vlivu řas a sinic na viabilitu probiotických bakterií, z kapitoly 5.5, můžeme konstatovat, že i vyšší obsah polyfenolů u Spiruliny nemá negativní vliv na viabilitu probiotických bakterií.

### 5.9.2 Stanovení obsahu mastných kyselin u konopného oleje pomocí GC

Konopný olej, lisovaný za studena, byl podroben analýze plynovou chromatografií, podle pracovního postupu uvedeného v kapitole 4.6.12.2, z hlediska obsahu mastných kyselin. V tabulce 34 jsou uvedeny jednotlivé druhy mastných kyselin s danými obsahy v jednotkách mg/ml obsažené v konopném oleji, které byly pomocí metody plynové chromatografie stanoveny.

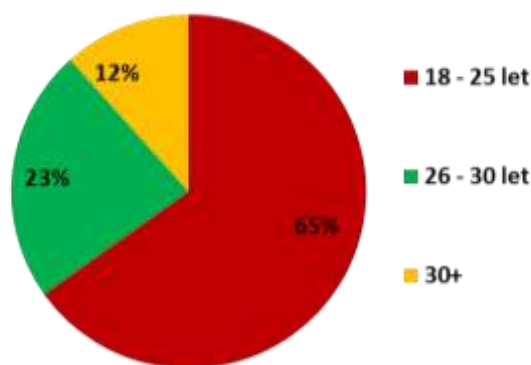
Tabulka 34: Obsah jednotlivých typů mastných kyselin v konopném oleji

Mastná kyselina	Konopný olej c [mg/g]	Mastná kyselina	Konopný olej c [mg/g]
Kyselina myristová (C14:0)	0,081 4 ± 0,002 3	Kyselina linolová (C18:2n6c)	153,622 2 ± 4,255 1
Kyselina pentadecenová (C15:0)	0,046 5 ± 0,001 0	Kyselina γ-linolenová (C18:3n6)	15,024 5 ± 0,412 0
Kyselina palmitová (C16:0)	15,277 2 ± 0,892 3	Kyselina α-linolenová (C18:3n3)	47,296 5 ± 1,410 2
Kyselina palmitoolejová (C16:1)	0,423 7 ± 0,018 9	Kyselina arachová (C20:0)	1,448 8 ± 0,043 2
Kyselina heptadecylová (C17:0)	8,555 1 ± 0,258 0	Kyselina eikosenová (C20:1)	1,159 2 ± 0,033 1
Kyselina heptadecenová (C17:1)	0,063 1 ± 0,001 9	Kyselina behenová (C22:0)	0,414 6 ± 0,012 4
Kyselina stearová (C18:0)	8,412 5 ± 0,315 0	Kyselina trikosanová (C23:0)	0,285 3 ± 0,008 8
Kyselina olejová (C18:1n9c)	37,870 9 ± 1,098 3	Kyselina lignocerová (C24:0)	0,112 4 ± 0,003 1
Kyselina linolelaidová (C18:2n6t)	0,904 5 ± 0,040 2	Kyselina nervonová (C24:1n9)	0,045 7 ± 0,001 2

Ze stanovených koncentrací lze pozorovat, že konopný olej obsahuje celou řadu mastných kyselin. Z výživového hlediska jsou pro nás hodně zajímavé omega 3 a 6 mastné kyseliny [60], které jsou v tomto oleji zastoupeny v poměrně velkém množství.

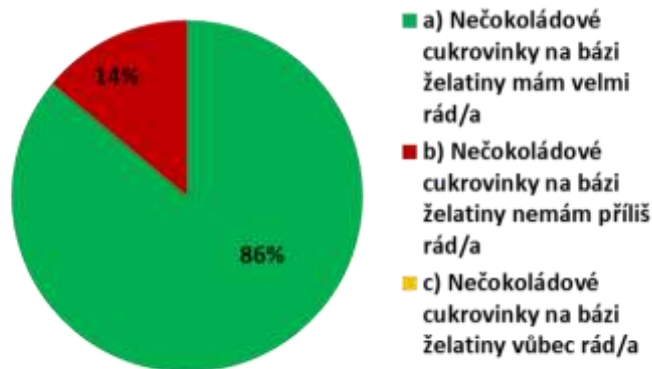
### 5.10 Senzorická analýza

Vzorky připravených probiotických preparátů s přidavkem řas a mastných kyselin hodnotilo celkem 43 hodnotitelů, jejich věk a stanoviska jsou znázorněna v grafech na obrázku 51, obrázku 52, obrázku 53, obrázku 54.

