



# 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

## PROBIOTIKA A PREBIOTIKA - STUDIUM ÚČINKŮ, INTERAKCÍ A MOŽNOSTÍ KOENKAPSULACE

PROBIOTICS AND PREBIOTICS - A STUDY OF INTERACTIONS, EFFECTS AND CO-ENCAPSULATION

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Monika Vrtná

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0948/2015</b>	Akademický rok: <b>2015/2016</b>
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	<b>Bc. Monika Vrtná</b>	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	<b>prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.</b>	
Konzultanti:	Ing. Petra Matoušková, Ph.D.	

### Název diplomové práce:

Probiotika a prebiotika - studium účinků, interakcí a možností koenkapsulace

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- přehledná literární rešerše zaměřená na probiotika, prebiotika a jejich enkapsulaci
- metody kultivace probiotik za využití prebiotik jako substrátů
- koenkapsulace probiotik a prebiotik, studium stability preparátů
- stanovení životaschopnosti probiotik ve směsi s prebiotiky

### Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Monika Vrtná  
Student(ka)

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Vedoucí práce

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

V Brně, dne 31.1.2016

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty



## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce je zaměřena na enkapsulaci probiotik a testování možnosti koenkapsulace s některými typy prebiotik.

Teoretická část se zabývá probiotiky, jejich obecnou charakterizací a možnostmi využití probiotických kultur ať už v potravinářském průmyslu jako doplňky stravy nebo v kosmetickém průmyslu. Dále jsou popsány prebiotika a jejich rozdělení, proces enkapsulace a jednotlivé techniky enkapsulace. V této části jsou také popsány vybrané metody, které byly využívány k analýze částic a enkapsulovaných složek.

V experimentální části byla nejprve provedena charakterizace zvolených prebiotik, a to pomocí spektrofotometrických metod, tenkovrstevné chromatografie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Následně byla testována možnost kultivace probiotik s přídavkem prebiotika v nehydrolyzované i hydrolyzované formě. S využitím průtokového cytometru byla stanovena rovněž viabilita buněk. Na závěr byly probiotika společně s prebiotiky enkapsulovány do alginátových částic s využitím enkapsulátoru a po dobu 6 týdnů byla sledována jejich dlouhodobá stabilita v modelovém prostředí. Částice byly také vystaveny působení umělé pankreatické, žaludeční a žlučové šťávy.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

probiotika, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, prebiotika, koenkapsulace, mikročástice, optický mikroskop, průtoková cytometrie

## **ABSTRACT**

This diploma thesis is focused on encapsulation probiotics and co-encapsulation with some types of prebiotics.

In theoretical part is aimed to probiotics, their general characteristics and application of probiotics in food industry as food supplement and in cosmetics industry. There are described prebiotics and their classification, there is described principles of encapsulation and encapsulation techniques. Methods, which are used for analysis of particles and encapsulation components were introduced too.

The experimental part describes methods of prebiotics characterization by high performance liquid chromatography, thin layer chromatography and spectrophotometric methods. Cultivation of probiotics with prebiotics – hydrolyzed and non-hydrolyzed was tested. Using flow cytometry cell viability was measured too. Finally probiotics and prebiotics were encapsulated, mainly by encapsulator machine. Long-term stability of particles during 6 week storage was observed. The particles were exposed to effect of artificial intestinal, gastric and bile juices.

## **KEYWORDS**

probiotics, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, prebiotics, coencapsulation, microparticles, optical microscopy, flow cytometry

VRTNÁ, M. *Probiotika a prebiotika – studium účinků, interakcí a možností koenkapsulace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 69 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

## **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 děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **Poděkování:**

*Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, Csc. za odborné vedení a všestrannou pomoc při řešení problémů. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za cenné rady, trpělivost, ochotu a pomoc při zpracování experimentální části. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a známým, kteří mi byli velkou podporou během celého studia.*

## Obsah

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Probiotika.....	10
2.1.1	Střevní mikroflóra.....	10
2.1.2	Účinek probiotik.....	11
2.1.3	Využití probiotických kultur.....	11
2.1.4	Probiotika jako doplňky stravy.....	12
2.1.5	Aplikace probiotik v kosmetickém průmyslu.....	13
2.1.6	Zástupci.....	13
2.2	Prebiotika.....	14
2.2.1	Probiotické oligosacharidy.....	14
2.2.2	Nerozpustná vláknina.....	15
2.2.3	Rozpustná vláknina.....	16
2.3	Enkapsulace a její techniky.....	16
2.3.1	Sprejové sušení.....	18
2.3.2	Sprejové chlazení.....	19
2.3.3	Fluidní vrstva.....	19
2.3.4	Extruze.....	20
2.3.5	Lyofilizace.....	20
2.3.6	Koacervace.....	20
2.3.7	Kokrystalizace.....	21
2.3.8	Uzavření do lipozomů.....	21
2.3.9	Inkluze.....	22
2.3.10	Emulzifikace.....	22
2.3.11	Tvorba polymerních kapslí.....	22
2.4	Vnější fáze využívané pro tvorbu částic.....	24
2.4.1	Alginát.....	24
2.4.2	Chitosan.....	25
2.4.3	Škrob.....	25
2.5	Enkapsulátor.....	26
2.6	Metody využívané k analýze částic a enkapsulovaných složek.....	27
2.6.1	Průtoková cytometrie.....	27
2.6.2	Vitální test.....	28
2.6.3	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	28
2.6.4	Chromatografie na tenké vrstvě.....	29
3	CÍLE PRÁCE.....	30

4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
4.1	Použité chemikálie a přístroje.....	31
4.1.1	Chemikálie.....	31
4.1.2	Přístroje.....	31
4.2	Použité probiotické kultury a prebiotika.....	32
4.2.1	Probiotické kultury.....	32
4.2.2	Prebiotika.....	32
4.3	Hydrolyza prebiotik.....	33
4.4	Charakteristika prebiotik.....	33
4.4.1	Stanovení celkových cukrů podle Duboise.....	34
4.4.2	Stanovení redukujících cukrů metodou dle Somogyiho Nelsona.....	34
4.5	Stanovení obsahu sacharidů pomocí tenkovrstvé chromatografie.....	34
4.5.1	Příprava činidla na detekci chromatogramu.....	34
4.5.2	Příprava vyvíjející směsi.....	34
4.5.3	Příprava vzorku.....	34
4.5.4	Postup.....	34
4.6	Stanovení obsahu mono- a oligosacharidů pomocí HPLC.....	35
4.7	Kultivace mléčných bakterií.....	35
4.7.1	Kultivace probiotik na médiích s přídatkem prebiotik.....	35
4.7.2	Stanovení viability a koncentrace buněk pomocí průtokového cytometru.....	36
4.8	Příprava částic.....	36
4.9	Stanovení stability částic – mikroskopie.....	36
4.10	Stanovení stability částic v modelovém prostředí lidského organismu.....	36
4.10.1	Složení modelové pankreatické šťávy.....	37
4.10.2	Složení modelové žaludeční šťávy.....	37
4.10.3	Složení modelové žlučové šťávy.....	37
4.11	Stanovení stability částic v modelovém prostředí.....	37
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	38
5.1	Charakteristika prebiotik.....	38
5.1.1	Stanovení celkových cukrů podle Duboise.....	38
5.1.2	Stanovení redukujících cukrů dle Somogyiho Nelsona.....	38
5.2	Stanovení obsahu sacharidů pomocí tenkovrstvé chromatografie.....	39
5.2.1	Vyhodnocení tenkovrstvé chromatografie.....	41
5.3	Stanovení obsahu sacharidů pomocí HPLC.....	42
5.3.1	Stanovení na NH <sub>2</sub> koloně.....	42
5.3.2	Stanovení sacharidů na Rezex koloně.....	44
5.3.3	Vyhodnocení měření na HPLC.....	47

5.4	Kultivace mléčných bakterií.....	48
5.4.1	Kultivace probiotik na médiích s přídavkem nehydrolyzovaných prebiotik.....	49
5.4.2	Kultivace probiotik na médiích s přídavkem hydrolyzovaných prebiotik.....	50
5.4.3	Kultivace probiotik na médiích s přídavkem mléka .....	53
5.5	Koenkapsulace probiotik a prebiotik.....	53
5.5.1	Stanovení viability buněk před enkapsulací probiotik.....	53
5.6	Stanovení dlouhodobé stability .....	56
5.7	Stanovení stability částic v modelovém prostředí lidského organismu.....	60
5.7.1	Stanovení stability částic s prebiotiky v žaludeční šťávě.....	61
5.7.2	Stanovení stability částic s prebiotiky v pankreatické šťávě.....	61
5.7.3	Stanovení stability částic s prebiotiky ve žlučové šťávě.....	61
6	ZÁVĚR .....	63
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	65
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	69

# 1 ÚVOD

V dnešní době dochází v potravinářském průmyslu k rozvoji nových technologií s cílem vylepšit kvalitu potravin a potravinových doplňků. Intenzivně se rozvíjí i využití metody enkapsulace, která umožňuje zlepšovat fyzikálně-chemické vlastnosti a stabilitu přírodních látek, čímž se pak rozšiřuje jejich využití a aplikace. Pokud jsou některé funkční skupiny citlivé na vnější prostředí nebo na proces zpracování, pokud chceme omezit reaktivitu látek nebo pokud chceme usnadnit či řídit jejich dávkování, je nutné vytvořit takový obal, který by tyto skupiny ochránil a nepoškodil. Proto je vhodné tyto látky enkapsulovat, čímž můžeme navýšit kvalitu a nutriční hodnoty potravin či potravinových doplňků [1].

Tato diplomová práce se zabývá především koenkapsulací probiotik a prebiotik. Přírodní látky a jejich extrakty jsou stejně jako probiotika známá a používaná pro svůj příznivý účinek pro lidský organismus. Probiotické kultury je vhodné užívat, pokud došlo k oslabení nebo k poškození střevní mikroflóry. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které se vyskytují v tlustém střevě zdravého člověka, napomáhají obnově správné střevní mikroflóry a znesnadňují jiným škodlivým mikroorganismům, které se ve střevech vyskytují, aby se dále rozmnožovaly. Často je doporučeno kombinovat probiotika zároveň s prebiotiky. Prebiotika jsou nestravitelné látky, které projdou žaludkem a tenkým střevem beze změny, ale v tlustém střevě tvoří vhodné prostředí pro růst a aktivitu probiotických kultur.

Mezi další rozšířené aplikace patří aplikace do kosmetického průmyslu, kde se probiotika využívají jako antimikrobiální ochrana, hojivé přípravky nebo jako nosiče aktivních látek, které umožňují řízené uvolňování.

Cílem této práce je najít vhodný typ částic pro koenkapsulace probiotika a prebiotika, který by byl stabilní a ve kterém by probiotika vydržela co nejdéle dobu živá. Jejich následné použití je předpokládáno do potravin a do kosmetických přípravků, čímž by vznikly produkty s vysokou přidanou hodnotou a lepší funkčností.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Probiotika

Pojem probiotikum je odvozen z řeckých slov „pro“ a „bios“, což v překladu znamená „pro život“. Opakem těchto slov je pojem „antibiotikum“, tedy „proti životu“ [2].

Probiotika jsou monokultury nebo směsné kultury živých mikroorganismů, které mají příznivý vliv na zdraví člověka nebo zvířete. Do těla se dostávají v potravě nebo v potravinových doplňcích a přirozeně osídlují trávicí soustavu. Pokud jsou podávána v adekvátním množství, tak mají pozitivní zdravotní účinek na svého hostitele. Podporují selektivně růst nebo aktivitu jednoho druhu bakterií nebo omezeného množství střevních bakterií a tím pozitivně ovlivňují složení střevní mikroflóry tlustého střeva. Forma, ve které je probiotikum aplikováno do trávicího ústrojí, by měla obsahovat dostatečné množství životaschopných bakterií, které mají schopnost přežít v trávicím ústrojí a které jsou metabolicky aktivní [3].

Pro zařazení některých druhů bakterií mezi probiotika je nutné splňovat několik požadavků. Bakteriální kmeny musí mít prokazatelně pozitivní vliv na zdraví hostitele a musí být zdravotně nezávadné, nesmí být toxické ani patogenní. Musí být odolné k působení kyselosti žaludeční šťávy a žluči a jsou aplikované v živém stavu. Mezi nejčastější probiotika se řadí laktobacily (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*), bifidobakterie (*Bifidobacterium bifidum*) či grampozitivní koky (*Enterococcus faecium*). Mezi probiotické organismy se kromě některých druhů bakterií mohou zařadit i některé kvasinkové mikroorganismy (*Saccharomyces boulardii*) nebo plísně (*Aspergillus oryzae*) [3].

#### 2.1.1 Střevní mikroflóra

Mikroorganismy se dostávají do trávicího traktu běžně společně s potravou, proto je ve střevním traktu lidí i zvířat zastoupena celá řada těchto mikroorganismů. Přehled nejčastěji vyskytovaných lze vidět v Tabulce 1. Mikroorganismy žijí na mukózním povrchu epitelu komenzálním způsobem, což je způsob neškodného příživnictví. Celkově se odhaduje až 500 druhů bakterií, které mají za úkol trávit potravu, bránit vzniku infekcí a onemocnění, regulovat alergické reakce a produkovat vitamíny skupiny B [4].

Tabulka 1: Složení mikroflóry lidského GIT [5]

BAKTERIÁLNÍ KMENY	ŽALUDEK	TENKÉ STŘEVO (JEJUNNUM)	TENKÉ STŘEVO (ILEUM)	TLUSTÉ STŘEVO (COLON)
<b>AEROBNÍ BAKTERIE</b>	<b>CFU/g</b>	<b>CFU/g</b>	<b>CFU/g</b>	<b>CFU/g</b>
Enterobacteriaceae	0-10 <sup>2</sup>	0-10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>10</sup>
Streptococi	0-10 <sup>3</sup>	0-10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>10</sup>
Stafylococi	0-10 <sup>2</sup>	0-10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>9</sup>
Lactobacilli	0-10 <sup>3</sup>	0-10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>10</sup>
Kvasinky	0-10 <sup>3</sup>	0-10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>
<b>ANAEROBNÍ BAKTERIE</b>				
Bacteroidy	vzácně	0-10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup>
Bifidobacterie	vzácně	0-10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>9</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>11</sup>
Peptostreptococi	vzácně	0-10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>10</sup> -10 <sup>72</sup>
Clostridie	vzácně	vzácně	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>11</sup>
<b>CELKOVÝ POČET</b>	0-10 <sup>3</sup>	0-10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup>



V trávicím traktu musí mikroorganismy překonat kyselé prostředí žaludku, poté se za ním usídlují v postupně se zvyšujícím množství od proximální k distální části trávicího traktu a vytváří střevní mikroflóru. Ta se může měnit ať už s přibývajícím věkem, tak její složení významně ovlivňuje výživa. Kvantitativně tvoří střevní mikroflóra několikanásobně větší počet buněk, než je vlastních buněk organismu a metabolické procesy mikroorganismů střevní mikroflóry zasahují do metabolických procesů lidského organismu. Ovlivňují procesy trávení, zasahují do metabolismu a využitelnosti různých látek, které přicházejí do trávicího traktu s potravou, podílí se na reparaci nebo naopak na poškození střevní bariéry a významně ovlivňují imunitní systém člověka. Střevní mikroflóra je udržována v určité rovnováze mikroorganismů, které jsou organismu potenciálně škodlivé nebo prospěšné. Ve stáří potenciálně škodlivých mikroorganismů přibývá. Střevní mikroflóra se výrazně mění i při výskytu některých onemocnění a při nadměrné konzumaci antibiotik a laxativ. Například při průjmu je snižován počet probiotických bakterií a naopak zvyšován počet fakultativních anaerobních bakterií [6].

### 2.1.2 Účinek probiotik

Pozitivní účinek probiotických organismů v mikrobiálním ekosystému je vysvětlován tím, že probiotika iniciují aktivaci určitých genů lokalizovaných v buňkách a tak příznivě ovlivňují široké spektrum střevních funkcí. Tento účinek je však jen dočasný a většinou je detekovatelný jen po dobu přijímání potravin s probiotiky. Současné výzkumy směřují ke studiu zdravotního přínosu, ke kterému patří nejen obrana proti infekcím, ale dokonce i ochrana proti rozvoji rakoviny. Probiotické bakterie totiž snižují hodnotu pH ve střevech a tím je snížena i aktivita enzymů, které jsou spojené s rozvojem rakoviny tlustého střeva. Probiotika také snižují aktivitu prokarcinogenních enzymů  $\beta$ -glukuronidázy, azoreduktázy a nitroreduktázy [6, 7].

K dosažení potřebné koncentrace probiotických bakterií ve střevě (v tenkém střevě by mělo být množství vyšší než  $10^6$  g, v tlustém střevě by mělo být minimální množství  $10^8$  g) je nutné, aby densita těchto bakterií v konzumované potravíně nebo doplňku stravy byla  $10^{10}$ . Ovšem pouhé přežití v gastrointestinálním traktu nezaručuje vznik prospěšných účinků. Probiotické bakterie musí být odolné k působení žaludeční kyselosti (přímo vlastnost kmenů nebo způsob podání například jako enkapsulované částice), následně jsou vystaveny působení žlučových kyselin a pankreatických šťáv [8].

Probiotika jsou základní složkou funkčních potravin a vyskytují se zejména v mléčných výrobcích. Po enkapsulaci se účinek probiotik v těchto výrobcích zvyšuje. Enkapsulace umožňuje pozvolné uvolňování buněk v potravíně, zvyšuje viabilitu buněk, chrání probiotika před nepříznivým vlivem okolního prostředí při zpracování a při skladování potravin [8].

### 2.1.3 Využití probiotických kultur

Probiotika jsou aplikována do trávicího ústrojí ve formě, která obsahuje dostatečné množství životaschopných bakterií. Bakterie musí mít schopnost přežít v trávicím ústrojí a musí být metabolicky aktivní. Probiotika mohou být využita pro prevenci a léčbu onemocnění zažívacího ústrojí, průjemových onemocnění, redukci hladiny sérového cholesterolu, pro prevenci kolorektální rakoviny a rakoviny močového měchýře [3].

Probiotické mikroorganismy se používají nejčastěji jako doplňky stravy nebo jako součást specifických mléčných výrobků, v poslední době nacházejí uplatnění i jako součást kojenecké a dětské výživy. Do různých doplňků stravy se přidávají většinou lyofilizované kultury, které se skládají z jednoho nebo z více druhů probiotických bakterií. Tyto kultury jsou samostatně nebo s dalšími látkami vyráběny ve formě kapslí, tobolek, dražé či tablet. Probiotika se nejčastěji přidávají do mléčných a zakysaných výrobků (jogurtové nápoje, krémy, dezerty),

ale některé bifidobakterie je možné najít i v trvanlivých, tepelně neupravených masných výrobcích [8].

#### 2.1.4 Probiotika jako doplňky stravy

Doplňky stravy jsou registrovány v databázi RoHy (Registr hlavního hygienika) na základě posouzení bezpečnosti Státním zdravotním ústavem nebo na základě notifikace těchto subjektů MZd ČR (Ministerstvo zdravotnictví). V současné době je registrováno více než 100 druhů doplňků stravy, které obsahují probiotika a prebiotika a z toho přibližně 40 % obsahuje obě skupiny současně. Obsah mikroorganismů v jedné tobolce/kapsli se označuje obvykle jako  $10^n$ . Nejčastěji se v doplňcích stravy vyskytuje *Lactobacillus acidophilus* (73 %), *Bifidobacterium bifidum* (40 %), *Lactobacillus lactis* (15 %), *Lactobacillus casei* (15 %), *Lactobacillus plantarum* (15 %). Další bakterie a kvasinky jsou obsaženy v méně než 10 % výrobcích. V mnoha komerčních výrobních, jako lze vidět například na Obrázku 1 jsou obsaženy jak probiotika, tak prebiotika. V tomto případě je probiotikum *Lactobacillus* kombinováno s prebiotikem inulinem [8].



Obrázek 1: Komerční produkt probiotik s prebiotikem [9]

U malého počtu doplňků stravy s probiotiky bylo provedeno namátkové ověření množství živých laktobacilů a zjištěné výsledky byly porovnány s deklarovaným množstvím a dobou expirace od výrobce. Z výsledků výzkumu, které jsou uvedeny v Tabulce 2 lze vyčíst, že životaschopnost bakterií v běžných formách doplňků stravy během deklarované doby minimální trvanlivosti poměrně rychle klesá na hodnoty, kdy již požadované účinky nelze předpokládat [8].

Tabulka 2: Ověření životaschopnosti probiotických mikroorganismů v doplňcích stravy [8]

Počet vzorků	Deklarované množství	Zjištěné množství	Expirace
3	1 až $4 \times 10^9$	<50	prošla o 18 až 6 měsíců
4	$5 \times 10^9$ až $1 \times 10^{10}$	<50	zbývá 4 až 8 měsíců
1	$1 \times 10^{10}$	$2 \times 10^2$	zbývá 8 měsíců
1	$3 \times 10^9$	$3 \times 10^7$	zbývá 10 měsíců
4	$3 \times 10^9$ až $1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^9$ až $2 \times 10^9$	zbývá 15 až 18 měsíců

### 2.1.5 Aplikace probiotik v kosmetickém průmyslu

Probiotika jsou využívány i v kosmetickém průmyslu z důvodu antimikrobiální ochrany kůže. Probiotická kultura také pomáhá k tvorbě kolagenu, zvyšuje vstřebávání kyslíku buňkami a tím zlepšuje buněčné dýchání. Díky tomu buňky zvyšují své energetické rezervy, které mohou následně využít k vyrovnání se s agresivním vnějším prostředím. Výsledkem celého tohoto procesu je, že se zpomaluje stárnutí pleti a pokožky. Probiotika také pomáhají zlepšovat hydrataci pleti, proto jsou probiotické kultury nejvhodnější pro pokožku, která je vysušená nebo pro extrémně suchou pleť [10].

### 2.1.6 Zástupci

Mezi nejčastěji využívané kmeny bakterií patří laktobacily a bifidobakterie.

#### 2.1.6.1 Rod *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou bakterie mléčného kvašení, jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní až mikroaerofilní. Tvar závisí na stáří kultury, složení média a obsahu kyslíku, většinou jde o rovné, různě dlouhé a ohnuté tyčinky. Řada z nich je součástí přirozené mikroflóry člověka. Většina druhů roste při teplotě do 40°C (mezofily), některým druhům vyhovuje teplota do 55°C (mírní termofily), některé druhy ale dokáží růst i při teplotách blízkých se nule (*Lactobacillus plantarum*). Produktem fermentace je v největším množství kyselina mléčná, dále pak kyselina octová, ethanol a oxid uhličitý. Těmito produkty jsou schopny snížit pH v prostředí až pod hodnotu 4,0 a spolu s nedisociovanými kyselinami pak působí proti výskytu ostatních mikroorganismů (kromě kvasinek a jiných bakterií mléčného kvašení). Díky tomu se využívají v potravinářském průmyslu při výrobě kysaného zelí, okurek, piva či vína. Rod *Lactobacillus* je schopný produkce mnoha látek včetně látek s antimikrobiálním účinkem [4, 11].

Laktobacily jsou velice náročné na živiny v médiu. Pro fermentaci vyžadují jako zdroj energie a uhlíků různé sacharidy (glukóza, laktóza), dále pak aminokyseliny, nukleové kyseliny a vitaminy skupiny B-komplex. Pro kultivaci jsou vhodná média s hodnotou pH 5,5-6,2, při produkci kyselin dojde k poklesu pH a růst se zastavuje u hodnoty pH 4,0-3,6. Na agarových plotnách jsou kolonie hladké, lesklé, neprůhledné a bezbarvé. Mají pravidelný okraj a jejich průměr je 2-5 mm. V obvyklých médiích netvoří zápach [12].

Mezi nejvýznamnější zástupce se řadí *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* nebo *Lactobacillus brevis* [4].

*Lactobacillus acidophilus* je tyčinková bakterie, jejíž šířka je 0,6-0,9 µm a délka 1,5-6 µm. Může se vyskytovat jednotlivě, ve dvojicích nebo tvoří krátké řetězky. Optimální teplota pro její růst je 39°C. Tyto kmeny mají díky svým vhodným vlastnostem využití v mlékárenství při výrobě acidofilního mléka, podmáslí a smetany, dále ve zdravotnictví, kdy se pěstují speciální kmeny odolné vůči některým druhům antibiotik. Tento druh bakterie se řadí do skupiny probiotik, které mají dieteticko-léčebné účinky a projevují se v potlačování nežádoucích mikroflóry trávicího systému [4].

#### 2.1.6.2 Rod *Bifidobacter*

Bifidobakterie jsou grampozitivní, chemoorganotrofní, nesporující, anaerobní a nepohyblivé bakterie ve tvaru tyčinek. Vyskytují se jak jednotlivě, tak v řetězcích nebo ve hvězdicovitém uspořádání. Jsou součástí přirozené mikroflóry trávicího traktu člověka, ale také jsou součástí mnoha fermentovaných mléčných výrobků. Optimální teplota pro jejich

růst je 28°C – 41°C, optimální hodnota pH je 6,5 - 7. Kyselé prostředí jim úplně nevyhovuje. Kolonie jsou hladké, vypouklé s hladkými okraji, lesklé a měkké konzistence. Bifidobakterie jsou heterofermentativní a fermentují sacharidy na kyselinu mléčnou a octovou v poměru 2:3. V menším množství vznikají i další produkty, například kyselina mravenčí, kyselina jantarová a ethanol. Vzhledem k tomu, že v nejvyšším podílu vzniká kyselina octová, která je účinnější než kyselina mléčná, dokážou výrazněji inhibovat nežádoucí gramnegativní bakterie. [12,20]

Jejich růst je podporován především bifidogenními faktory. Jedná se o sloučeniny laktulózy, N-acethyl-D-glukosaminu nebo fruktooligosacharidy. Některé kmeny se mohou využívat v mlékárenském průmyslu, stejně jako *Laktobacillus*, kde společně s dalšími bakteriemi mléčného kvašení slouží k výrobě fermentovaných mléčných výrobků [13].

V dnešní době je známo 38 bakteriálních druhů, z toho se šest využívá pro své probiotické vlastnosti. Mezi tyto druhy se řadí *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* a *Bifidobacterium thermophilum* [2].

