



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# ENKAPSULACE PROBIOTIK A PREBIOTIK DO VÝROBKŮ PRO DĚTSKOU VÝŽIVU

ENCAPSULATION OF PROBIOTICS AND PREBIOTICS FOR USE IN NUTRITIONAL PRODUCTS FOR CHILDREN

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Karolína Šnajdarová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2018

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1154/2017  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Karolína Šnajdarová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Enkapsulace probiotik a prebiotik do výrobků pro dětskou výživu

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) screening na trhu dostupných doplňků stravy pro dětskou výživu s obsahem probiotických bakterií a jejich charakterizace
- 2) příprava probiotických kultur, stanovení viability probiotických bakterií v různé formě (enkapsulované, lyofilizované) a s přidavkem různých prebiotik a dalších biologicky aktivních látek
- 3) návrh vhodných forem a složení dětských doplňků stravy s obsahem probiotických bakterií

### Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

-----  
Bc. Karolína Šnajdarová  
student(ka)

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

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

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

## **Abstrakt**

Tato diplomová práce se zabývá návrhem doplňku stravy pro dětskou výživu s obsahem probiotických bakterií kmene *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve* a s obsahem vhodného prebiotika. Jako prebiotika byly testovány Inulin, Chia vláknina, Bambusová vláknina, Chlorella + Spirulina a Jakon sirup.

Teoretická část práce se zaměřuje na probiotika, prebiotika a jejich biologický vliv. V experimentální části byla řešena možnost enkapsulace do alginátových částic a lyofilizace probiotických buněk za účelem nalezení jejich vhodné formy ve finálním produktu. Tyto různé formy probiotik s přídavkem prebiotik byly podrobeny modelovému trávení. Bylo zjištěno, že přídavek prebiotika výrazně zvyšuje viabilitu buněk a také jejich odolnost vůči trávicím šťávám. Viabilitu buněk pak nejvíce podporoval Jakon sirup. Vybraná prebiotika byla také podrobně charakterizována. Byl stanoven obsah celkových a redukujících sacharidů, obsah oligosacharidů, bílkovin, lipidů, polyfenolů a chlorofylů. S ohledem na dosažené výsledky byla vybrána tři prebiotika s nejlepšími vlastnostmi, kterými jsou Chia vláknina, Chlorella + Spirulina a Jakon sirup.

Na závěr byl s ohledem na nejvhodnější prebiotika navržen doplněk stravy s obsahem lyofilizovaných alginátových částic a prebiotik ve formě sypkého přípravku a také žvýkacích bonbónů ve tvaru gumových medvídků.

**Klíčová slova:** probiotika, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve*, prebiotika, enkapsulace, alginát, dětská výživa

## **Abstract**

The Diploma thesis deals with designing of probiotic dietary supplement for children with strains *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium breve* and with prebiotics. Used prebiotics were Inulin, Chia fiber, Bamboo fiber, Chlorella + Spirulina and Yakon syrup.

The theoretical part is focused on probiotics, prebiotics and their biological influence. In experimental part the possibilities of encapsulation into alginate particle and lyophilisation of probiotic cells were observed to find their good form to final nutritional product for children. Several types of probiotic with addition of prebiotics were tested in model conditions of gastrointestinal tract. It was found that addition of prebiotic highly increases viability of probiotic cells and their resistance to model conditions of gastrointestinal tract. In this case, the best prebiotic was found in Yakon syrup. The prebiotics were also characterised in terms of nutritional composition, amount of total and reducing sugars, oligosaccharides, proteins, lipids, polyphenols and chlorophyll were obtained. Finally, Chia fiber, Chlorella + Spirulina and Yakon syrup were chosen as prebiotics with best characterisation/properties.

In conclusion, a dietary supplement with lyophilized alginate particles containing probiotic cells and with the most appropriate prebiotics were designed. Forms of the product were powder and gummy-bear.

**Keywords:** probiotics, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve*, prebiotics, encapsulation, alginate, food for infant

ŠNAJDAROVÁ, K. *Enkapsulace probiotik a prebiotik do výrobků pro dětskou výživu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 73 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

#### PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární 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 děkanem FCH VUT.

.....

podpis studenta

#### PODĚKOVÁNÍ:

*Ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za výborné vedení při práci a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Julii Hoové za pomoc při experimentální části a za její trpělivost a ochotu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému partnerovi a rodině, kteří mi byli po celou dobu studia velkou oporou.*

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>11</b>
2.1	Probiotika .....	11
2.1.1	Historie probiotik a jejich definice .....	12
2.1.2	Střevní mikroflóra .....	13
2.1.3	Střevní mikroflóra u dětí .....	13
2.1.4	Mechanismus účinku probiotik .....	14
2.1.5	Význam probiotik .....	14
2.1.5.1	Virové průjemové onemocnění .....	15
2.1.5.2	Průjemové onemocnění po léčbě antibiotiky .....	15
2.1.5.3	Crohnova choroba.....	15
2.1.5.4	Alergie .....	15
2.1.5.5	Intolerance laktózy.....	15
2.1.6	Rizika spojená s užíváním probiotik .....	16
2.1.7	Bakterie mléčného kvašení.....	16
2.1.7.1	Rod Lactobacillus .....	16
2.1.7.2	Rod Bifidobacterium .....	17
2.1.8	Probiotické produkty pro děti .....	17
2.1.9	Použité probiotické produkty pro děti .....	18
2.1.9.1	APO-LAKTÍK kapky .....	18
2.1.9.2	APO-LAKTÍK pastilky .....	18
2.1.9.3	Biopron JUNIOR sáčky.....	18
2.1.9.4	ProbioMaxík tablety .....	18
2.2	Prebiotika.....	19
2.2.1	Mechanismus účinku prebiotik.....	20
2.2.2	Význam prebiotik .....	20
2.2.3	Prebiotika v mateřském mléce.....	21
2.2.4	Vláknina .....	21
2.2.4.1	Vláknina v dětské a dospělé stravě.....	22
2.2.5	Použitá prebiotika.....	22
2.2.5.1	Inulin.....	22
2.2.5.2	Chia vláknina .....	23
2.2.5.3	Bambusová vláknina.....	23
2.2.5.4	Chlorella + Spirulina .....	23
2.2.5.5	Jakon sirup .....	23
2.3	Synbiotika.....	24
2.3.1	Mechanismus účinku synbiotik .....	24
2.3.2	Vytvoření synbiotika metodou enkapsulace.....	25
2.3.3	Materiály používané pro vytvoření vnější vrstvy .....	25
2.3.3.1	Alginát .....	26
2.3.4	Metody enkapsulace .....	26
2.3.4.1	Sprejové sušení .....	26

2.3.4.2	Sprejové chlazení.....	27
2.3.4.3	Lyofilizace .....	27
2.3.4.4	Fluidní vrstva .....	28
2.3.4.5	Extruze.....	28
2.3.4.6	Emulgace .....	29
2.3.4.7	Koacervace .....	29
2.3.4.8	Kokrystalizace .....	29
2.4	Použité metody .....	30
2.4.1	Chromatografie.....	30
2.4.1.1	Plynová chromatografie.....	30
2.4.1.2	Kapalinová chromatografie .....	30
2.4.2	Enkapsulátor .....	30
2.4.3	Průtoková cytometrie.....	31
<b>3</b>	<b>Cíl práce .....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>33</b>
4.1	Použité chemikálie .....	33
4.2	Použité přístroje a pomůcky .....	33
4.3	Použité probiotické kultury .....	34
4.4	Složení použitých probiotických produktů.....	34
4.4.1	APO-LAKTÍK kapky .....	34
4.4.2	APO-LAKTÍK pastilky .....	34
4.4.3	Biopron JUNIOR sáčky.....	35
4.4.4	ProbioMaxík tablety .....	35
4.5	Složení použitých prebiotických produktů.....	35
4.5.1	Inulin.....	35
4.5.2	Chia vláknina .....	36
4.5.3	Bambusová vláknina .....	36
4.5.4	Jakon sirup.....	36
4.6	Kultivace mléčných bakterií v tekutém médiu.....	37
4.7	Promytí probiotických buněk .....	37
4.8	Enkapsulace.....	37
4.8.1	Příprava alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými buňkami	37
4.9	Lyofilizace.....	37
4.9.1	Lyofilizace buněk .....	37
4.9.2	Lyofilizace alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými buňkami	37
4.10	Stanovení počtu buněk a jejich viability .....	37
4.10.1	Průtokový cytometr .....	37
4.10.2	Kultivace na tuhém médiu na Petriho miskách metodou přelivu.....	38
4.11	Potvrzení deklarovaného počtu buněk v komerčních probiotických preparátech metodou přelivu.....	38
4.12	Modelové trávení vybraných komerčních probiotických produktů s využitím metody přelivu.....	38

4.12.1	Příprava trávicích šťáv.....	39
4.12.1.1	Složení modelové pankreatické šťávy .....	39
4.12.1.2	Složení modelové žaludeční šťávy .....	39
4.12.1.3	Složení modelové žlučové šťávy .....	39
4.13	Modelové trávení čerstvých probiotických buněk v různých formách .....	39
4.14	Stanovení celkových rozpustných sacharidů u prebiotických produktů metodou dle Duboise.....	40
4.15	Stanovení redukujících sacharidů u prebiotických produktů metodou dle Somogyi–Nelsona.....	40
4.15.1	Příprava roztoků .....	41
4.16	Stanovení celkových polyfenolů u prebiotických produktů.....	41
4.17	Charakteristika prebiotických produktů z hlediska obsahu sacharidů metodou HPLC.....	41
4.18	Stanoví celkových bílkovin u prebiotických produktů metodou dle Kjeldahla ....	42
4.18.1	Provedení mineralizace.....	42
4.18.2	Provedení destilace .....	42
4.19	Extrakce lipidů u vybraných prebiotických produktů metodou dle Folche .....	43
4.20	Stanovení obsahu mastných kyselin u prebiotických produktů metodou plynové chromatografie.....	43
4.21	Fotometrické stanovení chlorofylů u prebiotického produktu Chlorella + Spirulina .....	44
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuse .....</b>	<b>45</b>
5.1	Stanovení viability probiotických buněk.....	45
5.1.1	Potvrzení deklarovaného počtu buněk v komerčních probiotických preparátech metodou přelivu .....	45
5.2	Stanovení počtu buněk a jejich viability na průtokovém cytometru .....	46
5.3	Příprava alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými buňkami .....	47
5.3.1	Stanovení enkapsulační účinnosti.....	47
5.4	Modelové trávení probiotických buněk v různých formách .....	47
5.4.1	Modelové trávení komerčních probiotických produktů s využitím metody přelivu.....	47
5.5	Modelové trávení čerstvých probiotických buněk .....	50
5.6	Modelové trávení lyofilizovaných probiotických buněk s využitím metody přelivu .....	51
5.7	Modelové trávení lyofilizovaných alginátových částic s využitím metody přelivu .....	52
5.8	Výběr nejlepšího prebiotika z hlediska podpory viability probiotických buněk...	53
5.9	Charakterizace vybraných prebiotických výrobků.....	55
5.9.1	Stanovení celkových rozpustných sacharidů metodou dle Duboise.....	55
5.9.2	Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona .....	56
5.9.3	Charakterizace prebiotických produktů z hlediska obsahu sacharidů metodou HPLC .....	56



5.9.4	Stanovení celkových bílkovin u prebiotických produktů metodou dle Kjeldahla.....	59
5.9.5	Stanovení obsahu mastných kyselin u prebiotických produktů pomocí plynové chromatografie.....	59
5.9.6	Stanovení celkových polyfenolů .....	62
5.9.7	Fotometrické stanovení chlorofylů u prebiotického produktu Chlorella + Spirulina .....	62
5.10	Návrh vlastního probiotického produktu.....	63
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>Seznam zkratek .....</b>	<b>73</b>

# 1 ÚVOD

Probiotické produkty určené pro dospělé si postupem času získaly na trhu stabilní pozici. Celá řada pacientů využívá pozitivních účinků probiotik na střevní mikroflóru zejména při antibiotické terapii, cestovatelském průjmu či při jiných zažívacích obtížích. V poslední době si své místo na trhu snaží najít také probiotické produkty určené pro děti. Výrobci probiotických preparátů cílí zejména na děti, které mají střevní mikroflóru oslabenou o prospěšné probiotické bakterie. K tomuto jevu dochází hlavně dvou případech. Za prvé v případě, kdy dítě přijde na svět císařským řezem, nikoliv přirozenou cestou. Takto narozené děti jsou poté významným způsobem ochuzeny o probiotické bakterie přítomny ve vaginálních cestách matky. Druhým případem jsou děti nekojené. Jak je známo, mateřské mléko je významným zdrojem probiotických mikroorganismů. Nekojené děti proto postrádají zejména bakterie rodu *Bifidobacterium*, které jsou ve velkém množství zastoupeny právě v mateřském mléce.

Dětský spotřebitelé jsou náročnějším uživatelem probiotik než dospělí jedinci. Probiotika musí mít vhodnou formu, aby byla pro děti snadno užitelná. Pro nejmenší děti proto často výrobci sází na formu probiotických kapek, které mohou rodiče zamíchat například do nápoje. Pro děti již krmené pevnou stravou výrobci přišli s práškovou formou produktu, která se snadno zamíchá do dětských kaší. Pro starší děti se na trhu postupně objevují produkty například v podobě bonbónů, pastilek či želatinových medvídků. Jde o formu produktu, která se pro děti snaží být co nejvíce atraktivní.

Některé probiotické produkty pro děti obsahují také další přídatné složky. Jde zejména o prebiotika, která podporují viabilitu probiotických bakterií, ale také přispívají ke správnému trávení u dětí. Z prebiotik je však výrobci využíván výhradně inulin, což nenabízí mnoho variant pro zlepšení a vytvoření výživově zajímavějšího produktu. Tento produkt by mohl být obohacen o některé z dalších typů prebiotik, která jsou méně obvyklá. Dětem by tato méně obvyklá prebiotika mohla přinést i řadu zajímavých látek z výživového hlediska. Kromě prebiotik obsahují některé produkty také vitamín C, který slouží například ke správné funkci imunitního systému. Zde se nabízí také mnoho variant pro další vylepšení probiotického produktu, ať už z hlediska obsahu vitamínů, chuťových složek či dalších aktivních látek.

Předložená diplomová práce se proto zaměřuje na návrh nového typu probiotického preparátu pro děti s unikátním složením, který bude z výživového hlediska lepší než dostupné komerční preparáty. Zároveň bude splňovat kritérium atraktivního produktu pro dětské spotřebitele jak z hlediska chuti, tak i z hlediska vzhledu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Probiotika

Slovo probiotika pochází z řeckých slov ‚pro‘ a ‚bios‘, což může být vyloženo jako ‚pro život‘. Podle definice FAO/WHO jsou jako probiotika označovány živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v přiměřeném množství, tak pozitivně ovlivňují zdraví hostitele. Hostitelem pak může být člověk nebo zvíře. Probiotika jsou tedy mono či směsné kultury živých mikroorganismů, které zlepšují vlastnosti střevní mikroflóry a tím následně zlepšují celkový zdravotní stav hostitele [1, 2, 3].

Aby mohly být mikrobiální kmeny zařazeny mezi probiotika, musí splňovat několik základních kritérií. Jednotlivé kmeny musí mít prokazatelně pozitivní vliv na zdraví hostitele a musí být zároveň zdravotně nezávadné. Dále nesmí být toxické ani patogenní. Forma, ve které je pak probiotikum do trávicího ústrojí aplikováno, musí obsahovat takové množství životaschopných buněk, které jim umožní přežít v trávicím ústrojí a být metabolicky aktivní. Důležité je také to, že probiotika musí být životaschopné i během skladování [3].

Mezi probiotika patří různé druhy mikroorganismů, především se však jedná o některé zástupce z řady mléčných bakterií. Nejčastější zástupce probiotik nalezneme ve třech rodech, a to mezi rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*. Zástupci z rodu *Lactobacillus* byly první skupinou bakterií, která byla definována jako probiotika. Později byli mezi probiotika zařazeni také zástupci z rodu *Bifidobacterium*, *Streptococcus* a další. V každém rodu jsou tedy dále specifikovány různé kmeny bakterií s probiotickými vlastnostmi, například u laktobacilů je to *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis* nebo *Lactobacillus fermentum*. U bifidobakterií jde o *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* a podobně. Uvedené kmeny probiotických bakterií se navíc vzájemně posilují. Například po podání bakterií rodu *Lactobacillus* se v trávicím traktu nejen zvýší počet těchto bakterií, ale zvýší se i počet bakterií ve skupině *Streptococcus*. Kromě výše uvedených bakterií patří mezi probiotika i jiné mikroorganismy. Jsou to například kvasinkové mikroorganismy jako *Saccharomyces boulardii* [4].

Přehled nejčastěji probioticky využívaných kmenů mikroorganismů je uveden v tabulce č. 1.

Tabulka 1: Přehled nejčastěji využívaných probiotických kmenů mikroorganismů [5]

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Jiné bakterie mléčného kvašení	Jiné typy mikroorganismů
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> kmen Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Sacharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilis</i>	

<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>	
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. planarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

### 2.1.1 Historie probiotik a jejich definice

Prvním průkopníkem využití probiotik byl nositel Nobelovy ceny ruského původu Eli Metchnikoff, který pracoval v Pasteurově institutu v Paříži. Ten na počátku minulého století zjistil, že bakteriální složení střevní mikroflóry závisí na skladbě přijímaných potravin. Z toho vyvodil, že úpravou jídelníčku lze zvýšit počet zdraví prospěšných bakterií v trávicím traktu člověka a posílit tím lepší zdravotní stav. Ve stejné době francouzský pediatr Henry Tissier zpozoroval, že děti trpící průjmem měly ve své stolici jen velmi malý počet bifidobakterií na rozdíl od dětí zdravých, jejichž stolice obsahovala vysoký počet bifidobakterií. Tissier navrhl, aby bifidobakterie byly uměle podávány dětem postiženým průjmem. To jim mělo pomoci obnovit rovnovážné složení střevní mikroflóry. Práce Metchnikoffa a Tissiera byly první vědecké návrhy praktického použití probiotických bakterií, a to i přesto, že termín probiotikum jako takový ještě nebyl znám [2].

Termín probiotika definovali Lilly a Stilwell v roce 1965 jako faktory, které jsou produkovány mikroorganismy, a které mají příznivý účinek na celkový růst zvířat a zároveň na růst některých dalších mikroorganismů. Zvířata živená zakysanými mléčnými výrobky s těmito faktory byla celkově zdravější a lépe rostla. V roce 1974 Parker použil termín probiotika pro organismy, které mají obecně příznivý účinek na střevní mikroflóru hostitele. V roce 1989 Fuller definoval konkrétněji probiotika jako živý mikrobiální doplněk stravy, který příznivě ovlivňuje střevní rovnováhu hostitelského zvířete. Další podobnou definici navrhli Havenaar a Huis in 't Veld v roce 1992. Probiotika označili jako životaschopnou mono či směsnou kulturu bakteriálních buněk, která při aplikaci zvířeti nebo člověku pozitivně ovlivňuje jeho střevní mikroflóru. Novější definice podle Guarnera a Schaafsma z roku 1998 označuje probiotika jako živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství pozitivně ovlivňují celkový zdravotní stav hostitele. V následujících 20 letech došlo k velkému zájmu o probiotika a jejich možné využití. Jako jejich hlavní definice je nyní využívána výše zmíněná definice FAO/WHO z roku 2001. Dochází však k celé řadě jejích obměn. Například za probiotika jsou podle současné definice považovány pouze živé mikroorganismy, nikoliv mrtvé [2, 4, 6].

### 2.1.2 Střevní mikroflóra

Střevní mikroflóra je velmi důležitou součástí trávicího ústrojí. Trávicí ústrojí je domovem více než  $10^{14}$  CFU/g bakterií a celkově obsahuje až 1 000 bakteriálních druhů. Jde o nejkompexnější ekosystém v lidském těle a tato bakteriální flóra má v organismu mnoho důležitých funkcí. Slouží k syntéze některých vitamínů B, syntéze aminokyselin nebo k transformaci žluči, která hraje zásadní roli v metabolismu glukózy a cholesterolu.

Ve střevě se vyskytují jednak bakterie hnilobné, které produkují amoniak, sulfan nebo fenoly a jednak bakterie kvasné, které produkují methan a oxid uhličitý. Střevo samo o sobě je považováno za tzv. aktivní orgán, a to právě v důsledku své bohaté bakteriální flóry a jeho metabolické aktivity. Další velmi důležitou součástí střevní mikroflóry jsou právě probiotické bakterie, které podporují imunitu střevní mikroflóry. Lidské tělo má vyvinutý komplexní obranný imunitní systém, jehož posláním je buď rozpoznat a zničit nepříznivé patogenní vlivy na lidský organismus nebo vyvinout mechanismy minimalizující následky těchto škodlivých vlivů. Konkrétně před patogeny jako jsou bakterie, paraziti nebo viry je lidský organismus chráněn pomocí překážek tvořených kůží, sliznicemi a střevním obranným systémem. Obranný systém ve střevě je závislý na třech složkách, a to právě na střevní mikroflóře, střevní sliznici a dále na střevním epitelu [7, 8, 9].

Střevní mikroflóra funguje správně, pokud je její bakteriální flóra v rovnováze. Tuto křehkou rovnováhu může narušit antibiotická léčba či chemoterapie, významné změny ve stravě, chirurgická operace nebo podávání některých léků jako jsou například projímadla. Narušená rovnováha střevní mikroflóry se taktéž objevuje u starších lidí, u kterých dochází k redukci bifidobakterií. Tato různá narušení rovnováhy střevní mikroflóry mohou vést k oslabení imunity jedince a k rozvinutí některých infekcí jako je například infekce způsobená *Clostridium difficile*. Ta často vede k průjmovým onemocněním u starších pacientů [7].

### 2.1.3 Střevní mikroflóra u dětí

Před narozením dítěte je jeho střevní mikroflóra zcela sterilní, jelikož jeho střevo není v těle matky osídleno žádnými bakteriemi. Po narození dítěte však dochází k postupnému bakteriálnímu osídlení střevní mikroflóry. Toto osídlení je závislé zejména na dvou faktorech. Velmi důležité je, zda dítě přišlo na svět císařským řezem či přirozenou cestou. Dalším důležitým faktorem je, zda je po narození dítě kojeno či nikoliv.

Dítě, které přijde na svět přirozenou cestou, získává při průchodu vaginální cestou matky první bakterie, kdy jde hlavně o anaerobní bakterie. Děti narozené císařským řezem začínají svůj život s úplně bakteriologicky čistým stavem. U těchto dětí je první kontakt s bakteriemi víceméně náhodný, kdy tyto bakterie pochází z nemocničního prostředí, anebo od zaměstnanců nemocnice. Tyto děti získávají hlavně mikroaerofilní mikroorganismy a fakultativně-anaerobní mikroorganismy jako je třeba bakteriální kmen *Clostridium*.

Co se týká kojených a nekojených dětí, kojené děti vykazují během prvního týdne života vyšší počty bakterií než děti nekojené. Lidské mateřské mléko totiž obsahuje menší množství celé řady nepatogenních bakterií jako jsou *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* a *Bifidobacterium*. V mikroflóře kojených a nekojených dětí můžeme najít také určité rozdíly. Jde zejména o obsahové zastoupení ve střevě. Kojené děti obsahují ve střevě více bakterií kmene *Bifidobacterium*, které jsou samy o sobě obsaženy v mateřském mléce. Děti nekojené obsahují ve své střevní mikroflóře spíše kmen *Clostridium*.

Obecně se bakterie se ve střevech a stolici novorozence začnou objevovat do několika hodin po narození, kdy se začíná rozvíjet normální bakteriální flóra. V první stolici se dá často izolovat ve velkém množství například *Escherichia coli*, *Streptococcus* nebo *Staphylococcus*. Tyto prvotní bakterie pak vytváří příznivé podmínky pro následný výskyt anaerobních bakterií, jako jsou kmeny *Clostridium* nebo *Bifidobacterium*. Ty se ve stolici začínají objevovat asi do 2 dnů od porodu. Rychlý a pravidelný nárůst počtu bakterií je zaznamenán během prvního týdne života a odpovídá hodnotě  $10^9$  CFU/g stolice.

V celé řadě studií byly zaznamenány i výrazné účinky kmene *Bifidobacterium* na růst a zdraví kojenců. To je velmi důležitý faktor, protože během prvních dnů života, kdy se bakteriální flóra vyvíjí, jsou novorozenci velmi náchylní k různým typům infekce. Je to z toho důvodu, že kvůli nedostatečně rozvinuté střevní mikroflóře nejsou plně rozvinuté ani obranné mechanismy lidského těla. Děti, které nejsou kojené a nedostává se jim kmene *Bifidobacterium* z mateřského mléka, jsou ohroženy nejvíce.

