

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv podmínek skladování na životaschopnost
mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy**

Diplomová práce

Bc. Veronika Kondelová

Výživa a potraviny

prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv podmínek skladování na životaschopnost mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy" 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce.

Vliv podmínek skladování na životaschopnost mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy

Souhrn

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které jsou při podávání v adekvátním množství zdraví prospěšné. Mezi nejčastěji zmiňované zdravotní přínosy probiotik patří hlavně pozitivní vliv na střevní mikrobiotu, dále zlepšují imunitní reakce, pomáhají při léčbě alergických projevů a nesnášenlivosti laktózy, snižují cholesterol a jsou vhodným podpůrným prostředkem při problémech gastrointestinálního traktu.

Aby mohl být výrobek považován za probiotický, musí obsahovat uvedené množství živých mikroorganismů. Potřebný počet živých bakterií se liší, ale obecně je doporučovaný příjem v rozsahu $10^6 - 10^9$ KTJ/g. Během skladování může dojít k ovlivnění životaschopnosti a výraznému snížení celkového množství živých bakterií. Mezi faktory, které ovlivňují životaschopnost mikroorganismů patří teplota, vlhkost, aktivita vody, osmotický tlak, pH a složení produktu. Existují určité metody, které mohou ovlivnit životaschopnost a přežití probiotických bakterií během skladování. Zvýšení trvanlivosti probiotik lze zajistit skladováním za nižších teplot.

Cílem této diplomové práce byla kvantifikace jednotlivých rodů mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy určených pro lidskou výživu a ověření jejich deklarovaného počtu, přičemž polovina testovaných vzorků nesplňovala deklarované množství výrobcem. Dalším cílem bylo zhodnotit vliv skladovací teploty na životaschopnost mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy. Bylo prokázáno, že skladování při nižší teplotě může vést ke zvýšení počtu životaschopných bakterií oproti skladování při pokojové teplotě, a proto nízkoteplotní skladování je jedna z možností, kterou lze zvýšit kvalitu probiotika.

Klíčová slova: Probiotika, doplňky stravy, kvantifikace, skladování, selektivní média

Influence of storage conditions on the viability of microorganisms in probiotic food supplements

Summary

Probiotics are live microorganisms that are beneficial to health when given in adequate amounts. The most frequently cited health benefits of probiotics are mainly the positive effect on the gut microbiota, they also improve immune responses, help in the treatment of allergies and lactose intolerance, lower cholesterol and probiotics are a good support for gastrointestinal problems.

In order to be considered probiotic, a product must contain the specified amount of live microorganisms. The number of live bacteria required varies, but in general the recommended intake is in the range of 10^6 to 10^9 CFU/g. During storage, viability may be affected and the total amount of live bacteria may be significantly reduced. Factors that affect the viability of microorganisms include temperature, humidity, water activity, osmotic pressure, pH and product composition. There are certain methods that can affect the viability and survival of probiotic bacteria during storage. Increasing the shelf life of probiotics can be achieved by storing at lower temperatures.

The aim of this thesis was to quantify the different genera of microorganisms in probiotic food supplements intended for human consumption and to verify their declared number, half of the samples tested did not meet the manufacturer's declared amount. Another objective was to evaluate the effect of storage temperature on the viability of microorganisms in probiotic food supplements. It was shown that storage at lower temperature can lead to an increase in viable bacterial counts compared to storage at room temperature, and therefore low temperature storage is one option that can be used to improve the quality of a probiotic.

Keywords: Probiotics, dietary supplements, quantification, storage, selective media

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Definice pojmů.....	11
3.1.1 Probiotika.....	11
3.1.2 Prebiotika	13
3.1.3 Synbiotika	14
3.1.4 Postbiotika a parabiotika.....	14
3.2 Střevní mikrobiota	15
3.3 Mechanismus účinku probiotik	16
3.4 Zdravotní přínosy probiotik.....	17
3.4.1 Poruchy gastrointestinálního traktu	18
3.4.2 Alergie	18
3.4.3 Laktózová intolerance.....	19
3.4.4 Hypercholesterolémie	20
3.5 Vybrané skupiny probiotik	21
3.5.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	21
3.5.2 Rod <i>Bifidobacterium</i>	22
3.5.3 Rod <i>Streptococcus</i>	23
3.6 Označování probiotických doplňků stravy.....	25
4 Materiál a metodika.....	27
4.1 Testované probiotické doplňky stravy	27
4.2 Metodika	28
4.3 Pracovní postup.....	29
4.4 Příprava agarů	30
4.4.1 Wilkins-Chalgren.....	30
4.4.2 Wilkins-Chalgren s mupirocinem a kyselinou octovou.....	30
4.4.3 Rogosa	30
4.4.4 M17.....	30
4.5 Stanovení probiotických bakterií.....	31
4.5.1 Stanovení CP.....	31
4.5.2 Stanovení bifidobakterií.....	31
4.5.3 Stanovení laktobacilů.....	31
4.5.4 Stanovení streptokoků.....	31
4.6 Vyhodnocení	32
5 Výsledky.....	33

6	Diskuze	39
7	Závěr	40
8	Literatura.....	41
9	Samostatné přílohy	I
9.1	Probiotika skladovaná při pokojové teplotě (22 °C):	I
9.2	Probiotika skladovaná v chladničce (6°C):.....	II
9.3	Probiotika skladovaná v mrazáku (-18°C):	III

1 Úvod

Střevní mikrobiota je rozsáhlá komunita mikroorganismů obývajících trávicí trakt. Skládá se z bakterií, archeí, virů a dalších mikroorganismů, které společně tvoří komplexní ekosystém. Změny ve složení střevní mikrobioty mohou být spojeny s různými zdravotními problémy. Tato nerovnováha, nazývaná dysbióza, může být ovlivněna mnoha faktory, včetně stravy, užívání antibiotik, stresu nebo i geneticky. Proto rovnováha ve složení mikroorganismů střevní mikrobioty je klíčová pro správnou funkci řady fyziologických procesů v lidském těle. Toho lze dosáhnout dodržováním zásad zdravého životního stylu, ale lze si pomoci i doplňky stravy podporující střevní mikrobiotu.

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které jsou při konzumaci v adekvátním množství zdraví prospěšné. Probiotika a ostatní výrobky na podporu střevní mikrobioty jsou stále více oblíbenými doplňky stravy na úpravu trávení a zlepšení celkového zdravotního stavu jedince. Bohužel, ale ne všechna probiotika obsahují uvedené množství živých mikroorganismů.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza 1: Probiotické doplňky stravy budou obsahovat deklarované počty mikroorganismů během doby minimální trvanlivosti. (vyvráceno)

Hypotéza 2: Podmínky skladování budou ovlivňovat životaschopnost mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy. (potvrzeno)

Cílem diplomové práce je kvantifikace jednotlivých rodů mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy určených pro lidskou výživu a ověření jejich deklarovaného počtu. Dalším cílem je zhodnotit vliv skladovací teploty na životaschopnost mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy.

3 Literární rešerše

3.1 Definice pojmů

Celkový životní styl a stravovací návyky mají velký význam pro složení střevní mikrobioty. Ta se skládá z komensálních mikroorganismů a potencionálních patogenů, které ovlivňují metabolické, fyziologické i imunologické procesy v těle. Pro udržení správného fungování střev je velmi populární užívání probiotik a prebiotik. V posledních letech se kromě těchto doplňků stravy začíná věnovat velká pozornost synbiotikům, v nichž se probiotika a prebiotika společně, postbiotikům, což jsou vedlejší metabolické produkty vylučované mikroorganismy, a paraprobiotikům, což jsou neživé mikrobiální buňky (Nakilcioglu & Nurko 2023).

3.1.1 Probiotika

V posledních letech zaznamenal výzkum probiotik významný pokrok a velké množství studií prokázalo, že probiotika hrají zásadní roli při udržování lidského zdraví.

Probiotika jsou obecně definována jako živé mikroorganismy, které jsou při podávání v adekvátním množství zdraví prospěšné. V současnosti jsou nejčastěji používaná probiotika bakterie rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, některé druhy rodů *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Escherichia coli*, ale i kvasinky *Saccharomyces boulardii* (Damini et al. 2019).

Nejčastěji používané mikroorganismy s probiotickým účinkem jsou vypsány v tabulce 1 (Tridip et al. 2022).

Tabulka 1: Mikroorganismy s probiotickým účinkem

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> <i>L. gasseri</i> , <i>L. casei</i> <i>L. reuteri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. salivarius</i> <i>L. johnsonii</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> <i>L. helveticus</i> , <i>L. brevis</i> <i>L. murinus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. amylovorus</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> <i>B. lactis</i> , <i>B. adolescentis</i> <i>B. bifidum</i> , <i>B. animalis</i> <i>B. breve</i> , <i>B. thermophilum</i> <i>B. pseudolongum</i>
Kvasinky	<i>S. boulardii</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. carlsbergensis</i> , <i>Kluyveromyces marxianu</i> , <i>S. cerevisiae</i>
Ostatní	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>L. lactis</i> , <i>L. citreum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>Thermophilus</i> , <i>S. infantarius</i>

V roce 2002 vydala společná pracovní skupina Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) a Světová zdravotnická organizace (WHO) pokyny pro hodnocení probiotik v potravinách.

K základním požadavkům patří posouzení identity kmene (rod, druh, kmen), testy in vitro k prokázání probiotických účinků, posouzení bezpečnosti pro spotřebitele a testy in vivo k ověření údajných zdravotních tvrzení o produktu (Dempsey & Corr 2022).

Aby mohl být výrobek považován za probiotikum, musí splňovat následující podmínky (Fontana et al. 2013):

- Prokázaný příznivý účinek na hostitele
- Nepatogenní, netoxické účinky
- Bez významných nežádoucích vedlejších účinků
- Schopnost přežít v trávicím traktu
- Obsahovat dostatečný počet životaschopných buněk
- Být kompatibilní s matricí produktu, s podmínkami zpracování a skladování, aby byly zachovány požadované vlastnosti

Probiotika lze konzumovat buď přímo, nejčastěji v kapslích jako doplňky stravy, nebo ve formě mléčných či nemléčných potravin a nápojů (Latif et al. 2023). V řadě fermentovaných potravin, jako je jogurt, kefir, kimchi, kysané zelí, tempeh, miso nebo kombucha, které jsou součástí běžné stravy napříč různými kulturami, jsou probiotické bakterie obsaženy přirozeně (Kothari et al. 2019).

Mezi nejvíce zmiňované zdravotní přínosy probiotik patří pozitivní vliv na střevní mikrobiotu, což významně ovlivňuje zdravotní stav jedince a napomáhá prevenci či omezení některých onemocnění. Probiotika svým působením na střevní mikrobiotu pomáhají při léčbě alergických projevů u citlivých jedinců, snižují cholesterol při hypercholesterolemii, fungují jako prevence obezity či rakoviny a zmírňují nutriční intolerance jako je nesnášenlivost laktózy. Dále pomáhají detoxikovat xenobiotika a látky znečišťující životní prostředí, biotransformují mykotoxiny v potravinách, syntetizují vitamín K, riboflavin a folát a fermentují nestrávenou vlákninu v tlustém střevě. V neposlední řadě jsou vhodným podpůrným prostředkem při problémech gastrointestinálního traktu, průjmech, syndromu dráždivého tračníku a zánětlivých onemocněních střev jako je Crohnova choroba a ulcerózní kolitida (Latif et al. 2023).

V důsledku neustále přibývajících důkazů o příznivých účincích probiotických bakterií na lidské zdraví se probiotika v posledních letech stávají stále populárnějšími a jejich spotřeba roste. Proto je velmi důležité, aby odborníci i spotřebitelé měli znalosti o složení, účincích a správném užívání probiotik (Nquyen et al. 2020).

3.1.2 Prebiotika

Správného fungování probiotik nelze dosáhnout bez podpory prebiotik (You et al. 2022).

Prebiotika jsou definována jako nestravitelné složky potravy, které příznivě ovlivňují hostitele selektivní stimulací růstu a/nebo aktivity jedné nebo omezeného počtu bakterií v tlustém střevě. V roce 2016 byla definice prebiotik panelem odborníků z Mezinárodní vědecké asociace pro probiotika a prebiotika (ISAPP) poupravena na: substrát, který je selektivně využíván hostitelskými mikroorganismy a poskytuje zdravotní přínos (Yadav et al. 2022).

Prebiotika se přirozeně nacházejí ve více než 36 000 produktech rostlinného původu. Mezi ně patří artyčok, chřest, čekanka, česnek, cibule, pšenice, banány a další. Kromě toho mohou být prebiotika také uměle vyráběna a přidávána do potravin, aby se zvýšila nutriční hodnota těchto potravin.

Nejčastěji používanými prebiotiky jsou galaktooligosacharidy (GOS), fruktooligosacharidy (FOS), xylooligosacharidy (XOS), isomalto-oligosacharidy (IMO), inulin, laktulóza, β -glukany atd.