*Bifidobacterium breve* jsou anaerobní bakterie, jejich tvarem jsou tyčinky. U dětí, které byly kojené, bylo zjištěno, že většinu bakterií tlustého střeva tvoří právě tento druh. S tím, jak člověk stárne, tyto bakterie ubývají. Úkolem *Bifidobacterium breve* v zažívacím traktu je ničit nežádoucí mikroflóru ve střevě [12].

Aby se probiotické kultury více a rychleji množily a aby přežily delší dobu, je nutný dostatečný přísun živin. V mléčných produktech to je laktóza, případně další zdroje, kterými jsou například prebiotika, které mají dále i pozitivní vliv na hostitele.

## 2.2 Prebiotika

Prebiotikum je nestravitelná složka potravy, která příznivě ovlivňuje růst a činnost bakterií v tlustém střevě. Na rozdíl od probiotik nejsou prebiotika živé látky [14].

Je popsáno mnoho pozitivních účinků prebiotik. Například mají důležitou roli ve vztahu se střevními bakteriemi, pro něž jsou velice prospěšné. Díky nim mohou probiotické bakterie v trávicím ústrojí růst a množit se. Naopak omezují růst bakterií, které produkují toxické sloučeniny amoniaku, dusíku a síry. Prebiotika mají také schopnost vázat některé vitamíny, stopové prvky a toxiny, takže nejenže pomáhají vstřebat důležité a zdraví prospěšné látky, ale také chrání střevní sliznici a v konečném důsledku chrání i celý lidský organismus. Dále se podílí na zpomalení vstřebávání jednoduchých sacharidů, podporují imunitní systém, působí protirakovinně a brání růstu choroboplodných bakterií (*Salmonela*, *Clostridium*, *Escherichia coli*...) [15].

Aby se potraviny mohly označovat jako prebiotika, musí splňovat tři požadavky: nesmí být hydrolyzovány ani absorbovány v horní části gastrointestinálního traktu, musí být selektivním substrátem pro jeden nebo více druhů příznivé mikroflóry v našich střevech (stimulace růstu probiotických bakterií) a musí mít schopnost měnit složení střevní mikroflóry ve prospěch žádoucích kultur [16].

### 2.2.1 Probiotické oligosacharidy

Nejčastěji se mezi prebiotika řadí nestravitelné nebo těžko stravitelné oligosacharidy, mezi něž se řadí fruktooligosacharidy, xylooligosacharidy či mannanoligosacharidy. Většina z nich se získává extrakcí z rostlin hydrolýzou polysacharidů nebo transgalaktosylačními reakcemi, mannanoligosacharidy se získávají z buněčných stěn kvasinek [14].

### 2.2.1.1 Inulin

Inulin se řadí mezi přírodní rozpustnou vlákninu. Je to jemný bílý prášek, který je neutrální chuti a bez zápachu. Po chemické stránce se jedná o polymer složený z molekul fruktózy spojených navzájem  $\beta$  (1,2) glykosidickou vazbou. Množství jednotek se pohybuje od 2 do 140, nejčastěji jich je 20-30. U většiny rostlin je zásobní polysacharid škrob, ale přibližně u 30 000 druhů rostlin přebírá tuto funkci místo škrobu inulin. Poprvé byl izolován v roce 1804 z omanu pravého. Největší množství inulinu se nachází v cibulovinách, luštěninách, kořenech čekanky a v artyčoku, v menším či stopovém množství se pak nachází téměř v každé konzumované rostlině [17].

Inulin prochází trávicím ústrojím beze změny, odolává žaludečním kyselinám i trávicím enzymům a prakticky se dostává bez povšimnutí až do tlustého střeva. V tlustém střevě se začíná inulin štěpit a zastává funkci zdroje živin pro některé mikroorganismy. Vytváří ideální životní podmínky pro probiotické bakterie, podporuje jejich růst a dělení a nepřímo tak brání nežádoucímu množení ostatních nebezpečných infekčních bakterií. Účinek, který způsobuje růst přátelských střevních bakterií, se nazývá probiotické působení. Díky němu se následně zlepšuje činnost střeva, posiluje se imunitní systém a chrání se naše střeva před zánětlivým či nádorovým onemocněním. Zvýšený příjem inulinu upravuje hladinu cukru a snižuje vysoký krevní tlak, proto je vhodný pro diabetiky jako náhražka za glukózu. Mikroflóra trávicího traktu se také podílí na tvorbě vitamínu B12, K1 a K2 a protože inulin stimuluje růst žádoucí mikroflóry, má také vliv na množství těchto vitamínů [18].

V potravinářství je inulin využíván, protože snižuje celkovou energetickou hodnotu výrobku, navyšuje rozpustnou vlákninu a zlepšuje texturu výrobku. Přidává se například do masných a mléčných výrobků, cukrovinek, ovocných šťáv, nealkoholických nápojů nebo se uplatňuje při výrobě pečiva a chleba. V mléčných výrobcích se inulin využívá jako náhrada cukru nebo tuku a dochází tak ke snížení energetické hodnoty potravin. Podle vědeckých pokusů bylo dokázáno, že přidavek inulinu do fermentovaných mléčných výrobků zlepšuje využitelnost vápníku v těle. Dokazuje to koncentrace krátkých řetězců karboxylových kyselin, které vznikají v důsledku štěpení inulinu bakteriemi a které usnadňují vstřebávání minerálních látek v tlustém střevě [17].

## 2.2.2 Nerozpustná vláknina

Nerozpustná vláknina je hmota, která je nerozpustná ve vodě, není fermentovaná v trávicím ústrojí člověka, v žaludku navozuje pocit sytosti a ve střevech zvyšuje objem hmoty. Nerozpustná vláknina tvoří 75 % vlákniny v potravinách [19].

### 2.2.2.1 Konopná vláknina

Konopná vláknina je získávána lisováním konopných semínek, kdy vzniknout tzv. konopné koláče (výlisky). Při přípravě se sice většina konopného oleje vylisuje, ale konopná vláknina je i přesto bohatá na nasycené mastné kyseliny. Tato vláknina působí až ve střevech, kde podporuje střeva k pravidelnému vyprazdňování, podporuje vylučování toxinů z těla, protože na sebe váže všechny nežádoucí látky, které jsou zachyceny na střevních sliznicích. Účinně také likviduje škodlivé metabolity, které vznikají při trávení a zabraňuje množení patogenních mikroorganismů [20].

### 2.2.3 Rozpustná vláknina

Rozpustná vláknina má schopnost vstřebávat vodu, velmi snadno bobtná a po podání mnohonásobně zvětšuje svůj objem. V tlustém střevě je střevními bakteriemi fermentována [19].

#### 2.2.3.1 Jablečná vláknina

Jablečná vláknina je měkká (rozpustná) vláknina, často se označuje jako pektin. Jablečná vláknina má výrazně nasládlou chuť i vůni, je ideální do jogurtů, „smoothie“ nebo müsli. Vyrábí se ze slupky jablek, která se nejdříve usuší a pak namele na jemný prášek. Celkově přispívá k čištění střev, k obnovení a posílení zdravé střevní mikroflóry, čímž zlepšuje a zpomaluje trávení, stabilizuje hladinu krevní glukózy, snižuje hladinu cholesterolu a zvětšuje objem stravy v žaludku, díky čemuž je navozen pocit sytosti. Její pravidelné užívání podporuje snižování hmotnosti při redukčních dietách, jelikož pomáhá štěpit tuky a podporuje látkovou výměnu [21].

#### 2.2.3.2 Psyllium

Psyllium je vláknina, což je část rostlinné potravy, kterou organismus nedokáže vstřebat nebo strávit. Vláknina je nestravitelná na rozdíl od tuků, bílkovin či sacharidů, proto může ve více či méně neporušeném stavu přecházet celým trávicím traktem, přes žaludek, tenké střevo a tlusté střevo, až se nakonec vyloučí z těla ven. Psyllium tak pomáhá průchodu zkonsumované stravy přes trávicí trakt [22].

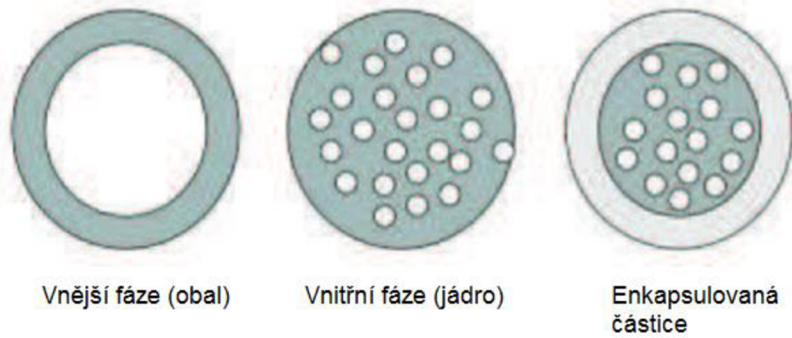
Psyllium obsahuje vlákninu, která je rozpustná ve vodě. Při kontaktu s vodou získá vláknina gelovou konzistenci, což může být účinným prostředkem ke snížení obsahu cholesterolu v krvi a snižování hladiny cukru v krvi [22].

Tato vláknina se získává z obalů semen jitrocele indického, která obsahují velmi mnoho vlákniny. Ta se ve střevech po zkonsumování dokáže zvětšit až na několiknásobek svého objemu jako zátka z psylliového gelu, prochází tlustým střevem a vyčistí jej. Během trávení do sebe psyllium vstřebá část toxických látek a odstraňuje usazeniny, může také napomáhat při snižování hmotnosti, detoxikuje organismus a zlepšuje celkový zdravotní stav. Při pravidelné konzumaci získá organismus více energie, zlepší se vstřebávání různých živin, zbaví se nepříjemných plynů a toxických látek. Podle nejnovějších lékařských výzkumů by měla vláknina při zvýšeném příjmu snižovat riziko vzniku rakoviny tlustého střeva [23].

## 2.3 Enkapsulace a její techniky

Proces enkapsulace začal být využíván od roku 1960 v biotechnologiích. Jedná se o metodu, při které dochází ke vzniku částic o průměru několika nanometrů až milimetrů. Ve většině technologií je využíván podobný princip a to vytvoření kapiček aktivní látky, které jsou následně obklopeny nosičem, dojde tak k zachycení jedné látky uvnitř druhé látky. Vzniklá částice se skládá ze dvou částí – z vnější a z vnitřní fáze. Vnější fáze je vytvořená z materiálu, který umožní zapouzdření, označuje se jako nosič, kapsle, povlak, matrice či membrána. Materiály, které se využívají pro vznik tohoto ochranného pláště, musí být schopné vytvořit bariéru mezi vnitřní fází a okolím, měly by být potravinářské kvality a biologicky odbouratelné. Nejčastěji se používají nejrůznější polysacharidy, lipidy a proteiny. Látka, která je enkapsulovaná uvnitř je nazývána jako vnitřní fáze, aktivní látka, jádro nebo výplň. Tuto fázi může tvořit kapalina, plyn i pevná látka, nejčastěji to jsou lipidy a peptidy [24].





Obrázek 2: Možnosti enkapsulace [25]

Enkapsulace se v potravinářství začala využívat především k přenosu bioaktivních molekul (minerály, antioxidanty, mastné kyseliny nebo vitamíny) a má mnoho výhod. Poskytuje bariéru mezi citlivými bioaktivními látkami a okolním prostředím, může zamaskovat nepříjemné pocity při jídle u potravin, které mají hořkou chuť či nepříjemnou vůni, stabilizuje složky potravin, zlepšuje stabilitu finálních výrobků, zabraňuje možným reakcím s jinými komponenty v potravinářských produktech jako je voda a kyslík a může být využita po imobilizaci buněk nebo enzymů například při fermentaci. Proces enkapsulace může probíhat několika různými způsoby. Mezi nejčastěji využívané techniky patří sprejové chlazení a sušení, emulgace, lyofilizace, koacervace, kokystalizace, extruze a inkluze [24, 26].

Enkapsulační technika	Schéma částic
Sprejové sušení	
Lyofilizace	
Emulzifikace	
Lipozomy	
Inkluze	

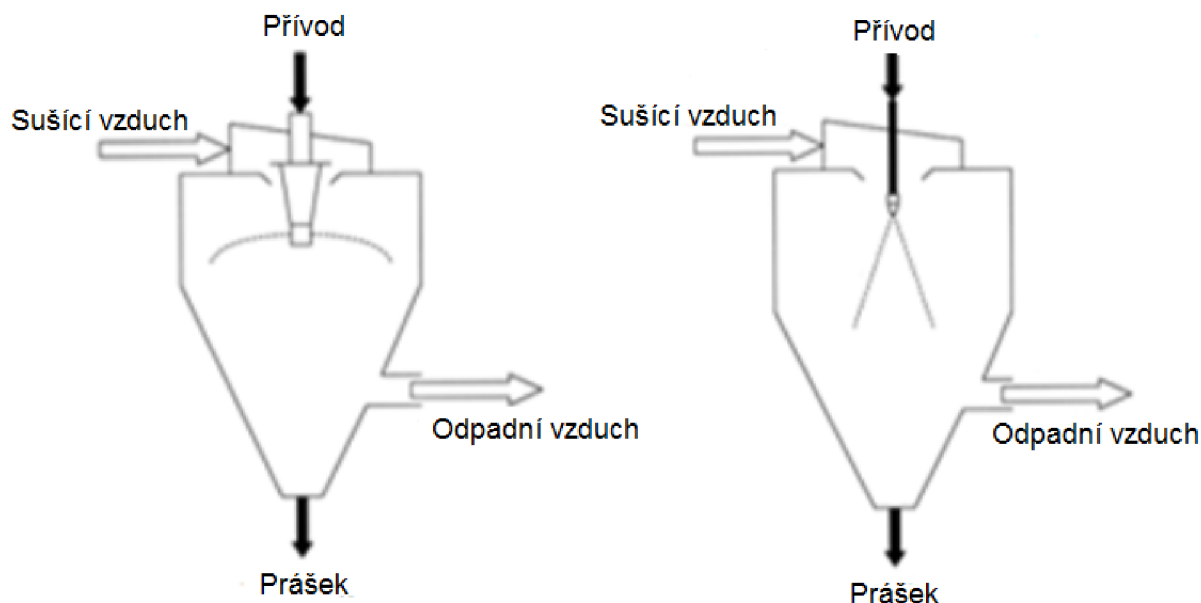
Obrázek 3: Přehled nejčastěji používaných enkapsulačních technik [27]

### 2.3.1 Sprejové sušení

Sprejové sušení je nejstarší enkapsulační metoda, v potravinářském průmyslu se využívá už od padesátých let minulého století. Zároveň se jedná i o metodu nejrozšířenější, je jí připravováno 80-90 % částic v potravinářství. Vzniklé částice jsou v dobré kvalitě, jejich velikost je menší než 40  $\mu\text{m}$ . Velikost částic závisí na povrchovém napětí a viskozitě kapaliny, na rychlosti sprejování a na teplotě. Tato technika je vhodná pro kontinuální výrobu suchých pevných látek, ať už prášků, granulátu nebo aglomerátu, vytvořených z kapalných surovin, jako jsou například roztoky a emulze. Nejdříve se tato metoda využívala pro výrobu aromatických olejů, které měly určitou ochranu proti degradaci, nyní se běžně využívá v potravinářském průmyslu pro přípravu stabilních přídatných látek a příchutí [26, 28].

Aktivní látky jsou rozpuštěny nebo dispergovány do roztoku s obalovým materiálem. Obalový materiál musí být rozpustný ve vodě, může to být arabská guma, maltodextriny, modifikovaný škrob a jejich směsi. Jako obalový materiál mohou být použity i polysacharidy či proteiny, ale jejich použití je dražší z důvodu jejich nízké rozpustnosti ve vodě. K samotné enkapsulaci dochází homogenizací aktivní látky s obalovým materiálem. Pomocí vysokotlakých trysek je následně směs pomocí rotačního rozprašovače sprejována do prostoru sušárny. Ve sprejové sušárně může probíhat buď rotační rozprašování, nebo rozprašování vysokotlakými tryskami. Během sušení dochází k tvorbě filmu na povrchu kapky, voda se vypařuje, koncentrace látky v kapce stoupá, až nakonec dojde ke vzniku suché částice. Dochází ke shromažďování částic na dně sušárny, kdy mohou být mikrokapsle posbírány [26].

Sprejové sušení se využívá v průmyslovém měřítku i pro enkapsulaci probiotických kultur. Buňky jsou smíchány s polymerním roztokem, jsou unášeny do horkého vzduchu v horké komoře, kde jsou prudce vysušeny. Mikrokapsle jsou ve formě suchého prášku [26, 28].



Obrázek 4: Schéma sprejové sušárny – rotační rozprašování a rozprašování vysokotlakými tryskami [29]



### 2.3.2 Sprejové chlazení

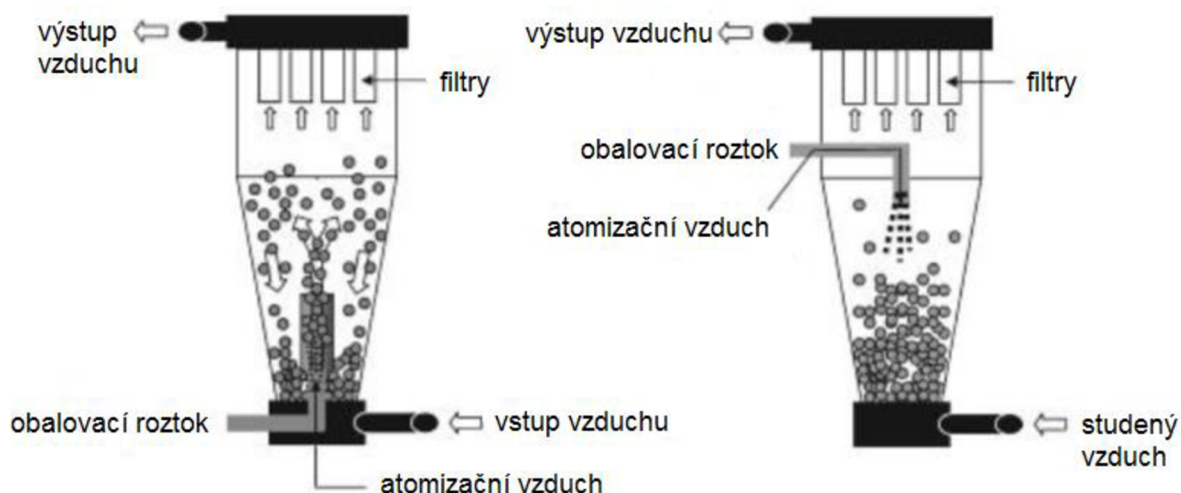
Tato metoda se využívá pro enkapsulaci aromat, enzymů, přípravků do sušených polévek a do pekařských produktů. Je velice podobná sprejovému sušení, ale při nižších teplotách a použití studeného vzduchu nedochází k odpařování vody ze vzorku. Směs aktivní látky a obalového materiálu je vstříkována do chlazeného prostoru v chladicí komoře, což způsobí ztuhnutí stěny kolem jádra. Aktivní látka může být rozpuštěna v lipidech, může být přítomná jako suchá částice nebo ve vodné emulzi. Jako obalový materiál se obvykle využívá nějaká forma rostlinného oleje nebo jeho derivátů, tuky nebo glyceroly. Takto vzniklé mikrokapsle mají lipidový povlak a jsou nerozpustné ve vodě, tudíž jsou vhodné pro enkapsulaci látek, které jsou ve vodě rozpustné (minerály, enzymy, příchutě, vitamíny rozpustné ve vodě) [26].

Tato technika je vhodná i pro tvorbu částic s řízeným uvolňováním, protože při sprejovém chlazení je možné si zvolit bod tání částic [30].

### 2.3.3 Fluidní vrstva

Mezi výhody kapslí, které jsou vytvořeny touto technikou, patří zvyšování životnosti aktivní látky, maskování chuti, řízené uvolňování, stabilita, zlepšení chuti a barvy a snadná manipulace. Aktivní látka je suspendována v komoře s řízenou teplotou a vlhkostí a za vysoké teploty dochází k atomizaci vnější fáze. Tím dochází k obklopení aktivní látky vnější fází a k vytvoření částic. Jako obalový materiál se využívají všechny materiály, které není nutné rozpouštět pro atomizaci, nejčastěji se používají deriváty celulózy, dextringy, lipidy, proteinové deriváty nebo deriváty škrobu. Fluidní vrstva je použitelná také pro tavné povlaky, jako je hydrogenovaný rostlinný olej, mastné kyseliny, emulgátory nebo vosky. Tato metoda je vhodná pro částice, které mají průměr 100  $\mu\text{m}$  a více [26].

Původně byla tato metoda vyvinuta pro farmaceutický průmysl, v dnešní době je čím dál tím více využívána v potravinářském průmyslu k doladění účinku funkčních složek a přísad. Fluidní vrstva se používá například k enkapsulaci kyseliny mléčné, kyseliny octové, kyseliny sorbové, vitamínů, k ochraně železa a k enkapsulaci hydrogenuhličitanu sodného a dalších solí, což se uplatňuje v pekárenském a masném průmyslu [31].

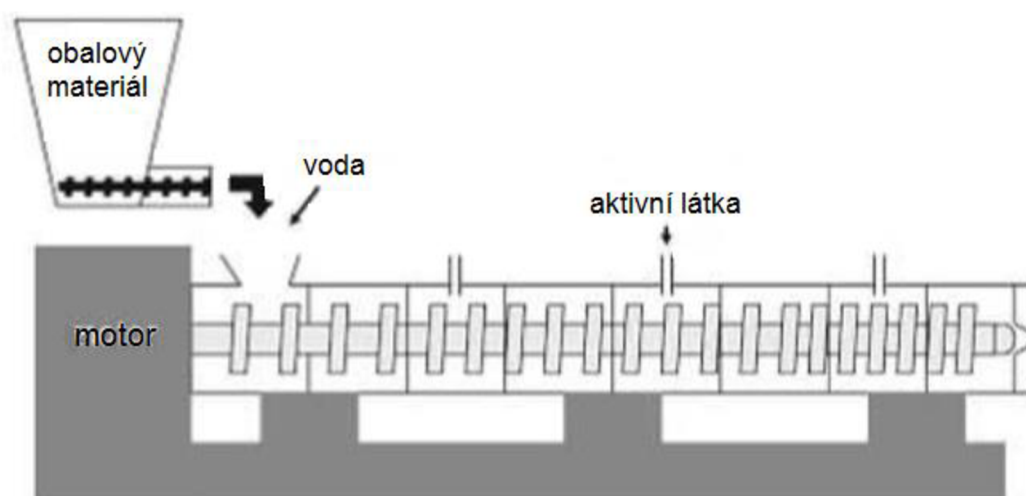


Obrázek 5: Schéma fluidního lože [32]

### 2.3.4 Extruze

Tavenina, která je složená ze sacharózy, maltodextrinu, glukózového sirupu nebo polyolů je protlačována přes jeden nebo přes více otvorů a poté dochází ke zchlazení chladným prostředím, případně dehydratací rozpouštědlem. Jako rozpouštědlo se používá isopropanol a tekutý dusík. Obalový materiál ztvrdne při kontaktu s rozpouštědlem a tím dochází k enkapsulaci aktivní látky. Vytvořené částice jsou ve vodě rozpustné a jejich velikost je od 200 do 2000  $\mu\text{m}$ . Výhodou této metody je, že enkapsulovaný materiál je zcela obklopen materiálem tvořícím stěny kapsle. Částice jsou tak velmi odolné a stabilní a často se využívají k enkapsulaci látek, které podléhají oxidaci nebo látek s pozvolným uvolňováním [24].

Extruze se využívá i pro enkapsulaci mikrobiálních buněk, kdy se polymerní roztok smíchá s mikrobiální kulturou a následně se vytlačuje tryskou ve formě kapky do roztoku zesíťovacího činidla [24].



Obrázek 6: Extrudér [31]

### 2.3.5 Lyofilizace

Lyofilizace, jinými názvy taky vakuové sušení nebo mrazová sublimace, je proces, který se používá za účelem dehydratace aromatických látek, esencí a téměř všech tepelně citlivých materiálů. Nosič a aktivní látka se nejprve rozpouští ve vodě a následně zmrazují. Za sníženého tlaku (vakua) je odstraněna voda pomocí sublimace. Sublimační sušení může trvat až 20 hodin. Někdy jsou využívány kryoprotektanty, které mají za úkol chránit a stabilizovat citlivé složky při mražení, kterými jsou například probiotika či lipozomy. [26, 32]

Lyofilizace se využívá také pro enkapsulaci buněk. Životaschopnost buněk v případě použití této techniky je vyšší než při použití sprejového sušení, i když potřebné zmražení před samotnou lyofilizací také způsobuje částečnou ztrátu viability buněk [33].

### 2.3.6 Koacervace

Při koacervaci dochází k rozdělení polymerního roztoku na dvě nemísitelné kapalné fáze. Jedna z nich je bohatá na makromolekulární materiál a označuje se jako koacervační fáze, druhá je zředěná a nazývá se koacervační médium neboli supernatant. Koacervace může být buď jednoduchá, kdy separace nastává v přítomnosti jednoho polymeru nebo komplexní, která probíhá v přítomnosti dvou nebo více opačně nabitých polymerů. Nejdříve se přidávají do kapaliny nerozpustné vosky nebo nerozpustné kapalné polymery, monomer je rozpuštěn a následně polymeruje na rozhraní. Během procesu se vytvářejí drobné kapičky, které se buď

usazují, nebo se spojují a vytvářejí oddělenou koacervovanou fází. Aby se předešlo shlukování a sedimentaci kapek koacervátu, tak je roztok míchán nebo se přidává stabilizátor. Vzniklé mikrokapsle jsou odděleny filtrací nebo odstředěním, promyty vhodným rozpouštědlem a vysušeny pomocí sprejového sušení [34].

Jako obalové materiály se používají arabská guma, karboxymethylcelulóza, pektin, polyvinylalkohol, karagen či sójový protein. Koacervace se používá pro enkapsulaci vonných olejů, vitaminů, konzervantů a enzymů. Je to také účinná metoda pro imobilizaci buněk, ale tento proces je velice nákladný [35].