V případě, že se dítě narodilo přirozeně a bylo dostatečně kojeno, je ve 2 letech dítěte jeho střevní mikroflóra srovnatelná s mikroflórou dospělého člověka. U dětí, které se narodily císařským řezem nebo kojeny nebyly, není osídlení střev správné a může docházet k problémům s imunitou a častou nemocností. Zde mohou nabídnout pomoc uměle podávaná probiotika, která umožňují vytvoření rovnováhy ve střevě a z toho plynoucí nápravu imunitního systému [8].

#### **2.1.4 Mechanismus účinku probiotik**

Probiotika se vyznačují různými typy mechanismů účinku. Důležitá je produkce substancí, které působí inhibičně na grampozitivní i gramnegativní bakterie. Mezi tyto substance patří například různé organické kyseliny nebo peroxid vodíku. Produkci těchto substancí nejen že snižují produkci toxinů patogenními bakteriemi, ale snižují také celkový počet živých patogenních bakterií. Například probiotika kmenů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* jsou velmi důležité pro prevenci invaze enteropatogenů. Produkují kyselinu mléčnou a ta následně vede k odstranění škodlivých patogenů. Dalším mechanismem účinku je jejich adhezace na střevní epitel, kde kompetitivní inhibicí blokuje adhezni místa pro patogenní bakterie. S tím souvisí také využití živin, které by jinak byly spotřebovávány patogenními bakteriemi. Mezi další mechanismy účinku patří také zlepšení bariérové funkce epiteliální výstelky a jejich stimulace specifické i nespecifické imunity [4, 9, 10].

Probiotika se dále vyznačují také produkcí aminokyselin s krátkým řetězcem, mezi které patří například kyselina  $\gamma$ -aminomáslená (tzv. GABA). Ta v organismu slouží jako neurotransmitter. Některá probiotika obsahují také geny kódující proteiny zodpovědné za některé biochemické cesty, kterých lidský organismus sám o sobě není schopný. Jde například o rozklad komplexního zdroje uhlíku. Některé kmeny produkují butyrát jako výsledek jejich fermentačního metabolismu. Právě butyrát je klíčovou molekulou k zajištění střevní homeostázy [10].

#### **2.1.5 Význam probiotik**

Různé probiotické kmeny vykazují různé příznivé účinky, a to pomocí různých mechanismů. Jejich pozitivní vliv je také často způsoben synergickým působením s jinými bakteriemi obsaženými ve střevní mikroflóře. Jeden probiotický kmen může mít úplně jiné vlastnosti než

kmen další a stejně tak může mít jiné klinické účinky na lidský organismus. Účinnost jednoho kmene nám nezaručuje, že stejné účinky budou mít i další probiotické kmeny. Proto jsou zdravotní přínosy probiotik dále pečlivě zkoumány a probíhá celá řada studií, které se soustředí na vliv probiotik na lidské zdraví ve vztahu k různým chorobám [11].

Přesto můžeme již nyní definovat několik základních významů probiotik pro lidský organismus a zdraví člověka, které jsou uvedeny v následujících kapitolách.

#### **2.1.5.1 Virové průjmové onemocnění**

Velmi často vyskytující se virové průjmové onemocnění je tzv. rotavirus. Jde o velmi nebezpečné onemocnění zažívacího traktu objevující se zejména u batolat a malých dětí. Rotavirus napadá epitelální buňky tenkého střeva. Je jednou z nejčastějších příčin akutního průjmu u dětí ve vyspělých zemích světa. Může způsobit i velmi vážný průběh onemocnění s těžkými průjmy, u kterých existuje velké riziko dehydratace dítěte. Ta může skončit v některých případech až smrtí dítěte [12].

Bylo prokázáno, že některé probiotické kmeny rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* mohou zkrátit dobu onemocnění přibližně o jeden den. Tento pozitivní účinek probiotik lze vysvětlit stabilizací střevní mikroflóry. Studie ukázaly, že podávání probiotik vede k významnému vzestupu specifických protilátek proti rotavirům v krevním séru pacientů, což naznačuje, že také humorální imunita hraje důležitou roli v mechanismu účinku probiotik [3].

#### **2.1.5.2 Průjmové onemocnění po léčbě antibiotiky**

Antibiotická léčba přináší kromě problémů s rezistencí i celou řadu vedlejších účinků na zdraví pacienta. Antibiotika například mění prostředí gastrointestinální flóry tím, že kromě škodlivých bakterií ničí i ty zdraví prospěšné. To následně vede ke snížené odolnosti vůči patogenům jako je například *Clostridium difficile*. Snížená odolnost pak vede k rozvoji průjmového onemocnění. Rozvoj tohoto průjmu je také velmi častý u malých dětí, například se vyskytuje až u 30 % novorozenců, kterým byla podána antibiotická léčba. Probiotika pak mohou pomoci navrátit zdraví prospěšné bakterie do střevní mikroflóry a zmírnit tak příznaky průjmu [13, 14].

#### **2.1.5.3 Crohnova choroba**

Probiotika byla taktéž úspěšně zkoušena v léčbě Crohnovy choroby tlustého střeva. U pacientů s touto nemocí probiotika pomáhají lépe udržovat remisní fázi onemocnění, tzn. fázi klidovou. V léčbě této nemoci se probiotika osvědčila zejména jako doplněk ke klasické léčbě [3, 4].

#### **2.1.5.4 Alergie**

Spousta studií zaměřených na probiotické bakterie ukazuje, že probiotika pomáhají vývoji imunitního systému už v kojeneckém věku. Současně zlepšují funkčnost slizniční bariéry. Slizniční bariéra je považována za jeden z faktorů, který přispívá ke zmírnění alergické reakce. Její funkce se projevuje zejména u alergií na potraviny a atopického ekzému. Bylo zjištěno, že podávání probiotik vede k prevenci potravinových alergií u dětí. U dětí s atopickým ekzémem došlo při podávání probiotik k výraznému zmírnění potíží. Bohužel, probiotika nejsou účinná v boji proti astmatu ani alergii na bílkovinu kravského mléka [3, 15].

#### **2.1.5.5 Intolerance laktózy**

Intolerance laktózy je způsobena nedostatečnou funkcí enzymu  $\beta$ -galaktosidázy. Její zhoršená funkčnost vede k neschopnosti hydrolyzovat (štěpit) laktózu na monosacharidy glukózu a

galaktózu. Asi 10 až 15 % dospělé populace má výrazně sníženou aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy a již po konzumaci malého množství laktózy u nich dochází k zažívacím potížím. U osob trpících intolerancí laktózy dochází po konzumaci mléka či mléčných výrobků k rozvoji bolesti břicha a průjmu. Probiotické bakterie obsahují  $\beta$ -galaktosidázu samy o sobě a pomocí svého enzymu pomáhají štěpit laktózu v tlustém střevě pacienta s laktózovou intolerancí. Tímto působením zlepšují toleranci laktózy [3, 14].

### **2.1.6 Rizika spojená s užíváním probiotik**

Z definice probiotik vyplývá, že pozitivně ovlivňují zdraví hostitele. Neznamena to však, že by jejich užívání bylo zcela bez rizika. Riziko užívání probiotik je u pacientů s alergiemi na kvasinky. U nich musí být vyloučeno podání probiotik s kvasinkami jako je *Sacharomyces boulardi*. Dalším rizikem mohou být potenciální interakce s léky na předpis, ačkoli se vyskytují velmi zřídka (například interakce s antikoagulačními léčivy). Riziko užívání může nastat i pro pacienty se sníženou imunitou (například díky chemoterapii), u kterých by se mohla vyvinout vážnější infekce. Nasazení probiotik v těchto případech musí být konzultováno s lékařem [7].

### **2.1.7 Bakterie mléčného kvašení**

#### **2.1.7.1 Rod *Lactobacillus***

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou velmi důležitou součástí lidské střevní bakteriální flóry a běžně se také vyskytují například v ústech. Jejich název vychází z toho, že při zkvašování sacharidů produkují prakticky jen kyselinu mléčnou, tzn. fermentují glukózu a laktózu na laktát.

Laktobacily jsou robustní nesporelující grampozitivní tyčinky a vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích nebo tvoří krátké řetězky. Jsou mikroaerofilní nebo fakultativně anaerobní. Optimální teplota pro jejich růst je kolem 39 °C. Jejich hlavním metabolickým produktem je kyselina mléčná, která vzniká fermentací glukózy. Kromě kyseliny mléčné produkují také v menším množství kyselinu octovou nebo kyselinu jantarovou. Celkem bylo popsáno asi 128 druhů rodu *Lactobacillus*, ale jen několik málo kmenů je používáno jako probiotika. Nejběžnějšími kmeny jsou *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus acidophilus*. Kmen *Lactobacillus acidophilus* má díky svým vhodným vlastnostem využití dále v mlékárenství při výrobě acidofilního mléka, podmáslí a smetany, dále pak ve zdravotnictví. Jeho struktura je uvedena na obrázku č. 1 [16, 17, 18, 19].





Obrázek 1: *Lactobacillus acidophilus* [20]

#### 2.1.7.2 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou grampozitivní, nesporulující, anaerobní bakterie ve tvaru tyčinek, které bývají často na jednom konci rozštěpeny. Vyskytují se jak jednotlivě, tak i v řetízcích nebo hvězdicovitě uspořádání. Patří k běžné flóře dutiny ústní, zažívacího traktu a jsou důležitou součástí mateřského mléka. Bakterie rodu *Bifidobacterium* představují dominantní bakteriální populaci v gastrointestinálním traktu. U kojených dětí tvoří více než 95 % střevních bakterií, u dospělých jejich podíl klesá na přibližně 25 %. V současnosti je v rámci rodu *Bifidobacterium* definováno 38 bakteriálních druhů, z nichž je šest využíváno pro své probiotické vlastnosti. Jako probiotické kultury se používají nejčastěji kmeny *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* (struktura uvedena na obrázku č. 2) a *Bifidobacterium thermophilum* [16, 17, 19].



Obrázek 2: *Bifidobacterium breve* [21]

#### 2.1.8 Probiotické produkty pro děti

I přesto, že se donedávna užívání probiotik týkalo víceméně jen dospělých jedinců, v poslední době se na trhu objevily i přípravky cílené na děti, a to zejména předškolního věku. V této skupině jsou velkým problémem děti, které nepřijímaly mateřské mléko, anebo děti, které přišly na svět císařským řezem. Obě skupiny těchto dětí jsou ochuzeny o některé prospěšné bakterie ve své střevní mikroflóře. Produkty na trhu jsou určeny k doplnění právě těchto prospěšných bakterií. Kromě těchto dětí jsou vhodnými uživateli i děti s antibiotickou terapií, u kterých hrozí riziko průjmu. Kromě probiotických bakterií obsahují produkty i některé další složky jako jsou například prebiotika. Ta jsou detailně popsána v kapitole 2.2. Z nich je využívána zejména inulin.

Ten výrazně podporuje životaschopnost probiotických bakterií, a navíc obsahuje fruktooligosacharidy (FOS), které jsou přítomny i v mateřském mléce.

Probiotické produkty pro děti se na trhu vyskytují v celé řadě různých forem. Na trhu se vyskytují například *pastilky* s různými příchutěmi, jako je jahodová, třešňová, hroznová nebo citrónová. Pastilky jsou často želatinové nebo dextransové. K těmto pastilkám je také často přidáváno umělé sladidlo xylitol. Toto sladidlo účinně působí proti zubnímu kazu u dětí. Je známo, že na průměrné pětileté dítě připadají asi 4 zubní kazy. Tím pádem je toto sladidlo velmi vhodné pro skupinu předškolních dětí a může u nich sloužit jako prevence zubního kazu. Další formou, ve které se dětská probiotika nacházejí, jsou *kapky*. Ty jsou vhodné pro nejmenší děti, kvůli své šetrné formě aplikace. Obsahují zejména různé kmeny rodu *Lactobacillus*. Dalším zajímavým produktem na trhu jsou probiotika v lyofilizované formě. Ta jsou uchovávána ve formě prášku v *sáčcích*. Jejich aplikace je vhodná zejména přidáním do pokrmů (dětské kaše či dětské mléka). Jejich hlavní složkou jsou bakterie rodu *Bifidobacterium* a obsahují také FOS, které jsou přirozenou součástí mateřského mléka. Na trhu se vyskytují i některé další zajímavé produkty, které se snaží oslovit malé dětské spotřebitele. Jde například o probiotické medvídky s příchutí bílé čokolády. Výrobce se snaží děti zaujmout tvarem výrobku, na který jsou děti zvyklé u sladkostí, benefitem výrobku může být také příjemná chuť [22, 23].

## **2.1.9 Použité probiotické produkty pro děti**

### **2.1.9.1 APO-LAKTÍK kapky**

Probiotický přípravek APO-LAKTÍK kapky obsahuje dva probiotické kmeny *Lactobacillus reuteri* a *Lactobacillus rhamnosus*. Jako prebiotikum obsahuje fruktooligosacharidy. Tyto kapky pro děti mohou být užívány od 0. měsíce [24].

### **2.1.9.2 APO-LAKTÍK pastilky**

Probiotický přípravek APO-LAKTÍK pastilky obsahuje celkem 4 probiotické kmeny, a to *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Streptococcus thermophilus*. Navíc obsahuje fruktooligosacharidy, xylitol a vitamín C, který přispívá k normální funkci imunitního systému. Pastilky mají jahodovou příchut' [25].

### **2.1.9.3 Biopron JUNIOR sáčky**

Probiotický výrobek Biopron JUNIOR sáčky je určen pro děti od ukončeného 1. měsíce života. Obsahuje kombinaci tří kmenů bakterií, a to *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium infantis*. Je také obohacen o fruktooligosacharidy a navíc o vanilkové aroma [26].

### **2.1.9.4 ProbioMaxík tablety**

Probiotikum ProbioMaxík tablety obsahuje tři mikrobiální probiotické kmeny, a to *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium longum*. Tablety mají hroznovou příchut' a také obsahují xylitol i vitamín C [27].

Všechny použité probiotické produkty jsou souhrnně znázorněny na obrázku č. 3 a z hlediska složení jsou detailněji popsány v kapitole 4.4.



Obrázek 3: Použité probiotické produkty pro děti (zleva APO-LAKTÍK kapky, APO-LAKTÍK postílky, Biopron JUNIOR sáčky, ProbioMaxik tablety)

## 2.2 Prebiotika

Jako prebiotikum je označována nestravitelná složka potravy, která selektivně stimuluje růst a aktivitu některých skupin prospěšných bakterií v lidském střevě. Prebiotika nejsou stravitelné trávicími enzymy lidského organismu, ale ve střevě jsou fermentovány prospěšnými bakteriemi za produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA - short chain fatty acids), jako je například kyselina máselná. Pro skupinu prospěšných bakterií pak slouží jako zdroj energie, zejména uhlíku, čímž podporují jejich viabilitu. Svou přítomností v tlustém střevě také prebiotika snižují riziko vzniku rakoviny (zejména rakoviny tlustého střeva a konečníku). Rovněž zvyšují schopnost vstřebávání vápníku a hořčíku. Zdrojem prebiotik je zelenina (například cibule, česnek nebo rajčata), dále obiloviny (například zelený ječmen), různé rostliny (například čekanka nebo jitrocel indický) či ovoce (například banány). Prebiotika mohou být tedy získána z těchto přírodních zdrojů a dále také mikrobiologickou produkcí, enzymatickou syntézou nebo enzymatickou degradací polysacharidů. Nestravitelné sacharidy můžeme považovat za prebiotika za předpokladu, že jsou odolné vůči žaludečním kyselinám a enzymům v organismu, prokazují citlivost na fermentaci střevními bakteriemi a mají schopnost zvýšení životaschopnosti i aktivity prospěšných mikroorganismů. U lidí by prebiotika měla představovat asi 10 % celkového energetického příjmu a asi 20 % objemu celkového příjmu potravy [28, 29].

Mezi nejznámější prebiotika, která se běžně vyskytují v lidské stravě, řadíme laktulózu, fruktooligosacharidy (FOS), galaktooligosacharidy (GOS) či inulin a jeho hydrolyzáty. Významnými prebiotiky jsou i různé typy vlákniny a jejich výrobků jako jsou pektiny, xylany a celulózy. GOS jsou odvozeny od laktózy, která se přirozeně vyskytuje v savčím mléce. Skládají se z řetězců monomerů galaktózy. FOS jsou pak deriváty inulinu. Inulin je znám jako rozpustná vláknina. Slouží jako rezervní polysacharid hlíznatých a oddenkových rostlin a vyskytuje se převážně jako součást kořenů čekanky nebo topinambury. V tabulce č. 2 jsou uvedeny nejvýznamnější typy prebiotik a jejich zdroje [28, 30].

Tabulka 2: Nejvýznamnější typy prebiotik a jejich zdroje [28]

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

### 2.2.1 Mechanismus účinku prebiotik

Prebiotika, která neporušená přicházejí trávicím traktem do střeva, zde slouží jako substráty pro fermentaci široké skupiny prospěšných bakterií. Jedno prebiotikum může být selektivním substrátem pro jeden, ale i více typů probiotických bakterií. V celé řadě studií in vivo bylo prokázáno, že po podání inulinu a FOS pacientům, nebyly tyto látky následně v jejich stolici vůbec detekovány, tzn. že byly rozloženy. Byla provedena také celá řada studií in vitro, kde bylo potvrzeno, že prebiotika procházejí neporušená až to tlustého střeva, kde prospěšné bakterie následně fermentují prebiotika za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem. Kromě těchto látek vznikají při fermentaci i některé aminokyseliny (arginin nebo cystein), polyaminy, růstové faktory, vitamíny a antioxidanty. Tyto látky zahrnují významnou část nutričních potřeb sliznice tlustého střeva a účastní se mnoha metabolických procesů. Bylo také zjištěno, že bakterie lépe fermentují lineární oligosacharidy než rozvětvené struktury [28, 29].

### 2.2.2 Význam prebiotik

Prebiotika mají celou řadu různých příznivých účinků na lidský organismus. *Alergické reakce* jako jsou astma, ekzém, kopřivka, rýma či senná rýma se velmi často objevují u dnešních dětí i dospělých. U některých dětí se mohou vyvinout dokonce již na počátcích kojenecké výživy. Je prokázáno, že prebiotika přidaná navíc do kojenecké výživy mohou pomoci zabránit vyvinutí ekzému u dětí. Prebiotika jsou přítomna v mateřském mléce. Jsou to hlavně nestravitelné oligosacharidy, jako jsou například FOS a GOS, které jsou přítomny v mateřském mléce v poměru 1:9. Problém však nastává u nekojených dětí, které nemají dostatečný přísun těchto látek [11].

U prebiotik je také znám jejich *vliv na metabolismus lipidů*. Podle některých studií fruktooligosacharidy a zejména inulin snižují hladinu triacylglycerolů. Zároveň snižují i koncentrace celkového cholesterolu. Tento účinek je vysvětlován tak, že snižují aktivitu lipogenních enzymů. Bylo také potvrzeno, že přispívají ke snižování hmotnosti navozením pocitu sytosti. Proto se také často využívají v redukčních dietách [12, 31].

Dále bylo prokázáno, že prebiotikum inulin výrazně zvyšuje vstřebávání vápníku, stejně jako dalších minerálů a zvyšuje i mineralizaci kostí v průběhu pubertálního růstu. Bylo tedy potvrzeno, že denní konzumace prebiotik u mladých dospělých významně zvyšuje vstřebávání vápníku a zvyšuje mineralizaci kostí [12, 32].

Jak již bylo zmíněno, fermentace prebiotik vede k produkci SCFA, které poskytují několik účinků na sliznici tlustého střeva. Kyselina máselná, která je produkována, je využívána epiteliálními buňkami sliznice tlustého střeva jako růstový faktor. Podle některých studií může mít také protizánětlivé účinky a preventivní účinky proti rozvoji nádorů [12].

### 2.2.3 Prebiotika v mateřském mléce

Lidské mateřské mléko je samo o sobě přirozeným prebiotickým zdrojem. Oligosacharidy tvoří třetí kvantitativně největší složku mateřského mléka, kdy se jejich koncentrace pohybuje okolo hodnot 6 až 12 g/l. Ve většině případů jsou tyto oligosacharidy odvozeny od laktózy. Oligosacharidy mohou chránit kojence živé mateřským mlékem před bakteriálními a virovými infekcemi, toxiny a plísněmi. Kromě toho mateřské mléko obsahuje také nezbytné živiny nebo růstové faktory pro správný vývoj dítěte a jeho střevní mikroflóry. Správného mikrobiálního složení dětského střeva je dosaženo ve dvou až třech letech dítěte. K určitým změnám střevní mikroflóry dochází také vlivem přechodu z kojenecké stravy k pevným potravinám. Světová zdravotnická organizace (WHO) doporučuje věk vhodný pro doplňkové krmení dětí okolo 6 až 23 měsíců věku dítěte. Tento věk se samozřejmě může lišit například u dětí s velmi nízkou porodní vahou, která musejí být dokrmována dříve.

Spousta vědeckých studií se zaměřila na posouzení úlohy pevné stravy a zavádění GOS a FOS do dětské stravy. Bylo zjištěno, že pokud jsou nekojeným dětem podávány GOS a FOS, dochází v organismu k syntéze podobných mastných kyselin s krátkým řetězcem jako v organismu kojených dětí. Dále bylo zjištěno, že při přidávání GOS a FOS do dětské výživy dochází k významnému nárůstu počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* jako je například *Bifidobacterium longum*. Nárůst těchto bakterií poté vede k lepší imunitě dítěte a k jeho celkově lepšímu zdravotnímu stavu. Prebiotika jsou přitom pro děti snadno dostupná například z banánů, proto se doporučuje postupně zařazovat dětem podobné potraviny do stravy. To dětem pomůže udržet vyvážený vývoj střevní mikroflóry. Obohacení kojeneckých přípravků pro nekojené děti směsí oligosacharidů tedy může přispět k dosažení takové střevní mikroflóry, která se svým složením blíží střevní mikroflóře kojených dětí [3, 33].

### 2.2.4 Vlákna

Taxonomicky je vlákna považována za tzv. nedigestibilní nutrienty, tzn. nestravitelné nutrienty. Vlákna lze charakterizovat několika způsoby, avšak obecně je vlákna definována jako jedlá část rostlin, která není štěpena pankreatickými a gastrointestinálními enzymy lidského organismu. Vlákna se pak dělí na rozpustnou a nerozpustnou ve vodě. Hlavním nutričním významem ve vodě rozpustné vlákna je, že slouží jako substrát pro fermentaci bakteriálních kmenů v tlustém střevě. Mezi rozpustnou vlákna řadíme například pektiny, guarovou gumu, arabskou gumu, inulin a fruktooligosacharidy. Dobrymi zdroji rozpustné vlákna jsou ovoce, zelenina, oves, luštěniny (fazole, čočka, hrách, cizrna) či ovoce (jablka, citrusové plody). Vlákna nerozpustná nemůže být metabolizována bakteriemi tlustého střeva a je z nutričního hlediska nevyužitelná. Pomáhá však při trávicích obtížích a také se využívá v redukčních dietách, protože navozuje pocit sytosti. Mezi nerozpustnou vlákna řadíme například celulózu, pšeničné a kukuřičné otruby, vlákna z ovesných slupek a rezistentní škroby. Zvláště dobrým zdrojem nerozpustné vlákna jsou výrobky z celozrnné mouky (celozrnný chléb, celozrnné těstoviny, celozrnný kuskus, celozrnné lupínky) a celozrnné

obiloviny (neloupaná rýže, bulgur, ječmen). Vzhledem k tomu, že rozpustná a nerozpustná vláknina je zastoupena v potravinách v různém množství a poměru, je velmi důležité jíst více druhů potravin s obsahem vlákniny [34, 35].

#### **2.2.4.1 Vláknina v dětské a dospělé stravě**

Co se týká výživy malých dětí, tak u nich musí být potraviny s vysokým obsahem vlákniny zařazovány do stravy postupně, nikoliv ve velkém množství najednou. Jejich strava by neměla být příliš objemná, aby dokázaly sníst dostatečné množství energie i živin nezbytných pro svůj vývoj. U nejmenších dětí se doporučuje nezařazovat nerozpustnou vlákninu do stravy do 4. měsíce věku. Děti v tomto věku navíc většinou přijímají oligosacharidy z mateřského mléka, takže o rozpustnou formu vlákniny nejsou ochuzeny. Vláknina se v množství 4 g denně doporučuje zařazovat do jídelníčku dětí od ukončeného 4. měsíce věku. Od ukončeného 1 roku je možno denní dávku vlákniny zvyšovat. Ke stanovení denního doporučeného množství vlákniny pro děti je možné použít jednoduchý výpočet, kdy se k věku dítěte v letech připočítá 5 gramů vlákniny. Tento výpočet je uveden pod odstavcem [34, 35, 36].

