



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# TVORBA BIOFILMU U PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ A JEJICH ZPRACOVÁNÍ DO PEVNÉ LÉKOVÉ FORMY.

FORMATION OF BIOFILM BY PROBIOTIC BACTERIA AND ITS PROCESSING TO SOLID DRUG FORM.

## DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Marie Grossová

## ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2016



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

## Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	<b>FCH-DIZ0001/2016</b>	Akademický rok: <b>2016/2017</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Ing. Marie Grossová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (P2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901V021)	
Vedoucí práce	<b>prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.</b>	
Konzultanti:		

### Název dizertační práce:

Tvorba biofilmu u probiotických bakterií a jejich zpracování do pevné lékové formy.

### Zadání dizertační práce:

V rámci předložené práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) studium schopnosti probiotických bakteriálních buněk rodů Bifidobacterium a Lactobacillus tvořit biofilm na vybraných typech nosičů (př. polymerních, minerálních, komplexních potravinových matricích)
- 2) srovnání vybraných sušících technik (lyofilizace, fluidní sušení) pro uchovávání biofilmových kultur
- 3) technologické zpracování probiotických kultur, jejich primární balení a hodnocení dlouhodobé stability.

### Termín odevzdání dizertační práce: 30.9.2016

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

-----  
Ing. Marie Grossová  
Student(ka)

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

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

V Brně, dne 1.9.2015

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



## ABSTRAKT

Cílem práce je kultivace probiotických bakterií *L. acidophilus*, *B. breve* a *B. longum* tak, aby kultura vytvářela shluky buněk nebo souvislý biofilm na různých typech volných nosičů. Tvorba biofilmu *L. acidophilus* na oxidu křemičitém byla následně studována z hlediska vyšší odolnost vůči nízkému pH a koncentraci žlučových solí v zažívacím traktu. Zatímco počet živých buněk u planktonické formy při pH 1 klesl o 30 %, života schopnost biofilmových buněk se udržela za stejných podmínek na 90 %. V případě působení žluči byla také sledována protektivní ochrana biofilmu před škodlivým prostředím žlučových solí.

Dále byly studovány možnosti sušení tekutých biofilmových kultur komerčně užívanými technologiemi ve farmaceutickém průmyslu. Srovnání lyofilizace a fluidního sušení ukázalo, že lyofilizace je v závislosti na výběru vhodného kryoprotektivního média vhodnější sušící technikou zachovávající nejvyšší počty životaschopných buněk a ve srovnání s fluidním sušením byla získána o přibližně 90 % vyšší životaschopnost probiotických buněk.

Závěrem bylo studováno velkoobjemové zpracování probiotických kmenů do pevné lékové formy. Tablety je vhodné vyrábět při pevnosti 70 - 90 N, přičemž vodní aktivita tabletoviny může být udržována pod 0,3. Následně musí být zajištěno sušení tablet v hermeticky uzavřeném prostoru s minimálně 10 % silikagelu, pak tablety i po 6 měsíčním skladování obsahují  $(5,4 \pm 0,7) \cdot 10^9$  životaschopných buněk. Technologie výroby kapslí nemá výrazný vliv na počty živých buněk během výroby. Pro následné primární balení byla vybrána triplexová blistrovací fólie, která má nízké hodnoty propustnosti vodní páry ( $0,07 \text{ g H}_2\text{O} / (\text{m}^2 \times \text{den})$ ) a kyslíku ( $0,01 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \times \text{den}$ ). Blistrovací folie běžně užívané ve farmaceutickém průmyslu nejsou pro skladování probiotik vhodné.

## ABSTRACT

The aim of present work is cultivation of probiotic bacteria *L. acidophilus*, *B. breve* and *B. longum* in such a way that the culture forms cells clusters or comprehensive biofilm on the variety of free carriers. Biofilm formation of *L. acidophilus* on the silica from point of view bile and acid tolerance in gastrointestinal tract was studied. While the number of living cells in planktonic form (planktonic form) at pH 1 fell by 30 %, the viability of the biofilm cells was maintained to 90 % under the same environmental conditions. The biofilm culture showed also the protection against environment contained bile.

Furthermore, the possibilities of drying procedures of biofilm cultures used as commercial technologies in pharmaceutical industry were studied. The comparison of freeze-drying and fluidization bed drying showed, that freeze-drying is more suitable method, which is able to achieve higher amount of viable cells after drying than fluidization bed drying. The effectivity of freeze-drying method is dependent on the selection of suitable cryoprotective medium. In this case, about 90 % higher viability after freeze drying was achieved in comparison with fluidization bed drying.

Finally, the industrial processing of probiotic strains into the solid dosage form was studied. Tablets should be produced at hardness between 70 and 90 N and water activity of tablet mixture can be maintained below 0.3. Consequently, the drying step of the tablets in a hermetically closed space with at least 10 % of silica gel must be ensured. Thereafter, the tablets contain  $(5.4 \pm 0.7) \cdot 10^9$  viable cells after 6 months of drying process. Capsule production technology has no significant effect on the cell's viability during production. The triplex blistering foil for primary blistering of probiotic capsules was chosen. The triplex foil, which has low values of water vapour transition rate ( $0.07 \text{ g H}_2\text{O} / (\text{m}^2 \times \text{day})$ ) and oxygen transition rate ( $0.01 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \times \text{day}$ ), was chosen. Other studied blistering foils commonly used in the pharmaceutical industry are not suitable for long storage of solid dosage forms contained probiotics.

#### KLÍČOVÁ SLOVA

Probiotika, biofilm, nosič, tolerance ke kyselému prostředí, tolerance ke žlučovým solím, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, vodní aktivita, pevná léková forma, stabilita při skladování

#### KEYWORDS

Probiotics, biofilm, carrier, bile tolerance, acid tolerance, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, water activity, solid dosage form, storage stability

GROSSOVÁ, M. Tvorba biofilmu u probiotických bakterií a jejich zpracování do pevné lékové formy. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 100 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....

podpis studenta

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Pavlové, Ph.D. za cenné rady a finanční podporu mé dizertační práce. Mé poděkování patří také prof. RNDr. Ivaně Márové, Csc..

# 1 OBSAH

1	OBSAH .....	6
2	ÚVOD .....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1	Probiotické mikroorganismy zažívacího traktu .....	10
3.1.1	Rod Bifidobacterium .....	12
3.1.2	Rod Lactobacillus.....	14
3.2	Probiotika a jejich interakce s GIT .....	16
3.2.1	Adheze mikrobiálních buněk na sliznici střev .....	17
3.2.2	Tvorba biofilmu.....	20
3.3	Techniky sušení probiotických kmenů .....	21
3.3.1	Lyofilizace.....	22
3.3.2	Fluidní sušení .....	28
3.3.3	Vodní aktivita.....	28
3.4	Zpracování probiotických kmenů do doplňků stravy a jejich sekundární balení .....	30
3.4.1	Tablety.....	32
3.4.2	Tvrdá tobolka .....	34
3.4.3	Vliv kyslíku na skladování pevných lékových forem obsahujících probiotika .	35
4	CÍLE PRÁCE .....	37
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
5.1	Použité chemikálie, materiál a přístroje .....	38
5.1.1	Bakteriální kmeny .....	38
5.1.2	Použité chemikálie pro kultivaci mikroorganismů.....	38
5.1.3	Ostatní chemikálie a suroviny .....	38

5.1.4	Přístroje a zařízení .....	39
5.2	Kultivace probiotické biofilmové kultury .....	40
5.3	Sledování životaschopnosti probiotických biofilmových buněk v simulovaném prostředí zažívacího traktu .....	40
5.3.1	Vliv roztoku kyselých solí na viabilitu biofilmových buněk .....	40
5.3.2	Vliv roztoku žluči na viabilitu biofilmových buněk .....	41
5.4	Zpracování biofilmových probiotických kultur pro farmaceutické účely .....	41
5.4.1	Lyofylizace .....	41
5.4.2	Fluidní sušení .....	42
5.4.3	Srovnání vlivu teploty skladování a vodní aktivity na životaschopnost probiotických buněk .....	42
5.5	Technologie lékových forem .....	43
5.5.1	Výroba probiotických tablet .....	43
5.5.2	Výroba probiotických kapslí .....	46
5.6	Primární balení probiotických přípravků .....	46
5.6.1	Srovnání používaných blistrovacích fólií .....	46
5.7	Statistické zpracování výsledků .....	48
6	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	49
6.1	Kultivace probiotické biofilmové kultury .....	49
6.2	Sledování životaschopnosti probiotických biofilmových buněk v simulovaném prostředí zažívacího traktu .....	53
6.2.1	Vliv roztoku kyselých solí na viabilitu biofilmových buněk .....	54
6.2.2	Vliv extraktu žluči na viabilitu biofilmových buněk .....	56
6.3	Zpracování biofilmových probiotických kultur pro farmaceutické účely .....	57
6.3.1	Srovnání účinnosti lyofilizace a fluidního sušení pro probiotické směsi .....	57
6.3.2	Vliv teploty fluidní sušárny na produkt .....	59

6.3.3	Srovnání vlivu teploty skladování a vodní aktivity na životaschopnost probiotických buněk.....	60
6.4	Technologie lékových forem .....	62
6.4.1	Výroba probiotických tablet.....	62
6.4.2	Výroba probiotických kapslí .....	68
6.5	Primární balení probiotických přípravků.....	69
6.5.1	Srovnání používaných blistrovacích fólií.....	69
7	ZÁVĚRY.....	73
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	76
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	100

## 2 ÚVOD

Užívání probiotických přípravků je široce rozšířený fenomén v populaci. Probiotika jsou doporučována lékaři nejen v době nemoci či při užívání antibiotických přípravků, ale i jako preventivní léčba. Lékárny nabízí nespočetnou řadu probiotických přípravků v různých pevných lékových formách, v různých baleních, od různých výrobců, s různých počtům probiotických buněk, ale bohužel i s různou kvalitou.

Ačkoliv jsou probiotické přípravky řazeny do kategorie doplňků stravy a Evropská společnost EFSA neschválila zdravotní tvrzení na probiotické přípravky pro nedostatek vědeckých průkazů, v populaci jsou probiotika velice dobře známá a široce užívaná. Běžný uživatel ale často bohužel nepozná kvalitu zakoupeného přípravku, která je pro terapeutický efekt klíčovým faktorem.

Právě tento klíčový faktor byl hlavním impulsem pro spuštění vývoje probiotických přípravků, které po celou dobu expirace vyhovují parametrům deklarovaným výrobcem na obalu výrobku. Proto následná práce je zaměřena na sledování hlavních paramterů ovlivňujících skladování – vodní aktivita a teplota skladování, a dále pak primární balení pevných lékových forem, které musí zajistit udržení zvolých parametrů po celou dobu skladování.

Probiotické přípravky ale nejsou ovlivňovány pouze technologickým nakládáním a skladování. Další zásah do jejich životaschopnosti přichází s jejich průchodem skrz zažívací trakt uživatele. Nízké pH žaludku a vliv žlučových kyselin v tenkém střevě významně snižují životaschopnost probiotik. Proto započala práce na vývoji inovativních přípravků s obsahem biofilmových probiotik. V rámci tohoto studia byly přejaty poznatky a znalosti chování patogenních a komenzálních mikroorganismů. Tyto organismy vytváří biofilm, který chrání mikroorganismy v něm inkorporované před nepříznivými podmínkami životního prostředí.

