

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Přežívání probiotických bakterií v probiotických  
doplňcích v závislosti na podmínkách skladování**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Tereza Střelková**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: Ing. Šárka Musilová, Ph.D.**

© 2018 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Přežívání probiotických bakterií v probiotických doplňcích v závislosti na podmínkách skladování" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Šárce Musilové, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při vypracování diplomové práce. Dále bych poděkovala Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnutí veškerého potřebného materiálu.

# Přežívání probiotických bakterií v probiotických doplňcích v závislosti na podmínkách skladování

## Souhrn

Střevní mikrobiota představuje soubor mikroorganismů, které přirozeně existují v gastrointestinálním traktu (GIT) a má zásadní význam pro lidské zdraví. Její adekvátní modulaci může umožnit používání probiotik – živých mikroorganismů, prebiotik či jejich kombinace. Komerční probiotické produkty jsou k dispozici jako potraviny a doplňky stravy a v obou případech tvoří nejčastěji používané bakterie rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Většina probiotických kmenů je dobře přizpůsobena životu v GIT, ale může být špatně přizpůsobena jinému prostředí. Hlavními faktory, které ovlivňují jejich životaschopnost během skladování, jsou pak zejména teplota, kyslík a relativní vlhkost a právě teplota se často uvádí jako kritický parametr pro přežívání.

Teoretická část práce se zabývá popisem střevní mikrobioty, jejího vývoje a možnostmi jejího ovlivnění a jsou zde charakterizovány nejvýznamnější rody probiotických bakterií spolu s faktory, které mají vliv na jejich přežívání. Tuto část práce poté uzavírá technologie výroby probiotik a její limitující faktory.

Cílem práce bylo testování probiotických výrobků v závislosti na podmínkách skladování, průběžné odebírání vzorků a jejich analýza na obsah probiotických bakterií. K výzkumu bylo použito 7 různých probiotických doplňků dostupných na českém trhu, které byly uloženy za různých teplot prostředí (4 °C, 24 °C, 37 °C). Periodicky u nich byl po dobu osmi měsíců pomocí kultivační deskové metody prováděn rozbor na počet bakterií.

Ze získaných výsledků lze konstatovat, že pro všechny hodnocené výrobky je nejvhodnější uchovávání při 4 °C. Laktobacily i bifidobakterie při této teplotě přežívaly ve vysokých počtech a po celou dobu výzkumu. Za pokojové teploty přežívaly hůře a jako nejméně příznivé prostředí se zdá být teplota zvýšená. U výrobků v podobě kapek, kde výrobci doporučují upotřebení do 2 – 3 měsíců od otevření, bakterie dobře přežívaly až trojnásobnou dobu. Zdá se, že roli hraje i výběr kmene a způsob zpracování včetně balení.

Hypotéza, že probiotické bakterie ve výrobcích skladovaných v lednici při nižší teplotě budou přežívat delší dobu, oproti těm, které budou skladovány při pokojové teplotě, byla v této práci potvrzena.

**Klíčová slova:** probiotika; bifidobakterie; laktobacily; selektivní média; podmínky skladování

# Survival of probiotic bacteria in the probiotic supplements depending on storage conditions

## Summary

The intestinal microbiota represents a set of microorganisms that naturally exists in the gastrointestinal tract (GIT) and is of fundamental importance to human health and physiology. The use of probiotics as living microorganisms, prebiotics or combinations thereof may allow its adequate modulation. Commercial probiotic products are available as food and dietary supplements and in both cases the most commonly used bacteria form the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Most probiotic strains are well adapted to life in the GIT, but may be poorly adapted to other environment. The main factors that influence the viability of probiotics during storage are especially temperature, oxygen and relative humidity, and temperature is often referred as a critical survival parameter.

The theoretical part of the thesis deals with the description of intestinal microbiota, its development and possibilities of its influence. There are also characterized the most important genus of probiotic bacteria together with factors influencing their survival. This part of the thesis is then closed by the technology of probiotic production and its limiting factors.

The aim of the thesis was to test probiotic products in dependence on the storage conditions, sampling during storage and analysis on the content of probiotic bacteria. For the research was used 7 different probiotic supplements available on the Czech market, which were stored at different ambient temperatures (4 °C, 24 °C, 37 °C). Periodically, after one to three months (according to the product form), a bacterial count was performed using the plate technique. From the first to the last analysis, eight months have elapsed.

From the results obtained, it can be stated that the most suitable storage temperature for all products is 4 °C. Lactobacilli and bifidobacteria survived at this temperature in high numbers and throughout the research. At room temperatures they survived worse and as the least favourable environment seems to be the elevated temperature. In products in the form of drops in which manufacturers recommend their use within 2 – 3 months of opening, bacteria survived well for up to three times. The selection of the strain and the method of processing, including packing, seem to play a role.

The hypothesis that probiotic bacteria in products stored in the fridge at a lower temperature will survive for longer time than those stored at room temperature has been in this thesis confirmed.

**Keywords:** probiotics; *Bifidobacterium*; *Lactobacillus*; selective media; storage conditions

# Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Cíl práce .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Literární rešerše .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Střevní mikrobiota a její vývoj.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Možnosti ovlivnění střevní mikrobioty.....</b>	<b>12</b>
3.2.1. Probiotika .....	12
3.2.2. Prebiotika .....	14
3.2.3. Synbiotika .....	15
<b>3.3 Charakteristika nejvýznamnějších rodů probiotických bakterií....</b>	<b>17</b>
3.3.1. <i>Bifidobacterium</i> .....	17
3.3.2. <i>Lactobacillus</i> .....	18
<b>3.4 Faktory ovlivňující přežívání probiotických bakterií .....</b>	<b>19</b>
3.4.1. Teplota .....	19
3.4.2. Vlhkost, aktivita vody .....	20
3.4.3. Kyslík .....	20
3.4.4. Průchod GIT .....	21
<b>3.5 Technologie výroby probiotik a její limitující faktory .....</b>	<b>22</b>
3.5.1. Mikroenkapsulace.....	23
<b>3.6 Lyofilizace bakterií .....</b>	<b>26</b>
<b>4. Metoda a materiál.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Hodnocené vzorky .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Skladování vzorků .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3 Mikrobiologický rozbor probiotických doplňků .....</b>	<b>29</b>
4.3.1. Složení a příprava kultivačních médií .....	29
4.3.2. Příprava ředících řad .....	32
4.3.3. Odebírání a ředění vzorků.....	32
4.3.4. Mikrobiologický rozbor .....	32
4.3.5. Vyhodnocení počtu kolonií .....	33
<b>5. Výsledky .....</b>	<b>35</b>
<b>6. Diskuze .....</b>	<b>47</b>
<b>7. Závěr .....</b>	<b>52</b>
<b>8. Seznam použité literatury.....</b>	<b>53</b>

# 1. Úvod

Střevní mikrobiota představuje soubor mikroorganismů, které přirozeně existují v gastrointestinálním traktu (GIT) a má zásadní význam pro lidské zdraví a fyziologii. Její rozmanitost je určována faktory, jako je strava, genetické pozadí a fyziologický stav hostitele. Byly popsány její hlavní obecné přínosy, a to potlačení růstu či invaze patogenních bakterií, zlepšení funkce střevní bariéry a modulace imunitního systému. Většina bakterií v tlustém střevě je anaerobní a mohou tedy fermentovat některé sacharidy, a vytvářejí tak mastné kyseliny s krátkým řetězcem a anionty, které mají významnou úlohu při podpoře zdraví střevního epitelu. Nerovnováha střevní mikrobioty může navíc vést k různým onemocněním.

Založení naší mikrobioty začíná již před narozením a je výrazně ovlivněno způsobem porodu. Dalším velkým ovlivňujícím faktorem je výživa kojence. U dětí, které jsou výhradně kojeny, dominují bifidobakterie, zatímco u dětí krmených kojeneckou výživou existuje rozmanitější mikrobiota. Každý člověk časem dosáhne homeostatické kompozice, která zůstává relativně stabilní, přesto však dochází ke snížení počtu užitečných mikroorganismů.

Jakákoliv nerovnováha mezi ochrannými a škodlivými bakteriemi může podporovat náchylnost k nemoci a / nebo progresi onemocnění. Proto je důležité zajistit vývoj zdravé mikrobioty a vyhnout se faktorům, které způsobují odchylky. Použití probiotik a prebiotik nebo jejich kombinace může umožnit adekvátní modulaci střevní mikrobioty.

Probiotika jsou živé mikroorganismy schopné působit příznivým vlivem na zdraví. Komerční probiotické produkty jsou k dispozici jako potraviny a doplňky stravy a v obou případech tvoří nejčastěji používané bakterie rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Prebiotikum je selektivně fermentovaná složka, která vede ke specifickým změnám v kompozici a / nebo aktivitě mikrobioty. V případě synbiotika se poté jedná o produkt, ve kterém jsou synergicky kombinována probiotika a prebiotika.

Většina probiotických kmenů je dobře přizpůsobena životu v GIT, ale může být špatně přizpůsobena jinému prostředí. Probiotický kmen, který má být používán musí být tedy relativně stabilní. Případnou nestabilitu lze překonat různými technikami, jako je úprava kompozičních a procesních faktorů při výrobě potravin a přípravků, výběru tolerantnějších kmenů a technologického procesu. Hlavními faktory, které ovlivňují životaschopnost probiotik během skladování, jsou pak zejména teplota, kyslík a relativní vlhkost a právě teplota se často uvádí jako kritický parametr pro přežívání.

## 2. Cíl práce

Cílem práce je testování probiotických výrobků v závislosti na podmínkách skladování. V průběhu skladování budou vzorky odebírány a analyzovány na obsah probiotických bakterií.

**Hypotéza:** Probiotické bakterie ve výrobcích skladovaných v lednici při nižší teplotě budou přežívat delší dobu, oproti těm, které budou skladovány při pokojové teplotě.



### 3. Literární rešerše

#### 3.1 Střevní mikrobiota a její vývoj

Gastrointestinální trakt (GIT) představuje ekosystém s nejvyšší složitostí. Slizniční povrch poskytuje velkou plochu pro adhezi a mikrobiální kolonizaci (Holzapfel et Schillinger, 2002). Střevní mikrobiota je tedy soubor mikroorganismů, které přirozeně existují v gastrointestinálním traktu a je považována za skrytý orgán složený z jiných druhů. Charakteristikou mikrobiomu je, že přítomné mikroorganismy jsou specifické pro hostitelské druhy (Liu, 2016) i pro samotné jedince. Bakteriální buňky v GIT převyšují somatické buňky alespoň o řád, takže není překvapující, že střevní mikrobiota má zásadní význam pro lidské zdraví a fyziologii (Martínez et al., 2013). Odhaduje se, že samotné tlusté střevo obsahuje více než 70 % všech mikroorganismů v lidském těle (Vyas et Ranganathan, 2012). To se projevuje nerovnoměrným rozložením bakteriálních buněk s nízkými koncentracemi bakterií v žaludku a duodenu [až  $10^3$  kolonie tvořících jednotek (KTJ) na mililitr (KTJ/ml)], zvyšujícími se koncentracemi v jejunu a ileum ( $10^4 - 10^8$  KTJ/ml) a nejvyšší koncentrací v tlustém střevě ( $10^9 - 10^{12}$  KTJ/ml) (Blaut et Clavel, 2007). Rozmanitost střevní mikrobioty se proto mění od segmentu k segmentu a navíc je určována faktory, jako je strava, genetické pozadí a fyziologický stav hostitele. Přítomné mikroorganismy, které představují více než 400 druhů, zahrnují různé bakteriální rody, z nichž převažující rody jsou *Bacteroides*, *Eubacterium* a *Bifidobacterium* (Holzapfel et Schillinger, 2002).

Střevní mikrobiota hraje důležitou roli při udržování hostitelského zdraví a vzniku onemocnění ve všech věkových skupinách. Byly popsány čtyři její obecné přínosy: potlačení růstu nebo epiteliální vazby / invaze patogenních bakterií, zlepšení funkce střevní bariéry, modulace imunitního systému a modulace vnímání bolesti. Většina bakterií v tlustém střevě je anaerobní a mohou tedy fermentovat sacharidy, které uniknou trávení a vytvářejí mastné kyseliny s krátkým řetězcem (např. acetát, propionát a butyrát) a anionty, které mají významnou úlohu při podpoře zdraví střevního epitelu (Wachholz, 2014). Butyrát, mastná kyselina s krátkým řetězcem, reguluje buněčný růst a diferenciaci a inhibuje transformaci buněčného růstu. Navíc je hlavním zdrojem energie pro kolonocyty (Vyas et Ranganathan, 2012). Mikrocykly v distálním střevě přispívají ke zdraví hostitele i prostřednictvím biosyntézy některých vitaminů a esenciálních aminokyselin (Singh et al., 2017).

Nerovnováha střevní mikrobioty může vést k chronickým onemocněním, jako jsou autoimunitní onemocnění, rakovina tlustého střeva, žaludeční vředy, kardiovaskulární

onemocnění, funkční střevní onemocnění (Vyas et Ranganathan, 2012), zánětlivé kožní choroby, jako jsou psoriáza a atopická dermatitida, dále autoimunitní artritida, diabetes II. typu, obezita a ateroskleróza (Singh et al., 2017). Počet a rozmanitost bakteriálních druhů jsou často spojeny s životním stylem jedince (Gómez-Gallego at Salminen, 2016).

Je zřejmé, že individuální mikrobiální kolonizační vzorec se rozvíjí již během života plodu a je ovlivňován režimem výživy a stravovacích návyků během dětství, které ovlivňují imunitní a metabolický vývoj. Normální vývoj mikrobioty může zlepšit zdraví kojenců a snížit riziko onemocnění v pozdějším životě. Rozdíly v počátečním inokulu se udržují i v příštích letech, což může mít dopad na zdraví kojenců. Po narození se novorozenecké střevo rychle kolonizuje mateřskými a environmentálními bakteriemi a kolonizace pokračuje v průběhu laktace a zvyšuje mikrobiální diverzitu (Gómez-Gallego at Salminen, 2016).

Založení naší mikrobioty začíná již před narozením kontaktem s placentou a plodovou vodou a je výrazně ovlivněno získáním buď vaginálního a fekálního mikrobiálního inokula během normálního způsobu porodu nebo inokula z kůže a prostředí během císařského řezu (Vallès et al., 2012; Gómez-Gallego at Salminen, 2016).