*Kolik gramů vlákniny by mělo mít v jídelníčku pětileté dítě?*

*5 let + 5 gramů vlákniny = 10 gramů vlákniny na den*

*Doporučená denní dávka vlákniny na den pro pětileté dítě je tedy 10 gramů [36].*

U dospělých jedinců však musíme na zvýšený příjem vlákniny dbát prakticky stále. Průměrná konzumace vlákniny je totiž jen asi 15 g/den, přičemž doporučení se pohybují okolo 30 g/den. Tuto dávku nám může kompenzovat například 400–500 g ovoce a zeleniny denně. Zelenina by měla být součástí každého jídla, ať syrová ve formě salátu nebo různě upravená. Mezi zeleninami vyniká v obsahu vlákniny brokolice, květák, kapusta, paprika, rajče, hlávkový salát či bílé zelí. Z ostatních potravin jsou výborným zdrojem luštěniny, žitné otruby, celozrnné výrobky. I ovoce je velmi kvalitním zdrojem vlákniny, a to zejména maliny, ostružiny, angrešt, rybíz červený i černý nebo švestky [34, 35].

## **2.2.5 Použitá prebiotika**

### **2.2.5.1 Inulin**

Inulin je polysacharid (patřící mezi FOS), který u rostlin z čeledi hvězdnicovitých nahrazuje škrob jako zásobní látku. Chemickým složením jde o tzv. fruktan, jehož základem jsou řetězce molekul fruktózy. Ty jsou spojeny  $\beta$ -(1,2)-glykosidickou vazbou. Množství jednotek je nejčastěji od 2 do 60. Je relativně nízkokalorický, kdy na 1 gram připadá asi 1,5 kalorie. Často se proto využívá jako umělé sladidlo a na trhu existuje celá řada doplňků stravy s jeho obsahem. Jde o jemný bílý prášek, který se ve střevě chová jako rozpustná vláknina a neštěpí se amylázou. Štěpí jej však bakteriální enzymy a následně pak slouží jako zdroj energie pro střevní bakterie.

Zdrojem inulinu je mnoho rostlin, avšak ve větším měřítku je obsažen zejména v chřestu, česneku, jeruzalémském artyčoku, cibuli, anebo jakonu. Inulin má také celou řadu blahodárných účinků na lidský organismus. Slouží jako substrát k fermentaci pro střevní probiotické bakterie a tím podporuje jejich růst a zlepšuje zažívání. Byly také provedeny mnohé studie, které potvrdily, že lidé pravidelně konzumující inulin mají obecně lepší peristaltiku střev, a proto u nich nedochází k zácpám. Inulin se také využívá u snižování hmotnosti, kdy pomáhá navozovat pocit sytosti. Velmi zajímavý efekt má také u pacientů s cukrovkou, kde má

pozitivní účinky na hladinu krevního cukru. V případě, že je inulin užíván v doporučených dávkách, tak nemá žádné nežádoucí účinky. Pozor by si měli dát jen lidé s intolerancí fruktózy. Při požití vyšších dávek, než jsou doporučené, se mohou objevit zažívací obtíže [37, 38].

#### **2.2.5.2 Chia vláknina**

Chia vláknina se získává z chia semínek, tzn. semínek z rostliny šalvěje hispánské (*Salvia hispanica*) z čeledi hluchavkovitých. Tato rostlina pochází ze Střední Ameriky. Chia semínka si v posledních letech získala významnou pozici mezi tzv. super-potravinami. Semínka se vyznačují vysokým obsahem vlákniny, bílkovin a nenasyčených omega 3 mastných kyselin. Chia vláknina se pak získává zpracováním těchto semínek, kdy se z nich šetrně za nízkých teplot vylisuje olej. Chia je nápomocná zejména při různých redukčních dietách, kdy pomáhá snižovat chuť k jídlu a udržuje normální hladinu cholesterolu. Její další účinek je zpomalení vstřebávání sacharidů. Díky tomu, že vykazuje výrazný hydrofilní charakter, tak na sebe dokáže vázat vodu a následně vytváří hustý gel. Ten pak slouží jako fyzická bariéra mezi sacharidy a trávicími enzymy, které je rozkládají. To způsobuje zpomalování procesu přeměny sacharidů na jednoduché cukry. Energie přijímaná potravou se tak uvolňuje postupně a je tělem mnohem lépe využita. Toho se využívá u pacientů s cukrovkou [39, 40].

#### **2.2.5.3 Bambusová vláknina**

Bambusová vláknina je rostlinná vláknina vyráběná z výhonků (stébel) bambusu. Jde o nerozpustnou vlákninu, která na sebe také, stejně jako Chia vláknina, velmi dobře váže vodu a zvětšuje svůj objem. Na trhu se vyskytuje ve formě bílého prášku. Je vhodná pro tepelné zpracování. Je možné ji využít pro přípravu celé řady pokrmů, jako jsou například různé druhy pečiva či knedlíky. Také je vhodná pro zahušťování. Obecně slouží k obohacení stravy o větší množství vlákniny [41, 42].

#### **2.2.5.4 Chlorella + Spirulina**

Souhrnně jsou Chlorella a Spirulina označovány jako „zelené potraviny“. Chlorella patří mezi sladkovodní zelené řasy a Spirulina patří mezi sladkovodní sinice. Jsou bohatým zdrojem vitamínů, minerálních látek, bílkovin a zeleného barviva chlorofylu. Působí antioxidantně a přispívají k detoxikaci organismu. Zelená řasa Chlorella navíc pozitivně ovlivňuje růst prospěšné střevní mikroflóry a napomáhá udržovat normální střevní funkce. Společně se Spirulinou ovlivňují celkovou vitalitu organismu [43, 44].

#### **2.2.5.5 Jakon sirup**

Jakon neboli rostlina *Smallanthus sonchifolius* je pěstována na území Jižní Ameriky, a to zejména v Peru a v Bolívii. Sirup se vyrábí zpracováním hlíz této rostliny. Získává se odpařováním šťávy vylisované z hlíz při nízké teplotě okolo 40 °C. Díky tomuto postupu nejsou zničeny enzymy a ostatní prospěšné látky. Hlízy obsahují 90 % polysacharidů, a proto je Jakon sirup velmi zajímavým prebiotikem. Má výrazný pozitivní vliv na střevní mikroflóru a slouží jako prevence proti rakovině tlustého střeva. Kromě toho obsahuje Jakon sirup další významné složky jako jsou polyfenoly, antioxidanty, draslík, vápník, hořčík a další stopové prvky [45].

Všechny použité prebiotické produkty jsou znázorněny na obrázku č. 4.



Obrázek 4: Použité prebiotické produkty (zleva nahoře Inulin, Chia vláknina, Bambusová vláknina, zleva dole Chlorella + Spirulina a Jakon sirup)

## 2.3 Synbiotika

Jako synbiotika označujeme kombinaci probiotika se specifickým prebiotikem. Tato kombinace vede k podpoření viability probiotika, pro které je prebiotikum specifickým substrátem vhodným k fermentaci. Termín se odvolává na tzv. synergismus, kdy prebiotická složka podporuje probiotickou složku [3, 46].

Hlavním účelem tohoto typu kombinace je podpoření viability probiotických mikroorganismů v gastrointestinálním traktu. Prebiotika jsou v synbiotiku využita nejen pro podporu viability probiotických mikroorganismů v gastrointestinálním traktu, ale mají pomoci zvýšit také viabilitu probiotických bakterií v samotném symbiotickém přípravku při skladování a jejich cestě gastrointestinálním traktem. Synbiotika v sobě navíc spojují všechny již zmiňované pozitivní vlastnosti jak probiotik, tak i prebiotik. Celkový zdraví prospěšný účinek je výsledkem individuální kombinace probiotika s prebiotikem. Vzhledem k obrovskému počtu možných kombinací je vše stále cílem řady studií. Z dosavadních výsledků ale vyplývá, že nejlepší kombinace přináší spojení rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* s FOS a inulinem [47].

### 2.3.1 Mechanismus účinku synbiotik

Jsou známé dva hlavní mechanismy synbiotického působení. V prvním případě jde o zlepšení životaschopnosti probiotických bakterií. Ve druhém případě jde o celkové pozitivní účinky synbiotika na lidské zdraví. Kombinace probiotik s prebiotiky vede ve střevě k udržení zdravé střevní mikroflóry a tím k inhibici potenciálních patogenů. Synbiotika vedou ke snížení koncentrace nežádoucích metabolitů, jako jsou například některé karcinogenní látky (nitrosaminy). Jejich využití naproti tomu vede k výraznému zvýšení obsahu mastných kyselin s krátkým řetězcem, které mají pozitivní vliv na lidské zdraví. Pokud jde o terapeutické využití synbiotik, spojují v sobě všechna pozitivna probiotik i prebiotik. Synbiotika v sobě spojují



antibakteriální, antialergické a proti-rakovinotvorné účinky. Také působí proti zažívacím potížím jako je zácpa nebo průjem a snižují hladinu krevního cukru [47].

### 2.3.2 Vytvoření synbiotika metodou enkapsulace

Probiotické produkty, jak již bylo řečeno, mají celou řadu kladných vlastností. Co se týká negativních vlastností, tak jde zejména o nízkou úroveň přežití těchto mikroorganismů v potravinách a v gastrointestinálním traktu. Vytvoření probiotik s fyzickou bariérou a správnou výživou prebiotiky je účinný přístup k ochraně mikroorganismů, a právě tímto směrem se vydává většina potravinářských i farmaceutických firem. Jednou z neúčinnějších metod je metoda enkapsulace [48].

Enkapsulace neboli zapouzdření je proces uchování aktivních látek v nosném materiálu. Prakticky jde o uchování jedné látky v látce druhé. Aktivními látkami může být pevná látka, kapalina i plyn. Jako aktivní látka je označována látka enkapsulovaná, jako nosný materiál (vnější obal) je označována látka, do které je aktivní látka zapouzdřena. Enkapsulace je metoda, která slouží k uchování bioaktivních molekul a živých buněk v potravinových výrobcích nebo farmaceutických produktech. Jde mimo jiné o antioxidanty, minerály, vitamíny, mastné kyseliny, anebo živé buňky jako jsou probiotika. Ve farmaceutickém průmyslu se využívá enkapsulace k vytvoření preparátů s pozvolným uvolňováním aktivních látek. Materiály použité jako vnější obal musí být potravinářské, biologicky odbouratelné a schopné tvořit bariéru mezi aktivní látkou a okolím. Jako materiály vnější vrstvy se nejčastěji používají polysacharidy nebo lipidy.

Enkapsulace umožňuje stabilizaci složky potravy nebo léčiva. Jedním z hlavních přínosů enkapsulace je zlepšení stability aktivní složky v konečných produktech a během skladování. Enkapsulace například zabraňuje některým nežádoucím jevům jako je reakce aktivních látek s dalšími složkami potravinářského výrobku. Zabraňuje reakcím s kyslíkem nebo vodou, tzn. brání oxidaci a hydrolyze. Úkolem enkapsulace je také minimalizovat odpařování a degradaci látky během skladování. Částice, které jsou procesem enkapsulace vytvořeny, dosahují velikosti od několika nanometrů po několik mikrometrů.

Co se týká enkapsulace probiotik, tak zapouzdření musí být účinné takovým způsobem, aby po průchodu trávicím traktem došlo k úspěšnému uvolnění mikroorganismů ve střevě. Mezi výhody enkapsulace probiotických buněk patří hlavně ochrana před bakteriofágy a škodlivými faktory (žaludeční kyseliny) při cestě synbiotik trávicím traktem a dále také ochrana při lyofilizaci, zmrazení a skladování [48, 49].

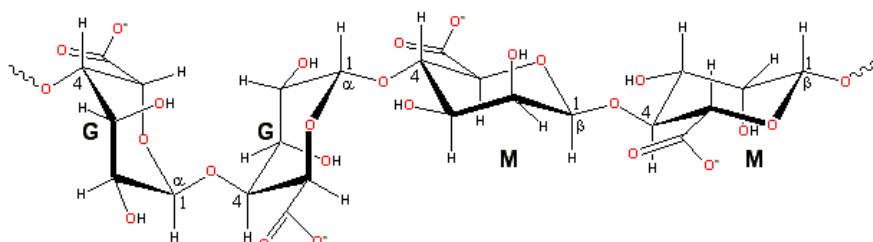
### 2.3.3 Materiály používané pro vytvoření vnější vrstvy

Zapouzdření probiotik ve vnější vrstvě umožňuje také změnu estetické či sensorické vlastnosti výrobku, kdy vnější vrstva zároveň poskytuje buňkám výraznou úroveň ochrany. Pro zapouzdření probiotických organismů se využívají různé typy polymerních materiálů. Mezi nejčastěji využívané materiály patří *polysacharidy*. Jde o škrob a jeho deriváty, tzn., že se využívá amyulóza, amylopektin, dále dextriny, maltodextriny, polydextróza i celulóza a její deriváty. Dále jsou také využívány extrakty z rostlin, jako je arabská guma nebo pektiny. Využívají se rovněž produkty mořských řas jako je karagenan nebo alginát. Právě alginát je nejčastěji používaný materiál vnější vrstvy pro enkapsulaci. Dalšími materiály jsou mikrobiální a zvířecí polysacharidy jako je dextran, chitosan, xanthan nebo gellan. Materiálem vnější vrstvy

mohou být také *proteiny*. Využit se dají mléčné a syrovátkové proteiny, jako je kasein nebo želatina. Z *lipidů* stojí za zmínku mastné kyseliny, vosky (včelí, karnaubský) či fosfolipidy [48, 50, 51].

### 2.3.3.1 Alginát

Alginát je lineární nerozvětvený kopolymer  $\beta$ -D-mannuronové kyseliny (M) a  $\alpha$ -L-guluronové kyseliny (G) spojené glykosidovými vazbami (1 $\rightarrow$ 4). Vzorec alginátu je uveden na obrázku č. 5. V řetězci se střídají různě dlouhé úseky obsahující pouze molekuly M s úseky tvořenými výhradně molekulami G a se smíšenými M-G úseky. Zastoupení a střídání jednotlivých komponent je velmi variabilní a závisí na původu alginátu. Získává se extrakcí alkáliemi (NaOH) z hnědých řas čeledi *Phaeophyceae*, které rostou při pobřeží severního Atlantiku, zejména v USA, Norsku, Francii a Británii. Alginát sodný je nejrozšířenějším materiálem pro vnější obal vhodný pro enkapsulaci. Je to z toho důvodu, že alginát tvoří termostabilní gely a filmy, které se snadno formují přidávkem vápenatých iontů k disperzním alginátu sodného. Na vazbě iontů vápníku se nepodílejí pouze elektrostatické síly, ale dochází také k chelataci. U alginátu sodného bylo zjištěno, že zvyšuje přežití enkapsulovaných probiotických bakterií až 80-95 %. Výhodou alginátu sodného je i to, že je to biokompatibilním, levným a netoxickým materiálem. Buňky potažené alginátem jsou chráněny před kyselostí žaludeční šťávy a zároveň poté alginát umožní jejich uvolnění v prostředí střeva. Další využití alginát nachází jako stabilizátor či emulgátor [51, 52, 53].



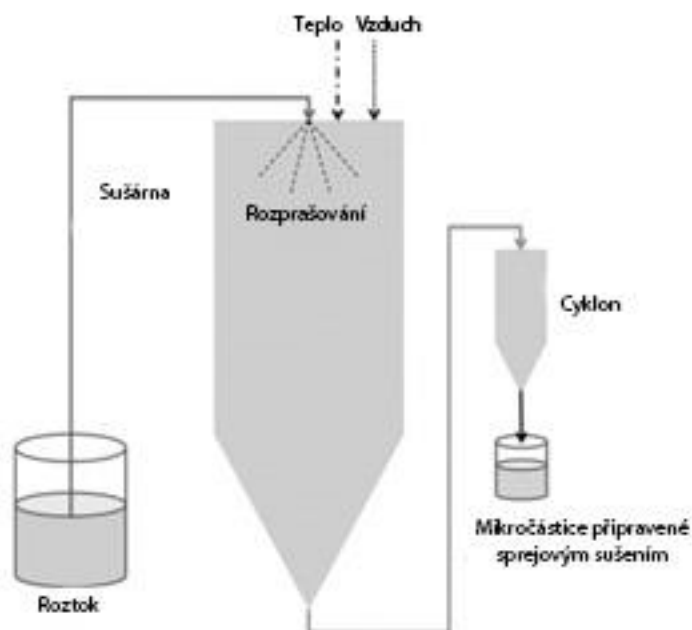
Obrázek 5: Vzorec alginátu [54]

## 2.3.4 Metody enkapsulace

### 2.3.4.1 Sprejové sušení

Sprejové sušení je enkapsulační technika, která se v potravinářském průmyslu využívá od konce 50. let minulého století. Nejdříve byla metoda využívána k ochraně aromatických olejů proti degradaci. V dnešní době zastupuje jednu z nejrozšířenějších enkapsulačních technik a využívá se zejména k zapouzdření bioaktivních molekul sloužících k přípravě suchých potravinářských přísad a příchutí. Sprejové sušení patří mezi výrazně ekonomické techniky, kdy náklady na vytvoření částice jsou výrazně nižší než u jiných způsobů zapouzdření. Tato technika totiž přeměňuje kapalnou látku na práškový produkt v uzavřeném systému pouze v jedné jediné výrobní operaci. Je to metoda rychlá, která zároveň poskytuje částice vysoké kvality. Hlavním omezením této techniky je to, že materiály použité při zapouzdření musí být rozpustné ve vodě. Během zapouzdření je také dosahováno poměrně vysokých teplot, které v některých případech mohou poškodit enkapsulovanou bioaktivní molekulu. Mezi typické obalové materiály patří polysacharidy jako je alginát, škrob nebo guarová guma. Využit se dají také proteiny, a to například syrovátkový.

V prvním kroku dochází k dispergaci enkapsulované látky ve velmi koncentrovaném (40 až 60%) vodném či organickém roztoku obalového materiálu. Z důvodu možné hořlavosti organických rozpouštědel v uzavřeném systému je preferována spíše varianta vodného roztoku. Proces dále spočívá v zavádění enkapsulační směsi do atomizujícího zařízení a v následném rozprašování kapek do prostoru sušárny. Ta musí být vyhřáta na teplotu 150 až 220 °C, kdy tyto teploty umožňují rychlé vypařování vody. Sušením se postupně zvyšuje koncentrace látky v kapce, až vznikne suchá částice. Tyto mikročástice jsou následně odděleny v separačním cyklonu. Schéma procesu sprejového sušení je uvedeno na obrázku č. 6 [54, 55, 56].



Obrázek 6: Schéma procesu sprejového sušení [57]

#### 2.3.4.2 Sprejové chlazení

Sprejové chlazení je metoda, při které je enkapsulovaná látka dispergována v horké tavenině tuků, vosků či mastných kyselin a dochází k rozprašování této směsi do prostoru s chlazeným vzduchem. Základním předpokladem je, že jednotlivé látky mají definovanou teplotu tání, nebo tají v úzkém teplotním rozmezí. Teplota tání používaných materiálů by se měla pohybovat v rozmezí 45–122 °C. Na rozdíl od sprejového sušení, zde nedochází k odpařování vody. Mikročástice připravené sprejovým chlazením jsou díky svému lipidovému povlaku nerozpustné ve vodě. Využívají se díky tomu k enkapsulaci látek, které ve vodě rozpustné jsou (například minerály, enzymy či vitamíny rozpustné ve vodě). Sprejovým chlazením se také mohou modifikovat fyzikální a chemické vlastnosti enkapsulovaných látek, například může dojít ke zvýšení rozpustnosti málo rozpustných léčiv [55, 58].

#### 2.3.4.3 Lyofilizace

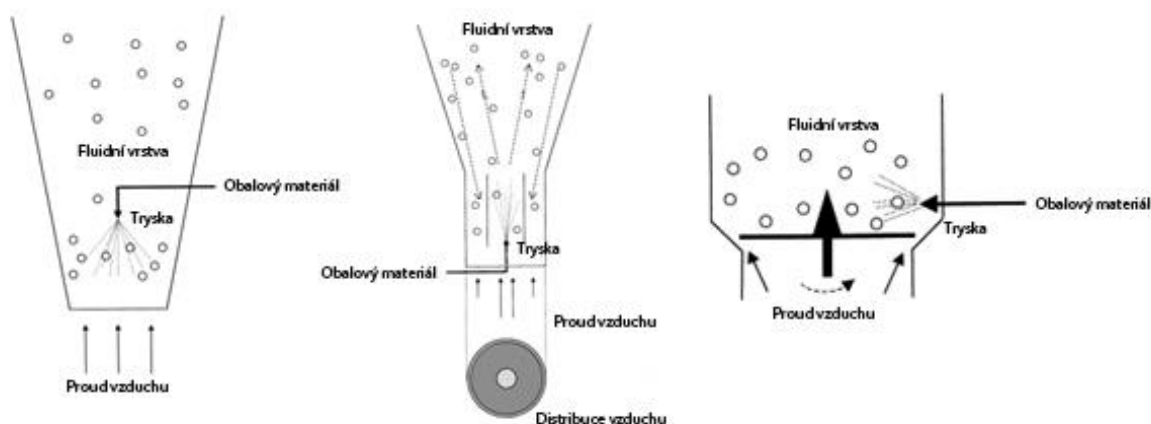
Lyofilizace neboli sušení mrazem je metoda, při které dochází k odstranění vody ze vzorku pomocí sublimace za nízkého tlaku a teploty. Lyofilizace je vhodná pro tepelně citlivé materiály a těkavé aromatické látky. Využívá se k zapouzdření různých přírodních látek, esencí,

aromatických látek a velmi často také léčiv. Metoda se výrazně uplatňuje právě ve farmaceutickém průmyslu, kde nachází uplatnění v zapouzdření léčiv citlivých na vyšší teploty. Následně pak umožňuje také bezproblémové dlouhodobé skladování těchto léčivých látek. Lyofilizace je poměrně nenáročnou metodou. Jedinou negativní stránku metody tvoří nutnost dlouhodobé dehydratace, která by měla trvat okolo 20 hodin [55].

#### 2.3.4.4 Fluidní vrstva

Metoda fluidní vrstvy byla původně využívána ve farmaceutickém průmyslu, avšak dnes nachází výrazné uplatnění také v potravinářství. Metodou fluidní vrstvy jsou vytvářeny zejména sférické mikročástice, mezi jejichž výhody patří prodloužená doba skladovatelnosti, cílené uvolňování látek nebo vylepšená estetická či chuťová stránka výrobku. Nevýhodou metody fluidní vrstvy jsou však poměrně vysoké náklady [55].

Fluidní zařízení využívá tzv. fluidní vrstvu, což je vrstva částic vznášejících se účinkem proudícího vzduchu. Chování takové vrstvy připomíná chování promíchávané kapaliny. Obalový materiál je ve fluidním zařízení rozstříkovan proudem teplého vzduchu o vysokém tlaku, který zároveň nadnáší pevné částice. Kapky dopadají na povrch jader, rozprostírají se na něm a odpařují se. Na povrchu jader postupně krystalizují rozpuštěné látky až do vytvoření suchých částic. Existují tři základní typy fluidních zařízení (uvedené na obrázku č. 7), a to zařízení se spodním nástřikem (nejčastěji používané), zařízení s horním nástřikem a zařízení s tangenciálním nástřikem. Zařízení se skládá z pracovní komory, ve které se vznášejí částice pomocí vzduchu přiváděného děrovanou přepážkou na dně komory. V horní části je systém filtrů, který brání úniku jemného prášku. Jako obalový materiál se využívá derivátů celulózy, dextrinů, derivátů bílkovin či derivátů škrobu [58].



Obrázek 7: Tři základní typy fluidních zařízení (zleva zařízení s horním nástřikem, se spodním nástřikem, s tangenciálním nástřikem) [59]

#### 2.3.4.5 Extruze

Extruze je v porovnání například se sprejovým sušením relativně nová technika enkapsulace. Využívá se hlavně v potravinářském průmyslu, například k zapouzdření různých příchutí. Extrudační zařízení se skládá z odkapávajícího zařízení a vytvrzovací lázně. Mikročástice vznikají odkapáváním připravené disperze do vytvrzující lázně, kde dochází ke gelaci či

tuhnutí. Po přidání chemického činidla mohou také tyto lázně sloužit k chelataci či kovalentnímu zesíťování.