Kombinace zvýšení odolnosti probiotik při jejich kultivaci v biofilmu a zajištění skladovacích podmínek pro udržení vysokého počtu životaschopných buněk vede k vývoji specifického doplňku stravy a uživatelům tak přináší jistou míru terapeutického efektu.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Probiotické mikroorganismy zažívacího traktu

Probiotikum je odvozeno z latinského a řeckého slova *pro* (= příznivý) a řeckého slova *bios* (= život). První koncept probiotik v podobě popisu a přisouzení zdravotního benefitu u bulharských pastevců byl zapsán již v roce 1907 ruským držitelem Nobelovy ceny Mečnikovem (1, 2). Ale až Lilly a Stillwell v roce 1965 poprvé použili pojem probiotikum pro popis substancí produkovaných mikroorganismem pro stimulaci růstu hostitelského organismu (3). Poté si až v roce 2001 uvědomila Světová zdravotnická organizace (WHO) absenci jakékoliv regulace a na svém kongresu v argentinské Cordobě uvedla definici probiotika. Probiotikum je tedy živý organismus, který, je-li dodáván v dostatečných množstvích, má blahodárné účinky na organismus příjemce (4).

Probiotika se vyskytují zejména v zažívacím traktu savců. Při narození jedince je jeho gastrointestinální trakt (GIT) sterilní. Osídlení GIT začíná až při porodu (přenos mikroorganismů během porodu z vagíny, konečníku, okolního prostředí a následným kojením jedince). Během života jedince jeho gastrointestinální trakt obývá  $10^{11}$  až  $10^{14}$  mikroorganismů patřících do skupiny až 1000 různých druhů (5–8). Nejvíce zastoupené bakterie u dospělého jedince jsou nesporeující anaerobní bakterie patřící zejména do tříd: *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Fusobacterium* spp. a různé grampozitivní koky (5, 7). Složení mikrobiální flóry se během života jedince přirozeně mění. Změnu složení způsobují i onemocnění nebo civilizační choroby. Studie (9) například odhalila, že děti trpící alergiemi mají jiné složení střevní mikroflóry oproti zdravým dětem. Děti trpící alergiemi mají vyšší koncentraci klostridií a nižší koncentraci bifidobakterií (9).

Tato mikrobiální flóra vykazuje biologickou aktivitu, kterou lze dělit do dvou velkých kategorií: (i) prospěšná nebo (ii) potenciálně patogenní (10). Rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* jsou obecně řazeny do kategorie prospěšných mikroorganismů vykazujících zejména imunostimulační efekt (8, 11–14), zvyšují obranou funkci sliznice při příjmu patogenů (15), zlepšují zažívání a absorpci (3, 8), syntetizují metabolity nezbytné pro jedince - vitamíny (8, 14), redukují hladinu cholesterolu (8, 16), snižují tvorbu plynů (1, 5), působí jako prevence proti rakovině (17) a vzniku alergií (9) a zejména inhibují růst potenciálně patogenních mikroorganismů (3, 8, 14). Mechanismus inhibice růstu patogenů je zabezpečen (i) modifikací podmínek prostředí, (ii) soutěživostí o mikronutrienty a adhezni místa, (iii)



produkcí antimikrobiálních metabolitů a (iv) modulací imunitní a neimunitní obranné odpovědi hostitelského organismu. Součástí obranných mechanismů je produkce bioaktivních látek zahrnujících frakce buněčné stěny, povrchové proteiny, nukleové kyseliny, organické a krátkořetězcové mastné kyseliny, antimikrobiální proteiny a další látky (18, 19).

Mezi další schopnosti bakterií mléčného kvašení, jež byly publikovány pouze na základě *in vitro* testů, se řadí vaznost a odstraňování cytotoxinů, těžkých kovů a mykotoxinů z vodných roztoků. Tato vlastnost je závislá na kmenu a druhu probiotické bakterie (20). Ačkoliv mikrobiální kolonizace gastrointestinálního traktu není esenciální pro život, je nezbytná pro zdravý růst a vývoj jedince (5).

Mikrobiální flóra zdravého jedince se postupně mění od dutiny ústní do útrobu zažívacího traktu. Zatímco v dutině ústní převažují aerobní nad anaerobními mikroorganismy, při postupu trávicím traktem se tento poměr obrací. Anaeroby a aeroby žijí ve vzájemné symbióze, zatímco aeroby spotřebovávají přítomný kyslík při oxidační fosforylaci (zejména *Escherichia coli*), anaeroby s výhodou využívají bezkyslíkové prostředí pro svůj růst, protože jejich buňka není zatížena neobdouratelnými kyslíkovými radikály díky nepřítomnosti enzymů katalázy a superoxididismutázy, aj (21, 22).

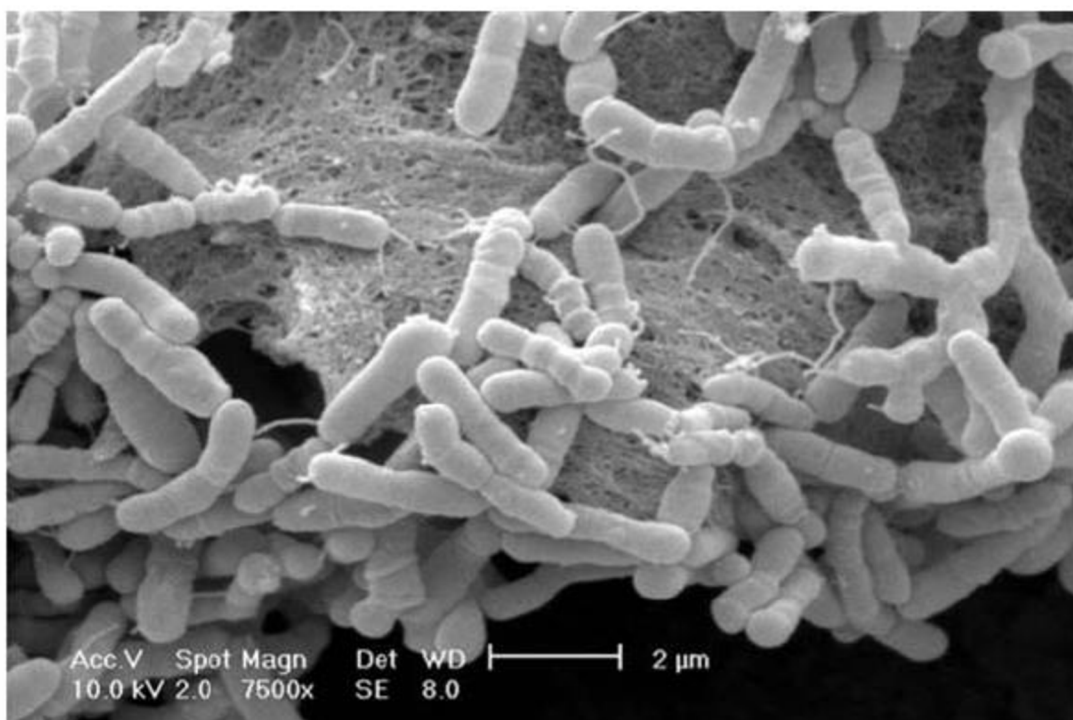
Střevní mikroflóra hraje významnou roli v trávení nutrientů a zisku energie z přijímané potravy. Například bakterie tlustého střeva produkují enzymy, které napomáhají při štěpení komplexních molekul (rostlinné polysacharidy). Fermentace výživových komponent, které nejsou štěpeny a absorbovány v tenkém střevě, a endogenních produktů (mucin) vedou k produkci organických kyselin, větvených mastných kyselin, vodíku, oxidu uhličitého, aminů a několika dalších produktů (21, 22). Tyto produkty ovlivňují prostředí zažívacího traktu a zdraví hostujícího organismu, působí jako zdroj energie, regulátory genové exprese a buněčné diference a protizánětlivé markery. Interakce hostitele a mikroorganismu je tedy esenciální pro resistenci vůči patogenním mikroorganismům, vývoj střevní mikroflóry a epiteliální homeostázu (21). Zajímavostí je fermentace, při níž vznikají krátkořetězcové mastné kyseliny, které jsou zdrojem energie pro enterocyty. Některé současné experimenty ukazují, že tato fermentace je tak výkonná, že může docházet k akumulaci tuků a následné obezitě (23).

### 3.1.1 Rod *Bifidobacterium*

#### 3.1.1.1 *Popis a fyziologie*

První bifidobakterie byly izolovány již kolem roku 1900 francouzským mikrobiologem Tissierem z dětské stolice. Izolovaný kmen byl pojmenován jako *Bacillus bifidus* (6). V roce 1924 navrhl mikrobiolog Orla-Jensen označení pro tento kmen *Bifidobacterium*, který byl v roce 1958 vyčleněn jako genus *Bifidobacterium* (24).

Bifidobakterie se řadí mezi gram-pozitivní, anaerobní, nepohyblivé a nesporulující tyčinky obvykle ve tvaru písmene „Y“ nebo „V“ vyskytující se samostatně, v řetězcích nebo shlucích (7). Morfologická struktura *Bifidobacterium infantis* je znázorněna na obrázku (Obrázek 1). Bifidobakterie se řadí mezi striktní anaeroby (25, 26), ačkoliv některé kmeny jsou tolerantní ke kyslíku za současné přítomnosti oxidu uhličitého (8). Jako zdroj uhlíky využívají organické látky a počítají se tak mezi heterotrofní organismy (27).



Obrázek 1: Buněčná morfologie *B. infantis* (skenovací elektronový mikroskop) (27)

Specifickým a rovněž i třídícím znakem bifidobakterií je jejich heterofermentativní metabolismus (6, 28). Genom bifidobakterií neobsahuje geny pro enzymy zapojené do glykolýzy (aldolázu a glukosa-6-fosfát oxidoreduktázu), glukoneogenezi a hexosofosfátovou dráhu (29, 30), ale produkuje enzym fruktosa-6-fosfát fosfoketolázu (E.C. 4.1.2.22). Tento

enzym je esenciální a zodpovědný za přeměnu glukosy na acetát a L-laktát (31). Vedle hlavních produktů vznikají i další vedlejší produkty substrátové fosforylace, jako je formiát nebo ethanol (32).

Dle teoretického přepočtu výtěžku dráhy vznikne z 1 molu glukosy 1,5 molu acetátu, 1 mol L-laktátu a 2,5 molu ATP (30). Teoretický poměr je ale závislý na (i) produkčním kmenu (33), (ii) fázi buněčného růstu kultury, (iii) složení kultivačního média (29) a (iv) na specifické rychlosti utilizace substrátu neboli na dostupném zdroji uhlíku. Tedy v případě navyšování rychlosti fermentace (kultivace např. na glukose) produktem metabolismu je vyšší podíl kyseliny mléčné, ale snižuje se množství acetátu, formiátu a ethanolu. V případě růstu kultury na fruktooligosacharidech dochází ke zpomalení rychlosti utilizace substrátu, vzniká zejména ethanol a buňka získává energii reoxidací NADH na NAD (32).