Dalším velkým ovlivňujícím faktorem pro počáteční intestinální mikrobiotu je výživa kojence. Mateřské mléko obsahuje  $10^2$  až  $10^4$  životaschopných bakterií na ml, prebiotické sacharidy a bioaktivní složky, které hrají důležitou roli při vzniku novorozenecké mikrobioty. U dětí, které jsou výhradně kojeny, dominují bifidobakterie, zatímco u dětí krmených kojeneckou výživou existuje rozmanitější mikrobiota se zvýšeným množstvím *E. coli* a bakterií rodů *Clostridium* a *Bacteroides* (van Best et al., 2015). Tyto rozdíly by mohly být způsobeny nejen bakteriálním složením, ale také přítomností oligosacharidů mateřského mléka, různorodou skupinou nekonjugovaných glykanů s prebiotickou rolí, které v kojenecké výživě chybí (van Best et al., 2015).

Střevní mikrobiota dítěte se velmi podobá různorodé dospělé podobě ve věku tří let s vysokými hladinami *Bacteroides* a *Clostridium*, změnami v populaci *Lactobacillus* a počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* (van Best et al., 2015). Každý člověk dosáhne homeostatické kompozice, která zůstává relativně stabilní během většiny života dospělého člověka. Definování normální zdravé mikrobioty je nemožné kvůli velkým individuálním změnám mezi druhy mikroorganismů přítomných na různých místech těla spolu s různými změnami v mikrobiologii ve vztahu k věku, geografické oblasti, genetickému pozadí, způsobu porodu, kojení, věku, stravě, hormonálním cyklům, cestování, zdravotnímu stavu a užívání léků

(Gómez-Gallego at Salminen, 2016). Expozice antibiotiky během raného života nejen mění bakteriální rozmanitost, ale také zpomaluje zrání mikrobioty (Liu, 2016).

Složení střevní mikrobioty se přes relativní stabilitu s věkem mění. Zvyšuje se počet fakultativně anaerobních a gramnegativních bakterií (zejména *Enterobacter*) a snižuje se počet užitečných mikroorganismů, jako jsou laktobacily a bifidobakterie. Tyto změny společně s obecným snížením rozmanitosti druhů ve většině bakteriálních skupin a změnami stravy a fyziologii zažívacího traktu, jako je doba průchodu střevem, mohou vést ke zvýšení hnilobných pochodů v tlustém střevě a k vyšší náchylnosti k onemocnění a infekci (Patel et al., 2014).

## 3.2 Možnosti ovlivnění střevní mikrobioty

Dysbióza nebo dysbakterióza jsou definovány jako nerovnováha v kompozici mikrobiálních organismů, snižující relativní počet prospěšných mikroorganismů ve prospěch škodlivých mikroorganismů ve střevním traktu. Jakákoliv nerovnováha mezi ochrannými a škodlivými bakteriemi může mít schopnost podporovat náchylnost k nemoci a / nebo progresi onemocnění. Proto je důležité zajistit vývoj zdravé mikrobioty a vyhnout se faktorům, které způsobují odchylky. Existuje mnoho příčin způsobující dysbiózu, jako je např. porod císařským řezem, předčasný porod, krátká doba kojení, strava, životní styl, hygiena nebo použití antibiotik (Gómez-Gallego at Salminen, 2016).

Dieta je jedním z hlavních determinantů pro přetrvávání mikroorganismů v gastrointestinálním traktu, protože poskytuje živiny nejen pro hostitele, ale i pro jeho mikrobiom (Blaut et Clavel, 2007). Je hlavním faktorem tvarování struktury střevní mikrobioty a dlouhodobé dietní preference jsou spojeny s konzistentními rozdíly ve struktuře mikrobiálních společenství mezi jedinci (Martínez et al., 2013). Většina studií konstatovala, že konzumace bílkovin pozitivně koreluje s celkovou mikrobiální rozmanitostí. Například se uvádí, že konzumací syrovátkových a hrachových bílkovin se zvyšuje zastoupení bifidobakterií a laktobacilů, přičemž syrovátka dále snižuje zastoupení patogenních mikroorganismů, jako jsou *Bacteroides fragilis* a *Clostridium perfringens*. Několik lidských studií dále naznačilo, že dieta s vysokým obsahem tuku zvyšuje celkovou anaerobní mikrobiotu a počet bakterií rodu *Bacteroides*. Autoři navíc poznamenali, že strava s nízkým obsahem tuku vedla ke zvýšení množství zástupců *Bifidobacterium*. Stejných výsledků bylo dosaženo i po podávání vysoké hladiny glukózy, fruktózy a sacharózy. Nestravitelné sacharidy jsou pak označovány jako prebiotika (viz 3.2.2.) (Singh et al., 2017).

Použití probiotik a prebiotik nebo jejich kombinace jako synbiotik může umožnit adekvátní modulaci střevní mikrobioty a může být základem výživových nástrojů proti chorobám spojeným s dysbiózou (Gómez-Gallego at Salminen, 2016).

### 3.2.1. Probiotika

Probiotika jsou živé mikroorganismy nebo bakteriální kultury schopné vydržet průchod gastrointestinálním traktem a působit tak, aby poskytly účinky s příznivým vlivem na zdraví hostitele vyrovnaním gastrointestinální mikrobioty (Meybodi et Mortazavian, 2017). Mají dlouhou historii bezpečné konzumace ve fermentovaných potravinách, jako jsou

jogurty a nakládané potraviny a jejich použití jako potravinářských přídatných látek a doplňků je věnován značný zájem. *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* tvoří bakteriální rody nejčastěji používané v probiotických přípravcích pro humánní použití. Probiotické preparáty musí splňovat přísná kritéria týkající se kvality, bezpečnosti a funkčnosti. Klíčovým kritériem kvality je obsah přesně definovaného počtu životaschopných buněk, který je uveden na štítku produktu (Davis, 2014). Bezpečnostní aspekty zahrnují specifikace týkající se lidského původu, nepatogenicity a antibiotik (Østlie et al., 2005). Zdravotní tvrzení týkající se probiotik jsou početná, ale zahrnují udržování normální / zdravé střevní mikrobioty a ochranu proti infekcím, zmírnění laktóзовé intolerance a stimulaci imunitního systému (Holzapfel et Schillinger, 2002).

Probiotické bakterie, které byly původně izolovány z mateřského mléka, jsou zvláště zajímavé, jelikož splňují hlavní požadavky doporučené pro humánní probiotika, jako je lidský původ, anamnéza bezpečného dlouhodobého příjmu zvláště citlivé populace (kojenci) a jsou přizpůsobeny k pobytu v lidském zažívacím traktu a interakci s námi v symbióze (Gómez-Gallego at Salminen, 2016).

Jako probiotika se používá řada mikroorganismů. Mezi nejčastěji využívané kmeny patří *Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. lactis* a *B. longum* (Coghetto et al., 2016).

Výhody probiotik souvisejí s jejich schopností modulovat mikrobiotu hostitele, která brání nebo omezuje kolonizaci patogenů produkcí bakteriocinů a / nebo produkcí jiných metabolitů či soutěží o živiny a místo a zlepšení bariérových funkcí střevní sliznice (Gómez-Gallego at Salminen, 2016). Kromě toho jsou specifická probiotika schopna zlepšit trávení produkcí některých enzymů jako např.  $\beta$ -galaktosidázy (Gómez-Gallego at Salminen, 2016). Dále se jako prospěšná funkce uvádí produkce některých vitamínů (thiamin, niacin, kyselina listová, pyridoxin, vit. B<sub>12</sub>, biotin), snížení cholesterolu, zvýšení motility střev či neutralizace toxických sloučenin (Holzapfel et Schillinger, 2002; Lee et al., 2009; Kharchenko et al., 2017). Klinické důkazy také často hovoří o účinnosti v případě léčby průjmu spojeného s užíváním antibiotik (Vyas et Ranganathan, 2012). Za dostatečnou denní dávku se považuje  $10^6$  až  $10^9$  životaschopných bakterií (Østlie et al., 2005). Tyto vysoké počty byly navrženy tak, aby kompenzovaly možnou ztrátu při průchodu žaludkem a střevem (Talwalkar et Kailasapathy, 2004). Navíc se uvádí, že kombinací více kmenů lze dosáhnout lepšího efektu, než při použití jednodruhových probiotik (Lee et al., 2009).

Komerční probiotické produkty jsou k dispozici ve dvou hlavních formách, a to jako potraviny a doplňky stravy. V doplňcích se v podobě tablet, kapslí, sypkých prášků či kapek do těla dopravují velmi vysoká množství životaschopných probiotických buněk, zatímco v potravinářských produktech jsou přidávány do nosičových potravin nebo aplikovány jako startovací kultury ve fermentovaných potravinách (Meybodi et Mortazavian, 2017).

Úřadem odpovědným za hodnocení důkazů zdravotních tvrzení v EU, Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA), nejsou povoleny žádné specifické údaje o zdraví na probiotických etiketách potravin. Evropská komise také zdůrazňuje, že termín "probiotikum" má sám o sobě zdravotní tvrzení, a proto by neměl být používán u produktů s nedostatkem přijatelných zdravotních tvrzení (Meybodi et Mortazavian, 2017).

Probiotika se používají nejen v potravinářském průmyslu, ale také v lékařství, zemědělském a akvakulturním průmyslu. Celosvětová poptávka po probiotících byla proto v roce 2011 odhadována na 27,9 miliardy dolarů a odhaduje se, že v roce 2018 dosáhne 44,9 miliardy USD se 7% ročním růstem (Meybodi et Mortazavian, 2017).

### **3.2.2. Prebiotika**

Prebiotikum je selektivně fermentovaná složka, která vede ke specifickým změnám v kompozici a / nebo aktivitě gastrointestinální mikrobioty, čímž poskytuje hostiteli přínosy pro zdraví. Všechny složky stravy, které uniknou trávení v tenkém střevě, jsou potenciální substráty bakterií v tlustém střevě. Patří mezi ně rezistentní škrob, vláknina (celulóza, hemicelulóza, pektin, inulin), neabsorbované cukry a cukerné alkoholy. Fermentace nebo metabolismus těchto nestravitelných substrátů vede k růstu mikroorganismů a produkci plynů a mastných kyselin s krátkým řetězcem. Tyto mastné kyseliny mají ochranný účinek na střevní epitel a podporují vstřebávání solí a vody (Blaut et Clavel, 2007; Vyas et Ranganathan, 2012). Zejména butyrát má antimikrobiální aktivitu díky snížení střevního pH. Fermentativní produkce těchto kyselin se považuje za hlavní prospěšný rys související s primární prevencí kolorektálního karcinomu (Holzapfel et Schillinger, 2002; Gómez-Gallego at Salminen, 2016).

Většina studií byla zaměřena na fruktany, jako jsou fruktany inulinového typu, fruktooligosacharidy (FOS), galaktooligosacharidy (GOS) a laktulosa (Gómez-Gallego at Salminen, 2016). Některé druhy prebiotik mohou být extrahovány z rostlinných zdrojů, avšak většina se jich získává syntézou za použití enzymatických a chemických metod (Lee et al., 2009). Inulin, GOS a FOS jsou pravděpodobně nejčastěji používaná prebiotika. Mezi

potvrzené účinky či aspekty prebiotik patří nízkooenergetická hodnota ( $< 9 \text{ kJ.g}^{-1}$ ), zvýšení objemu stolice, stimulace bakterií rodů *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Eubacterium* a inhibice bakterií rodů *Clostridium* a *Bacteroides* (Holzapfel et Schillinger, 2002). Studie dále ukázaly, že podávání prebiotik vede také ke zvýšení tvorby protizánětlivých cytokininů a snížení cytokininů zánět podporujících (Patel et al., 2014).

Mateřské mléko je zlatým standardem v kojenecké výživě a kojení přináší dětem několik zdravotních přínosů. Jednou z těchto výhod je sestavení zdravého střevního mikrobiomu, což je připisováno i oligosacharidům mateřského mléka (OMM), přítomných ve velkém množství. OMM jsou složité sacharidy, které procházejí zažívacím traktem a působí jako prebiotika, kdy selektivně stimulují růst prospěšných střevních bakterií (Medina et al., 2017).

Ne všechny děti jsou však kojeny a kojenecká výživa, která se obvykle vyrábí z kravského mléka, se používá jako náhražka. Prebiotika jsou běžnými přísadami přidávanými do kojenecké výživy. Fruktooligosacharidy jsou směsí lineárních polymerů fruktosy ve vazbě 2-1 s koncovou glukosou a stupněm polymerace (DP) 3 až 6. FOS spolu s inulinem, který má vyšší DP, jsou získávány z kořene určitých rostlin, např. z čekanky. Přes jejich široké použití tyto prebiotika zcela neodpovídají strukturální složitosti OMM (Medina et al., 2017).

Vzhledem k tomu, že prebiotika nejsou životaschopná, stabilita není problémem, ale musí být stanovena bezpečná úroveň spotřeby (Vyas et Ranganathan, 2012).

### **3.2.3. Synbiotika**

Synbiotikum se týká produktu, ve kterém jsou synergicky kombinována probiotika a prebiotika. Kombinace pre- a probiotik v jednom přípravku prokázala, že přináší výhody nad rámec jejich jednotlivého použití. Pokud je prebiotický sacharid využíván probiotickým kmenem, bude tento kmen selektivně podporován v růstu a proliferaci ve střevě (Goktepe et al., 2006).

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou méně patrné ve střevní mikrobiotě novorozenců, nicméně jsou stále předmětem obohacování prebiotiky, jako je FOS a inulin, a tudíž jsou častým základem synbiotik (Medina et al., 2017).

Bylo prokázáno, že synbiotika zvyšují absorpci minerálů, zejména vápníku a hořčíku. Základní mechanismy jsou různé: zvýšená rozpustnost minerálů v důsledku zvýšené bakteriální produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem, což je podporováno větší dodávkou substrátu; zvětšení absorpčního povrchu podporou proliferace enterocytů

zprostředkovaných produkty bakteriální fermentace, převážně laktátu a butyrátu; zvýšená exprese proteinů vázajících vápník; zlepšení zdraví střev; degradace minerálních komplexů fytové kyseliny; uvolňování faktorů ovlivňujících kosti, jako jsou fytoestrogeny z potravin; a stabilizace střevní mikrobioty (Patel et al., 2014).