Existuje více typů extruze, avšak jednou z nejdůležitějších metod je technika odstředivé extruze. Bioaktivní látky a obalový materiál jsou dávkovány dvojitou tryskou. Ve špičce kapiláry vytvoří kapaliny jednotný proud. Rotací zařízení se vytváří odstředivá síla, díky které se kapalina rozpadá na menší kapky. Ty jsou poté dávkovány do vytvrzovací lázně, kde dochází ke zpevnění obalu ochlazením, zesíťováním nebo odstraněním rozpouštědla. Další metodou je extruze taveniny. To je metoda založená na protlačování taveniny s dispergovanou účinnou látkou přes děrovanou přepážku. Tavenina může obsahovat malé množství vody (zpravidla méně než 10 %), která slouží ke snížení viskozity. Tímto způsobem jsou získány dlouhé provazce, které padají do vytvrzovací lázně. V lázni dochází ke zpevňování a k uzavření aktivní látky do polymerní matrice. Jako vytvrzovací lázeň se nejčastěji využívá isopropylalkohol. Vlákna jsou nakonec rozlámána na menší fragmenty a následně vysušena [55, 58].

#### **2.3.4.6 Emulgace**

Emulgace je technika, při které se do velkého objemu rostlinného oleje (tzv. kontinuální fáze) přidá malý objem suspenze enkapsulovaných složek jako jsou například buňky či různé polymery (tzv. diskontinuální fáze). Jako kontinuální fáze může sloužit sójový olej, slunečnicový olej nebo kukuřičný olej. Jakmile dojde k vytvoření emulze typu voda v oleji, musí být ve vodě rozpustný polymer zesíťován síťovacím činidlem. Vzniklé mikročástice se poté separují filtrací. Velikost částic závisí na dvou faktorech. Čím větší je velikost částic vnitřní emulze, tím menší budou konečné mikročástice. Velikost mikročástic je také ovlivněna rychlostí míchání a může se pohybovat od 25  $\mu\text{m}$  do 2 mm [60].

#### **2.3.4.7 Koacervace**

Při metodě zvané koacervace dochází k rozdělení polymerního roztoku na dvě nemísitelné kapalně fáze. Jedna z nich je bohatá na makromolekulární látky a označuje se jako koacervační fáze. Druhá, která je zředěná, se nazývá koacervační médium neboli supernatant.

Koacervace se podle postupu dělí na jednoduchou a komplexní koacervaci. Při jednoduché koacervaci fázová separace nastává v přítomnosti jednoho typu makromolekulární látky. Komplexní koacervace probíhá v přítomnosti dvou a více typů makromolekulárních látek, které jsou opačně nabitě. Během jednoduché i komplexní koacervace se vytváří drobné kapky, které se spojují a vytváří oddělenou koacervovanou fázi. Pokud jsou v roztoku přítomná jádra, tak se kapky koacervátu kolem nich shromáždí a přidávkem vhodného síťovacího činidla (například glutaraldehyd) vytváří stěnu mikročástic. Tvorba mikročástic koacervací obvykle vyžaduje další kroky pro jejich zpevnění. Těmi mohou být relativně jednoduché procesy vedoucí k odstranění zbytkového rozpouštědla, např. snížením teploty a propláchnutí srážecím roztokem nebo stabilizací síťovacími činidly [58].

#### **2.3.4.8 Kokrystalizace**

Kokrystalizace je jedna z novějších metod enkapsulace, která využívá jako obalový materiál sacharózu. Sacharózový sirup je koncentrován do přesyceného stavu a udržován při dostatečné teplotě tak, aby se zabránilo krystalizaci sirupu. Enkapsulované látky se následně za intenzivního míchání přidávají ke koncentrovanému sirupu. Tím dojde ke krystalizaci směsi

sirupu a enkapsulovaných složek. Krystalizací se získávají aglomeráty, které se dále suší na požadovanou vlhkost a upravují se na jednu stejnou velikost. Mezi výhody této techniky patří to, že prostřednictvím tohoto procesu může být aktivní látka v kapalné formě převedena na suchou práškovitou formu bez dalšího sušení [55].

## **2.4 Použité metody**

### **2.4.1 Chromatografie**

Chromatografie je separační metoda, při které dochází k separaci složek obsažených ve vzorku. Vzorek se nanáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek se umístí na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zachycované. Svým určením je chromatografie metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku [61].

#### **2.4.1.1 Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie je metoda, která využívá jako mobilní fázi plyn (tzv. nosný plyn). Vzorek se dávkuje do proudu plynu, který jej dále unáší kolonou. Aby vzorek mohl být dále transportován, musí být 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 [61].

#### **2.4.1.2 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 fází, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Díky tomu, že je možno pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn, je kapalinová chromatografie vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie pak využívá kolonu s malými zrníčky sorbentu, které kladou kapalině značný odpor. Z toho důvodu je nutno pracovat při vysokém tlaku [61].

### **2.4.2 Enkapsulátor**

Enkapsulátor je zařízení, které slouží k polymernímu zapouzdření různých typů látek, a to chemických látek, biologických molekul, pigmentů či buněk a mikroorganismů. Zapouzdření může probíhat za sterilních i nesterilních podmínek. Výsledná velikost částic závisí na použité velikosti trysky, která se pohybuje od 0,15 do 2 mm. Pro vytvoření probiotických částic s prebiotiky pro děti je vhodné použít těch nejmenších velikostí trysky okolo velikosti 300  $\mu\text{m}$ , aby větší částice nečinily dětem při polykání problémy.

Enkapsulovaná látka se při procesu enkapsulace smíchá s polymerem, který tvoří vnější obal a vše se umístí do tlakové lahve. Do pulzační komory se poté směs dostává pomocí stlačeného vzduchu. Následně prochází směs systémem trysek o definované velikosti, které z proudu kapaliny vytváří malé kapky. Kapky získávají povrchový náboj průchodem elektrickým polem, které se nachází mezi tryskou a elektrodou. Působením elektrostatické odpudivé síly dojde k rozptýlení kapek. Ty následně dopadají do vytvrzovacího roztoku  $\text{CaCl}_2$ . Po dopadu kapek do vytvrzovacího roztoku dochází ihned k zesíťování polymeru a vznikají tak pevné částice. Aby nedocházelo ke shlukování částic, musí být vytvrzovací roztok neustále míchán. Aby se částice dokonale zesíťovaly, je nutné je ponechat ve vytvrzovacím roztoku dostatečně dlouho. Tato potřebná doba pak vzrůstá se zvětšující se velikostí částic [62].

### **2.4.3 Průtoková cytometrie**

Průtoková cytometrie je tzv. metoda analýzy na úrovni jedné buňky. Využívá principy mikroskopie a také citlivé detekce světelného signálu. Umožňuje měření a analýzu fyzikálně-chemických vlastností buňky nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem. Buňky nebo jiné biologické částice jsou unášeny proudem nosné kapaliny do měrné cely, kde probíhá analýza laserovým paprskem. Ve chvíli, kdy buňka tento paprsek kříží, dochází k lomu a rozptylu světla. Podle směru a úhlu lomu bývá rozptyl označován jako „forward scatter“ (přímý rozptyl) a „side scatter“ (boční rozptyl).

Při analýze se také často využívá znázornění detekované látky například pomocí methylenové modři, anebo tzv. fluorochromů. Takto značená detekovaná látka je pak rozpoznávána detekčním systémem přístroje. Některé buňky jsou také schopny vnitřní fluorescence, a to díky přítomnosti jejich vlastních vnitřních fluoroforů. Jde například o cytochrom, peroxidázu či hemoglobin. U buněk, které neobsahují vnitřní fluorofory, se velmi často využívají k označení fluorescenční barviva jako je například propidium jodid. U něj je vykazována detekce po vmezeření do DNA mrtvých buněk [63,64].

### 3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem předložené diplomové práce bylo studium probiotických mikroorganismů, testování možností jejich enkapsulace se specifickými prebiotiky a sledování viability enkapsulovaných bakterií v modelových fyziologických podmínkách s cílem navrhnout vhodný produkt pro dětskou výživu ve formě doplňku stravy s obsahem probiotických bakterií a prebiotik. Podstatná část práce se věnovala také charakterizaci prebiotik, především jejich hlavních obsahových složek.

Za tímto účelem byly řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Screening na trhu dostupných doplňků stravy pro dětskou výživu s obsahem probiotických bakterií a jejich charakterizace.
- 2) Příprava probiotických kultur, stanovení viability probiotických bakterií v různé formě (enkapsulované, lyofilizované) a s přidavkem různých prebiotik i dalších biologicky aktivních látek.
- 3) Návrh vhodných forem a složení dětských doplňků stravy s obsahem probiotických bakterií.



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

Alginát sodný, Sigma-Aldrich (USA)  
Kyselina chlorovodíková 35%, Lach:Ner (ČR)  
Chlorid vápenatý p.a., Lachema (ČR)  
D-glukóza monohydrát p.a., Lach:Ner (ČR)  
D-fruktóza p.a., Lach:Ner (ČR)  
D-galaktóza, Himedia (IND)  
L-rhamnóza, Sigma-Aldrich (USA)  
Xylóza, Himedia (IND)  
Manóza, Himedia (IND)  
Kyselina sírová 96%, Lach:Ner (ČR)  
Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát p.a., Vitrium-Lach:Ner (ČR)  
Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a., Vitrium-Lach:Ner (ČR)  
Hydrogenuhlíčan sodný p.a., Lach:Ner (ČR)  
Uhlíčan sodný bezvodý p.a., Lach:Ner (ČR)  
Síran sodný bezvodý, Lach:Ner (ČR)  
Vínan sodno-draselný tetrahydrát p.a., Lachema (ČR)  
Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lach:Ner (ČR)  
Molybdenan amonný p.a., Lach:Ner (ČR)  
Hydrogenarseničnan sodný heptahydrát 98%, Sigma-Aldrich (IND)  
Fenol p.a., Lach:Ner (ČR)  
Pankreatin (vepřový pankreas), Sigma-Aldrich (SRN)  
Pepsin, Sigma-Aldrich (SRN)  
Bile salts – směs kyseliny cholové a deoxycholové, Sigma-Aldrich (SRN)  
Propidiumjodid, eBioscience (USA)  
MRS Broth médium, Himedia (IND)  
Agar powder, Himedia (IND)  
Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (SRN)  
Folin - Ciocalteu činidlo- p.a., Lach:Ner(ČR)  
Chloroform, Biosolve Chimie Sarl (F)  
Methanol, VWR BDH Chemicals (F)

### 4.2 Použité přístroje a pomůcky

Centrifuga vysokorychlostní chlazená Z36HK, Hermle (SRN)  
Mikrocentrifuga Mikro 200, Hettich Zentrifugen (VB)  
LIFE BOX pro gradientový cycler (Airstream), ESCO (SGP)  
Termostat INCU-Line, VWR (USA)  
Lyofilizátor VirTis, Biotrade (ČR)  
Analytické váhy, Boeco (SRN)  
Předvážky Ohaus ScoutPro (USA)  
Předvážky Kern 440-33 (SRN)  
Vortex, Heidolph Reax top (SRN)

Fluorescenční mikroskop Olympus IX71, Microtime 200 (ČR)  
 Software Lab Photo 3.0 (ČR)  
 Spektrofotometr Helios  $\gamma$ , Unicam (VB)  
 Enkapsulátor Büchi B-395 Pro (Š)  
 Průtokový cytometr Apogee A50, Apogee Flow Systems (VB)  
 Magnetická míchačka, Lavat (ČR)  
 Sestava HPLC, Ultimate 3000 (ČR):  
 Termostat, Column oven LCO 101  
 Pumpa, Dionex UltiMate 3000 Pump  
 Detektor, Dionex UltiMate 3000 Diode Array Detector  
 Kolona Rezex ROA – Organic Acid H+ (8%), 7,8 x 300 mm, Phenomenex (USA)  
 Mineralizátor, Gerhardt (SRN)  
 Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)  
 Plynový chromatograf, Thermo Scientific, Trace 1300 (ČR)  
 Kolona DB-WAX 30 m x 0,25 mm, Agilent technologies (USA)

### 4.3 Použité probiotické kultury

V experimentální práci byly použity probiotické bakteriální kultury *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 a *Bifidobacterium breve* CCM 7825T. Tyto kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

### 4.4 Složení použitých probiotických produktů

#### 4.4.1 APO-LAKTÍK kapky

Složení probiotických kapek od výrobce Apotex (ČR) je uvedeno v tabulce č. 3.

Tabulka 3: Složení probiotického přípravku APO-LAKTÍK kapky

Složky produktu	Množství v balení	Množství v 5 kapkách
<i>Lactobacillus reuteri</i> FloraActive	75,000 mg	2,500 mg / $1,25 \cdot 10^8$ CFU
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> FloraActive	75,000 mg	2,500 mg / $1,25 \cdot 10^8$ CFU
Fruktooligosacharidy	50,000 mg	1,667 mg
Olej ze slunečnicových semen	6,825 g	227,500 mg

#### 4.4.2 APO-LAKTÍK pastilky

Složení probiotických pastilek od výrobce Apotex (ČR) je uvedeno v tabulce č. 4.

Tabulka 4: Složení probiotického přípravku APO-LAKTÍK pastilky

Složky produktu	Množství v jedné pastilce
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	47,300 mg / $4,09 \cdot 10^9$ CFU
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	
Fruktooligosacharidy	29,200 g
Kyselina L-askorbová (vitamín C)	12,200 mg

Další složky: dextrosa (224,00 mg), manitol (100,90 mg), xylitol (25,50 mg), jahodová příchut' (2 mg), vanilková příchut' (1,6 mg), mikrokrystalická celulóza, magnesium stearát.

#### 4.4.3 Biopron JUNIOR sáčky

Složení probiotických sáčků od výrobce Valosun (ČR) je uvedeno v tabulce č. 5.

Tabulka 5: Složení probiotického přípravku Biopron JUNIOR sáčky

Složky produktu	Množství v denní dávce (1 sáček)
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	5,00·10 <sup>9</sup> CFU
<i>Bifidocabterium infantis</i>	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
Inulin	1043,000 mg
Fruktooligosacharidy	400,000 mg

Další složky: vanilkové aroma

#### 4.4.4 ProbioMaxík tablety

Složení probiotických tablet od výrobce Dr. Max Pharma (ČR) je uvedeno v tabulce č. 6.

Tabulka 6: Složení probiotického přípravku ProbioMaxík tablety

Složky produktu	Množství v jedné tabletě
Mikrobiální kultura Rosell Probiocap: <i>Lactobacillus helvetius</i> Rosell-52 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Rosell-11 <i>Lactobacillus longum</i> Rosell-175	1,00·10 <sup>9</sup> CFU

Další složky: sorbitol, xylitol, rostlinný olej, maltodextrin, kyselina askorbová, hroznová příchut', mikrokrystalická celulóza, stearan hořečnatý, kyselina citrónová

### 4.5 Složení použitých prebiotických produktů

#### 4.5.1 Inulin

Nutriční hodnoty prebiotického produktu Inulin od výrobce 4Fitness profesionální výživa (ČR) jsou uvedeny v tabulce č. 7.

Tabulka 7: Nutriční hodnoty pro prebiotický produkt Inulin

Nutriční hodnoty na 100 g	
Energetická hodnota	669,9 kJ / 160 kcal
Tuky	0 g
-z toho nasycené MK	0 g
Sacharidy	7 g
-z toho cukry	7 g
Bílkoviny	0 g

#### 4.5.2 Chia vláknina

Nutriční hodnoty prebiotického produktu Chia vláknina od výrobce Dragon Superfoods (VB) jsou uvedeny v tabulce č. 8.

*Tabulka 8: Nutriční hodnoty pro prebiotický produkt Chia vláknina*

<b>Nutriční hodnoty na 100 g</b>	
Energetická hodnota	1316 kJ / 315 kcal
Tuky	3 g
-z toho nasycené MK	0,3 g
Sacharidy	44 g
-z toho cukry	0 g
Vláknina	38 g
Bílkoviny	9 g
Sůl	0,125 g

#### 4.5.3 Bambusová vláknina

Nutriční hodnoty prebiotického produktu Bambusová vláknina od výrobce Adveni Medical (SRN) jsou uvedeny v tabulce č. 9.

*Tabulka 9: Nutriční hodnoty pro prebiotický produkt Bambusová vláknina*

<b>Nutriční hodnoty na 100 g</b>	
Energetická hodnota	738 kJ / 196 kcal
Tuky	0,1 g
-z toho nasycené MK	0,1 g
Sacharidy	0,1 g
-z toho cukry	0,1 g
Vláknina	97 g
Bílkoviny	0,1 g
Sůl	0,2 g

#### 4.5.4 Jakon sirup

Nutriční hodnoty prebiotického produktu Jakon sirup od výrobce Lifefood (P) jsou uvedeny v tabulce č. 10.

*Tabulka 10: Nutriční hodnoty pro prebiotický produkt Jakon sirup*

<b>Nutriční hodnoty na 100 g</b>	
Energetická hodnota	1277 kJ / 293 kcal
Tuky	0 g
Sacharidy	71 g
-z toho cukry	25 g
-z toho FOS	45 g
Vláknina	1,6 g
Bílkoviny	2,2 g
Sůl	0,03 g

U prebiotického produktu Chlorella + Spirulina výrobce neudává nutriční hodnoty, a to z toho důvodu, že jde o doplněk stravy a u nich výrobce není ze zákona povinen udávat tyto informace.

#### **4.6 Kultivace mléčných bakterií v tekutém médiu**

Pro kultivaci bakteriálních kultur *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve* bylo použito komerční MRS médium. Médium bylo smícháno v Erlenmayerově baňce s destilovanou vodou v daném poměru 55,15 g média na 1 000 ml destilované vody a sterilováno v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu třiceti minut. Obě kultury byly vždy zaočkovány ve sterilním boxu. Bylo očkováno 10% inokulem do média v příslušné kultivační nádobě. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin.

#### **4.7 Promytí probiotických buněk**

U probiotických buněk po 24hodinové kultivaci v tekutém médiu byla pomocí průtokové cytometrie stanovena viabilita buněk. Postup práce je uveden v kapitole 4.10.1 Probiotické buňky ve zkumavkách byly poté 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.

#### **4.8 Enkapsulace**

##### **4.8.1 Příprava alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými buňkami**

Probiotické buňky po promytí, jehož postup je popsán v kapitole 4.7, byly rozsuspendovány v 1% roztoku sterilního alginátu sodného. Alginátové částice byly připraveny na enkapsulátoru B-395 Pro od firmy BÜCHI a byla využita tryska o velikosti 300 µm. Vytvrzovacím roztokem byl 1,5% roztok CaCl<sub>2</sub>. Částice byly následně ponechány ve vytvrzovacím roztoku po dobu 30 minut. Poté byly částice zfiltrvány a uchovány pro další experimenty.

#### **4.9 Lyofilizace**

##### **4.9.1 Lyofilizace buněk**

Probiotické buňky po promytí, které je popsáno v kapitole 4.7, byly rozpuštěny ve 2 ml sterilní vody a byly zamrazeny ve zkumavce určené pro lyofilizaci při teplotě -70 °C. Poté byly buňky zlyofilizovány na lyofilizátoru VirTis od firmy Biotrade.

##### **4.9.2 Lyofilizace alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými buňkami**

Alginátové částice s enkapsulovanými probiotickými buňkami připravené podle postupu v kapitole 4.8.1 byly zmrazeny a poté zlyofilizovány.

#### **4.10 Stanovení počtu buněk a jejich viability**

##### **4.10.1 Průtokový cytometr**

Pro analýzu na průtokovém cytometru byl odebrán vzorek buněk kultivovaných v tekutém médiu po dobu 24 hodin. Buňky byly 10krát zředěny a pro stanovení byl odebrán 1 ml zředěné

kultury. Ke stanovení viability bylo k 1 ml vzorku přidáno 5 µl interkalačního barviva propidium jodidu o koncentraci 1 mg/ml. Obarvené vzorky byly ponechány ve tmě po dobu 10 minut. Následně proběhla analýza na průtokovém cytometru a byl stanoven počet buněk i procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk.

#### **4.10.2 Kultivace na tuhém médiu na Petriho miskách metodou přelivu**

Pro kultivaci probiotických kultur *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve* byla použita sterilní směs komerčního MRS média o koncentraci 55,15 g/l a agaru o koncentraci 15 g/l. Vzorky probiotických kultur byly připraveny desítkovým ředěním a vždy 1 ml dané koncentrace byl nalit na Petriho misku. Tento objem naředěné kultury byl následně přelit asi 15 ml vysterilované směsi MRS média a agaru. Tímto způsobem byly připraveny vždy 3 misky o stejném ředění vzorku. Misky byly poté kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin.

#### **4.11 Potvrzení deklarovaného počtu buněk v komerčních probiotických preparátech metodou přelivu**

Komerční probiotické produkty byly pro potvrzení deklarovaného počtu buněk upraveny dvěma způsoby. Při první způsobu byly vzorky probiotických produktů analyzovány po 12 hodinové kultivaci v tekutém komerčním MRS médiu a při druhém způsobu byly probiotické produkty před analýzou pouze rozsuspendovány ve vodě.

Při prvním stanovení byly tedy probiotické produkty umístěny do MRS média. Takto připravené vzorky byly ponechány na 12hodinovou kultivaci v termostatu s teplotou 37 °C. Při druhém stanovení byly probiotické produkty umístěny do sterilní vody, ve které probíhalo bobtnání produktů po dobu 20 minut před vlastní analýzou.

Následně byly připravené vzorky upraveny desítkovým ředěním sterilní destilovanou vodou na vhodné koncentrace. Jako srovnávací vzorky byly připraveny také dva blanky z čerstvých kultur *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve*. Následovala kultivace na tuhém médiu na Petriho miskách s metodou přelivu, která je detailněji popsána v kapitole 4.10.2.

#### **4.12 Modelové trávení vybraných komerčních probiotických produktů s využitím metody přelivu**

Pro provedení modelového trávení byly vybrány dva produkty s nejvhodnější formou aplikace pro malé děti, a to produkty Biopron JUNIOR sáčky a APO-LAKTÍK kapky. Denní dávka produktu Biopron JUNIOR sáčky byla rozpuštěna ve 100 ml sterilní vody. Takto připravený produkt se nechal bobtnat po dobu 12 hodin v termostatu s teplotou 37 °C. Denní dávka produktu APO-LAKTÍK kapky byla rozpuštěna ve 100 ml sterilní vody. U kapek nebyl nutný 24hodinový proces bobtnání v termostatu, protože díky jejich kapalné formě dochází k rychlému uvolnění buněk do vody.

10 ml připravených vzorků probiotických produktů bylo přidáno k navážce 0,1 g všech typů prebiotik. Prebiotika byla ponechána po dobu 1 hodiny v kontaktu s oběma probiotickými produkty. Poté byly desítkovým ředěním připraveny vhodné koncentrace. Jako porovnávací vzorky v tomto případě sloužily vzorky s probiotickými produkty bez přídatku prebiotik. Na závěr byl tedy 1 ml vhodně naředěného vzorku umístěn na Petriho misku a byl zalit

připraveným médiem. Všechny Petriho misky byly následně umístěny na 48hodinovou kultivaci do termostatu s teplotou 37 °C.

Ke zbylým vzorkům byla v poměru 1:1 přidána žaludeční šťáva, která se nechala působit po dobu 30 minut. Během těchto 30 minut byly vzorky umístěny na třepačku s teplotou 37 °C. Po 30 minutách byla ke vzorkům přidána v poměru 1:1 žlučová a pankreatická šťáva. Tyto šťávy se nechaly působit po dobu 2 hodin. Po uplynutí 2 hodin byly desítkovým ředěním připraveny vhodné koncentrace, kdy 1 ml vhodně naředěného vzorku byl pak umístěn na Petriho misku a zalit připraveným médiem. Všechny Petriho misky byly následně umístěny na 48 hodinovou kultivaci do termostatu s teplotou 37 °C.

#### **4.12.1 Příprava trávicích šťáv**

##### **4.12.1.1 Složení modelové pankreatické šťávy**

Pankreatická šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pankreatinu a 1,5 g NaHCO<sub>3</sub> ve 100 ml destilované vody. V roztoku bylo pH upraveno na hodnotu 8,9 [65].

##### **4.12.1.2 Složení modelové žaludeční šťávy**

Žaludeční šťáva byla připravena z 0,25 g pepsinu, který byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. V roztoku bylo pH upraveno na hodnotu 0,9 [65].

##### **4.12.1.3 Složení modelové žlučové šťávy**

Žlučová šťáva byla připravena přidáním 0,8 g žlučových solí do 200 ml fosfátového pufru o pH 8 [65].