Sacharolytické enzymy bifidobakterií jsou schopné využít zejména glukosu, galaktosu, xylulosu a fruktosu (34), ale fermentují i celou řadu komplexních sacharidů s různým stupněm polymerace, jako jsou například fruktooligosacharidy nebo xylooligosacharidy (35).

Bifidobakterie jsou schopny syntetizovat „*de novo*“ celou řadu biologicky významných látek – vitamíny skupiny B (kyselinu listovou, niacin, thiamin, riboflavin, pyridoxin, biotin nebo kobalamin a vitamin K (36–38), nízkokalorické cukry nebo exopolysacharidy (39).

### **3.1.1.2 Antimikrobiální aktivita bifidobakterií**

Jak už bylo zmíněno, probiotické přípravky dokáží inhibovat růst potenciálně patogenních mikroorganismů. Hlavním mechanismem, který využívají obecně bakterie mléčného kvašení, je produkce organických kyselin. Přítomnost těchto kyselin způsobí pokles pH okolního prostředí, které má bakteriocidní účinky vůči G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup> bakteriím i patogenům (40, 41). Naproti tomu jsou samotná probiotika schopna přežít i při pH 3,5 (6).

Dalším mechanismem antimikrobiální aktivity je schopnost bifidobakterií přeměňovat na povrchu buněčné stěny trojmocné železo na jeho dvojmocný kationt, který je ihned transportován pomocí bivalentní permeázy do buňky. Obecně je dvojmocná forma železa nezbytná pro růst a proliferaci buněk. Výše popsaný systém tedy zvýhodňuje právě bifidobakterie v prostředí s nízkým obsahem dvojmocného železa (34).

Třetím a neméně významným bakteriocidním mechanismem je produkce bakteriocinů. Jedná se o ribozomálně syntetizované polypeptidy (38, 42, 43) mající obecně inhibiční vlastnosti vůči G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup> bakteriím. Mechanismus účinku bakteriocinu bifidocinu B je veden přes vazbu

na lipoteichoovou kyselinu buněčné stěny G<sup>+</sup> bakterií pomocí specifických nebo letálních receptorů. Navázáním polypeptidového řetězce následně započne produkce molekul vedoucích k buněčné smrti, v některých případech spojené s lýzou buňky (42, 44, 45).

Bakteriociny jsou obecně děleny do dvou tříd: (i) peptidy podléhající posttranslační modifikaci, kde patří zejména lanthibiotika (nisin produkovaný *B. longum* DJO10A) (46) a (ii) nemodifikované peptidy, mezi něž patří např. bifidocin B produkovaný *B. bifidum* NCFB 1454 (46, 47).

### 3.1.2 Rod *Lactobacillus*

#### 3.1.2.1 *Popis a fyziologie*

Laktobacily jsou ubikvitární organismy rozšířené zejména v prostředí bohatém na sacharidy, nejvíce pak ve fermentovaných potravinách a sliznicích gastrointestinálního traktu člověka a zvířat (15).

Psychrofilní, nesporulující, nepohyblivé tyčinky jsou na svých koncích zaoblené. Ve volném prostředí vegetují samostatně, v párech nebo v krátkých řetězcích (48). Patří mezi Gram-pozitivní bakterie. Řadí se mezi chemoorganotrofní organismy, které vyžadují složitá růstová média. Jejich poměr obsahu guaninu a cytosinu v genomu odpovídá rozmezí od 32 do 51 procent mol (49). Ačkoliv většina druhů je aerotolerantních, optimální růst je docílen za anaerobních či mikroaerofilních podmínek a zvyšující se koncentrace oxidu uhličitého stimuluje růst (5%) (50). Laktobacily neobsahují enzym katalázu (51).

Na základě majoritních produktů fermentace sacharidů se dělí na homofermentativní a heterofermentativní producenty. Zatímco homofermentativní kmeny produkují ze sacharidických zdrojů z 90 % kyselinu mléčnou a neprodukují plyny, heterofermentativní kmeny přeměňují cukr (glukosu) za současné produkce energie na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou a oxid uhličitý (19).

Homofermentativní metabolismus využívá pyruvát, který je výsledkem Embden-Meyerhoff-Parnasova schématu (glykolýza). Vzniklý pyruvát je redukován laktátdehydrogenázou za vzniku kyseliny mléčné a současné regenerace NAD<sup>+</sup> (52).

Heterofermentativní kvašení je založeno na pentosovém katabolismu. Pentosa je transportována přes membránu nebo vzniká dekarboxylací hexosy intracelulárně. Nejdříve je pentosa přeměněna na xylulosa-5-fosfát, který je následně štěpen fosfoketolázou na glyceraldehyd-3-fosfát a dvouuhlíkatou sloučeninu. Ty jsou pak dále konvertovány na

glyceraldehyd, kyselinu octovou a ethanol. Ačkoliv pentosovým cyklem získá buňka pouze 1 molekulu ATP, výhoda vězí v tom, že takto je buňka schopna zpracovat i pentosy (52). V přítomnosti kyslíku nebo dalších oxidačních látek roste podíl kyseliny octové na úkor kyseliny mléčné a ethanolu, což potvrzuje fakt, že vlivy prostředí vysoce ovlivňují složení koncových produktů metabolismu (22). Některé homofermentativní kmeny (*L. viridescens*, *L. curvatus*) produkují peroxid vodíku, který způsobuje oxidaci přírodních barviv (51).

Některé kmeny *Lactobacillus* sp. (*L. plantarum*) se řadí mezi fakultativně heterotrofní producenty. Jejich preference typu metabolismu závisí na zdroji uhlíku v prostředí. Jsou-li sacharidickým zdrojem hexosy, buňka využívá homofermentativní kvašení. V případě pentos přechází buňka na heterofermentativní metabolismus. Při nízké koncentraci hexos v prostředí nevzniká dostatečné množství fruktosa-1,6-bisfosfátu, buňka není schopna aktivovat laktátdehydrogenázu, proto dojde k přestupu na heterofermentativní metabolismus (52).

Laktobacily jsou schopny ve svém metabolismu zpracovávat celou škálu sacharidů. Nejvýznamnějším je disacharid laktosa, který je nejprve štěpen na monosacharidy. Glukosa je aktivována a vstupuje do glykolýzy nebo pentosového cyklu a galaktosa-6-fosfát je odboráván tagatosovou drahou. U některých laktobacillů (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii*) je galaktosa vylučována do média bez fermentace ihned po štěpení laktosy na glukosu a galaktosu. *L. reuteri* a *L. fermentum* využívají jako zdroj uhlíku maltosu. Ta je po aktivaci fosforolyticky štěpena na glukosa-1-fosfát, který je mutázou přeměněn na glukosa-6-fosfát vstupující do pentosového cyklu, a na glukosu, která je vyloučena do okolí. Testy ale nadále prokázaly, že u některých kmenů může docházet k indukci kinázy a následného zapojení molekuly glukosy zpět do metabolismu. Některé kmeny (*L. sanfranciscensis* a *L. pontis*) jsou schopné využívat i fruktosu. Pokud je ale v médiu dostupnější sacharid, je fruktosa v nepřítomnosti kyslíku užívána přednostně jako akceptor elektronů za současného vzniku manitolu. Podobně vzniká i glycerol nebo erythritol (50, 53).

Laktobacily nejlépe rostou při počátečním pH 6,4 – 5,4. Růst je pak pomalu zastaven při pH 3,6 – 4,0 v závislosti na druhu. Samozřejmě existují i výjimky. *L. suebicus*, *L. casei* i *L. plantarum* jsou schopné růstu i při pH 2,8. Některé kmeny jsou pak schopné přežít i při pH 10,0 (50). Pro růst laktobacilů je vyžadována vodní aktivita nad 0,92 (51). Nejvýhodnější teplotou pro růst je rozmezí mezi 30 až 40°C, ačkoliv některé kmeny jsou schopny růst při 15°C nebo i při 5°C. Termofilní kmeny jsou pak schopné růst při 55°C (50).

Laktobacily vykazují velkou diversitu ve složení buněčného povrchu a je o nich obecně známo, že jsou schopny měnit vlastnosti povrchu buňky jako reakci na změnu prostředí. Buněčná stěna probiotických bakterií se obecně skládá z lipidické dvojvrstvy. Tato buněčná stěna je kryta mnohvrstevným peptidoglykanem, na nějž je navázána kyselina teichoová, kyselina lipoteichoová (přispívá k aniontovému charakteru buňky), exopolysacharidy, proteinázové filamenty zvané pilli a proteiny zakotvené v buněčné stěně. Některé druhy laktobacilů vykazují schopnost tvorby parakrystalické struktury obklopující peptidoglykan. Tato vrstva je označována jako S-vrstva (54).

### 3.1.2.2 Antimikrobiální aktivita laktobacilů

Nejvýznamnějším a primárním efektem laktobacilů na patogenní organismy je produkce organických kyselin za současného snížení pH. Tato redukce pH je dále podpořena tvorbou mnoha látek, které jsou produkovány v závislosti na okolním prostředí a genetické výbavě buňky. Jako příklad slouží produkce reuterin-(3-hydroxypropanolu), který je produkován několika zástupci laktobacilů (*L. reuteri*, *L. brevis*) a inhibuje thiolové enzymy, prvoky, houby a bakterie. Kyselina pyroglutamová je produkována například *L. casei* a působí proti *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas* sp. Mezi další sloučeniny patří produkce kyseliny benzoové, methylhydantoinu, mevalonolaktonu, kyseliny fenymléčné nebo derivátů teramové kyseliny (reutericyklin) (50).

Stejně jako bifidobakterie, tak i laktobacily produkují bakteriociny, proteiny mající bakteriocidní a bakteriostatické vlastnosti. Bakteriociny se v podrobnějším pojetí dělí do čtyř skupin: (i) Lanthibiotika, mezi něž patří macedocin produkováný *Streptococcus macedonicus* (55), (ii) malé, teplotně stabilní membránově aktivní nemodifikované peptidy, které zastupují producenti *L. salivarius* (56) a *L. plantarum* (57–59), (iii) velké teplotně labilní proteiny a (iv) komplexní proteiny obsahující lipidovou nebo sacharidickou složku či cyklické proteiny, kde se řadí například acidocin B produkováný *L. acidophilus* (50, 55). Laktobacily jsou jedny z největších producentů bakteriocinů, ale bakteriocidní účinky vyvolávají pouze u Gram-pozitivních bakterií (56).

## 3.2 Probiotika a jejich interakce s GIT

Probiotika obsažená v doplňcích stravy, ve funkčních potravinách nebo mléčných výrobcích nemají pro dosažení místa určení (střevo hostitele) potřebnou aktivitu. Pro získání jejich aktivity a plnění funkce probiotika je nutná jejich adheze na sliznici střeva. Teprve přilnutím buňky na epitel jsou spuštěny procesy kolonizace, simulace imunitního systému a

antagonistické aktivity proti patogenním mikroorganismům (60). Adheze buňky na epitel zajišťuje její dostatečné setrvání v místě určení nezbytné pro její aktivitu a pozitivní vliv na hostitele (61).