### 3.3 Charakteristika nejvýznamnějších rodů probiotických bakterií

#### 3.3.1. *Bifidobacterium*

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou nesporulující, nepohyblivé tyčinky, které mohou být různě ohnuté či větvené do tvaru Y či V, přičemž nejtypičtější je lehce rozvětvený kyjovitý tvar nebo špachtlovitě rozšířená zakončení. Mohou existovat jednotlivě nebo tvořit řetízky či shluky. Jsou striktně anaerobní, avšak některé druhy mohou tolerovat nízké koncentrace kyslíku. Mají fermentační metabolismus, rozkládají řadu sacharidů a neprodukují plyny. Jejich optimální růstová teplota je v rozmezí 36 a 38 °C, což platí o bakteriích lidského původu, zatímco bakterie zvířecího původu mají optimum vyšší (41-43 °C). Patří mezi Gram-pozitivní bakterie a řadí se do kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, podtřídy *Actinobacteridae*, řádu *Bifidobacteriales* a čeledi *Bifidobacteriaceae* (Jardine, 2009; Lee et al., 2009).

Rod *Bifidobacterium* zahrnuje: *B. actinocoloniiforme*, *B. adolescentis*, *B. aerophilum*, *B. aesculapii*, *B. aquikefiri*, *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. anseris*, *B. asteroides*, *B. avesanii*, *B. biavatii*, *B. bifidum*, *B. bohemicum*, *B. bombi*, *B. boum*, *B. breve*, *B. callitrichos*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. commune*, *B. coryneforme*, *B. criceti*, *B. crudilactis*, *B. cuniculi*, *B. dentium*, *B. eulemuris*, *B. faecale*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. hapali*, *B. imperatoris*, *B. indicum*, *B. italicum*, *B. kashiwanohense*, *B. lemurum*, *B. longum*, *B. magnum*, *B. margollesii*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. mongoliense*, *B. moukalabense*, *B. myosotis*, *B. parmae*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. psychraerophilum*, *B. pullorum*, *B. ramosum*, *B. reuteri*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. saguini*, *B. scardovii*, *B. stellenboschense*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum*, *B. termophilum*, *B. tissieri* a *B. tsurumiense* (Lee et al., 2009; Lugli et al., 2018; Mattarelli et Biavati, 2018).

Všechny doposud známé bifidobakterie jsou izolovány z velmi limitovaného počtu přirozených míst výskytu, a to z lidského a zvířecího gastrointestinálního traktu, potravin, střev hmyzu se sociálním způsobem života a odpadních vod. Mezi nejčastěji se nacházející kmeny v lidském střevě patří ty, které spadají pod druhy *catenulatum*, *pseudocatenulatum*, *adolescentis*, *longum*, *breve*, *angulatum*, *bifidum* a *dentium* a typickým druhem izolovaným z funkčních potravin je *B. animalis* subsp. *lactis* (Lee et al., 2009).

### 3.3.2. *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je největší skupinou patřící k bakteriím mléčného kvašení obsahující zatím více než 120 kmenů, přičemž toto číslo navíc každý rok narůstá. Řadí se do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae*. Jsou to nesporulující, většinou nepohyblivé, Gram-pozitivní krátké tyčinky, které často tvoří řetízky. Mají fermentační metabolismus, přičemž se dělí na homo- a heterofermentativní skupiny, jsou aerotolerantní či anaerobní, acidotolerantní či acidofilní a mají složité nutriční požadavky (sacharidy, aminokyseliny, peptidy, estery mastných kyselin, soli, deriváty nukleových kyselin, vitamíny) (Jardine, 2009; Lee et al., 2009).

Rod *Lactobacillus* může být rozdělen do následujících skupin: skupina *L. brevis*, *Lactobacillus buncheri*, *L. casei*, *L. coryniformis*, *L. delbrueckii*, *L. fructivorans*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. sakei*, *L. salivarius* a skupina *L. vaccinoferus*. Skupiny *L. casei* a *L. delbrueckii* zahrnují některé důležité druhy bakterií pro použití jako probiotika (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*) (Jardine, 2009; Hirayama et Endo, 2016).

Mnoho druhů je využíváno ve výrobě a konzervaci fermentovaných potravin a krmiv ze syrových zemědělských produktů (mléko, maso, zelenina, obiloviny), ve kterých jsou přítomny buď díky kontaminaci, nebo jsou přidány jako startovací kultury. Navíc se přirozeně vyskytují v GIT lidí, i když v menším zastoupení než bifidobakterie, a hrají důležitou roli ve prospěch zdraví jedince. Není tedy překvapivé, že se řada druhů používá jako probiotika více než 70 let (Lee et al., 2009).

### 3.4 Faktory ovlivňující přežívání probiotických bakterií

Většina probiotických kmenů je dobře přizpůsobena životu v GIT, ale může být špatně přizpůsobena jinému prostředí. Při vystavení environmentálnímu stresu během produkce a skladování mohou tyto mikroorganismy přecházet do životaschopného, avšak nekultivovatelného stavu, což je ochranná odezva, ve které jsou spící, přesto metabolicky aktivní. Bakterie v tomto stavu mohou obnovit své široké funkce a opět se replikovat, když narazí na pohostinnější prostředí (Davis, 2014). Probiotický kmen, který má být používán v potravinářských matricích a farmaceutických aplikacích, musí odolávat podmínkám a interakcím a musí být stabilní i při průchodu gastrointestinálními cestami. Bylo zjištěno, že mnoho kmenů není tak stabilní, jak je požadováno. Tuto nestabilitu lze překonat různými technikami, jako je úprava kompozičních a procesních faktorů při výrobě potravin a přípravků ve prospěch použitých kmenů, výběru tolerantnějších kmenů a technologického procesu (Meybodi et Mortazavian, 2017).

Bifidobakterie, podobně jako jiné bakterie mléčného kvašení, vykazují nízkou toleranci vůči stresu. Aby bylo možné s nimi pracovat, je nezbytné rozvíjet podmínky skladování, které zajistí jejich životaschopnost a zachování druhově specifických vlastností, včetně probiotických. Hlavními faktory, které ovlivňují životaschopnost probiotik během skladování jsou zejména teplota, kyslík a relativní vlhkost (Kharchenko et al., 2017).

#### 3.4.1. Teplota

Probiotické přípravky musí být obvykle uchovávány v lednici i v případě, že jsou v sušené formě. Některé komerční produkty mohou být ale uchovávány při pokojové teplotě i po dobu několika měsíců. Je třeba poznamenat, že k získání takových produktů musí být výrobní nastavení velmi specifické a řízené (Meybodi et Mortazavian, 2017). Ve všech testovaných přípravcích jedné studie měla však teplota při skladování malý vliv na množství životaschopných buněk (Leja et al., 2009), zatímco v jiných vědeckých publikacích se uvádí teplota jako kritický parametr pro přežití během skladování (Strasser et al., 2009).

Nadměrné teploty prostředí způsobují u bakterií denaturaci proteinů, poškození nukleových kyselin, membrán a DNA. Nicméně pokud jsou bakterie vystaveny vyšším teplotám, přeprogramují své metabolické systémy jako reakci na změny teploty prostředí. Odezva na teplotní stres byla v posledních letech převážně zkoumána právě u probiotik.

Existuje mnoho důkazů o tom, že vystavení buněk subletální teplotě zvyšuje jejich přežití za stresových podmínek (Nguyen et al., 2016).

Studená tolerance je jedním z nejdůležitějších rysů probiotických bakterií, protože při výrobě, skladování a uchovávání musí být vystaveny nízkým teplotám a bakterie tedy musí udržovat svou životaschopnost a své probiotické vlastnosti i při nízké teplotě. Zmrazení způsobuje poškození buněk nejen tvorbou vodních krystalů, které poškozují buněčnou membránu, ale také změnou gradientu osmotického tlaku živin uvnitř i vně buněk. Existuje dobře zdokumentovaný důkaz, že buňky, které jsou vystaveny nízké teplotě (např. 15 °C po dobu 2 hodin) před zmrazením vykazovaly vyšší míru přežití (Nguyen et al., 2016). Dále se uvádí, že v čím chladnějším prostředí je produkt poté uchováván, tím lépe probiotické bakterie přežívají (Lee et al., 2009).

#### **3.4.2. Vlhkost, aktivita vody**

Vlhkost je druhým omezením, které musí být bráno v úvahu. Obecně musí mít sušené kultury aktivitu vody ( $a_w$ ) kolem 0,1. Se stoupající hodnotou nad 0,3 by se snížila životaschopnost bakterií. Je zřejmé, že vlhkost ve vzduchu zvyšuje hodnotu  $a_w$  prášku během skladování a aby se zabránilo kontaktu kultury s vodou během skladování, využívá se dvou opatření: 1.) balení ve voděodolných lahvičkách nebo filmech; a 2.) přidání malého množství činidla vázajícího vlhkost. Tyto strategie platí až do otevření obalu. Stabilita kultury tedy závisí na absorpci vody v produktu, zejména pokud je jeho obal opakovaně otevírán (Meybodi et Mortazavian, 2017). Vlhkost navíc souvisí i s teplotou – se vzrůstající teplotou roste i škodlivost působení vlhkosti (Lee et al., 2009).

#### **3.4.3. Kyslík**

Kyslík je dalším nepříznivým faktorem pro životaschopnost probiotik během skladování. Přechodné působení kyslíku na bifidobakterie neutralizuje jejich probiotický potenciál, což je rozhodující pro účinnost substituční terapie (Kharchenko et al., 2017). Laktobacily a bifidobakterie jsou mikroorganismy mikroaerofilní resp. anaerobní a na rozdíl od aerobních bakterií, které kyslík zachytávají a zabudovávají do molekul vody, je systém zachytávání kyslíku v těchto probiotických bakteriích buď snížen, nebo zcela chybí. Expozice kyslíku způsobuje akumulaci toxických kyslíkových metabolitů jako je superoxidový anion, hydroxylový radikál, peroxid vodíku v buňce, vedoucí případně ke smrti buněk (Talwalkar et Kailasapathy, 2004).

S cílem překonat škodlivé účinky kyslíku a zvýšit stabilitu produktu, přidávají výrobci obvykle antioxidanty do sušícího média. Jedná se také o některá činidla vychytávající kyslík, jejichž účinky na ochranu se ale při otevření výrobku sníží (Meybodi et Mortazavian, 2017). Deoxygenace inertními plyny způsobuje snížení redoxního potenciálu a zlepšení schopnosti přežití (Nguyen et al., 2016).

#### **3.4.4. Průchod GIT**

pH je důležitým faktorem ovlivňujícím přežití probiotických bakterií. Je známo, že normální kyselost prázdného žaludku má pH 1,5 až 2,0, což jsou hodnoty pro bifidobakterie škodlivé (Nualkaekul et al., 2011; Kharchenko et al., 2017). Z tohoto důvodu se sypký prášek probiotik často aplikuje do kapslí, které bakterie chrání před kyselým prostředím (Goktepe et al., 2006). Laktobacily a bifidobakterie však vytvářejí jako konečný produkt metabolismu sacharidů organické kyseliny, což jim umožňuje tolerovat nižší pH ve srovnání s jinými bakteriemi. Navíc je setrvání v žaludku relativně krátké (Lee et al., 2009).

Po průchodu žaludkem se potraviny a probiotické přípravky přenesou do střeva, kde zůstávají po dobu nejméně 5 hodin. Tento čas postačuje k tomu, aby probiotika vykazala svou funkční aktivitu (Kharchenko et al., 2017). Navzdory již vyššímu pH v duodenu je další překážkou koncentrace žlučových solí. V tlustém střevě je poté již koncentrace těchto solí nízká a probiotické bakterie, které průchod přes GIT přežily zde mohou fungovat (Lee et al., 2009). Ve střevě je pak adheze předpokladem pro střevní kolonizaci, která je spojena s příznivými účinky probiotik (Goktepe et al., 2006).

### 3.5 Technologie výroby probiotik a její limitující faktory

Příprava produktů, které obsahují probiotické bakterie, může být stresující pro samotné mikroorganismy a může dokonce vyvolat geny stresové odezvy. Důležitým předpokladem výběru probiotických kmenů je schopnost odolat namáhání, jako je teplota, osmotický tlak, pH, které probíhá během výroby (Davis, 2014). Je nutné zvolit ty kmeny, které jsou při skladování nejstabilnější při zachování jejich hlavních probiotických vlastností (Kharchenko et al., 2017).

Fermentační proces je klíčovým krokem k získání mikrobiální biomasy a biologických produktů používaných farmaceutickým, chemickým a potravinářským průmyslem. Kontrolovaný a řízený proces získávání probiotických kultur umožňuje produkci buněk v různém fyziologickém stavu, kdy jsou zvláště korigovány stresové podmínky, jako jsou ty, které se nacházejí v zažívacím traktu budoucího hostitele. Navzdory tomu jde o složitou operaci, kterou je třeba provádět na průmyslové úrovni (Coghetto et al., 2016).

Životaschopnost buněk musí být udržována ve výrobcích po celou dobu jejich skladovatelnosti a během spotřeby, a proto byly popsány četné techniky při pokusu o zlepšení tohoto aspektu. Mezi mnoha slibnými technologiemi, které byly zaznamenány, se ukázala imobilizace buněk jako mimořádně zajímavá, protože podporuje zvýšenou rezistenci buněk a přežití (Coghetto et al., 2016).

K překonání bariér se zkoumají techniky mikroenkapsulace jako způsobu ochrany probiotických mikroorganismů přidávaných do potravinových produktů dodávaných ve vysoce koncentrovaných formách, přičemž v literatuře je popsáno několik postupů včetně přípravy emulzí, extruzí, koacervací, sušení rozprašováním, chlazení rozprašováním, elektrospaying a technologie aerosolu (Her et al., 2015; Coghetto et al., 2016). Není překvapením, že údaje ukazují, že bakterie trpí poškozením buněk během všech těchto procesů. V důsledku toho rehydratační podmínky těchto poškozených buněk mají zásadní vliv na životaschopnost probiotik po sušení. Proto je třeba pečlivě zvolit způsob sušení a použitý postup (Coghetto et al., 2016). Vysoké koncentrace životaschopných buněk jsou totiž pro produkci probiotického produktu nezbytné (Julean et al., 2014).

U probiotik v orálních pevných dávkových formách (tablety) byla pozorována silná negativní korelace mezi životaschopností bakterií a kompresní silou; přežití bakterií se snížilo zvýšením stlačovacího tlaku působícího na tabletu (Meybodi et Mortazavian, 2017).