Prebiotika nejsou trávena endogenními enzymy v lidském gastrointestinálním traktu, proto se dostávají do tlustého střeva v nezměněné podobě, kde jsou fermentována bakteriemi. V procesu fermentace prebiotik vznikají mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které jsou velmi důležité pro správné fungování střev. Prebiotika při průchodu lumenem střeva na sebe vážou vodu, čímž zvětšují objem střevního obsahu. Díky volné struktuře a velkému povrchu jsou vhodnou živnou půdou pro mikroorganismy, čímž zvyšují počet prospěšných bakterií v lidském střevě, převážně bakterií rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Bacteroides*. Prebiotika svým působením urychlují procesy hojení a regenerace střevního epitelu, zvyšují produkci hlenu a pomáhají udržovat správné pH ve střevě, což snižuje růst patogenních bakterií. Dále zvyšují vstřebávání vápníku, železa a hořčíku, snižují hladinu cholesterolu v krvi a příznivě ovlivňují metabolismus glukózy (Martyniak et al. 2021).

Aby mohl být výrobek (potravina nebo doplněk) považován za prebiotikum, musí splňovat následující podmínky (Martyniak et al. 2021):

- Stimulovat růst a aktivitu vybraných kmenů bakterií, které mají příznivý vliv na zdraví
- Snižovat pH střevního obsahu
- Být odolný vůči vstřebávání v horní části gastrointestinálního traktu
- Být odolný vůči hydrolýze a působení gastrointestinálních enzymů
- Poskytovat substrát pro jeden nebo více prospěšných mikroorganismů v tlustém střevě
- Být stabilní v procesu zpracování potravin

3.1.3 Synbiotika

Synbiotika jsou kombinací probiotik a prebiotik. Tedy směs obsahující živé mikroorganismy a substrát/substráty selektivně využívané hostitelskými mikroorganismy, které hostiteli poskytují zdravotní přínos. V této definici hostitelské mikroorganismy zahrnují jak autochtonní mikroorganismy (rezidentní nebo kolonizující hostitele), tak alochtonní mikroorganismy (externě aplikované, např. probiotika).

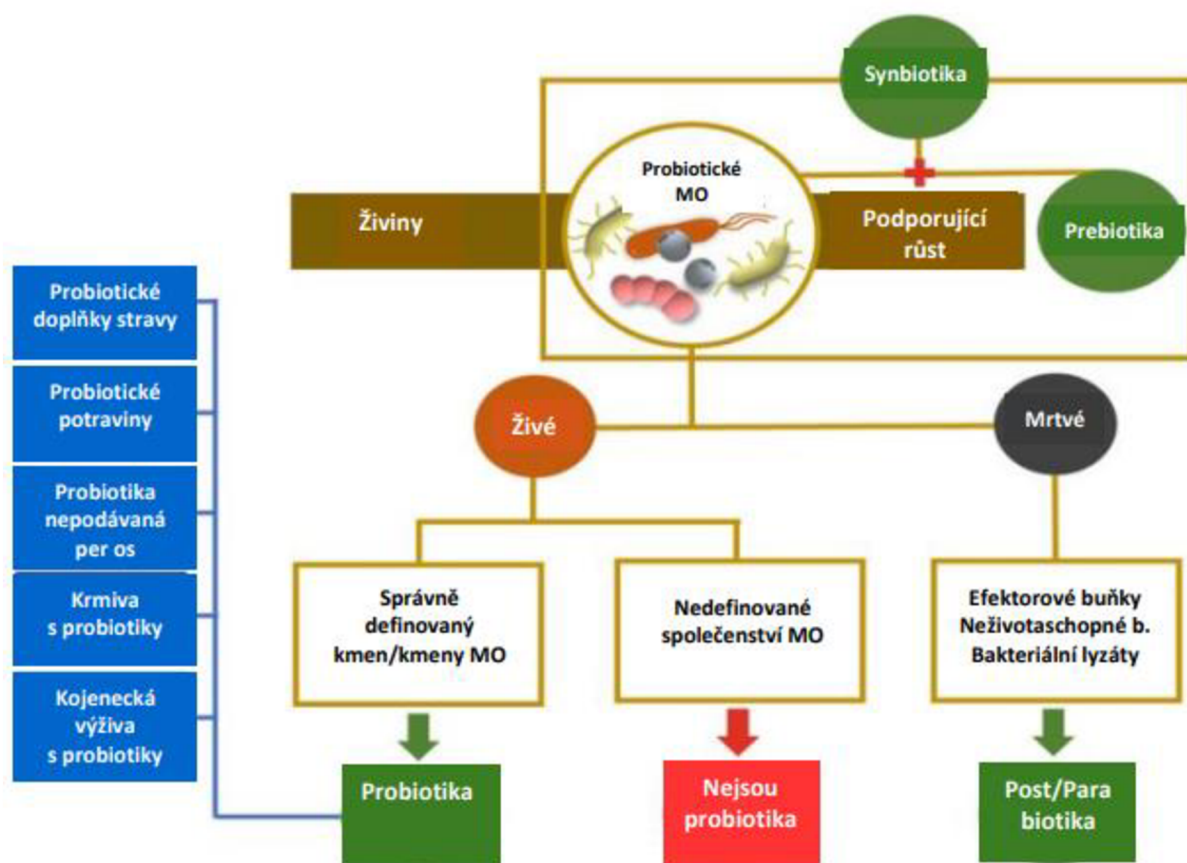
Synbiotika lze rozdělit do dvou skupin: komplementární a synergická. Komplementární synbiotikum obsahuje probiotikum a prebiotikum, které fungují nezávisle na sobě. Probiotická složka poskytuje hostiteli zdravotní přínos, zatímco prebiotikum je prospěšné tím, že podporuje růst a aktivitu mikroorganismů střevní mikrobioty. Synergické synbiotikum se skládá z živého mikroorganismu a substrátu, který je selektivně využíván společně podávaným mikroorganismem. Aby se jednalo o synergické synbiotikum, musí být živý mikroorganismus vybrán na základě své schopnosti poskytovat zdravotní přínos. Substrát je vybrán tak, aby primárně podporoval aktivitu a růst tohoto vybraného mikroorganismu (Swanson et al. 2020).

3.1.4 Postbiotika a parabiotika

Podle definice probiotik musí být mikroorganismy živé, aby byly zdraví prospěšné. Ovšem mikrobiální životaschopnost není nezbytná k dosažení pozitivních účinků. Neživotaschopná nebo neaktivní probiotika či jejich metabolické vedlejší produkty mohou též hostiteli poskytovat zdravotní benefity (Liang & Xing 2023).

Postbiotika a parabiotika jsou novými pojmy v oblasti funkčních potravin. Paraprobiotika jsou inaktivované mikrobiální buňky probiotik (neporušené nebo rozbité buňky obsahující buněčné složky, jako jsou peptidoglykany, teichoové kyseliny, povrchové proteiny atd.) nebo surové buněčné extrakty (Nataraj et al. 2020). Postbiotika jsou komplexní směsí metabolických produktů vylučovaných živými bakteriemi nebo uvolňované bakteriální lýzou. Těmito látkami mohou být mastné kyseliny s krátkým řetězcem, proteiny, aminokyseliny, enzymy, extracelulární polysacharidy, buněčné lyzáty, peptidy buněčné stěny (kyselina teichoová, kyselina lipoteichoová, peptidoglykany) apod.

Postbiotika a parabiotika mají protizánětlivé, antioxidační a imunomodulační vlastnosti, čímž pozitivně ovlivňují homeostázu mikrobioty, metabolismus hostitele a signální dráhy. Posilují intestinální epiteliální bariéru, inhibují patogenní mikroorganismy a obecně přispívají k prevenci a léčbě mnoha onemocnění obdobně jako probiotika (Liang & Xing 2023). Zpracování, skladování, distribuce, příprava či nevhodné podmínky mohou u probiotik negativně ovlivnit životaschopnost prospěšných bakterií, čímž dochází k jejich znehodnocení. Naproti tomu postbiotika či parabiotika jsou vůči nepříznivým podmínkám imunní a mohou tak být vhodnou alternativou probiotik (Sabahi et al. 2023).



Obrázek 1: Rozdělení pojmů
(přeloženo z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-24903-8_16)

3.2 Střevní mikrobiota

Mikrobiota je definována jako soubor mikroorganismů obývajících lidské tělo a interagujících s ním. Tyto mikroorganismy tvoří komplexní ekosystém, který se přizpůsobuje podmínkám prostředí. Kolonizují různá místa v těle, jako je kůže, sliznice gastrointestinálního, dýchacího nebo urogenitálního traktu. Tyto mikroorganismy a jejich složení ovlivňují lidskou fyziologii ve zdraví i v nemoci a přispívají ke zlepšení nebo zhoršení celkového zdravotního stavu (Ogunrinola et al. 2020).

Největší populací mikroorganismů v lidském těle je střevní mikrobiota, která je jedním z nejsložitějších ekosystémů v přírodě skládajících se z bakterií, hub, archae a virů. Složení střevní mikrobioty zahrnuje především čtyři kategorie mikroorganismů: *Firmicutes* (31,1 %), *Proteobacteria* (29,5 %), *Actinobacteria* (25,9 %) nebo *Bacteroidetes* (7,1 %). Mezi střevní mikrobiotou a jejím hostitelem existuje symbiotické spojení, které hraje důležitou roli ve zdraví hostitele (Choundhary et al. 2023).

Složení bakterií je individuální a je ovlivněno hned na počátku života, a to způsobem porodu (vaginální porod nebo císařský řez) a výživou v prvních měsících života (kojení nebo náhradní kojenecká mléčná výživa). V pozdějších letech je mikrobiální složení závislé na

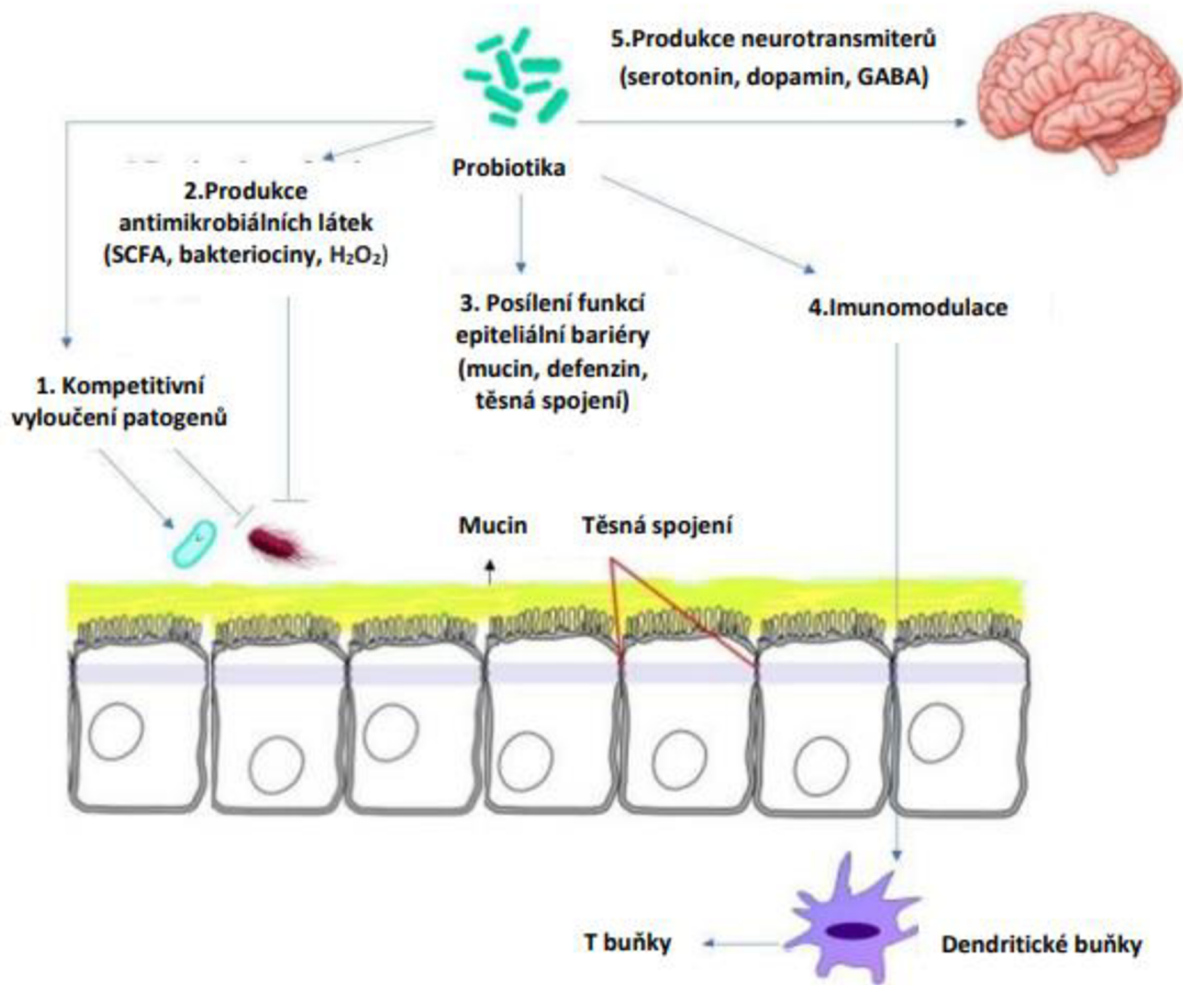
mnoha faktorech jako zdravý životní styl (vyvážená strava a dostatek fyzické aktivity), užívání léků (zejména antibiotik), prodělání virových nebo bakteriálních infekcí, kouření nebo stres (Rea et al. 2020).