Gastrointestinální trakt je osídlen celou řadou bakterií, jejichž mikrobiální aktivita může být prospěšná nebo nikoliv (60). V obou případech je ale klíčem ke spuštění jejich aktivity a dosažení výsledného efektu na organismus hostitele adheze mikroorganismů na epiteliální buňky střeva a vzájemná agregace mezi nimi (60, 62).

### **3.2.1 Adheze mikrobiálních buněk na sliznici střev**

Adheze neboli přilnavost buňky k povrchu je složitým mechanismem, který byl a je v současné době intenzivně studován (63–67). *In vivo* jsou epiteliální buňky intestinálního traktu pokryty vrstvou hlenu. Hlen je z biochemického hlediska komplexní médium bohaté na glykoproteiny (mucin), antimikrobiální peptidy imunoglobuliny a spoustu dalších proteinů, lipidů a elektrolytů. V tlustém střevě je hlen organizován do dvou vrstev: (i) vnější vrstva je volnější a je osídlena střevní mikroflórou a (ii) vnitřní vrstva, která je úzce spojená se sliznicí tlustého střeva a tuto sliznici chrání (68).

Muciny, glykoproteiny majoritně zastoupené v hlenu, jsou bohaté na zbytky serinu a threoninu. Tyto aminokyselinové zbytky nabízí možnost tvorby o-glykosidických vazeb zejména s N-acetylgalaktosaminem a vytváří tak potřebný základ pro vaznost dalších oligosacharidových řetězců, které mohou být prodlouženy dalšími monosacharidy, zejména pak N-acetylglukosaminem, galaktosou, fruktosou a ukončeny kyselinou sialovou. Monosacharidy mohou být dále modifikovány sulfatací. Vzniklá glykanová vrstva tvoří až 80% mucinu a obsahuje vazebná místa pro bakteriální buňky střevní mikroflóry, které se rychle adaptují na podmínky v prostředí hlenu (69). Hlen tvoří nezbytné prostředí pro udržení intestinální homeostázy mezi střevními bakteriemi a zdravím hostitele (70).

Nejjednodušší metoda studia adheze na sliznici je založena na kultivaci sledovaných buněk na komerčně dostupných buňkách sliznice (mukose), které jsou kultivovány na povrchu mikrotitračních destiček (71). Lepším materiálem jsou pak pro studium lidské epiteliální buněčné linie (Caco-2 a HT29-MTX), které lépe vystihují *in vivo* situaci. Caco-2 buňky tvoří homogenní a polarizované linie, které se podobají lidským zralým enterocytům, jejich nedostatečná produkce slizu je však velkou nevýhodou. Buněčné linie HT29-MTX, které diferencují na pohárkové buňky se vyznačující produkcí hlenu (*mucus*). Ve střevním epitelu pak erytrocyty a pohárkové buňky představují dva hlavní buněčné fenotypy a tak pro lepší

porozumění adheze a agregace buněk je vhodné studovat tyto vlastnosti na kombinovaném *in vitro* modelu Caco-2/HT29-MTX buněčných liniích (61).

Adheze buněk není ovlivněna jen možnostmi vazebných míst sliznice a hlenu, velkou měrou se na adhezi podílí povrch adherované buňky a jeho složení (60). Adhesiny jsou zejména látky proteinové povahy neboli specifické proteiny obsažené na povrchu buňky, které jsou zodpovědné za adhezi mikrobiální buňky na sliznici střeva nebo její hlen (69). Adhesiny laktobacilů jsou děleny do skupin na proteiny vážící se na hlen, proteiny S-vrstvy, proteiny zprostředkovávající adhezi ke komponentám extracelulární matrix intestinálních epitelálních buněk a neproteinové adhesiny (54).

Nejsilnější pozici a nezastupitelnou roli v adhezi buňky mají proteiny vážící se na hlen produkovaný pohárkovými buňkami sliznice. V dnešní době je široce reportována schopnost adherence rodu *Lactobacillus* na intestinální sliznici přes proteiny povrchu buňky, které mají schopnost vázat se na hlen sliznice ve střevě (70). Proteiny vážící se na hlen (MUB) jsou kódovány pro laktobacily specifickými clustery kódujícími orthologní proteiny a obsahujícími jednu nebo více opakujících se *Mub* jednotek (54). Nejlépe prostudovaným je MUB izolovaný z druhu *L. reuteri*. MUB jsou multidomenové proteiny, které mají typické vlastnosti povrchových proteinů grampozitivních bakterií – C-terminální rozpoznávací motiv pro kovalentní ukotvení proteinu na peptidoglykan, opakující se sekvence v délce 183-206 aminokyselin (*Mub* opakující se sekvence) a N-terminální koncový signální peptid (72). Studie několika druhů v zastoupení *L. reutheri*, *L. acidophilus* a *L. plantarum* prokázaly, že MUB proteiny jsou zodpovědné za vaznost na hlen a agregaci bakteriálních buněk (73–75), současně ale vysoká diversita mezi jednotlivými druhy vede k druhové specifitě také v případě adheze na hlen střevní sliznice (76). MUB vykazují i vaznost na extracelulární matrix, kde se specificky váží na fibrinogen a laminin (77).

*L. reuteri* byl dále studován na přítomnost motivu LPxTG, který hraje významnou roli v adhezi, jak na MUB, tak i extracelulární matrix (78). Tento motiv byl studován u patogenu *Streptococcus aureus* a slouží jako cílové místo pro enzym sortasu. Tento enzym štěpí peptidovou vazbu mezi threoninem a glycinem nebo v přítomnosti volné aminoskupiny na glycinu katalyzuje transpeptidační reakce, čímž je schopen zabudovávat proteiny do povrchu buňky (79).

Některé laktobacily mají fimbrie (pilli), které byly studovány pro možné zvýšení adheze. Pilli jsou multipodjednotkové polymerní proteiny, které byly popsány pouze u *L. rhamnosus* GG,



ačkoliv byly identifikovány i u jiných laktobacilů (80). Fimbrie jsou složeny z více podjednotek, které jsou navzájem kovalentně vázány. Vznikající isopeptidové vazby jsou tvořeny mezi threoninem LPxTG motivem a lysinem YPKN pillu na jeho podjednotce. U *L. rhamnosus* GG bylo sledováno zvýšení adheze za přítomnosti fimbrií ke glykoproteinům hleny hostujících buněk se současnou kolonizací GIT (81).

Proteiny S-vrstvy jsou speciální skupinou nekovalentně vázaných proteinů, které tvoří ochrannou vrstvu na povrchu určitých kmenů (82). Tyto proteiny obsahují jednu nebo více N-terminálních domén, které se váží na určité molekuly zabudované do peptidoglykanové vrstvy buňky (zejména na kyselinu teichoovou, lipoteichoovou nebo neutrální sacharidy). Volné N a C-terminální konce proteinů S-vrstvy mohou být zodpovědné za vazbu na buněčnou stěnu buňky, zejména na fibronectin a laminin (83). Jiný zdroj však uvádí, že proteiny S-vrstvy nejsou zodpovědné za vazbu na fibronectin (84).

Adheze rodu *Lactobacillus* v GIT může zahrnovat také neproteinové složky buněčné stěny, jako jsou například kyselina lipoteichoová nebo exopolysacharidy (EPS). Kyselina lipoteichoová má aniontový náboj a zajišťuje hydrofobicitu, která ovlivňuje adhezivitu buňky (54). Měření hydrofobicity povrchu buňky bylo navrženo jako vhodná metoda pro studium adheze buněk (85).

Exopolysacharidy jsou látky, které hrají pravděpodobnou roli v ochraně před vysušením buňky, před nízkým pH v žaludku a vlivem žlučových solí v dvanáctníku, vůči toxickým látkám, bakteriofágům nebo osmotickému stresu (86). EPS zřejmě vykazují antikancerogenní a imunomodulační aktivitu, snižují hladinu cholesterolu a tvoří základ pro adhezi na pevný povrch, současně tak tvoří biofilm na povrchu střevního epitelu (87). EPS mohou přispívat k fyzikálně chemickým vlastnostem buněčného povrchu ochranou ostatních adhesinů na povrchu buňky, které působí jako ligandy pro adhezi a agregaci (54). Dále byla studiem EPS druhu *L. acidophilus* prokázána částečná adheze jak na Caco-2 buňky, tak i na hlen produkující HT29-MTX buněčné linie (88).

U druhu *L. plantarum* byl studován dva glykoproteiny mající adhezi ke sliznici, jeden z nich byl následně identifikován jako aminokyselinová sekvence vázající se na chitin. Buňky obsahující tento krátký aminokyselinový řetězec jsou schopné se vázat na N-acetylglukosamin obsažený v prostředí, ať už je součástí hub, skeletu členovců nebo buněčné mukosy (89). Adheze probiotik na epitel může být posílena vhodnou kombinací probiotických kmenů. Například kombinace druhů *L. paracasei* a *L. plantarum* vykazuje

významný synergický efekt při koadhezi. Na druhou stranu bylo publikováno několik kmenů, které samy vykazují vysokou adhezi na epitel, ale v kombinaci s jinými kmeny dochází k inhibici této vlastnosti (62).

### 3.2.2 Tvorba biofilmu

Bakteriální biofilmy jsou husté agregáty neboli shluky vzájemně interagujících buněk nebo buněk interagujících s povrchem materiálu. Tyto buněčné shluky jsou obaleny hydratovanými extracelulárními polymerními substancemi produkovanými samotnými buňkami (90), kde jsou vysoce zastoupeny EPS, proteiny a DNA. Schopnost biofilmu byla důkladně studována u patogenních organismů, které díky tvorbě biofilmu vyvolávají trvalá chronická onemocnění. Tvorba biofilmu přináší vysoce sofistikovaný systém signalizace a rozpoznávání vnějších podnětů, který s sebou nese celou řadu výhod. Příkladem je odolnost vůči antibiotikům a imunitnímu systému hostitele, která je zapříčiněna tvorbou difúzní bariéry (91). Tato bariéra neboli biofilm získává speciální biofilmový fenotyp jako důsledek zpomaleného metabolismu a mutace genů (90, 92).

Základní podmínkou vzniku biofilmu je předpoklad vzniku vazeb mezi buňkou a povrchem. Zatímco adheze na abiotický povrch je organizována nespecifickými reakcemi (náboj povrchu a buňky, hydrofobicita) s extracelulárními molekulami (93), živé povrchy jsou adherovány přes specifická vazebná místa (receptory) obsažená na površích bakteriálních buněk (94). Na adhezi buňky k povrchu se může podílet celá řada fyzikálně chemických interakcí jako elektrostatické a hydrofobní interakce, sterické bránění, van der Waalsovy síly, teplota nebo hydrodynamické síly (93).

Vaznost bakterií na povrch je dále ovlivněna povrchově aktivními látkami, které buňka sama tvoří. Tyto látky, tvořené především u patogenních mikroorganismů, dokáží například pozměnit smáčivost nebo náboj. Ačkoliv jejich přesná funkce není známa, byla prokázána jejich účinnost na oslabení vzniklého biofilmu (90, 95).