### 3.5.1. Mikroenkapsulace

Mikroenkapsulace chrání buňky před baktericidními účinky žaludeční kyseliny, zvyšuje stabilitu a udržuje životaschopnost kultury během skladování (Coghetto et al., 2016). Jde o proces, při kterém jsou živé buňky zabaleny do obalu, aby je chránil před okolním nepříznivým prostředím (Talwalkar et Kailasapathy, 2004). Je zde ale řada požadavků:

- Materiály musí být potravinářské kvality, levné a kompatibilní se surovinou, do které mají probiotika přijít.
- Proces musí být snadný, levný a nesmí snižovat životaschopnost bakterií.
- Efektivita procesu musí být vysoká (až 100%).
- Mikrokapsle musí obsahovat vysoký podíl probiotik.
- Mikrokapsle nesmí ovlivňovat chuť a texturu potravin a nápojů.
- Mikrokapsle musí chránit bakterie před vnějším stresem (nejčastěji vlhkostí a nízkým pH).
- Mikrokapsle musí být schopny dopravit probiotika na požadované místo účinku (Lee et al., 2009).

Zahrnuje postupy uvedené dále.

#### **Emulze**

Emulzní technikou se dosahuje dispergace probiotických buněk v oleji nebo organické fázi. Při této metodě se diskontinuální fáze (suspenze buněčného polymeru) přidá k velkému objemu oleje (kontinuální fáze). Směs se homogenizuje za vzniku emulze. Po vytvoření emulze vody v oleji je ve vodě rozpustný polymer insolubilizován (zesíťen) za vzniku částic v olejové fázi. Pro potravinářské aplikace se používají jako kontinuální fáze rostlinné oleje. Emulze je obvykle rozbita přidáním  $\text{CaCl}_2$  a mikrokapsle jsou shromažďovány centrifugací (Coghetto et al., 2016).

#### **Extruze**

V extruzní technice se roztok polymerů, jako je alginát, nejprve smísí s mikrobiálními buňkami a potom se extruduje přes otvor jako kapičky do roztoku zesíťovacího činidla, jako je chlorid vápenatý (Coghetto et al., 2016).

## **Koacervace**

Tato mikroenkapsulační technika využívá fázovou separaci jednoho nebo více nekompatibilních polymerů z počátečního polymerního roztoku za specifické teploty, pH nebo složení roztoku. Nekompatibilní polymer je přidán k roztoku polymeru a disperze se míchá. Změny ve fyzikálních parametrech vedou k oddělení nekompatibilního polymeru a ukládání husté koacervátové fáze obklopující materiál jádra, což vede k tvorbě koacervátů.

Koacervace poskytuje odolnost proti mechanickému namáhání, změnám teploty a pH v médiu. Odolnost proti pH je obzvláště užitečná pro enkapsulaci probiotik, která se musí uvolnit až v prostředí tlustého střeva (Coghetto et al., 2016).

## **Sušení rozprašováním**

Technika sušení rozprašováním spočívá v atomizaci suspenze životaschopných buněk ponořených do polymerního roztoku v horkém sušicím vzduchu a rychlého odpařování vody. Zapouzdřený produkt je oddělený ve formě suchého prášku z proudícího vzduchu v cyklonu. Při výrobě rovnoměrných mikročástic je třeba optimalizovat různé provozní podmínky, jako je teplota vstupního vzduchu, teplota přívodu, rychlost přivádění produktu, teplota vzduchu a výstupní teplota vzduchu. Přiměřené nastavení teploty vstupního vzduchu je důležité, protože nízké teploty vzduchu snižují rychlost odpařování vody, což vede k mikročásticím s membránami s vysokou hustotou a špatnými tokovými vlastnostmi, zatímco nadměrně vysoké teploty vzduchu mohou nepříznivě ovlivnit životaschopnost buněk. Přizpůsobení teploty přívodu je navíc důležité pro úpravu viskozity polymerního roztoku a pro jeho schopnost stříkat v homogenní formě (Coghetto et al., 2016).

Technika nabízí vysokou produkci a nízké provozní náklady, ale obvykle se nepoužívá k sušení bakterií náchylných k vysokým teplotám (Shokri et al., 2015).

## **Chlazení rozprašováním**

Tato metoda mikroenkapsulace je podobná sušení rozprašováním. Vytvářejí se opět malé kapičky, s významným rozdílem v tom, že chlazení zahrnuje injekci studeného vzduchu namísto horkého vzduchu, což umožňuje tuhnutí částic. Chlazení rozprašováním bylo vyvinuto pro vyřešení problému s poškozením buněk způsobeného vystavením mikroorganismů vysokým teplotám (Coghetto et al., 2016).



## **Elektrospraying**

Poměrně nová technologie pro mikroenkapsulaci probiotik je použití elektrospinningu / elektrosprayingu, způsobu, který umožňuje vytvářet částice v měřítku mikro až nano stupnice a nevyžaduje vysoké teploty. Tato technika je založena na principu atomizace kapaliny za použití elektrických sil. Kapalina, která proudí z kapilární trysky při vysokém elektrickém potenciálu, je nucena elektrickým polem rozptýlit se do jemných kapiček. Velikost takovýchto kapiček se může pohybovat od stovek mikrometrů až po desítky nanometrů (Coghetto et al., 2016).

## **Aerosol**

Další vcelku nová technologie, používaná pro kontinuální zapouzdření probiotik je založená na samostatné technologii dopadajících aerosolů roztoku alginátu sodného a síťovacího roztoku chloridu vápenatého pro výrobu ve vodě nerozpustných zesíťovaných alginátových mikročástic. Podle autorů se v tomto způsobu nepoužívá rozpouštědlo a teplo, a proto je metoda vhodná pro zapouzdření tepelně labilních a k rozpouštědlům citlivých bakterií (Coghetto et al., 2016).

### 3.6 Lyofilizace bakterií

Po mnoho let se bakterie mléčného kvašení konzervují hlavně lyofilizací, což je ale časově náročná a drahá metoda (Strasser et al., 2009). Při této metodě se buňky nejdříve zmrazí a potom suší sublimací a desorpcí rozpouštědla, obvykle vody, za vysokého vakua. Tato metoda však může způsobit poškození buněčné membrány z důvodu tvorby krystalů a stresových podmínek s vysokou osmolaritou. Je proto využíváno látek působících jako kryoprotektanty, aby se udržovala životaschopnost mikrobiálních buněk během dehydratace. Funguje takto např. glukosa, trehalosa, maltodextrin, sušené odstředěné mléko a syrovátkový protein. Kryoprotektanty mohou být také začleněny do média před fermentací, což napomáhá při adaptaci mikrobiálních buněk na životní prostředí. Tyto kryoprotektanty se hromadí v buňkách, což snižuje osmotický rozdíl mezi vnitřním a vnějším buněčným prostředím (Miao et al., 2008; Coghetto et al., 2016). Ochranná látka, která je jedním z nejdůležitějších faktorů pro zlepšení životaschopnosti probiotik během lyofilizace, vykazuje zvýšenou toleranci při vysoušení v mnoha organismech díky stabilizaci membrán a proteinů (Her et al., 2015). Cukry pronikají do buněk a vytvářejí vysoký osmotický tlak, který brání tvorbě ledových krystalů a destrukci buněk během procesu zmrazení. Proteinové sloučeniny zajišťují těsnější spojení mezi buněčnou stěnou a cytoplasmou, což je důležité při rozmrazení a rehydrataci buněk (Kharchenko et al., 2017).

Vysoušení lyofilizací představuje preferovanou metodu pro dlouhodobé skladování mikroorganismů pro potravinářský a farmaceutický průmysl, kde je potřeba velké množství bakterií. I když je široce používanou technikou, stále existují velké obměny kvůli množství různých vysoušecích technik souvisejících s jednotlivými mikroorganismy. Sušení vymražením je také známé jako proces stabilizace, při kterém dojde nejprve ke zmrznutí, následované dvěma kroky sušení, aby se snížil obsah vody na úroveň, která není schopna podpořit růst a enzymatickou aktivitu (Julean et al., 2014).

## 4. Metoda a materiál

### 4.1 Hodnocené vzorky

#### Vzorek číslo 1: Biopron

Probiotické kapky od výrobce Valosun (ČR) fungují jako doplněk stravy a mohou je užívat děti již od narození. Použitým probiotickým kmenem je zde *Lactobacillus rhamnosus* s označením LRH08. Dalšími složkami jsou slunečnicový olej a protispěkové látky (oxid křemičitý, stearan hořečnatý).

Obsah v denní dávce – 6 kapkách:  $1 \times 10^9$  CFU.

Dle upozornění výrobce se má výrobek skladovat při teplotách 5 – 25 °C a po otevření spotřebovat do 3 měsíců.

#### Vzorek číslo 2: BioGaia – ProTectis

Doplněk stravy formou probiotických kapek vyrobený ve Švédsku obsahuje patentovaný kmen *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 a dále pak slunečnicový olej. Kapky mohou užívat děti od prvního měsíce života.

V jedné dávce – 5 kapkách: minimálně  $10^8$  CFU.

Výrobek má být skladován do teploty 25 °C a po otevření je jeho trvanlivost 3 měsíce.

#### Vzorek číslo 3: ProbioMaxík Baby

V současné době (květen 2017) je nejnovějším probiotickým doplňkem pro kojence na trhu. Výrobce je Dr. Max a může být podáván dětem od 0. měsíce věku. Použitou kulturou je *Lactobacillus reuteri* s označením LR 92 MDX. Kapky jsou složeny z oleje jako nosiče a antioxidantů v podobě extraktu s vysokým obsahem tokoferolů.

V jedné dávce – 5 kapkách:  $1,5 \times 10^9$  CFU.

Kapky mají být skladovány při 15 – 25 °C a po otevření v lednici. Poté je jejich trvanlivost 2 měsíce.

#### Vzorek číslo 4: Apo-Laktík for Baby

Probiotické kapky vyrobené v Dánsku firmou Biocare mohou užívat děti již od narození. Mezi použité kmény patří *Lactobacillus reuteri* a *Lactobacillus rhamnosus*. Kapky dále obsahují fruktooligosacharidy a slunečnicový olej.

*Lactobacillus reuteri* FloraActive™ v 5 kapkách:  $1,25 \times 10^8$  CFU

*Lactobacillus rhamnosus* FloraActive™ v 5 kapkách:  $1,25 \times 10^8$  CFU

Dle výrobce se má výrobek skladovat při teplotách 10 – 25 °C. Neotevřené balení má při pokojové teplotě trvanlivost 2 roky, otevřené 2 měsíce při skladování v lednici.

#### **Vzorek číslo 5: Laktobacílky baby**

Jedná se o doplněk stravy v podobě vysypávacích kapslí kombinující probiotika a prebiotika od společnosti Swiss natur I™. Je určen pro děti od narození a obsahuje maltodextrin, fruktooligosacharidy (inulin), kapsli rostlinného původu, bakteriální kulturu, antioxidant (kyselinu askorbovou) a protispěkovou látku (stearan hořečnatý).

V jedné kapsli: lyofilizované bakterie 1 mld\* / 8,21 mg (\* při výrobě plněno až 300 % tohoto množství); 45 % *Lactobacillus rhamnosus* HA-111, 15 % *Lactobacillus acidophilus* HA-122, 15 % *Lactobacillus casei* HA-108, 15 % *Bifidobacterium infantis* HA-116, 10 % *Bifidobacterium bifidum* HA-132.

Výrobek má být skladován při pokojové teplotě, po otevření lépe v chladničce. Kapsle nejsou uloženy v blistrech, ale volně v plastové nádobce.

#### **Vzorek číslo 6: Biopron Junior**

Doplněk stravy formou sáčků od českého výrobce Valosun je probiotikum s vysokým podílem prebiotik vhodný pro kojence od prvního měsíce života. Syká směs obsahuje inulin, fruktooligosacharidy, směs probiotik a vanilkové aroma.

V jednom sáčku: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus* – vše po  $5 \times 10^9$  CFU.

Skladování je doporučeno při teplotách 5 – 25 °C.

#### **Vzorek číslo 7: Biopron – Laktobacily Baby Bifi+**

Probiotický doplněk stravy s vysokým podílem bifidobakterií vyrábí opět firma Valosun. Jedná se o vysypávací tobolky uložené v blistrech vhodné pro děti od narození. Tobolky vyrobené ze želatiny jsou naplněny směsí fruktooligosacharidů, probiotických kultur, barviva (oxid titaničitý) a protispěkové látky (stearan hořečnatý).

V jedné tobolce: *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* – vše po  $10^9$  CFU.

Teplota skladování i tohoto výrobku by se měla pohybovat mezi 5 – 25 °C.

## 4.2 Skladování vzorků

Vzorky byly skladovány v rozdílných podmínkách. Teploty skladování byly 4 °C v lednici, pokojová teplota 24 °C a 37 °C v termostatu.

Všechny vzorky byly najednou poprvé otevřeny (kromě jednotlivě dávkovaných sáčků a blistrů), následně několik měsíců skladovány v původním zavřeném balení a periodicky u nich byl prováděn mikrobiologický rozbor na počet probiotických bakterií. V případě kapek byl rozbor proveden každý měsíc, jelikož mají uvedenou kratší dobu použitelnosti. Pouze poslední rozbor byl proveden s odstupem tří měsíců. Ostatní vzorky byly odebírány jednou za dva až tři měsíce. Vzorky nebyly vystaveny přímému slunečnímu záření.

## 4.3 Mikrobiologický rozbor probiotických doplňků

### 4.3.1. Složení a příprava kultivačních médií

#### Wilkins – Chalgren agar se sójovým peptonem

Jedná se o univerzální neselektivní kultivační půdu, která se používá pro stanovení celkových počtů anaerobních bakterií (Oxoid, UK).

Na 100 ml destilované vody:	Wilkins – Chalgren agar	4,3 g
	sójový pepton	0,5 g
	cystein	0,05 g
	Tween 80	0,1 ml
Složení Wilkins – Chalgren agaru:	kasein	10 g
	želatina	10 g
	kvasniční extrakt	5,0 g
	chlorid sodný	5,0 g
	dextróza	1,0 g
	L-Arginin	1,0 g
	pyruvát sodný	1,0 g
	hemin	0,005 g
	vitamín K	0,0005 g

Přesně navážené odpovídající množství bylo rozpuštěno v potřebném objemu destilované vody a následně sterilováno při 120 °C 15 minut.

### **Wilkins – Chalgren agar se sójovým peptonem a mupirocinem**

Stejný agar jako byl popsán výše s rozdílem přidání antibiotika mupirocinu (Oxoid, UK). Je určen ke stanovení rodu *Bifidobacterium*.