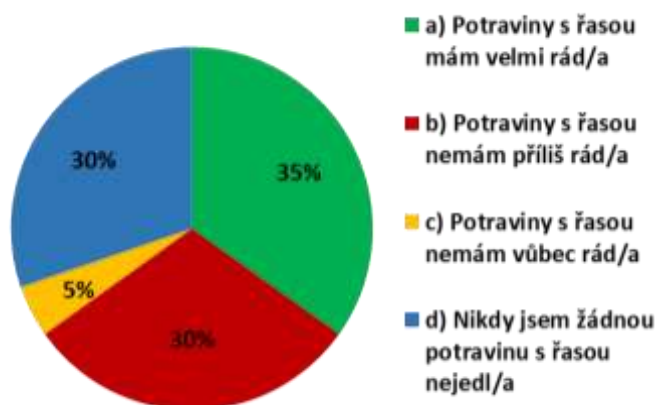


Obrázek 51: Věkové rozpětí hodnotitelů

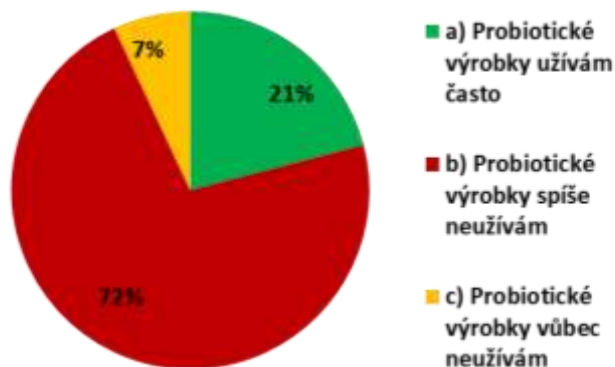




Obrázek 52: Otázka č. 1- Jaké je Vaše stanovisko před ochutnáváním? (želatinové bonbóny)



Obrázek 53: Otázka č. 2 - Jaké je Vaše stanovisko před ochutnáváním? (řasa)



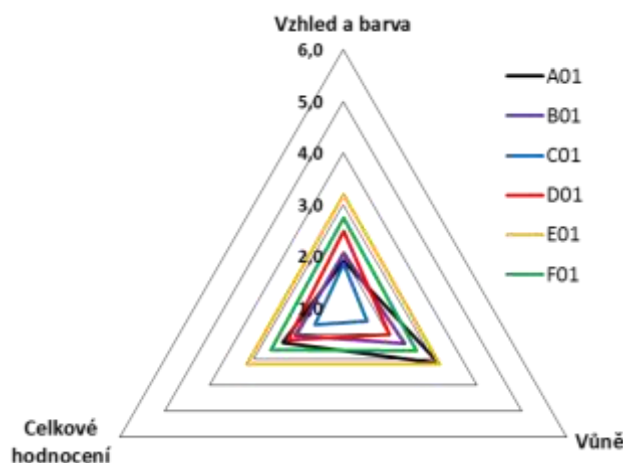
Obrázek 54: Otázka č. 3 - Jaký máte vztah k probiotickým výrobkům?

Hodnoceno bylo celkem šest vzorků, jejichž složení je uvedeno v kapitole 4.6.13.2. Chlorella a Spirulina byly upřednostněny před mořskými řasami, kvůli dostupnosti na českém trhu. Na obrázku 55 jsou zobrazeny připravené probiotické vzorky hodnoceny v senzoričké analýze. Složení probiotických preparátů k senzoričké analýze je uvedeno v tabulka 14.



Obrázek 55: Vzorky probiotických preparátů hodnocených na sensorické analýze

První částí sensorické analýzy bylo provedení sensorické hodnocení probiotických vzorků pětibodovým stupnicovým testem (1 byla pro nejlepší, 5 byla pro nejhorší). Znamky ze sensorického hodnocení připravených probiotických preparátů byly zprůměrovány a jsou znázorněny graficky pomocí trojúhelníkového grafu, kdy hodnota 1 byla označena jako výborný a je v grafu zaznamenána ve středu trojúhelníku a nevyhovující hodnota 5 je v grafu jako okrajová hodnota, viz obrázek 56.



Obrázek 56: Sensorické hodnocení vzhledu, barvy, vůně a celkového hodnocení

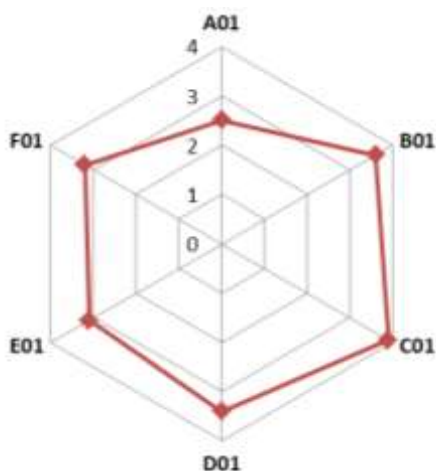
Z grafu uvedeného na obrázku 56 vyplývá, že parametr vzhledu a barvy byl nejlépe hodnocen u dvou vzorků A01 a C01 s průměrnou známkou 1,9. Na druhém místě se umístil vzorek B01 s průměrnou známkou 2,1. Třetí místo obsadil vzorek D01 s průměrnou hodnotou 2,5. Na čtvrtém místě skončil vzorek F01 se známkou 2,7. Poslední místo obsadil vzorek E01 se známkou 3,2. Vzhledově se sice vzorek B01 umístil na druhém místě, ovšem většina hodnotitelů uvedla, že z hlediska tvaru „medvídka“ je nejhorší. To bylo způsobeno tím, že ve vzorku byl obsažen probiotický preparát, tudíž celková směs se při plnění do silikonové formy nemohla zahřát na vysokou teplotu, aby nedošlo k usmrcení probiotických bakterií.