Střevní mikrobiota plní mnoho základních funkcí důležitých pro správné fungování lidského těla. Zajišťuje produkci vitamínů a syntézu aminokyselin, ovlivňuje absorpci iontů, podílí se na přeměně polyfenolických sloučenin v potravě a na procesu biotransformace žlučových kyselin. Střevní mikrobiota je schopna transformovat potenciálně karcinogenní sloučeniny (N-nitroso sloučeniny, heterocyklické aminy) a aktivovat bioaktivní sloučeniny (fytoestrogeny). Další důležitou funkcí mikrobioty je rozklad komplexních nestravitelných sacharidů a produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (především acetát, propionát a butyrát). Tyto metabolity napomáhají udržovat fyziologii střevního epitelu, slouží jako energetický substrát pro buňky a pozitivně ovlivňují imunitní reakce (Schippa & Conte 2014).

3.3 Mechanismus účinku probiotik

Probiotika mohou mít pozitivní účinek na lidský organismus prostřednictvím několika hlavních mechanismů (Latif et al. 2023), které jsou znázorněny na Obrázku 2.

- Kompetitivní vyloučení, kdy probiotika soutěží s patogeny o živiny a vazebná místa na receptorech, čímž ztěžují přežití patogenů a jejich přilnutí ke střevní sliznici (1)
- Produkce antimikrobiálních látek, jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem, organické kyseliny, peroxid vodíku nebo bakteriociny, které inhibují růst patogenních bakterií ve střevě (2)
- Probiotika zlepšují funkci epitelální bariéry ve střevě tím, že podporují produkci hlenu a zvyšují exprese proteinů těsného spojení, které brání translokaci patogenů ze střeva do krve (3)
- Imunomodulace v těle hostitele. Probiotika regulují imunitu hostitele modulací zrání a funkce dendritických buněk a následně zvyšují aktivitu T buněk, které hrají důležitou roli v imunitní homeostáze (4)
- Produkce neurotransmiterů. Kromě toho mohou probiotika produkovat neurotransmitery ve střevě prostřednictvím osy střevo-mozek. Specifická probiotická barviva mohou modulovat hladinu serotoninu, kyseliny gama-aminomáselné a dopaminu, což ovlivňuje náladu, chování, motilitu střev a dráhy související se stresem (5)
- Probiotika také regulují vrozenou a adaptivní imunitní odpověď modulující dendritické buňky, makrofágy B a T lymfocyty. Probiotika také zvyšují produkci protizánětlivých cytokinů, zatímco interagují s buňkami střevního epitelu a přitahují makrofágy a mononukleární buňky.



Obrázek 2: Mechanismu účinku probiotik
(přeloženo z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10470842/>)

3.4 Zdravotní přínosy probiotik

Jak už bylo zmíněno, po celý lidský život je gastrointestinální trakt osídlen rozmanitou škálou mikroorganismů, převážně bakterií známých jako střevní mikrobiota. Tyto mikroorganismy ovlivňují stav hostitele ve zdraví i nemoci. Konzumace probiotik může fungovat jako prevence a snížit pravděpodobnost rozvoje některých onemocnění a napomoc tak zachování celkového zdravotního stavu a kondice jedince (Ibrahim et al. 2023).

Probiotika se používají k léčbě nejrůznějších onemocnění již desítky let. První použití probiotik bylo na počátku 19. století na základě pozorování snížené populace bifidobakterií u dětí trpících průjmy. To naznačovalo, že perorální příjem bifidobakterií by mohl tuto subpopulaci mikrobioty doplnit a zlepšit tak zdravotní stav jedince.

Většina studií ovšem nezaznamenala žádný přímý vliv probiotik na mikrobiotu. Pozitivní vliv probiotik nespočívá v jejich schopnosti vstoupit se do mikrobioty, ale spíše ve sdílení genů a metabolitů s komenzálními mikroorganismy, podpoře mikrobioty oslabené dysbiózou nebo přímým ovlivňováním epiteliálních a imunitních buněk (Wieers et al. 2020).

3.4.1 Poruchy gastrointestinálního traktu

Bezpochyby nejsilnější důkazy podporující užívání probiotik souvisí s léčbou gastrointestinálních onemocnění, konkrétně s akutním průjmem. Při poruchách trávení jsou probiotika častým doporučovaným doplňkem stravy a jejich účinky se zabývá mnoho klinických studií.

Některé patogenní kmeny *Escherichia coli*, stejně jako *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.* a viry jako rotavirus, norovirus atd. patří mezi nejčastější příčiny gastroenteritidy vedoucí k zánětu střev. Bylo prokázáno, že kmeny *Lactobacillus* jsou účinné proti patogenům *Escherichia coli* a *Clostridium difficile*. Konkrétně *Lactobacillus* F19 a *Lactobacillus reuteri* mají pozitivní dopad na gastrointestinální mikrobiotu tím, že posilují imunitní systém. Podobně *Lactobacillus casei* (kmen 431) posiluje imunitní odpověď a přispívá k rychlejší rekonvalescenci po průjmovém onemocnění u dětí. *Streptococcus thermophilus* a *Bifidobacterium bifidum* (kmen TH-4+ BB12) snižují riziko rotavirového průjmu a koliky u dětí. *Lactobacillus acidophilus* (kmen NCFM) a *Bifidobacterium lactis* (kmen Bi-07) mají příznivý vliv na gastrointestinální mikrobiotu, čímž snižují nafouklé břicho (Stavropoulou & Bezirtzoglou 2020).

3.4.2 Alergie

Alergie je reakce přecitlivělosti vyvolaná specifickými imunitními mechanismy zprostředkovanými buňkami nebo protilátkami (Luo et al. 2022). Hypersenzitivní reakce imunitního systému může být způsobena i zdánlivě neškodnými, běžně se vyskytujícími látkami z okolního prostředí. Tyto látky se nazývají alergeny a obvykle mezi ně patří léky, potraviny, květový pyl, kousnutí nebo bodnutí hmyzem, roztoči, srst domácích zvířat, chemikálie nebo třeba latex (Stavropoulou & Bezirtzoglou 2020).

Alergická onemocnění dýchacích cest zahrnuje alergické astma a alergickou rýmu. Astma je jedním z nejčastějších chronických nepřenosných onemocnění a postihuje přibližně 334 milionů lidí na celém světě. Astma je zánět dýchacích cest, a to jak reverzibilní obstrukce dýchacích cest, tak hyperreaktivita uvnitř dýchacích cest. Projevy alergické rýmy jsou otok nosní sliznice, zvýšená vaskulární permeabilita a masová vodnatá sekrece (Huang et al. 2022).

Alergická rýma je charakterizována nazálním citlivým zánětem, který podle odhadů již postihuje 10–40 % celosvětové populace. Běžnými příznaky alergické rýmy jsou svědění nosu, kýchání, výtok z nosu a ucpaný nos. Někteří pacienti navíc pociťují příznaky alergické rinokonjunktivitidy jako slzení, svědění očí nebo červené oči.

Změny střevní mikrobioty jsou považovány za jeden z nejdůležitějších aspektů v rozvoji alergických onemocnění, protože přecitlivělost v mechanismech tolerance imunitního systému je modulována střevní mikrobiotou. Některé studie ukázaly, že probiotika mohou ovlivnit

rozvoj a sílu alergické reakce, a proto se úspěšně používají při léčbě alergických onemocnění, jako je alergická rýma, astma, atopická dermatitida a potravinová alergie (Luo at al. 2022).

3.4.3 Laktózová intolerance

Laktózová intolerance je jednou z nejčastějších forem potravinové intolerance. Vzniká při snížené aktivitě laktázy v kartáčovém lemu sliznice tenkého střeva. Mezi nejčastější projevy patří zvracení, průjemy, plynatost a bolesti břicha, které jsou způsobeny fermentací nevstřebané laktózy v tlustém střevě. Závažnost onemocnění a gastrointestinální potíže tím způsobené se můžou u jednotlivých osob značně lišit. Deficit laktázy může být primární, sekundární nebo vrozený. Nejčastější formou je primární nedostatek laktázy, charakterizovaný sníženou tvorbou nebo postupným poklesem aktivity laktázy. Sekundární nedostatek laktázy je způsoben patologickými stavy (např. celiakií, Crohnovou chorobou nebo infekcí) a zákroky (např. operací), které postihují tenké střevo a vyvolávají ztrátu aktivity enzymu. Vrozený nedostatek laktázy je charakterizován úplnou absencí aktivity laktázy hned po narození.

Léčba obvykle spočívá ve snížení nebo dokonce vyloučení mléčných výrobků ze stravy. Další možností je konzumace mléčných výrobků bez laktózy. Kromě toho lze při požití výrobků s laktózou včas použít suplementaci s enzymem laktázou ve formě tablet.

Probiotika a prebiotika mohou pomoci jako potenciální léčba laktázové intolerance díky své schopnosti modulovat gastrointestinální mikrobiotu a podporovat trávení laktózy (Leis et al. 2020).

Příznivé účinky probiotik při léčbě intolerance laktózy jsou (Han 2022):

- Kompenzace nedostatku laktázy. Probiotika slouží jako zdroj laktázy ve střevním traktu po dosažení trávicí soustavy, aby zvýšila celkovou hydrolytickou kapacitu gastrointestinálního traktu a zvýšila fermentaci laktózy v tlustém střevě.
- Probiotika produkují antagonistické látky působící na heterofermentativní bakterie, které produkují velké množství plynů, včetně vodíku, oxidu uhličitého a metanu. Tyto látky mohou dráždit sliznici střeva, což vede k průjmům a křečím v břiše. Tímto způsobem jsou probiotika schopna pozitivně ovlivňovat propustnost střevní bariéry a mikrobiálního prostředí tím, že inhibují růst škodlivých mikroorganismů.
- Probiotika mohou stimulovat imunitní reakce hostitele proti infekcím, a to díky své schopnosti silně přilnout ke střevní sliznici.

Ne všechny druhy a kmeny probiotik lze při léčbě laktázové intolerance použít. Probiotika využívaná při léčbě intolerance laktózy by měla splňovat následující požadavky (Han 2022):

- Aplikovaná probiotika by měla vykazovat enzymatickou aktivitu β -galaktosidázy, která je schopna štěpit disacharid laktózu na glukózu a galaktózu. Probiotika s β -galaktosidázovou aktivitou napomáhají trávení laktózy, působí pozitivně na trávení a činnost gastrointestinálního traktu a mikrobiálního prostředí. Některé kmeny rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* patří mezi nejdůležitější, které mohou syntetizovat enzym β -galaktosidázu, čímž napomáhají hydrolyzovat laktózu v mléce a zvyšují tak toleranci k mléčným výrobkům.

- Použitá probiotika by měla být adaptabilní na prostředí trávicí soustavy, na hodnotu pH a teplotu gastrointestinálního traktu. Dále by měla mít schopnost přilnout ke střevní sliznici a kompetitivně vytěsňovat patogeny.

Podle Leis et al. (2020) existuje šest druhů probiotik, mezi něž patří: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* a *Bifidobacterium. longum*, u kterých bylo prokázáno, že splňují všechna kritéria a jsou účinná při zmírňování projevů laktóзовé intolerance.

3.4.4 Hypercholesterolémie

Hypercholesterolémie je rozšířené dědičné metabolické onemocnění způsobené zvýšenými sérovými hladinami cholesterolu s nízkou hustotou lipoproteinů (LDL-c). Hypercholesterolémie významně přispívá k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění a zvyšuje riziko infarktu myokardu (Sivamaruthi et al. 2021).

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou kardiovaskulární onemocnění jednou z hlavních příčin úmrtí. Ve srovnání se zdravými jedinci mají hypercholesterolemičtí pacienti trojnásobně vyšší riziko onemocnění srdce. Zvýšení hladiny celkového cholesterolu o 1 % v séru zvyšuje toto riziko o 2–3 %. Naopak 1% snížení hladiny LDL-C odpovídá snížení relativního rizika kardiovaskulárních příhod o více než 1 % (Jiang et al. 2020). Vhodnou léčbou lze snížit riziko morbidity a úmrtí souvisejících s KVO. Kromě doporučení na změnu životního stylu a stravovacích návyků musí většina pacientů užívat léky snižující hladiny LDL-c. Nejčastěji předepisovanými léky na léčbu hypercholesterolémie jsou statiny, jejichž užívání je spojeno s různými vedlejšími účinky a symptomy, včetně myositidy, myalgie, rhabdomyolýzy, kognitivní poruchy, jaterní dysfunkce, neuropatie, pankreatitidy a poruchy sexuálních funkcí (Sivamaruthi et al. 2021).