### 2.3.7 Kokrystalizace

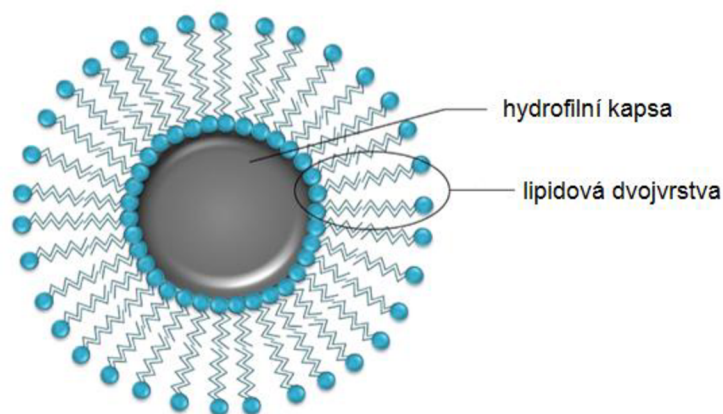
Tato enkapsulační technika využívá jako obal aktivní látky sacharózu. Cukrový sirup se udržuje při dostatečně vysoké teplotě, aby se zabránilo krystalizaci, ale zároveň aby byl roztok v přesyceném stavu. Poté se za intenzivního míchání přidá aktivní látka do sacharózového sirupu, roztok začne krystalizovat a dochází k enkapsulaci aktivní látky. Míchání trvá tak dlouho, dokud nezačnou vypadávat z nádoby aglomeráty. Částice se následně suší na požadovanou vlhkost [26].

Výhodou je možnost převedení aktivní látky v kapalně formě na prášek bez nutnosti sušení a následně je díky struktuře aglomerátů usnadněn proces převedení prášku na tablety, což je výhodné ve farmaceutickém průmyslu. Další výhodou je vysoká dostupnost základního materiálu a mnoho možností využití v potravinářském průmyslu [26].

### 2.3.8 Uzavření do lipozomů

Lipozomy byly popsány v roce 1965 na univerzitě v Cambridge. Jsou to útvary, které jsou tvořené dvojvrstvou lipidové membrány obsahující dutinu. Membrána je složená z fosfolipidů, mezi nejčastěji využívanými patří lecitin a cholesterol. Lipozomy vznikají na základě hydrofilně-hydrofobních interakcí mezi vodou a fosfolipidy. Díky amfifilitě molekul mohou být v lipozomech zachyceny hydrofilní látky i hydrofobní látky. Hydrofilní látky se umísťují ve formě roztoku dovnitř lipozomu, hydrofobní látky se zakomponují do membrány. Velikost částic je v rozmezí 25 až 1000 nm [26, 36].

Lipozomy můžeme používat ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu jako nosiče léků nebo jako model biologické membrány. Jsou vhodné pro enkapsulaci peptidů a nízkomolekulárních látek, kterými jsou vitamíny a antioxidanty. Pro svou netoxicitu mohou být používány i v potravinářském průmyslu, ale jejich využití je zde omezené, protože jsou fyzikálně i chemicky nestabilní. Jejich pozitivní efekt je zkoumán například při zrání tvrdých sýrů [37].



Obrázek 7: Schéma struktury liposomu [38]

### 2.3.9 Inkluze

Při molekulární inkluzi dochází k zachytávání aktivních látek do dutin, které jsou vytvořeny pomocí cyklodextrinů jako enkapsulačního materiálu. Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy, které vznikly spojením šesti až osmi jednotkami D-glukosy a jsou spojeny vazbami  $\alpha$ -(1,4) do cylindrické struktury. Vnitřní část molekuly cyklodextrinů je hydrofobní a vnější část je hydrofilní. Cyklodextriny se získávají ze škrobu pomocí enzymu cyklodextrin glykosyltransferázy. Enkapsulovány mohou být molekuly pouze do určité velikosti, jelikož vnitřní lipofilní kapsa má průměr 0,5-0,8 nm. Nejčastěji jsou enkapsulovány aromatické látky a lipofilní vitamíny [39].

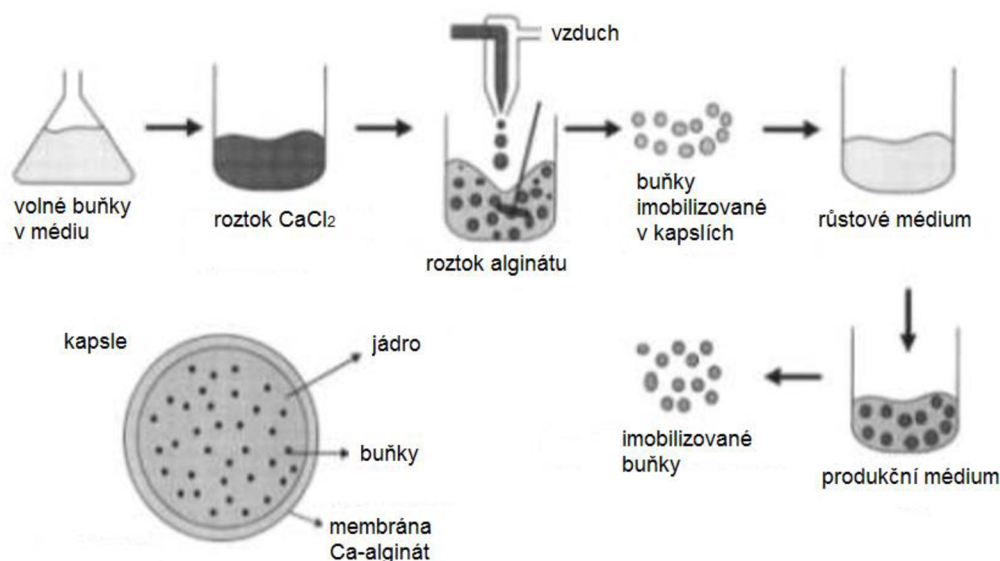
### 2.3.10 Emulzifikace

Emulze se skládá ze dvou nemísitelných fází, kdy jedna látka je dispergovaná ve druhé ve formě malých kapiček. Dva nejčastější typy emulzí jsou voda v oleji a olej ve vodě. Existují i tzv. dvojité emulze olej/voda/olej nebo voda/olej/voda, v nichž například kapky emulze olej ve vodě obsahují drobné kapičky vody. Tyto dvojité emulze se uplatňují při zpracování odpadních vod, při různých separačních procesech, ve farmacii či v kosmetickém průmyslu. Metoda emulzifikace se také často využívá k enkapsulaci buněk. Rozptýlené vodné kapky monomeru a buněk, pokud jsou míchané v organické směsi, vytvoří emulzi a po přidání polymerizačního činidla dojde ke vzniku kapslí [39].

Emulze vznikají nejčastěji mechanickým způsobem, kdy se využívá mixérů, míchadel nebo homogenizérů. Aby byla zvýšena stabilita emulze, je možné přidat do směsi emulgátory a stabilizátory. Velikost kapslí můžeme ovlivňovat rychlostí míchání či změnou koncentrace použité povrchově aktivní látky. Emulze mohou využívat v potravinářském průmyslu pro dopravení hydrofilních aktivních látek do potravin. Emulze by měly být po celou dobu aplikace stabilní, proto v případě enkapsulace emulzí, ve kterých se aktivní látky nacházejí ve vodném prostředí je nutné částice nejprve dehydratovat a převést na prášek [24, 27].

### 2.3.11 Tvorba polymerních kapslí

Principem metody je přikapávání roztoku nebo taveniny do vytvrzující lázně. Využívá se k enkapsulaci řady aktivních složek včetně mikrobiálních buněk, které si udrží svou životaschopnost i při kultivacích. Postup této techniky je znázorněn na Obrázku 8 [24].



Obrázek 8: Enkapsulace buněk do alginátových kapslí [40]



Nejčastěji je pro tvorbu částic s enkapsulovanými mikroorganismy používán alginát. Tento polysacharid se získává z přírodních zdrojů (vyskytuje se ve velkém množství řas) a mohou se v něm vyskytovat zbytkové nečistoty, jako jsou proteiny, polyfenoly nebo lipopolysacharidy. Tyto látky mohou následně zajistit dostatečnou výživu pro enkapsulované látky, na druhou stranu však mohou omezovat jeho biokompabilitu a tím i jeho použití ve farmacii [41].

Alginátové kapsle se připravují nejčastěji kapáním pomocí pipety nebo stříkačky buněčné suspenze v roztoku alginátu do síťujícího roztoku dvojmocného iodu. Většinou se používá chlorid vápenatý, který obsahuje kationty  $\text{Ca}^{2+}$ . V menší míře se využívají i kationty  $\text{Ba}^{2+}$ , které měly větší pevnost, ale bariem nevyniká stejnou biokompabilitou jako vápník. Velikost částic lze měnit použitím různé teploty, tlaku, koncentrací nosiče nebo také změnou tvaru a velikostí trysky [41].

Mezi nejčastěji používané nosiče se řadí již zmíněný alginát, ale místo něj se může využít například i modifikovaný škrob, celulóza, agar, agarosa, karagenan, kolagen, chitosan, celulóza další přírodní polymery [41].

Tabulka 3: Shrnutí jednotlivých technik enkapsulace [26]

Enkapsulační technika	Hlavní kroky při enkapsulaci
1. Sprejové sušení	a. Příprava disperze
	b. Homogenizace disperze
	c. Atomizace disperze
	d. Dehydratace částic
2. Sprejové chlazení	a. Příprava disperze
	b. Homogenizace disperze
	c. Atomizace disperze
3. Fluidní vrstva	a. Příprava roztoku na obal
	b. Příprava částic na jádro
	c. Zabalení částic
4. Extruze	a. Příprava taveniny
	b. Disperze jádra do roztaveného polymeru
	c. Chlazení chladným prostředím nebo dehydratací rozpouštědlem
5. Lyofilizace	a. Míchání částic účinné látky v roztoku na obal
	b. Sublimační sušení směsi
6. Koacervace	a. Vytvoření tří nemísitelných fází
	b. Depozice obalu
	c. Tuhnutí obalu
7. Odstředivé oddělení	a. Smíchání částic účinné látky
	b. Nalítí směsi na rotační disk
	c. Zapouzdření malých částic
	d. Sušení
8. Kokrytalizace	a. Příprava přesyceného roztoku sacharózy
	b. Přidání aktivní látky do roztoku
	c. Dodání tepla jakmile roztok sacharózy dosáhne teploty krystalizace
9. Uzavření do lipozomů	a. Mikrofluidizace
	b. Ultrazvuk
	c. Odpaření reverzní fáze

## 2.4 Vnější fáze využívané pro tvorbu částic

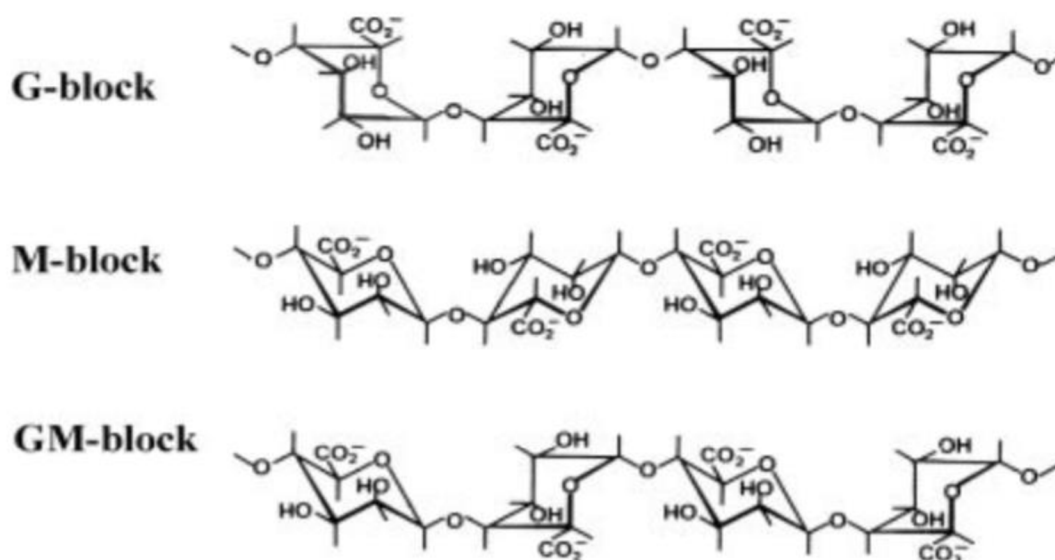
Pro vytvoření vnějších fází může být využito velké množství látek, ovšem pro vytvoření vnějších fází, které by následně mohly být používány v potravinářství jich je mnohem méně. Látky, které mohou být využity k enkapsulacím v potravinářském průmyslu musí být zařazeny mezi aditiva, které se řadí do skupiny „všeobecně považované za bezpečné“ (Generally Recognised As Safe – GRAS) [24].

Jako nejčastější materiály pro vytvoření obalu částic jsou používány polysacharidy (škrob, celulóza), extrakty z mořských řas (alginát) a živočišné polysacharidy (chitosan). Všechny tyto látky musí být biologicky odbouratelné, požitelné, nesmí reagovat s aktivní látkou a zároveň ji musí být schopné v kapsli udržet během zpracování a skladování a musí vytvořit bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím. Pro enkapsulaci probiotik se nejčastěji využívá alginát a chitosan [42].

### 2.4.1 Alginát

Alginát je sůl alginové kyseliny, kterou můžeme označovat jako algin. Tento přírodní polysacharid se získává jako sodná sůl extrakcí hnědých mořských řas alkáliemi (NaOH). Z extraktů se sráží jako vápenatá sůl přidávkem  $\text{CaCl}_2$  nebo se okyslí HCl jako alginová kyselina. Vápenatá sůl se následně převádí na alginovou kyselinu a z té se získává neutralizací finální komerční produkt – sodná sůl. Alginát může být produkovan i bakteriemi rodu *Azobacter* či *Pseudomonas*. V potravinářském průmyslu nachází uplatnění zejména jako stabilizátory, zahušťovadla nebo emulgátory pro zlepšení konzistence [43].

Struktura alginátu je tvořena nevětveným lineárním kopolymerem  $\beta$ -D-mannuronové kyseliny a  $\alpha$ -L-guluronové kyseliny, které jsou spojeny glykosidovými vazbami. Řetězce jsou spirálovité až prakticky lineární a jsou tvořeny 180 – 930 jednotkami cukrů. První informace o struktuře byly zveřejněny v práci Haugeeta, kdy po částečné hydrolýze a frakcionaci bylo možno rozdělit alginátovou molekulu do tří základních odlišných sekvencí, které můžeme vidět na Obrázku 9. V alginátovém řetězci střídají různě dlouhé úseky obsahující pouze molekuly M, nebo výhradně molekuly G nebo smíšené úseky MG [44].

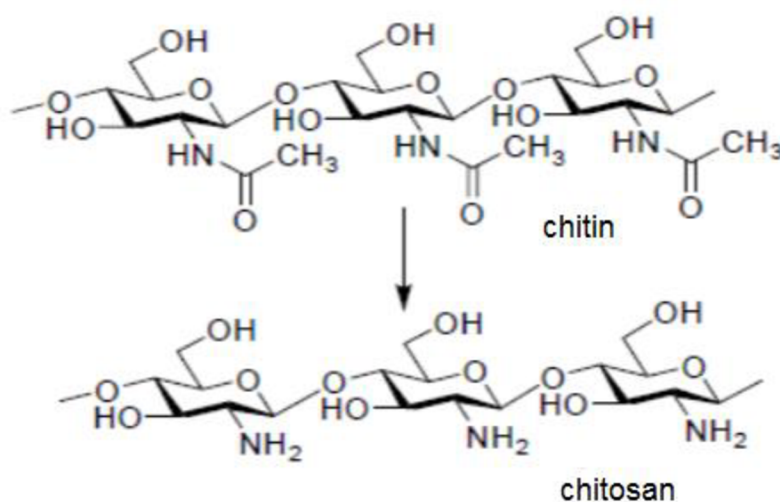


Obrázek 9: Základní sekvence alginátu [44]

## 2.4.2 Chitosan

Chitosan je přírodní lineární polysacharid složený z 2-amino-2-deoxy-D-glukopyranosy a z 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosy. Nejčastěji se vyrábí N-acetylací chitinu, na který se působí koncentrovanou zásadou při teplotách 100°C a vyšších. Mezi jeho vlastnosti patří biokompatibilita, snadná biodegradabilita a nízká toxicita, proto může být základem mnoha komerčních produktů, které se využívají v potravinářství, medicíně, farmacii nebo při výrobě detergentů. Chitosan má vyšší chemickou a biochemickou reaktivitu než chitin, je nerozpustný ve vodě a v organických rozpouštědlech, naopak se dobře rozpouští v kyselině dusičné, octové, chlorovodíkové a dalších [45].

Molekuly chitosanu obsahují kladné náboje a v přítomnosti záporných nábojů dochází ke koagulaci. Tohoto jevu se využívá i při enkapsulaci, kdy se chitosan sráží roztokem tripolyfosfátu sodného. V přítomnosti kovů dochází k tvorbě komplexů. Pro člověka je jak chitosan, tak kov nestravitelný, ale chitosan výrazným způsobem snižuje hladinu cholesterolu a tuků v játrech a v krevním séru [43].



Obrázek 10: Struktura chitinu a chitosanu [46]

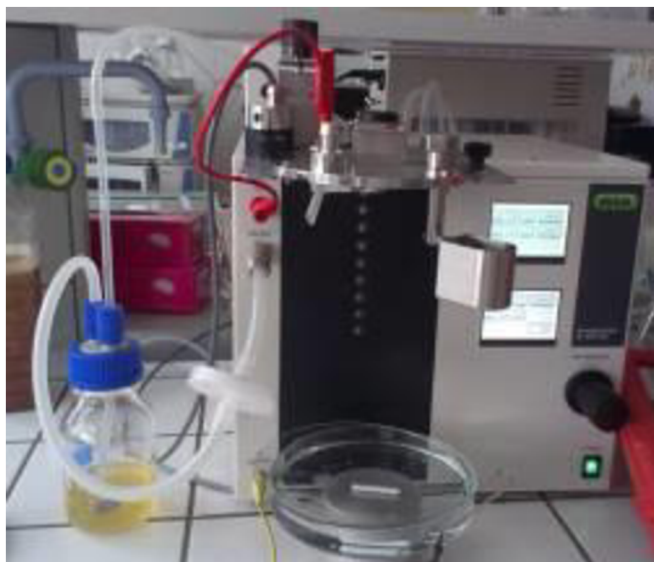
## 2.4.3 Škrob

Škrob je vysokomolekulární polymer D-glukózy, v němž jsou monomerní jednotky spojeny  $\alpha$ -1,4 glykozidovými vazbami a větvení je zajištěno  $\alpha$ -1,6 glykozidovými vazbami. Dvěma hlavními složkami škrobu je lineární amyulóza (20 – 40 %) a větvený amylopektin (70 – 80 %). Průmyslově se škrob získává především z obilovin a brambor. Takto získaný škrob se v přirozené formě, ale hlavně ve formě nejrůznějších derivátů a modifikovaných škrobů používá v potravinářském, textilním, lékařském a chemickém průmyslu. Přírodní pšeničný škrob je velice jemný, sypký prášek, bez mechanických nečistot, neutrální vůně a chuti. V dnešní době se nativní škroby různě modifikují, aby se potlačovaly negativní vlastnosti nebo aby se vytvořily škroby s vhodnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi [43, 47].

V přírodě se škrob vyskytuje uložený v micelách, které se nazývají škrobová zrna nebo škrobové granule. Tyto škrobové zrna jsou uloženy v pletivech rostlin, chloroplastech, amyloplastech nebo v buňkách kořenů, hlíz a semen. Jejich struktura je semikrystalická, je složena z krystalické a amorfni oblasti. Krystalická oblast je spojená s amylopektinem, amorfni oblast představuje především amyulóza [43].

## 2.5 Enkapsulátor

Enkapsulátor je laboratorní přístroj, který se využívá pro tvorbu částic. Proces enkapsulace je realizován pomocí polymerního zapouzdření různých typů aktivních látek, kterými mohou být různé extrakty, buňky, biologické molekuly, vůně, pigmenty, barviva nebo drogy. Konečným produktem tohoto přístroje jsou malé kapičky, které mají identickou velikost. Enkapsulátor začne vytvářet kapičky poté, co se nastaví optimální frekvence vibrace, která je aplikovaná na laminární kapalný proud a dojde k jeho roztržení. Frekvence nám určuje, kolik kapek se vytvoří za jednu sekundu. Velikost vzniklých částic závisí na velikosti zvolené trysky, ta se pohybuje od 0,15 do 2 mm [48].



Obrázek 11: Enkapsulátor B-375 Pro

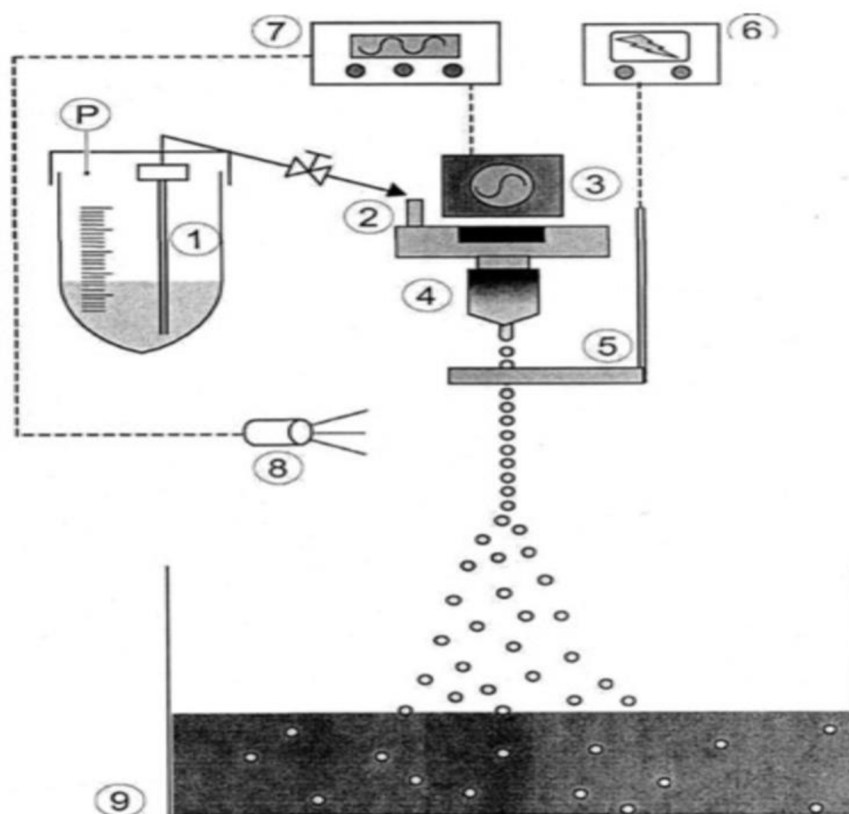


Obrázek 12: Proces enkapsulace

Jednotlivé části enkapsulátoru jsou znázorněny na Obrázku 13. Látka, která je určena k enkapsulaci se smíchá s obalovým (zapouzdřovacím) polymerem. Vzniklá směs se umístí do tlakové lahve (1) a do pulzační komory (2) se směs tlačí stlačeným vzduchem. Následně pak prochází kapalina systémem trysek (4) o přesné velikosti otvorů, které z proudu kapaliny vibracemi vytváří stejně velké kapičky. Mezi tryskou a elektrodou se nachází elektrické pole (6) a průchodem přes něj získají kapičky stejný povrchový náboj. Působením elektrostatické odpudivé síly dochází k rozptýlení kapek před tím, než dopadnou do vytvrzovacího roztoku (9), který je nalit na Petriho misce. Roztok na Petriho misce musí být kontinuálně míchán magnetickým míchadélkem, aby nedocházelo ke shlukování jednotlivých částic. Po dopadení kapiček do polymerizačního roztoku dochází ke vzniku částic. [48]

Velikost jednotlivých částic se dá měnit pomocí několika parametrů, mezi něž se řadí frekvence vibrací, amplituda, velikost trysky, rychlost průtoku a fyzikální vlastnosti směsi produktu s polymerem. Optimální parametry tvorby částic se indikují vizualizací tvorby částic v reálném čase ve světle stroboskopické lampy (8). Při dosažení optimálních parametrů je vidět stálý řetězec kapiček. Chybně vytvořené částice, které vznikají na začátku a na konci běhu, jsou zachyceny v krycím sklíčku, které vložíme pod proud částic. Vzniklé částice se zfiltrují a mohou být použity k dalšímu pozorování [48].





Obrázek 13: Schématické znázornění enkapsulátoru [48]

## 2.6 Metody využívané k analýze částic a enkapsulovaných složek

### 2.6.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která se zabývá měřením a analýzou fyzikálních a chemických vlastností buňky nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem. Když buňka kříží tento paprsek, tak dochází k lomu a k rozptylu světla, který se podle směru a úhlu lomu označuje jako přímý a boční rozptyl. Přímý rozptyl je charakterizován lomem světla o malém úhlu a je úměrný velikosti buňky. Úhel bočního rozptylu je indikátorem vnitřní buněčné struktury (granularity). Při měření je detekovaná také fluorescence procházejících částic nebo buněk [49].

Stanovení viability buněk je založeno na aplikaci látek, které za běžných podmínek neprocházejí neporušenými buněčnými membránami, případně jsou ihned vylučovány zpět do extracelulárního prostředí. Pokud je cytoplazmatická membrána narušena natolik, že látky mohou do buňky projít, tak dojde k vazbě na složky buněčné hmoty a k zesílení nebo k posunu spektra fluorescence. Buňky, které mají takto narušené membrány, nejsou považovány za životaschopné. K určení, jestli jsou buňky živé nebo mrtvé se využívají látky, které se v buňce vážou na nukleové kyseliny, protože ty se vyskytují ve všech buňkách mikroorganismů v dostatečném množství. Nejrozšířenější barvivo, které se využívá je propidiumjodid. Propidiumjodid je činidlo, které se váže na nukleové kyseliny. Po navázání dochází k posunu a zesílení intenzity fluorescence emitované v červené oblasti spektra. Toto barvivo se využívá v mikrobiologii pro určení viability kvasinek a bakterií [49].