Na 100 ml destilované vody:	Wilkins – Chalgren agar	4,3 g
	sójový pepton	0,5 g
	cystein	0,05 g
	Tween 80	0,1 ml
	mupirocin	1 ampulka

Přesně navážené odpovídající množství bylo rozpuštěno v potřebném objemu destilované vody. Mupirocin byl přidán do rozvařeného a na max. 50 °C vytemperovaného agaru.

### **Rogosa agar**

Rogosa agar (Oxoid, UK) se používá ke kultivaci rodu *Lactobacillus*.

Na 100 ml destilované vody:	Rogosa agar	6,2 g
Složení Rogosa agaru:	trypton	10 g
	kvasniční extrakt	5 g
	glukóza	20 g
	Tween 80	1 ml
	octan sodný	17 g
	citran amonný	2 g
	dihydrogenfosforečnan draselný	6 g
	síran hořečnatý	0,575 g
	síran manganatý	0,12 g
	síran železitý	0,034 g
	agar	20 g

Přesně navážené odpovídající množství bylo rozpuštěno v potřebném objemu destilované vody a následně bylo upraveno pH kyselinou octovou na hodnotu 5,4. Používá se 132 ml kyseliny na 100 ml destilované vody. Agar se nesteriluje, pouze rozváří.

## MRS agar

Agar (Oxoid, UK) využívaný ke kultivaci rodu *Lactobacillus*.

Na 100 ml destilované vody:	MRS agar	6,5 g
Složení MRS agaru:	pepton	10 g
	hovězí extrakt	8 g
	kvasniční extrakt	4 g
	D (+) glukóza	20 g
	Tween 80	1 ml
	citran amonný	2 g
	octan sodný	5 g
	heptahydrát síranu hořečnatého	0,2 g
	tetrahydrát síranu manganatého	0,05 g
	dihydrogen fosforečnan draselný	2 g
agar	10 g	

Přesně navážené odpovídající množství bylo rozpuštěno v potřebném objemu destilované vody a následně sterilováno při 120 °C 15 minut.

## Agar s mucinem a mupirocinem

Selektivní médium pro kultivaci a stanovení *Bifidobacterium bifidum*, do kterého byl přidán mucin a antibiotikum mupirocin (Oxoid, UK).

Na 100 ml destilované vody:	trypton	0,5 g
	pepton	0,5 g
	kvasniční extrakt	0,25 g
	Tween 80	0,1 ml
	cystein	0,025 g
	mucin	2 g
	agar	1,5 g
	mupirocin	1 ampulka

Přesně navážené odpovídající množství bylo rozpuštěno v potřebném objemu destilované vody a následně sterilováno při 120 °C 15 minut. Mupirocin byl přidán do vytemperovaného agaru na max. 50 °C.

### 4.3.2. Příprava ředících řad

Ředící řady se využívají k získání potřebného naředění vzorku.

Na 900 ml destilované vody:	trypton	4,5 g
	nutrient broth	4,5 g
	kvasniční extrakt	2,5 g
	Tween 80	0,45 ml
	cystein	0,225 g

Připravená směs byla následně rozvářena po dobu 10-20 minut. Tekutina byla poté dávkována po 9 ml do vysterilovaných penicilínek, které byly takto na 10 minut vloženy do 100 °C vodní lázně s destilovanou vodou.

Následujícím krokem bylo probublání obsahu CO<sub>2</sub>, utěsnění gumovým špuntem a kovovým víčkem. Takto připravené ředící řady byly voženy do autoklávu a sterilovány po dobu 15 minut při 120 °C.

### 4.3.3. Odebírání a ředění vzorků

1 g resp. 1 ml vzorku byl odvážen resp. odměřen do penicilínky s 9 ml média s ředící řadou, dobře uzavřeno a lehce promícháno tak, aby došlo ke smísení s tekutinou. Tím vzniklo první ředění 10<sup>-1</sup>.

Další ředění bylo již vytvářeno přenesením jen 1 ml tekutiny z předchozího ředění. Takto se postupovalo až do potřebného počtu ředění, nejvíce však do 10<sup>-9</sup>.

Při přípravě je třeba dbát aseptické práce a používání sterilních nástrojů a pomůcek, aby se zabránilo kontaminaci a ovlivnění koncentrací.

### 4.3.4. Mikrobiologický rozbor

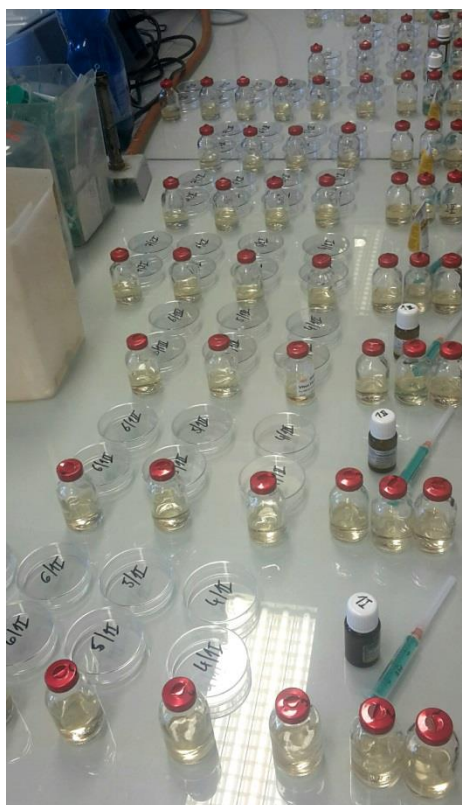
K rozboru bylo třeba připravit: ředící řady se vzorky, kultivační média, sterilní Petriho misky o průměru 55 mm a injekční stříkačky s jehlami, plynový kahan, anaerostaty (Oxoid, UK) s katalyzátory (Anaerogeny) vytvářející anaerobního prostředí. Vhodné kultivační médium bylo zvoleno dle rodu či druhu bakterie, kterou daný výrobek obsahoval.

Na popsané Petriho misky bylo zaočkováno po 0,5 ml ředící řady dané koncentrace ve třech opakováních. Při postupu od nejnižší koncentrace po nejvyšší mohla být používána pouze jedna injekční stříkačka. Ihned poté byly misky zality kultivačním médiem – agarem a v případě rozboru bifidobakterií uzavřeny do anaerostatů. Změny složení atmosféry uvnitř



bylo dosaženo použitím vyvíječe anaerobní atmosféry. Důkladně uzavřené anaerostaty byly uloženy do termostatu, ve kterých zůstaly po dobu kultivace (37 °C/48 hod).

V případě rozboru se zaměřením na mikroaerofilní laktobacily byla zatuhlá první vrstva agaru přelita ještě jednou. Po úplném zatuhnutí byly misky ke kultivaci uloženy dnem vzhůru do termostatu (37 °C/48 hod).



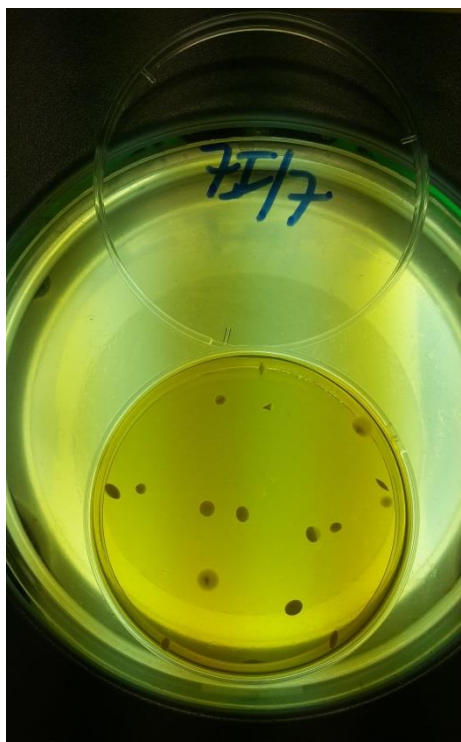
**Obr. 1:** Rozbor výrobků v podobě kapek na počty laktobacilů (vlastní fotodokumentace)

#### 4.3.5. Vyhodnocení počtu kolonií

Během kultivace na pevných živných mediích vytvářejí mikroorganismy kolonie, což jsou útvary vzniklé pomnožením jedné buňky či shluku dvou a více od sebe neoddělitelných buněk. Vzrostlé kolonie zpravidla obsahují  $10^7$  –  $10^9$  buněk, mají většinou kulovitý tvar a dosahují různých velikostí.

Použitá desková metoda vychází z předpokladu, že z jedné životaschopné buňky vyrůstá jedna kolonie. Po kultivaci byly na všech médiích spočítány kolie z těch Petriho misek z ředění, kde bylo množství dobře počítatelné, tudíž kde nebyly kolonie přerostlé či slité.

Počet mikroorganismů se následně vyjadřuje jako CFU/g či CFU/ml, což znamená „počet jednotek tvořících kolonie“, v angličtině Colony Forming Units. Českým ekvivalentem pro tento výraz je KTJ, tedy „kolonie tvořící jednotky“. Tohoto výrazu se využívá z toho důvodu, že ne z každé buňky přítomné ve vzorku ve výsledku naroste kolonie. Kultivačními metodami není možné stanovit veškeré přítomné mikroorganismy a zároveň jsou některé kolonie tvořeny z více neoddělitelných buněk, a proto se výsledný počet mikroorganismů nevyjadřuje jako počet buněk, ale právě jako CFU či KTJ.



**Obr. 2:** Počítání kolonií. Na fotce výrobek č. 7 uchovávaný při 4 °C a jeho 7. ředění (vlastní fotodokumentace)

## 5. Výsledky

Byly testovány vzorky sedmi různých probiotických doplňků v závislosti na teplotě skladování. Doplňky v tekuté formě (č. 1 – 4) byly analyzovány pokaždé s měsíčním odstupem, poslední rozbor byl proveden po tříměsíční pauze. Výrobky č. 5 až 7, které jsou v suché práškové formě, byly analyzovány s odstupem dvou a posléze tří měsíců. Od prvního do posledního rozboru uplynulo osm měsíců. Stanovován byl počet mikroorganismů pomocí daného selektivního média (dle druhu bakterie, kterou daný výrobek obsahoval), a tak bylo sledováno jejich přežívání.

Výsledky byly vyhodnoceny statistickou analýzou rozptylu pomocí programu STATGRAPHIC Centurion XV. II (Manugistics, Rockville, MD, USA) s 95% pravděpodobností. Analýzou bylo zjišťováno, zda se jednotlivé výsledky statisticky významně liší. V **tabulkách č. 1 – 19** jsou u veškerých získaných hodnot udávajících počet mikroorganismů vyjádřených jako log KTJ na gram či mililitr výrobku  $\pm$  směrodatná odchylka uvedené odlišné indexy v řádcích označující statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 0,05.

### Změny počtu mikroorganismů u vzorků č. 1 – 4

**Tabulka č. 1** Změny počtu bakterií *Lactobacillus rhamnosus* (log KTJ/ml  $\pm$  směrodatná odchylka) v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 1.<sup>1</sup>

Vz. 1	počáteční	1. měsíc	2. měsíc	3. měsíc	4. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	9,73 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	9,83 $\pm$ 0,00 <sup>e</sup>	9,95 $\pm$ 0,00 <sup>f</sup>	9,55 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	9,65 $\pm$ 0,03 <sup>cd</sup>	8,51 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	9,26 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
24 °C	9,73 $\pm$ 0,05 <sup>e</sup>	9,13 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>	8,45 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	8,50 $\pm$ 0,03 <sup>bc</sup>	8,59 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	7,84 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	-
37 °C	9,73 $\pm$ 0,05 <sup>e</sup>	9,08 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>	8,44 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	8,70 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	8,38 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	6,70 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Bakterie ve výrobku přežívaly nejlépe a nejdéle při skladování při 4 °C. Pouze za této teploty jejich počty výrazně neklesly ani po osmi měsících skladování, avšak statisticky

prokazatelné rozdíly zde existují. I za pokojové a zvýšené teploty bakterie přežívaly i pět měsíců v počtu, který je uváděn jako minimální účinný pro probiotika (minimálně 6 log KTJ/g).

**Tabulka č. 2** Změny počtu bakterií *Lactobacillus reuteri* (log KTJ/ml ± směrodatná odchylka) v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 2.<sup>1</sup>

Vz. 2	počáteční	1. měsíc	2. měsíc	3. měsíc	4. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	9,07±0,01 <sup>c</sup>	8,99±0,00 <sup>bc</sup>	9,04±0,03 <sup>c</sup>	8,53±0,11 <sup>a</sup>	8,42±0,01 <sup>a</sup>	8,84±0,06 <sup>b</sup>	8,85±0,04 <sup>b</sup>
24 °C	9,07±0,01 <sup>e</sup>	8,82±0,03 <sup>d</sup>	8,86±0,01 <sup>d</sup>	8,45±0,04 <sup>b</sup>	7,80±0,06 <sup>a</sup>	8,55±0,03 <sup>bc</sup>	8,57±0,01 <sup>c</sup>
37 °C	9,07±0,01 <sup>c</sup>	8,46±0,00 <sup>b</sup>	8,51±0,09 <sup>b</sup>	8,71±0,03 <sup>b</sup>	7,80±0,14 <sup>a</sup>	8,66±0,02 <sup>a</sup>	8,60±0,02 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Bakterie z tohoto výrobku přežívaly velmi dobře při všech teplotách skladování, jejich počty klesly po osmi měsících maximálně o 0,5 log. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při skladování při 4 °C.

**Tabulka č. 3** Změny počtu bakterií *Lactobacillus reuteri* (log KTJ/ml ± směrodatná odchylka) v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 3.<sup>1</sup>

Vz. 3	počáteční	1. měsíc	2. měsíc	3. měsíc	4. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	9,26±0,04 <sup>a</sup>	9,71±0,03 <sup>b</sup>	9,26±0,13 <sup>a</sup>	9,59±0,03 <sup>b</sup>	9,74±0,04 <sup>b</sup>	9,09±0,02 <sup>a</sup>	-
24 °C	9,26±0,04 <sup>e</sup>	8,04±0,01 <sup>d</sup>	6,51±0,15 <sup>b</sup>	6,92±0,05 <sup>c</sup>	6,46±0,01 <sup>c</sup>	5,42±0,05 <sup>a</sup>	5,25±0,16 <sup>a</sup>
37 °C	9,26±0,04 <sup>e</sup>	8,33±0,01 <sup>d</sup>	6,85±0,1 <sup>c</sup>	6,77±0,05 <sup>c</sup>	6,11±0,10 <sup>b</sup>	5,30±0,00 <sup>a</sup>	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Laktobacily v tomto výrobku nejlépe přežívaly při skladování v 4 °C. Při této teplotě nedošlo k poklesu pod 9 log KTJ/ml a pravděpodobně by se tak nestalo ani po osmi měsících, výrobek ale došel, a tak nebylo možné provést poslední rozbor. Oproti tomu při skladování za vyšších teplot došlo k velkému snížení, přičemž po osmiměsíčním skladování v 37 °C kolonie již nenarostly.