Po prvním přichycení buňky na povrch a vytvoření vzájemné vazby přechází biofilm do fáze růstu trojrozměrné struktury, vytváří se mikrokolonie a startuje proces zrání. Organizace buněk do větších celků znamená potřebu jednotného řízení vznikající struktury (96). Vzájemná komunikace buněk je popsána procesem zvaným *quorum sensing* (97 - 99) Tato komunikace napomáhá buňkám sdílet informace o stavu biofilmu a regulovat genovou expresi v závislosti na okolních podmínkách. Za chemickou komunikaci zahrnující informace

o produkci, uvolňování, detekci a odpovědi na vnější faktory v buněčném biofilmu jsou zodpovědné malé molekuly na bázi hormonů nazývané též autoinducery (97–99).

Struktura a tvar biofilmu jsou značně proměnlivé a jsou ovlivněny zastoupením jednotlivých mikrobiálních druhů a podmínkami okolního prostředí (vlastnosti povrchu, dostupnost živin a kyslíku, pH, osmotický tlak nebo hydrodynamika prostředí). Prostředí s vysokým obsahem živin vede k tvorbě silné a relativně homogenní vrstvy biofilmu bez přítomnosti kanálků, kdežto v prostředí chudém na živiny se tvoří mozaiková nebo houbová struktura s dobře vyvinutým systémem kanálků a póry, které složí ke snadnějšímu transportu živin do hlubších vrstev biofilmu (93, 100).

Posledním krokem v životě biofilmu je disperze - proces, který může být zapříčiněn jak samotnou biofilmovou strukturou, tak vnějším prostředím. Hydrodynamický tok tekutiny kolem a skrz biofilm může zapříčinit oddělení části biofilmu, který současně může začít růst a vegetovat na jiném místě (93, 95, 96). Maximální růst biofilmu je omezen dostupností živin a procesem odstraňování odpadních látek. Při nedostatku živin je růst omezen expresí *quorum sensing* genů, které jsou zodpovědné za udržování biofilmu v době strádání (93).

Tlusté střevo je místem s nejvyšší kolonizací mikrobiální flórou v GIT. Pro snadnější pochopení se udává mikroflóra střeva jako jedna identita, ale opak je pravdou. Ve střevě existuje celá řada míst s oddělenými stanovišti a metabolickými výklenky, které se vzájemně liší a neustále se mění v závislosti na dostupných živinách nebo nových dostupných zdrojích (94). Mikroskopická pozorování prokázala, že probiotické buňky mohou v zažívacím traktu existovat samostatně, ale mnohem častěji jsou shlukovány do mikrokolonií nebo různorodých sdružení na povrchu částic přítomných v okolí. Biofilm zažívacího traktu je multidruhové společenství, jehož kompozice je předurčena a ovlivněna prostředím, výživovými faktory, imunitní odpovědí v místě vzniku biofilmu nebo chemickou kompozicí substrátů (101). Studium biofilmu probiotického přípravku po orálním podání pak prokázalo schopnost adheze až 45% rodu *L. rhamnosus* GG a 30% *B. lactis* na intestinální povrch (102).

### **3.3 Techniky sušení probiotických kmenů**

Sušením se všeobecně rozumí odstraňování vlhkosti z tuhého materiálu. V užším slova smyslu se sušením rozumí odstraňování vlhkosti v proudu sušícího vzduchu pod teplotou varu vlhkosti. Řídícím dějem je odevzdávání látky mezi tuhou a plynnou fází difuzí (103). V současné farmaceutické praxi existuje celá řada sušících technik, které jsou využitelné pro probiotické přípravky, například fluidní sušení, lyofilizace, sprejové sušení nebo vakuové

sušení. Sprejové sušení je nejrozšířenější a neekonomičtější technikou sušení, ale u probiotik vede ke ztrátě viability buněk díky vlivu vysoké teploty, mechanického namáhání, dehydratace a osmotického tlaku (104). Vysokou viabilitu buněk je schopná zajistit lyofilizace a ačkoliv se řadí mezi velmi nákladné techniky (105), je v průmyslu hojně využívaná. Příklad poloprovodního lyofilizátoru je na obrázku (Obrázek 2). Lyofilizace také chrání morfologii probiotických enkapsulí (106). Vakuové sušení je také technikou, která je schopna v kombinaci s protektivními látkami zajišťovat vysokou viabilitu po sušení (107). Fluidní sušení je v současné době nejméně studovanou technikou pro vysoušení bakteriálních kultur. Pro studium sušení probiotických přípravků byly v předložené práci vybrány dvě techniky sušení – (i) lyofilizace a (ii) fluidní sušení.

### **3.3.1 Lyofilizace**

Lyofilizace představuje šetrné vysoušení látek nebo jejich roztoků ve zmrazeném stavu, přičemž je rozpouštědlo odstraňováno sublimací za současného vakua (103). Po ukončení lyofilizace je zachována, jak struktura produktu, tak i bioaktivita sušených látek bez nutnosti vystavení produktu vysokým teplotám, které by zapříčinily degradaci materiálu (108).

Proces lyofilizace se skládá ze tří základních fází – zamrazování, primární fáze a sekundární fáze sušení. Každá fáze má v procesu svou nezastupitelnou roli a podílí se na výsledném vzhledu a stabilitě lyofilizačního koláče (103, 108–110). Spuštění lyofilizačního procesu ale předchází výběr vhodného kryoprotektivního činidla, které zajišťuje odolnost bakteriálních buněk v jednotlivých stupních procesu (110).

#### **3.3.1.1 Zamrazování**

Zamrazování je proces, při kterém dochází k přeměně vody na ledové krystaly. V lyofilizovaných směsích je zmrazeno 65-90 % vody, zbylých 10-35 % je absorbováno na produkt (111). Teplota, při níž dojde k zmražení lyofilizované směsi, je dána teplotou eutektického bodu stanoveného z fázového diagramu (112).

Během mražení krystalických látek dochází v dvoufázovém systému (voda a krystalická látka-sůl) k rychlému vykrystalizování vody, což má za následek prudký vzrůst molární koncentrace dané soli ve směsi. Koncentrace soli se v této fázi stává závislou pouze na teplotě (113). Například při zamražení isotonického roztoku soli o molární koncentraci  $0,15 \text{ mol/dm}^3$  dojde snížením teploty pod  $-10^\circ\text{C}$  k vzrůstu koncentrace soli na  $3 \text{ mol/dm}^3$  (112). Tato

koncentrace a nedetekovatelné pH má fatální následky na viabilitu mikroorganismů a další bioaktivní látky (114).

Nežádoucí krystalizace je v praxi odbourána přidávkem excipientů, které snadno nepodléhají krystalizaci a řadí se mezi ně zejména sacharidy. Sacharidy při zamražení inhibují krystalizaci solí (114). Při snižování teploty dochází k supersaturaci a strmě roste viskozita směsi, dokud nedojde k ukončení růstu krystalů ledu. Výsledkem jsou krystaly ledu obklopené vysoce viskózním roztokem a směs prochází tzv. skelným přechodem, který je charakterizován teplotou skelného přechodu (113). Roztok má v tomto bodě strukturu amorfních pevných látek (115).

Nukleace neboli tvorba a růst krystalů závisí na několika parametrech, zejména pak na složení lyofilizované směsi a povrchových vlastnostech lyofilizačního tácu (116). Zajištění stejnoměrné nukleace je zajištěno držením teploty několik málo stupňů nad teplotou nukleace po dobu alespoň jedné hodiny (110).



*Obrázek 2: Poloprovozní lyofilizátor ovládaný počítačem (zdroj: Fotoarchiv FAVEA a.s.)*

Během procesu zamražení je vložen krok žihání („annealing“) neboli termální ošetření, který má za cíl usnadnění krystalizace plnidel formulačních směsí (117, 118) (nejčastěji u glycerolu nebo manitolu (119)), navýšení objemu krystalů, tvorbu stejnoměrných krystalů a jejich

vzájemnou provázanost (120). Velké ledové krystaly a jejich provázání snižuje rezistenci produktu k toku vodní páry při sublimaci během primární fáze (121, 122).

Žihání spočívá v navýšení teploty na hodnotu mezi teplotou skelného přechodu amorfnní fáze a teplotou eutektického bodu plnidla, a její udržení po určitou dobu. Doba žihání pak závisí na poměru a vlastnostech použitého plnidla (120). V případě manitolu o obsahu více jak 80% byla teplota žihání stanovena na -20 až -25°C při délce 2 hodiny (123). Roztoky s nižším hmotnostním podílem krystalizují mnohem pomaleji (120).

### ***3.3.1.2 Primární fáze***

Primární fáze sušení představuje sublimaci ledu ze zmrazeného produktu za současného využití vakua (103). Hnací silou procesu je rozdíl tenzí vodních par v sublimačním rozhraní a nad kondenzátorem (124, 125). Tyto tenze par závisí na teplotách, které jsou hnacím motorem sublimace (103, 126, 127).

Pro úspěšné provedení lyofilizace je nutné zajistit dodávání energie do systému, která je spotřebovávána na skupenskou přeměnu (sublimaci). Tato dodávka energie je vedena udržováním stálé teploty polic (128, 129). Rychlost sublimace ledu je určena vzájemným propojením proměnných: (i) tlak v komoře, (ii) teplota polic a (iii) teplota produktu (129).

Nejefektivnější proces primární fáze lyofilizace je veden za co možná nejvyšší teploty polic a co nejnižšího tlaku, v praxi ale tato cesta není výhodná, protože vakuum způsobuje nehomogenní přestup tepla a tlak v komoře během lyofilizace se tedy pohybuje v rozmezí od 50 do 100 Pa (103, 110). Teplota produktu má dosáhnout maximální výše, ale nesmí během sublimace překročit teplotu eutektického bodu v případě krystalických látek (130) a teplotu skelného přechodu v případě lyofilizace látek amorfnních (125). Překročení těchto hranic má za následek tání struktury s následným zborcením lyofilizačního koláče (131). Posledním vysoce proměnlivým parametrem je teplota polic (132), která je ale stanovována na základě experimentu. Dosahuje vyšších hodnot než teplota produktu (131).

Délka primární fáze je dána třemi faktory: (i) rychlostí sublimace ledu, (ii) charakteristikou a složením lyofilizované směsi a (iii) objemem lyofilizované směsi. Konec primární fáze pak může být stanoven matematickým výpočtem z rovnice přestupu hmoty a energie nebo v praxi požívaným sledování okamžiku strmého nárůstu teploty produktu v procesu lyofilizace (133) nebo poklesem teploty kondenzoru (134).

### **3.3.1.3 Sekundární fáze**

Po ukončení primární fáze obsahuje produkt stále kolem 5-20 % vody v závislosti na formulaci v nezmrznuté formě. Tato voda je absorbována na povrchu, ve formě hydrátů nebo rozpuštěna v amorfni hmotě (103, 135). Například v případě přítomnosti manitolu, který krystalizuje ve formě manitol·H<sub>2</sub>O obsahuje produkt ve formě hydrátu manitolu s 9 hmotnostními % vody (136). Během sekundární fáze dochází ke snížení obsahu vody přítomné v produktu po ukončení primární fáze na požadovanou hodnotu, v případě probiotických kultur na 2-3 % (137, 138).