A konzistence směsi tak nebyla ideální pro formování požadovaného tvaru. Probiotické bakterie byly obsaženy i ve vzorku A01 a F01. V těchto vzorcích byl oproti vzorku B01 navíc přidán vodný extrakt řasy, kterým se směs naředila. Konzistence směsi tak byla ideální a vytvořila tak krásný tvar „medvídka“. V případě vzorků D01, E01 a F01 se hodnotitelům ve většině případů vzhledově nelíbily řasy/sinice viditelné v „medvídkovi“.

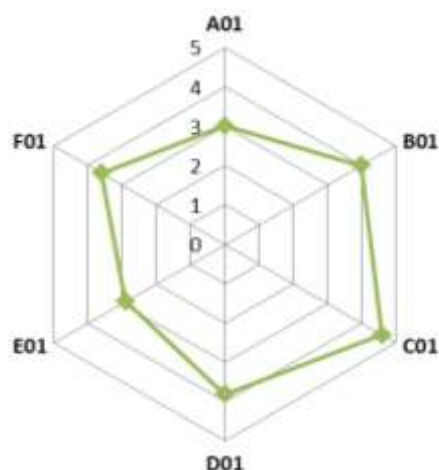
Dalším hodnotícím parametrem byla vůně daných preparátů. Zde byl nejlépe hodnocen vzorek C01 s průměrnou známkou 1,5. Na druhém místě se známkou 2,0 umístil vzorek D01. Třetí místo obsadil s průměrnou hodnotou 2,4 vzorek B01. Na čtvrtém místě skončil vzorek F01 s průměrnou hodnotou 2,6. Poslední dvě místa obsadily s hodnotami 3,1 a 3,2 vzorky A01 a E01. U vzorků A01 hodnotitelé uváděli, že vzorky byly z hlediska vůně neidentifikovatelné.

Posledním hodnotícím parametrem v první části senzoričké analýzy bylo celkové hodnocení připravených probiotických preparátů. Zde byl opět nejlépe hodnocen vzorek C01 s průměrnou známkou 1,6. Na druhém místě se pak umístil vzorek B01 se známkou 2,1 a se známkou 2,2 obsadil třetí místo vzorek D01. Vzorek číslo A01 skončil se známkou 2,4 na čtvrtém místě. Páté místo obsadil vzorek F01 se známkou 2,6. A jako poslední skončil vzorek E01 se známkou 3,2.

V druhé části byla hodnocena intenzita sladké chuti a celková chuť, kde byla použita obrácená pětibodová stupnice. Body ze senzoričké hodnocení připravených probiotických preparátů byly zprůměrovány a jsou znázorněny graficky pomocí paprskového grafu, 1 byla označena jako výborný a je v grafu zaznamenána ve středu grafu a nevyhovující hodnota 5 je v grafu jako okrajová hodnota, viz obrázek 57 a obrázek 58.



Obrázek 57: Senzorické hodnocení intenzity sladké chuti

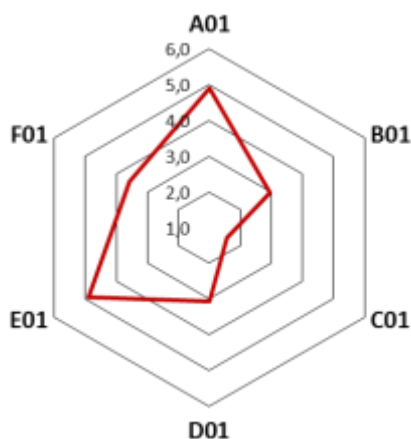


Obrázek 58: Sensorické hodnocení celkové chuti

Obrázek 57 ukazuje, že parametr intenzita sladké chuti byl nejlépe hodnocen u vzorku C01 s průměrnou známkou 3,9. Na druhém místě se umístil vzorek B01 s průměrnou známkou 3,6. Třetí místo obsadil vzorek D01 s průměrnou známkou 3,4. Na čtvrtém místě skončil vzorek F01 se známkou 3,2. Páté místo obsadil vzorek se známkou 3,1 E01 a jako poslední vzorek A01 s 2,5.

Druhým hodnotícím parametrem byla celková chuť daných preparátů, viz obrázek 58. Zde byl nejlépe opět hodnocen vzorek C01 s průměrným počtem bodů 4,6. Na druhém místě se s 4,0 body umístil vzorek B01. Třetí místo obsadil s průměrnou hodnotou 3,8 vzorek D01. Na čtvrtém místě skončil vzorek F01 s průměrnou hodnotou 3,6. Poslední dvě místa obsadily s hodnotami 3,0 a 2,9 vzorky A01 a E01. U vzorku A01 hodnotitelé uváděli, že vzorky byly chuťově hořké, umělé a příchut' byla neidentifikovatelná. U vzorku B01 se hodnotitelé ve většině případů trefili do příchutě lesní plody, kdy psali, že se jedná o jahodu nebo malinu. Příchut' vzorku C01 většina označila jako citrón. Pětina lidí uváděla exotické ovoce. E01 hodnotitelům chutnala jako tráva. 5 hodnotitelů napsalo, že jim to připomíná zelený čaj Matcha.