**Tabulka č. 4** Změny počtu bakterií rodu *Lactobacillus* (log KTJ/ml ± směrodatná odchylka) v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 4.<sup>1</sup>

Vz. 4	počáteční	1. měsíc	2. měsíc	3. měsíc	4. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	8,86±0,08 <sup>c</sup>	9,10±0,00 <sup>d</sup>	9,08±0,01 <sup>d</sup>	8,72±0,02 <sup>c</sup>	8,34±0,01 <sup>b</sup>	6,78±0,08 <sup>a</sup>	7,41±0,03 <sup>a</sup>
24 °C	8,86±0,08 <sup>b</sup>	8,12±0,01 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
37 °C	8,86±0,08 <sup>a</sup>	8,90±0,01 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Na čtvrtý výrobek měla zvýšená teplota skladování razantní vliv. Již po dvou měsících mimo lednici kolonie na médiích nenarostly. Při skladování jak doporučuje výrobce, tedy v lednici, bakterie přežívaly i osmý měsíc od otevření.

Při porovnání tekutých doplňků v podobě kapek lze konstatovat, že nejvyšší množství probiotických bakterií obsahoval výrobek č. 1. Nejlepších výsledků za všech teplot skladování však dosahoval výrobek č. 2, u kterého ani po osmi měsících neklesla hodnota log KTJ/ml pod 8. U výrobku č. 1 skladovaného za pokojové teploty hodnota klesla pod 8 log KTJ/ml po pěti měsících, za zvýšené teploty dokonce pod 7 log KTJ/ml. Vzorek č. 3 uchovávaný při pokojové teplotě klesl pod 8 log KTJ/ml již po dvou měsících a stejně tak tomu bylo v případě zvýšené teploty. V případě výrobku č. 4 měla snížená teplota zásadní vliv, jelikož za pokojové a zvýšené teploty bakterie do rozboru po dvou měsících nepřežily.

Jako nejnižší terapeuticky účinná dávka probiotických bakterií se udává 6 log KTJ/ml, což pod tuto hodnotu výrobky č. 1 a 2 neklesly po celou dobu výzkumu za žádné teploty

skladování. U výrobku č. 3 se počty pod tuto hranici dostaly až po pětíměsíčním skladování za pokojové i zvýšené teploty. Výrobek č. 4 při 4 °C obstál a pod tuto hranici neklesl.

Celkově je možné říci, že teplota skladování má na přežívání bakterií v těchto výrobcích významný vliv. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při 4 °C; mezi 24 °C a 37 °C byl pozorován rozdíl ve prospěch teploty nižší, avšak ten se projevil až po delší době skladování. Výjimkou byl výrobek č. 2, u kterého bakterie přežívaly za všech teplot velmi podobně. Důvodem by mohl být výběr odolnějších druhů bakterií či způsob jejich zpracování a celého výrobku. Pro výrobek č. 4 vyšlo uložení v lednici jako naprosto opodstatněné, použité bakterie jsou patrně k vyšší teplotě náchylné.

### Změny počtu mikroorganismů u vzorků č. 5 – 7

**Tabulka č. 5** Změny počtu bakterií rodu *Lactobacillus* (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu Rogosa v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 5.<sup>1</sup>

Vz. 5 Rog	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	9,39±0,02 <sup>c</sup>	8,92±0,01 <sup>b</sup>	8,98±0,01 <sup>b</sup>	8,80±0,04 <sup>a</sup>
24 °C	9,39±0,02 <sup>d</sup>	7,43±0,09 <sup>c</sup>	5,97±0,07 <sup>b</sup>	5,44±0,13 <sup>a</sup>
37 °C	9,39±0,02 <sup>d</sup>	7,48±0,06 <sup>c</sup>	6,39±0,02 <sup>b</sup>	5,74±0,13 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Laktobacily v tomto výrobku nejlépe a nejdéle přežívaly při skladování ve 4 °C. Na rozdíl od toho ve 24 °C a 37 °C došlo k rychlejšímu a velmi výraznému poklesu.

**Tabulka č. 6** Změny počtu bakterií rodu *Lactobacillus* (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu MRS v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 5.<sup>1</sup>

Vz. 5 MRS	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	9,39±0,00 <sup>d</sup>	9,26±0,00 <sup>c</sup>	9,15±0,05 <sup>b</sup>	8,90±0,01 <sup>a</sup>
24 °C	9,39±0,00 <sup>c</sup>	7,76±0,01 <sup>b</sup>	5,87±0,09 <sup>a</sup>	5,84±0,06 <sup>a</sup>
37 °C	9,39±0,00 <sup>c</sup>	8,38±0,02 <sup>b</sup>	5,79±0,18 <sup>a</sup>	6,01±0,10 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Kultivace laktobacilů z pátého výrobku i na tomto živném médiu ukázala jako nejlepší prostředí skladování 4 °C. Navíc lze usoudit, že agar MRS je pro toto stanovení vhodnější.

**Tabulka č. 7** Změny počtu anaerobních probiotických bakterií (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu Wilkins-Chalgren se sójovým peptonem v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 5.<sup>1</sup>

Vz. 5 W+SP	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	9,23±0,08 <sup>a</sup>	9,57±0,02 <sup>b</sup>	9,41±0,05 <sup>b</sup>	9,22±0,07 <sup>a</sup>
24 °C	9,23±0,08 <sup>d</sup>	7,77±0,01 <sup>c</sup>	6,43±0,08 <sup>b</sup>	5,56±0,24 <sup>a</sup>
37 °C	9,23±0,08 <sup>d</sup>	8,70±0,00 <sup>c</sup>	6,82±0,20 <sup>b</sup>	5,30±0,00 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

I pro přežívání anaerobních bakterií v tomto výrobku bylo stanoveno jako nejvhodnější skladování při 4 °C – rozdíl mezi prvním a posledním rozbořem nebyl zjištěn. Za pokojové a zvýšené teploty docházelo k postupnému snižování log KTJ/g po celou dobu.

**Tabulka č. 8** Změny počtu bakterií *Bifidobacterium bifidum* (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu s mucinem a mupirocinem v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 5.<sup>1</sup>

Vz. 5 MM	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	9,08±0,06 <sup>b</sup>	9,20±0,10 <sup>b</sup>	8,99±0,06 <sup>b</sup>	8,64±0,10 <sup>a</sup>
24 °C	9,08±0,06 <sup>c</sup>	6,24±0,03 <sup>b</sup>	6,08±0,07 <sup>b</sup>	5,08±0,69 <sup>a</sup>
37 °C	9,08±0,06 <sup>b</sup>	8,60±0,00 <sup>b</sup>	5,88±0,52 <sup>a</sup>	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Bifidobakteriím se nejlépe dařilo při skladování za snížené teploty. Rozdíl oproti skladování za pokojové a zvýšené teploty je výrazný – snížení až o 4 log KTJ/g. Pokles za zvýšené teploty je sice pozvolnější, avšak při posledním rozboru se kolonie již netvořily.

**Tabulka č. 9** Změny počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu Wilkins-Chalgren se sójovým peptonem a mupirocinem v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 5.<sup>1</sup>

Vz. 5 W+SP+M	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	8,72±0,08 <sup>a</sup>	9,30±0,01 <sup>c</sup>	8,99±0,07 <sup>b</sup>	8,82±0,05 <sup>a</sup>
24 °C	8,72±0,08 <sup>b</sup>	6,97±0,07 <sup>a</sup>	6,91±0,54 <sup>a</sup>	6,89±0,52 <sup>a</sup>
37 °C	8,72±0,08 <sup>b</sup>	8,88±0,01 <sup>b</sup>	6,91±0,54 <sup>a</sup>	6,80±0,44 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Rozdíl mezi prvním a posledním rozbohem s odstupem osmi měsíců nebyl při skladování při 4 °C zjištěn. Za pokojové teploty došlo již po dvou měsících ke snížení, za zvýšené až po pěti. Vzhledem ale k podobnosti výsledků v rozborech následujících



je možné, že došlo během přípravy ke kultivaci k chybě a i po dvou měsících mohly být hodnoty podobné.

**Tabulka č. 10** Změny počtu bakterií *Lactobacillus acidophilus* (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu Rogosa v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 6.<sup>1</sup>

Vz. 6 Rog	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	8,22±0,14 <sup>b</sup>	8,83±0,01 <sup>c</sup>	8,68±0,01 <sup>c</sup>	6,46±0,15 <sup>a</sup>
24 °C	8,22±0,14 <sup>b</sup>	8,44±0,00 <sup>b</sup>	6,84±0,22 <sup>a</sup>	-
37 °C	8,22±0,14 <sup>c</sup>	7,22±0,07 <sup>b</sup>	5,44±0,13 <sup>a</sup>	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Výrazný pokles počtu bakterií ve výrobku skladovaném v lednici byl zaznamenán až po osmiměsíčním skladování. K poklesu mohlo dojít již v šestém nebo sedmém měsíci, avšak při rozboru po pěti měsících snížení zjištěno nebylo. Za vyšších teplot ke snížení došlo již dříve a při posledním rozboru kolonie nenarostly.

**Tabulka č. 11** Změny počtu bakterií *Lactobacillus acidophilus* (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu MRS v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 6.<sup>1</sup>

Vz. 6 MRS	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	9,25±0,03 <sup>a</sup>	9,40±0,01 <sup>b</sup>	9,49±0,04 <sup>c</sup>	9,44±0,02 <sup>bc</sup>
24 °C	9,25±0,03 <sup>d</sup>	8,99±0,00 <sup>c</sup>	7,33±0,16 <sup>a</sup>	7,95±0,04 <sup>b</sup>
37 °C	9,25±0,03 <sup>b</sup>	8,98±0,02 <sup>a</sup>	-	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Na kultivačním médiu MRS se evidentně laktobacilům dařilo lépe – tvořily kolonie v hojnějším počtu. Zde po uplynutí osmi měsíců u výrobku skladovaném při 4 °C ke snížení

nedošlo, tudíž při přípravě pro kultivaci na médiu Rogosa došlo k chybě, stejně jako u výrobku z 24 °C. Rozdíl mezi sníženou a vyšší teplotou je ale stále patrný.

**Tabulka č. 12** Změny počtu anaerobních probiotických bakterií (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu Wilkins-Chalgren se sójovým peptonem v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 6.<sup>1</sup>

Vz. 6 W+SP	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	9,66±0,05 <sup>b</sup>	9,78±0,00 <sup>c</sup>	9,49±0,04 <sup>a</sup>	9,42±0,03 <sup>a</sup>
24 °C	9,66±0,04 <sup>d</sup>	8,99±0,00 <sup>c</sup>	7,33±0,16 <sup>a</sup>	7,95±0,04 <sup>b</sup>
37 °C	9,66±0,04 <sup>b</sup>	9,56±0,07 <sup>b</sup>	7,32±0,02 <sup>a</sup>	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Počet anaerobních bakterií byl nejvyšší po celou dobu skladování při teplotě 4 °C. Za zvýšené teploty bakterie osmiměsíční skladování pravděpodobně nepřežily.

**Tabulka č. 13** Změny počtu bakterií *Bifidobacterium bifidum* (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu s mucinem a mupirocinem v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 6.<sup>1</sup>

Vz. 6 MM	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	9,23±0,02 <sup>b</sup>	9,03±0,09 <sup>a</sup>	9,33±0,02 <sup>b</sup>	8,88±0,08 <sup>a</sup>
24 °C	9,23±0,02 <sup>d</sup>	8,89±0,03 <sup>c</sup>	8,30±0,00 <sup>a</sup>	8,43±0,02 <sup>b</sup>
37 °C	9,23±0,02 <sup>c</sup>	8,20±0,04 <sup>b</sup>	7,13±0,03 <sup>a</sup>	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Bakterie přeživaly ve vysokých počtech po celou dobu skladování ve 4 °C i ve 24 °C, přičemž za snížené teploty lépe. Za zvýšené teploty došlo k výraznému poklesu.

**Tabulka č. 14** Změny počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu Wilkins-Chalgren se sójovým peptonem a mupirocinem v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 6.<sup>1</sup>

Vz. 6 W+SP+M	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	9,47±0,02 <sup>a</sup>	9,53±0,03 <sup>a</sup>	9,48±0,03 <sup>a</sup>	9,52±0,03 <sup>a</sup>
24 °C	9,47±0,02 <sup>c</sup>	9,44±0,04 <sup>c</sup>	8,16±0,15 <sup>a</sup>	9,18±0,00 <sup>b</sup>
37 °C	9,47±0,02 <sup>b</sup>	9,25±0,03 <sup>b</sup>	6,89±0,52 <sup>a</sup>	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Rozbory i na této živné půdě potvrdily, že bifidobakteriím se lépe daří přežívat při snížené teplotě, avšak i pokojová teplota se zdá být poměrně optimální.

**Tabulka č. 15** Změny počtu bakterií rodu *Lactobacillus* (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu Rogosa v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 7.<sup>1</sup>

Vz. 7 Rog	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	8,32±0,02 <sup>c</sup>	8,17±0,05 <sup>b</sup>	8,32±0,04 <sup>c</sup>	7,86±0,06 <sup>a</sup>
24 °C	8,32±0,02 <sup>d</sup>	6,76±0,09 <sup>c</sup>	6,41±0,04 <sup>b</sup>	5,66±0,06 <sup>a</sup>
37 °C	8,32±0,02 <sup>c</sup>	6,65±0,03 <sup>b</sup>	5,81±0,04 <sup>a</sup>	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Při skladování ve 4 °C se laktobacilům z tohoto výrobku dařilo nejlépe – přežívaly ve vysokých počtech i po osmi měsících. Za vyšších teplot došlo již po dvou měsících k výraznému snížení a tato tendence nadále pokračovala. Poslední rozbor výrobku z 37 °C nebyl proveden z důvodu jeho nedostatku.