#### **4.13 Modelové trávení čerstvých probiotických buněk v různých formách**

Modelovému trávení byly podrobeny probiotické buňky v různých formách, a to lyofilizované probiotické buňky, lyofilizované alginátové částice s enkapsulovanými probiotickými buňkami i čerstvé probiotické buňky. Lyofilizované probiotické buňky byly připraveny podle postupu, který je uveden v kapitole 4.9.1. Lyofilizované alginátové částice s enkapsulovanými probiotickými buňkami byly připraveny podle postupu kapitole 4.9.2. Oba lyofilizáty byly poté ponechány k bobtnání po dobu 12 hodin ve 100 ml sterilní vody. Bobtnání probíhalo v termostatu s teplotou 37 °C. Čerstvé probiotické buňky byly po 24hodinové kultivaci v tekutém médiu podrobeny analýze na průtokovém cytometru ke stanovení jejich viability. Buňky byly promyty podle návodu uvedeném v kapitole 4.7. Po promytí byly buňky zality 100 ml sterilní vody.

Vždy 10 ml takto připraveného vzorku bylo přidáno k navážce 0,1 g jednotlivých prebiotických produktů. Probiotické buňky pak byly ponechány v kontaktu s potravinou po dobu 1 hodiny. Desítkovým ředěním byly poté připraveny vhodné koncentrace. Ty byly v objemu 1 ml umístěny na Petriho misku a byly zality 15 ml pevného MRS média. Byl připraven také tzv. blank, který sloužil jako porovnávací vzorek. Ten tvořily probiotické buňky bez přídavku prebiotika.

Ke zbytku probiotických buněk byla v poměru 1:1 přidána žaludeční šťáva, která se nechala působit po dobu 30 minut. Během této doby byly vzorky umístěny na třepačku s teplotou 37 °C. Po uplynutí 30 minut byly ke vzorkům přidány v poměru 1:1 pankreatická a žlučová šťáva. Obě šťávy se nechaly působit po dobu 2 hodin a vzorky byly opět umístěny na třepačku. Po

2 hodinách byly desítkovým ředěním z vzorků připraveny vhodné koncentrace. Ty byly v objemu 1 ml umístěny na Petriho misky a byly zality asi 15 ml pevného MRS média. Trávení bylo provedeno také pro porovnávací vzorek bez přídavku prebiotika. Misky byly poté umístěny na 48hodinovou kultivaci do termostatu s teplotou 37 °C.

#### **4.14 Stanovení celkových rozpustných sacharidů u prebiotických produktů metodou dle Duboise**

Pro stanovení celkových rozpustných cukrů byla využita metoda stanovení dle Duboise. Tato metoda je založena na dehydrataci cukrů koncentrovanou kyselinou sírovou a následné kondenzaci vzniklého furfuralu s fenolem za vzniku barevných kondenzačních produktů. Jde tedy o kolorimetrickou reakci. Tyto barevné produkty jde poté spektrofotometricky stanovit [66].

1 ml vzorku byl smíchán s 1 ml 5% fenolu a s 5 ml koncentrované H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Roztok byl zamíchán a nechal se 30 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 490 nm. Stanovení bylo provedeno pro glukózu, kdy byla získána kalibrační křivka pro rozmezí koncentrací 0,02-0,1 mg/ml. Následně bylo stanovení provedeno pro daná prebiotika. Od prebitotických produktů Inulin, Chia vláknina, Bambusová vláknina a Chlorella + Spirulina bylo do plastové zkumavky naváženo 0,1 g produktu na 10 ml vody. Zkumavky byly umístěny na 20 minut na třepačku a následovala centrifugace při 8 000 otáčkách po dobu 2 minut. Poté byl pro stanovení odebrán 1 ml. Produkt Jakon sirup byl zředěn v poměru 1:9 destilovanou vodou. Pro stanovení byl poté odebrán 1 ml tohoto prebiotického produktu. Blankem byl 1 ml destilované vody.

#### **4.15 Stanovení redukujících sacharidů u prebiotických produktů metodou dle Somogyi–Nelsona**

Pro stanovení redukujících cukrů byla použita metoda stanovení dle Somogyi-Nelsona. Jde o kolorimetrickou reakci, která je založena na redukcí měďnatých solí. Vyloučený Cu<sub>2</sub>O se pak stanovuje spektrofotometricky [67].

K 1 ml vzorku bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I. a II. Vzorek byl umístěn do vroucí lázně na 10 minut a následně byl ochlazen tekoucí vodou na laboratorní teplotu. Do ochlazeného vzorku bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III. Vzniklý Cu<sub>2</sub>O byl poté důkladně rozpuštěn promícháním na vortexu. Nakonec byl objem doplněn na 10 ml a byla změřena absorbance při vlnové délce 720 nm. Stanovení bylo provedeno pro glukózu, kdy byla získána kalibrační křivka pro koncentrační rozmezí 0,002–0,01 g/l. Následně bylo stanovení provedeno pro daná prebiotika. Od prebiotických produktů Inulin, Chia vláknina, Bambusová vláknina a Chlorella + Spirulina bylo do plastové zkumavky naváženo 0,1 g na 10 ml. Zkumavky byly umístěny na 20 minut na třepačku a následovala centrifugace při 8 000 otáčkách po dobu 2 minut. Poté byl pro reakci odebrán 1 ml. Produkt Jakon sirup byl zředěn v poměru 1:9 destilovanou vodou. Pro stanovení byl poté odebrán 1 ml vzorku. Blankem byl 1 ml destilované vody.



#### 4.15.1 Příprava roztoků

**Somogui-Nelsonovo činidlo I:** 12 g uhličitanu sodného, 8 g hydrogenuhličitanu sodného a 6 g vlnanu sodno-draselného bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. 72 g síranu sodného bylo rozpuštěno v 300 ml destilované vody. Oba roztoky byly smíchány.

**Somogui-Nelsonovo činidlo II:** 4 g pentahydrátu síranu měďnatého bylo smícháno s 24 g síranu sodného a 200 ml destilované vody.

**Somogui-Nelsonovo činidlo III:** 25 g molybdenanu amonného bylo rozpuštěno ve 450 ml destilované vody. Do roztoku bylo přidáno 21 ml koncentrované kyseliny sírové. 3 g heptahydrátu hydrogenarseničnanu sodného byly rozpuštěny v 25 ml destilované vody a oba roztoky byly smíchány. Připravený roztok byl ponechán pod dobu 48 hodin ve tmě při laboratorní teplotě.

#### 4.16 Stanovení celkových polyfenolů u prebiotických produktů

Vždy k 50  $\mu$ l vzorku byl přidán 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla (zředěného destilovanou vodou v poměru 1:9) a 1 ml vody. Po promíchání vzorků na vortexu následovala 5minutová inkubace a poté byl ke každému vzorku přidán 1 ml nasyceného roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Vše bylo opět promícháno na vortexu a po 15 minutách inkubace byla měřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Stanovení bylo provedeno nejprve pro kyselinu gallovou, kdy byla získána kalibrační křivka v rozmezí koncentrací 0,1–0,7 mg/ml. Následně bylo stanovení provedeno pro daná prebiotika. Od prebiotik Inulin, Chia vláknina, Bambusová vláknina a Chlorella + Spirulina bylo do plastové zkumavky naváženo 0,1 g na 10 ml. Zkumavky byly umístěny na 20 minut na třepačku a následovala centrifugace při 8 000 otáčkách po dobu 2 minut. Poté bylo pro stanovení odebráno 50  $\mu$ l vzorku. Produkt Jakon sirup byl pouze zředěn v poměru 1:9 destilovanou vodou. Pro stanovení bylo poté odebráno 50  $\mu$ l vzorku. Blankem bylo 50  $\mu$ l destilované vody.

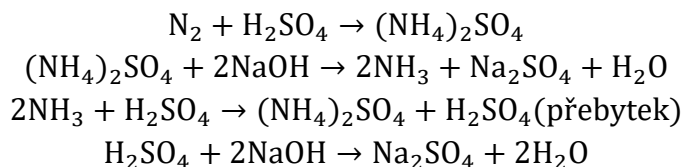
#### 4.17 Charakteristika prebiotických produktů z hlediska obsahu sacharidů metodou HPLC

Metoda HPLC byla využita pro charakterizaci složení prebiotických produktů z hlediska obsahu sacharidů. Stanovení na kapalinovém chromatografu bylo provedeno na koloně Rezex, která je vhodná právě pro stanovení sacharidů a dále také organických kyselin. Jako mobilní fáze byl použit 0,005M roztok  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Ten byl připraven přidáním 0,56 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  do 2 000 ml miliQ  $\text{H}_2\text{O}$ . Eluce byla izokratická, kolona byla v termostatu zahřívána na 60 °C. Průtok byl nastaven na 0,5 ml za minutu. Na začátek kolony byl do dávkovací smyčky o objemu 20  $\mu$ l nastříkovan vzorek a detekce látek probíhala na refraktometrickém detektoru.

Nejprve byly stanoveny kalibrační křivky glukózy, fruktózy, xylózy, galaktózy a Inulinu v koncentračním rozmezí 0,5-5 g/l. Následně byly analyzovány vzorky prebiotik o koncentraci 5 g/l. Vzorky byly před analýzou filtrovány na membránových filtrech o průměru 0,45  $\mu$ m. Poté byly analyzovány i hydrolyzované prebiotické produkty. Přesněji byla u prebiotických produktů provedena kyselá hydrolyza. K navážce 0,2 g prebiotika bylo přidáno 5 ml 35% HCl. Hydrolyza následně probíhala po dobu 60 minut při 110 °C. Po ochlazení následovala analýza na kapalinovém chromatografu. Zbytky produktů po hydrolyze byly v sušárně s teplotou 70 °C vysušeny do konstantní hmotnosti a poté byly zváženy.

## 4.18 Stanoví celkových bílkovin u prebiotických produktů metodou dle Kjeldahla

Principem stanovení bílkovin metodou dle Kjeldahla je provedení mineralizace vzorku varem v koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$  za přídavku katalyzátoru. Tím dojde k převodu dusíkatých látek na síran amonný. Z něho se v alkalickém prostředí uvolní amoniak, který je předestilován s vodní parou a stanoví se titračně. Stanovení celkového dusíku dle Kjeldahla popisuje rovnice č. 1.



Rovnice 1: Rovnice stanovení celkového dusíku dle Kjeldahla

Vyhodnocení výsledků poté vychází z následujících vztahů:

Celková  $\text{H}_2\text{SO}_4$ :

$$n_{\text{H}_2\text{SO}_4}^{\text{celk}} = c_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4}^{\text{celk}}$$

Nadbytečná  $\text{H}_2\text{SO}_4$ :

$$n_{\text{H}_2\text{SO}_4}^{\text{nadb}} = \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{2}$$

Zreagovaná  $\text{H}_2\text{SO}_4$ :

$$n_{\text{H}_2\text{SO}_4}^{\text{zreag}} = n_{\text{H}_2\text{SO}_4}^{\text{celk}} - n_{\text{H}_2\text{SO}_4}^{\text{nadb}} = c_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4}^{\text{celk}} - \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{2}$$

Vzniklý  $\text{NH}_3$ :

$$\frac{n_{\text{NH}_3}}{n_{\text{H}_2\text{SO}_4}^{\text{zreag}}} = \frac{2}{1} \Rightarrow n_{\text{NH}_3} = 2 \cdot n_{\text{H}_2\text{SO}_4}^{\text{zreag}} = n_{\text{N}}$$

Obsah celkového N:

$$w_{\text{N}} = \frac{m_{\text{N}}}{m_{\text{navážka}}} = \frac{n_{\text{N}} \cdot M_{\text{N}}}{m_{\text{navážka}}} = \frac{2 \cdot n_{\text{H}_2\text{SO}_4}^{\text{zreag}} \cdot M_{\text{N}}}{m_{\text{navážka}}} = 10 \cdot \frac{2 \cdot (c_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4}^{\text{celk}} - \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{2}) \cdot M_{\text{N}}}{m_{\text{navážka}}}$$

### 4.18.1 Provedení mineralizace

Do pěti mineralizačních trubice byl odvážen 1 g od každého prebiotického produktu s přesností na tři desetinná místa. K této navážce byly přidány 2 g Weiningerova katalyzátoru a 10 ml koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Mineralizační trubice byly následně umístěny do mineralizačního zařízení. Po vzrůstu teploty na hodnotu  $400^\circ\text{C}$  probíhala mineralizace varem po dobu 1,5 hodiny. Po uplynutí této doby následovalo chlazení po dobu třiceti minut. Po ukončení mineralizace bylo do mineralizačních baněk přidáno 15 ml destilované vody a baňky se přes noc nechaly stát při laboratorní teplotě.

### 4.18.2 Provedení destilace

Celý objem vzorků z mineralizačních baněk byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku. Pro destilaci byl použit destilační přístroj dle Parnase-Wagnera, který je uveden na obrázku č. 8. Do dělicí nálevky bylo nalito 10 ml zředěného vzorku, ke kterému byly přidány tři kapky fenolftaleinu. Následně bylo do dělicí nálevky nalito 40 ml 33% NaOH. Uvolněný amoniak byl předestilován s vodní parou do předlohy s 25 ml standardizovaného roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o koncentraci 0,05 M. Destilace trvala po

dobu 25 minut a konec chladiče musel sahat až ke dnu předlohy. Po uplynutí 25 minut byla předloha snížena, aby konec chladiče nezasahoval do roztoku standardizované kyseliny sírové a bylo destilováno ještě po dobu 5 minut. Po skončení destilace byly do předlohy přidány tři kapky Tashirova indikátoru a bylo titrováno odměrným roztokem NaOH o koncentraci 0,1M do prvního trvalého žlutého zbarvení.



Obrázek 8: Destilační aparatura dle Parnase-Wagnera

#### 4.19 Extrakce lipidů u vybraných prebiotických produktů metodou dle Folche

Lipidy byly stanovovány celkem u třech prebiotických produktů, a to u Chia vlákniny, Bambusové vlákniny a Chlorelly + Spiruliny. U Inulinu a Jakon sirupu nebyly lipidy stanovovány, protože výrobce deklaruje obsah tuků 0 g. Od Chia vlákniny byl naváženo 1 g, od Bambusové vlákniny bylo naváženo 5 g a od Chlorelly + Spiruliny bylo naváženo 0,8 g. Navážky se odvíjely od deklarovaného obsahu tuků v produktech. K navážkám v Erlenmayerových baňkách bylo přidáno 60 ml chloroformu a 30 ml methanolu (tzn. rozpouštědla v poměru 2:1). Baňky byly poté umístěny na magnetickou míchačku. Míchání probíhalo po dobu 1,5 hodiny. Přídavkem vody bylo následně docíleno oddělení fází a spodní chloroformová část vzorku byla přefiltrována přes hladký filtr s vrstvou bezvodého síranu sodného. Extrakce byla provedena ve dvou krocích, přičemž při druhé extrakci bylo použito poloviční množství rozpouštědel. Chloroformové extrakty z obou filtrací byly na závěr společně v odpařovací baňce odpařovány na vakuové odparce. Po odpařování se na stěnách baňky vytvořila lipidická vrstva. Baňky byly následně na 24 hodin umístěny do exsikátoru, aby došlo k plnému odpaření rozpouštědel. Nakonec bylo vážkově stanoveno množství lipidů.

#### 4.20 Stanovení obsahu mastných kyselin u prebiotických produktů metodou plynové chromatografie

Lipidické látky získané metodou dle Folche byly rozpuštěny v 10 ml chloroformu. Z tohoto objemu byl do malé vialky napipetován 1 ml, ke kterému bylo dále přidáno 0,8 ml transesterifikační směsi. Transesterifikační směs tvořila 15%  $H_2SO_4$  v methanolu (p.a.) a 0,5 mg/ml C17 jako vnitřního standardu. Vialky byly inkubovány při teplotě 90 °C po dobu 3 hodin. Po uplynutí této doby se nechaly vialky volně vychladnout na laboratorní teplotu. Do

5ml vialek bylo poté napipetováno 0,5 ml 0,005M roztoku NaOH a do něho byl následně vlit celý obsah vialek po transesterifikaci. Směs byla intenzivně promíchána, aby došlo k dokonalému oddělení jednotlivých fází. Po oddělení fází bylo ze spodní fáze odpipetováno 0,5 ml do čisté vialky se závitkem pro plynovou chromatografii. Do této vialky bylo poté ještě napipetováno 0,5 ml chloroformu. Takto připravený vzorek byl analyzován na plynovém chromatografu.

#### **4.21 Fotometrické stanovení chlorofylů u prebiotického produktu Chlorella + Spirulina**

U prebiotického produktu Chlorella + Spirulina bylo provedeno fotometrické stanovení chlorofylů. Navážka 2 g produktu byla v třecí misce rozetřena s 5 ml acetonu. Směs byla zfiltrována přes malý filtr smáčený acetonem do 25ml odměrné baňky. Dalšími dávkami acetonu byla směs plně převedena do odměrné baňky a vše bylo doplněno acetonem po rysku. Roztok byl zředěn pětkrát. Poté byla měřena absorbance při vlnových délkách 663 nm a 645 nm proti acetonu. Koncentrace v mg/ml se vypočítá pro chlorofyl a ( $C_a$ ), chlorofyl b ( $C_b$ ) a celkový chlorofyl pomocí následujících vztahů:

$$\begin{aligned}C_a &= 12,70 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645} \text{ (mg/ml)} \\C_b &= 22,90 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663} \text{ (mg/ml)} \\C_a + C_b &= 8,02 \cdot A_{663} + 20,20 \cdot A_{645} \text{ (mg/ml)}\end{aligned}$$

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Předložená diplomová práce je zaměřena na studium probiotických mikroorganismů z hlediska stanovení jejich viability a možností jejich enkapsulace se specifickými prebiotiky. V práci byly testovány různé formy enkapsulovaných bakterií, u kterých byla sledována viabilita v modelových fyziologických podmínkách, s cílem navrhnout vhodný produkt pro dětskou výživu s obsahem probiotických bakterií a prebiotik.

### 5.1 Stanovení viability probiotických buněk

U vybraných probiotických preparátů určených dětem byl stanoven počet viabilních probiotických buněk. Stanovené hodnoty byly dále srovnány s hodnotami deklarovanými výrobcem na obale. U kultivovaných kmenů *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve* byla viabilita pozorována rovněž pomocí průtokové cytometrie.

#### 5.1.1 Potvrzení deklarovaného počtu buněk v komerčních probiotických preparátech metodou přelivu

Pro potvrzení deklarovaného počtu buněk v komerčních probiotických preparátech byly použity probiotické produkty upravené dvěma způsoby. Probiotické preparáty nazvané v následující tabulce jako čerstvé produkty byly preparáty bez předchozí kultivace, kdy u nich došlo pouze k rozsuspendování ve vodě. Druhým sledovaným typem byly probiotické preparáty, které byly podrobeny 12hodinové kultivaci v tekutém médiu. Podle postupu uvedeného v kapitole 4.11 byla u obou typů provedena kultivace na tuhém médiu po dobu 48 hodin a získané výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 11.

Tabulka 11: Výsledky potvrzení deklarovaného počtu buněk v komerčních probiotických preparátech

Probiotický produkt	Deklarované množství buněk [CFU/ml]	Čerstvé produkty [CFU/ml]	Produkty po 12 hodinové kultivaci v tekutém médiu [CFU/ml]
Sáčky	$5,00 \cdot 10^9$	$8,90 \cdot 10^9 \pm 1,00 \cdot 10^9$	$1,10 \cdot 10^9 \pm 0,10 \cdot 10^9$
Kapky	$1,25 \cdot 10^8$	$1,10 \cdot 10^9 \pm 0,10 \cdot 10^9$	$1,70 \cdot 10^9 \pm 0,80 \cdot 10^9$
Pastilky	$4,09 \cdot 10^9$	$5,30 \cdot 10^8 \pm 1,40 \cdot 10^8$	$1,10 \cdot 10^{11} \pm 0,10 \cdot 10^{11}$
Tablety	$1,00 \cdot 10^8$	$6,00 \cdot 10^8 \pm 1,60 \cdot 10^8$	$1,60 \cdot 10^9 \pm 3,90 \cdot 10^9$

Testované výrobky byly hodnoceny z hlediska deklarovaného množství životaschopných bakterií. U všech preparátů byla potvrzena výrobcem deklarovaná koncentrace buněk. Koncentrace buněk byla navíc většinou ještě vyšší než deklarovaná hodnota, jak vyplývá z tabulky č. 11. Dále byla testována rychlost růstu probiotických bakterií. U většiny výrobků došlo k rychlému růstu buněk, pouze u preparátu ve formě sáčku nedošlo během kultivace k významnému navýšení koncentrace buněk, což mohlo být způsobeno delší lag fází použitých probiotických kmenů v daném preparátu.



Obrázek 9: Výsledek potvrzení deklarovaného množství buněk u pastilek (zleva koncentrace  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$ )

Na obrázku č. 9 jsou znázorněny výsledky potvrzení deklarovaného množství buněk u čerstvého produktu pastilky. Konkrétně jsou zde znázorněny výseče výsledků s koncentrační řadou  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$ .

## 5.2 Stanovení počtu buněk a jejich viability na průtokovém cytometru

Stanovení počtu buněk bylo provedeno podle postupu uvedeném v kapitole 4.10.1. Toto stanovení počtu buněk na průtokovém cytometru bylo využito před vytvořením alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými buňkami a před modelovým trávením čerstvých probiotických buněk. Výsledky v jednotkách CFU/ml jsou uvedeny v tabulce č. 12 a tabulce č. 13.

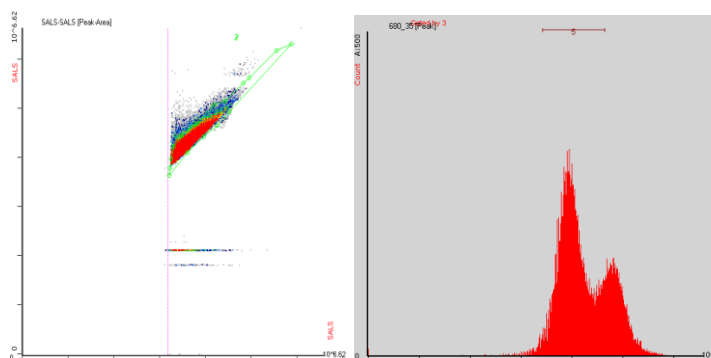
Tabulka 12: Výsledky analýzy na průtokovém cytometru pro probiotické buňky před vytvořením alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými buňkami

<b>CFU/ml</b>	$1,10 \cdot 10^7 \pm 0,30 \cdot 10^7$
---------------	---------------------------------------

Tabulka 13: Výsledky analýzy na průtokovém cytometru pro probiotické buňky před modelovým trávením čerstvých probiotických buněk

<b>CFU/ml</b>	$1,10 \cdot 10^7 \pm 0,20 \cdot 10^7$
---------------	---------------------------------------

Na obrázku č. 10 je znázorněn příklad výstupu z průtokového cytometru. Na obrázku vlevo jsou patrné ohraničené buňky s jejich koncentrací, ze kterých je následně v pravém okně vypočítán poměr živých a mrtvých buněk. Na obrázku vpravo jsou vidět dva píky, větší pík více vlevo odpovídá počtu živých buněk, menší pík více vpravo znázorňuje počet mrtvých buněk.



Obrázek 10: Příklad výstupu z průtokového cytometru – buňky *Lactobacillus acidophilus* po 24 hodinách kultivace

### 5.3 Příprava alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými buňkami

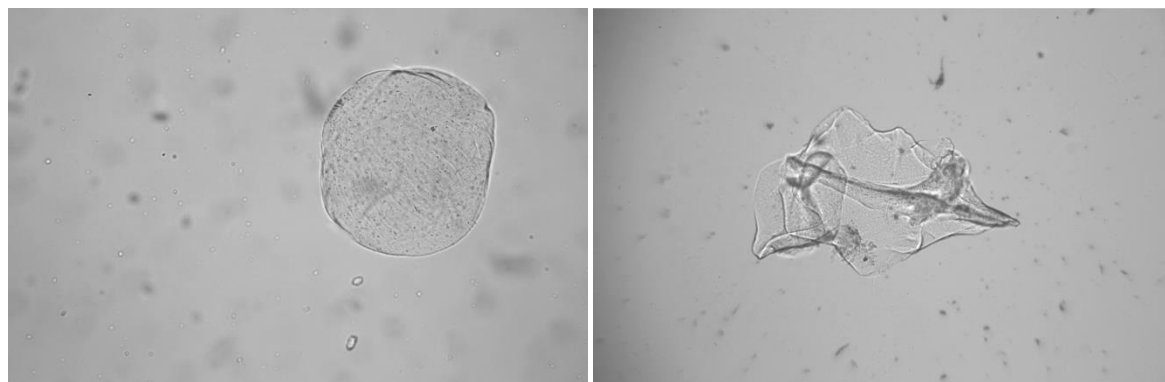
Alginátové částice byly připraveny pomocí enkapsulátoru dle postupu v kapitole 4.8.1. Velikost částice byla dána použitou tryskou o velikosti 300  $\mu\text{m}$ .