Posledním testem byl pořadový test, kdy hodnotitelé seřazovali vzorky dle vlastních preferencí od nejchutnější po nejhorší (tedy od 1 do 6), viz obrázek 59. I v poslední testu zvítězil vzorek C01, který byl následován vzorky B01 a D01.



Obrázek 59: Pořadový test hodnocených vzorků

Pomocí funkce COUNTIF v Excelu byla sestrojena tabulka 35, která informuje o četnosti výskytu jednotlivých probiotických preparátů na určitém místě od nejlepšího (1.) po nejhorší (6.)

Tabulka 35: Četnost výskytů jednotlivých vzorků

Pořadí	A01	B01	C01	D01	E01	F01
1.	0	4	<b>29</b>	6	2	2
2.	1	<b>17</b>	8	8	2	7
3.	6	9	2	<b>12</b>	4	10
4.	4	6	3	12	3	<b>15</b>
5.	<b>17</b>	4	1	4	11	6
6.	15	3	0	1	<b>21</b>	3

V tabulce 35 je pro každé místo na stupnici zvýrazněna nejvyšší hodnota. Tedy tato hodnota odpovídá vždy nejvyššímu výskytu daného výrobku na základě seřazení hodnotitelů. Na prvním místě umístilo vzorek C01 29 hodnotitelů. Naopak jako nejhorší vzorek byl 21krát ohodnocen vzorek E01.

Nejlepším výrobkem podle hodnotitelů byl ve všech testech vzorek C01, ve kterém byla pouze mangová šťáva a enkapsulovaný konopný olej. Konopný olej byl i ve vzorku F01 a žádný z hodnotitelů k němu neměl výhrady. Ve výrobcích s přidanou řasou nebo sinicí, byla v testech lépe hodnocena sinice Spirulina. Řasa Chlorella většině hodnotitelů nechutnala, psaly k výrobkům, že mají pachout trávy.

## 5.11 Návrh vlastního probiotického produktu

Posledním cílem této diplomové práce bylo navržení optimálnějšího složením dětských doplňků stravy s obsahem probiotických bakterií, než mají komerčně dostupné produkty. Jako nejlepší směs, tedy směs probiotických bakterií s nejnižším procentem snížení viability po průchodu trávicím traktem, byla stanovena směs č. 5 o složení *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>, *Bifidobacterium longum* CCM 4990 a *Lactobacillus casei* CCM 4798. V rámci dalšího zvýšení a udržení dlouhodobé viability můžeme směs probiotických bakterií s nejnižší procentem snížené viability do produktu navíc zaenkapsulovat. Dále je možné probiotický

přípravek obohatit o další aktivní látky. V této práci byla sledována především možnost přidavku řas a jejich extraktů.

Z testovaných vzorků dle sensorického hodnocení byla vyhodnocena pro hodnotitele jako přijatelnější Spirulina, a to v rámci přidavku biomasy i v rámci obohacení produktu vodným extraktem. Díky vyššímu obsahu polyfenolů, má tato sinice pozitivní antioxidační účinky, avšak v experimentální části bylo prokázáno, že nemají vliv na viabilitu probiotických bakterií, ba naopak pozitivně ovlivňují růst probiotických bakterií, takže by mohla zastávat funkci prebiotik. Další výživově významnou složkou z hlediska mastných kyselin, o kterou lze finální probiotický produkt obohatit, je konopný olej za studena lisovaný, který obsahuje hlavně omega 3 a 6 mastné kyseliny. Dalším nutným přísadkem do navrhovaného produktu, kvůli hořké chuti alginátu, je sacharóza nebo jiné sladidlo. V sensorickém hodnocení hodnotitelům nejvíce vyhovoval mangový sirup. Po shrnutí dosažených výsledků byla navržena jedna forma unikátního probiotického produktu pro děti o dvou složeních.

Navrhovanou formou jsou probiotické buňky s přísadkem Spiruliny a konopného oleje ve formě gumových medvídků. Tato forma byla navržena tak, aby byla pro dětské spotřebitele atraktivní, jelikož bude připomínat jimi oblíbené gumové bonbóny. Probiotické buňky jsou navíc enkapsulovány do alginátových částic a dochází tak například k jejich ochraně před nepříznivým prostředím žaludečních šťáv a současně je zajištěno jejich pozvolné uvolnění v cílovém místě určení. Další výhodou těchto produktů, je i fakt, že medvídek je navrhnutý z alginátu a agaru, tudíž pro maminky veganky, je to daleko přijatelnější, než produkt ze želatiny.

Celkové shrnutí složení obou navržených probiotických preparátů pro děti je uvedeno v tabulce 36.