Probiotika lze využít jako účinný nástroj ke snížení hladiny cholesterolu v krvi. Hlavními mechanismy účinku probiotických bakterií na snížení cholesterolu jsou (Susanti et al. 2023):

- Přeměna cholesterolu na koprostanol – cholesterol přeměněný na koprostanol není absorbován v tenkém střevě a je přímo vylučován stolicí
- Dekonjugace žlučových solí – dekonjugované žlučové soli se méně reabsorbují střevem, čímž inhibují enterohepatální cirkulaci žluči a vyšší vylučování ve stolicí. Enzym BSH hraje hlavní roli v dekonjugaci žlučové soli v enterohepatálním oběhu. Tento enzym hydrolyzuje konjugovanou kyselinu glykodeoxycholovou a kyselinu taurodeoxycholovou a uvolňuje glyko- a tauro-žlučové kyseliny. Enzym BSH byl identifikován u několika druhů bakterií mléčného kvašení izolovaných z gastrointestinálního traktu lidí i zvířat
- Změna exprese proteinů související se syntézou cholesterolu – inhibice syntézy cholesterolu de novo hypocholesterolemickými faktory, jako je kyselina močová, laktóza, kyselina orotová a syrovátkový protein
- Produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem – SCFA, produkované probiotickou fermentací v hostitelském trávicím traktu, mohou zvyšovat syntézu HDL apolipoproteinu

3.5 Vybrané skupiny probiotik

3.5.1 Rod *Lactobacillus*

Lactobacillus je rod tyčinkovitých, grampozitivních, nesporetvorných, fakultativně anaerobních bakterií z kmene *Firmicutes*. Laktobacily metabolizují sacharidy za vzniku kyseliny mléčné, což z nich činí největší rod ve skupině bakterií mléčného kvašení. V březnu roku 2020 bylo 261 druhů *Lactobacillaceae* překlasifikováno do 25 rodů (včetně 23 nových rodů) kvůli jejich extrémně vysoké genotypové, fenotypové a ekologické rozmanitosti.

Druhy *Lactobacillus* lze rozdělit do tří skupin na základě jejich metabolismu: obligátně homofermentativní, fakultativně heterofermentativní a obligátně heterofermentativní. Obligátně homofermentativní skupina fermentuje sacharidy za vzniku kyseliny mléčné jako hlavního vedlejšího produktu (např. *L. acidophilus* a *L. salivarius*).

Fakultativně heterofermentativní skupina, která za určitých podmínek nebo s určitými substráty fermentuje sacharidy za vzniku kyseliny mléčné, ethanolu/kyseliny octové a oxidu uhličitého jako vedlejších produktů (např. *L. casei* a *L. plantarum*).

Obligátně heterofermentativní skupina vždy fermentuje sacharidy za vzniku kyseliny mléčné, ethanolu/kyseliny octové a oxidu uhličitého jako vedlejších produktů (např. *L. reuteri* a *L. fermentum*).

Laktobacily kolonizují mnohé části lidského těla, zejména trávicí trakt včetně ústní dutiny a ženské pohlavní ústrojí. Laktobacily jsou pro své pozitivní vlastnosti využívány jako probiotika v doplňcích stravy nebo jako nástroje v odvětví potravinářských technologií. Hlavní použití laktobacilů je ve výrobním procesu fermentovaných mléčných, masných nebo zeleninových potravin a kváskového chleba. Laktobacily získaly status „obecně uznané jako bezpečné“ od amerického Úřadu pro potraviny a léčiva a status „kvalifikovaného předpokladu bezpečnosti“ od Evropského úřadu pro bezpečnost potravin, tudíž je jejich použití ve výrobě potravin bezproblémové.

Mezi hlavní probiotické druhy rodu *Lactobacillus* patří: *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri* a *L. rhamnosus*. Existuje mnoho výzkumů o potenciálních zdravotních přínosech druhů *Lactobacillus*, ačkoli důkazy naznačují, že mnohé vlastnosti těchto probiotických bakterií jsou závislé jak na druhu, tak na kmeni.

Laktobacily prokazují účinnost při léčbě různých onemocnění včetně bakteriální vaginózy, atopické dermatitidy a infekcí horních cest dýchacích. Ale převážně se většina probiotik rodu *Lactobacillus* konzumuje s cílem zlepšit stav gastrointestinálního traktu (Dempsey & Corr 2022).

Lactobacillus je důležité probiotikum při studiu lidských střevních mikroorganismů, které úzce souvisí s lidským zdravím, nejenže syntetizuje esenciální vitamíny a aminokyseliny a podporuje vstřebávání minerálů, ale co je důležité, může dosáhnout efektu zlepšení střevní mikroekologie inhibicí růstu škodlivých mikroorganismů. Kromě toho mastné kyseliny s krátkým řetězcem, důležité metabolity Lactobacilů, pomáhají udržovat normální fyziologickou funkci tlustého střeva a morfologii epitelu tlustého střeva, stejně jako podporují růst a reprodukci *Lactobacillus*, čímž snižují počet patogenních *Escherichia coli* ve střevě.

Lactobacillus ovlivňuje mikrobiální zásahy k udržení nebo zlepšení mikrobiální rovnováhy v hostitelském prostředí a k inhibici invaze patogenů. Synergické interakce mezi bakteriemi mléčného kvašení a endogenní komenzální mikrobiotou jsou důležitým faktorem při obnově mikrobiální endostázy. Kromě synergického účinku s komenzální mikrobiotou produkují bakterie mléčného kvašení sloučeniny s antimikrobiálními účinky v obraně proti patogenům posílením funkce epiteliální bariéry střeva (You et al. 2022).



Obrázek 3: *Lactobacillus* spp.

(<https://www.oberonic.cz/bakterie-lactobacillus-mohou-chronit-pred-uzkosti-a-depresi/>)

3.5.2 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobacterium je rod grampozitivních, anaerobních bakterií, který je na konci často rozvětven. Jde o fyziologickou bakterii, která se vyskytuje v lidském těle a je pro člověka velmi důležitou skupinou probiotik. *Bifidobacterium* se může přizpůsobit anaerobnímu střevnímu životu, reprodukovat se a metabolizovat ve středním a na konci tenkého a tlustého střeva a vylučovat bifidogenní faktory s probiotickými účinky k regulaci zdraví střev. V současnosti *Bifidobacterium* zahrnuje 32 druhů a 9 poddruhů, z nichž 14 bylo izolováno od lidí (You et al. 2022).

Např. *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* a *B. pseudolongum* se běžně vyskytují v lidském střevě (Kazmierczak-Siedlecka et al. 2021).

Fyziologické funkce *Bifidobacterium* jsou hlavně následující (You et al. 2022):

- Podobně jako ostatní bakterie mléčného kvašení může *Bifidobacterium* omezit růst patogenních bakterií, aby udržela rovnováhu normální střevní mikrobioty a inhibovala prozánětlivé cytokiny. Související experimenty také ukázaly, že *Bifidobacterium* může chránit před dysfunkcí střevní bariéry jak *in vitro*, tak *in vivo*. Tento ochranný účinek je spojen s inhibicí sekrece prozánětlivých cytokinů a uvolňování vimentinu a zlepšením integrity střevního těsného spojení.
- *Bifidobacterium bifidum* syntetizuje vitamíny a aminokyseliny ve střevě a zvyšuje biologickou dostupnost vápníku a předpokládá se, že zlepšuje zdraví kostí.
- *Bifidobacterium bifidum* má protinádorové účinky. *Bifidobacterium longum*, který vylučuje C-CPE-PE23 se může selektivně lokalizovat a proliferovat v nádorech. Izolované bifidobakterie byly specificky distribuovány v nádorech

myši s rakovinou prsu a významně inhibovaly růst nádoru bez závažných vedlejších účinků, jako je ztráta hmotnosti nebo poškození jater a ledvin, a experimentální výsledky naznačují, že bifidobakterie mohou být speciálními nosiči protirakovinných proteinů proti zhoubným nádorům.



Obrázek 4: *Bifidobacterium* spp.

(<https://www.nutraingredients.com/Article/2023/02/02/probiotics-as-prophylactics-bifidobacterium-strain-may-prevent-arthritis>)

3.5.3 Rod *Streptococcus*

Streptokoky jsou bakterie, které patří do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Streptococcaceae*. Na základě sekvence genu 16s rRNA byl rod *Streptococcus* klasifikován do 6 hlavních skupin: *anginosus*, *bovis*, *mitis*, *mutans*, *pyogenes* a *salivarius*. Některé bakterie rodu *Streptococcus* jsou používány jako probiotika pro prevenci a léčbu gastrointestinálních poruch u lidí (Mato et al. 2023).

Streptococcus thermophilus (STH) je nepatogenní grampozitivní bakterie patřící do skupiny *salivarius*. Zdraví prospěšné bioaktivní látky produkované *Streptococcus thermophilus* jsou: mastné kyseliny s krátkým řetězcem, konjugovaná kyselina linolová; konjugovaná kyselina linolenová; exopolysacharidy a kyselina gama-aminomáselná.

Streptococcus thermophilus se běžně používá jako startér v mlékárenském průmyslu a také v mnoha tradičních fermentovaných produktech včetně jogurtů a sýrů. Nachází se také v mléčných výrobcích spontánně fermentovaných, jako jsou různá fermentovaná mléka v Mongolsku a sýr Ragusano na Sicílii. Kromě toho se tato bakterie může podílet na fermentaci luštěnin nebo zrn mléčného kefiru.

Kromě technologického významu si *Streptococcus thermophilus* v posledních letech získal zájem také jako probiotická bakterie. Ve fermentovaných produktech je spojován s různými příznivými účinky na lidské zdraví, včetně zmírnění intolerance laktózy, inhibice patogenů, prevence průjmu, modulace zánětu, produkce cytokinů, snížení urémie, snížení celkového cholesterolu a cholesterolu v lipoproteinech s nízkou hustotou, prevence rozvoje inzulinové rezistence a zlepšení glykemických parametrů, snížené riziko vzniku některých druhů rakoviny, prevence nebo léčba zánětlivých onemocnění střev a udržení střevní

homeostázy. Ačkoli většina bakteriálních faktorů a mechanismů stojících za těmito prospěšnými účinky zůstává neznámá, některé byly objasněny.

Například LacZ beta-galaktosidáza uvolňovaná bakterií *Streptococcus thermophilus* je zapojená do katabolismu laktózy může hrát roli v prevenci kolorektálního karcinomu. Vylučovaný LacZ inhibuje buněčnou proliferaci, snižuje tvorbu kolonií, vyvolává zástavu buněčného cyklu, podporuje apoptózu buněk kolorektálního karcinomu in vitro a snižuje tvorbu nádorů u myši. Protirakovinné účinky *Streptococcus thermophilus* jsou částečně zprostředkovány schopností LacZ uvolňovat galaktózu, která interferuje s energetickou homeostázou k aktivaci oxidativní fosforylace a downregulaci kináz Hippo dráhy. Exopolysacharidy z kmene CRL1190 stimulují regeneraci epitelálních buněk a imunologické vrozené obranné mechanismy in vitro a zabraňují chronické gastritidě indukované kyselinou acetylsalicylovou u myši. Exopolysacharidy z kmene AR333 vykazují imunostimulační účinek in vitro. Příznivé účinky zprostředkované exopolysacharidy jsou však závislé na kmeni. Laktát produkovaný bakterií *Streptococcus thermophilus* v trávicím traktu hlodavců podporuje hlenovou dráhu a moduluje epitel tlustého střeva. Laktát také inhibuje růst patogenů, účastní se trofického řetězce mezi mikrobiálními komunitami a vykazuje antiproliferativní účinky. Antioxidační látky produkované *Streptococcus thermophilus*, včetně redukovaného glutathionu, by se mohly podílet na snížení rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění a hypercholesterolemie, zejména prostřednictvím jejich aktivity proti oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou. Proteolýza kaseinů jogurtovými bakteriemi včetně STH uvolňuje bioaktivní peptidy, které mimo jiné stimulují expresi a sekreci mucinového genu in vitro a zvyšují počet pohárkových a Panethových buněk podél tenkého střeva a expresi střevních mucinů a antibakteriálních faktorů in vivo. Také bylo zjištěno, že pozitivní účinek STH kmene ST4 na myši s mukozitidou vyvolanou 5-fluorouracilem je připisován zvýšení obsahu fekálního acetátu mastných kyselin s krátkým řetězcem v korelaci s udržováním zánětlivé homeostázy a zachování střevní permeability. Folát produkovaný STH by se mohl podílet na snížení zánětu v modelech indukované mukositivity na hlodavcích.

Navzdory těmto četným potenciálním příznivým účinkům je však jediné zdravotní tvrzení týkající se *Streptococcus thermophilus* uznané Evropským úřadem pro bezpečnost potravin spojeno s konzumací živé jogurtové kultury při špatném trávení laktózy (Roux et al. 2022).



Obrázek 5: *Streptococcus thermophilus*

(<https://www.istockphoto.com/cs/fotografie/bakterie-streptococcus-gm1325033481-410180274>)

3.6 Označování probiotických doplňků stravy

Rozsáhlá nabídka doplňků stravy s probiotiky na trhu může být pro spotřebitele matoucí. Důležité je, aby spotřebitelé byli schopni rozpoznat produkty vysoké kvality, které odpovídají jejich specifickým potřebám. Kvalitu probiotika definuje bezpečnost užívání, účinnost a správné označení produktu, včetně přesných formulací jakýkoliv zdravotních tvrzení, v rozsahu, v jakém jsou povolena. Protože probiotika jsou živé mikroorganismy, musí být dodrženy správné výrobní postupy, podmínky skladování a je nutné průběžně ověřovat kvalitu probiotik, zda produkt obsahuje uvedené probiotické bakterie v daném množství a není kontaminován nežádoucími mikroorganismy.

Na etiketě doplňku stravy s probiotiky by měl být uveden rod, druh a označení kmene všech mikroorganismů obsažených v produktu. Na základě nejnovějších vědeckých poznatků se způsob klasifikace a pojmenování mikroorganismů může lišit, a proto by výrobci měli používat aktuální a přesné názvy (aktualizovaný seznam je k dispozici na <http://www.bacterio.net/>). Tyto informace jsou klíčové pro rozpoznání kvalitních probiotik.