## 2.6.2 Vitální test

Pro vitální test se využívá barvivo methylenová modř. Toto barvivo slouží k rozlišení mrtvých a živých buněk, jelikož má schopnost procházet membránami buněk. U živých buněk je methylenová modř ihned vylučována z buněk ven do extracelulárního prostředí pomocí reduktáz a u mrtvých buněk tato enzymová aktivita chybí, tudíž zůstanou obarveny [50].

## 2.6.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je separační metoda založena na existenci fázového rozhraní dvou fází – stacionární a mobilní. Vzorek, který se nadávkuje do kolony, je unášen mobilní fází, která obtéká fází stacionární. Některé složky vzorku adsorbují snadněji ke stacionární fázi než k mobilní a tím dojde k zadržení jedné části látky více než druhé látky. Dělení vzorku mezi tyto dvě fáze můžeme vyjádřit distribuční konstantou, která udává poměr mezi množstvím látky ve stacionární fázi k mobilní fázi. Čím větší hodnotu má konstanta, tím déle vzorek zůstává ve stacionární fázi. Charakteristickou veličinou pro každou separovanou látku je retenční čas, což je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky. Mezi faktory, na nichž je samotná separace látek závislá patří složení mobilní a stacionární fáze, výběr kolony, průtok, pracovní teplota, vlastnosti analyzovaných látek, dávkovací zařízení a detektor [51, 52].

Tato metoda byla vyvinuta z klasické kolonové chromatografie. Vysoké účinnosti a rychlosti se dosahuje použitím kolon s náplněmi o velikosti částic několika mikrometrů, poměrně velkých průtoků mobilní fáze a vysokého tlaku. Jako stacionární fáze se nejčastěji používá silikagel s modifikovaným povrchem. V současnosti je kapalinová chromatografie jednou z nejvíce využívaných analytických metod a její význam se pořád zvyšuje. Díky chromatografií jsme schopni separovat přibližně 80 % sloučenin, které jsou převážně organického původu. Tyto látky musí být netěkavé a tepelně stálé. Můžeme ji využít pro analýzu vysokomolekulárních a biochemicky významných látek, především ve farmaceutickém průmyslu, biochemii, v potravinářském průmyslu, ale i ke kontrole životního prostředí. [48,50]

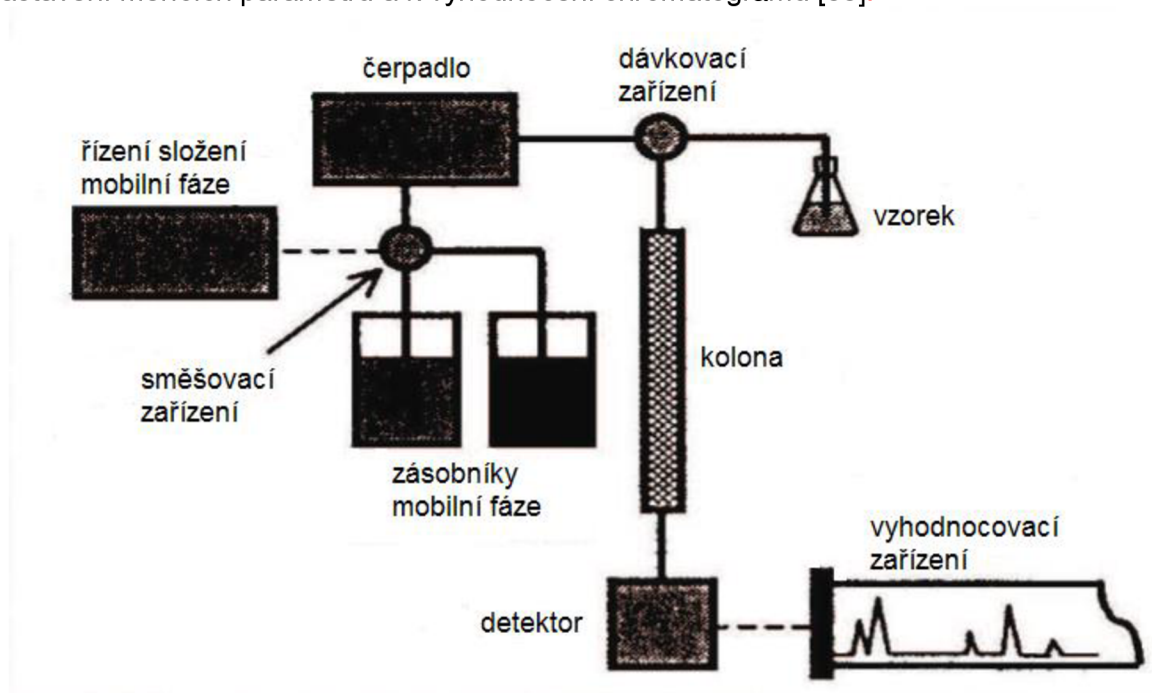
Chromatografický systém je složen z několika částí: zásobník mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, dávkovací zařízení, kolona, detektor a pc. Dnes se mezi nezbytné části řadí i ochranné filtry, předkolony k odstranění nečistot mobilní fáze a ventily pro přepojování chromatografických kolon v průběhu separace [51].

Zásobník slouží pro dostatek mobilní fáze v průběhu celého měření. Čerpadlo nebo-li pumpa zajišťuje průtok mobilní fáze. Nastavený průtok by měl být konstantní, reprodukovatelný a měl by tvořit co nejmenší tlakové pulzy. Čerpadlo musí mít takový výkon, aby bylo schopno vyvinout potřebný tlak. Dávkovací zařízení musí odolat vysokému tlaku a zůstat těsné. V moderních systémech je dávkování ovládáno elektronicky a provádí se automaticky. Mezi dávkovače se řadí mikrostržkačka, dávkovací smyčka a automatický dávkovač [53].

Kolony jsou naplněny částicemi o různé velikosti a pórovitosti s pravidelným kulovitým tvarem částic. Jsou odolné vůči vysokému tlaku. Délka kolony je obvykle v rozmezí 15-25 cm s vnitřním průměrem 3-5 mm. Častěji se využívají užší kolony, protože mají menší spotřebu mobilní fáze, dochází v nich k menší difuzi a jsou výhodnější pro následné spojení s hmotnostním spektrometrem. Aby se prodloužila životnost kolony, tak se před ní vkládá předkolona, která má stejný sorbent jako kolona a slouží k zadržení nečistot a látek s příliš vysokou afinitou [54].

Jako poslední částí chromatografu je detektor. Detektor je zařízení, které kontinuálně sleduje složení eluátu a převádí tuto informaci na měřitelnou veličinu. Požadavky na detektory jsou zejména vysoká citlivost, univerzalita (snaha detekovat různé typy látek), maximální rychlost odezvy, stabilita, malá citlivost ke změnám průtoku a tlaku a dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou. Detektorů je celá řada, nejčastěji používané jsou

spektrofotometrické detektory, refraktometrické detektory a fluorimetrické detektory. Výsledkem vyhodnocení je chromatogram. Na chromatogramu můžeme vidět retenční čas maxima píku a podle ploch a výšky píku daných analytů můžeme vypočítat kvantitativní údaj. Součástí chromatografu je i počítač s nainstalovaným softwarem, který slouží ke kontrole, nastavení měřících parametrů a k vyhodnocení chromatogramů [55].



Obrázek 14: Schéma přístroje pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii [51]

#### 2.6.4 Chromatografie na tenké vrstvě

Princip tenkovrstvé chromatografie spočívá v rozdělování jednotlivých látek, které mají odlišnou rozpustnost a adsorpci, mezi mobilní a stacionární fází. Výběr mobilní fáze má vliv na účinnost kolon, retenční poměr, dobu analýzy a citlivost. Nejčastější používaná rozpouštědla pro mobilní fázi jsou organická rozpouštědla, např. toluen, chloroform, aceton a ethanol. Stacionární fází je tenká destička, která je pokrytá sorbentem, tím může být silikagel, oxid hlinitý nebo celulóza [56].

Vyhodnocení se provádí pomocí porovnání retenčních faktorů jednotlivých vzorků a použitých standardních látek. Retenční faktor popisuje poměr vzdáleností středu skvrny vzorku od startu a vzdálenosti čela od startu [56].

### 3 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem předložené práce je studium probiotických kultur, možností jejich enkapsulace a koenkapsulace s různými druhy prebiotik a sledování životaschopnosti enkapsulovaných bakterií v modelových fyziologických podmínkách. Za tímto účelem budou provedeny následující dílčí úkoly:

1. Zpracování literární rešerše vztahující se k dané problematice - charakteristika probiotik a prebiotik, metody enkapsulace.
2. Optimalizace metod kultivace mléčných bakterií za využití prebiotik jako substrátů, stanovení viability buněk pomocí průtokové cytometrie a optické mikroskopie.
3. Zavedení metod pro analýzu prebiotik – spektrofotometrické metody, vysokoúčinná kapalinová chromatografie.
4. Enkapsulace mléčných bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* do organických částic společně s prebiotiky, charakterizace, dlouhodobá stabilita a životaschopnost enkapsulovaných bakterií ve směsi s prebiotiky.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie a přístroje

#### 4.1.1 Chemikálie

Alginát sodný, Sigma-Aldrich (USA)  
Kyselina chlorovodíková 35%, Lach-Ner (ČR)  
Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)  
Chlorid vápenatý p.a., Lachema (ČR)  
D-maltosa monohydrát čistá, Lach-Ner (ČR)  
Sacharosa p.a., Lach-Ner (ČR)  
D-fruktosa p.a., Lach-Ner (ČR)  
D-glukosa monohydrát p.a., Lach-Ner (ČR)  
Kyselina sírová 96%, Lach-Ner (ČR)  
Dihydrogenfosforečnan draselný, Lach-Ner (ČR)  
Hydrogenfosforečnan draselný, Lach-Ner (ČR)  
Hydrogenuhličitan sodný p.a., Lach-Ner (ČR)  
Kyselina citrónová bezvodá p.a., Lach-Ner (ČR)  
Kyselina octová 98%, Lach-Ner (ČR)  
Methanol - Vitrum–Lach-Ner (ČR)  
Ethanol - Vitrum–Lach-Ner (ČR)  
Acetonitril pro HPLC, Gradient Grade – Sigma (Německo)  
Methanol pro HPLC, Gradient Grade – Sigma (Německo)  
MRS médium, Himedia (Indie)  
Pankreatin (vepřový pankreas), Sigma-Aldrich (Německo)  
Pepsin -Sigma-Aldrich (Německo)  
Propidiumjodid, eBioscience (USA)  
Methylenová modř, E-Merck (Německo)  
Bile salts – směs kyseliny cholové a deoxycholové, Sigma-Aldrich (Německo)

Ostatní použité chemikálie byly čistoty p.a. a byly získány od běžných dodavatelů.

#### 4.1.2 Přístroje

Analytické váhy – Boeco (SRN)  
Předvážky Ohaus ScoutPro (USA)  
Předvážky Kern 440-33 (Německo)  
Optický mikroskop – Intracomicro LM666PC/∞LED (ČR)  
Fluorescenční mikroskop Olympus IX71, Microtime 200 (Německo)  
Bürkerova komůrka Marienfeld (Německo)  
Mikrocentrifuga –Mikro 200, Hettich Zentrifugen (UK)  
Spektrofotometr –Helios  $\gamma$ , Unicam (UK)  
Enkapsulátor – Büchi B-395 Pro (CH)  
Hmotnostní spektrometr - LCQ Advantage MAX, Thermo Finnigan  
Průtokový cytometr - Apogee A50, Apogee Flow Systems (GB)  
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)  
- Kolona Supelcosil™ LC-NH<sub>2</sub>, 5 $\mu$ m, 4,6 x 250 mm (Phenomenex – USA)  
Vortex Heidolph Reax top (Německo)  
Magnetická míchačka Lavat (ČR)

## 4.2 Použité probiotické kultury a prebiotika

### 4.2.1 Probiotické kultury

V experimentální části této práce byly použity bakteriální kultury *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 a *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup>, které byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

### 4.2.2 Prebiotika

V práci byly použity vzorky inulinu, psyllia, konopné vlákniny a jablečné vlákniny. Tyto vlákniny jsou běžně dostupné ve specializovaných obchodech se zdravou výživou.

Inulin:

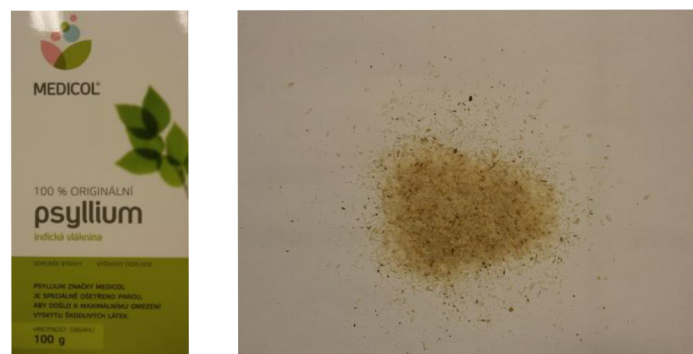
- Název: Inulin - rozpustná vláknina
- Značka: FAN sladidla
- Složení: 90 % inulin, 9 % oligosacharidy, 1 % protispěková látka, oxid křemičitý
- Výrobce: F&N dodavatelé, s.r.o.
- Zakoupeno: Zdravá výživa NC Královo pole



Obrázek 15: Vzorek inulinu

Psyllium

- Název: 100 % originální psyllium – indická vláknina
- Značka: Medicol
- Složení: Rozemleté osemení jitrocele indického
- Výrobce: ASP CZECH s.r.o.
- Zakoupeno: Zdravá výživa NC Královo pole



Obrázek 16: Vzorek psyllia



### Konopná vláknina

- Název: Konopná vláknina
- Značka: Zdravá linie
- Složení: Konopná vláknina
- Výrobce: Zdráva linie s.r.o.
- Zakoupeno: Zdravá výživa, Poliklinika Lesná



Obrázek 17: Vzorek konopné vlákniny

### Jablečná vláknina

- Název: Jablečná vláknina jemná
- Značka: Provita
- Složení: Vláknina sušených jablek
- Výrobce: Vega provita s.r.o.
- Zakoupeno: Zdravá výživa, Poliklinika Lesná



Obrázek 18: Vzorek jablečné vlákniny

## 4.3 Hydrolýza prebiotik

K 0,5 g prebiotika bylo do každé baňky napipetováno 9 ml 1,2M HCl a 15 ml 50% MetOH. Takto připravené roztoky byly promíchány, uzavřeny zátkou, obaleny alobalem a hydrolyzovány 1 hodinu ve vroucí vodní lázni. Poté byly hydrolyzáty zfiltrány a jejich pH bylo upraveno na hodnotu 3-4. Hydrolyzáty byly uchovány v lednici pro další použití.

## 4.4 Charakteristika prebiotik

Všechna stanovení byla provedena s roztoky prebiotik před i po hydrolýze. Přesný postup hydrolýzy je uveden v kapitole 4.3.

#### 4.4.1 Stanovení celkových cukrů podle Duboise

Byl smíchán 1 ml vzorku s 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Roztok byl zamíchán a 30 minut inkubován při laboratorní teplotě. Poté byla měřena absorbance při 490 nm. Každý vzorek byl proměřen 3x. Kalibrační křivka byla připravena pomocí glukózy v rozmezí 0,01 – 0,1 g/l.

#### 4.4.2 Stanovení redukujících cukrů metodou dle Somogyiho Nelsona

Byl smíchán 1 ml vzorku s 0,5 ml roztoku I, 0,5 ml roztoku II a směs byla 10 minut povařena. Roztok byl ochlazen na laboratorní teplotu a následně bylo přidáno 0,5 ml roztoku III a 7,5 ml destilované vody. Kalibrační křivka byla sestavena pro glukózu v koncentračním rozmezí 0,01 – 0,1 g/l. Každý vzorek byl změřen 3x a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr.

Roztok I: 12 g uhlíčitanu sodného a 8 g hydrogenuhlíčitanu 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.

Roztok II: 4 g pentahydrátu síranu měďnatého byl smíchán s 24 g síranu sodného a 200 ml destilované vody.

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

### 4.5 Stanovení obsahu sacharidů pomocí tenkovrstvé chromatografie

Chromatografické metody jsou dnes zcela nepostradatelné, máme-li od sebe vzájemně odlišit látky, které mají blízkou strukturu. V praxi se velmi často využívá komerční hliníkové folie povlečené tenkou vrstvou silikagelu a škrobu (Silufol).

#### 4.5.1 Příprava činidla na detekci chromatogramu

4 g difenylalaninu byly rozpuštěny v 50 ml acetonu, byly přidány 4 ml anilinu a 28 ml  $H_3PO_4$ . Po dokonalém rozmíchání a vytvoření homogenní směsi bylo přidáno 150 ml acetonu.

#### 4.5.2 Příprava vyvíjející směsi

Bylo smícháno 50 ml butanolu, 12,5 ml kyseliny octové a 62,5 ml destilované vody.

#### 4.5.3 Příprava vzorku

Pro stanovení byly použity vzorky neupravených prebiotik, dále byly charakterizovány i jejich hydrolyzáty připravené dle postupu v kapitole 4.3. Doba hydrolyzy byla zvolena na 20 minut, 1 hodinu a 2 hodiny. Ze standardů byl použit 5% roztok glukózy, fruktózy, sacharózy, laktózy, maltózy, arabinózy, rhamnózy, xylózy a galaktózy.

#### 4.5.4 Postup

Na desce Silufolu byl označen obyčejnou tužkou start přibližně 1 cm od okraje. Vzorky byly na desku nanášeny pomocí mikropipety tak, aby maximální velikost skvrny byla 2 – 3 mm. Další vzorky byly nanášeny ve vhodné vzdálenosti od sebe tak, aby nedošlo k jejich vzájemnému smísení. Po nanášení byl chromatogram vysušen krátce v sušárně a byl umístěn do chromatografické kolony s vyvíjející směsí.

Mobilní fázi u tenkovrstvé chromatografie jsou organická rozpouštědla a pro správné vyvíjení chromatogramu by měla být chromatografická komora nasycena parami mobilní fáze. Chromatografická komora byla připravena, když do ní byla nalita mobilní fáze v takovém



množství, aby při vložení tenké vrstvy nebyla startovní linie (nanesené vzorky) ponořeny do mobilní fáze. Rychlost vztlínání mobilní fáze závisí na vlastnostech složek, které daný vzorek obsahuje a na materiálu stacionární fáze. Látky, které se více poutají ke stacionární fázi, budou unášeny mobilní fází pomaleji.

Po vyvinutí chromatogramu (jakmile čelo dostoupí asi 1 cm od horního okraje) bylo poznačeno tužkou čelo rozpouštědla a chromatogram byl vysušen 5 minut v sušárně při 80°C. Suchý chromatogram byl postříkán rozprašovačem s detekčním činidlem a byl umístěn na 5 minut do sušárny vyhřáté na 80°C. Tužkou byly označeny středy jednotlivých skvrn a byly vypočítány hodnoty R<sub>f</sub>.

#### 4.6 Stanovení obsahu mono- a oligosacharidů pomocí HPLC

Bylo provedeno měření na dvou různých kolonách. V prvním případě byl jako mobilní fáze použit roztok acetonitrilu a destilovaná voda v poměru 75 : 25. Eluce byla izokratická, kolona byla v termostatu zahřívána na 30°C a průtok byl nastaven na 1 ml za minutu. Byla použita kolona Luna NH<sub>2</sub>. Na začátek kolony byl do dávkovací smyčky o objemu 20 µl nastříkovan vzorek a detekce látek probíhala na refraktometrickém detektoru. Vzorky byly před analýzou filtrovány na membránových filtrech o průměru 0,45 µm.

V druhém případě byla jako mobilní fáze použita pouze okyselená voda. Okyselená voda byla připravena z destilované vody a kyseliny orthofosforečné v poměru 99 : 1. Eluce byla izokratická, kolona byla v termostatu zahřívána na 60°C. Průtok byl nastaven na 0,5 ml za minutu. Byla použita kolona typu Rezex. Na začátek kolony byl do dávkovací smyčky o objemu 20 µl nastříkovan vzorek a detekce látek probíhala na refraktometrickém detektoru. Vzorky byly před analýzou filtrovány na membránových filtrech o průměru 0,45 µm.

#### 4.7 Kultivace mléčných bakterií

Pro kultivaci bakteriálních kultur *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve* bylo použito komerční MRS médium s názvem *Lactobacillus* MRS agar. Médium bylo smícháno v Erlenmayerově baňce s destilovanou vodou v daném poměru 55,15 g média na 1000 ml destilované vody a sterilizováno v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut. Obě kultury byly zaočkovány ve sterilním boxu.

Tabulka 4: Základní složky MRS média

pepton	10 g
hovězí extrakt	10 g
kvasničný extrakt	5 g
glukóza	20 g
agar	12 g

Kultivace probíhala při 37°C po dobu 24 hodin. Poté byly kultury použity na stanovení viability, k zaočkování případně k enkapsulaci.

##### 4.7.1 Kultivace probiotik na médiích s přidavkem prebiotik

Probiotika *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve* byly kultivovány v MRS médiu. Dále byly do média přidávána zvolená hydrolyzovaná i nehydrolyzovaná prebiotika v různých koncentracích, aby bylo zjištěno, jaká koncentrace je pro jejich růst nejlepší. Byla připravena série zkumavek s přidavkem a bez přidavku prebiotika. Zvolená neupravená prebiotika (inulin, psyllium, jablečná a konopná vláknina) byla přidávána do média v koncentraci 10 a 100 mg/ml.

Hydrolyzovaná prebiotika byla přidávána dle schématu uvedeného v Tabulce 15. Kultivace probíhala ve zkumavkách při 37 °C v 10 ml sterilního média a zaočkování bylo provedeno z 5 % 24hodinového inokula. Ve 24., 48. a 72. hodině byl proveden sterilní odběr a ve vzorcích byl stanoven počet buněk a jejich viabilita. Toto stanovení bylo provedeno spektrofotometricky měřením zákalu při 630 nm. Viability buněk byly sledovány mikroskopicky barvením methylenovou modří. Pro stanovení množství buněk a jejich viability bylo rovněž využíváno průtokové cytometrie, kde bylo jako fluorescenční sondy využito propidiumjodidu.

#### **4.7.2 Stanovení viability a koncentrace buněk pomocí průtokového cytometru**

Odebrané vzorky buněk pro stanovení byly 10x naředěny destilovanou vodou, k 1 ml takto připraveného vzorku bylo přidáno 5 µl propidiumjodidu (1 mg/ml) a vzorky byly ponechány k obarvení 10 minut ve tmě a následně analyzovány.

#### **4.8 Příprava částic**

Buňky probiotik po 24 hodinách kultivace byly podrobeny analýze na průtokovém cytometru. Po tomto stanovení koncentrace a viability buněk byly kultury určené k enkapsulaci centrifugovány při 5000 otáčkách po dobu 10 minut. Buňky byly následně rozsuspendovány v 2% alginátu a rozděleny na sérii 6 vzorků (bez přídatku prebiotika, s přídatkem glukózy a s přídatkem jednotlivých prebiotik - inulin, psyllium, jablečná vláknina a konopná vláknina, přídatek činil 0,5g a 0,05/10ml. Pro přípravu částic byl použit Enkapsulátor B-395 Pro (BÜCHI) a jako srážecí roztok byl použit 1% roztok CaCl<sub>2</sub>. Připravené částice byly ponechány ve srážecím roztoku po dobu 10 minut, následně byly zfiltrány a použity pro stanovení dlouhodobé stability viz kap. 5.6. Pro přípravu částic byly použity trysky o velikosti 450 µm a 1000 µm.

Bylo vytvořeno celkem 6 typů částic i manuální přípravou tak, že roztok alginátu společně s buňkami a s vlákninou byl kapán do roztoku CaCl<sub>2</sub> pomocí mikropipety.

#### **4.9 Stanovení stability částic – mikroskopie**

Mikroskopie byla použita ke sledování velikosti připravených částic, morfologie připravených částic, ke stanovení počtu a viability buněk uvnitř částice a ke stanovení počtu a viability buněk uvolněných z částic při dlouhodobém skladování případně při působení modelových trávicích šťáv. Vzorky byly před analýzou barveny po dobu 10 minut methylenovou modří. Po této době byly jednotlivé částice i roztok pozorován pod optickým mikroskopem, v případě sledování uvolněného množství byla k pozorování využita i Bürkerova komůrka.

#### **4.10 Stanovení stability částic v modelovém prostředí lidského organismu**

Stabilita částic byla stanovena v umělé žaludeční, pankreatické a žlučové šťávě dle Československého lékopisu [57]. Vzorky byly připraveny vložением částice nejprve do žaludeční šťávy, následně do pankreatické šťávy a nakonec do žlučové šťávy. Pod optickým mikroskopem byla sledována viabilita bakterií uvnitř kapsle a jejich uvolněné množství působením šťávy. V žaludeční a v pankreatické šťávě byly enkapsulované bakterie inkubovány 20 minut v termostatu o teplotě 37°C, ve žlučové šťávě byly po dobu 40 minut při teplotě 37°C.

#### **4.10.1 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 [57].

#### **4.10.2 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 [57].

#### **4.10.3 Složení modelové žlučové šťávy**

Žlučová šťáva byla připravena přidáním 0,8 g žlučových solí do 200 ml fosfátového pufru o pH 8 [57].

### **4.11 Stanovení stability částic v modelovém prostředí**

Pro optimální růst bakterií *Lactobacillus acidophilus* je nejvhodnější prostředí, které má pH 3-4. Proto jako modelová potravina byla zvolena kyselá potravina, jejímž simulantem je 2,5% kyselina citrónová o tomto pH [12, 58].