*Tabulka 36: Složení navrhovaných probiotických produktů pro děti*

<b>Gumový medvídek 1</b>	<b>Gumový medvídek 2</b>
Enkapsulované probiotické buňky, směs č. 5	Enkapsulované probiotické buňky, směs č. 5
Enkapsulovaný konopný olej	Enkapsulovaný konopný olej
Vodný extrakt Spiruliny	Biomasa Spiruliny
Alginát, agar	Alginát, agar
Sacharóza / mangový sirup	Sacharóza / mangový sirup

## 6 ZÁVĚR

Předložená práce se zabývala probiotickými bakteriemi pro děti. Cílem bylo hledání a výběr vhodné probiotické směsi pro děti na základě vyhodnocení nejmenšího snížení viability po průchodu trávicím traktem a následným návrhem optimálního složení doplňků stravy pro děti.

V první části práce byly testovány jednotlivé kmeny rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* samostatně v průběhu modelového trávení. Měření bylo provedeno pomocí spektrofotometrického stanovení, kdy byly vždy vyhodnoceny růstové křivky jednotlivých kmenů. Z naměřených výsledků byl z rodu *Lactobacillus* vybrán kmen *Lactobacillus casei* CCM 4798 s procentem snížení viability o 4,84 %. U rodu *Bifidobacterium* byl při měření růstových křivek vyloučen kmen *Bifidobacterium adolescentis* CCM 4987, který ani po 24 hodinách nezačal v optimálních podmínkách růst. A jelikož byla hledána optimální probiotická směs pro děti, bylo hlavním cílem mít ve směsi zastoupeny převážně kmeny z rodu *Bifidobacterium*. Proto byly dále využívány všechny vyhovující buňky z rodu *Bifidobacterium*. Vybrány byly tedy kmeny *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762, *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup> a *Bifidobacterium longum* CCM 4990. Následně byly s vybranými kmeny vytvořeny směsi o různém složení a byl opět sledován vliv modelového trávení na viabilitu buněk. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u směsi o složení *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762, *Bifidobacterium longum* CCM 4990 a *Lactobacillus casei* CCM 4798, kde poklesla viabilita buněk po skončení trávení pouze o 3,37 %. Pokud bychom chtěli použít směs, která neobsahuje rod *Lactobacillus*, byla by nejlepší směs *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762 a *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>, kde poklesla viabilita o 7,88 %. Těchto procent bylo navíc dosaženo bez použití enkapsulační techniky. Při porovnání viability jednotlivých směsí probiotických bakterií s viabilitou jednotlivých kmenů z rodu *Bifidobacterium*, byla u všech směsí probiotik vyšší viabilita, než u srovnávacího kmene *Bifidobacterium longum* CCM 4990, který měl procento snížení viability po průchodu trávicím traktem 20,04 %. Viabilitu buněk po trávení lze tedy úspěšně zvýšit přípravou vhodné probiotické směsi. Další možností jak ochránit jednotlivé kmeny před nepříznivým prostředím trávicího traktu je enkapsulace, u které byla rovněž potvrzena zvýšená viabilita buněk po skončení trávení ve srovnání s neenkapsulovanou variantou.

V druhé části práce byla pomocí metody PCR v reálném čase prokazována přítomnost jednotlivých kmenů v probiotických směsích z první části, tedy po trávení. Nejdříve byla prokazována přítomnost vyhodnocením produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria*, následně vyhodnocením produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* a pro rod *Bifidobacterium*. Nakonec byly vyhodnoceny produkty PCR specifické pro druhy *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum*. Kvantifikovat se podařilo rod *Bifidobacterium* a kmen *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>. U rodu *Lactobacillus* se kvantifikace povedla také, ovšem sklon amplifikačních křivek byl větší, což způsobilo snížení korelačního koeficientu při výpočtu koncentrace DNA. U kmenů *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762 a *Bifidobacterium longum* CCM 4990 se kvantifikace nezdařila. Pro její získání by bylo nutné více optimalizovat PCR směs nebo teplotní program. Hlavní cíl byl ovšem splněn a to zjištění, že všechny kmeny, které byly do směsi přidány před trávením, v ní byly obsaženy i po trávení.

V třetí části práce byl hodnocen vliv řas a sinic na probiotické bakterie, sledován byl především možný antimikrobiální účinek přítomných polyfenolů po obohacení probiotického preparátu o tyto složky. Na základě měření bylo ovšem zjištěno, že u testovaných vzorků vyšší obsah polyfenolů neměl negativní vliv na probiotické bakterie, ba naopak probiotické bakterie rostly rychleji. Přídavek řas a jejich extraktů do navrhovaného probiotického přípravku tak může být vhodnou formou. Dále byla testována možnost obohacení probiotické směsi i o další aktivní látky. Testován byl přídavek konopného oleje, u kterého byl stanoven profil mastných kyselin a z výživového hlediska byl zjištěn zejména vyšší obsah omega 3 a 6 mastných kyselin. Na závěr byla provedena sensorická analýza mnou připravených probiotických doplňků stravy. Na tuto sensoriku byl použit komerčně dostupný probiotický přípravek Biopron Junior, řasa Chlorella, sinice Spirulina, za studena lisovaný konopný olej a různé druhy sirupů. Na základě hodnocení 43 hodnotitelů, kteří byli různé věkové kategorie, byl nejlépe hodnocen produkt s mangovou šťávou a enkapsulovaným konopným oleje.