#### 5.3.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Pomocí průtokové cytometrie bylo nejprve stanoveno množství probiotických buněk pro následnou enkapsulaci. Množství neenkapsulovaných buněk bylo poté sledováno ve srážecím roztoku  $\text{CaCl}_2$ . Z rozdílu hodnot počtu buněk před a po enkapsulaci, které jsou uvedeny v tabulce č. 14, byla vypočtena enkapsulační účinnost, která byla takřka 100%. Připravené alginátové částice byly následně zlyofilizovány a použity k dalším analýzám. Vzhled alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými buňkami před a po lyofilizaci je znázorněn na obrázku č. 11.

Tabulka 14: Hodnoty počtu buněk před enkapsulací a po enkapsulaci

Počet buněk před enkapsulací	Počet buněk po enkapsulaci
$1,10 \cdot 10^7 \pm 0,30 \cdot 10^7$	$0,8 \cdot 10^2 \pm 0,02 \cdot 10^2$



Obrázek 11: Alginátové částice s enkapsulovanými buňkami *Lactobacillus acidophilus* pod mikroskopem, vlevo nelyofilizované, vpravo lyofilizované (zvětšení 5000krát)

### 5.4 Modelové trávení probiotických buněk v různých formách

U probiotických buněk *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve* enkapsulovaných i neenkapsulovaných, a také u kmenů obsažených ve vybraných komerčně zakoupených probiotických produktech byl sledován vliv působení trávicích šťáv na jejich viabilitu. Navíc byl pozorován vliv působení trávicích šťáv na životaschopnost buněk i po přidavku vybraných prebiotik.

#### 5.4.1 Modelové trávení komerčních probiotických produktů s využitím metody přelivu

U vybraných komerčních probiotických produktů bylo provedeno modelové trávení. Přičemž pro analýzu byly vybrány dva produkty, a to APO-LAKTÍK kapky a Biopron JUNIOR sáčky. Tyto produkty byly vybrány z toho důvodu, že zaznamenaly nejvyšší počet životaschopných bakterií, jak je patrné z výsledků v kapitole 5.1.1. Modelové trávení bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.12. Po 48hodinové kultivaci na tuhém médiu od skončení modelového trávení byly narostlé kolonie probiotických kultur spočítány a byly vyhodnoceny výsledky.

V tabulce č. 15 a v tabulce č. 16 jsou uvedeny počty buněk v 1 ml pro oba produkty před trávením bez přídavku prebiotik. Tyto hodnoty sloužily jako blank, tzn. srovnání, jak přídavek prebiotika ovlivňuje viabilitu probiotických bakterií.

*Tabulka 15: Počet buněk v 1 ml před trávením pro produkt Biopron JUNIOR sáčky bez přídavku prebiotika*

<b>Produkt Biopron JUNIOR sáčky bez přídavku prebiotika (před trávením)</b>	$6,50 \cdot 10^7 \pm 1,10 \cdot 10^7$ CFU/ml
---	--

*Tabulka 16: Počet buněk v 1 ml před trávením pro produkt APO-LAKTÍK kapky bez přídavku prebiotika*

<b>Produkt APO-LAKTÍK kapky bez přídavku prebiotika (před trávením)</b>	$7,30 \cdot 10^7 \pm 0,50 \cdot 10^7$ CFU/ml
---	--

V tabulce č. 17 a v tabulce č. 18 jsou pak uvedeny výsledky počtu buněk v 1 ml před trávením pro oba produkty, tzn. sáčky i kapky s přídavkem různých typů testovaných prebiotických produktů.

*Tabulka 17: Počet buněk v 1 ml před trávením pro produkt Biopron JUNIOR sáčky s přídavkem různých typů prebiotik*

<b>Prebiotické produkty</b>	<b>Biopron JUNIOR sáčky [CFU/ml]</b>
Inulin	$1,76 \cdot 10^8 \pm 0,92 \cdot 10^8$
Chia vláknina	$7,56 \cdot 10^8 \pm 1,80 \cdot 10^8$
Bambusová vláknina	$9,60 \cdot 10^8 \pm 1,28 \cdot 10^8$
Chlorella + Spirulina	$5,88 \cdot 10^8 \pm 2,68 \cdot 10^8$
Jakon sirup	$8,72 \cdot 10^8 \pm 0,32 \cdot 10^8$

*Tabulka 18: Počet buněk v 1 ml před trávením pro produkt APO-LAKTÍK kapky s přídavkem různých typů prebiotik*

<b>Prebitické produkty</b>	<b>APO-LAKTÍK kapky [CFU/ml]</b>
Inulin	$3,82 \cdot 10^8 \pm 1,56 \cdot 10^8$
Chia vláknina	$2,80 \cdot 10^7 \pm 0,15 \cdot 10^7$
Bambusová vláknina	$2,50 \cdot 10^7 \pm 0,05 \cdot 10^7$
Chlorella + Spirulina	$2,60 \cdot 10^7 \pm 0,20 \cdot 10^7$
Jakon sirup	$9,40 \cdot 10^7 \pm 0,80 \cdot 10^7$

Z tabulky č. 17 a z tabulky č. 18 obecně vyplývá, že počet buněk se u všech probiotických preparátů po přidání daného prebiotika a jejich interakci po dobu 1 hodiny zvýšil oproti srovnávací hodnotě bez přídavku prebiotika. Největší nárůst buněk po interakci s prebiotiky můžeme vidět u probiotického produktu Biopron JUNIOR sáčky, u kterého se nejlépe osvědčil prebiotický produkt Jakon sirup. Z naměřených výsledků lze tedy usuzovat, že přidaná prebiotika mohou přispět k životaschopnost probiotických bakterií například i v průběhu trávicího procesu.



Vlastnosti prebiotik (například vysoký obsah sacharidů, zastoupení rozpustných a nerozpustných složek) podporují růst mikroorganismů a také mohou zabránit působení nepříznivých vlivů v prostředí žaludku, popřípadě prostředí tenkého a tlustého střeva.

V tabulce č. 19 a v tabulce č. 20 jsou uvedeny výsledky stanovení počtu buněk v 1 ml po trávení pro oba analyzované komerční probiotické produkty bez přídavku prebiotika. Z výsledků je patrné, že po proběhnutí trávení došlo k poklesu počtu buněk ve srovnání se stejnou hodnotou před trávením.

*Tabulka 19: Počet buněk v 1 ml po trávení pro produkt Biopron JUNIOR sáčky bez přídavku prebiotika*

<b>Produkt Biopron JUNIOR sáčky bez přídavku prebiotika (po trávení)</b>	$1,50 \cdot 10^7 \pm 0,60 \cdot 10^7$ CFU/ml
--	--

*Tabulka 20: Počet buněk v 1 ml po trávení pro produkt APO-LAKTÍK kapky bez přídavku prebiotika*

<b>Produkt APO-LAKTÍK kapky bez přídavku prebiotika (po trávení)</b>	$1,20 \cdot 10^7 \pm 0,10 \cdot 10^7$ CFU/ml
--	--

V tabulce č. 21 a v tabulce č. 22 jsou uvedeny výsledky počtu buněk na 1 ml pro oba komerční probiotické produkty s přídavky různých typů probiotik po proběhnutí trávení.

*Tabulka 21: Počet buněk v 1 ml po trávení pro produkt Biopron JUNIOR sáčky s přídavkem různých typů prebiotik*

<b>Prebiotické produkty</b>	<b>Biopron JUNIOR sáčky [CFU/ml]</b>
Inulin	$1,30 \cdot 10^7 \pm 0,45 \cdot 10^7$
Chia vláknina	$1,10 \cdot 10^7 \pm 0,15 \cdot 10^7$
Bambusová vláknina	$1,40 \cdot 10^7 \pm 0,60 \cdot 10^7$
Chlorella + Spirulina	$2,20 \cdot 10^7 \pm 0,05 \cdot 10^7$
Jakon sirup	$1,30 \cdot 10^7 \pm 0,70 \cdot 10^7$

*Tabulka 22: Počet buněk v 1 ml po trávení pro produkt APO-LAKTÍK kapky s přídavkem různých typů prebiotik*

<b>Prebiotické produkty</b>	<b>APO-LAKTÍK kapky [CFU/ml]</b>
Inulin	$2,80 \cdot 10^7 \pm 0,05 \cdot 10^7$
Chia vláknina	$1,30 \cdot 10^7 \pm 0,05 \cdot 10^7$
Bambusová vláknina	$1,70 \cdot 10^7 \pm 0,80 \cdot 10^7$
Chlorella + Spirulina	$1,80 \cdot 10^7 \pm 0,60 \cdot 10^7$
Jakon sirup	$2,70 \cdot 10^7 \pm 0,70 \cdot 10^7$

Co se týká obecných výsledků, tak lze říci, že lehce negativní vliv na viabilitu buněk u modelového trávení byl pozorován u všech vzorků i přes přítomnost prebiotika. Nejvyšší počet viabilních buněk byl pak po skončení trávení stanoven u prebiotika Chlorella + Spirulina. Ostatní vzorky byly srovnatelné se vzorkem bez přídavku prebiotika.

Tento jev byl zřejmě způsoben obsahem vhodného probiotika a prebiotika v komerčních produktech, a další navyšování koncentrace prebiotika již nemělo významný vliv na zvýšení viability buněk v průběhu trávení.

### 5.5 Modelové trávení čerstvých probiotických buněk

Postup provedení modelového trávení čerstvých probiotických buněk je uveden v kapitole 4.13. Tabulka č. 23 uvádí hodnotu počtu buněk v 1 ml pro čerstvé probiotické buňky bez přidavku prebiotika před provedením trávení. Tato hodnota sloužila jako srovnávací, tedy jak se změní počet probiotickým buňkám s přidáním specifického prebiotika.

*Tabulka 23: Počet buněk v 1 ml před trávením čerstvých probiotických buněk*

<b>Čerstvé probiotické buňky bez přidavku prebiotika</b>	$5,40 \cdot 10^7 \pm 0,20 \cdot 10^7$ CFU/ml
--	--

Tabulka č. 24 uvádí výsledky počtu buněk v 1 ml čerstvých probiotických buněk s přidavkem různých typů prebiotik před jejich trávením.

*Tabulka 24: Počet buněk v 1 ml před trávením čerstvých probiotických buněk s přidavkem různých typů prebiotických produktů*

<b>Prebiotické produkty</b>	<b>CFU/ml</b>
Inulin	$1,40 \cdot 10^8 \pm 0,30 \cdot 10^8$
Chia vláknina	$1,10 \cdot 10^8 \pm 0,10 \cdot 10^8$
Bambusová vláknina	$1,40 \cdot 10^8 \pm 0,30 \cdot 10^8$
Chlorella + Spirulina	$2,30 \cdot 10^8 \pm 0,30 \cdot 10^8$
Jakon sirup	$1,20 \cdot 10^8 \pm 0,10 \cdot 10^8$

Z tabulky č. 24 vyplývá, že po přidání prebiotických preparátů k probiotickým buňkám došlo ke zvýšení počtu buněk, a to při využití všech typů prebiotických produktů. Nejvyšší nárůst počtu buněk byl stanoven u prebiotika Chlorella + Spirulina. V porovnání se srovnávací hodnotou bez přidavku prebiotika došlo u všech prebiotických produktů k nárůstu počtu buněk v 1 ml o jeden řád.

V tabulce č. 25 je uvedena výsledná hodnota stanovení počtu buněk v 1 ml čerstvých probiotických buněk bez přidavku prebiotika po trávení. A z dosažených výsledků je patrné, že během trávení došlo k poklesu počtu buněk ve vzorku bez přidavku prebiotika oproti stejné hodnotě před trávením.

*Tabulka 25: Počet buněk v 1 ml po trávení čerstvých probiotických buněk*

<b>Čerstvé probiotické buňky bez přidavku prebiotika</b>	$2,3 \cdot 10^7 \pm 0,5 \cdot 10^7$ CFU/ml
--	--

Tabulka č. 26 uvádí výsledné hodnoty stanovení počtu buněk v 1 ml u čerstvých probiotických buněk s přidavkem různých typů prebiotických produktů po trávení. Z výsledků vyplývá, že po proběhnutí trávení došlo ve všech případech ke snížení počtu buněk v 1 ml i přes přidavek prebiotika. Nejvyšší hodnota počtu buněk v 1 ml byla zaznamenána při přidavku prebiotika Bambusová vláknina. Nicméně u všech testovaných vzorků s přidavkem prebiotika bylo ve srovnání se vzorkem bez jeho přidavku stanoveno výrazně vyšší množství buněk po skončení procesu trávení.

Tabulka 26: Počet buněk v 1 po trávení čerstvých probiotických buněk s přidavkem různých typů prebiotických produktů

Prebiotické produkty	CFU/ml
Inulin	$6,00 \cdot 10^7 \pm 0,30 \cdot 10^7$
Chia vláknina	$8,40 \cdot 10^7 \pm 0,50 \cdot 10^7$
Bambusová vláknina	$1,10 \cdot 10^8 \pm 0,10 \cdot 10^8$
Chlorella + Spirulina	$6,80 \cdot 10^7 \pm 0,50 \cdot 10^7$
Jakon sirup	$2,80 \cdot 10^7 \pm 0,20 \cdot 10^7$

## 5.6 Modelové trávení lyofilizovaných probiotických buněk s využitím metody přelivu

Modelové trávení lyofilizovaných probiotických buněk bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.12. Po 48hodinové kultivaci na tuhém médiu byly kolonie buněk spočítány a byly vyhodnoceny výsledky počtu buněk. V tabulce č. 27 je uvedena hodnota udávající počet buněk v 1 ml lyofilizovaných probiotických buněk bez přidavku prebiotika před proběhnutím trávení. Tato hodnota sloužila jako srovnávací pro zjištění, jak se změní hodnota počtu buněk po přidavku prebiotik.

Tabulka 27: Počet buněk v 1 ml před trávením lyofilizovaných probiotických buněk bez přidavku prebiotika

<b>Lyofilizované probiotické buňky bez přidavku prebiotika (před trávením)</b>	$1,00 \cdot 10^7 \pm 0,40 \cdot 10^7$ CFU/ml
--	--

V tabulce č. 28 jsou uvedeny získané výsledky charakterizující počet buněk v 1 ml lyofilizovaných probiotických buněk s přidavkem prebiotika před proběhnutím trávení.

Tabulka 28: Počet buněk v 1 ml před trávením lyofilizovaných probiotických buněk s přidavkem různých typů prebiotik

Prebiotické produkty	CFU/ml
Inulin	$1,70 \cdot 10^7 \pm 0,50 \cdot 10^7$
Chia vláknina	$1,00 \cdot 10^7 \pm 0,20 \cdot 10^7$
Bambusová vláknina	$1,10 \cdot 10^7 \pm 0,30 \cdot 10^7$
Chlorella + Spirulina	$1,40 \cdot 10^7 \pm 0,50 \cdot 10^7$
Jakon sirup	$1,10 \cdot 10^7 \pm 0,20 \cdot 10^7$

Z tabulky č. 28 vyplývá, že po přidavku prebiotických produktů došlo ke zvýšení počtu buněk téměř ve všech případech, pouze při přidavku prebiotického produktu Chia vláknina nedošlo k žádnému významnému navýšení počtu buněk ve srovnání s kontrolním vzorkem.

V tabulce č. 29 je uvedena hodnota počtu buněk v 1 ml po proběhnutí trávení lyofilizovaných probiotických buněk bez přidavku prebiotika.

Tabulka 29: Počet buněk v 1 ml po trávení lyofilizovaných probiotických buněk bez přídavku prebiotika

<b>Lyofilizované probiotické buňky bez přídavku prebiotika (po trávení)</b>	$1,00 \cdot 10^6 \pm 0,20 \cdot 10^6$ CFU/ml
---	--

V tabulce č. 30 jsou uvedeny výsledky počtu buněk v 1 ml po proběhnutí trávení lyofilizovaných probiotických buněk s přídavkem různých typů prebiotik.

Tabulka 30: Počet buněk v 1 ml po trávení lyofilizovaných probiotických buněk s přídavkem různých typů prebiotik

<b>Prebiotické produkty</b>	<b>CFU/ml</b>
Inulin	$8,00 \cdot 10^6 \pm 0,20 \cdot 10^6$
Chia vláknina	$6,00 \cdot 10^6 \pm 0,50 \cdot 10^6$
Bambusová vláknina	$4,00 \cdot 10^6 \pm 1,00 \cdot 10^6$
Chlorella + Spirulina	$7,00 \cdot 10^6 \pm 0,30 \cdot 10^6$
Jakon sirup	$4,00 \cdot 10^6 \pm 0,20 \cdot 10^7$

Z tabulky č. 30 je patrné, že po proběhnutí modelového trávení došlo ve všech případech ke snížení počtu probiotických buněk o jeden řád. Nejmenší pokles počtu buněk byl zaznamenán u prebiotika Inulin a nejvyšší pokles naopak u prebiotik Bambusová vláknina a Jakon sirup. Nicméně u všech testovaných vzorků bylo po trávení s přídavkem prebiotika přítomno ve srovnání s kontrolním vzorkem bez přídavku prebiotika několikanásobně vyšší koncentrace viabilních buněk.

## 5.7 Modelové trávení lyofilizovaných alginátových částic s využitím metody přelivu

Modelové trávení s lyofilizovanými alginátovými částicemi bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.12. Po 48hodinové kultivaci na tuhém médiu byly narostlé kolonie buněk spočítány a byly vyhodnoceny výsledky. V tabulce č. 31 je uveden výsledek charakterizující počet buněk v 1 ml lyofilizovaných alginátových částic bez přídavku prebiotika před proběhnutím trávení. Tato hodnota sloužila pro porovnání, jak se změní počet buněk po přídavku prebiotik.

Tabulka 31: Počet buněk v 1 ml před trávením lyofilizovaných alginátových částic bez přídavku prebiotika

<b>Lyofilizované alginátové částice bez přídavku prebiotika</b>	$6,00 \cdot 10^6 \pm 0,40 \cdot 10^7$ CFU/ml
---	--

V tabulce č. 32 jsou uvedeny hodnoty počtu buněk v 1 ml u lyofilizovaných alginátových částic s obsahem prebiotických produktů. Z dosažených výsledků vyplývá, že po přidání prebiotik k lyofilizovaným alginátovým částicím došlo ke zvýšení počtu buněk oproti srovnávací hodnotě bez přídavku prebiotika.

Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u buněk s přídavkem prebiotického produktu Inulin. Nejmenší nárůst byl zaznamenán při přidání prebiotického produktu Jakon sirup

Tabulka 32: Počet buněk v 1 ml před trávením lyofilizovaných alginátových částic s přidavkem různých typů prebiotik

Prebiotické produkty	CFU/ml
Inulin	$1,3 \cdot 10^7 \pm 0,2 \cdot 10^7$
Chia vláknina	$1,9 \cdot 10^6 \pm 0,5 \cdot 10^7$
Bambusová vláknina	$1,0 \cdot 10^7 \pm 0,3 \cdot 10^7$
Chlorella + Spirulina	$1,0 \cdot 10^7 \pm 0,2 \cdot 10^7$
Jakon sirup	$5,0 \cdot 10^6 \pm 0,3 \cdot 10^7$

V tabulce č. 33 je dále uvedena hodnota počtu buněk v 1 ml pro lyofilizované alginátové částice bez přidavku prebiotika pro proběhnutí trávení. Z dosažených výsledků je patrné, že po proběhnutí trávení hodnota počtu buněk poklesla oproti stejné hodnotě před trávením.

Tabulka 33: Počet buněk v 1 ml po trávení lyofilizovaných alginátových částic bez přidavku prebiotika

<b>Lyofilizované alginátové částice bez přidavku prebiotika</b>	$1,20 \cdot 10^6 \pm 0,1 \cdot 10^7$ CFU/ml
---	---

V tabulce č. 34 jsou uvedeny hodnoty počtu buněk v 1 ml lyofilizovaných alginátových buněk s přidavkem různých typů prebiotik po proběhnutí trávení.

Tabulka 34: Počet buněk v 1 ml po trávení lyofilizovaných alginátových částic s přidavkem různých typů prebiotik

Prebiotické produkty	CFU/ml
Inulin	$1,00 \cdot 10^7 \pm 0,10 \cdot 10^7$
Chia vláknina	$1,20 \cdot 10^6 \pm 0,20 \cdot 10^6$
Bambusová vláknina	$7,00 \cdot 10^6 \pm 0,20 \cdot 10^6$
Chlorella + Spirulina	$9,00 \cdot 10^6 \pm 0,20 \cdot 10^7$
Jakon sirup	$5,00 \cdot 10^6 \pm 0,10 \cdot 10^6$

Z tabulky č. 34 vyplývá, že počet buněk se s proběhnutím trávení snížil, kromě počtu buněk u přidavku prebiotických produktů Chlorella + Spirulina a Jakon sirupu, u kterých nedošlo k významnému snížení počtu buněk a koncentrace buněk zůstala stejná jako před trávením. Tyto produkty tedy nejlépe působí na viabilitu enkapsulovaných buněk v lyofilizovaných alginátových částicích. Na jejich odolnost proti modelovému trávicímu prostředí působí výrazně také uchování probiotických buněk v alginátových částicích. Jak vyplývá například ze studie Nazzarové a kolektivu, alginát účinně brání pronikání kyselého žaludečního šťávy do probiotických buněk a hodí se proto pro ochranu probiotických buněk při průchodu gastrointestinálním traktem [68].

## 5.8 Výběr nejlepšího prebiotika z hlediska podpory viability probiotických buněk

Po shrnutí výsledků účinku jednotlivých prebiotik na viabilitu a odolnost probiotických buněk v různých formách (čerstvé buňky, lyofilizované buňky a lyofilizované alginátové částice s enkapsulovanými probiotickými buňkami) proti trávicím šťávám, byly stanoveny rozdíly

mezi počtem buněk před trávením a po provedení modelového trávení pro dané prebiotické produkty. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce č. 35.

V tabulce č. 35 jsou použity symboly, které odpovídají jednotlivým rozdílům v počtu buněk před trávením a po trávení probiotických buněk v různých formách s přidavkem daného typu prebiotik. Z dosažených výsledků vyplývá, že u čerstvých buněk nejvýrazněji působilo prebiotikum Jakon sirup, u kterého nebyla po trávení zaznamenána žádná podstatná změna v poklesu počtu buněk oproti hodnotě počtu buněk před trávením. Jakon sirup tedy dokázal zachovat viabilitu probiotických buněk při průchodu trávicím traktem.

Naopak nejhorším prebiotikem zde byla stanovená Chlorella + Spirulina, u které došlo k výraznějšímu poklesu počtu viabilních probiotických buněk po průchodu trávicím traktem.

*Tabulka 35: Výsledky porovnání účinků jednotlivých probiotik na odolnost probiotických buněk v různých formách proti trávicím šťávám*

<b>Prebiotikum</b>	<b>Čerstvé buňky</b>	<b>Lyofilizované buňky</b>	<b>Lyofilizované částice</b>
Inulin	xx	x	x
Chia vláknina	x	x	xx
Bambusová vláknina	x	xx	x
Chlorella + Spirulina	xxx	xx	*
Jakon sirup	*	xx	*

*Poznámka: \* - beze změny (pokles o 0 až  $0,2 \cdot 10^6$ ), x – malá změna (pokles o  $0,2 \cdot 10^6$  až  $0,6 \cdot 10^6$ ), xx - střední změna (pokles o  $0,6 \cdot 10^6$  až  $1 \cdot 10^6$ ), xxx – výrazná změna (pokles  $1 \cdot 10^6$  až  $1,4 \cdot 10^6$ )*

U lyofilizovaných probiotických buněk se jako nejlepší prebiotika jevil Inulin a Chia vláknina, u kterých došlo jen k malému poklesu počtu buněk po proběhnutí modelového trávení. U lyofilizovaných částic se pozitivně projeví prebiotika Chlorella + Spirulina a Jakon sirup. U těchto dvou produktů nedošlo po trávení k téměř žádnému poklesu počtu viabilních buněk v průběhu trávení.