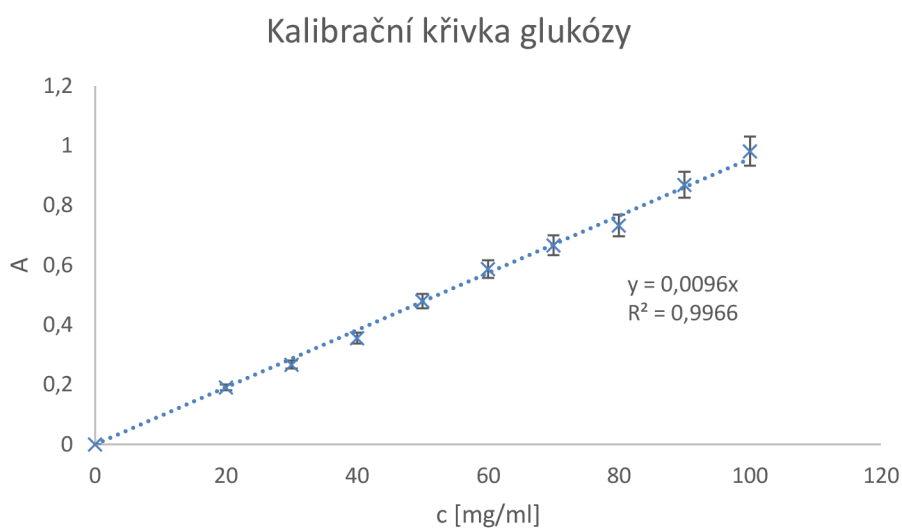
Částice s bakteriemi byly ponechány po dobu 6 týdnů v tomto modelovém prostředí. Stabilita částic byla sledována pod optickým mikroskopem po 1 dnu, po 1 týdnu, po 3 týdnech a po 6 týdnech.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Charakteristika prebiotik

#### 5.1.1 Stanovení celkových cukrů podle Duboise

Byla vytvořena kalibrační křivka s rovnicí regrese  $y=0,0096x$ . Postup stanovení celkových sacharidů podle Duboise je uveden v kapitole 4.4.1. Stanovení celkových cukrů bylo provedeno u inulinu, psyllia, konopné vlákniny a jablečné vlákniny. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 5. Absorbance u všech vzorků byla provedena 3x, v Tabulce 5 je uvedena již zprůměrovaná hodnota.



Graf 1 : Kalibrační křivka pro stanovení celkových cukrů

Tabulka 5: Stanovení celkových cukrů podle Duboise pro nehydrolyzovaná prebiotika

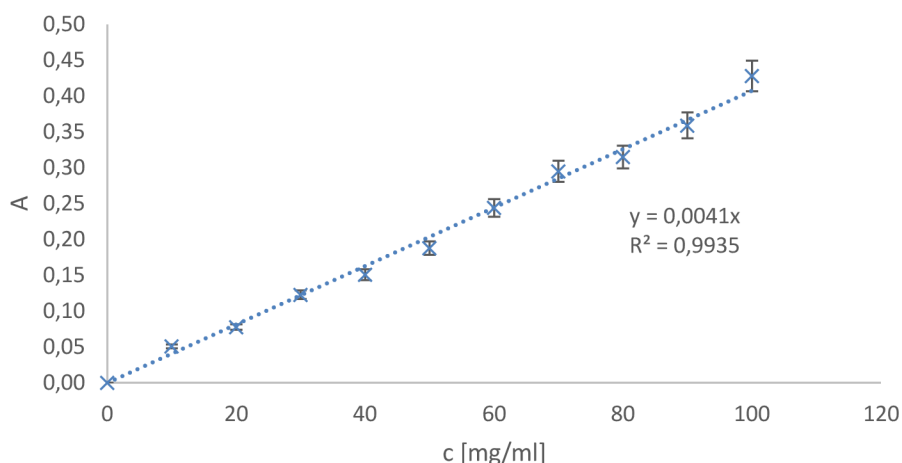
Vzorek	Navážka	Ředění	$\phi A$	c [ $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$ ]	g/100 g
Inulin	0,001	10x	0,509	535,68 $\pm$ 15,23	53,6 $\pm$ 1,51
Psyllium	0,001	10x	0,923	961,47 $\pm$ 37,54	96,1 $\pm$ 3,75
Jablečná vláknina	0,001	10x	0,083	97,55 $\pm$ 4,63	9,8 $\pm$ 0,49
Konopná vláknina	0,001	10x	0,018	30,7 $\pm$ 1,56	3,1 $\pm$ 0,16

Z uvedených výsledků můžeme usoudit, že největší podíl celkových cukrů z analyzovaných vzorků má psyllium a to 96,1 g/100 g. Naopak nejnižší hodnotu celkových cukrů má konopná vláknina, pouze 3,1 g/100 g a poměrně malou hodnotu má i jablečná vláknina.

#### 5.1.2 Stanovení redukujících cukrů dle Somogyiho Nelsona

Byla vytvořena kalibrační křivka s rovnicí regrese  $y=0,0041x$ . Postup pro stanovení redukujících cukrů je uveden v kapitole 4.4.2. Stanovení redukujících cukrů bylo provedeno u inulinu, psyllia, konopné vlákniny a jablečné vlákniny. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 6. Absorbance u všech vzorků byla provedena 3x, v Tabulce 6 je uvedena již zprůměrovaná hodnota.

### Kalibrační křivka glukózy



Graf 2: Kalibrační křivka pro stanovení redukujících cukrů

Tabulka 6: Stanovení redukujících cukrů pro nehydrolyzované prebiotika

Vzorek	Navážka	Ředění	øA	c [ $\mu\text{g}/10\text{ ml}$ ]	g/100 g
Inulin	0,020	10	0,457	1145,29±39,58	5,7±0,19
Psyllium	0,020	10	0,578	1449,45±46,11	7,2±0,23
Jablečná vláknina	0,004	10	1,386	3480,53±67,85	87,02±1,7
Konopná vláknina	0,004	10	0,487	1220,7±42,26	30,5±1,05

Poměrně vysoké hodnoty při stanovení redukujících cukrů měla jablečná vláknina, její hodnota byla 87,02 g/100 g. Naopak nejmenší obsah redukujících cukrů byl zjištěn u inulinu (5,7 g/100 g). Konopná vláknina, u které byla naměřena nejnižší koncentrace celkových cukrů, obsahovala vyšší podíl redukujících cukrů, přesněji 30,5 g/100 g.

Při stanovení celkových a redukujících cukrů u jednotlivých prebiotik bylo zjištěno, že v inulinu je obsaženo přes 50 % celkových cukrů a pouze 5 % redukujících cukrů. Psyllium obsahuje přes 95 % celkových cukrů, z toho redukující cukry tvoří jen 7 %. Jablečná vláknina obsahovala 87 % redukujících cukrů a konopná vláknina obsahovala přes 30 % redukujících cukrů. Lze předpokládat, že vyšší obsah redukujících cukrů je způsoben přítomností nižších oligosacharidů a monosacharidů, což je přístupnější substrát pro bakterie.

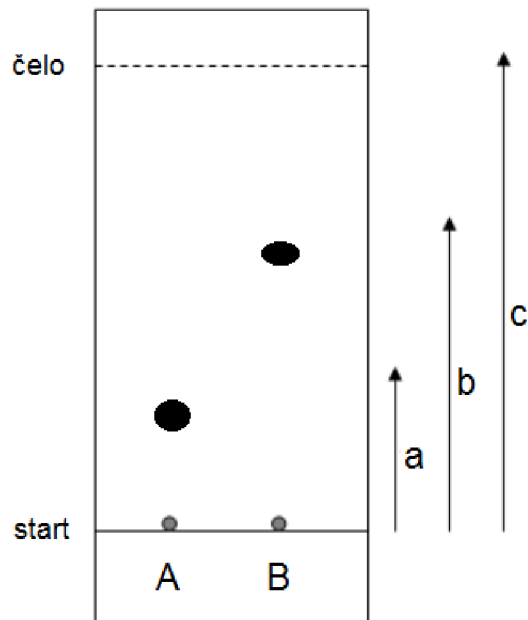
## 5.2 Stanovení obsahu sacharidů pomocí tenkovrstvé chromatografie

Na destičku ze Silufolu byly postupně naneseny vzorky standardů, následně vzorek inulinu po 2-hodinové hydrolýze, hodinové hydrolýze a po 20 minutách hydrolýzy, jablečná vláknina po 2-hodinové hydrolýze, hodinové hydrolýze, po 20 minutách hydrolýzy, následně konopná vláknina po 2-hodinové hydrolýze, hodinové hydrolýze a po 20 minutách hydrolýzy a jako poslední byla na destičku nanesena kapička psyllia po 2-hodinové hydrolýze, hodinové hydrolýze a po 20 minutách hydrolýzy. Po zaschnutí všech vzorků byl Silufol vložen do vyvíjejí směsi složené z butanolu, kyseliny octové a destilované vody. Po dosáhnutí vyvíjejí směsi pod vrchní okraj destičky byl Silufol vložen do sušárny. Po uschnutí byla celá destička postříkaná rozprašovačem s činidlem na detekci chromatogramu a opět byl Silufol vložen do sušárny. Po 5 minutách bylo možné na Silufolu vidět barevné skvrny, které znázorňují přítomnost sacharidů. Vytvořené skvrny byly označeny tužkou. Výsledný chromatogram lze vidět na Obrázku 19.



Obrázek 19: Chromatogram postupné hydrolyzy prebiotik

Pomocí pravítka byly změřeny vzdálenosti jednotlivých skvrn od startu. Následně byly vypočítány retenční faktory jednotlivých prebiotik. Výsledky retenčních časů jsou uvedeny v Tabulce 7. Jednotlivé retenční časy byly vypočítány podle schématu, které je na Obrázku 20.



Obrázek 20: Schéma pro výpočet retenčních faktorů

Retenční faktory byly vypočítány pro látku A podle vztahu  $Rf = a/c$  a pro látku B podle vztahu  $Rf = b/c$ . A je první nanesený vzorek, B je druhý nanesený vzorek, a je vzdálenost

středu první skvrny od počátku, b je vzdálenost středu druhé skvrny od počátku a c je vzdálenost od počátku vyvíjení do konce, kde doputovala vyvíjecí směs (vzdálenost od startu po čelo). Podle stejného vzorce byly vypočítány i retenční faktory v Tabulce 7.

Tabulka 7: Retenční časy jednotlivých skvrn z chromatogramu

Vzorek	Retenční čas 1	Retenční čas 2	Retenční čas 3	Retenční čas 4
Glukóza	0,25	-	-	-
Fruktóza	0,36	-	-	-
Inulin 2 hod.	0,77	0,64	0,36	0,24
Inulin 1 hod.	0,75	0,65	0,35	0,25
Inulin 20 min.	0,75	0,66	0,36	0,25
Jabl. vl. 2 hod.	0,37	0,20	-	-
Jabl. vl. 1 hod.	0,36	0,22	-	-
Jabl. vl. 20 min.	0,36	-	-	-
Kon. vl. 2 hod.	0,42	0,26	0,14	-
Kon. vl. 1 hod.	0,37	0,25	-	-
Kon. vl. 20 min.	0,37	0,25	-	-
Psyllium 2 hod.	0,48	-	-	-
Psyllium 1 hod.	0,78	-	-	-
Psyllium 20 min.	0,82	-	-	-

Tabulka 8: Srovnání retenčních časů testovaných standardů

	glukóza	fruktóza	sacharóza
Rf	0,25	0,36	0,15
	laktóza	maltóza	arabinóza
Rf	0,07	0,11	0,3
	rhamnóza	xylóza	galaktózy
Rf	0,47	0,4	0,2

### 5.2.1 Vyhodnocení tenkovrstevné chromatografie

Při porovnání retenčních časů standardů glukózy a fruktózy s retenčními časy ostatních prebiotik zjistíme, že glukózu obsahuje inulin a konopná vláknina a fruktózu inulin, jablečná a konopná vláknina. Další retenční časy, které byly zjištěny u prebiotik, odpovídaly přítomnosti dalších větších složek – oligosacharidů.

Inulin obsahoval už po 20 minutách hydrolýzy 4 viditelné složky, což se nezměnilo po celou dobu hydrolýzy. Podle retenčního času lze určit, že v inulinu je obsažena glukóza i fruktóza a další dvě složky, jedná se o dva typy oligosacharidů. Jablečná vláknina obsahovala po 20 minutách hydrolýzy pouze fruktózu a po hodině byla zjištěna ještě jedna další složka, která by podle retenčního času a podle barvy skvrny na chromatogramu měla označovat galaktózu. U konopné vlákniny byly po 2 hodinách hydrolýzy detekovány 3 viditelné složky podle retenčních časů bylo zjištěno, že se jedná o glukózu, fruktózu a sacharózu. U psyllia se jednotlivé složky nepodařilo identifikovat, jelikož na chromatogramu bylo vidět pouze jednu protáhlou skvrnu přes celý chromatogram. Po 20 minutách došlo k úplné hydrolýze a další složky už nebyly zaznamenány.

Bylo zjištěno, že při hydrolýze inulinu a psyllia stačí pouhých 20 minut na to, aby se prebiotikum zcela rozložilo a výsledky byly stejné i po delší hydrolýze. U konopné vlákniny a jablečné vlákniny bylo potřeba minimálně hodinové hydrolýzy, aby se celá rozložila

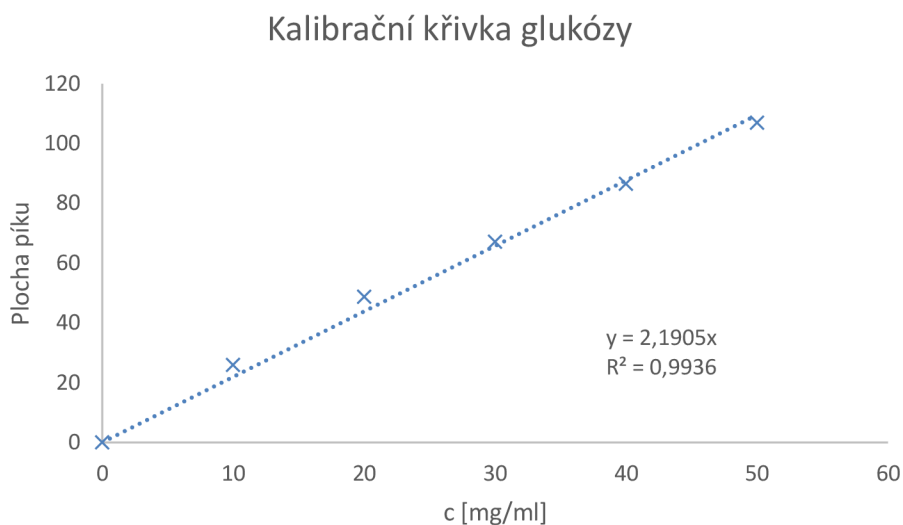
a abychom mohli identifikovat všechny hlavní složky, které konopná a jablečná vláknina obsahuje.

### 5.3 Stanovení obsahu sacharidů pomocí HPLC

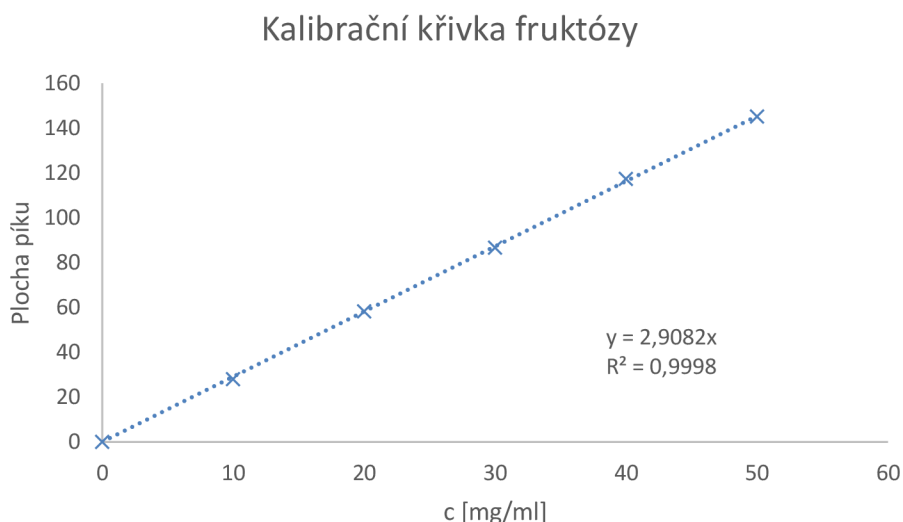
Při optimalizaci metody byly použity 2 typy kolon - kolona  $\text{NH}_2$  a kolona Rezex ROA-organic acid  $\text{H}^+$ . Jednotlivá měření probíhaly podle postupů uvedených v kapitole 4.6.

#### 5.3.1 Stanovení na $\text{NH}_2$ koloně

Byly provedeny kalibrace na některé cukry, v Grafu 3, 4 a 5 lze vidět kalibrační křivku pro glukózu, fruktózu a sacharózu. Hodnoty uvedené v grafech 3-5 jsou průměrem ze dvou měření.

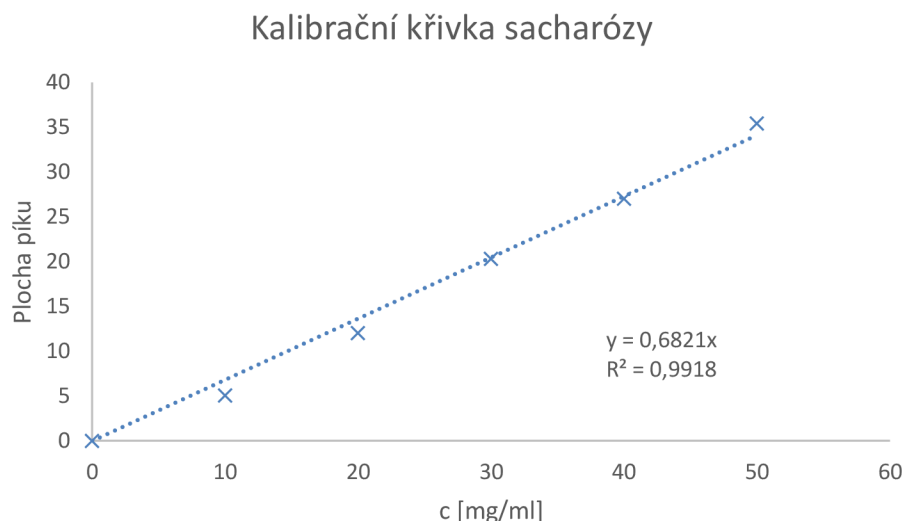


Graf 3: Kalibrační křivka glukózy stanovená na  $\text{NH}_2$  koloně



Graf 4: Kalibrační křivka fruktózy stanovená na  $\text{NH}_2$  koloně





*Graf 5: Kalibrační křivka sacharózy stanovená na NH<sub>2</sub> koloně*

Po zjištění rovnice regrese glukózy a fruktózy byly na kolonu nastříknuty vzorky nehydrolyzovaných a hydrolyzovaných prebiotik. Byl identifikován pík glukózy a fruktózy a z odečtené plochy píku a z rovnice regrese u kalibračních křivek byl vypočítán obsah glukózy a fruktózy v jednotlivých vzorcích. Výsledky jsou zpracovány v Tabulce 9 a 10. Hodnoty uvedené v tabulkách 9 a 10 jsou průměrem ze dvou měření.

*Tabulka 9: Obsah glukózy a fruktózy u nehydrolyzovaných prebiotik*

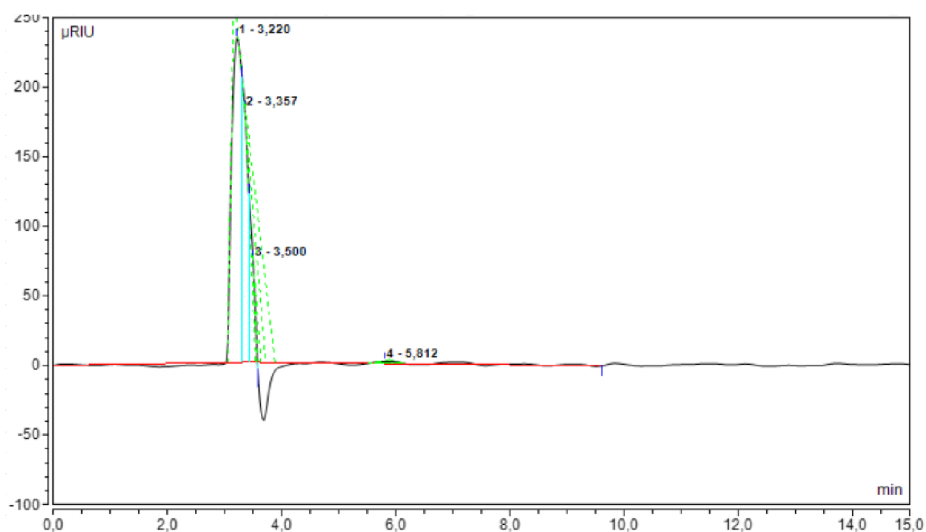
Nehydrolyzované prebiotika	Obsah glukózy [mg/g]	Obsah fruktózy [mg/g]
Inulin	15,6197	2,8121
Psyllium	0,1961	0,0468
Jablečná vláknina	0,3279	0,3165
Konopná vláknina	4,0923	1,1934

*Tabulka 10: Obsah glukózy a fruktózy u hydrolyzovaných prebiotik*

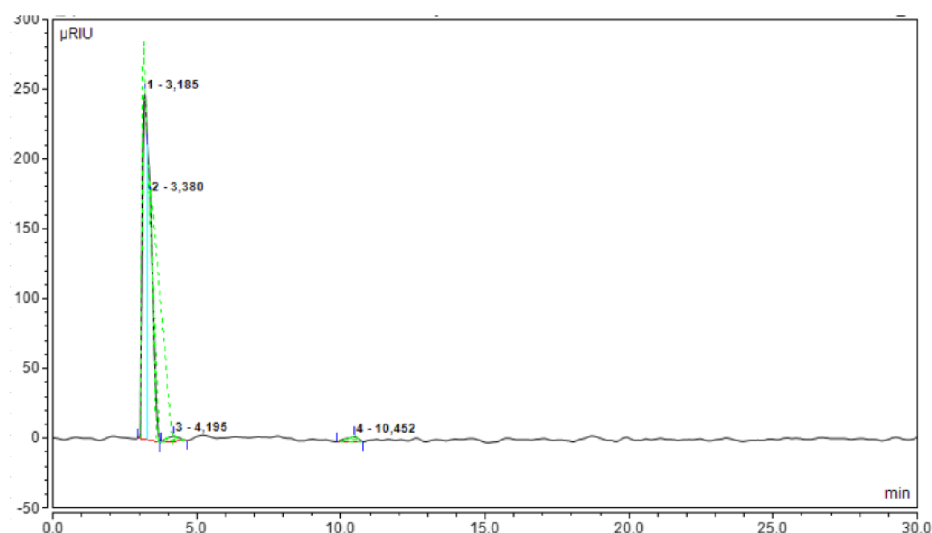
Hydrolyzovaná prebiotika	Obsah glukózy [mg/g]	Obsah fruktózy [mg/g]
Inulin	859,5937	34,0176
Psyllium	302,9993	48,9959
Jablečná vláknina	40,2374	69,7717
Konopná vláknina	2,1411	7,5614

U nehydrolyzovaných prebiotik bylo zjištěno, že nejvíce glukózy obsahuje inulin, obsah glukózy v tomto prebiotiku je 15,6197 mg/g. Obsah glukózy v konopné vláknině bylo 4,0923 mg/ml. V psylliu a v konopné vláknině bylo obsaženo pouze stopové množství tohoto cukru. Fruktózu obsahoval ve vyšším množství pouze inulin a konopná vláknina. Inulin obsahoval 5x vyšší množství glukózy než fruktózy. U hydrolyzovaných prebiotik byl výrazný nárůst obsahu glukózy u inulinu a u psyllia. Fruktózu obsahoval inulin, psyllium a jablečná vláknina a to přibližně mezi 34 – 70 mg/g. V menším množství byla fruktóza detekována i v konopné vláknině.

Pro srovnání grafu z HPLC pro nehydrolyzované a hydrolyzované prebiotikum byla zvolena jablečná vláknina, jejíž grafy jsou v Grafu 6 a 7. Tato kolona nebyla dostatečně citlivá, abychom z grafů mohli rozpoznat píky pro jednotlivé oligosacharidy a disacharidy.



Graf 6: Chromatogram nehydrolyzované jablečné vlákniny

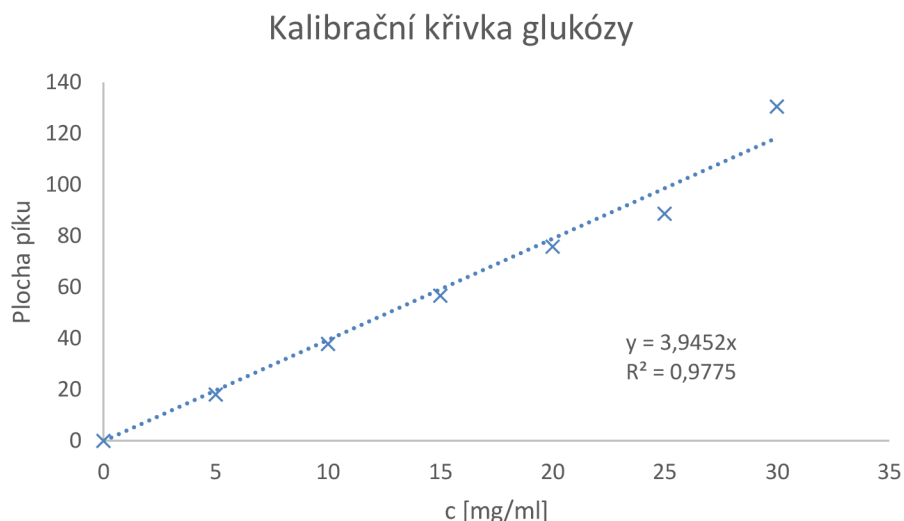


Graf 7: Chromatogram hydrolyzované jablečné vlákniny

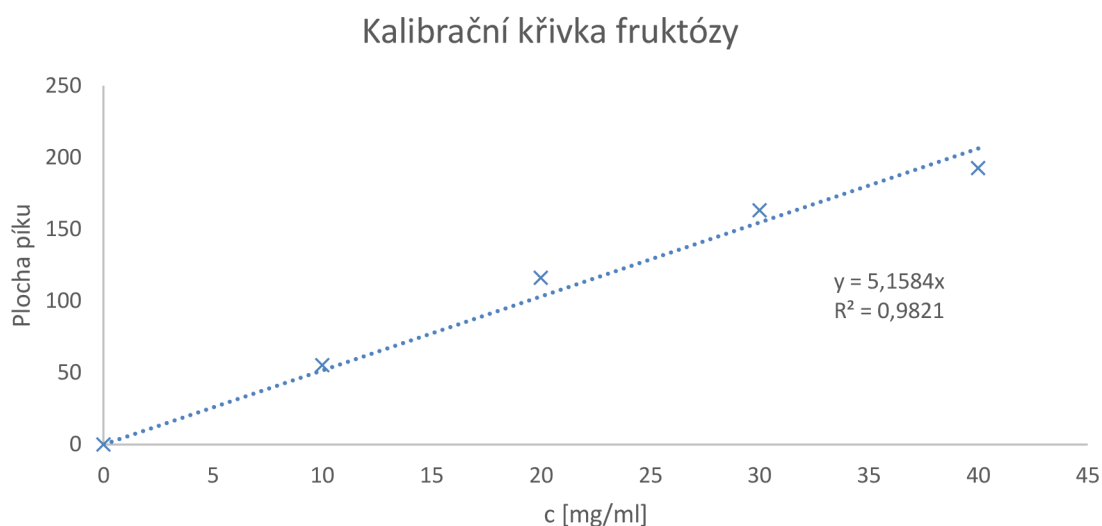
U nehydrolyzované vlákniny lze vidět pouze pík rozpouštědla a jeden malý pík. V 6. minutě se na  $\text{NH}_2$  koloně detekuje glukóza. Oproti tomu u hydrolyzované vlákniny můžeme vidět více píků, takže jde vidět, že v jablečné vláknině se vyskytuje více složek. Celkově nejvíce píků obsahoval inulin, který před hydrolýzou obsahoval 2 různé oligosacharidy a po hydrolýze 4. U psyllia a u konopné vlákniny nebylo možné na této koloně z důvodu nízké citlivosti rozlišit další píky.