Při přechodu z primární do sekundární fáze není nutné měnit tlak v komoře, ale je nutné udržovat teplotu produktu pod teplotou skelného přechodu, přičemž tato teplota je vysoce závislá na obsahu vody. Pro amorfni látky je doporučována rychlost ohřevu polic v rozmezí 0,1 – 0,2 °C/min, u krystalických látek je rychlost ohřevu vyšší (0,5 °C/min) (110).

Stabilita produktu je v této fázi funkcí jak teploty, tak i obsahu vody v produktu. Koncentrace vody i teplota se v produktu velmi liší v závislosti na lokalitě a čase. Protože profil obsahu vody v produktu je závislý na teplotě, je hlavním sledovaným parametrem právě teplota sekundární fáze lyofilizace, která nesmí překročit termolabilitu lyofilizované aktivní látky. Teplota v této části procesu je opět regulována teplotou polic. Obsah vody je sledován až na konci sekundární fáze lyofilizace (111, 125, 137).

### **3.3.1.4 Kryoprotektivní média pro lyofilizaci probiotické kultury**

Lyofilizace je dlouho užívanou technikou pro dehydrataci bakteriálních kultur. Lyofilizace je ale zároveň stresovým prostředím, které způsobuje poškození buňky zejména zkoncentrováním buněčného obsahu s následným zvýšeným osmotickým tlakem nebo prasknutím buňky v důsledku tvorby velkých krystalů ledu (139, 140). Tyto nežádoucí účinky lze omezit přidávkem vhodně zvoleného kryoprotektivního média, které zajistí ochranu zejména buněčné stěny, buněčné membrány a ribonukleové kyseliny (113).

Kryoprotektivní látky působí různými mechanismy a na základě schopností difúze přes buněčnou stěnu (BS) a cytoplasmatickou membránu (CM) se dělí do tří skupin: (i) látky schopné penetrace přes BS i CM (glycerol, DMSO) jsou látky zvyšující plasticitu buňky a váží vodu, což zabraňuje odstranění vázané vody, snižuje toxicitu solí a zabraňuje tvorbě krystalů; (ii) látky prostupující přes BS, ale neprostupující pře CM (oligosacharidy, aminokyseliny, nízkomolekulární polymery) jsou látky vyvolávající plazmolýzu buněk, čímž soustředí mezi CM a BS určitou formu pufru, která brání tvorbě krystalů, a (iii) látky

nepenetrující přes BS a CM (vysokomolekulární polymery – proteiny, polysacharidy) se adsorbují na povrch a vytváří viskózní vrstvu, která brání vzniku krystalů (141, 142).

Sacharidy jsou jedny z nejvíce užívaných kryoprotektiv díky jejich relativně nízké ceně, chemicky nezávadné povaze a významně rozšířenému použití v potravinářském průmyslu. Mezi kryoprotektiva je řazena zejména trehalosa, sorbitol, manitol, sacharosa, laktosa, manosa a maltodextrin (143).

Trehalosa je přírodní cukr, který při lyofilizaci nahrazuje molekuly vody svými hydroxylovými skupinami (144), stabilizuje strukturu biomolekuly a zabraňuje ireversibilní denaturaci (115). Trehalosa neuvolňuje ze struktury během lyofilizace vlhkost (139), je velice dobrým kryoprotektivním činidlem, ale je-li přidána do média během kultivace, způsobuje inhibici růstu kmene *L. acidophilus* (105). V literatuře se ale objevují práce, které uvádí trehalosu jako neefektivní protektant (104).

Sorbitol má jen slabé účinky při ochraně proteinů proti jejich agregaci a nemá žádný efekt na chemickou degradaci (145). Spolu s manitolem a maltosou působí jako antioxidant a řadí se mezi efektivní protektanty proti oxidačnímu stresu a následnému poškození buněčné membrány, přesný mechanismus ale zatím není znám (143). Ačkoliv nebyl zjištěn významný kryoprotektivní efekt sorbitolu, byl sledován významný vliv na viabilitu kmenů *L. bulgaricus* a *L. rhamnosus* během dlouhodobého skladování (146). Jiné zdroje uvádí sorbitol jako látku, která je schopná chránit membrány proti zničení díky vzájemným interakcím a následně stabilizuje funkčnost proteinů i jejich strukturu (104).

Sacharosa je vhodným kryoprotektivním médiem pro lyofilizaci *L. bulgaricus*. Její kryoprotektivní vlastnosti lze zvýšit kultivací mikrobiální kultury na MRS médiu s obsahem sacharosu. Následná dehydratace je pak neúčinnější, pokud probíhá v roztoku trehalosy (142, 147)

Dalším disacharidem používaným při lyofilizaci je laktosa. Její schopnosti byly studovány u kmene *L. casei* 431. Bylo prokázáno, že ve srovnání s trehalosou je lepším protektivem díky lepším výsledkům vůči lyofilizačnímu stresu (105), které jsou přičítány prebiotickým vlastnostem laktosy (148). Stejných výsledků bylo dosaženo pro kmeny *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici* a *L. salivarius* (149). Laktosa je řazena mezi velmi dobrá kryoprotektivní média a zároveň zvyšuje viabilitu během působení trávicích šťáv (148). Opačného výsledku bylo ale dosaženo u kmene *L. bulgaricus* (142).



Dalším možným protekčním prvkem může být manitol řadící se mezi polyoly. Malá množství manitolu byla prokázána v buňkách bakterií mléčného kvašení s homofermentativním metabolismem, které využívaly jako zdroj uhlíku jiné sacharidy než glukosu. Předpokládá se tedy, že manitol může být látkou, která zvyšuje životaschopnost buněk během skladování v lyofilizované podobě (130). Přítomnost manitolu má zároveň i terapeutický efekt, protože může být v zažívacím traktu přeměněn na krátkořetězcové mastné kyseliny (butyrát), které jsou schopné inhibovat vznik rakoviny tlustého střeva. Manitol je také dobrý antioxidant, který chrání probiotické bakterie před otravou kyslíkem díky tvorbě peroxidu vodíku (150).

V současné době jsou testována i netradiční média z řad necukerných látek. Například jako protektivní média byly použity  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  a askorbová kyselina, nejvyšší míra přežívání a největší počet živých buněk byl ale zjištěn v kultuře s obsahem  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (151).

Dlouhou dobu nebyl kladen důraz na kultivační médium v souvislosti s přežíváním mikroorganismů při sušení a následném skladování a studie byly zaměřeny spíše na sledování účinků kryoprotektivních médií a následný proces lyofilizace než na kompozici kultivačního média. Opak je ale pravdou a studie potvrdily, že výběr vhodného kultivačního média má významný vliv na přežívání *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* a *L. bulgaricus* během lyofilizace a následného skladování. Studie dále potvrdila striktní závislost přežívání kmenu na protektivním médiu (133). Carvalho se svým kolektivem (130) dále tuto myšlenku studovali. Kultivovali *L. bulgaricus* na různých substrátech a pro lyofilizaci použili vždy stejný substrát jako při kultivaci (130). Základním zdrojem uhlíku pro růst je glukosa, ale pokud ji zaměnili za jiný jednoduchý cukr (manosa, fruktosa, laktosa), sledovali rozdíly jak v kinetice růstu, tak v rozdílných látkách produkovaných během kultivace, což mělo za následek produkci stresových látek (zejména EPS, manitolu) v závislosti na použitém zdroji uhlíku (135).

Announ a kolektiv publikovali studii (152), podle které růst bakteriální kultury na jiném zdroji uhlíku než je glukosa, ovlivňuje fluiditu membrány a to díky reakci produktů z nestandardní fermentace s mastnými kyselinami obsaženými v cytoplasmatické membráně. Tento fakt následně doplňuje obecně známá pravda, že mastné kyseliny hrají důležitou roli v termorezistenci buňky (152).

Závěrem lze usuzovat, že pokud se v přípravě lyofilizované kultury použije pouze jeden a tentýž druh sacharidu jako zdroj uhlíku i jako kryoprotektivum s výjimkou glukosy, je

předpokládána vyšší termorezistence a vyšší stabilita během skladování lyofilizované bakteriální kultury (133).

### 3.3.2 Fluidní sušení

Zatímco lyofilizace je velmi dobře prostudovaná technika pro sušení probiotických bakterií, fluidní sušení příliš publikovanou technikou v odborné literatuře není. Objevují se publikace, které využívají fluidní sušárny vybavené tryskou pro potahování granulátu probiotické kultury umístěné na sítu fluidní sušárny (153) nebo byla použita pouze pro dosušení masy *L. plantarum* a *L. bulgaricus* pro prvotní dehydrataci kultury v glycerolu a následným dosušením na nosiči (154). Fluidní sušení je ale ekonomicky výhodnou technikou s nízkou spotřebou energie a zároveň je tato metoda přívětivá k probiotické kultuře díky nízké teplotě proudícího vzduchu a možnosti její regulace (155).

Při sušení probiotik ve fluidní sušárně je probiotická kultura nanášena na absorbér nebo základní hmotu, které umožní snadnější vznik pelet nebo dobře absorbuje nanášenou suspenzi. Kontinuální proudění nejenže vysušuje obsaženou vodu, ale zajišťuje udržování částic absorbéru ve vznosu a zamezuje tak neřízené agregaci částic (155).

Nag a kolektiv (105) studovali vliv fluidního sušení probiotické kultury na její viabilitu při dlouhodobém skladování při pokojové teplotě. Pro studium byl využit kmen *L. casei*. Srovnáním s lyofilizovanou kulturou bylo zjištěno, že po ročním skladování měla kultura sušená ve fluidní sušárně o 2,5 řádu vyšší obsah než kultura lyofilizovaná. Navýšení ještě o 0,83 řádu bylo sledováno, když byla kultura vystavena osmotickému stresu (působení 0,6M NaCl od 14 hodiny kultivace po ukončení kultivace) před samotným fluidním sušením. Získané výsledky byly validovány opakováním testů se stejným výsledkem pro dva kmeny *Lactobacillus* a dva kmeny *Bifidobacterium* (155).

### 3.3.3 Vodní aktivita

Základním parametrem pro stanovení dlouhodobého přežívání probiotik je vodní aktivita. Mikroorganismy obsahují tři typy vody – volnou (intercelulární voda a část intracelulární vody), vázanou (intracelulární voda vázaná v proteinech, nukleových kyselinách, membránách, atd.) a zásobní (obsažená v izolovaných kapsách tvořených např. lipidy). Obsah volné vody v materiálu je udáván jako vodní aktivita (156, 157).

Jedná se o termodynamický parametr, který vychází z rovnovážného stavu termodynamiky směsi. Rozpustíme-li sůl ve vodě, dojde k poklesu entropie a molekuly vody se začnou

orientovat podle orientace molekul rozpuštěné látky. Rozpuštěná látka tak omezuje únik vody z kapalně fáze do fáze plynné, čímž dojde ke snížení tlaku par nad roztokem. Tento jev je pro ideální rozpuštěné látky popsán Raoultovým zákonem 158, který říká, že relativní pokles tlaku par rozpouštědla je roven molární frakci rozpuštěné látky

$$\frac{p_0 - p}{p_0} = \frac{n_1}{n_1 + n_2} \quad (1)$$

kde  $p_0$  a  $p$  jsou tlaky rozpouštědla a roztoku,  $n_1$  a  $n_2$  jsou molární koncentrace rozpuštěné látky a rozpouštědla.