Na etiketě výrobku by měla být uvedena informace o síle přípravku. Ta je obvykle vyjádřena jako KTJ neboli kolonie tvořící jednotky (z ang. CFU – colony forming unit) a udává počet životaschopných buněk. Uvedené množství životaschopných buněk by mělo být obsaženo až do konce data minimální trvanlivosti. Doporučená denní dávka by měla odpovídat dávce použité ve studiích na lidech, u kterých byl prokázán pozitivní zdravotní účinek.

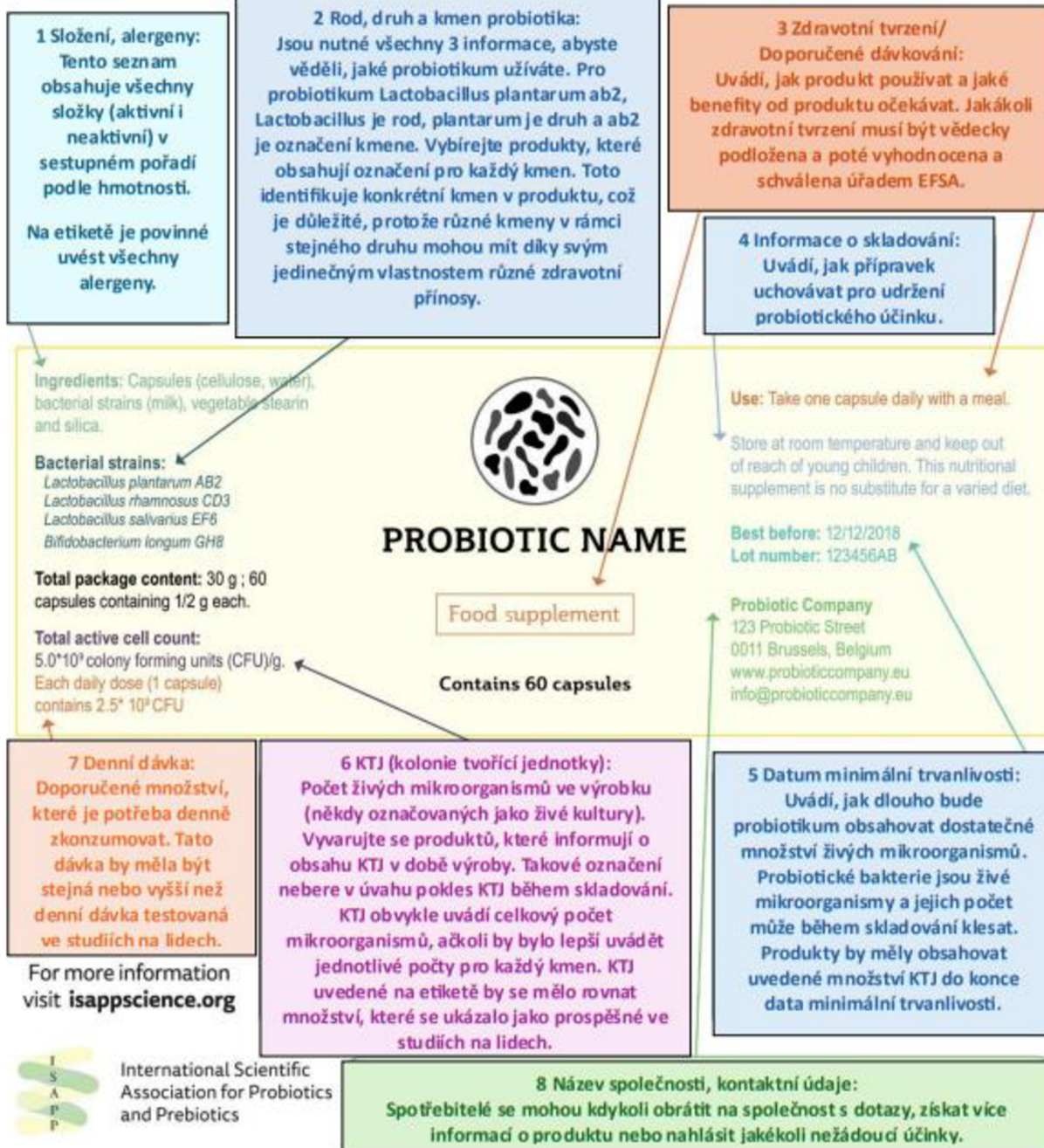
Pravděpodobně nejspornějším aspektem v označování probiotických výrobků jsou tvrzení o zdravotním prospěchu. Regulační rámce v různých zemích stanovují různé podmínky uvádění důkazů na podporu tvrzení. Některé země navíc vyžadují předběžné schválení tvrzení, zatímco jiné nikoli. V Evropské unii musí být všechna tvrzení schválena regulačními orgány a dosud předložená tvrzení o probiotických přípravcích schválena nebyla. Dokumentace předložená na podporu tvrzení byly považovány za neprokazující příčinnou souvislost mezi probiotickým přípravkem a uváděným zdravotním účinkem.

I přesto, že existují přesvědčivé důkazy o tom, že probiotika mohou být mnoha způsoby prospěšná lidskému zdraví, v současné době to není možné uvádět na etiketách výrobků ani v reklamě. Spotřebitelé, kteří mají zájem o používání probiotických výrobků ke zmírnění konkrétního zdravotního problému, mohou mít potíže se správným výběrem produktu. Mezi organizace, které poskytují doporučení pro užívání probiotik založená na důkazech, patří například World Gastroenterology Organisation Practice Guideline - Probiotics and Prebiotics, Clinical Guide to Probiotic Products Available in the US a European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (Sanders et al. 2018).

Zjednodušený diagram etikety správně označeného probiotika je vysvětlen na obrázku 6.

Vysvětlení etikety probiotika

Toto je příklad etikety doplňku stravy s probiotiky prodávaného v Evropě



Obrázek 6: Etiketa probiotika

(přeloženo z: ISAPP <https://isappscience.org/eu-probiotic-label/>)

4 Materiál a metodika

4.1 Testované probiotické doplňky stravy

Bylo testováno 10 vzorků probiotických doplňků stravy (Tabulka 2). Vzorky byly testovány v roce 2021 (Vytlačilová, 2022) a poté byly skladovány po dobu 6 měsíců při pokojové, chladničkové a mrazirenské teplotě. Cílem bylo zjistit, jestli vzorky budou obsahovat deklarované množství celkového počtu mikroorganismů a jaký má vliv teplota skladování na životaschopnost probiotik ve výrobcích.

Tabulka 2: Přehled testovaných vzorků včetně deklarovaných CP výrobcem

Vzorek	Deklarované druhy MO	Deklarované CP (log KTJ/g)
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bacillus coagulans</i>	9,4
2	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	10,3
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Bacillus coagulans</i>	8,82
4	<i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i>	11
5	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	9,91
6	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus</i>	10,3

	<i>plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus lactis ssp. lactis</i>	
7	<i>Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum</i>	9,6
8	<i>Bifidobacterium longum, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus brevis, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus casei, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus salivarius, Lactococcus lactis, Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium infantis</i>	9,88
9	<i>Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus rhamnosus, Bifidobacterium bifidum</i>	8,85
10	<i>Bifidobacterium lactis, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Lactobacillus lactis, Lactobacillus paracasei, Streptococcus thermophilus</i>	10,26

4.2 Metodika

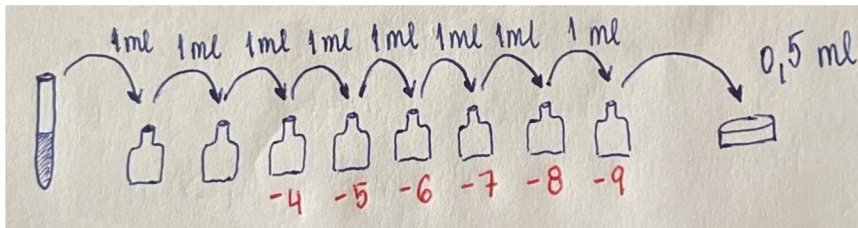
Stanovení celkového počtu bakterií, laktobacilů, bifidobakterií a streptokoků bylo provedeno pomocí selektivních kultivačních médií, které svým složením podporují růst dané skupiny mikroorganismů, případně inhibují růst ostatních. Vzorek byl zvážen, zhomogenizován a naředěn ředícím médiem do devátého řádu. K naočkování na Petriho misky bylo použito čtvrté až deváté ředění. Poté byly misky zality odpovídajícím agarem a kultivovány za daných podmínek (Tabulka 3). Po kultivaci byly narostlé kolonie spočteny.

Tabulka 3: Kultivační stanovení mikroorganismů

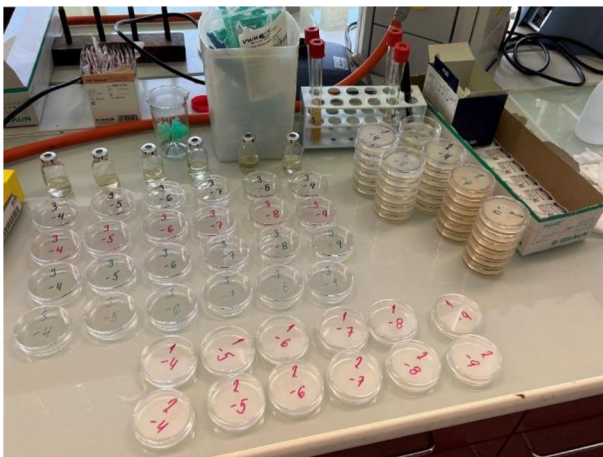
	Agar	Teplota kultivace	Doba kultivace	Typ kultivace
CP	Wilkins-Chalgren	37 °C	48 hodin	anaerobně
Bifidokbakterie	Wilkins-Chalgren + mupirocin (100 mg/L) + kys. octová (1 ml/L)	37 °C	48 hodin	anaerobně
Laktobacily	Rogosa agar + kys. octová (1,32 ml/L)	37 °C	72 hodin	mikroaerofilně
Streptokoky	M17 agar	37 °C	48 hodin	aerobně

4.3 Pracovní postup

Z každého probiotika bylo odebráno příslušné množství vzorku (většinou jedna kapsle), které bylo zváženo. Obsah kapsle byl převeden do zkumavky s ředícím médiem a vzorek byl přístrojem CHS Vortex (Obrázek 9) důkladně zhomogenizován. Poté následovalo další ředění (Obrázek 7). Ze zkumavky byl asepticky injekční stříkačkou odebrán 1 ml vzorku a převeden do penicilinky s ředícím médiem. Takto se pokračovalo až do devátého ředění, vždy s novou injekční stříkačkou (kvůli koncentraci). Poté bylo 0,5 ml vzorku ze čtvrtého, pátého, šestého, sedmého, osmého a devátého ředění aplikováno na Petriho misku (Obrázek 8) a zalito agarem.



Obrázek 7: Schéma ředění vzorků



Obrázek 8: Petriho misky



Obrázek 9: Přístroj CHS Vortex

4.4 Příprava agarů

4.4.1 Wilkins-Chalgren

Do Erlenmayerovy baňky bylo odměřeno 100 ml destilované vody a naváženo 4,3 g agaru. Bylo přidáno 0,5 g sójového peptonu, 0,05 g cysteinu a 0,1 ml tweenu a vše bylo důkladně promícháno. Baňka byla překryta alobalem a agar byl sterilizován v autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 20 minut.

4.4.2 Wilkins-Chalgren s mupirocinem a kyselinou octovou

Do Erlenmayerovy baňky bylo odměřeno 100 ml destilované vody a naváženo 4,3 g agaru. Bylo přidáno 0,5 g sójového peptonu, 0,05 g cysteinu a 0,1 ml tweenu a vše bylo důkladně promícháno. Baňka byla překryta alobalem a agar byl sterilizován v autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 20 minut. Poté bylo přidáno 100 µl kyseliny octové a 1 balení mupirocinu na 100 ml agaru rozpuštěného v ampuli.

4.4.3 Rogosa

Do Erlenmayerovy baňky bylo odměřeno 100 ml destilované vody, naváženo 6 g agaru a vše důkladně promícháno. Baňka byla překryta alobalem a agar byl rozvařen ve vodní lázni. Poté bylo přidáno 132 µl kyseliny octové.

4.4.4 M17

Do Erlenmayerovy baňky bylo odměřeno 100 ml destilované vody, naváženo 5,1 g agaru a vše důkladně promícháno. Baňka byla překryta alobalem a agar byl vytemperován v autoklávu na teplotu 50 °C po dobu 20 minut. Poté bylo přidáno 5 ml laktózy.



Obrázek 10: Příprava agarů

4.5 Stanovení probiotických bakterií

4.5.1 Stanovení CP

Stanovení celkového počtu mikroorganismů bylo prováděno na Wilkins Chalgren agaru. Petriho misky s naočkovaným vzorkem byly zality jednou vrstvou agaru a uloženy do anaerostatu (Obrázek 11), ve kterém pomocí přístroje Whitley jar gassing system (Obrázek 12) bylo zajištěno anaerobní prostředí. Kultivace probíhala 48 hodin při teplotě 37 °C.