Po shrnutí všech výsledků byl navržen probiotický doplněk stravy pro děti od tří let ve formě alginát-agarového medvídku o složení: probiotická směs č 5: *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>, *Bifidobacterium longum* CCM 4990 a *Lactobacillus casei* CCM 4798, mangový sirup, za studena lisovaný konopný olej a Spirulina (vodný extrakt nebo biomasa).



## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome: World Health Organization, 2006. ISBN 9251055130.
- [2] 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 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.014. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381200231>
- [3] Vyhláška č. 446/2004 Sb. ze dne 30. 7. 2004, kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin potravními doplňky. *Sbírka zákonů*, 2003, č. 149. [cit. 2019-02-22]. Dostupné z: <http://www.sagit.cz/info/sb04446>
- [4] Vyhláška č. 77/2003 Sb. ze dne 27. 3. 2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. *Sbírka zákonů*, 2003, č. 32. [cit. 2019-02-27]. Dostupné z: <http://www.sagit.cz/info/sb03077>
- [5] SÝKORA, J., SCHWARZ, J., & SIALA, K. Probiotika a dětský věk. *Pediatric pro praxi* [online]. 2006, 7(5), 264-270 [cit. 2019-02-27]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2006/05/05.pdf>
- [6] LYE, Huey Shi, Kunasundari BALAKRISHNAN, Kokila THIAGARAJAH, Nor Ismaliza MOHD ISMAIL a Shao Yin OOI. Beneficial Properties of Probiotics. *Tropical Life Sciences Research* [online]. 2016, 27(2), 73-90 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.21315/tlsr2016.27.2.6. ISSN 19853718. Dostupné z: [http://www.tlsr.usm.my/tlsr27022016/27022016\\_06.pdf](http://www.tlsr.usm.my/tlsr27022016/27022016_06.pdf)
- [7] FRIC, P. Probiotics and prebiotics — renaissance of a therapeutic principle. *Open Medicine* [online]. 2007-01-1, 2(3), - [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.2478/s11536-007-0031-5. ISSN 23915463. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/med.2007.2.issue-3/s11536-007-0031-5/s11536-007-0031-5.pdf>
- [8] ONOHUE, D. Safety of probiotics. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2006, vol. 15, no. 4, s. 563-9. ISSN 09647058.
- [9] NEVORAL, J. Prebiotika, probiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi* [online]. 2005, 6(2), 59-65 [cit. 2019-02-27]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2005/02/02.pdf>
- [10] HEMARAJATA, Peera a James VERSALOVIC. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* [online]. 2012, 6(1), 39-51 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1177/1756283X12459294. ISSN 1756-283X. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1756283X12459294>
- [11] SÁNCHEZ, Borja, a kol. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition* [online]. 2017, 61(1), 1600240- [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1002/mnfr.201600240. ISSN 16134125. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/>
- [12] ZBOŘIL, V. *Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti*. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-0584-2.

- [13] LUKÁŠ, M., Prebiotika, probiotika a střevní mikroflora. *Interní medicína* [online], 2015, 17(1), 14-17 [cit. 2019-02-27]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2015/01/03.pdf>
- [14] KRUIS, W. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* [online]. 2004, 53(11), 1617-1623 [cit. 2019-02-28]. DOI: 10.1136/gut.2003.037747. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2003.037747>
- [15] LILLY, D. M. a R. H. STILLWELL. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science* [online]. 1965, 147(3659), 747-748 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1126/science.147.3659.747. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.147.3659.747>
- [16] PANDIYAN, Priyadarshini a kol. Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today* [online]. 2013, 5(1), 55-59 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1016/j.dit.2013.03.003. ISSN 09757619. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/>
- [17] TLÁSKAL, Petr. Využití probiotik v pediatrii. *Pediatric pro praxi*, 2008, roč. 9, s. 288-292. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2008/05/04.pdf>
- [18] SCHREZENMEIR, Jürgen a Michael DE VRESE. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2001, 73(2), 361s-364s [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.361s. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/73/2/361s/4737561>
- [19] FULLER, R. Probiotics in human medicine. *Gut* [online]. BMJ Publishing Group Ltd and British Society of Gastroenterology, 1994, 32(4), 439 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1136/gut.32.4.439. ISSN 0017-5749.
- [20] SALMINEN, S, A OUWEHAND, Y BENNO a Y.K LEE. Probiotics: how should they be defined?. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 1999, 10(3), 107-110 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1016/S0924-2244(99)00027-8. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224499000278>
- [21] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 8086850005.
- [22] BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996, 558 s.: il.)
- [23] ŠVESTKA, T. Mikroflóra trávicího traktu a probiotika. *Interní medicína pro praxi*, 2007, roč. 9, č. 9, s. 389-391.
- [24] DOYLE, M. P. a BEUCHAT, L. R. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2007. ISBN 1-55581-407-7.
- [25] THON, V. Intestinální mikroflóra v raném dětství - úloha při rozvoji infekčních a alergických chorob. *Pediatric pro praxi* [online]. 2011, 12(4), 252-254 [cit. 2019-02-27]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2011/04/07.pdf>
- [26] PENDERS, J., THIJS, C., VINK, C., STELMA, F. F., SNIJDERS, B., KUMMELING, I., VAN DEN BRANDT P. A. a STOBBERINGH, E. E. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *PEDIATRICS* [online]. 2006, 118(2), 511-521 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1542/peds.2005-2824. ISSN 0031-4005. Dostupné z: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2005-2824>