Závěrem lze tedy říci, že všechna použitá prebiotika zaznamenala při kontaktu s probiotiky podporu růstu buněk oproti vzorku bez přidavku prebiotik. Bohužel i přes přidání prebiotik k probiotickým buňkám byl ve většině případů zaznamenán částečný pokles jejich počtu po průchodu trávicím traktem. Nicméně negativní vliv trávicího procesu na tyto probiotické buňky byl mnohem nižší ve srovnání s probiotickými buňkami bez přítomnosti prebiotika. Velmi zajímavým prebiotickým produktem byl především Jakon sirup, který ve dvou případech dokázal podpořit viabilitu buněk natolik, že nedošlo k žádnému výraznému úbytku počtu buněk po modelovém trávení. Z tohoto hlediska se tedy jeví jako nejlepší z testovaných prebiotik. Mohl by tedy plnit funkci alternativy k doposud nejčastěji používanému prebiotiku inulinu. Jak vyplývá například ze studie Mathewsové a kolektivu, inulin nepatří mezi nejúčinnější prebiotika z hlediska podpory viability probiotických buněk a jejich odolnosti proti trávicím šťávám. Spíše jde o prebiotikum, které má pozitivní účinky na lidské zdraví a zároveň je dobře dostupné [69]. Jakon sirup by tak mohl naopak výrazněji přispět k podpoře probiotických bakterií a díky vyššímu zastoupení monosacharidů a sladké chuti i k vylepšení sensorických vlastností produktu.

## 5.9 Charakterizace vybraných prebiotických výrobků

Komerčně prodávané prebiotické výrobky byly charakterizovány z hlediska obsahu významných výživových složek, a to sacharidů, bílkovin nebo tuků. Navíc bylo sledováno množství polyfenolů a chlorofylu. Naměřené hodnoty byly poté v některých případech srovnány s deklarovanými hodnotami uvedenými výrobcem na obale výrobku.

### 5.9.1 Stanovení celkových rozpustných sacharidů metodou dle Duboise

Podle pracovního postupu uvedeného v kapitole 4.14 byla nejprve stanovena kalibrační křivka D-glukózy. Rovnice regrese má tvar  $y = 15,074x$ . Dále bylo stanovení celkových sacharidů provedeno pro dané prebiotické produkty. Pro každé prebiotikum byla absorbance změřena třikrát a výsledná absorbance byla průměrem těchto tří hodnot. Pomocí rovnice regrese byl vypočítán obsah celkových sacharidů v každém prebiotickém produktu i se směrodatnou odchylkou. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 36.

Tabulka 36: Obsah celkových rozpustných sacharidů u jednotlivých prebiotických produktů

Produkty	Deklarované hodnoty [g/100 g]	Naměřené hodnoty [g/100 g]
Inulin	7	8,380 ± 0,110
Chia vláknina	44	43,760 ± 0,020
Bambusová vláknina	0,1	0,090 ± 0,020
Chlorella + Spirulina	NEDEKLAROVÁNO	0,600 ± 0,030
Jakon sirup	71	63,240 ± 0,060

Z výsledků je patrné, že nejvyšší obsah celkových rozpustných sacharidů zaznamenal produkt Jakon sirup. Naopak nejmenší obsah celkových sacharidů zaznamenala Bambusová vláknina. Co se týká porovnání výsledků s deklarovanou hodnotou od výrobce, všechny výsledky se pohybovaly v rámci odchylky okolo 10 % od deklarované hodnoty, což může být způsobeno nižší přesností použité spektrofotometrické metody.

Produkt Inulin zaznamenal výsledek vyšší, než je deklarovaná hodnota, ale zároveň šlo o produkt, u kterého byla zaznamenána nejvyšší odchylka od deklarované hodnoty. Produkty Chia vláknina a Bambusová vláknina zaznamenaly přibližně srovnatelnou hodnotu obsahu celkových sacharidů s hodnotou, kterou deklaruje výrobce. U produktu Chia vláknina byla zaznamenána nejmenší odchylka naměřené hodnoty od deklarované hodnoty. U produktu Chlorella + Spirulina není bohužel hodnota obsahu celkových sacharidů výrobcem deklarována z toho důvodu, že jde o doplněk stravy. U doplňků stravy není výrobce povinen uvádět výživové údaje. Tím pádem nemůže být výsledná hodnota porovnána. Produkt Jakon sirup zaznamenal naopak menší obsah celkových sacharidů, než uvádí výrobce. Stanovení sacharidů v daných prebiotických produktech je důležité z toho důvodu, že sacharidy mohou být zdrojem energie pro růst a viabilitu probiotických bakterií a jejich množství je tedy důležitým faktorem při volbě správného prebiotika, které by zajistilo jak správné fungování trávicí soustavy, tak i vytvářelo příznivé podmínky pro střevní mikroflóru. Pro určení, které prebiotikum je pro kombinaci s probiotickými bakteriemi nejvhodnější, byly prebiotické produkty dále charakterizovány i z hlediska obsahu redukcujících sacharidů.

### 5.9.2 Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona

Podle pracovního postupu uvedeného v kapitole 4.15 byla stanovena kalibrační křivka D-glukózy. Rovnice regrese má tvar  $y = 29,557x$ . Dále bylo provedeno stanovení redukujících sacharidů pro dané prebiotické produkty. Pro každé prebiotikum byla absorbance změřena třikrát a výsledná absorbance byla průměrem těchto tří hodnot. Pomocí rovnice regrese byl následně vypočítán obsah redukujících sacharidů v každém prebiotiku i se směrodatnou odchylkou. Výsledné hodnoty pro prebiotické produkty jsou uvedeny v následující tabulce č 37.

*Tabulka 37: Obsah redukujících sacharidů u jednotlivých prebiotických produktů*

<b>Produkty</b>	<b>Deklarované hodnoty [g/100 g]</b>	<b>Naměřené hodnoty [g/100 g]</b>
Inulin	7	1,104 ± 0,012
Chia vláknina	0	0,090 ± 0,002
Bambusová vláknina	0,1	0,007 ± 0,013
Chlorella + Spirulina	NEDEKLAROVÁNO	0,234 ± 0,008
Jakon sirup	25	23,260 ± 0,014

Z dosažených výsledků stanovení obsahu redukujících sacharidů vyplývá, že nejvyšší hodnotu obsahu redukujících sacharidů zaznamenal produkt Jakon sirup. Nejmenší obsah redukujících cukrů byl stanoven u produktu Bambusová vláknina.

Při porovnání s deklarovanou hodnotou zaznamenal produkt Inulin velmi malý obsah redukujících sacharidů, a to asi jen 15 % z deklarované hodnoty. Co se týká produktu Chia vláknina, u něj byl zaznamenán drobný rozdíl od deklarované hodnoty. Výrobce deklaruje nulové zastoupení redukujících sacharidů, ale i přesto bylo nepatrné množství těchto sacharidů naměřeno. To mohlo být způsobeno částečným rozkladem sacharidových jednotek na monosacharidy. U produktu Bambusová vláknina byl zaznamenán nižší obsah redukujících sacharidů, avšak nebyl u něj zaznamenán tak markantní rozdíl od deklarovaných hodnot, jako například v případě Inulinu, naměřeno bylo asi 70 % z deklarované hodnoty. U produktu Jakon sirup byly detekované výsledky rovněž lehce nižší ve srovnání s deklarovanou hodnotou.

Z hlediska dostupnosti redukujících sacharidů, které mohou poskytovat okamžitý zdroj uhlíku bez rozkladu větších sacharidových jednotek, má Jakon sirup nejlepší předpoklady. Ve spojení s výsledky uvedenými v kapitole 5.8, kde byl Jakon sirup shledán jako nejlepší prebiotikum z hlediska podpory viability probiotických buněk, se produkt Jakon sirup jeví jako ideální alternativa či doplňková složka k doposud užívaným prebiotikům v komerčních probiotických preparátech.

### 5.9.3 Charakterizace prebiotických produktů z hlediska obsahu sacharidů metodou HPLC

Proměřením koncentračních řad 0,5-5 g/l byly stanoveny následující rovnice regrese a retenční časy daných typů sacharidů, které jsou uvedeny v tabulce č. 38.



Tabulka 38: Kalibrační křivky a retenční časy vybraných stanovovaných sacharidů

Stanovované sacharidy	Kalibrační křivka	Retenční čas [min]
Inulin	$y = 3,832\ 2x$	8,20
Glukóza	$y = 6,084\ 0x$	11,50
Manóza	$y = 5,654\ 0x$	12,20
Galaktóza	$y = 5,896\ 9x$	12,25
Xylóza	$y = 5,720\ 5x$	12,30
Fruktóza	$y = 6,210\ 6x$	12,40

V následující tabulce č. 39 jsou uvedeny výsledky z analýzy nehydrolyzovaných prebiotických produktů, obsahy jednotlivých typů sacharidů jsou uváděny v procentech. Produkt Inulin zaznamenal nejvyšší obsah oligosacharidů (fruktooligosacharidů), naopak disacharidů a monosacharidů obsahoval jen velmi málo. Z monosacharidů se ve výsledném chromatogramu vyskytovala glukóza a fruktóza, které byly v téměř vyrovnaném množství s lehkou převahou fruktózy. Chia vláknina zaznamenala poměrně vysoký obsah monosacharidů (konkrétně manózy). Manóza byla obsažena ve vysoké míře i u produktu Bambusová vláknina. Ta neobsahovala jiné typy sacharidů než monosacharidy, a to jen stopové množství glukózy a manózy. Jakon sirup obsahoval oligosacharidy typu fruktooligosacharidů, disacharidy neobsahoval vůbec a nejvyšší obsah zaznamenal v množství monosacharidů (glukózy a fruktózy). Z monosacharidů převažovala fruktóza. Chlorella + Spirulina zaznamenala u všech typů sacharidů poměrně vyrovnané množství ve všech třech skupinách. Ve skupině oligosacharidů obsahovala různé typy tetrozů a trióz, dále některé disacharidy a poté glukózu a fruktózu.

Tabulka 39: Poměrné zastoupení jednotlivých typů sacharidů v nehydrolyzovaných prebiotických produktech

Produkt	Oligosacharidy	Disacharidy	Monosacharidy
Inulin	90 %	4 %	6 %
Chia vláknina	23 %	2 %	75 %
Bambusová vláknina	0 %	0 %	100 %
Chlorella + Spirulina	38 %	28 %	34 %
Jakon sirup	17 %	0 %	83 %

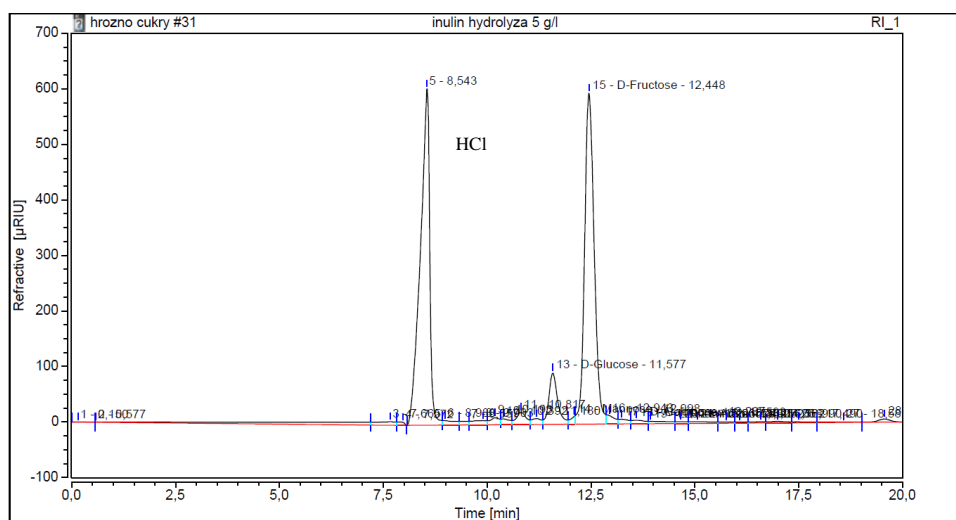
Následující tabulka č. 40 uvádí poměrové zastoupení jednotlivých typů sacharidů u hydrolyzovaných prebiotických produktů. Co se týká produktu Inulin, tak můžeme vidět, že zaznamenal velmi podstatný nárůst počtu monosacharidů. Je to z toho důvodu, že během hydrolýzy došlo k rozštěpení fruktooligosacharidů na disacharidy, ale zejména na velké množství monosacharidů, tzn. na glukózu a fruktózu. V zastoupení monosacharidů výrazně převažuje fruktóza. U Chia vlákniny došlo k rozpadu složitých struktur nerozpustné vlákniny v největší míře na monosacharidy a dále na malé množství disacharidů. Z monosacharidů se v chromatogramu vyskytovala xylóza a glukóza. U dalšího produktu, Bambusové vlákniny, nedošlo k žádné významné změně a obsahovala opět jen monosacharidy. Stejně jako Chia vláknina, obsahovala i Bambusová vláknina monosacharid xylózu. U produktu Jakon sirup došlo k výraznému rozštěpení všech oligosacharidů. Většina oligosacharidů se rozložila na

glukózu a zejména fruktózu. U produktu Chlorella + Spirulina došlo ke změně vyrovnaného zastoupení všech typů sacharidů. Všechny oligosacharidy se hydrolyticky rozštěpily na minoritní disacharidy a majoritní monosacharidy, jmenovitě na glukózu a galaktózu.

Tabulka 40: Poměrné zastoupení jednotlivých typů sacharidů v hydrolyzovaných probiotických produktech

Produkt	Oligosacharidy	Disacharidy	Monosacharidy
Inulin	0 %	12 %	84 %
Chia vláknina	0 %	20 %	80 %
Bambusová vláknina	0 %	0 %	100 %
Chlorella + Spirulina	0 %	28 %	72 %
Jakon sirup	0 %	6 %	94 %

Na obrázku č. 12 je znázorněn chromatogram z analýzy hydrolyzovaného Inulinu. První pík zleva znázorňuje kyselinu chlorovodíkovou, která byla využita při hydrolyze. Dále můžeme vidět řadu malých píků, které odpovídají tetrozám, triózám a disacharidům, jako je například sacharóza. Za nimi následují píky monosacharidů. Menší pík patří glukóze a větší fruktóze. Právě hlavně na fruktózu se rozštěpily původní fruktooligosacharidy. Při opakování hydrolyzy by docházelo k neustálému snižování počtu fruktooligosacharidů se souvisejícím zvyšováním množství monosacharidů, zejména fruktózy.



Obrázek 12: Chromatogram hydrolyzovaného inulinu

V tabulce č. 41 jsou uvedeny výsledky stanovení obsahu nerozpustných složek v produktech. Výsledná navážka po proběhnutí hydrolyzy a po vysušení do konstantní hmotnosti byla vztahována k původní navážce 0,2 g. Z výsledků vyplývá, že produkt Inulin společně s Jakon sirupem obsahují téměř na 100 % rozpustné složky. Naopak nejvíce nerozpustných složek obsahují obě vlákniny, nejvíce konkrétně Bambusová vláknina.

Tabulka 41: Výsledky analýzy nerozpustných složek v prebiotických produktech

Prebiotikum	Navážka [g]	%
Inulin	0,000 6	0,30
Chia vláknina	0,139 9	69,95
Bambusová vláknina	0,187 5	93,75
Jakon	0,000 9	0,45
Chlorella + Spirulina	0,111 1	55,55

#### 5.9.4 Stanovení celkových bílkovin u prebiotických produktů metodou dle Kjeldahla

Velmi významnou složkou potravin jsou také bílkoviny, které jsou nezbytné pro správnou funkci lidského těla. Proto byl zjišťován jejich obsah i u použitých prebiotických produktů. Vyhodnocení získaných výsledků po proběhnutí mineralizace a destilace bylo provedeno podle rovnic uvedených v kapitole 4.18. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce č. 42, kde je uveden jednak obsah celkového dusíku v procentech, a také obsah hrubé bílkoviny v procentech. Pod tabulkou je uveden také příklad výpočtu pro prebiotický produkt Chia vláknina, který zaznamenal nejvyšší hodnotu obsahu hrubé bílkoviny.

Tabulka 42: Obsah celkového dusíku a hrubé bílkoviny u prebiotických produktů

Prebiotický produkt	Obsah celkového dusíku [%]	Obsah hrubé bílkoviny [%]
Inulin	0,00	0,00
Chia vláknina	2,09	11,95
Bambusová vláknina	0,02	0,13
Chlorella + Spirulina	1,96	11,17
Jakon sirup	0,58	3,28

Příklad výpočtu pro prebiotický produkt Chia vláknina:

Obsah celkového N:

$$w_N = 10 \cdot \frac{2 \cdot c_{H_2SO_4} \cdot V_{H_2SO_4}^{celk} - \left( \frac{c_{NaOH} \cdot V_{NaOH}}{2} \right) \cdot M_N}{m_{navážka}} = 10 \cdot \frac{2 \cdot (0,0520 \cdot 0,025 - \frac{0,0988 \cdot 0,0248}{2}) \cdot 14,01}{1,0007} = 0,0209 = \underline{2,09\%}$$

Obsah hrubé bílkoviny v prebiotickém produktu Chia vláknina:

$$HB = w_N \cdot 5,7 = 0,0209 \cdot 5,7 = 0,1195 = \underline{11,95\%}$$

Z tabulky č. 42 vyplývá, že nejvyšší obsah bílkovin zaznamenal produkt Chia vláknina. Poměrně vysoký obsah bílkovin byl zaznamenán také u produktu Chlorella + Spirulina. Naopak nejmenší obsah bílkovin byl zaznamenán u produktu Inulin, kde byl potvrzen nulový obsah bílkovin deklarovaný výrobcem.

#### 5.9.5 Stanovení obsahu mastných kyselin u prebiotických produktů pomocí plynové chromatografie

Celkové lipidické látky byly z vybraných prebiotických produktů extrahovány metodou dle Folche, která je popsána v kapitole 4.19. Obecně se dá říci, že u všech prebiotických přípravků byl potvrzen deklarovaný obsah tuků. Lipidické látky byly dále podrobeny analýze plynovou

chromatografií z hlediska obsahu mastných kyselin. Postup úpravy vzorků pro plynovou chromatografii je popsán v kapitole 4.20.

V tabulce č. 43 jsou uvedeny celkové obsahy mastných kyselin v jednotkách mg/g včetně směrodatných odchylek pro všechny tři typy produktů, které byly pro analýzu vybrány. Chia vláknina, Bambusová vláknina a Chlorella + Spirulina byly vybrány proto, že u nich výrobce deklaruje obsah tuků. U produktů Inulin a Jakon sirup byl potvrzen výrobcem deklarovaný nulový obsah tuků.

*Tabulka 43: Celkový obsah mastných kyselin u vybraných prebiotických produktů*

	<b>Chia vláknina</b>	<b>Bambusová vláknina</b>	<b>Chlorella + Spirulina</b>
<b>Celkový obsah mastných kyselin [mg/g]</b>	2,340 ± 0,070	0,510 ± 0,020	0,029 ± 0,001

Z tabulky č. 43 vyplývá, že nejvyšší hodnotu celkového obsahu mastných kyselin stanovených plynovou chromatografií zaznamenal produkt Chia vláknina a to hodnotu 2,340 ± 0,070 mg/g. Nejnižší hodnotu pak zaznamenal produkt Chlorella + Spirulina s hodnotou 0,029 ± 0,001 mg/g.

V tabulce č. 44 jsou uvedeny jednotlivé druhy mastných kyselin s danými obsahy v jednotkách mg/g u jednotlivých testovaných prebiotických produktů, které byly pomocí metody plynové chromatografie stanoveny.

Tabulka 44: Obsah jednotlivých typů mastných kyselin u vybraných typů prebiotických produktů

<b>Mastná kyselina</b>	<b>Chia vláknina [mg/g]</b>	<b>Bambusová vláknina [mg/g]</b>	<b>Chlorella + Spirulina [mg/g]</b>
Kyselina kaprylová (C8:0)	ND	ND	$3,00 \cdot 10^{-4} \pm 0,10 \cdot 10^{-4}$
Kyselina undecenová (C11)	ND	ND	$1,00 \cdot 10^{-3} \pm 0,03 \cdot 10^{-3}$
Kyselina tridecenová (C13:0)	ND	ND	$6,00 \cdot 10^{-4} \pm 0,20 \cdot 10^{-4}$
Kyselina myristová (C14:0)	ND	ND	$3,00 \cdot 10^{-4} \pm 0,10 \cdot 10^{-4}$
Kyselina myristolejová (C14:1)	$4,40 \cdot 10^{-3} \pm 0,10 \cdot 10^{-3}$	ND	ND
Kyselina pentadecenová (C15:0)	ND	ND	$5,00 \cdot 10^{-4} \pm 0,20 \cdot 10^{-4}$
Kyselina palmitová (C16:0)	$0,17 \pm 0,01$	$2,8 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-2}$	$1,50 \cdot 10^{-2} \pm 0,04 \cdot 10^{-2}$
Kyselina palmitoolejová (C16:1)	$6,20 \cdot 10^{-3} \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$	ND	$8,00 \cdot 10^{-4} \pm 0,20 \cdot 10^{-4}$
Kyselina stearová (C18:0)	$6,90 \cdot 10^{-2} \pm 0,20 \cdot 10^{-2}$	$1,10 \cdot 10^{-2} \pm 0,03 \cdot 10^{-2}$	$3,80 \cdot 10^{-3} \pm 0,10 \cdot 10^{-3}$
Kyselina olejová (C18:1)	$0,20 \pm 0,01$	$3,60 \cdot 10^{-2} \pm 0,10 \cdot 10^{-2}$	$4,00 \cdot 10^{-4} \pm 0,10 \cdot 10^{-4}$
Kyselina linolová (C18:2)	$0,56 \pm 0,02$	$1,60 \cdot 10^{-2} \pm 0,10 \cdot 10^{-2}$	$9,10 \cdot 10^{-3} \pm 0,30 \cdot 10^{-3}$
Kyselina $\alpha$ -linolová (C18:3n3)	$1,32 \pm 0,04$	$3,3 \cdot 10^{-3} \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-3} \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$
Kyselina $\gamma$ -linolová C(18:3n6)	ND	ND	$1,5 \cdot 10^{-3} \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$
Kyselina arachidonová (C20:0)	$9,70 \cdot 10^{-3} \pm 0,30 \cdot 10^{-3}$	$5,50 \cdot 10^{-3} \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$	ND
Gondoová kyselina (C20:1)	$4,80 \cdot 10^{-3} \pm 0,10 \cdot 10^{-3}$	$3,90 \cdot 10^{-3} \pm 0,10 \cdot 10^{-3}$	ND

Poznámka: ND - nedetekováno

Z tabulky č. 44 je patrné, že vybrané prebiotické produkty obsahují celou řadu mastných kyselin. Z výživového hlediska je zajímavý hlavně produkt Chia vláknina, který obsahuje omega 3 a 6 mastné kyseliny poměrně ve velkém množství. Proto by v komplexních preparátech s probiotiky mohla Chia vláknina sloužit jako významný zdroj těchto kyselin pro

dětskou výživu. Takovýto produkt by mohl například částečně nahradit mezi dětskými spotřebiteli málo oblíbený rybí tuk. Chia vláknina navíc zaznamenala výborné výsledky při zvýšení odolnosti lyofilizovaných probiotických buněk proti trávicím šťávám a při podpoře viability těchto buněk, jak vyplývá z kapitoly 5.8. Proto se Chia vláknina nabízí jako vhodně využitelné prebiotikum při aplikaci v probiotickém produktu pro děti.

### 5.9.6 Stanovení celkových polyfenolů

Podle pracovního postupu uvedeného v kapitole 4.16 byla stanovena kalibrační křivka kyseliny gallové. Rovnice regrese má tvar  $y = 1,665 3x$ . Dále bylo provedeno stanovení polyfenolů pro dané prebiotické produkty. U každého byla absorbance změřena třikrát a výsledná hodnota byla průměrem těchto tří hodnot. Pomocí rovnice regrese byl vypočítán obsah polyfenolů v každém prebiotiku i se směrodatnou odchylkou. Získané hodnoty pro prebiotické produkty v jednotkách polyfenolů v mg/g jsou uvedeny v tabulce č. 45.

Tabulka 45: Obsah polyfenolů u jednotlivých prebiotických produktů

Produkty	Naměřené hodnoty [mg/g]
Inulin	5,61 ± 0,91
Chia vláknina	6,56 ± 0,33
Bambusová vláknina	4,61 ± 0,21
Chlorella + Spirulina	8,57 ± 0,12
Jakon sirup	3,34 ± 0,27

U vybraných typů prebiotik nebyl očekáván vysoký obsah polyfenolů a z výsledků uvedených v tabulce č. 45 rovněž vyplývá, že celkové polyfenoly jsou v produktech zastoupeny poměrně v malém množství. Nejvyšší obsah polyfenolů v jednotkách mg/g zaznamenal produkt Chlorella + Spirulina. Nejmenší obsah polyfenolů naopak obsahoval produkt Bambusová vláknina. Jelikož na obalech výrobků nejsou deklarované hodnoty obsahu polyfenolů, nemohlo být provedeno porovnání s deklarovanou hodnotou. Vzorky byly změřeny především z toho důvodu, že sloučeniny, které patří do skupiny polyfenolů, mohou vykazovat antimikrobiální účinek a mohly by tedy negativně působit na probiotické bakterie. Nicméně díky vysokému obsahu sacharidů se u většiny prebiotik při dalších dílčích analýzách prokázalo, že vybrané prebiotické produkty podporují růst bakterií a polyfenolické látky obsažené v prebiotících v minimálním množství žádným výrazným způsobem neinhibují jejich růst.