Raoultův zákon může být dále vyjádřen vztahem,

$$\frac{p}{p_0} = \frac{n_2}{n_1 + n_2} \quad (2)$$

kteřý udává procentuální zastoupení tlaku vodní páry čisté vody. Poměr tlaku páry roztoku a rozpouštědla je popsán termínem vodní aktivita 159. Dosáhneme-li rovnovážného stavu tlaku vodních par v prostoru nad roztokem s roztokem, bude relativní vlhkost rovna stonásobku vodní aktivity. Vodní aktivita čisté vody má hodnotu 1, což je ekvivalentní rovnovážné relativní vlhkosti (100%) při dané teplotě (158, 159).

Tento zákon je ideálním případem, v praxi tento parametr ovlivňuje celá řada faktorů, jako je osmotický tlak, neideálnost chování rozpouštědla, neideálně rozpuštěná látka nebo vaznost vody na studované materiály (vaznost vody na polární skupiny materiálu, kapilární síly tvořené vodou drženou v kapilárách materiálu) (159).

Vodní aktivita ( $a_w$ ) má vyšší výpovědní hodnotu ve vztahu k mikrobiálnímu růstu než vlhkost. Měření vlhkosti je nevhodné pro stanovení schopnosti růstu mikroorganismů. Vlhkost udává celkové množství vody v produktu, která ale může být chemicky vázána na humektanty nebo rozpuštěné látky (cukry, polyoly) a ta je poté nedostupná pro proces růstu mikroorganismů. Růst mikroorganismů je pak omezen limitními hodnotami  $a_w$ , pod které nejsou mikroorganismy schopné růst (157).

Vliv vodní aktivity na stabilitu probiotického přípravku byl studován v několika pracích. Dianawati a kolektiv (150) studovali stabilitu kmene *B. animalis* ssp. *Lactis* B12 enkapsulovaného v alginátových nebo v alginát-manitolových peletách, kde při vodní aktivitě 0,38 - 0,40 byla sledována viabilita kolem 80 % po 10 týdnech ve srovnání s kontrolou (150). Podobně byla publikována viabilita buněk *L. paracasei* v alginátových kapsulích (161). Při vodní aktivitě 0,115 byla viabilita 79 % (7 týdnů při 25°C) a v rozmezí

od 0,115 do 0,329  $a_w$  nebyl sledován signifikantní vliv. Při  $a_w$  od 0,436 do 0,536 byla viabilita rovna 70 % ( $8,9 \cdot 10^8$  cfu/g suché směsi) (160). Stejně výsledky publikoval ve své práci i Semyonov, kde sledoval viabilitu buněk *L. paracasei* při různých koncentracích trehalosy a maltodextrinu (161).

Bora a jeho kolektiv sledovali vliv relativní vlhkosti, vlhkosti materiálu a vodní aktivity na přežívání spor *L. sporogenous*. Maximální hranice pro dlouhodobé přežívání spor byla stanovena 0,6  $a_w$  za současného držení relativní vlhkosti vzduchu pod 52 % (156).

Další studie sledování stability *B. longum* ssp. *longum* BB536 při různých hodnotách prokázala významný pokles stability vyjádřený jako navýšení rychlostní konstanty degradace probiotického přípravku při 25°C od  $a_w$  0,21, současně navrhla systém předpokládaného stanovení doby viability pro skladování probiotických kmenů ve formě prachu (162). Dále bylo přežívání probiotických kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* R-704 a *L. acidophilus* 2401 sledováno po lyofilizačním a sprejovém sušení v mezích  $a_w$  0,07 až 0,1 (85). Stejně výsledky byly reportovány i v dalších pracích (85, 163–165). Relativně stabilní byla shledána lyofilizace zmíněných kmenů za využití manitolu a sacharosy na straně kryoprotektantů, jež byla sledována při 20°C a  $a_w$  0,07 až 0,1 (166). Dříve pak bylo uvedeno, že pokles viability sprejově sušených buněk *L. rhamnosus* GG byl během 6 týdnů, při teplotě 25°C a  $a_w$  0,1 snížen pouze o půl řádu (167).

Ze získaných informací ve sledované literatuře lze dojít k závěru, že viabilita buněk skladované kultury přímo závisí na teplotě skladování a hodnotě vodní aktivity. Vodní aktivita je tedy kritickým parametrem pro dlouhodobé uchovávání probiotických přípravků. Nezanedbatelný vliv na stabilitu během skladování mají také látky přidávané během různých sušících technik, ale tato závislost je kmenově specifická a závisí i na použité technice sušení a vybraném materiálu (168). Zajímavostí je například testování inkorporace probiotického kmene *Lactobacillus* do potahovací suspenze tablet. Zatímco při použití čistě potahovací suspenze Opadry II dosahovala kultura 21% viability buněk, při obohacení média protektivními látkami (manitol, trehalosa a rekonstituované odtučněné mléko) se viabilita zvedla na 59 % (168).

### **3.4 Zpracování probiotických kmenů do doplňků stravy a jejich sekundární balení**

Získání stabilní formy probiotického kmene ve formě prachu není konečnou misí, ale následuje náročná cesta aplikace získaného materiálu do vhodné aplikační formule, která je

přijatelná a snadno aplikovatelná pro koncového zákazníka a zároveň stabilní po celou dobu expirace.

Probiotika jsou konzumenty přijímány perorálně, ať už ve formě tablet, kapslí nebo jako součást funkčních potravin či mléčných výrobků. Aby mohla takto přijatá probiotika kolonizovat zažívací trakt, musí přežít průchod kyselým prostředím žaludku (12). Literatura také uvádí, že takto přijímané kmeny se nestávají trvalou součástí střevní mikroflóry, ale žijí jen krátce po jejich užití (13). Právě vhodná kombinace probiotika s pomocnými látkami ve formulaci a výběr vhodné lékové formy s kombinací skladování za předepsaných podmínek může zajistit ochranu před škodlivým vlivem prostředí žaludku.

Problematika probiotik z pohledu legislativy nám říká, že existuje několik možností, které mohou být využity při uvolnění probiotického přípravku na spotřebitelský trh. Probiotický přípravek může být uveden v kategorii léčiva, zdravotnického prostředku nebo doplňku stravy, pomineme-li však využití probiotik v potravinách a funkčních potravinách.

Registrace a uvolnění na trh se u léčivého přípravku řídí zákonem o léčivech č. 378/2007 Sb. v aktuálním znění a zahrnuje celou škálu nejen klinických, ale i preklinických zkoušek, které ověřují bezpečnost a účinnost zamýšleného léčivého přípravku. Tato mašinerie je ale velmi drahou záležitostí a i když některé státy EU produkují probiotické kmeny v kategorii léčiv, tato cesta je pro výzkum v podmínkách ČR nerealizovatelná.

S obdobnou situací se potýkáme v kategorii zdravotnického prostředku. Zdravotnický prostředek je dle definice uvedené v zákoně 123/2000 Sb., o zdravotnických prostředcích popisován jako nástroj, přístroj, zařízení, materiál nebo jiný předmět, použitelný samostatně nebo v kombinaci spolu s příslušenstvím, určený výrobcem pro použití u člověka za účelem stanovení diagnózy, prevence, monitorování, léčby nebo mírnění choroby, mírnění nebo kompenzace poranění nebo zdravotního postižení, vyšetřování nebo kontroly počtů a který nedosahuje své hlavní zamýšlené funkce farmakologickým, imunologickým nebo metabolickým účinkem, ale jeho funkce však může být těmito účinky podpořena.

Ačkoliv by se dala najít schůdná cesta v legislativě odpovídající definici zdravotnického prostředku – tvorba souvislé biofilmové struktury, která mechanicky brání osídlení stěny střeva patogenními mikroorganismy - nebyla tato možnost využita z důvodů vysokých nákladů na klinické zkoušky a nejednoznačnost prokázání účinku na malém počtu subjektů hodnocení.

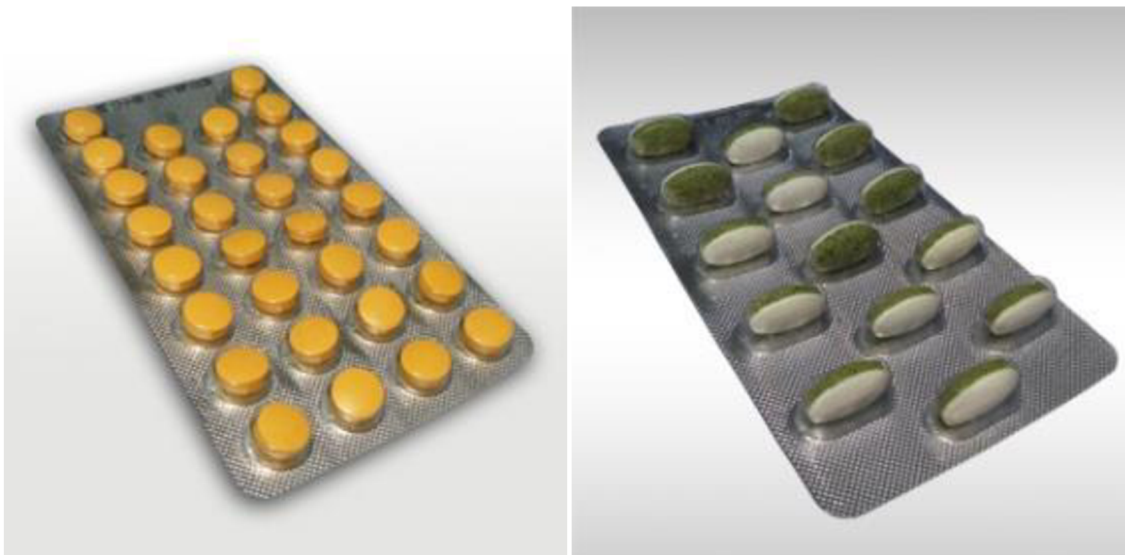
Pro probiotický přípravek byla zvolena tedy poslední cesta - cesta doplňku stravy. Obecná legislativa doplňků stravy je harmonizována dle nařízení EU a je zpracována zejména do vyhlášky 225/2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a obohacování potravin.

Legislativa upravující konkrétně probiotické přípravky je ale skoupá. Světová zdravotnická organizace v roce 2001 na kongresu v Argentině si uvědomila absenci definice probiotik a zároveň nutnost regulace, a tak definovala probiotika jako „živé organismy, které, když jsou podávány v adekvátních množstvích, přispívají ke zdraví konzumenta“ (169). Pro docílení terapeutického efektu probiotik je nutné, aby denní dávka odpovídala minimálně  $10^6$  cfu v čase konzumace. Vzhledem k poznatkům o snižování viability během zažívání je doporučován obsah  $10^6 - 10^9$  cfu v denní dávce (104). Pozdější zásah evropské legislativy ale zamezil výrobcům doplňků stravy uvádět na obalech tzv. zdravotní tvrzení. Zdravotní tvrzení je seznam prokázaných účinků látky, sloučeniny, skupiny látek na zdraví spotřebitele ve specifikované dávce. Zdravotní tvrzení jsou kontrolována a aktualizována EFSA (vysvětlit zkratku) na základě dat a informací zejména z klinických zkoušek a praxe. Probiotické přípravky ale dle rozhodnutí EFSA nejsou vhodně a uceleně dokumentovány, tak byla veškerá zdravotní tvrzení vážící se k probiotickým přípravkům zamítnuta (2).