- [27] BEZIRTZOGLU, E., STAVROPOULOU, E. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. *Anaerobe* [online]. 2011, 17(6), 369-374 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.03.010. ISSN 10759964. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996411000345>
- [28] ŠILHÁNKOVÁ, L. Mikrobiologie: pro potravináře a biotechnology. 2. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 8085605716.
- [29] GÖRNER, F. a L. VALÍK. Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 8096706497.
- [30] KREJSEK, J., KUDLOVÁ, M., KOLÁČKOVÁ, M., & NOVOSAD, J. Nutrice, probiotika a imunitní systém II. část: Nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. *Pediatric pro praxi* [online], 2007, 8(3), 156-162. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2007/03/07.pdf>
- [31] KLABAN, V. Ilustrovaný mikrobiologický slovník. Praha: Galén, 2005. ISBN 8072623419.
- [32] *Probiotic Amerika: Lactobacillus acidophilus* [online]. [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <https://probioticsamerica.com/lactobacillus-acidophilus/>
- [33] *Probiotic Amerika: Bifidobacterium longum* [online]. [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <https://probioticsamerica.com/bifidobacterium-longum/>
- [34] MENNINI, Tiziana. Probiotics and prebiotics. *Nutrafoods*. 2013, vol. 12, issue 2, s. 66-67. DOI: 10.1007/s13749-013-0017-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13749-013-0017-7>
- [35] KECHAGIA, M., Dimitrios BASOULIS, Stavroula KONSTANTOPOULOU, Dimitra DIMITRIADI, Konstantina GYFTOPOULOU, Nikoletta SKARMOUTSOU a Eleni Maria FAKIRI. Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition* [online]. 2013, 2013, 1-7 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.5402/2013/481651. ISSN 2314-4068. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/archive/2013/48165>
- [36] RADA, V. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Solen* [online]. 2011, č. 8(1), 10-15 [cit. 2019-02-27]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/med/2011/01/03.pdf>
- [37] NEVORAL, J. Jsou potravinové doplňky pro děti vždy prospěšné? *Pediatric v praxi* [online]. 2018, 19(2), 103-106 [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2018/02/08.pdf>
- [38] *PROBIO-FIX* [online]. [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <https://www.gigalekarna.cz/produkt/probio-fix-60-zelatinovych-tobolek/>
- [39] *NESTLÉ Beba OPTIPRO Comfort* [online]. [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/nestle-beba-optipro-comfort-2-800g>
- [40] *Walmark Biopron LAKTOBACILY Baby BiFi+* [online]. [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <https://www.gigalekarna.cz/produkt/walmark-biopron-laktobacily-baby-bifi-30-tobolek/>
- [41] *Martánci Gummy* [online]. [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/w-martanci-gummy-tbl-50-50-brouk>
- [42] *Dr.Max Kids Gummies AIRPLANES* [online]. [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/max-kids-gummies-airplanes-225g-50ks-47768>

- [43] Vibovit FARMA želé multivitaminy [online]. [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/vibovit-farma-50-zele-bonbonu>
- [44] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [45] ÚCHBPT, FAKULTA CHEMICKÁ, VUT V BRNĚ. *Praktikum z molekulární biotechnologie* [online]. 2016-2017 [cit. 2019-02-28].
- [46] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [47] *Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization*. Editor Ian M. MACKAY. Norfolk: Caister Academic Press, 2007. ISBN 978-1-904455-18-9.
- [48] DRUML, Barbara a Margit CICHNA-MARKL. High resolution melting (HRM) analysis of DNA--its role and potential in food analysis. *Food chemistry* [online]. 2014, roč. 158, s. 245–54. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.111
- [49] BLATNÝ, R. Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) jako nástroj moderní diagnostiky. *Časopis lékařů českých*, 2012, roč. 151, č. 3, s. 161. ISSN: 0008-7335.
- [50] ŽERAVÍK, J. Enkapsulace probiotik. *Mlékařské listy* [online], 2017, roč. 162, č. 3, s.1-4 [cit. 2019-02-27].  
Dostupné z: [http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2017/veda\\_162\\_s.1-4.pdf](http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2017/veda_162_s.1-4.pdf)
- [51] BÜCHI. Návod k použití: Enkapsulátor B-395 Pro. 2011.
- [52] ANAL, Anil Kumar a Harjinder SINGH. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2007, **18**(5), 240-251 [cit. 2019-02-28]. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.01.004. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224407000350>
- [53] DESAI, Kashappa Goud H. a Hyun JIN PARK. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology* [online]. 2005, **23**(7), 1361-1394 [cit. 2019-02-28]. DOI: 10.1081/DRT-200063478. ISSN 0737-3937. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DRT-200063478>
- [54] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [55] *Československý lékopis: Pharmacopoea Bohemoslovaca*. 4. vyd. Praha: Avicenum, 1987.
- [56] HAARMAN, M. a J. KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, **72**(4), 2359-2365. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006>
- [57] KOK R. G., DE WAAL A., Shut F., WELLING G. W., WEENK G., HELLINGWERF K. J.(1996): Specific detection and analysis of a probiotic Bifidobacterium strain innfant feces. *Appl. Environ. Biol.* **62**(10): 3668-3672.