**Tabulka č. 16** Změny počtu bakterií rodu *Lactobacillus* (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu MRS v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 7.<sup>1</sup>

Vz. 7 MRS	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	8,55±0,01 <sup>c</sup>	8,38±0,05 <sup>b</sup>	8,47±0,01 <sup>bc</sup>	8,07±0,04 <sup>a</sup>
24 °C	8,55±0,01 <sup>d</sup>	7,11±0,07 <sup>c</sup>	6,63±0,01 <sup>b</sup>	6,19±0,03 <sup>a</sup>
37 °C	8,55±0,01 <sup>c</sup>	6,95±0,03 <sup>b</sup>	6,11±0,10 <sup>a</sup>	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Hodnota log KTJ/g se u výrobku skladovaného v lednici snížila jen o cca 0,5, zatímco za pokojové teploty docházelo k postupnému a výraznému poklesu a za zvýšené teploty k poklesu prudšímu. Poslední rozbor výrobku z 37 °C nebyl proveden z důvodu jeho nedostatku.

**Tabulka č. 17** Změny počtu anaerobních probiotických bakterií (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu Wilkins-Chalgren se sójovým peptonem v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 7.<sup>1</sup>

Vz. 7 W+SP	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	8,73±0,01 <sup>c</sup>	8,35±0,11 <sup>a</sup>	8,55±0,03 <sup>b</sup>	8,71±0,01 <sup>bc</sup>
24 °C	8,73±0,01 <sup>d</sup>	7,76±0,08 <sup>c</sup>	7,19±0,01 <sup>b</sup>	6,72±0,11 <sup>a</sup>
37 °C	8,73±0,01 <sup>c</sup>	7,43±0,01 <sup>b</sup>	6,12±0,15 <sup>a</sup>	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Celkové počty všech anaerobních bakterií byly pozorovány nejvyšší opět při skladování za nízkých teplot, kdy k poklesu prakticky nedošlo. Skladování za pokojové teploty mělo za následek postupný pokles o cca 2 log KTJ/g. Rychlejší průběh snižování byl

zjištěn při skladování při 37 °C, kdy poslední rozbor tohoto výrobku nebyl proveden z důvodu jeho nedostatku.

**Tabulka č. 18** Změny počtu bakterií *Bifidobacterium bifidum* (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu s mucinem a mupirocinem v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 7.<sup>1</sup>

Vz. 7 MM	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	8,36±0,04 <sup>c</sup>	7,89±0,07 <sup>a</sup>	8,23±0,03 <sup>bc</sup>	8,21±0,05 <sup>b</sup>
24 °C	8,36±0,04 <sup>d</sup>	7,62±0,02 <sup>c</sup>	6,92±0,04 <sup>b</sup>	6,27±0,07 <sup>a</sup>
37 °C	8,36±0,04 <sup>c</sup>	7,30±0,10 <sup>b</sup>	5,91±0,13 <sup>a</sup>	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

V tomto případě bylo dosaženo velmi podobných výsledků jako v předchozí tabulce. Skladování za snížené teploty mělo na přežívání bifidobakterií příznivý vliv, za pokojové teploty docházelo k postupnému snižování a za zvýšené teploty došlo k poklesu rychleji. Poslední rozbor výrobku z 37 °C nebyl proveden z důvodu jeho nedostatku.

**Tabulka č. 19** Změny počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) na kultivačním médiu Wilkins-Chalgren se sójovým peptonem a mupirocinem v čase a za různých teplot skladování u vzorku č. 7.<sup>1</sup>

Vz. 7 W+SP+M	počáteční	2. měsíc	5. měsíc	8. měsíc
4 °C	8,51±0,02 <sup>a</sup>	8,26±0,04 <sup>a</sup>	8,28±0,07 <sup>a</sup>	8,57±0,09 <sup>b</sup>
24 °C	8,51±0,02 <sup>d</sup>	7,63±0,01 <sup>c</sup>	6,93±0,06 <sup>b</sup>	6,30±0,40 <sup>a</sup>
37 °C	8,51±0,02 <sup>c</sup>	7,48±0,01 <sup>b</sup>	5,89±0,15 <sup>a</sup>	-

<sup>1</sup> Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05. Pro porovnání byla použita analýza rozptylu.

Stejně jako u kultivace na dvou předchozích médiích i zde se potvrdilo, že bakterie ve vysokých počtech přeživaly při skladování ve 4 °C, za pokojové teploty docházelo k postupnému snižování a za zvýšené teploty ke snižování prudšímu. Poslední rozbor výrobku z 37 °C nebyl proveden z důvodu jeho nedostatku.

Porovnání kapkových a zvláště práškových forem testovaných doplňků se nabízí zejména kvůli různé technologii výroby a způsobu balení a dávkování. Práškové formy jsou dávkovány buď v kapslích a uloženy volně v krabičce či v blistrech, nebo jsou v podobě vysypávacích jednorázových sáčků. Nedochází tak k opětovnému otvírání jako tomu je v případě lahviček od kapek a nehrozí tím pádem negativní působení vzdušného kyslíku. Bakterie by navíc v lyofilizované formě měly být odolnější a přežívat déle. Z těchto důvodů mají tyto výrobky delší datum použitelnosti. Důležitý faktor je také to, že zde není použit olej jako nosič, který časem a při působení tepla oxiduje. Všechny tyto vzorky navíc obsahují jak bakterie rodu *Lactobacillus*, tak i rodu *Bifidobacterium*.

Laktobacily byly kultivovány na dvou různých médiích, přičemž MRS lze hodnotit jako vhodnější, kolonie se na něm tvořily ve vyšších počtech, a tudíž pro porovnání jsou tyto hodnoty použitelnější. Ve výrobku č. 5 bylo stanoveno největší množství těchto bakterií a skladování ve 4 °C se ukázalo jako prokazatelně lepší, hodnota log KTJ/g pod limit 6 neklesla po celou dobu a stejně tomu bylo u výrobku č. 6 i 7. Za pokojové a zvýšené teploty k poklesu pod tento limit došlo u 5. výrobku po pěti měsících skladování, pouze za zvýšené teploty i u 6. výrobku. U tohoto výrobku se zdá být skladování v lednici obzvláště účinné, jelikož hodnota log KTJ/g neklesla po celou dobu pod 9.

Anaerobním bifidobakteriím se dle výsledků také prokazatelně lépe dařilo za snížené teploty. Hodnoty počtu bakterií se při skladování ve 4 °C snižovaly jen velmi mírně či vůbec. Oproti tomu po rozbořech výrobků uložených za pokojové a zvýšené teploty bylo pozorováno snížení často výrazné. Jako nejodolnější vůči různým teplotám se zdají být bakterie z výrobku č. 6, avšak po osmiměsíčním skladování ve 37 °C již žádný rozbor přežívání neprokázal. Pod hodnotu 6 log KTJ/g se dostal za pokojové a zvýšené teploty pouze výrobek č. 5 po osmi měsících skladování, výsledek to byl však pouze z jednoho kultivačního média ze tří.

Při srovnání přežívání laktobacilů z kapkových a práškových forem se zdá, že bakterie v tekuté formě doplňku jsou méně náchylné na působení různých teplot, data však nejsou konzistentní.

## 6. Diskuze

Je nezbytné, aby probiotické mikroorganismy byly charakterizovány jako bezpečné pro lidskou spotřebu, a proto se nejčastěji používají v probiotických potravinách a doplňcích bakterie patřící do rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, které jsou přirozeně přítomné v lidském střevě (Dimitrellou et al., 2016) a i v této práci byly analyzovány probiotické výrobky obsahující bakterie právě z těchto rodů. Vzhledem k tomu, že účinnost konzumace probiotik vůči lidskému zdraví souvisí s jejich životaschopností, je mimořádně důležité nejen minimalizovat buněčnou smrt během procesu výroby, ale také zajistit minimální ztrátu životaschopnosti během skladování (Ananta et al., 2005). Léčebná účinnost probiotických výrobků závisí na počtu životaschopných a aktivních buněk na gram nebo mililitr produktu v okamžiku spotřeby (Tripathi et Giri, 2014). Jako minimální terapeutická dávka v tomto množství se uvádí 6 log KTJ v g nebo ml (Dimitrellou et al., 2016). V této diplomové práci bylo zjištěno, že při uložení ve 4 °C přeživaly laktobacily i bifidobakterie v počtech nad 8 až nad 9 log KTJ na g či ml výrobku až osm měsíců skladování, tedy po celou dobu výzkumu, a tím pádem tento limit splňovaly.

V současné době se pro produkci velkého množství bakteriálních probiotických kultur hojně využívá sušení rozprašováním. Hlavními výhodami jsou menší nákladnost a rychlost. Hlavní nevýhodou je, že tento proces vede k vystavení mikroorganismů vysokým teplotám, které mohou poškodit celistvost buňky. Tento proces může ovlivnit velké množství buněčných složek, včetně DNA, RNA, cytoplasmatické membrány a buněčné stěny (Golowcyc et al., 2011). Vzhledem k tomu, že voda přispívá ke stabilitě biologických molekul, její odstranění může způsobit nevratné změny strukturní a funkční integrity bakteriálních membrán a proteinů. Zachování těchto základních funkcí a struktury je zásadní pro přežití bakterií (Ananta et al., 2005). Je známo, že během i po sušení a také následným skladováním v suchém stavu mohou buňky trpět řadou stresů zahrnující tepelný, osmotický a oxidační stres, což vede ke ztrátě životaschopnosti a aktivity buněk (Golowcyc et al., 2011).

Je důležité si uvědomit, že pro každý kmen, který je předmětem zájmu, specificky působí vlivy růstových podmínek a pravděpodobně i složení sušícího média na přežití v suchém stavu (Carvalho et al., 2003). Velmi důležitý je však výběr kmene pro vývoj probiotického produktu, který odolává zpracování a udržuje probiotickou aktivitu (Golowcyc et al., 2011). Příkladem může být výrobek č. 4, který mezi výrobky uloženými ve 4 °C,

vykazující nejlepší výsledky, tvořil výjimku a osmý měsíc vykazoval hodnotu 7,41 log KTJ/ml. Jako uvedené použité kmeny zde byly *L. reuteri* a *L. rhamnosus*, stejně jako u výrobků č. 1 až 3, nicméně se pravděpodobně jednalo o méně stabilní kmeny a vzhledem k tomu, že u tohoto výrobku jako jediného nebylo zaznamenáno přežívání bakterií ihned po dvou měsících skladování za pokojové a zvýšené teploty, lze usuzovat, že byly použity kmeny velmi náchylné k vyšší teplotě či se jednalo o jiný způsob zpracování bakterií a samotného výrobku.

Schopnost adherovat k intestinálnímu epitelu a antagonizovat patogenní bakterie je jedním z parametrů pro výběr probiotických bakterií. Studie Golowcyc et al. (2011) ukázala, že testované kmeny rodu *Lactobacillus* po sušení rozprašováním tuto schopnost neztrácejí. Vyšší citlivost bifidobakteriálních druhů izolovaných z lidského gastrointestinálního traktu ve vztahu k těm z živočišných zdrojů je jedním z hlavních faktorů, které omezují použití kmenů lidského původu (Sanz, 2007).

Jedna z používaných metod, která byla navržena k překonání problémů s nízkou životaschopností probiotik, je mikroenkapsulace, která může poskytnout ochranu citlivým buňkám během zpracování a skladování a zajistit cílovou dávku v gastrointestinálním traktu (Dimitrellou et al., 2016). Pozorovaná vysoká schopnost přežití bakterií během procesu, stabilita přípravku až do čtvrtého měsíce skladování a nízká spotřeba energie potvrzují, že tato metoda je vhodnou alternativou při výrobě koncentrovaných bakteriálních přípravků (Goderska et Czarnecki, 2008). I v testech Dimitrellou et al. (2016) zůstal počet mikroenkapsulovaných buněk *L. casei* na rozdíl od volných buněk nad hladinou 6 log KTJ/g. Z výsledků přežívání bakterií v této práci lze usuzovat, že použité bakterie mohly být touto ochrannou technologií ošetřeny.

Další neméně používanou metodou k uchování bakterií je lyofilizace, avšak i ta má negativní dopad na životaschopnost buněk, a to především tvorbou ledových krystalů, které poškozují membrány. Poškození struktur je rozsáhlejší v případě, že plochy buněk jsou větší (Fonseca et al., 2000). Uvádí se, že rezistence k lyofilizaci je kmenově závislá (Koch et al., 2008). Zatímco rezistentní kmeny vykazovaly po měsíci skladování méně než 10 % mrtvých buněk, citlivý kmen vykazoval po zmrazení více než 50 % mrtvých buněk spolu se 14 % stresových buněk (Rault et al., 2007). Stejně tak Kandil et El Soda (2015) ve své studii uvedli, že zmrazené kultury vykazovaly vyšší míru přežití, vyšší rychlost intracelulární enzymatické aktivity a nižší rychlost autolýzy.



Skladovací teplota je jedním z nejdůležitějších parametrů regulujících činnost mikroorganismů v potravinářských systémech. Vzhledem k vlivu teploty na všechny funkce buňky je adaptace na kolísání teploty pravděpodobně nejobvyklejší zkoumanou reakcí (Beales, 2004). Je obecně známo, že stabilita při skladování lyofilizovaných kultur je vyšší při nižších teplotách a v atmosféře bez kyslíku (Santivarangkna et al., 2007). Dále Tripathi et Giri (2014) uvádí, že volné a enkapsulované buňky uložené při teplotě 4 °C měly srovnatelnou stabilitu, zatímco mikroenkapsulace poskytla vyšší stupeň ochrany proti zvýšené skladovací teplotě. V této studii dále pro dlouhodobé uchovávání lyofilizovaných probiotik doporučují mnohem nižší teplotu -18 °C, která maximalizuje životaschopnost rodu *Bifidobacterium* a uvádí, že teplota skladování 20 °C vedla k významnému snížení životaschopných počtů tohoto druhu v sušených výrobcích. U všech výrobků v této práci obsahujících i bifidobakterie nedošlo za pokojové teploty k poklesu jejich přežívání pod hranici 6 log KTJ/g ani po osmi měsících. Nejlepších výsledků dosahoval výrobek č. 6 s hodnotou 9,18 log KTJ/g. Byly v něm použity kmeny *B. bifidum* a *B. infantis* stejně jako u ostatních výrobků, nicméně se jednalo nejspíše o odolnější kmeny, lepší způsob zpracování, či mohl hrát roli způsob balení – sáčky. Celkově zle ale říci, že bakterie přežívaly za této teploty skladování prokazatelně hůře.