4.5.2 Stanovení bifidobakterií

Stanovení bifidobakterií bylo prováděno na Wilkins Chalgren agaru s mupirocinem a kyselinou octovou. Petriho misky s naočkovaným vzorkem byly zality jednou vrstvou agaru a uloženy do anaerostatu, ve kterém pomocí přístroje Whitley jar gassing system bylo zajištěno anaerobní prostředí. Kultivace probíhala 48 hodin při teplotě 37 °C.



Obrázek 11: Anaerostat



Obrázek 12: Whitley jar gassing system

4.5.3 Stanovení laktobacilů

Stanovení laktobacilů bylo prováděno na Rogosa agaru. Petriho misky s naočkovaným vzorkem byly zality jednou vrstvou agaru a po ztuhnutí ještě druhou vrstvou (kvůli mikroaerofilnímu prostředí). Poté byly misky uloženy dnem vzhůru do termostatu. Kultivace probíhala 48–72 hodin při teplotě 37 °C.

4.5.4 Stanovení streptokoků

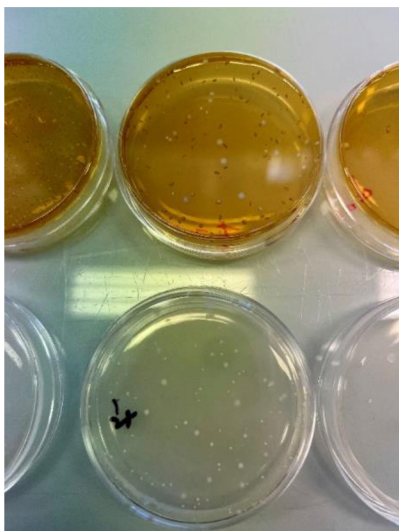
Stanovení streptokoků bylo prováděno na agaru M17. Petriho misky s naočkovaným vzorkem byly zality jednou vrstvou agaru a uloženy dnem vzhůru do termostatu. Kultivace probíhala 48 hodin při teplotě 37 °C.



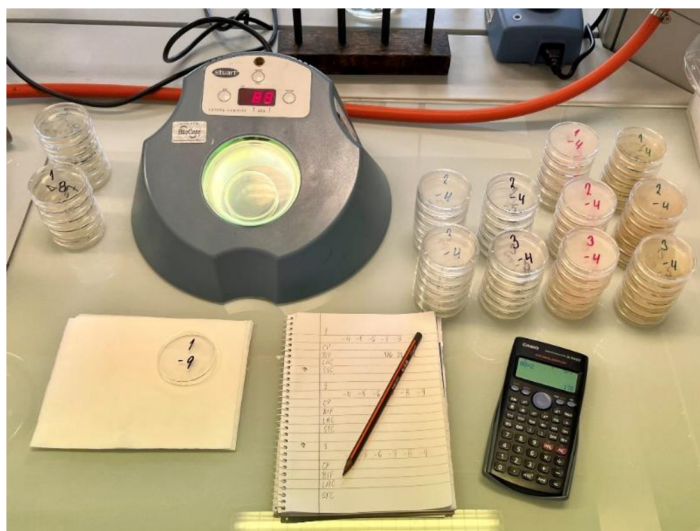
Obrázek 13: Petriho misky zalité agarem

4.6 Vyhodnocení

Po kultivaci byly narostlé kolonie (Obrázek 14) spočteny pomocí přístroje Stuart SC6 colony counter (Obrázek 15). Každá miska byla umístěna dnem vzhůru na počítací desku a pomocí lihového fixu byly označeny narostlé kolonie. Spočítané kolonie byly vynásobeny dvakrát (bylo aplikováno jen 0,5 ml vzorku). Výsledek byl vypočítán pomocí vzorce $P = [(P1+P2)/11] \times F$ (KTJ/ml). P1 a P2 jsou počty kolonií na dvou po sobě jdoucích počítatelných plotnách a F je převrácená hodnota vyššího ředění.



Obrázek 14: Narostlé kolonie



Obrázek 15: Počítání kolonií

5 Výsledky

Bylo testováno 10 vzorků probiotických doplňků stravy. Vzorky byly testovány v roce 2021 (Vytlačilová, 2022) a poté byly skladovány po dobu 6 měsíců při pokojové (22 °C), chladničkové (6 °C) a mrazírenské teplotě (-18 °C). Cílem bylo zjistit, jestli vzorky budou obsahovat deklarované množství celkového počtu mikroorganismů a jaký má vliv teplota skladování na životaschopnost probiotik ve výrobcích.

Jednotlivé výsledky pro každý vzorek jsou zobrazeny na grafech 1 až 10, kde jsou zahrnuty i výsledky měření z roku 2021 (Vytlačilová, 2022).

Hypotéza 1: Probiotické doplňky stravy budou obsahovat deklarované počty mikroorganismů během doby minimální trvanlivosti.

Z výsledků je patrné, že je nutné vyvrátit hypotézu 1, protože polovina testovaných vzorků nesplňovala deklarované množství mikroorganismů.

Vzorky, které nesplňovaly deklarované množství výrobcem:

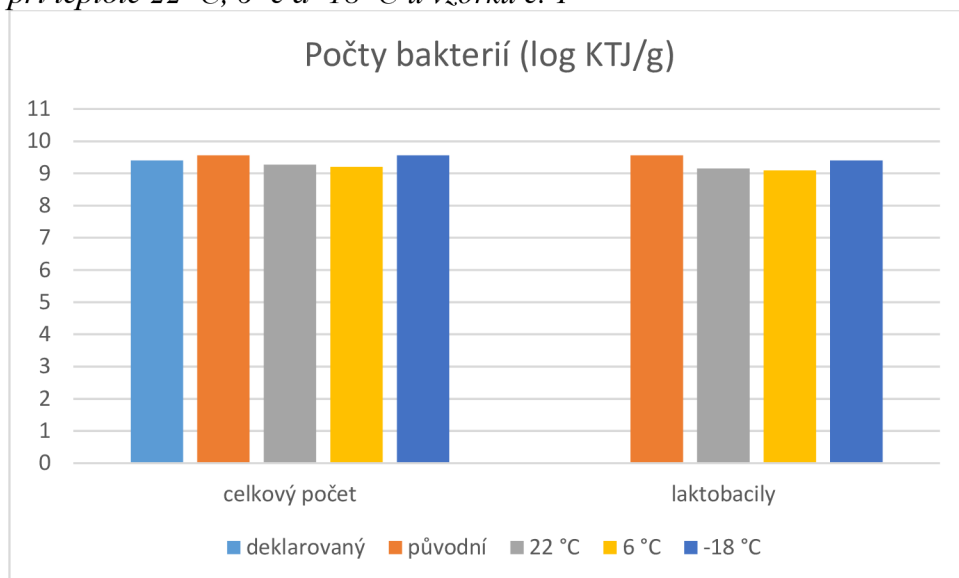
- 2
- 4
- 5
- 8
- 10

Hypotéza 2: Podmínky skladování budou ovlivňovat životaschopnost mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy.

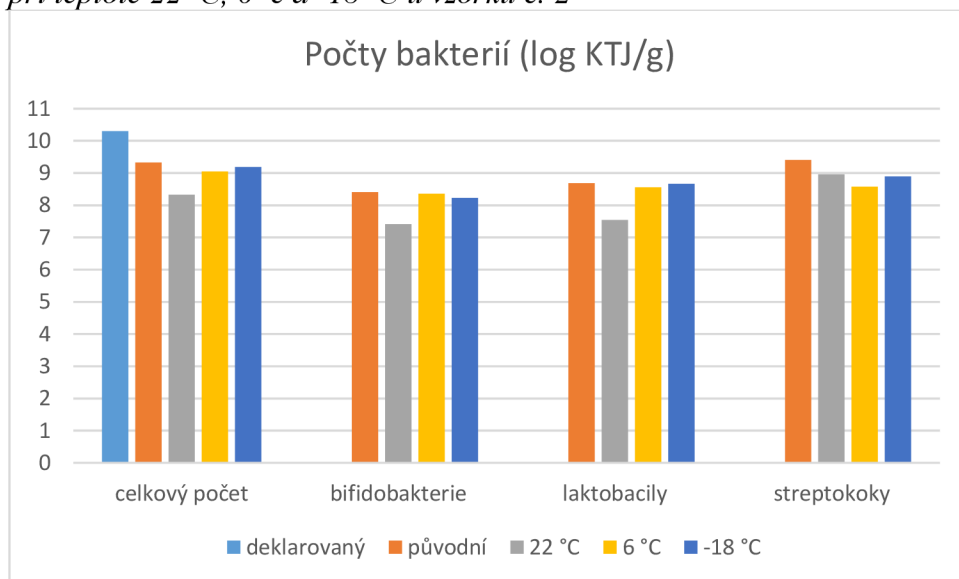
Výsledky potvrdily hypotézu 2, protože teplota skladování významně ovlivňuje životaschopnost mikroorganismů.

U všech vzorků skladovaných při pokojové teplotě došlo ke snížení počtu mikroorganismů. Došlo k poklesu i o několik řádů a u vzorku 7 dokonce nebyly stanoveny žádné životaschopné mikroorganismy. Zatímco u vzorků skladovaných při nižších teplotách k takovému úbytku nedošlo.

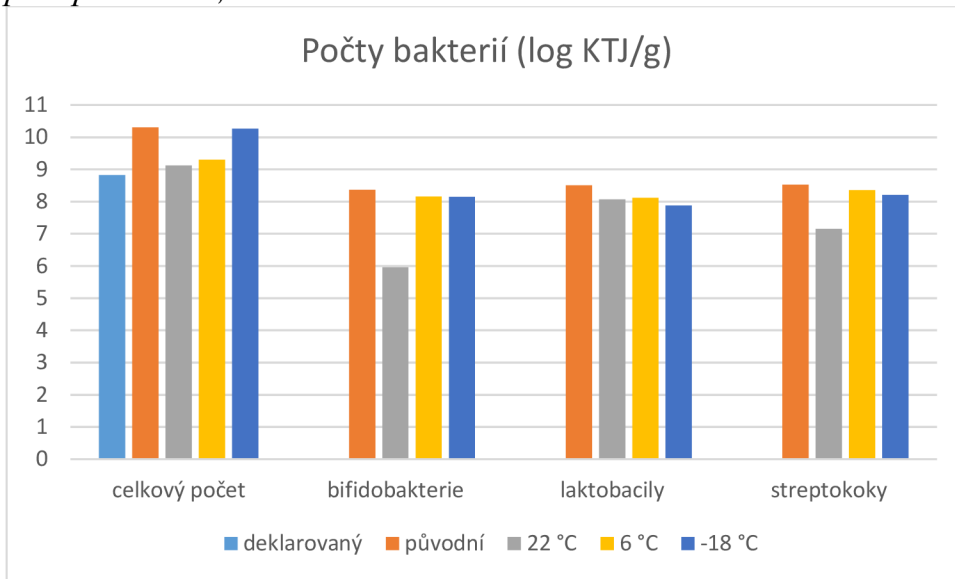
Graf 1: Porovnání deklarovaného množství výrobcem a zjištěného množství při teplotě 22 °C, 6 °C a -18 °C u vzorku č. 1



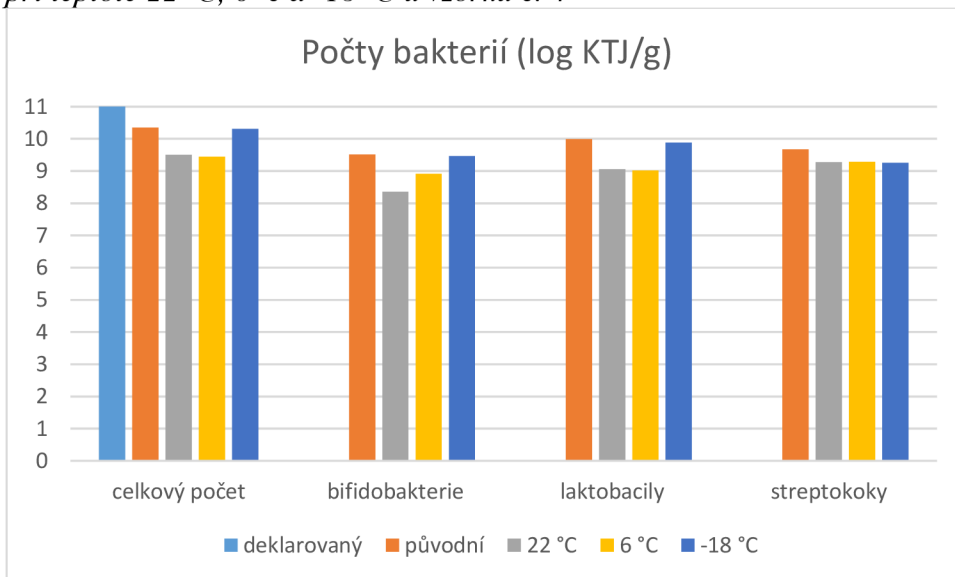
Graf 2: Porovnání deklarovaného množství výrobcem a zjištěného množství při teplotě 22 °C, 6 °C a -18 °C u vzorku č. 2