### 5.3.2 Stanovení sacharidů na Rezex koloně

Byly provedeny kalibrace na glukózu a fruktózu, kalibrační křivky lze vidět v Grafu 8 a 9. Hodnoty uvedené v grafech 8 a 9 jsou průměrem ze dvou měření.



Graf 8: Kalibrační křivka glukózy stanovená na koloně Rezex



Graf 9: Kalibrační křivka fruktózy stanovená na koloně Rezex

Po zjištění rovnice regrese glukózy a fruktózy byly na kolonu nastříknuty vzorky prebiotik nehydrolyzovaných a hydrolyzovaných. Byl identifikován pík glukózy a fruktózy a z odečtené plochy píku a z rovnice regrese u kalibračních křivek byl vypočítán obsah glukózy a fruktózy v jednotlivých prebiotících. Výsledky jsou zpracovány v tabulce 11 a 12. Hodnoty uvedené v tabulkách jsou průměrem ze dvou měření.

Tabulka 11: Obsah glukózy a fruktózy u nehydrolyzovaných prebiotik

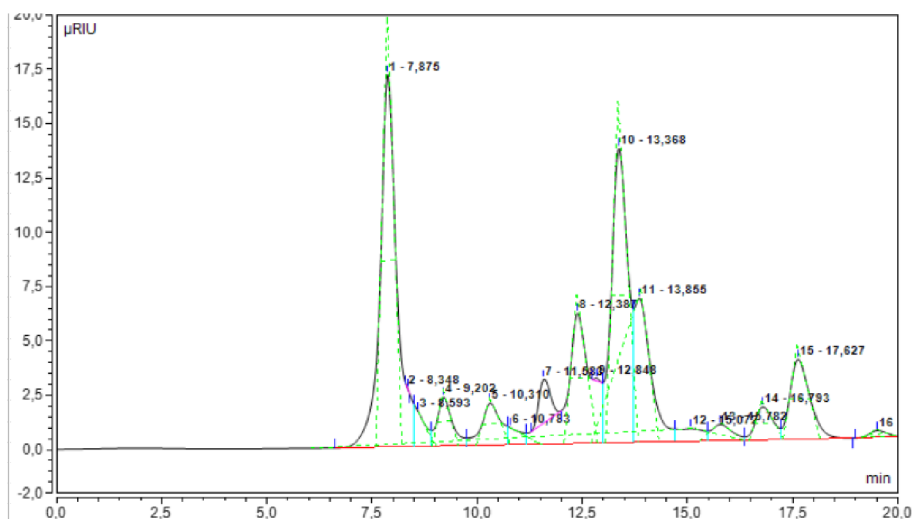
Nehydrolyzovaná prebiotika	Obsah glukózy [mg/g]	Obsah fruktózy [mg/g]
Inulin	21,0896	6,2727
Psyllium	0,0016	0,0007
Jablečná vláknina	0,8739	1,1982
Konopná vláknina	7,1456	2,7162

Tabulka 12: Obsah glukózy a fruktózy u hydrolyzovaných prebiotik

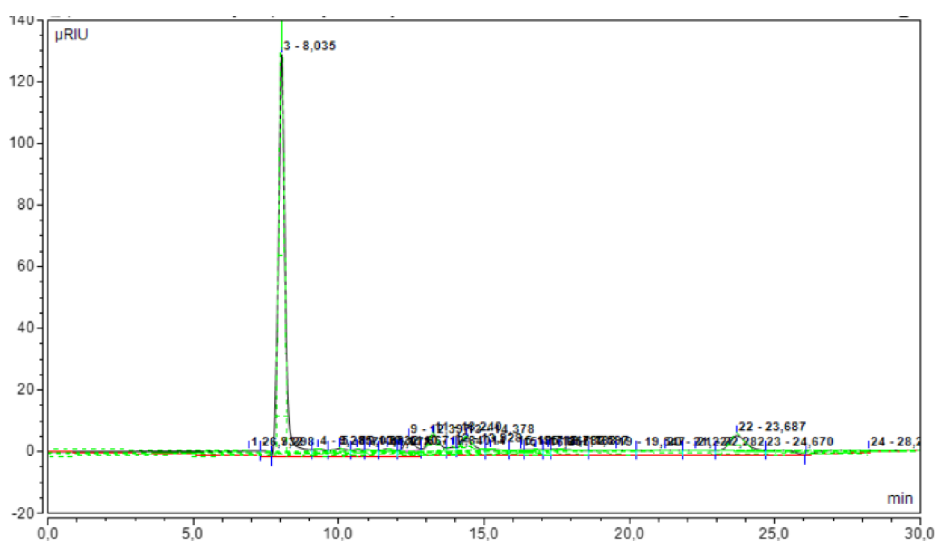
Hydrolyzovaná prebiotika	Obsah glukózy [mg/g]	Obsah fruktózy [mg/g]
Inulin	110,3239	326,9929
Psyllium	83,9907	307,3472
Jablečná vláknina	38,6951	70,9270
Konopná vláknina	52,2432	29,9337

Při měření nehydrolyzovaných prebiotik byl zjištěn nejvyšší obsah glukózy u inulinu. V malém množství se glukóza vyskytuje i u konopné vlákniny. Inulin obsahuje i nejvyšší množství fruktózy ze všech prebiotik, v menší míře se fruktóza nachází v jablečné a konopné vláknině. Po hydrolyze bylo největší množství glukózy zaznamenáno opět u inulinu, a to v množství 110,3239 mg/g. Nejvyšší množství fruktózy bylo u inulinu a psyllia, u obou prebiotik měla fruktóza nad 300 mg/g.

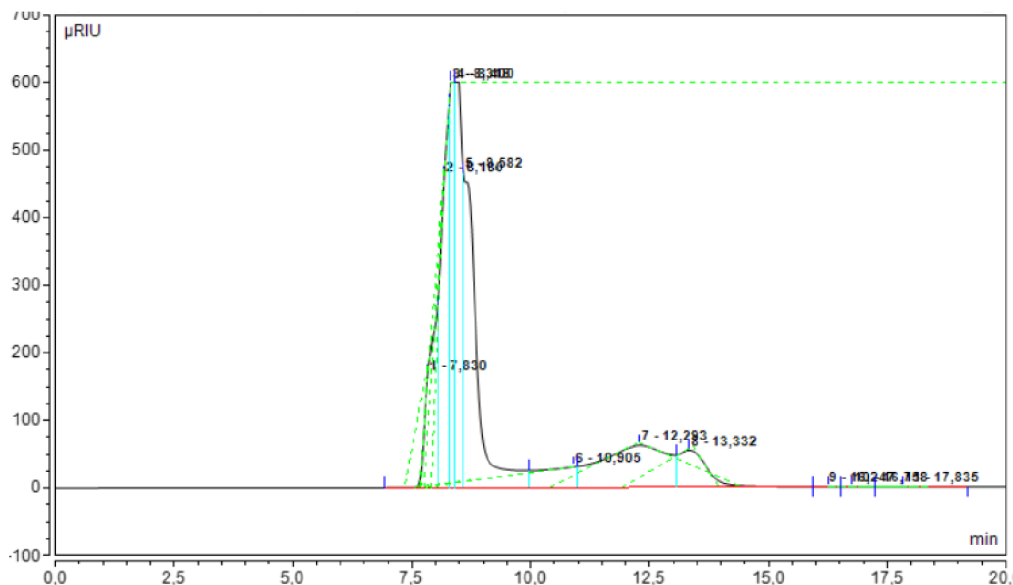
Pro srovnání grafu z HPLC pro nehydrolyzované a hydrolyzované prebiotikum byla zvolena jablečná vláknina a inulin, jejich chromatogramy jsou uvedeny v Grafu 10, 11, 12 a 13.



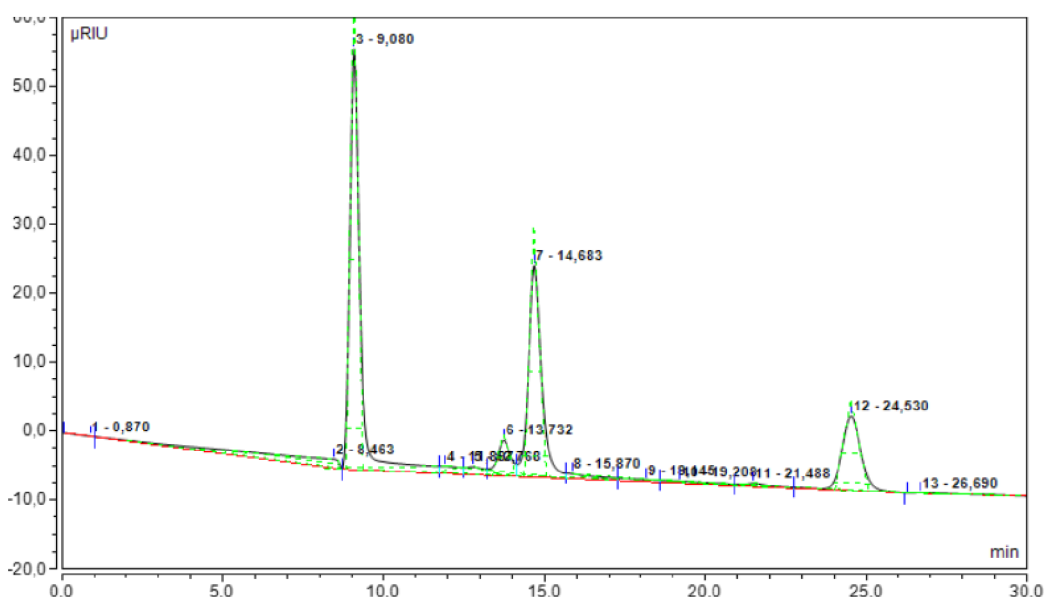
Graf 10: Chromatogram nehydrolyzované jablečné vlákniny



Graf 11: Chromatogram hydrolyzované jablečné vlákniny



Graf 12: Chromatogram nehydrolyzovaného inulinu



Graf 13: Chromatogram hydrolyzovaného inulinu

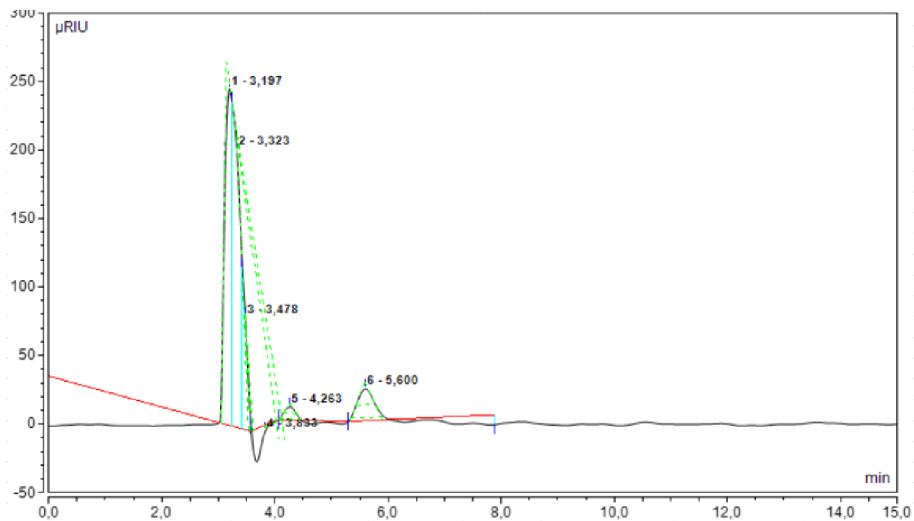
V prvním chromatogramu, který zobrazuje složky jablečné vlákniny před hydrolyzou, můžeme pozorovat 16 různých píků. Po hydrolyze se obsah jednotlivých složek zvýšil na 24. Inulin obsahoval před hydrolyzou pouze 3 různé oligosacharidy, po hydrolyze lze vidět, že inulin obsahuje navíc dalších 8 složek. Nehydrolyzované psyllium obsahovalo 7 oligosacharidů, v hydrolyzovaném psylliu bylo navíc dalších 15 složek. Nejvíce oligosacharidů ze všech prebiotik a disacharidů obsahovala jablečná vláknina.

### 5.3.3 Vyhodnocení měření na HPLC

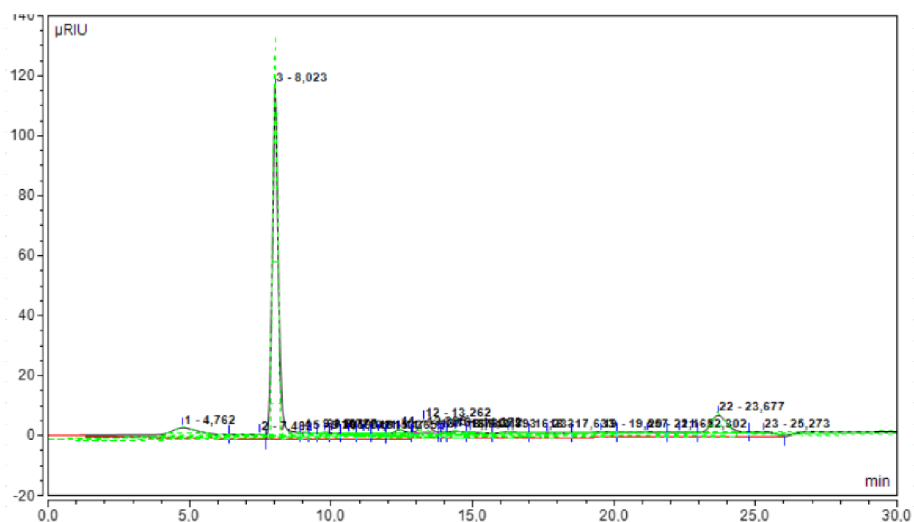
Pro charakterizaci prebiotik byla vhodnější kolona typu Rezex, jelikož měla vyšší citlivost. Při porovnání chromatogramů z kolony typu NH<sub>2</sub> a typu Rezex vidíme, že na citlivější koloně lze vidět mnohonásobně vyšší počet píků a tudíž můžeme identifikovat více složek. Příklad

chromatogramu je uveden v grafu a pro konopnou vlákninu. Bylo zjištěno, že u kolony NH<sub>2</sub> je možné rozlišit pouze 6 píků, kdežto z chromatogramu z kolony Rezex je možné identifikovat 25 různých píků. Na koloně typu NH<sub>2</sub> byla zaznamenána ve všech případech především jen glukóza a fruktóza a ostatní oligosacharidy nebyly v chromatogramu vůbec vidět. Na koloně Rezex bylo možné rozlišit mnohem vyšší obsah složek.

Z časových důvodů jsme se zaměřili pouze na podrobnější identifikaci glukózy a fruktózy. Bylo zjištěno, že u NH<sub>2</sub> kolony se plocha píku odečítala v 6,5. minutě, plocha fruktózy v 6. minutě. Při měření s kolonou Rezex byla plocha píku glukózy odečítaná v 12,5. minutě a plocha fruktózy v 13,5. minutě. Bylo zjištěno, že oligosacharidy byly v chromatogramu mezi 8, až 10. minutou a disacharidy mezi 11. – 13. minutou.



Graf 14: Chromatogram konopné vlákniny na NH<sub>2</sub> koloně



Graf 15: Chromatogram konopné vlákniny na koloně typu Rezex

## 5.4 Kultivace mléčných bakterií

Kultivace probíhala podle postupu uvedeném v kapitole 4.7. Byla provedena kultivace probiotik na médiích s přidavkem nehydrolyzovaných a hydrolyzovaných prebiotik a kultivace s přidáním reálné potraviny do média.

#### 5.4.1 Kultivace probiotik na médiích s přidavkem nehydrolyzovaných prebiotik

Při kultivaci bakterií bylo do MRS média přidáno prebiotikum, a to ve 2 koncentracích. Nižší koncentrace vlákniny byla 10 mg/1 ml média a vyšší koncentrace byla 100 mg/1 ml média. Kultivace probíhala celkem 4 dny a měření zákalu bylo prováděno po 1 dnu, po 2 dnech a po 4 dnech. Vždy byly sterilně odebrány 2 ml vzorku a změřeny na spektrofotometru při vlnové délce 630 nm. Každé měření bylo provedeno 2x, v Tabulce 13 jsou uvedeny již zprůměrované výsledky.

Tabulka 13: Výsledky spektrofotometrického stanovení

Vzorek	Měření absorbance po 24 hodinách	Měření absorbance po 48 hodinách	Měření absorbance po 96 hodinách
<b>Lactobacillus acidophilus</b>	0,684	0,889	1,459
LA + 10 mg inulinu	0,631	0,678	1,449
LA + 100 mg inulinu	0,554	0,899	0,972
LA + 10 mg jablečné vlákniny	0,644	0,954	1,328
LA + 100 mg jablečné vlákniny	0,59	0,974	1,181
LA + 10 mg konopné vlákniny	0,546	0,868	0,715
LA + 100 mg konopné vlákniny	0,846	0,874	1,37
<b>Bifidobacterium breve</b>	0,246	0,461	0,606
BB + 10 mg inulinu	0,321	0,446	0,641
BB + 100 mg inulinu	0,307	0,283	1,692
BB + 10 mg jablečné vlákniny	0,326	0,469	1,638
BB + 100 mg jablečné vlákniny	0,458	0,633	0,927
BB + 10 mg konopné vlákniny	0,329	0,239	1,164
BB + 100 mg konopné vlákniny	0,432	0,342	0,898

Byly připraveny vzorky i se dvěma koncentracemi psyllia, ale tato vláknina vytvořila gel a nebylo možné tento typ média změřit na spektrofotometru.

Z výsledků je vidět, že zákal téměř ve všech typech média se v průběhu času zvyšuje, což znamená, že se počet buněk v jednotlivých médiích zvyšuje. Ve všech případech byl zákal po 4 dnech měření téměř dvojnásobný, u 10 mg jablečné a konopné vlákniny u probiotik typu *Bifidobacterium breve* byl zákal dokonce trojnásobně velký.

U bakterií *Lactobacillus acidophilus* byl po 24 hodinách největší zákal naměřen u konopné vlákniny, ovšem po 96 hodinách byl zákal nejvyšší u probiotik samotných nebo u probiotik společně s inulinem.

U bakterií *Bifidobacterium breve* bylo zjištěno, že po prvním měření byla nejvyšší hodnota naměřena u jablečné a konopné vlákniny. Po 96 hodinách byl nejvyšší zákal naměřen u opět u inulinu. Proto u obou typů bakterií se jako nejvhodnější prebiotikum pro růst bakterií jeví inulin.

Dále byla stanovena koncentrace a viabilita buněk pomocí průtkové cytometrie. Následující tabulka srovnává viabilitu buněk bakterií *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve*, po jejich 24hodinové kultivaci společně s prebiotiky. Koncentrace prebiotika byla 10 mg/ml.

Tabulka 14: Viabilita a koncentrace bakterií po 24 hodinové kultivaci

Typ bakterií	Složení kultivačního média	Výchozí c buněk [evt/μl]	živé/mrtvé [%]
LA	1 ml MRS média	1333	95/5
LA	1 ml MRS média + 0,01 g inulinu	1115	100/0
LA	1 ml MRS média + 0,01 g JV	1582	98/2
LA	1 ml MRS média + 0,01 g KV	2328	98/2
BB	1 ml MRS média	988	96/4
BB	1 ml MRS média + 0,01 g inulinu	417	98/2
BB	1 ml MRS média + 0,01 g JV	895	93/7
BB	1 ml MRS média + 0,01 g KV	872	96/4

Z těchto výsledků můžeme přehledně posoudit vliv prebiotika v médiu na růst bakterií. Na *Lactobacillus acidophilus* má největší vliv konopná vláknina. Po přidání konopné vlákniny do MRS média můžeme vidět skoro dvojnásobně rychlý růst bakterií. Z Tabulky 14 vyplývá, že po kultivaci bakterií typu *Lactobacillus acidophilus* pouze v MRS médiu, které sloužilo jako srovnávací médium, byla naměřena nejnižší koncentrace buněk, tudíž přídavek jablečné i konopné vlákniny příznivě ovlivňuje růst buněk.

U bakterií *Bifidobacterium breve* vláknina nijak neovlivnila růst bakterií. Největší koncentrace buněk je v obyčejném MRS médiu. Je možné, že bakterie při přídavku vlákniny rostou pomaleji, ale díky tomu mohou být vitálnější z dlouhodobého hlediska. Proto bylo následně provedeno další měření, kdy byla zkoumána viabilita buněk po přídavku prebiotika v různých časových obdobích.

Nejvyšší viabilita byla zjištěna u inulinu, kde bylo v obou případech nad 98 % živých bakterií. Celkově viabilita nebyla nižší než 93 %.

#### 5.4.2 Kultivace probiotik na médiích s přídavkem hydrolyzovaných prebiotik

Bylo vytvořeno několik typů médií, ve kterých byly následně kultivovány probiotika. Pro přípravu médií bylo využito komerční MRS médium a hydrolyzovaná prebiotika v různých poměrech. Složení jednotlivých médií jsou detailně rozepsány v Tabulce 15. Vzorky z těchto médií byly použity na spektrofotometrické stanovení a na stanovení viability na průtokovém cytometru.

Tabulka 15: Složení médií pro kultivaci bakterií

	MRS médium [ml]	LA [ml]	BB [ml]	inulin [ml]	psyllium [ml]	konopná vláknina [ml]	jablečná vláknina [ml]
LA - blank	5	0,5	0	0	0	0	0
LA + 0,5 ml inulinu	4,5	0,5	0	0,5	0	0	0
LA + 2,5 ml inulinu	2,5	0,5	0	2,5	0	0	0
LA + 5 ml inulinu	0	0,5	0	5	0	0	0
LA + 0,5 ml psyllia	4,5	0,5	0	0	0,5	0	0
LA + 2,5 ml psyllia	2,5	0,5	0	0	2,5	0	0
LA + 5 ml psyllia	0	0,5	0	0	5	0	0
LA + 0,5 ml KV	4,5	0,5	0	0	0	0,5	0
LA + 2,5 ml KV	2,5	0,5	0	0	0	2,5	0
LA + 5 ml KV	0	0,5	0	0	0	5	0
LA + 0,5 ml JV	4,5	0,5	0	0	0	0	0,5
LA + 2,5 ml JV	2,5	0,5	0	0	0	0	2,5



LA + 5 ml JV	0	0,5	0	0	0	0	5
BB - blank	5	0	0,5	0	0	0	0
BB + 0,5 ml inulinu	4,5	0	0,5	0,5	0	0	0
BB + 2,5 ml inulinu	2,5	0	0,5	2,5	0	0	0
BB + 5 ml inulinu	0	0	0,5	5	0	0	0
BB + 0,5 ml psyllia	4,5	0	0,5	0	0,5	0	0
BB + 2,5 ml psyllia	2,5	0	0,5	0	2,5	0	0
BB + 5 ml psyllia	0	0	0,5	0	5	0	0
BB + 0,5 ml KV	4,5	0	0,5	0	0	0,5	0
BB + 2,5 ml KV	2,5	0	0,5	0	0	2,5	0
BB + 5 ml KV	0	0	0,5	0	0	5	0
BB + 0,5 ml JV	4,5	0	0,5	0	0	0	0,5
BB + 2,5 ml JV	2,5	0	0,5	0	0	0	2,5
BB + 5 ml JV	0	0	0,5	0	0	0	5

#### 5.4.2.1 Spektrofotometrické stanovení

Po 24 hodinové kultivaci probiotik s prebiotiky byl sterilně odebrán 1 ml vzorku od každého typu. Vzorky byly měřeny na spektrofotometru při vlnové délce 630 nm. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 16.

Tabulka 16: Výsledky ze spektrofotometrického stanovení koncentrace buněk

	A		A
LA - blank	0,307	BB - blank	0,247
LA + 0,5 ml inulinu	0,166	BB + 0,5 ml inulinu	0,16
LA + 2,5 ml inulinu	0,485	BB + 2,5 ml inulinu	0,466
LA + 5 ml inulinu	0,677	BB + 5 ml inulinu	0,647
LA + 0,5 ml psyllia	0,118	BB + 0,5 ml psyllia	0,112
LA + 2,5 ml psyllia	0,148	BB + 2,5 ml psyllia	0,146
LA + 5 ml psyllia	0,206	BB + 5 ml psyllia	0,193
LA + 0,5 ml KV	0,206	BB + 0,5 ml KV	0,225
LA + 2,5 ml KV	0,559	BB + 2,5 ml KV	0,489
LA + 5 ml KV	0,658	BB + 5 ml KV	0,685
LA + 0,5 ml JV	0,135	BB + 0,5 ml JV	0,11
LA + 2,5 ml JV	0,305	BB + 2,5 ml JV	0,295
LA + 5 ml JV	0,314	BB + 5 ml JV	0,305

Podle výsledků měření, které jsou uvedeny v Tabulce 16 lze usoudit, že nejvíce buněk je v médiích, které jsou složeny pouze z prebiotik. Nejvíce buněk pak bylo stanoven v médiu, které je složeno pouze z inulinu. Jelikož spektrofotometr ale měří zákal a vlivem hydrolyzovaných prebiotik měla média různou barvu a obsahovala slabý zákal hydrolyzovaných zbytků, jsou výsledky značně zkresleny. Z tohoto důvodu byly tedy následně všechny vzorky měřeny na průtokovém cytometru, kde byla sledována nejen přesná koncentrace buněk, ale rovněž jejich viabilita.