### 5.9.7 Fotometrické stanovení chlorofylů u prebiotického produktu

#### Chlorella + Spirulina

U prebiotického produktu Chlorella + Spirulina, který se skládá ze zelených řas, bylo stanoveno také množství chlorofylů typu A, B i množství celkového chlorofylu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 46 v jednotkách mg/g.

Tabulka 46: Obsah chlorofylů v prebiotickém produktu Chlorella + Spirulina

Prebiotický produkt	Chlorofyl A [mg/g]	Chlorofyl B [mg/g]	Chlorofyl A+B [mg/g]
Chlorella + Spirulina	0,165 ± 0,003	0,271 ± 0,004	0,460 ± 0,070

Z tabulky č. 46 vyplývá, že produkt Chlorella + Spirulina zaznamenal vyšší obsah chlorofylu B, a to konkrétně hodnotu  $0,271 \pm 0,004$  mg/g. Celkový obsah chlorofylu byl stanoven na  $0,460 \pm 0,070$  mg/g. Chlorofyl slouží pro lidský organismus jako antioxidant, proto je Chlorella + Spirulina další zajímavou variantou možné použitého prebiotika. Navíc jak vyplývá z výsledků v kapitole 5.8, tento produkt zaznamenal nejlepší výsledky při zvýšení viability a odolnosti enkapsulovaných probiotických buněk ve formě alginátových částic proti trávicím šťávám a výborně také podpořil viabilitu buněk v komerčních probiotických produktech pro děti, jak vyplývá z kapitoly 5.4.1.

## 5.10 Návrh vlastního probiotického produktu

Jedním z cílů předložené diplomové práce bylo navržení unikátního probiotického produktu pro děti s lepšími vlastnostmi, než jaké mají dostupné komerční preparáty. V experimentální části práce bylo zjištěno, že nejlepší formou pro uchování probiotických buněk je jejich lyofilizovaná forma. Náš preparát by byl navíc obohacen o specifické prebiotikum. Po provedení optimalizace se hned několik prebiotik jeví jako zajímavá varianta k nahrazení prebiotika inulinu, který je v komerčních probiotických preparátech hojně využíván. Produkt Chia vláknina by mohl přinést benefit ve vysokém obsahu oligosacharidů a také v obsahu omega 3 a 6 mastných kyselin. Avšak z toho důvodu, že se jedná o nerozpustnou vlákninu, by tento produkt nemohl být využit pro nejmenší děti, protože jak vyplývá z kapitoly 2.2.4.1, nerozpustnou vlákninu se nedoporučuje zařazovat do jídelníčku dětem mladším 4 měsíců. Právě vysoký podíl nerozpustné vlákniny u Chia vlákniny byl stanoven v kapitole 5.9.3. Produkt Chlorella + Spirulina je naopak zajímavý obsahem chlorofylu, který má pozitivní účinky na lidský organismus jako antioxidant. Další velmi vhodnou variantou by mohl být Jakon sirup, který zaznamenal zajímavé výsledky z obecného výživového hlediska a také se nejlépe osvědčil při podpoře viability probiotických buněk. Po shrnutí dosažených výsledků byly navrženy dvě možné formy unikátního probiotického produktu pro děti.

První navrhovanou formou je produkt, který by mohl sloužit například jako ochucovadlo dětských kaší. Tento přípravek ve formě lyofilizovaných alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými buňkami s přísadkou Chia vlákniny by sloužil pro starší děti. Mohl by být obohacen také o některou z ovocných složek pro lepší chuť. V úvahu přichází například acerola neboli tropická třešň, která byla charakterizována v bakalářské práci kolegyně Lucie Dzurické a vykazovala velmi zajímavé výsledky. Acerola vykazuje především vysoký obsah vitamínu C, který by přirozeně podporoval imunitu dětí. Její nevýhodou je však kyselá chuť, která by musela být vyrovnána přísadkou některého z přirozených či umělých sladidel.

Druhou navrhovanou formou jsou probiotické buňky s přísadkou prebiotika ve formě gumových medvídků. Je to forma, která může být velmi atraktivní pro dětské spotřebitele, jelikož jim připomíná bonbóny.

Probiotické buňky jsou zde uvažovány ve formě alginátových částic v lyofilizované formě a jako nejvhodnější forma přidaného prebiotika dle dosažených výsledků se jeví produkt Jakon sirup. Tato varianta s prebiotickým produktem Jakon sirup byla navíc výborně hodnocena zkušenými hodnotiteli v sensorické analýze, která byla zrealizována v rámci bakalářské práce

kolegyně Veroniky Šmídové. Na obrázku č. 13 jsou zobrazeny vytvořené finální produkty ve formě gumových medvídků.



Obrázek 13: Návrh vlastního probiotického produktu pro děti ve formě gumových medvídků

Celkové shrnutí složení obou navržených probiotických preparátů pro děti je uvedeno v tabulce č. 47.

Tabulka 47: Shrnutí složení navrhovaných probiotických produktů pro děti

<b>Probiotický produkt ve formě prášku</b>	<b>Gumoví medvídci</b>
Lyofilizované alginátové částice s enkapsulovanými probiotickými buňkami	Lyofilizované alginátové částice s enkapsulovanými probiotickými buňkami
Chia vláknina nebo Chlorella + Spirulina	Jakon sirup
Acerola	Alginát, agar
Sacharóza či jiné sladidlo	Přírodní aroma



## 6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na navržení vhodného produktu pro dětskou výživu s obsahem probiotických bakterií a jejich specifických substrátů, tzv. prebiotik. Jako probiotické bakterie byly vybrány bakterie *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve*. Jako prebiotika pak byly testovány Inulin, Chia vláknina, Bambsuová vláknina, Chlorella + Spirulina a Jakon sirup.

Po provedení screeningu na trhu dostupných doplňků stravy pro dětskou výživu s obsahem probiotických bakterií byly vybrány produkty APO-LAKTÍK kapky, APO-LATÍK želatinové pastilky, Bipron JUNIOR sáčky a ProbioMaxík tablety. U vybraných produktů bylo potvrzeno deklarované množství životaschopných bakterií, které bylo ve všech případech ještě vyšší než deklarovaná hodnota. Vybrané komerční produkty s a bez přídavku různých typů prebiotik byly dále podrobeny modelovému trávení. Zde se jako nejlepší prebiotikum jevila Chlorella + Spirulina, která nejlépe podpořila viabilitu buněk při průchodu trávicím traktem.

Modelové trávení bylo provedeno také u čerstvě kultivovaných probiotických buněk, u lyofilizovaných probiotických buněk a u lyofilizovaných alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými buňkami. Vždy ve srovnání s a bez přídavku různých typů prebiotik. Zmíněné alginátové částice s enkapsulovanými probiotickými buňkami byly připraveny pomocí trysky o průměru 300  $\mu\text{m}$  na enkapsulátoru. Z dosažených výsledků u trávení různých forem probiotických buněk se jako nejvhodnější jeví prebiotikum Jakon sirup, které zaznamenalo výraznou podporu odolnosti probiotických buněk proti trávicím šťávám.

V další části práce byla charakterizována vybraná prebiotika z hlediska různých obsahových složek. Prebiotika byla charakterizována z hlediska obsahu redukujících a celkových rozpustných sacharidů, kdy v obou případech zaznamenal nejvyšší hodnoty produkt Jakon sirup. Obsah celkových rozpustných sacharidů byl u něj stanoven na hodnotu  $63,240 \pm 0,060$  g/100 g a redukujících sacharidů na hodnotu  $23,260 \pm 0,014$  g/100 g.

Z hlediska obsahu sacharidů byla vybraná prebiotika také charakterizována pomocí metody kapalínové chromatografie, a to jak v nehydrolyzované, tak v hydrolyzované formě. Sledován byl především obsah fruktooligosacharidů, které patří k nejvhodnějším substrátům pro růst probiotických bakterií. Jejich obsah byl zjištěn u produktů Inulin a Jakon sirup. Další oligosacharidy se vyskytovaly u prebiotik Chia vláknina a Chlorella + Spirulina.

Z hlediska výživy dětí velmi záleží na podílu rozpustné a nerozpustné vlákniny v prebiotiku. Zde se tedy jako nevhodnější prebiotikum jeví Jakon sirup, který obsahuje pouze 0,45 % nerozpustné vlákniny. Naopak poměrně velké množství nerozpustné vlákniny, a to 69,95 %, obsahuje Chia vláknina, která tak může být pro menší děti hůře stravitelná. Chia vláknina však zaznamenala velmi dobré výsledky z hlediska obsahu bílkovin a lipidů. Chia vláknina obsahovala nejvyšší množství bílkovin ze všech prebiotik, a to 12 % hrubé bílkoviny. Obsahovala také omega 3 a 6 mastné kyseliny.

V neposlední řadě byl u probiotických produktů stanoven obsah polyfenolů a chlorofylu, kde nejvyšší koncentrace obsahoval produkt Chlorella + Spirulina, přesněji  $0,460 \pm 0,070$  mg/g chlorofylu a  $8,57 \pm 0,12$  mg/g polyfenolů.

Po shrnutí získaných výsledků se jako nejlepší varianta pro uchování probiotických bakterií jeví alginátové částice s enkapsulovanými probiotickými buňkami v lyofilizované formě a jako

prebiotika se při této aplikaci nejlépe osvědčily produkty Chia vláknina, Chlorella + Spirulina a Jakon sirup. Návrh finálního produktu zahrnuje dvě varianty. První varianta zvažuje sypký prášek s obsahem lyofilizovaných probiotických buněk a prebiotika Chia vlákniny či Chlorelly + Spiruliny. Druhá varianta pracuje s představou produktu ve formě gumových medvídků s lyofilizovanými alginátovými částicemi s obsahem probiotických buněk. Jako prebiotikum se zde nejlépe jeví produkt Jakon sirup. Tato varianta by mohla být pro dětské spotřebitele atraktivnější z hlediska vzhledu a mohla by jim přinést zdravější alternativu k dětským pochutinám podobného typu.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SANDERS, Mary Ellen, Irene LENOIR-WIJNKOOP, Seppo SALMINEN, et al. Probiotics and prebiotics: prospects for public health and nutritional recommendations [online]. [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1111/nyas.12377. ISBN 10.1111/nyas.12377. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/nyas.12377>
- [2] FAO a WHO. Probiotics in food health and nutritional properties and guidelines for evaluation: report. Rome: [Food and agriculture organization of the United nations (FAO) [etc.], 2006. ISBN 9251055130.
- [3] NEVORAL, Jiří. Prebiotika, probiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*, 2005, roč. 8, č. 2, s. 59-65. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2005/02/02.pdf>
- [4] 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>
- [5] 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. 2018-02-25]. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.014. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643812002319>
- [6] SANDERS, Mary Ellen. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2008, 46(s2), S58-S61 [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1086/523341. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/523341>
- [7] LEFKOVITZ, Allen L., Barbara J. ZAROWITZ, Glenn R. GIBSON a Robert A. RASTALL. 2013. It's a microscopic world after all: Prebiotics, probiotics, and synbiotics. *Geriatric Nursing* [online]. 34(4): 323-325 [cit. 2015-05-12]. DOI: 10.1016/j.gerinurse.2013.06.007. ISSN 01974572. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197457213002024>
- [8] BEZIRTZOGLOU, Eugenia a Elisabeth STAVROPOULOU. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. *Anaerobe* [online]. 2011, vol. 17, issue 6, s. 369-374 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.03.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996411000345>
- [9] CANDELA, M., F. PERNA, P. CARNEVALI, et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2008, 125(3), 286-292 [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.012. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160508001967>
- [10] SÁNCHEZ, Borja, Susana DELGADO, Aitor BLANCO-MÍGUEZ, Anália LOURENÇO, Miguel GUEIMONDE a Abelardo MARGOLLES. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research* [online]. 2017, 61(1), 1600240- [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1002/mnfr.201600240. ISSN 16134125. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201600240>

- [11] VIEIRA, Angélica T., Mauro M. TEIXEIRA a Flaviano S. MARTINS. The Role of Probiotics and Prebiotics in Inducing Gut Immunity. *Frontiers in Immunology*[online]. 2013, 4, - [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00445. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00445/abstract>
- [12] 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. 2018-02-17]. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.014. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381200231>
- [13] 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>
- [14] 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. 2018-02-17]. 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)
- [15] KECHAGIA, Maria, 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. 2018-02-17]. DOI: 10.5402/2013/481651. ISSN 2314-4068. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/archive/2013/48165>
- [16] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [17] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5.
- [18] SLOVER, Christine M. a Larry DANZIGER. Lactobacillus: a Review. *Clinical Microbiology Newsletter* [online]. 2008, 30(4), 23-27 [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1016/j.clinmicnews.2008.01.006. ISSN 01964399. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019643990800007X>
- [19] KREJSEK, Jan, Manuela TROJÁČKOVÁ KUDLOVÁ, Martina KOLÁČKOVÁ a Jakub NOVOSAD. Nutrice, probiotika a imunitní systém: Nutrition, probiotics and immune system. *Pediatrics pre prax*. 2007, 8(3), 125. ISSN 1336-8168.
- [20] *Botica Magistral: Lactobacillus acidophilus* [online]. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <http://www.botica.com.py/prospecto-digital/2016/11/16/lactobacillus-acidophilus/>
- [21] *Mystical Biotech: Bifidobacterium breve* [online]. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <http://www.mysticalbiotech.com/product>
- [22] *Babyweb: 7 typů na probiotika pro děti* [online]. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <https://www.babyweb.cz/7-tipu-na-probiotika-pro-deti>
- [23] *Biopron: Pro děti* [online]. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <http://www.biopron.cz/pro-deti/>
- [24] *Dr. Max: APO-Laktik for baby 75ml* [online]. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/apo-laktik-for-baby-7-5-ml>

- [25] *Pilulka.cz: APO-Laktik žvýkací pastilky 30 ks* [online]. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: [https://www.pilulka.cz/apo-laktik-zvykaci-pastilky-30ks?ppcbee-adttext-variant=MD-pod499+&gclid=EAIaIQobChMIyZzL3MHn2QIVkRbTCh35Eg34EAAAYAiAAEgIcn\\_D\\_BwE](https://www.pilulka.cz/apo-laktik-zvykaci-pastilky-30ks?ppcbee-adttext-variant=MD-pod499+&gclid=EAIaIQobChMIyZzL3MHn2QIVkRbTCh35Eg34EAAAYAiAAEgIcn_D_BwE)
- [26] *Dr. Max: Biopron JUNIOR 15 sáčků* [online]. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/biopron-junior-15-sacku>
- [27] *Dr. Max: ProbioMaxik 30tbl.* [online]. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/dr-max-probiomaxik-30tb>
- [28] AL-SHERAJI, Sadeq Hasan, Amin ISMAIL, Mohd Yazid MANAP, Shuhaimi MUSTAFA, Rokiah Mohd YUSOF a Fouad Abdulrahman HASSAN. Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods* [online]. 2013, 5(4), 1542-1553 [cit. 2018-02-25]. DOI: 10.1016/j.jff.2013.08.009. ISSN 17564646. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S175646461300193X>
- [29] FRIC, Premysl. Probiotics and prebiotics — renaissance of a therapeutic principle. *Open Medicine* [online]. 2007, 2(3), - [cit. 2018-02-25]. DOI: 10.2478/s11536-007-0031-5. ISSN 2391-5463. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/med.2007.2.issue-3/s11536-007-0031-5/s11536-007-0031-5.xml>
- [30] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002, Přer. str. ISBN 80-200-0600-1.
- [31] STEINBUCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 35-273- 0226-3.
- [32] C. DELATTRE, M. URDACI a SCHMITTER. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2013, vol. 50, issue 1 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.014
- [33] WATKINS, Claire, Catherine STANTON, C. Anthony RYAN a R. Paul ROSS. Microbial Therapeutics Designed for Infant Health. *Frontiers in Nutrition*[online]. 2017, 4, - [cit. 2018-02-25]. DOI: 10.3389/fnut.2017.00048. ISSN 2296-861x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2017.00048/full>
- [34] FRŮHAUF, Pavel. Vlákna v dětské výživě. *Pediatric pro Praxi* [online]. 2007, č. 1, 12-16 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2007/01/02.pdf>
- [35] GROFOVOÁ, Zuzana. Vlákna. *Medicina pro praxi* [online]. 2009, č. 6(4), 206-208 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2009/04/09.pdf>
- [36] *Výživa dětí: Vlákna v dětském jídelníčku* [online]. Praha, 2008 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://vyzivadeti.cz/tiskove-centrum/tiskove-materialy/vlaknina-v-detskem-jidelnicku-13-11-2008/>
- [37] Medlicker: Inulin: prebiotikum a vlákna s významným pozitivním účinkem na zdraví [online]. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <https://cs.medlicker.com/1167-inulin>
- [38] WILSON, Bridgette a Kevin WHELAN. Prebiotic inulin-type fructans and galactooligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2017, 32, 64-68 [cit.

- 2018-02-25]. DOI: 10.1111/jgh.13700. ISSN 08159319. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jgh.13700>
- [39] *Via Naturae: Chia vláknina* [online]. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <https://www.prirodnidoplanky.eu/chia-vlaknina-200g-bio-raw/>
- [40] *Vláknina.cz: Chia semínka - zdroj vlákniny* [online]. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <http://www.vlaknina.cz/chia-seminka-zdroj-vlakniny.html>
- [41] *Bezlepkova.com: Bambusová vláknina* [online]. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <http://www.bezlepkova.com/vlakniny/bambusova-vlaknina>
- [42] *Biobooms: Bambusová vláknina* [online]. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <http://www.biobooms.cz/produkt/100-bambusova-vlaknina-150g>
- [43] *Apotek: Chlorella + Spirulina* [online]. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: [https://www.apotek.cz/chlorella-spirulina-tbl-60?gclid=EAIaIQobChMIjdW6z6632AIV0p0bCh1xtg-tEAYYASABEgIwavD\\_BwE](https://www.apotek.cz/chlorella-spirulina-tbl-60?gclid=EAIaIQobChMIjdW6z6632AIV0p0bCh1xtg-tEAYYASABEgIwavD_BwE)
- [44] *Favea: Chlorella + Spirulina* [online]. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <http://faveaplus.cz/produkt/%EF%BB%BFchlorella-spirulina/>
- [45] *Život s dietou: Přírodní sladidla - 3. díl: Agávový a jakonový sirup* [online]. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <https://www.zivotsdietou.cz/clanky/prirodni-sladidla-3-dil-agavovy-jakonovy-sirup>
- [46] 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. 2018-02-25]. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.361s. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/73/2/361s/4737561>
- [47] Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*[online]. 2017, 9(12), 1021- [cit. 2018-02-25]. DOI: 10.3390/nu9091021. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/9/1021>
- [48] MARTÍN, María José, Federico LARA-VILLOSLADA, María Adolfinia RUIZ a María Encarnación MORALES. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science*. 2015, vol. 27, s. 15-25. DOI: 10.1016/j.ifset.2014.09.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S146685641400160X>
- [49] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. 2011, vol. 1, s. 1806-1815 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002665>
- [50] ANAL, Anil Kumar a Harjinder SINGH. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science* [online]. 2007, vol. 18, issue 5, s. 240-251 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.01.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224407000350>
- [51] SATHYABAMA, S., M. RANJITH KUMAR, P. BRUNTHA DEVI, R. VIJAYABHARATHI a V. BRINDHA PRIYADHARISINI. Co-encapsulation of

- probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2014, vol. 57, issue 1, s. 419-425 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.12.024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813004957>
- [52] Biopolymers. 2002. Weinheim: Wiley-VCH, 532 s. ISBN 35-273-0226-3
- [53] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [54] LEMBRE, Pierre, Cecile LORENTZ a Patrick DI. Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World[online]. [cit. 2016-05-08]. DOI: 10.5772/51213. ISBN 10.5772/51213. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/exopolysaccharides-of-the-biofilm-matrix-a-complex-biophysical-world>
- [55] DESAI, Kashappa Goud H. a Hyun JIN PARK. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology* [online]. 2005, 23(7), 1361-1394 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1081/DRT-200063478. ISSN 0737-3937. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DRT-200063478>
- [56] DIMA, Ștefan, Cristian DIMA a Gabriela IORDĂCHESCU. Encapsulation of Functional Lipophilic Food and Drug Biocomponents. *Food Engineering Reviews* [online]. s. - [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1007/s12393-015-9115-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12393-015-9115-1>
- [57] ESTEVINHO, Berta Nogueiro, Fernando ROCHA, Lúcia SANTOS a Arminda ALVES. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2013, 31(2), 138-155 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1016/j.tifs.2013.04.001. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224413000733>
- [58] Bajerová M., Dvořáčková K., Gajdziok J., Masteiková R., Rabišková M. Metody přípravy mikročástic ve farmaceutické technologii. *Čes. slov. Farm.* 2009; 58(5/6), 191–199.
- [59] DEWETTINCK, K. a A. HUYGHEBAERT. Fluidized bed coating in food technology. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 1999, 10(4-5), 163-168 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1016/S0924-2244(99)00041-2. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224499000412>
- [60] KRASAEKOOPT, Wunwisa, Bhesh BHANDARI a Hilton DEETH. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*[online]. 2003, 13(1), 3-13 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1016/S0958-6946(02)00155-3. ISSN 09586946. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694602001553>
- [61] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [62] BÜCHI. *Návod k použití: Enkapsulátor B-395 Pro*. 2011.
- [63] BERNARD, Vladan. Průtoková cytometrie [online]. In: . [cit. 2018-04-16]. Dostupné z:

- [http://www.med.muni.cz/biofyz/files/gerontologie/prutokova\\_cytometrie\\_prezentace.pdf](http://www.med.muni.cz/biofyz/files/gerontologie/prutokova_cytometrie_prezentace.pdf)
- [64] Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2016, 795. ISSN 13835718. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571815002685>
- [65] Československý lékopis: Pharmacopoea Bohemoslovaca. 4. vyd. Praha: Avicenum, 1987
- [66] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. Laboratorní techniky biochemie. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, vi, 258 s. ISBN 80-708-0586-2
- [67] Sacharidy [online]. [cit. 2018-03-29]. Dostupné z:  
<https://web.vscht.cz/~koplikr/Sacharidy.pdf>
- [68] NAZZARO, Filomena, Florinda FRATIANNI, Raffaele COPPOLA, Alfonso SADA a Pierangelo ORLANDO. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions [online]. [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1016/j.jff.2009.02.001. ISBN 10.1016/j.jff.2009.02.001. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464609000152>
- [69] MATHEWS, Smitha, Florinda FRATIANNI, Raffaele COPPOLA, Alfonso SADA a Pierangelo ORLANDO. Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate and Gelatin and Evaluation of its Survival in Simulated Human Gastro-Intestinal Condition [online]. [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.604.245. ISBN 10.20546/ijcmas.2017.604.245. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464609000152>



## 8 SEZNAM ZKRATEK

### Použité jednotky

g – gram  
mg – miligram  
μg – mikrogram  
l – litr  
ml – mililitr  
mm – milimetr  
μm – mikrometr  
nm – nanometr  
°C – stupně Celsia  
kJ – kilojouly  
kcal – kilokalorie  
CFU – colony forming units, kolonie tvořící jednotky  
evts – events, události

### Zkratky

CaCl<sub>2</sub> – chlorid vápenatý  
NaOH – hydroxid sodný  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – kyselina sírová  
HCl – kyselina chlorovodíková  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – uhličitan sodný  
H<sub>2</sub>O – voda  
NaHCO<sub>3</sub> – hydrogenuhličitan sodný  
HPLC – high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie  
GC – gas chromatography, plynová chromatografie  
FAO – Food and Agriculture Organization, Organizace pro výživu a zemědělství  
WHO – World Health Organisation, Světová zdravotnická organizace  
SCFA – Short Chain Fatty Acid, mastné kyseliny s krátkým řetězcem  
ČR – Česká republika  
Š – Švýcarsko  
SRN – Spolková republika Německo  
USA – Spojené státy americké  
VB – Velká Británie  
SGP – Singapur  
IND – Indie  
P – Peru  
F – Francie  
S – Švýcarsko  
C<sub>a</sub> – chlorofyl A  
C<sub>b</sub> – chlorofyl B  
ND – nedetekováno