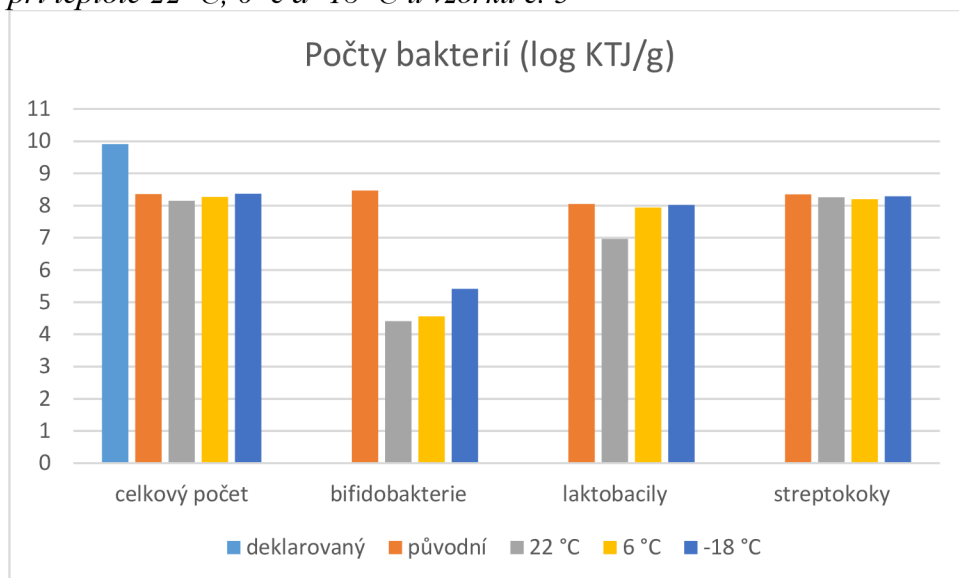
Graf 3: Porovnání deklarovaného množství výrobcem a zjištěného množství při teplotě 22 °C, 6 °C a -18 °C u vzorku č. 3



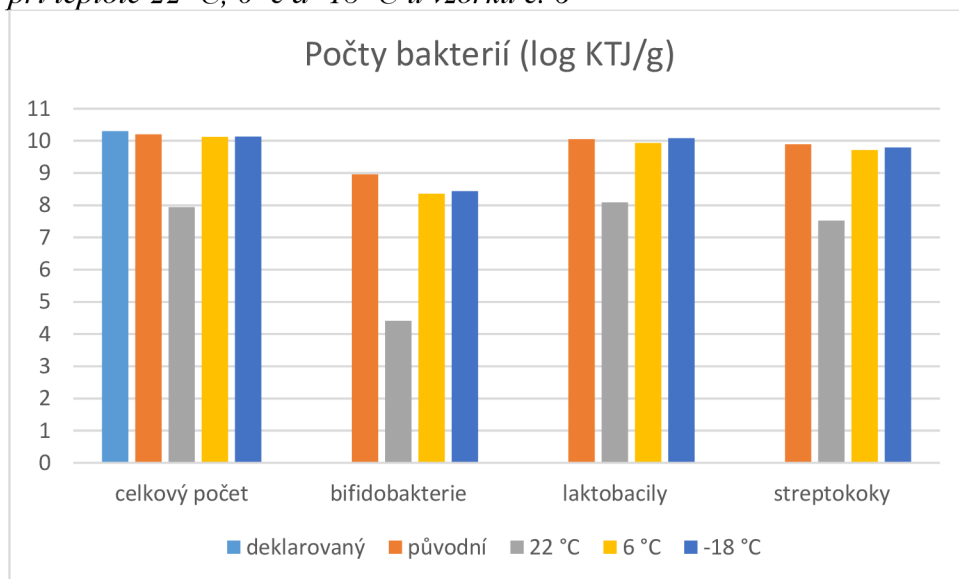
Graf 4: Porovnání deklarovaného množství výrobcem a zjištěného množství při teplotě 22 °C, 6 °C a -18 °C u vzorku č. 4



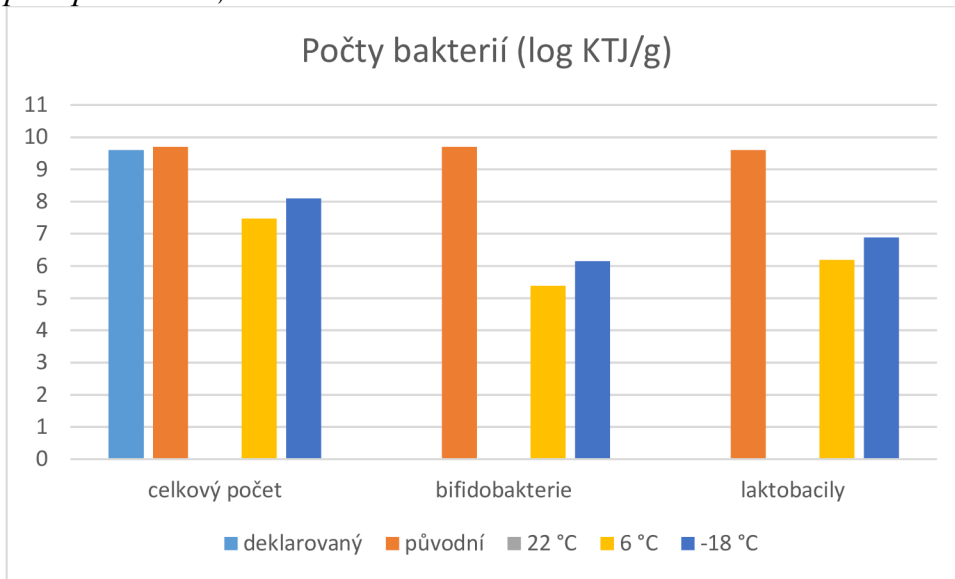
Graf 5: Porovnání deklarovaného množství výrobcem a zjištěného množství při teplotě 22 °C, 6 °C a -18 °C u vzorku č. 5



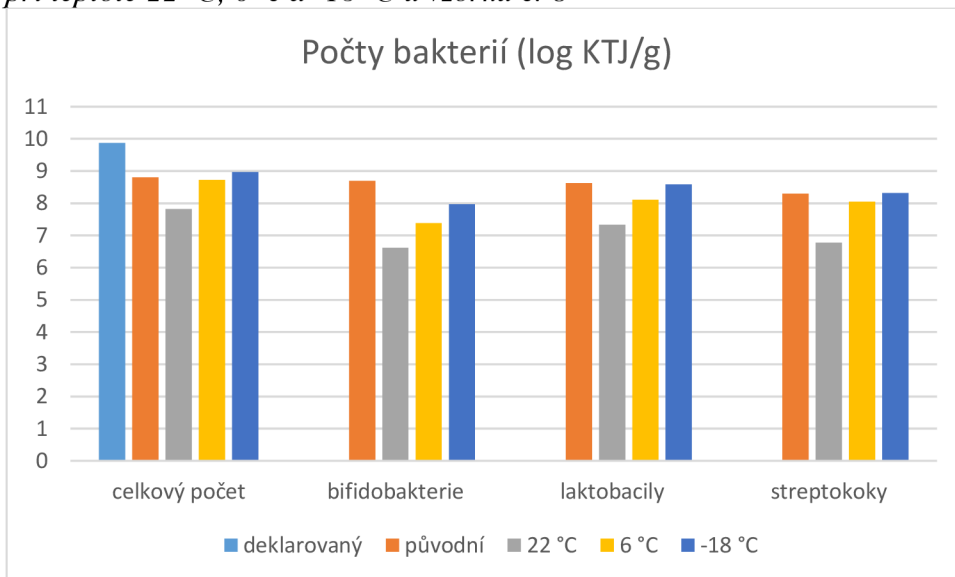
Graf 6: Porovnání deklarovaného množství výrobcem a zjištěného množství při teplotě 22 °C, 6 °C a -18 °C u vzorku č. 6



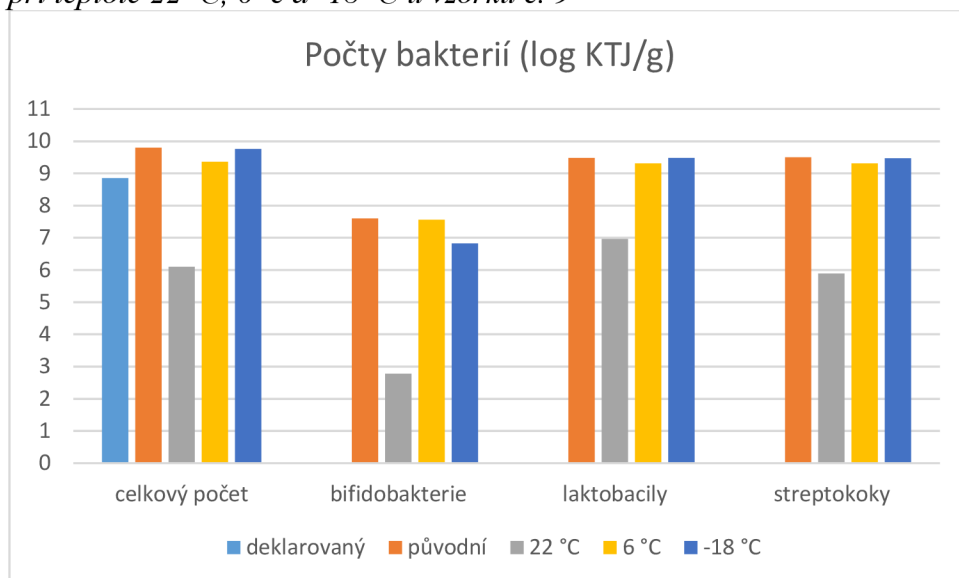
Graf 7: Porovnání deklarovaného množství výrobcem a zjištěného množství při teplotě 22 °C, 6 °C a -18 °C u vzorku č. 7



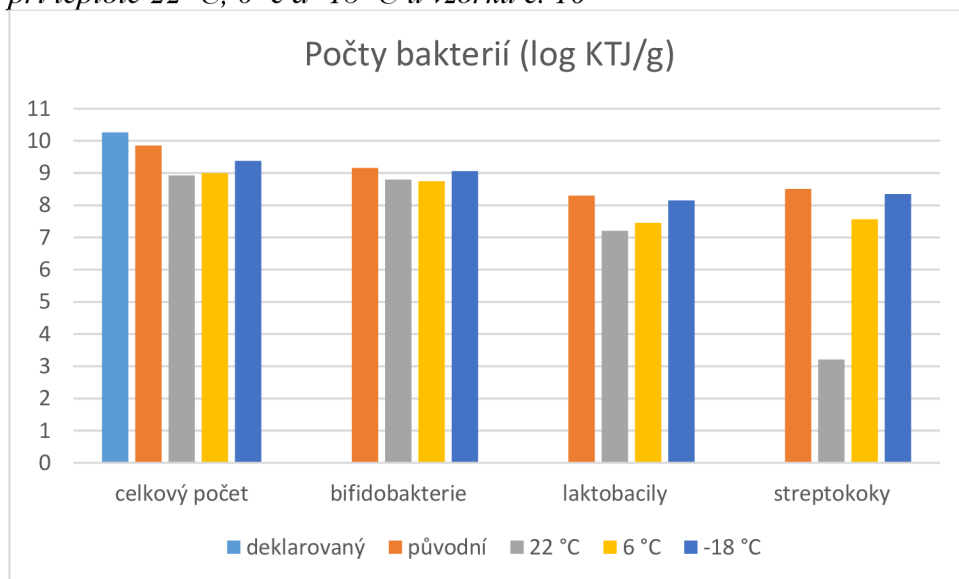
Graf 8: Porovnání deklarovaného množství výrobcem a zjištěného množství při teplotě 22 °C, 6 °C a -18 °C u vzorku č. 8



Graf 9: Porovnání deklarovaného množství výrobcem a zjištěného množství při teplotě 22 °C, 6 °C a -18 °C u vzorku č. 9



Graf 10: Porovnání deklarovaného množství výrobcem a zjištěného množství při teplotě 22 °C, 6 °C a -18 °C u vzorku č. 10



6 Diskuze

Tato diplomová práce se zabývá kvantifikací jednotlivých rodů mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy určených pro lidskou výživu a ověření jejich deklarovaného počtu, přičemž polovina testovaných vzorků nesplňovala deklarované množství dané výrobcem.

V důsledku toho nabývá na významu stanovení spolehlivých mikrobiologických metod pro zajištění a ověření přítomnosti určitého počtu životaschopných mikroorganismů v probiotických produktech. Aby bylo zajištěno dostatečné množství životaschopných buněk, je třeba aby dozorové orgány hlídali a ověřovali životaschopnost mikroorganismů v rámci určité doby skladovatelnosti v jednotkách tvořících kolonie (CFU) (Wendel 2022).

V práci je dále zhodnocen vliv skladovací teploty na životaschopnost mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy. Bylo prokázáno, že skladování při nižší teplotě může vést ke zvýšení počtu životaschopných bakterií oproti skladování při pokojové teplotě, a proto nízkoteplotní skladování je jedna z možností, kterou lze zvýšit kvalitu probiotika.

Je velmi důležité, aby doplňky stravy s probiotiky obsahovaly deklarovaný počet bakterií (více než 6 log CFU/g) až do konce doby skladování. Je mnoho faktorů, které mohou ovlivnit životaschopnost probiotik, jako je kyselost, kyslíkový stres, teplota při skladování, složení kultur, osmotický tlak, obsah vlhkosti atd. Tato diplomová práce je zaměřena na vliv teploty při skladování probiotik a jak uvádí celá řada studií, nízké teploty skutečně umožňují lepší zachování životaschopnosti probiotik po delší dobu skladování.