#### 5.4.2.2 Stanovení pomocí průtokové cytometrie

Sterilně bylo odebráno 0,1 ml vzorku ze všech typů médií po 24 hodinové kultivaci, po 48hodinové kultivaci a po 62 hodinové kultivaci. Bylo tedy zjišťováno, jak se mění

koncentrace buněk v jednotlivých typech médií v rozmezí 3 dnů. Výsledky s měření na průtokovém cytometru lze vidět v Tabulce 17 a v Tabulce 18. Složení médií je popsáno v Tabulce 15.

Tabulka 17: Výsledky z průtokového cytometru pro bakterie typu *Lactobacillus acidophilus*

	po 24 hodinách [evt/ $\mu$ l]	po 48 hodinách [evt/ $\mu$ l]	po 72 hodinách [evt/ $\mu$ l]
LA - blank	4622	11949	10667
LA + 0,5 ml inulinu	1693	2300	2113
LA + 2,5 ml inulinu	1597	2482	3305
LA + 5 ml inulinu	735	649	672
LA + 0,5 ml psyllia	1250	1376	1777
LA + 2,5 ml psyllia	931	1454	1279
LA + 55 ml psyllia	458	1513	1182
LA + 0,5 ml KV	1443	1995	1668
LA + 2,5 ml KV	1180	1141	1061
LA + 5 ml KV	2042	2011	3139
LA + 0,5 ml JV	2702	2712	2231
LA + 2,5 ml JV	745	817	898
LA + 5 ml JV	2852	1706	1322

Tabulka 18: Výsledky z průtokového cytometru pro bakterie typu *Bifidobacterium breve*

	po 24 hodinách [evt/ $\mu$ l]	po 48 hodinách [evt/ $\mu$ l]	po 42 hodinách [evt/ $\mu$ l]
BB - blank	5594	9210	10120
BB + 0,5 ml inulinu	2106	2408	2055
BB + 2,5 ml inulinu	1117	3068	3383
BB + 5 ml inulinu	599	572	512
BB + 0,5 ml psyllia	1375	1495	1651
BB + 2,5 ml psyllia	894	1483	967
BB + 55 ml psyllia	709	1375	818
BB + 0,5 ml KV	1603	2046	1459
BB + 2,5 ml KV	987	1300	1010
BB + 5 ml KV	1519	2734	1588
BB + 0,5 ml JV	3023	2661	2019
BB + 2,5 ml JV	785	537	371
BB + 5 ml JV	1236	2224	927

Z výsledků je patrné, že oběma typům bakterií vyhovuje spíše čisté médium než hydrolyzát. Na hydrolyzáttech jsou sice schopny růst, ale hůře, ve výrazně menším množství. Hydrolyzát tudíž nebyl nejvhodnější, ale i přesto na něm buňky rostly a po 24 hodinách měly 100% viabilitu. U *Lactobacillus acidophilus* bylo po jednom dnu 7,5 % mrtvých buněk, po 2 dnech bylo 9 % mrtvých a po 3 dnech bylo 14,4 % mrtvých bakterií. U přidaných vláknin byly mrtvé buňky zjištěny jen u média, které bylo složeno pouze z hydrolyzátu a to maximálně do 2 %.

Buňky *Bifidobacterium breve* rostly také více na čistých médiích, ale opět po třech dnech bylo 8 % buněk mrtvých. U médií složených i z hydrolyzátu byly buď všechny živé, nebo výjimečně u některých médií se objevily mrtvé buňky o koncentraci do 1,5 %. V hydrolyzátu měly tedy všechny buňky živé, což je výhodné, pokud potřebujeme trvanlivý výrobek.

Probiotické kultury jsou citlivé na přítomnost živin, ke svému růstu potřebují řadu minerálů a vitamínů v médiu, proto se nejčastěji ke kultivaci využívá MRS médium, které všechny potřebné složky pro růst mikroorganismů obsahuje. Při tomto měření bylo zjištěno, že probiotika jsou schopna růst i na médiu, které je složeno pouze z hydrolyzátu bez přídavku různých živin. Nabízí se zde potenciální možnost nahrazení finančně náročnějšího MRS média za hydrolyzát z prebiotika a tudíž možnost ke zlevnění výroby. Firmy by nemusely kultivovat probiotika pro přípravu tabletek v MRS médiu. Hydrolyzát je levnější a dostatečně nutričně bohatý na to, aby na něm probiotika rostly.

### 5.4.3 Kultivace probiotik na médiích s přídavkem mléka

Byla provedena kultivace bakterií typu *Lactobacillus acidophilus* v reálné potravine podle postupu uvedeného v Kapitole 4.11. Reálnou potravinou bylo obyčejné mléko a bylo jím nahrazeno buď část média nebo celé médium. Výsledky měření viability jsou popsány v Tabulce 19.

Tabulka 19: Stanovení viability buněk v reálném médiu

Složení kultivačního média	Výchozí c buněk [evt/ $\mu$ l]	Živé buňky v 1 $\mu$ l [%]	Živé buňky v 1 $\mu$ l [%]
5 ml MRS média	12897	63,2	36,8
5 ml mléka	10380	100	0
2,5 ml MRS média + 2,5 ml mléka	17821	100	0

Po 24 hodinové kultivaci probiotik v MRS médiu a v médiích s mlékem vidíme, že největší koncentrace buněk je v médiu, které je složeno z kombinace MRS média s mléka. Z Tabulky 19 také vyplývá, že bakterie jsou všechny živé, kdežto pouze v čistém srovnávacím MRS médiu je obsah mrtvých bakterií přes 1/3. V mléce jako zdroj živin využívaly probiotika laktózu, rostly pomaleji, ale jejich viabilita byla v průběhu delší doby výrazně vyšší. V MRS médiu rostou buňky *Lactobacillus acidophilus* rychleji, ale jejich životnost výrazně klesá už po jednom dni.

I když by nejspíš mléko bylo nejlepším kultivačním médiem pro probiotika, tak nebylo vhodné pro další analýzy a nebylo dále využíváno z důvodu probíhajícího výrazného mléčného kvašení, především u kmene *Lactobacillus acidophilus*.

## 5.5 Koenkapsulace probiotik a prebiotik

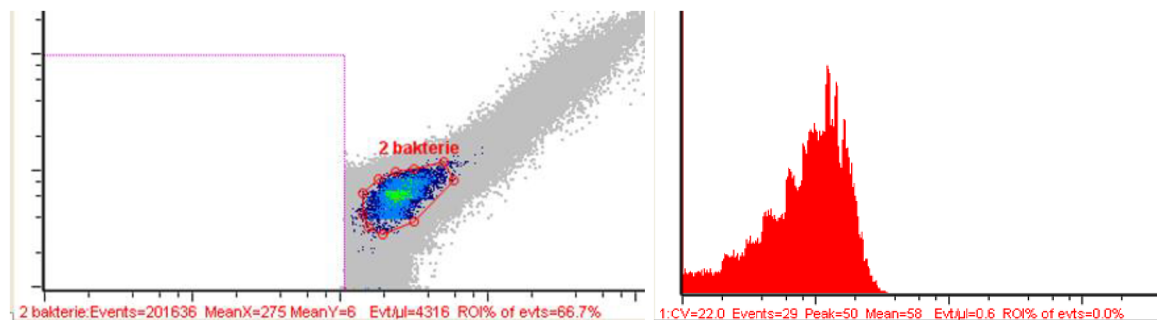
### 5.5.1 Stanovení viability buněk před enkapsulací probiotik

Průtoková cytometrie byla využívána pro měření viability buněk mikroorganismů po 24 hodinové kultivaci, kdy bylo potřeba zjistit poměr živých a mrtvých buněk před tím, než se buňky enkapsulují do částic. Celkově bylo měření na průtokovém cytometru provedeno s každou kulturou 2x. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 20. Na Obrázcích 21, 22 a 23 jsou uvedeny příklady záznamů analýzy viability buněk z průtokového cytometru.

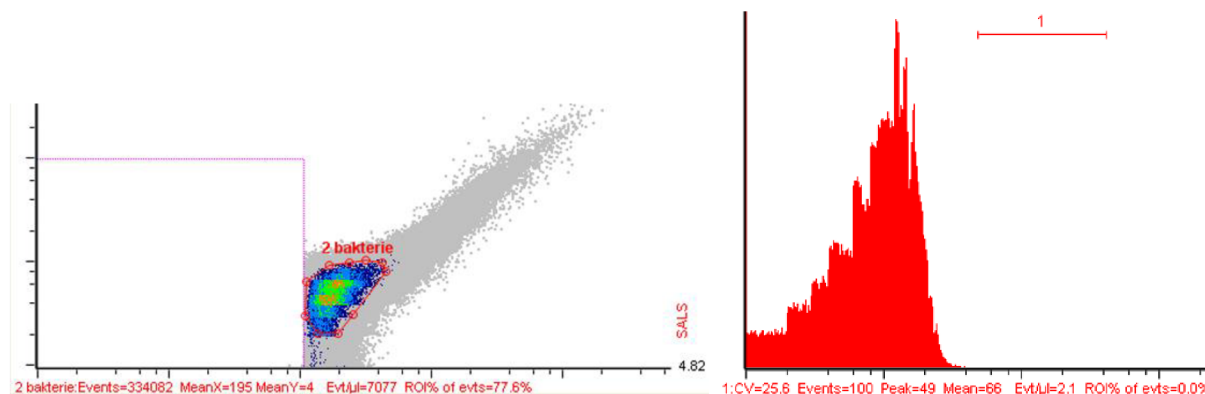
Tabulka 20: Poměr živých a mrtvých bakterií po 24hodinové kultivaci

Měření	Typ bakterií	Výchozí c buněk [evt/ $\mu$ l]	Živé buňky v 1 $\mu$ l [%]	Mrtvé buňky v 1 $\mu$ l [%]
1.	LA	1856	98	2
	BB	15693	93	7
2.	LA	5458	90,9	9,1
	BB	7541	90	10

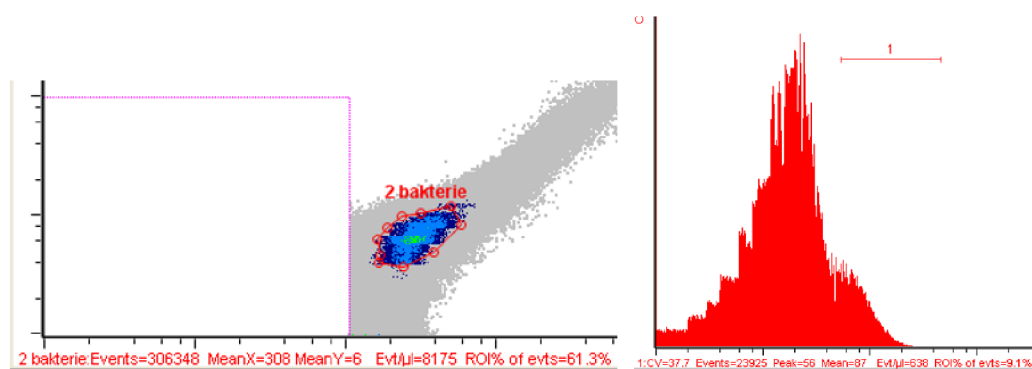
Zkratka LA znamená typ bakterie *Lactobacillus acidophilus* a BB je bakterie *Bifidobacterium breve*.



Obrázek 21: Viabilita buněk *Lactobacillus acidophilus* po 24hodinové kultivaci (na obrázku vlevo je vidět ohraničení buněk, ze kterých je následně vypočítán poměr živých a mrtvých buněk, na obrázku vpravo je vidět pík, který zobrazuje počet živých buněk)



Obrázek 22: Viabilita buněk *Bifidobacterium breve* po 24hodinové kultivaci (v okně na levé straně můžeme vidět ohraničení buněk, ze kterých je následně vypočítán poměr živých a mrtvých buněk, v okně na pravé straně lze vidět pík, který představuje množství živých buněk)



Obrázek 23: Viabilita buněk *Lactobacillus acidophilus* po 24hodinové kultivaci (v okně na levé straně lze vidět ohraničení buněk, ze kterých je následně vypočítán poměr živých a mrtvých buněk, v okně na pravé straně lze vidět 2 píky, vyšší pík vlevo představuje množství živých buněk a malý pík vpravo představuje množství mrtvých buněk)

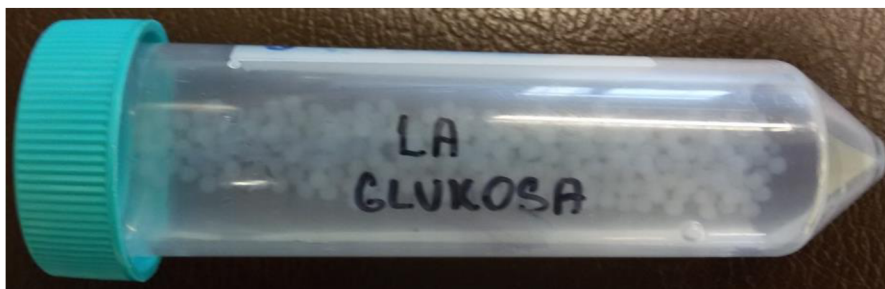
Po 24hodinové kultivaci bylo ve všech vzorcích vždy nad 90 % živých buněk. Tyto bakterie, u kterých byla zjištěna dostatečná viabilita, byly použity pro enkapsulaci společně s prebiotiky.

K enkapsulaci byly použity kmeny *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve*, buňky byly enkapsulovány samostatně, s přidavkem glukózy a s přidavkem prebiotik. Byla testována možnost přidavku dvou různých koncentrací prebiotik, rovněž výchozí koncentrace probiotických buněk byla testována v různých koncentracích. Enkapsulace byla provedena do alginátových částic, dle postupu uvedeného v kapitole 4.8. Pro srovnání byly připraveny částice dvou velikostí – malé o průměru 1 mm a velké s průměrem 2-4 mm. Vybrané částice lze vidět na Obrázcích 24-29. Po přípravě částic byla zjištěna 100% enkapsulační účinnost, veškeré buňky včetně nehydrolyzované vlákniny byly enkapsulovány do alginátových kuliček.

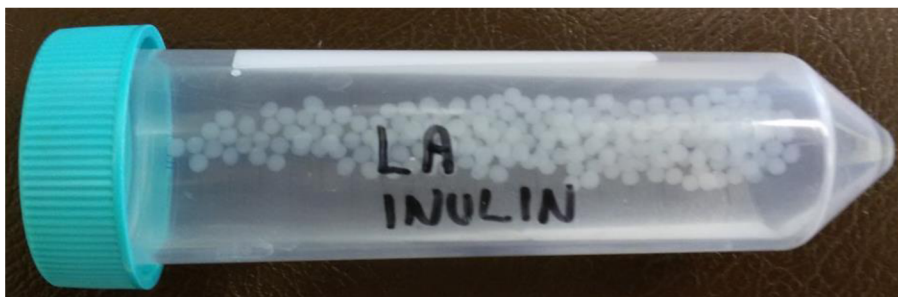
Částice byly poté po dobu 6 týdnů uchovávány v 2,5% kyselině citrónové. V průběhu skladování byla sledována stabilita těchto částic a rovněž koncentrace a viabilita enkapsulovaných probiotických buněk.



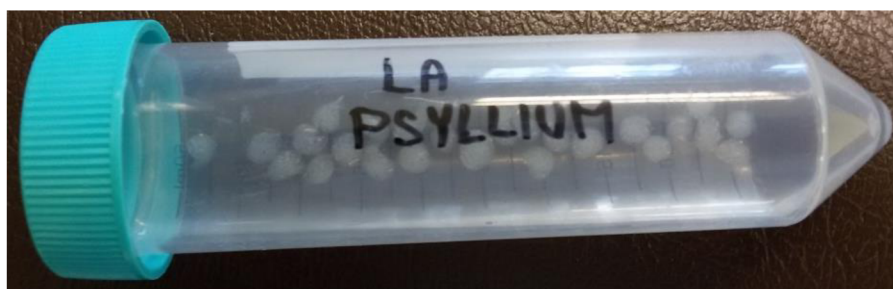
Obrázek 24: Částice pouze s probiotikem



Obrázek 25: Částice s přidavkem glukózy



Obrázek 26: Částice s přidavkem inulinu



Obrázek 27: Částice s přidavkem psyllia



Obrázek 28: Částice s přidavkem konopné vlákniny



Obrázek 29: Částice s přidavkem jablečné vlákniny

## 5.6 Stanovení dlouhodobé stability

Dlouhodobá stabilita byla sledována v modelovém prostředí dle postupu uvedeného v kapitole 4.11.

Jako první byly analyzovány částice, kde byly použity pro enkapsulaci buňky *Lactobacillus acidophilus* o počáteční koncentraci buněk 1856 evt/μl. V Tabulce 21 lze vidět procenta živých a mrtvých buněk po prvním dnu enkapsulace, po 1 týdnu, po 3 týdnech a po 6 týdnech od enkapsulace. V Tabulce 22 vidíme nárůst buněk v procentech, vždy od počátku měření.

Tabulka 21: Poměr živých a mrtvých buněk v různých časových intervalech

	1. den		1. týden		3. týden		6. týden	
	živé [%]	mrtvé [%]	živé [%]	mrtvé [%]	živé [%]	mrtvé [%]	živé [%]	mrtvé [%]
LA	100	0	95	5	80	20	70	30
LA+glu	100	0	97	3	85	15	75	25
LA+inu	100	0	97	3	90	10	80	20
LA+psy	100	0	90	10	75	25	65	35
LA+KV	100	0	95	5	90	10	80	20
LA+JV	/	/	/	/	/	/	/	/

Tabulka 22: Nárůst buněk v procentech v průběhu 6 týdnů

	1. týden [%]	3. týden [%]	6. týden [%]
LA	80	120	130
LA+glukóza	60	120	150
LA+inulin	50	100	120
LA+psyllium	30	100	130
LA+konopná vláknina	30	110	160
LA+jablečná vláknina	/	/	/



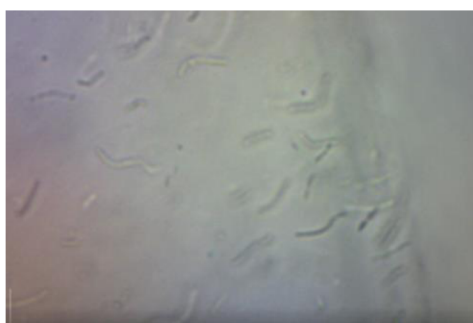
Po prvním dnu enkapsulace byly všechny mikroorganismy živé. Po prvním týdnu bylo mrtvých maximálně do 10 %, ve třetím týdnu do 25 % a ve čtvrtém do 35 %. Nejvyšší počet mrtvých buněk bylo zaznamenáno u psyllia, nejnižší u částic enkapsulovaných s inulinem. Z Tabulky 21 vyplývá, že probiotika z počátku rostly nejpomaleji v částicích, které obsahovaly konopnou vlákninu a psyllium, ale po 6 týdnech byl nárůst buněk v konopné vláknině nejvyšší. V částicích, které obsahovaly pouze buňky *Lactobacillus acidophilus*, byl po prvním týdnu zaznamenán nejvyšší nárůst, ale po 6 týdnech skladování byl nárůst již srovnatelný s inulinem a psylliem. V jablečné vláknině nebylo možné pod mikroskopem analyzovat buňky, jelikož částice vlákniny většinu mikroorganismů překrývaly. Na Obrázcích 30, 31, 32 a 33 lze vidět příklady některých částic.



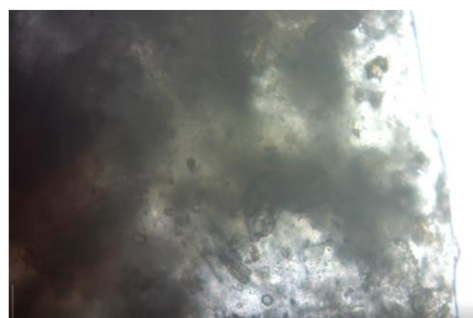
Obrázek 30: LA+inulin po 6 týdnech. 100x



Obrázek 31: LA po 6 týdnech. 100x



Obrázek 32: LA+glukóza po 3 týdnech. 100x



Obrázek 33: LA+JV po 1 týdnu. 100x

Následně byly analyzovány částice, kde byly použity pro enkapsulaci buňky *Lactobacillus acidophilus* o počáteční koncentraci buněk 5458 evt/ $\mu$ l. V Tabulce 23 lze vidět procenta živých a mrtvých buněk po prvním dnu enkapsulace, po 1 týdnu, po 3 týdnech a po 6 týdnech enkapsulace. V Tabulce 24 vidíme nárůst buněk v procentech, vždy od počátku měření.

Tabulka 23: Poměr živých a mrtvých buněk v různých časových intervalech

	1. den		1. týden		3. týden		6. týden	
	živé [%]	mrtvé [%]	živé [%]	mrtvé [%]	živé [%]	mrtvé [%]	živé [%]	mrtvé [%]
LA	100	0	95	5	90	10	80	20
LA+glu	100	0	98	2	90	10	85	15
LA+inu	100	0	100	0	93	7	85	15
LA+psy	100	0	95	5	90	10	80	20
LA+KV	100	0	97	3	90	10	85	15
LA+JV	/	/	/	/	/	/	/	/



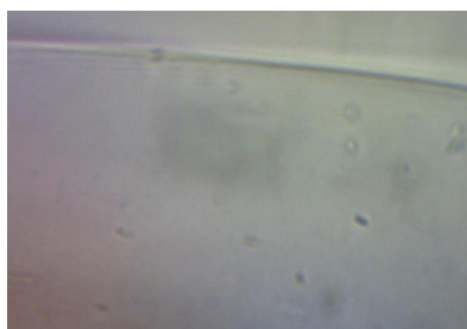
Tabulka 24: Nárůst buněk v procentech v průběhu 6 týdnů

	1. týden [%]	3. týden [%]	6. týden [%]
LA	50	130	140
LA+glukóza	30	120	160
LA+inulin	50	150	160
LA+psyllium	100	180	200
LA+konopná vláknina	40	120	150
LA+jablečná vláknina	/	/	/

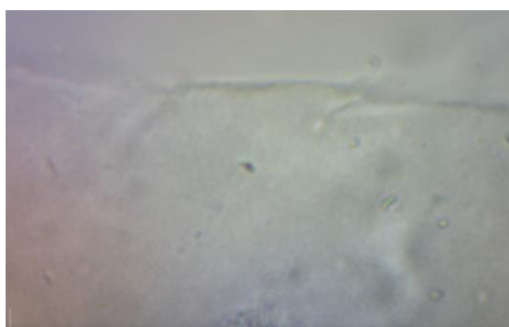
Po jednom dnu bylo 100 % živých buněk. Po jednom týdnu byl počet mrtvých buněk do 5 %, po 3 týdnech do 10 % a po 6 týdnech maximálně do 20 %. Po prvním týdnu enkapsulace byl největší nárůst buněk zaznamenán u částic s probiotiky enkapsulovanými s psylliem, a to o 100 %. U ostatních prebiotik byl nárůst do 50 %. Po 6 týdnech bylo nejvíc buněk u částic s psylliem a téměř srovnatelný počet buněk měly částice s glukózou, inulinem a s konopnou vlákninou. V částicích s prebiotiky bylo na konci více buněk než v částicích, které obsahovaly pouze probiotické kultury. Ukázky mikroskopické analýzy jsou na Obrázcích 34, 35, 36 a 37. V jablečné vláknině nebylo možné pod mikroskopem analyzovat buňky, jelikož částice vlákniny většinu mikroorganismů překrývaly.



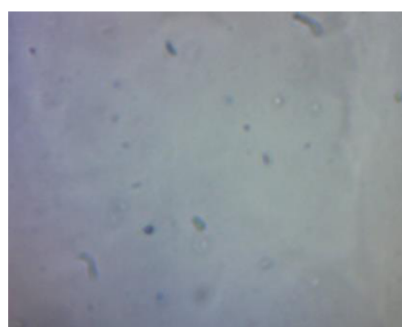
Obrázek 34: LA po 3 týdnech. 100x



Obrázek 35: LA+glukóza po 6 týdnech. 100x



Obrázek 36: LA+psyllium po 3 týdnech. 100x



Obrázek 37: LA+inulin po 6 týdnech. 100x

Jako poslední byly analyzovány částice, kde byly použity pro enkapsulaci buňky *Bifidobacterium breve* o počáteční koncentraci buněk 7541 evt/ $\mu$ l. V Tabulce 25 lze vidět procenta živých a mrtvých buněk po prvním dnu enkapsulace, po 1 týdnu, po 3 týdnech a po 6 týdnech enkapsulace. V Tabulce 26 vidíme nárůst buněk v procentech, vždy od počátku měření.