- [58] MATSUKI T., WATANABE K., TANAKA R., FUKUDA M., OYAIZU H. (1999): Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA gene targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Biol.* 65(10): 4506-4512.
- [59] SANDOVAL-ACUÑA, Cristian, Jorge FERREIRA a Hernán SPEISKY. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2014, **559**, 75-90 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.017. ISSN 00039861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000398611400174X>
- [60] VYHNÁNKOVÁ, D. M. L. Význam PUFA OMEGA-3 pro děti. *Pediatric pro praxi* [online]. 2010, 11(5), 336-338 [cit 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2010/05/14.pdf>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 8.1 Použité jednotky

g – gram  
mg – miligram  
μg – mikrogram  
ml – mililitr  
μl – mikrolitr  
nm – nanometr  
°C – stupně Celsia  
s – vteřina  
min – minuta  
M – mol/litr  
mM – milimol/litr  
pmol – pikomol  
mΩ – miliohm  
bp – počet komplementárních párů bází  
CFU – colony forming units, kolonie tvořící jednotky

### 8.2 Zkratky

CO<sub>2</sub> – oxid uhličitý  
ČR – Česká republika  
D – Německo  
DRHP - denní referenční hodnota příjmu  
FAO – Food and Agriculture Organization, Organizace pro výživu a zemědělství  
GC – gas chromatography, plynová chromatografie  
GIT – gastrointestinální trakt  
CH – Švýcarsko  
HCl – kyselina chlorovodíková  
IND – Indie  
KCl – chlorid draselný  
MgCl<sub>2</sub> – chlorid hořečnatý  
PCR – polymerázová řetězová reakce  
SRN – Spolková republika Německo  
USA – Spojené státy americké  
WHO – World Health Organisation, Světová zdravotnická organizace

## 9 PŘÍLOHY

### Příloha 1 – Dotazník senzorické analýzy



#### Dotazník pro senzorické hodnocení doplňků stravy

Vážení hodnotitelé,  
zhodnoťte, prosím, předložené vzorky doplňků stravy.

**Hodnotitel:** Student / Doktorand / Akademik

**Datum:** 14. 3. 2019

**Čas:**

**Zdravotní stav:**

**kuřák / nekuřák**

**muž / žena**

#### **Jaké je Vaše stanovisko před ochutnáváním? (želatinové bonbóny)**

1. Nečokoládové cukrovinky na bázi želatiny mám velmi rád/a
2. Nečokoládové cukrovinky na bázi želatiny nemám příliš rád/a
3. Nečokoládové cukrovinky na bázi želatiny vůbec rád/a

#### **Jaké je Vaše stanovisko před ochutnáváním? (řasa)**

1. Potraviny s řasou mám velmi rád/a
2. Potraviny s řasou nemám příliš rád/a
3. Potraviny s řasou nemám vůbec rád/a
4. Nikdy jsem žádnou potravinu s řasou nejedl/a

#### **Jaký máte vztah k probiotickým výrobkům?**

1. Probiotické výrobky užívám často
2. Probiotické výrobky spíše neužívám
3. Probiotické výrobky vůbec neužívám

## Senzorické hodnocení vzorků pomocí stupnice

### Vzhled, vůně

**1** – vynikající; **2** – velmi dobrá; **3** – dobrá; **4** – uspokojivá; **5** – nevyhovující

Kód vzorku	Vzhled a barva	Vůně	Celkové hodnocení
A01			
B01			
C01			
D01			
E01			
F01			

### Chuť

**Intenzita chuti:** **1** - velmi slabá; **2** – slabá; **3** – střední; **4** – silnější; **5** – velmi silná

**Celková chuť:** **1** – nepřijatelná (nepříjemná, netypická, výrazně negativní pachut')  
**2** – nevyhovující (nevýrazná, prázdná, neutrální)  
**3** – méně dobrá  
**4** – dobrá (mírné odchylky od stupně „vynikající“, méně výrazná)  
**5** – vynikající (výrazná, charakteristická – lze dobře identifikovat, příjemná, harmonická)

Kód vzorku	Chuť – intenzita sladkosti (číslo)	Celková chuť (číslo)	Příchuť / či případná pachut' (slovy)	Označte nejlepší vzorek (+) a nejhorší vzorek (-)
A01				
B01				
C01				
D01				
E01				
F01				



**Pořadový test – seřadíte jednotlivé vzorky podle vlastních preferencí a zdůvodněte**

Pořadí	Kód vzorku	Důvod (či případně jiná poznámka)
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		