Na základě testování kmene *Lactobacillus acidophilus* Riveros et al. (2009) zjistili, že nezávisle na podmínkách použitých při sušení udržuje kmen svou životaschopnost uložený při teplotě 4 °C po dobu až 2 měsíců a že při uložení za pokojové teploty životnost klesá. S tím se shodují i informace z dalších studií, kde Ananta et al. (2005) a King et Su (1993) potvrzují ztrátu životaschopnosti urychlenou za vyšší skladovací teploty. V případě laktobacilů a skladování za pokojové teploty byly výsledky poměrně různé. U výrobků č. 2 (*L. reuteri*), č. 6 (*L. acidophilus*) a č. 7 (*L. acidophilus*, *L. casei*) byly počty bakterií nad minimální účinný limit 6 log KTJ/g či ml i po osmiměsíčním skladování, avšak v rozmezí 6,19 – 8,57 log KTJ/g či ml. Výrobek č. 1 tento limit naposledy splňoval po pěti měsících, č. 3 po čtyřech a č. 5 dokonce jen po dvou.

Během skladování ve 37 °C docházelo zpravidla k největšímu a nejprudšímu poklesu počtu jak laktobacilů, tak bifidobakterií. U výrobků č. 1, 5, 7 došlo ke snížení počtu laktobacilů na minimální účinnou hranici po pětíměsíčním skladování, u výrobku č. 3 po čtyřměsíčním, u čísla 6 dokonce dvoutměsíčním a výjimku tvořil výrobek č. 2, kde byla hodnota téměř stejná jako za pokojové teploty, tedy 8,6 log KTJ/ml i osmý měsíc. V případě bifidobakterií byl tento pokles zjištěn u 6. a 7. výrobku po pěti měsících, zatímco u 5. výrobku

až po osmi. Limit byl sice splněn, k prokazatelně výraznému a rychlejšímu poklesu však za této teploty docházelo u všech výrobků. V některých případech bylo nicméně zjištěno, že rozdíl mezi pokojovou a zvýšenou teplotou nebyl výrazný.

Během skladování se zdá, že i oxidace membránových lipidů, jak ukazuje pokles poměru nenasycených a nasycených mastných kyselin, je škodlivým faktorem pro smrt buněk (Santivarangkna et al., 2007; Teixeira et al., 1996). Tato modifikace profilu mastných kyselin je však kmenově závislá (Carvalho et al., 2003). Aby se snížila oxidace lipidů, je vhodné přidání antioxidantu. Přidání kyseliny askorbové a glutamátu sodného však chránilo buňky *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* pouze při skladování při 4 °C. Předpokládalo se, že to bylo způsobeno dvojitými vlastnostmi kyseliny askorbové, a to jako antioxidantu, tak i jako prooxidantu. Tato prooxidační reakce ve směsích proteinů a kyseliny askorbové se zdála být závislá na teplotě (Santivarangkna et al., 2007). Důležitá je také technologie balení pro skladování probiotických kultur – měla by být schopna zabránit vniknutí kyslíku, vlhkosti a světla (Santivarangkna et al., 2007).

Přestože je počítání kolonií běžnou metodou kvantitativních studií přežívání, má tato technika tři hlavní nedostatky. Za prvé vyžaduje dlouhou inkubační dobu (24 – 72 hodin, v závislosti na druhu bakterií). Za druhé, často vede k podcenění počtu životaschopných buněk v důsledku shlukování buněk. A za třetí, berou se v úvahu pouze bakterie, které se replikují za podmínek stanovených pro růst. V důsledku toho některé buňky, které jsou životaschopné, ale nekultivovatelné, se tímto způsobem nezapočítávají, stejně jako buňky, které jsou mrtvé, subletálně poškozené, zraněné, inhibované, spící nebo neaktivní, přesto se mohou vrátit do fyziologicky aktivního stavu, pokud budou následně obnoveny vhodné podmínky (Rault et al., 2007). Z tohoto důvodu je možné, že skutečné počty přítomných bakterií byly vyšší, nicméně se předpokládá, že tento rozdíl není razantní a rozhodující pro tuto práci byl tedy počet skutečně narostlých kolonií.

Celkově je možné říci, že probiotické bakterie, jak se předpokládalo, nejlépe přežívaly za teploty 4 °C. Vysoké počty byly zachovány i po dobu osmi měsíců skladování. Doporučení výrobců pro uchování výrobků v lednici či do 25 °C bylo tím pádem potvrzeno. Uváděnou dobu spotřeby u kapkových výrobků po otevření, tedy dva až tři měsíce, by bylo teoreticky možné prodloužit, bakterie v minimálním terapeuticky účinném množství přežívaly více jak dvojnásobnou dobu. Z praktického hlediska vzniká však problém s přítomným olejem jako nosičem, který po delší době skladování žlukne, což bylo senzorycky znatelné. Bakterie ve

výrobciích v podobě prášku a uložených v blistrech či sáčcích by neměly být tak náchylné, prokázáno však bylo, že i v tomto případě je uložení v lednici výhodnější.

## 7. Závěr

- Ze získaných výsledků lze konstatovat, že pro všechny hodnocené výrobky je nejvhodnější uchovávání v lednici při 4 °C. Laktobacily i bifidobakterie při této teplotě přežívaly ve vysokých počtech a nejdelší dobu, respektive po celou dobu výzkumu – osm měsíců. Za pokojové teploty přežívaly hůře a jako nejméně příznivé prostředí se zdá být teplota zvýšená.
- U tekutých výrobků v podobě kapek, kde výrobci doporučují upotřebení výrobku do dvou až tří měsíců od otevření by bylo teoreticky možné tuto dobu prodloužit, jelikož bakterie dobře přežívaly až trojnásobnou dobu. Z praktického hlediska však vzniká problém s obsaženým olejem jako nosičem, který po delší době skladování oxiduje. U sypkých výrobků tento nebo obdobný problém nevystává.
- Zdá se, že důležitou roli hraje i výběr konkrétních kmenů, způsob zpracování bakterií a celého výrobku včetně technologie balení.
- Hypotéza: Probiotické bakterie ve výrobcích skladovaných v lednici při nižší teplotě budou přežívat delší dobu, oproti těm, které budou skladovány při pokojové teplotě. Hypotéza byla v této práci potvrzena.

## 8. Seznam použité literatury

- Abe, F., Miyauchi, H., Uchijima, A., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. 2009. Effects of storage temperature and water activity on the survival of bifidobacteria in powder form. *International Journal of Dairy Technology*. 62 (2). 234-239.
- Ananta, E., Volkert, M., Knorr, D. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*. 15. 399-409.
- Beales, N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 3. 1-20.
- Blaut, M., Clavel, T. 2007. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: Implications for health and disease. *The Journal of Nutrition*. 137. 751-755.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P. 2003. Effect of various growth media upon survival during storage of reeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology*. 94. 947-952.
- Coghetto, C. C., Brinques, G. B., Ayub, M. A. Z. 2016. Probiotics production and alternative encapsulation methodologies to improve their viabilities under adverse environmental conditions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 67 (8). 99-943.
- Davis, K. 2014. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative technigues to quantify viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 103. 9-17.
- Dimitrellou, D., Kandyliis, P., Petrović, T., Dimitrijević-Branković, S., Lević, S., Nedović, V., Kourkoutas, Y. 2016. Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrintestinal conditions and fermented milk. *LWT – Food Science and Technology*. 71. 169-174.
- Fonseca, F., Béal, C., Corrieu, G. 2000. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research*. 67. 83-90.

- Goderska, K., Czarnecki, Z. 2008. Influence of microencapsulation and spray drying on the viability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. Polish Journal of Microbiology. 57 (2). 135-140.
- Goktepe, I., Juneja, V. K., Ahmedna, M. (eds.). 2006. Probiotics in food safety and human health. Taylor & Francis Group. New York. p. 494. ISBN: 1574445146.
- Golowczyc, M., Silva, J., Teixeira, P., De Antoni, G. L., Abraham, A. G. 2011. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. International Journal of Food Microbiology. 144. 556-560.
- Gómez-Gallego, C., Salminen, S. J. 2016. Novel probiotics and prebiotics: How can they help in human gut microbiota dysbiosis?. Applied Food Biotechnology. 3 (2). 72-81.
- Her, J. Y., Kim, M. S., Lee, K. G. 2015. Preparation of probiotic powder by the spray freeze-drying method. Journal of Food Engineering. 150. 70-74.
- Hirayama, Y., Endo, A. 2016. Taxonomy of lactic acid bacteria up-to-date and minimal standards for description of new taxa of lactic acid bacteria recommended by subcommittee on the taxonomy of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related organisms. Journal of Intestinal Microbiology. 30 (1). 17-28.
- Holzapfel, W. H., Schillinger, U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. Food Research International. 35. 109-116.
- Jardine, S. (ed.). 2009. Prebiotics and probiotics. Wiley-Blackwell. United Kingdom. p. 152. ISBN: 9781905224524.
- Julean, C., Stef, L., Drinceanu, D., Cean, A., Dragomirescu, M., Vintila, T., Gherasim, V., Corcionivoschi, N. 2014. Lyophilisation of probiotic bacteria for inclusion in poultry feed. Scientific Papers: Aimal Science and Biotechnologies. 47 (2).
- Kandil, S., El Soda, M. 2015. Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains. Advances in Microbiology. 5. 371-382.

- Kharchenko, N. V., Cherdynceva, T. A., Netrusov, A. I. 2017. Development of lyophilization procedure ensuring survival of bifidobacteria and preservation of their probiotic potential upon long-term storage. *MICROBIOLOGY*. 86 (2). 225-230.
- King, V. A. E., Su, J. T. 1993. Dehydration of *Lactobacillus acidophilus*. *Process Biochemistry*. 28. 47-52.
- Koch, S., Eugster-Meier, E., Oberson, G., Meile, L., Lacroix, C. 2008. Effects of strains and growth conditions on autolytic activity and survival to freezing and lyophilization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* isolated from cheese. *International Dairy Journal*. 18. 187-196.
- Lee, Y. K., Salminen, S. (eds.). 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. p. 596. ISBN: 9780470135440.
- Leja, K., Dembczyński, R., Białas, W., Jankowski, T. 2009. Production of dry *Lactobacillus rhamnosus* GG: Preparation by spray drying and lyophilization in aqueous two-phase system. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 8 (4). 39-49.
- Liu, S. 2016. The development of our organ of other kinds – The gut microbiota. *Frontier in Microbiology*. 7. 2107.
- Lugli, G. A., Mangifesta, M., Duranti, S., Anzalone, R., Milani, C., Mancabelli, L., Alessandri, G., Turrone, F., Ossiprandi, M. C., van Sinderen, D., Ventura, M. 2018. Phylogenetic classification of six novel species belonging to the genus *Bifidobacterium* comprising *Bifidobacterium anseris* sp. nov., *Bifidobacterium criceti* sp. nov., *Bifidobacterium imperatoris* sp. nov., *Bifidobacterium italicum* sp. nov., *Bifidobacterium margollesii* sp. nov. And *Bifidobacterium parmae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology. A Journal of Microbial Diversity*. 36 (1).
- Martínez, I., Muller, C. E., Walter, J. 2013. Long-term temporal analysis of the human fecal microbiota revealed a stable core of dominant bacterial species. *PLOS ONE*. 8 (7).
- Mattarelli, P., Biavati, B. 2018. Species in the Genus *Bifidobacterium*. *The Bifidobacteria and Related Organisms*. Chapter 2. 9-48.

- Medina, D. A., Pinto, F., Ovalle, A., Thomson, P., Garrido, D. 2017. Prebiotics mediate microbial interactions in consortium of the infant gut microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (10). 2095.
- Meybodi, N. M., Mortazavian, A. M. 2017. Probiotic supplements and food products: A comparative approach. *Biochemistry & Pharmacology*. 6 (2). 227.
- Miao, S., Mills, S., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Roos, Y., Ross, R. P. 2008. Effect of disaccharides on survival during storage of freeze dried probiotics. *Dairy Sci. Technol.* 88. 19-30.
- Nguyen, H. T., Truong, D. H., Kouhondé, S., Ly, S., Razafindralambo, H., Dalvigne, F. 2016. Biochemical engineering approaches for increasing viability and functionality of probiotic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 17 (6). 867.
- Nualkaekul, S., Salmeron, I., Charalampopoulos, D. 2011. Survival of *Bifidobacterium longum* in model solutions and fruit juices. 129 (3). 1037-1044.
- Østlie, H. M., Treimo, J., Narvhus, J. A. 2005. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. *International Dairy Journal*. 15. 989-997.
- Patel, P. J., Singh, S. K., Panaich, S., Cardozo, L. 2014. The aging gut and the role of prebiotics, probiotics, and synbiotics: A review. *Journal of Clinical Gerontology & Geriatrics*. 5. 3-6.
- Rault, A., Béal, C., Ghorbal, S., Ogier, J. C., Bouix, M. 2007. Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology*. 55. 35-43.
- Riveros, B., Ferrer, J., Bórquez, R. 2009. Spray drying of a vaginal probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technology*. 27. 123-132.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P. 2007. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnol. Prog.* 23 (2). 203-315.



- Sanza, Y. 2007. Ecological and functional implication of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way to selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*. 17. 1284-1289.
- Shokri, Z., Fazeli, M. R., Ardjmand, M., Mousavi, S. M., Gilani, K. 2015. Factors affecting viability of *Bifidobacterium bifidum* during spray drying. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 23 (7).
- Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T. H., Bhutani, T., Liao, W. 2017. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*. 15 (73).
- Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R., Danner, H. 2009. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 107. 167-177.
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K. 2004. A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Institute of Food Technologists. 3. 117-124.
- Teixeira, P., Castro, H., Kirby, R. 1996. Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Letters in Applied Microbiology*. 22. 34-38.
- To, B. C. S., Etzel, M. R. 1997. Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *Journal of Food Science*. 6 (3). 576-585.
- Tripathi, M. K., Giri, S. K. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 9. 225-241.
- Vallès, Y., Gosalbes, M. J., Vries, L. E., Abellán, J. J., Francino, M. P. 2012. Metagenomics and development of the gut microbiota in infants. *Clinical Microbiology and Infection*. 18 (4). 21-26.
- Vyas, U., Ranganathan, N. 2012. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Gut and beyond. *Gastroenterology Research and Practice*. 2012. 16.

Wachholz, P. A. 2014. Evidence on the role of prebiotics, probiotics, and synbiotics in gut health and disease prevention in the elderly. *Journal of Clinical Gerontology & Geriatrics*. 5. 1-2.