Tabulka 25: Poměr živých a mrtvých buněk v různých časových intervalech

	1. den		1. týden		3. týden		6. týden	
	živé [%]	mrtvé [%]	živé [%]	mrtvé [%]	živé [%]	mrtvé [%]	živé [%]	mrtvé [%]
BB	100	0	95	5	80	20	70	30
BB+glu	100	0	100	0	92	8	85	15
BB+inu	100	0	100	0	95	5	90	10
BB+psy	100	0	97	3	90	10	80	20
BB+KV	100	0	97	3	80	20	75	25
BB+JV	/	/	/	/	/	/	/	/

Tabulka 26: Nárůst buněk v procentech v průběhu 6 týdnů

	1. týden [%]	3. týden [%]	6. týden [%]
BB	40	130	150
BB+glukóza	30	110	130
BB+inulin	60	150	160
BB+psyllium	50	130	150
BB+konopná vláknina	50	110	180
BB+jablečná vláknina	/	/	/

Viabilita buněk po 1 dnu byla 100%. Po 1 týdnu bylo 5 % mrtvých bakterií u částic bez prebiotika a 3 % mrtvých u částic s psylliem a s konopnou vlákninou. Po 3 týdnech bylo 25 % mrtvých buněk částic bez prebiotika a u částic s konopnou vlákninou, u ostatních částic bylo do 10 % mrtvých buněk. Po šesti týdnech bylo maximálně 30 % mrtvých buněk. Po prvním týdnu byl zjištěn téměř stejný nárůst buněk u všech typů částic, a to do 60 %. Po třech týdnech měly nejvíce buněk částice, ve kterých byl inulin. Po 6 týdnech bylo nejvíce buněk v částicích s konopnou vlákninou a nejméně v částicích s glukózou. V jablečné vláknině nebylo možné pod mikroskopem analyzovat buňky, jelikož částice vlákniny většinu mikroorganismů překrývaly. Na Obrázcích 38, 39, 40 a 41 lze vidět příklady částic s *Bifidobacterium breve* a prebiotiky.



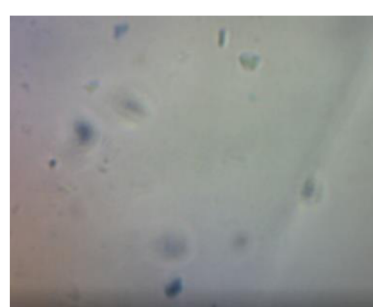
Obrázek 38: BB po 1 týdnu. 100x



Obrázek 39: BB+inulin po 1 týdnu. 100x



Obrázek 40: BB+KV po 3 týdny. 100x



Obrázek 41: BB+psyllium po 1 týdnu. 100x

Na závěr lze říci, že všechny enkapsulované buňky s nehydrolyzovanou vlákninou jsou v našem připraveném prostředí o kyselém pH stabilní i po 6 týdnech. Během dlouhodobého skladování docházelo pouze k minimálnímu uvolnění probiotických buněk z testovaných částic. Toto uvolněné množství nepřesahovalo 5 %.

Jako nejvhodnější kombinace ke koenkapsulaci probiotik s prebiotiky byla vyhodnocena konopná vláknina. Buňky zde sice nerostly tak rychle jako v prostředí bez přidaných prebiotik, ale po 6 týdnech sledování bylo vždy zjištěno nejvyšší procento nárůstu. Buňky také celkem dobře rostly v částicích s inulinem a glukózou.

Z Tabulky 21 a 23 vyplývá, že na životaschopnost probiotik má vliv také počáteční koncentrace buněk. U částic, které měly počáteční koncentraci buněk vyšší, bylo po 6 týdnech zaznamenáno o 5-10 % méně mrtvých buněk než u částic, které měly počáteční koncentraci nižší. Také nárůst buněk byl vyšší, například u psyllia až o 70 %.

Pro ukázkou byly vytvořeny na enkapsulátoru i menší částice, které byly skladovány týden v 2,5% kyselině citrónové (modelová kyselá potravina). Po týdnu bylo zjištěno, že jsou částice stabilní a není žádné uvolněné množství mimo částici.

Celkově se jako nejlepší jeví částice, ve kterých byl přidán inulin. Tyto částice s inulinem měly nejnižší procento mrtvých buněk po 6 týdnech, ve všech případech pouze do 20 %, tudíž by mohly být nejvhodnější pro aplikace do kosmetických přípravků a potravinářských doplňků stravy.

## 5.7 Stanovení stability částic v modelovém prostředí lidského organismu

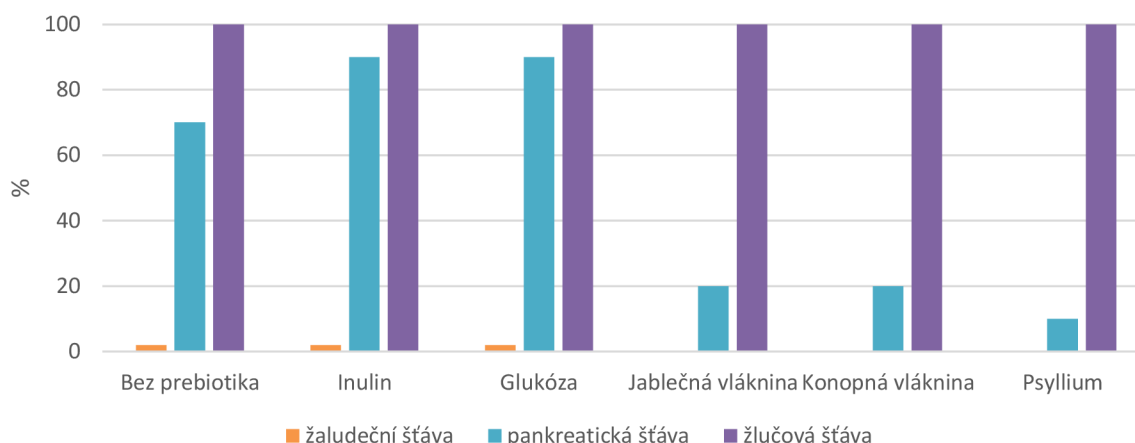
Stabilita v simulovaných tělních tekutinách byla sledována u alginátových částic s bakteriemi typu *Lactobacillus acidophilus*. Bakterie byly enkapsulovány společně s glukózou, psylliem, inulinem, konopnou vlákninou a jablečnou vlákninou. Po enkapsulaci byly tyto částice skladovány v modelových podmínkách, v průběhu skladování byly částice vloženy postupně do modelových tělních tekutin. V pankreatické šťávě a v žaludeční šťávě byly inkubovány po dobu 20 minut a ve žlučové šťávě byly 40 minut, vše při teplotě 37°C. V průběhu působení jednotlivých trávicích šťáv byly odebírány vzorky pro mikroskopické stanovení. Byla sledována především stabilita testovaných částic, a nárůst množství uvolněných buněk a jejich viability. Postupováno bylo dle návodu uvedeného v kapitole 4.9.

V Grafu 16 lze vidět aktuálně uvolněné množství buněk do trávicí šťávy.

Tabulka 27: Stabilita částic s prebiotiky ve fyziologickém prostředí

Prebiotikum	Množství uvolněného obsahu [%]		
	žaludeční šťáva	pankreatická šťáva	žlučová šťáva
Bez prebiotika	2	70	100
Inulin	2	90	100
Glukóza	2	90	100
Jablečná vláknina	0	20	100
Konopná vláknina	0	20	100
Psyllium	0	10	100

## Uvolnění obsahu z částic ve fyziologických podmínkách



Graf 16: Fyziologické prostředí – stabilita částic s prebiotiky

### 5.7.1 Stanovení stability částic s prebiotiky v žaludeční šťávě

Na částicích po 20 minutách inkubace v žaludeční šťávě nebyly pozorovány žádné změny. Na pohled byly částice v celku, neporušené, obal enkapsulovaných částic se nerozpadal. Při pozorování pod mikroskopem nebyly vidět žádné uvolněné probiotické buňky, nebo pouze v minimálním počtu. Žaludeční šťáva tudíž na obal z alginátu nepůsobí, počet uvolněných bakterií z kapsle do roztoku bakterie byl maximálně do 2 %.

Tato šťáva působí na enkapsulované částice jako první ze tří testovaných prostředí a s ohledem na předpokládanou funkci mléčných bakterií je nutné, aby obaly částic nebyly již v této části trávicího systému porušeny. Je potřeba, aby bakterie přežily kyselé pH v žaludku a mohly se následně uplatnit ve střevě. Bylo potvrzeno, že uvnitř částice byly po působení žaludeční šťávy všechny buňky živé. Částice byly dále vloženy do pankreatické šťávy.

### 5.7.2 Stanovení stability částic s prebiotiky v pankreatické šťávě

Pankreatická šťáva na částice působila více než žaludeční šťáva. Pankreatická šťáva je produkována ve slinivce a je součástí tenkého střeva. Účelem enkapsulace probiotických kultur je, aby se bakterie začaly z částic uvolňovat právě na tomto místě. Při pohledu na částice po 20 minutách působení této šťávy bylo vidět, že v některých případech byl alginátový obal zcela porušen. Částice, které obsahovaly inulin a glukózu se rozpadly na malé kousky a téměř všechny bakterie byly uvolněny do trávicích šťáv. Z kuliček, které obsahovaly jablečnou vlákninu a konopnou vlákninu, bylo uvolněno do roztoku přibližně 20 % buněk. Po obarvení methylenovou modří a sledováním pod mikroskopem bylo vidět, že všechny bakterie jsou živé a to jak bakterie enkapsulované stále uvnitř kapsle, tak i bakterie uvolněné. Zbytky částic byly následně vloženy na 40 minut do žlučové šťávy.

### 5.7.3 Stanovení stability částic s prebiotiky ve žlučové šťávě

Po 40 minutách ve žlučové šťávě se částice s konopnou vlákninou, jablečnou vlákninou a s psylliem také rozpadly, v roztoku jsme mohli pozorovat jen zbytky nerozpustné vlákniny, které jsou nestravitelné. Žlučová šťáva je poslední částí trávicího systému, tudíž je výhodné, že se právě zde rozpadnou i zbytky částic a uvolní se všechny prebiotika. Během celého trávení tedy došlo k uvolnění všech buněk ze všech testovaných částic.

Viabilita buněk se nezměnila po celou dobu trávení, všechny buňky zůstaly živé. Během trávení docházelo k pozvolnému uvolňování enkapsulovaných složek z částic. Po 40 minutách

trávení došlo k uvolnění buněk z částic, které obsahovaly inulin a glukózu. Z jablečné vlákniny, konopné vlákniny a psyllia se uvolnilo přibližně 20 % buněk, zbytek zůstalo v kouscích částice. Po delší době se uvolnil zbytek buněk z částic. K úplnému uvolnění všech buněk ze všech částic došlo po 2 hodinách trávení (Graf 16). Tyto alginátové částice jsou tedy vhodné k pozvolnému uvolňování aktivních složek v zažívacím traktu, mohou být dlouhodobě uchovávány a poté použity jako farmaceutický doplněk.

## 6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na enkapsulaci mikroorganismů do alginátových částic. Enkapsulovanými mikroorganismy byly probiotické kmeny *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve*. Probiotika byla enkapsulována s prebiotky – s inulinem, s psylliem, s konopnou vlákninou a s jablečnou vlákninou. Částice byly připraveny z 2% alginátu pomocí enkapsulátoru s použitím trysky o velikosti 450 a 1000  $\mu\text{m}$ .

Nejprve byla provedena charakterizace a složení jednotlivých prebiotik s využitím spektrofotometrických a chromatografických metod. Sledován byl především obsah monosacharidů a oligosacharidů.

Pro jednotlivá probiotika bylo zvoleno několik kultivačních médií. Nejprve bylo použito samostatné MRS médium pro kultivaci laktobacilů, následně bylo do média přidáno určité množství nehydrolyzovaných prebiotik a nakonec byla probiotika kultivována na médiu smíchaném v určitém poměru s hydrolyzovaným prebiotikem nebo pouze na hydrolyzovaném prebiotiku. Buňky rodů *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* byly schopny růst i na médiu, které bylo složeno pouze z hydrolyzovaného prebiotika. Bakterie zde sice rostly pomaleji a v menším množství, než při použití MRS média, ale použití MRS média je výrazně nákladnější než použití hydrolyzátu jablečné či konopné vlákniny.

Po enkapsulaci probiotik na enkapsulátoru byly částice skladovány v 2,5% kyselině citrónové jakožto simulantu pro modelovou kyselou potravinu, a to za účelem sledování dlouhodobé stability a zachování životaschopnosti probiotických bakterií.

Částice byly také inkubovány v modelovém fyziologickém prostředí (v umělé žaludeční, pankreatické a žlučové šťávě), kde byla posouzena stabilita částic a míra uvolňování jejich obsahu v příslušné části trávicího traktu. Stabilita částic byla posuzovaná pod optickým mikroskopem, kdy byl stanoven počet buněk uvnitř částic a počet buněk uvolněný z částic do volného roztoku. Všechny částice byly stabilní v žaludeční šťávě. V pankreatické šťávě došlo k rozpadu částic a k uvolnění většiny buněk do roztoku. Žlučová šťáva pak působila výrazněji na částice, které byly enkapsulované bez prebiotika a částice s inulinem a s glukózou. Během trávení tedy docházelo k pozvolnému uvolňování všech buněk ze všech částic. Bylo prokázáno, že většina částic dorazí bez porušení až do pankreatické šťávy, tudíž by tyto enkapsulované částice mohly být využity pro cílený transport probiotických kultur do střevního traktu.

Z vyhodnocení dlouhodobé stability lze usoudit, že vytvořené částice jsou velmi stabilní. I po 6 týdnech nebylo vidět pod optickým mikroskopem výraznější uvolnění částic z kapsle do okolního roztoku. U všech typů připravených částic byl počet uvolněných buněk do 5 %. Největší nárůst buněk po 6 týdnech byl zaznamenán u částic, které byly enkapsulovány společně s konopnou vlákninou. Naopak nejméně mrtvých bakterií bylo zjištěno po 6 týdnech u částic, které byly enkapsulovány zároveň s inulinem. Obecně bychom mohli říct, že koenkapsulace probiotik s prebiotiky je výhodná, významně prodlužuje dlouhodobou životaschopnost a biologickou aktivitu probiotik.

Celkově lze říci, že s využitím enkapsulátoru je možné úspěšně enkapsulovat oba typy testovaných probiotických bakterií do alginátových obalů. Přidané prebiotikum pozitivně ovlivňuje růst i nárůst mikroorganismů v částicích. U částic, které vznikly touto koenkapsulací byla potvrzena jejich stabilita nejméně po dobu 6 týdnů, přičemž enkapsulované bakterie si po celou dobu udržují svou životaschopnost. Takto připravené částice by mohly být využity v potravinářském průmyslu, kde potřebujeme cílené uvolnění bakterií v trávicí soustavě. Částice by se mohly přidat do mléčných či zakysaných výrobků, do jogurtů a díky kvalitě použitých materiálů by se mohly použít i pro výrobky určené pro dětskou výživu a do potravinových doplňků. Jako další aplikace je vhodný kosmetický průmysl, kde by se

alginátové částice společně s probiotiky a prebiotiky mohly využít jako antimikrobiální ochrana kůže a mohly by být využity například v krémech nebo jiných přípravcích pro zevní použití.



## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] DE VOS, Paul, Marijke M. FAAS, Milica SPASOJEVIC a Jan SIKKEMA. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* [online]. 2010, roč. 20, č. 4, s. 292-302. ISSN 09586946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.11.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694609002167>
- [2] KLABAN, Vladimír. Ilustrovaný mikrobiologický slovník. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 654 s. ISBN 80-726-2341-9.
- [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] GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK. Aplikovaná mikrobiologie požívatin: principy mikrobiologie požívatin, potravinářsky významné mikroorganismy a jejich skupiny, mikrobiologie potravinářských výrob, ochorenia mikrobiálního povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
- [5] LATA, Jan, JURÁNKOVÁ, Jana. Střevní mikroflóra, slizniční bariéra, a probiotika u některých interních chorob. *Praktické lékařství*. 2011, č. 7, s. 212-217.
- [6] 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>
- [7] BEZKOROVAINY, Anatoly. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* [online]. 2001, č. 73, s. 399-405 [cit. 2016-03-03]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157348>
- [8] ŠPELINA, Vladimír a Daniela WINKLEROVÁ. Principy hodnocení účinnosti a bezpečnosti probiotik a charakteristika registrovaných doplňků stravy s obsahem probiotik a prebiotik. *Pediatric pro praxi*, 2009, roč. 10, s. 247-250. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2009/04/08.pdf>
- [9] [www.tajemstvizravi.cz](http://www.tajemstvizravi.cz). Probiotika na střeva, aby kvasinky nepřebraly vládu. [online]. [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: <http://tajemstvizravi.cz/probiotika-po-antibiotikach-daji-do-poradku-nasi-strevni-floru/>
- [10] [www.levandulum.cz](http://www.levandulum.cz): Přírodní kosmetika s probiotickou kulturou a růžovým olejem. [online]. [cit. 2016-04-14]. Dostupné z: <http://www.levandulum.cz/content/25-prirodni-kosmetika-s-probiotickou-kulturou>
- [11] HOLZAPFEL, W.H., et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*. 2001, 73(2): 365-373
- [12] KREJSEK, Jan, Manuela KUDLOVÁ a Martina KOLÁČKOVÁ. Nutrice, probiotika a imunitní systém II. část: Nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. *Pediatric pro praxi*, 2007, roč. 8, č. 3, s. 126-127.
- [13] SAARELA, Maria, Gunnar MOGENSEN, Rangne FONDÉN, Jaana MÄTTÖ a Tiina MATTILA-SANDHOLM. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 2000, č. 84, s. 197-215, ISSN 0168-1656
- [14] ÖTLEŞ, Semih. Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health [online]. CRC Press, 2013 [cit. 2014-04-10]. ISBN 978-1-4665-8623-9.
- [15] ARNDT, Tomáš. Prebiotika, probiotika, symbiotika [online]. *Celostní medicína*, 2013 [cit. 2016-02-21]. Dostupné z: <http://www.celostnimedicina.cz/prebiotika-probiotika-symbiotika.htm>.
- [16] COLLINS, M David, Glenn R GIBSON a Jaana MÄTTÖ. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Society for Clinical Nutrition* [online]. 1999, vol. 69, no. 5, s. 1052-1057 [cit. 2014-04-10]. Dostupné z: <http://ajcn.nutrition.org/content/69/5/1052s.full>
- [17] [www.jimehlavou.cz](http://www.jimehlavou.cz). Inulin – přírodní rozpustná vláknina. [online]. [cit. 2016-04-14]. Dostupné z: <http://www.jimehlavou.cz/cz/vlaknina/Emag/DetailClanku/ic-274/inulin-prirodni-rozpustna-vlaknina.html>

- [18] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7
- [19] ZELINKOVÁ, Lenka. Vlákna a její příjem. Brno, 2006. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Dostupné z: [http://is.muni.cz/th/67375/lf\\_m/DIPLOMKA.txt](http://is.muni.cz/th/67375/lf_m/DIPLOMKA.txt).
- [20] Www.bioboos.cz. Konopná vláknina BIO RAW. [online]. [cit. 2016-04-14]. Dostupné z: <http://www.bioboos.cz/produkt/konopna-vlknina-bio-raw-250g>
- [21] Www.celostnimedica.cz. Jablečná vláknina, lék mnoha benefitů. [online]. [cit. 2016-04-14]. Dostupné z: <http://www.celostnimedica.cz/jablecna-vlknina-lek-mnoha-benefitu.htm>
- [22] Ziai SA, Larijani B, Akhoondzadeh S, Fakhrzadeh H, Dastpak A, Bandarian F, et al. Psyllium decreased serum glucose and glycosylated hemoglobin significantly in diabetic outpatients. *J Ethnopharmacol.* 2005 Nov 14;102(2):202-7
- [23] Www.umm.edu. Psyllium. [online]. [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/psyllium>
- [24] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food* [online]. 2011, roč. 1, s. 1806-1815 [cit. 2016-02-28]. ISSN 2211601x. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002665>
- [25] ZUIDAM, N. J., NEDOVIĆ, V. A. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing [online]. Springer Science, 2010, [cit. 2016-02-28], 400 s. ISBN 978-1-4419-1007-3. Dostupný z: [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com)
- [26] DESAI, Kashappa Goud H. a Hyun JIN PARK. Recent Developments in Microencapsulation of Ingredients. *Drying Technology* [online]. 2005, roč. 23, Č. 7, s. 1361-1394 [cit. 2016-02-28]. ISSN 0737-3937. Dostupné z: <http://pack.korea.ac.kr/non/49.pdf>
- [27] FANG, Zhongxiang a Bhesh BHANDARI. Encapsulation of polyphenols -a review. *Trends in Food Science* [online]. 2010, vol. 21, issue 10, s. 510-523 [cit. 2016-02-28]. DOI: 10.1016/j.tifs.2010.08.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224410001925>
- [28] RATHORE, S., P. M. DESAI, C. V. LIEW, L. W. CHAN and P. W. S. HENG. Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering.* 2013, 116(2): 369-381. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022.
- [29] Www.ceramicindustry.com: Successful Spray Drying. [online]. [cit. 2016-03-06]. Dostupné z: <http://www.ceramicindustry.com/articles/successful-spray-drying>
- [30] SARA J. RISCH, Sara J. editor. Encapsulation and controlled release of food ingredients developer from a symposium sponsored by the Division of Agricultural and Food Chemistry at the 206th national meeting of the American Chemical Society, Chicago, Illinois, August 22-27, 1993. Washington, DC: American Chemical Society, 1995. ISBN 978-084-1215-153
- [31] GUIBAN, J. M.. Immobilization of enzymes and cells. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press, 2006, 449 p. ISBN 978-158-8292-902
- [32] ZUIDAM, N, Viktor, A. NEDOVIC. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing.* NeV York: Springer Science+Business Media, LLC, 2010, 400 s. ISBN 978-144-1910-080
- [33] DONG, Q-Y., M-Y. CHEN, Y. XIN, X-Y. QIN, Z. CHENG, L-E. SHI and Z-X. TANG. Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *International Journal of Food Science.* 2013, 48(7): 1339-1351. DOI:10.1111/ijfs.12078

- [34] SWARBRICK, James. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, c2007, 6 v. ISBN 08-493-9399-X
- [35] WILSON, N. a N.P. SHAH. Microencapsulation of Vitamins. *ASEAN Food Journal* [online]. 2007, roč. 1, č. 14, s. 1-14 [cit. 2016-03-19]. Dostupné z: <http://www.ifrj.upm.edu.my/afjv14%281%292007/1-14.pdf>
- [36] DÜZGÜNEŞ, Edited by Nejat. *Liposomes*. 1st ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2009. ISBN 978-012-3749-697
- [37] CRABIELLE-MADELMONT, C., LESIEUR, S., OLLIVON, M. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2003, [cit. 2016-04-20], vol. 56, pp. 189-217. Dostupný z WWW: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>.
- [38] GURÁN, R. *Studium vlastností liposomů jako přenašečů léčiv pomocí různých analytických metod*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2014. 78 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Ondřej Zítka, Ph.D.
- [39] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M.: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2005. 245 s. ISBN 80-7080-579-X. [online]. [cit.2016-03-03]. Dostupný z WWW: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-80-7080-579-X/pages-img/172.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/172.html)
- [40] PARK, J.K, H.N CHANG, C. V. LIEW, L. W. CHAN and P. W. S. HENG. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*. 2000, 18(4): 303-319. DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00040-9.
- [41] MAZZITELLI, S., L. CAPRETTO, F. QUINCI, R. PIVA and C. NASTRUZZI. Preparation of cell-encapsulation devices in confined microenvironment. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013, 1533-1555. DOI: 10.1016/j.addr.2013.07.021.
- [42] NICOLAAS JAN ZUIDAM, Viktor A. *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* [online]. Online-Ausg. New York: Springer, 2010. ISBN 978-144-1910-080. Dostupné z: [http://www.nottingham.ac.uk/ncmh/harding\\_pdfs/Paper329.pdf](http://www.nottingham.ac.uk/ncmh/harding_pdfs/Paper329.pdf)
- [43] VELIŠEK, J., HAJŠLOVA, J. *Chemie potravin I*. Vyd. 3. Tabor: OSSIS, 2009, 580 s. ISBN 978-80-86659-15-2
- [44] ANDRIAMANANTOANINA, H.; RINAUDO, M., Relationship between the molecular structure of alginates and their gelation in acidic conditions. *Polymer International*. 2010, v. 59, č. 11, 1531 - 1541 s.
- [45] DE ALVARENGA, E. S. Characterization and Properties of Chitosan. *InTech*, 2011, 364 s. [cit. 2016-02-11]. ISBN 978-953-307-179-4. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biotechnology-of-biopolymers/characterization-and-properties-of-chitosan>
- [46] VAVŘÍKOVÁ, E. a J. VINŠOVÁ. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy*. 2009, s. 56-65 [cit. 2016-03-28]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_01\\_56-65.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_56-65.pdf)
- [47] PEŠEK, M. a kol. *Potravinářské zbožíznalství*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2000. 175 s. ISBN 80-7040-399-3.
- [48] *BŮCHI. Návod k použití: Enkapsulátor B-395 Pro. 2011.*
- [49] SHAPIRO, Howard M. *Practical flow cytometry*. 4th ed. New York: Wiley-Liss, c2003, I, 681 p. ISBN 04-714-1125-6
- [50] VUT BRNO. *Praktikum z mikrobiologie: Přímé stanovení počtu buněk MO počítáním pod mikroskopem, Vitální barvení*. 2008
- [51] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 1996, 203 s. ISBN 80-902155-0-5
- [52] SOMMER, L. *Základy analytické chemie II*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0
- [53] ARKOVICH Matthew. High performance liquid chromatography [online]. 2010 [cit.2016-04-01]. Dostupné z: [http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical\\_Chemistry/](http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/)
- [54] MCMASTER, Marvin C. *HPLC, a Practical User's Guide*. 2<sup>nd</sup> ed. New Jersey: Wiley, 2007, 238 s. ISBN: 0471754013.

- [55] SNYDER, Lloyd R., Joseph J. KIRKLAND a John W. DOLAN. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley, 1979, 863 s. ISBN: 0470167548
- [56] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. Laboratorní techniky biochemie. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [57] *Československý lékopis: Pharmacopoea Bohemoslovaca*. 4. vyd. Praha: Avicenum, 1987
- [58] Vyhláška č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů. ČR, 2000. Dostupné z:  
<http://portal.gov.cz/app/zakony/zakonPar.jsp?idBiblio=49577&fulltext=&nr=258~2F2000&part=&name=&rpp=15#local-content>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
BB	<i>Bifidobacterium breve</i>
FC	průtoková cytometrie
CFU	colony forming units
GIT	gastrointestinální trakt
KV	konopná vláknina
JV	jablečná vláknina