Khalf et al. (2010) pomocí deskové kultivační metody prokázali, že javorová míza byla schopna udržet přežití kombinace probiotik (BB12 a *L. rhamnosus* GG, každé inokulované v množství ~10⁸ CFU/ml) po celou dobu skladování v chladu při 4 °C.

Jak popsali Kemsawasd et al. (2016) ve své studii, po 60 dnech skladování při 4 °C zůstala míra přežití probiotik (*L. casei* a *L. acidophilus*) v chlazené čokoládě poměrně vysoká, a to více než 6 log CFU/g.

Mortazavian et al. (2007) sledovali vliv teploty skladování v chladu (při 2, 5 a 8 °C) na životaschopnost probiotik (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12) v jogurtu. V rámci této studie byla po 20 dnech skladování při teplotě 2 °C zjištěna nejvyšší životaschopnost *L. acidophilus*, zatímco u *B. lactis* byla nejvyšší životaschopnost dosažena při skladování jogurtu při teplotě 8 °C. Ačkoli jsou bifidobakterie oproti laktobacilům méně tolerantní k nízkým teplotám, nízké teploty skladování obecně podporují přežívání probiotik (Lourens-Hattinga Viljoen, 2001).

7 Závěr

- Probiotika mohou sloužit jako vhodný podpůrný prostředek při léčbě řady onemocnění. Nejsou ale všespásná. Důležité je i dodržování zdravého životního stylu a zásad racionálního stravování. Strava by měla být pestrá a bohatá na živiny, které mohou sloužit jako substrát pro bakterie v tlustém střevě.
- Při výběru doplňku stravy s probiotiky by měli spotřebitelé klást důraz na kvalitu produktu, protože polovina testovaných probiotických doplňků stravy v této práci nesplňovala deklarované množství výrobcem.
- Během skladování probiotik dochází k poklesu životaschopnosti mikroorganismů. Bylo zjištěno, že teplota skladování významně ovlivňuje životaschopnost mikroorganismů, proto při dlouhodobém skladování probiotik lze doporučit nízkoteplotní skladování v lednici nebo v mrazáku.

8 Literatura

Calinoiu, Lavinia Florina; Vodnar, Dan A Precup, Gabriela. A Review: The Probiotic Bacteria Viability under Different Conditions. DOI: 10.15835/buasvmcn-fst:12448

Damini K, Seema P, Soo-Ki K. 2019. Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 111, Pages 537-547, ISSN 0753-3322

Dempsey E, Corr S. 2022. *Lactobacillus* spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. DOI: 10.3389/fimmu.2022.840245

Fontana L; Bermudez-brito M; Plaza-diaz J; Muñoz-Quezada S, Gil A. 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*. DOI: 10.1017/S0007114512004011

Han L. 2022. Effects of probiotics on lactose intolerance. School of Biological Sciences, Faculty of Science, the University of Hong Kong

Huang J, Zhang J, Wang X, Jin Z, Zhang P. 2022. Effect of Probiotics on Respiratory Tract Allergic Disease and Gut Microbiota. DOI: 10.3389/fnut.2022.821900

Choudhary P, Kathuria D, Suri S Bahndral A, Kanthi Naveen A. 2023. Probiotics- its functions and influence on the ageing process: A comprehensive review. DOI: 10.1016/j.fbio.2023.102389

Ibrahim S, Yeboah P, Ayivi R, Eddin A, Wijemanna N.2023. A review and comparative perspective on health benefits of probiotic and fermented foods. DOI: 10.1111/ijfs.16619

Jiang J, Wu C, Zhang C, Zhao J, Yu L. 2020. Effects of probiotic supplementation on cardiovascular risk factors in hypercholesterolemia: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trial. DOI: 10.1016/j.jff.2020.104177

Kaźmierczak-Siedlecka K, Roviello G, Catalano M A Polom K. 2021. Gut Microbiota Modulation in the Context of Immune-Related Aspects of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. in Gastrointestinal Cancers. DOI: 10.3390/nu13082674

Kothari D, Patel S, Kim S. 2019. Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.104

Latif A, Shehzad A, Niazi S, Zahid A, Ashraf W. 2023. Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries. Online. *Frontiers in Microbiology*. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1216674

- Leis R, De Castro M, De Lamas C, Picáns R, Couce M. 2020. Effects of Prebiotic and Probiotic Supplementation on Lactase Deficiency and Lactose Intolerance: A Systematic Review of Controlled Trials. DOI: 10.3390/nu12051487
- Liang B, Xing D. 2023. The Current And Future Perspectives Of Postbiotics. Doi: 10.1007/s12602-023-10045-x
- Luo C, Peng S, Li M, Ao X, Liu Z. 2022. The Efficacy And Safety Of Probiotics For Allergic Rhinitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. DOI: 10.3389/fimmu.2022.848279
- Martyniak A, Medyńska-Przęczek A, Wędrychowicz A, Skoczeń S, Tomasik P. 2021. Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, Paraprobiotics and Postbiotic Compounds in IBD. DOI: 10.3390/biom11121903
- Mato E, Montaña-Barrientos B, Rivas-Mundiña B, Aneiros I, López L. 2023. Anti-caries *Streptococcus* spp: A potential preventive tool for special needs patients. DOI: 10.1111/scd.12920
- Nakilcioğlu E, Nurko E. 2023. Gıda endüstrisinde simbiyotikler, postbiyotikler ve paraprobiyotikler. DOI: 10.15237/gida.GD22089
- Nataraj B, Ali S; Behare P, A Yadav H. Postbiotics-Parabiotics: The New Horizons In microbial biotherapy and functional foods. DOI: 10.1186/s12934-020-01426-w
- Nguyen M; Ferge K; Vaughn A; Burney W; Teng L. 2020. Probiotic Supplementation and Food Intake and Knowledge Among Patients and Consumers. DOI: 10.1007/s12602-019-09602-0
- Ogunrinola G, Oyewale J, Oshamika O, Olasehinde G. 2020. The Human Microbiome and Its Impacts on Health. DOI: 10.1155/2020/8045646
- Rea K, Dinan T, Cryan J. 2020. Gut Microbiota: A Perspective For Psychiatrists. Doi: 10.1159/000504495
- Roux E, Nicolas A, Valence F, Siekaniec G, Chuat V. 2022. The genomic basis of the *Streptococcus thermophilus* health-promoting properties. DOI: 10.1111/scd.12920
- Sabahi S, Homayouni Rad A, Aghebati-Maleki L, Sangtarash N, Ozma M. Postbiotics as the new frontier in food and pharmaceutical research. DOI: 10.1080/10408398.2022.2056727
- Sanders M, Merenstein D, Merrifield C, Hutkins R. 2018. Probiotics for human use. DOI: 10.1111/nbu.12334

- Schippa, Serena A Conte, Maria. Dysbiotic Events In Gut Microbiota: Impact On Human Health. DOI: 10.3390/nu6125786
- Sivamaruthi B, Bharathi M, Kesika P, Suganthy N, Chaiyasut C. 2021. The Administration of Probiotics against Hypercholesterolemia: A Systematic Review. DOI: 10.3390/app11156913
- Stavropoulou E, Bezirtzoglou E. 2020. Probiotics In Medicine: A Long Debate. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02192
- Susanti I, Haryo Bimo Setiarto R., Kahfi J, Giarni R, Muhamaludin. 2023. The Mechanism of Probiotics in Preventing the Risk of Hypercholesterolemia. DOI: 10.7831/ras.11.0_156
- Swanson K, Gibson G; Hutkins R; Reimer R, Reid G. 2020. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. DOI: 10.1038/s41575-020-0344-2
- Tridip K, Shrabani P, Sudipta C, Keshab C, Kuntal G. 2022. Current status of probiotic and related health benefits, Applied Food Research, Volume 2, Issue 2, 100185, ISSN 2772-5022
- Vytlačilová L. 2022. Ověření deklarovaných počtů bakterií v probiotických preparátech určených pro lidskou výživu. (Diplomová práce) ČZU v Praze. Praha
- Wendel, Ulrika. 2022. Assessing Viability And Stress Tolerance Of Probiotics—A Review. DOI: 10.3389/fmicb.2021.818468
- Wieërs G, Belkhir L, Enaud R, Leclercq S, Philippart De Foy J. 2020 How Probiotics Affect the Microbiota. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00454
- Yadav M, Kumari I; Singh B; Sharma K, Tiwari S. 2022. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. DOI: 10.1007/s00253-021-11646-8
- You S, Ma Y, Yan B; Pei W; Wu Q. 2022. The Promotion Mechanism Of Prebiotics For Probiotics. DOI: 10.3389/Fnut.2022.1000517

9 Samostatné přílohy

9.1 Probiotika skladovaná při pokojové teplotě (22 °C):

Vzorek	Hmotnost dávky	Celkové počty	Bifidobakterie	Laktobacily	Streptokoky
1	0,30	$1,856 \times 10^9$	-	$1,4 \times 10^9$	-
2	0,17	$2,144 \times 10^8$	$2,595 \times 10^7$	$3,495 \times 10^7$	$0,9189 \times 10^9$
3	0,45	$1,315 \times 10^9$	$9,091 \times 10^5$	$1,182 \times 10^8$	$1,405 \times 10^7$
4	0,50	$3,261 \times 10^9$	$2,288 \times 10^8$	$1,164 \times 10^9$	$1,909 \times 10^9$
5	0,57	$1,4 \times 10^8$	$2,559 \times 10^4$	$9,091 \times 10^6$	$1,802 \times 10^8$
6	0,54	$8,649 \times 10^7$	$2,577 \times 10^4$	$1,225 \times 10^8$	$3,297 \times 10^7$
7	0,43	ND	ND	ND	-
8	0,25	$6,545 \times 10^7$	$4,182 \times 10^6$	$2,162 \times 10^7$	6×10^6 (1 ředění)
9	0,58	$1,261 \times 10^6$	6×10^2	$7,273 \times 10^5$	$7,818 \times 10^5$
10	0,48	$8,364 \times 10^8$	$6,126 \times 10^8$	$1,6 \times 10^7$	$1,622 \times 10^3$

9.2 Probiotika skladovaná v chladničce (6°C):

Vzorek	Hmotnost dávky	Celkové počty	Bifidobakterie	Laktobacily	Streptokoky
1	0,27	$1,6 \times 10^9$	-	$1,243 \times 10^9$	-
2	0,15	$1,135 \times 10^9$	$2,273 \times 10^8$	$3,514 \times 10^8$	$3,694 \times 10^8$
3	0,37	2×10^9	$1,441 \times 10^8$	$1,676 \times 10^8$	$2,291 \times 10^8$
4	0,52	$2,793 \times 10^9$	$8,108 \times 10^8$	$1,045 \times 10^9$	$1,928 \times 10^9$
5	0,53	$1,856 \times 10^8$	$3,639 \times 10^4$	$8,649 \times 10^7$	$1,568 \times 10^8$
6	0,50	$1,327 \times 10^{10}$	$2,288 \times 10^8$	$8,182 \times 10^9$	$5,273 \times 10^9$
7	0,64	$5,586 \times 10^7$	$2,4 \times 10^5$ (jedno ředění)	$1,549 \times 10^6$	-
8	0,25	$5,225 \times 10^8$	$2,396 \times 10^7$	$1,291 \times 10^8$	$1,127 \times 10^8$
9	0,58	$2,288 \times 10^9$	$3,658 \times 10^7$	$2,036 \times 10^9$	$2,036 \times 10^9$
10	0,49	10×10^8	$5,454 \times 10^8$	$2,818 \times 10^7$	$3,604 \times 10^7$

9.3 Probiotika skladovaná v mrazáku (-18°C):

Vzorek	Hmotnost dávky	Celkové počty	Bifidobakterie	Laktobacily	Streptokoky
1	0,32	$3,636 \times 10^9$	-	$2,509 \times 10^9$	-
2	0,16	$1,545 \times 10^9$	$1,694 \times 10^8$	$4,545 \times 10^8$	$7,748 \times 10^8$
3	0,41	$1,8 \times 10^{10}$	$1,405 \times 10^8$	$7,568 \times 10^7$	$1,622 \times 10^8$
4	0,49	$2,036 \times 10^{10}$	$2,937 \times 10^9$	$9,818 \times 10^9$	$1,802 \times 10^9$
5	0,56	$2,342 \times 10^8$	$2,545 \times 10^5$	$1,045 \times 10^8$	$1,946 \times 10^8$
6	0,52	$1,345 \times 10^{10}$	$2,667 \times 10^8$	$1,2 \times 10^{10}$	$9,455 \times 10^9$
7	0,42	$1,207 \times 10^8$	$1,4 \times 10^6$	$7,818 \times 10^6$	-
8	0,23	$9,273 \times 10^8$	$9,369 \times 10^7$	$3,784 \times 10^8$	$2,108 \times 10^8$
9	0,58	$5,818 \times 10^9$	$6,727 \times 10^6$	$3,0171 \times 10^9$	$2,982 \times 10^9$
10	0,47	$2,378 \times 10^9$	$1,802 \times 10^9$	$1,405 \times 10^8$	$2,216 \times 10^8$