Probiotické produkty se nachází v celé řadě lékových forem – sáčky s granuláty, kapsle nebo tablety. Všechny tyto formy ale podléhají různému stupni degradace v žaludku při velmi nízkém pH, které je kritickým parametrem pro přežívání probiotik. Proto stále běží výzkum a vývoj se zaměřením na výběr vhodné formulace, která zajistí přežívání probiotik v prostředí žaludku (170).

### **3.4.1 Tablety**

Tablety se dle lékopisu definují jako pevné přípravky s obsahem jedné nebo více aktivních látek v jedné tabletě. Získávají se lisováním stejných objemů částic nebo jiným vhodným výrobním postupem (vytlačování (=extruze), formování nebo lyofilizace). Tablety jsou obvykle válcovitého tvaru, ploché nebo čočky, hrany mohou být zkosené (Obrázek 3). Obvykle se tablety vyrábí lisováním. Při výrobě tablet je nutné zajistit vhodnou mechanickou pevnost, aby se při jejich zacházení zamezilo jejich drobení nebo lámání (171). U probiotických přípravků je tento parametr kritický, zejména při studiu přežívání probiotických přípravků během lisování a vliv lisovacích tlaků na životaschopnost buněk.



Obrázek 3: Tablety v blistru tvaru čočka a ovál (Zdroj: Fotoarchiv FAVEA a.s.)

Obecně jsou v technologii lékových forem zpracovávány nestabilní látky zejména ve formě tablet i z důvodů ochrany před nepříznivým prostředím žaludku a možností cíleného uvolnění aktivní látky v požadovaném místě (plnidla rozpustná v určitém pH, potahování tablet). Nespornou výhodou tablety je také přesná dávka, jednoduché podávání, dobrá akceptace ze strany pacienta a možnost velkoobjemové produkce s nízkými výrobními náklady (170).

Další výhodou tablet je vysoká variabilita excipientů použitelných při technologii jejich výroby, kterými může být snadno kontrolováno uvolňování aktivní látky – probiotika a současně díky přítomnosti excipientů může být podpořena adheze na epitelální mukosu. Excipienty s kontrolovaným uvolňováním jsou v poslední době studovány i pro probiotika. Pevné lékové formy s probiotiky, které jsou výsledkem mnoha studií, se zaměřují zejména na rezistenci probiotika vůči kyselému prostředí žaludku, sledování viability po tabletování v závislosti na použitých parametrech tabletování a stabilitu probiotika obsaženého v získané pevné lékové formě (166, 170, 172–175).

Hlavním faktorem při výrobě tablet je tedy lisovací tlak, který se odráží v parametru pevnosti tablet. Obvykle jsou tablety lisovány alespoň na 100 N. Silva a kolektiv (176) studovali vliv lisovací síly na přežívání probiotik. Při síle 9,8 kN byla získána pevnost tablety 314 N a byl sledován pokles probiotik ve formě mikrokapslí obalených syrovátkovým proteinem o jeden řád. Při dalším navyšování lisovací síly nadále nedocházelo k významnému poklesu probiotik v přípravku (176). Podobné výsledky byly publikovány při vyšších silách (20 kN, 2,75 N/mm<sup>2</sup>) (170), kdy bylo docíleno vysoké pevnosti tablety s nízkým oděrem (177). Naopak pokles o 2 řády byl sledován při výrobě probiotických mikrotablet (*Lactobacillus* sp.)

s mikrokrytalickou celulosou a inulinem navzdory tomu, že lisovací síly se pohybovaly v rozmezí od 1 do 5 kN (178).

Právě při vysoké lisovací síle a nízkém procentu oděru (pod 1 %) bylo dosaženo téměř 90 % přežívání buněk po průchodu kyselým prostředím žaludku (177). Právě souvislost mezi nízkým oděrem a vysokou pevností je určující pro dobré přežívání, protože velká pevnost tablety nedovoluje kyselému prostředí proniknout do tablety po čas průchodu zažívacím traktem (170).

Nejčastěji používaným excipientem pro cílené uvolnění v tlustém střevě je hydroxypropylmethyl-celulosaftalát (známý pod obchodním názvem Eudragit), který je nerozpustný v kyselém prostředí a je schopen v nezměněné podobě dojít do cíle určení. Studie kombinace hydroxypropylmethyl-celulosaftalátu a alginátu sodného prokázala minimální vliv žaludečních šťáv na probiotickou kulturu za současného zisku tablety vyhovující mechanickým parametrům - oděr <1%, při pevnosti 1,38 N/mm<sup>2</sup> (170).

Zatímco excipienty pro cílené uvolnění zvyšují viabilitu během pasáže zažívacím traktem, přídavek sacharidických složek (sacharosa, inulin, manitol) udržuje viabilitu během dlouhodobého skladování podobně jako u sušících technik (179).

### **3.4.2 Tvrdá tobolka**

Perorální želatinové tobolky jsou tělíska různé velikosti, tvaru a objemu, naplněné jednou dávkou účinné látky (Obrázek 4). Pro probiotické přípravky se používají tvrdé tobolky. Ty jsou složeny ze dvou částí (těla a víčka). Základní složkou stěny je želatina. Standardní tobolky jsou rozpustné v žaludečních šťávách, pro enterosolventní použití jsou však dostupné i tobolky, které odolávají žaludečním šťávám (103).

Odborná literatura uvádí možnosti využít i tobolky vyráběné z hydroxypropylmethylcelulosity (HPMC). HPMC je s výhodou užívána pro látky nestabilní ve vodném prostředí, protože sama má nízký obsah vody a neobsahuje chemicky reaktivní skupiny (180, 181). Zvýšení rezistence HPMC tobolek bylo ještě docíleno potažením tobolek polymerními látkami nerozpustnými v kyselém prostředí (Eudragit) (182).

Obohacení HPMC o želatinizující látky (gelanová guma) vedlo k vývoji tobolek, které jsou rezistentní ke kyselému prostředí žaludku (tzv. DR tobolky). Testem bylo prokázáno, že i 30-minutová přítomnost této tablety v simulovaném prostředí žaludku nevedla k porušení její stěny a tobolka tak uchránila nesený obsah (183). Tento výsledek byl porovnán se



standardní HPMC tobolkou a želatinovou tobolkou, zatímco HPMC kapsle vykazovala nižší rezistenci, želatinová kapsle se ihned po začátku působení kyselého prostředí rozpadla (180). Pro HPMC tobolku bylo testem prokázáno, že její použití vede k zisku 1700-násobku živých probiotických buněk ve srovnání s kontrolou (prosté rozpuštění buněk v 1% roztoku žlučových kyselin) (183).



Obrázek 4: HPMC tobolky plněné aktivní látkou (zdroj: Fotoarchiv FAVEA a.s.)

Kapsle nabízí možnosti plnění rozličných excipientů, které mohou více či méně ovlivňovat stabilitu probiotického přípravku, pomíneme-li hodnotu vodní aktivity, která byla studována výše (Kap. 3.3.3). Při procesu plnění kapsle je možné vybrat nejvhodnější excipienty, které mohou zvýšit viabilitu buněk během skladování nebo následném průchodu zažívacím traktem (183).

Vliv pomocných látek na stabilitu *Lactobacillus* spp. byl studován se třemi vybranými excipienty- laktosou, sušeným mlékem a kyselinou askorbovou, které byly přidány již během lyofilizace. Stabilita získaného lyofilizátu naplněného do želatinových kapslí byla sledována při 5°C po dobu 15 měsíců v uzavřených skleněných nádobách. Byla-li ve formulaci obsažena kyselina askorbová, byla udržena viabilita buněk více než 12 měsíců (184).

### 3.4.3 Vliv kyslíku na skladování pevných lékových forem obsahujících probiotika

Již bylo zmíněno, že vodní aktivita je kritickým parametrem ovlivňujícím stabilitu produktu během dlouhodobého skladování (viz kapitola 0). Dalšími významnými faktory, které ovlivňují stabilitu během skladování produktu jsou (i) obsah kyslíku a (ii) redoxní potenciál (185). Molekulární kyslík je škodlivý pro život a růst probiotických bakterií, protože většina mikroorganismů patřících mezi probiotika, jsou z hlediska náročnosti na kyslík anaerobní mikroorganismy (186). Kyslík ovlivňuje probiotika třemi cestami: (i) je přímo toxický pro buňku, (ii) určité kultury produkují v přítomnosti kyslíku toxické peroxidy nebo (iii) volné radikály, které jsou produktem oxidace jiných látek (např. tuků) a jsou toxické pro probiotické mikroorganismy (104). Hladina kyslíku v balení probiotika během skladování probiotického

produktu by měla být co nejnižší, aby bylo zamezeno úhynu buněk následkem toxicity peroxidu vodíku. Stupeň sensitivity ke kyslíku je závislý na kmenu a druhu probiotika (187).

Kyslík je všudypřítomná molekula, která se vyskytuje nejen v samotném produktu, ale na základě bariérových vlastností obalového materiálu může procházet k produktu z okolního prostředí. Při kontaktu molekuly kyslíku s probiotickou buňkou dochází zejména k oxidačnímu stresu s následným poškozením membránových lipidů (188). Proto je cílem snížit co nejvíce přístup molekuly kyslíku, čímž se zamezí oxidačnímu stresu, což má za následek delší stabilitu produktu během skladování.

Snížení přístupu kyslíku může být provedeno několika způsoby, např. uchováváním probiotických kultur pod vakuem, přidávkem antioxidantů a absorbérů kyslíku nebo balením do obalových materiálů nepropustných nebo s omezenou propustností pro kyslík (aktivní balení) (189). Pro produkty v kategorii doplňků stravy může být využito balení do hliníkových sáčků (granuláty) nebo do blistrů (Obrázek 5), či dóz obsahujících desikanty (kapsle, tablety).



*Obrázek 5: Tobolky v blistru (zdroj: Fotoarchiv FAVEA a.s.)*

Navzdory velkému počtu již používaných probiotických kmenů, výrobci funkčních potravin a farmaceutické společnosti se snaží stále hledat nové kmeny, nové strategie pro jejich dlouhodobé skladování a udržitelnost a různé zdroje pro jejich izolaci, a to vše za současného snižování cen nákladů za současného zvýšení konkurenceschopnosti jejich výrobků. Tato strategie je částečně využita při řešení disertační práce.

## 4 CÍLE PRÁCE

Téma disertační práce je zaměřeno na vývoj přípravku obsahujícího probiotickou kulturu v kombinaci s nosičem, přičemž probiotická kultura by měla být alespoň v minimální míře připevněna k nosiči ve formě biofilmu. V rámci tématu byla studována tvorba probiotického biofilmu, optimalizace kultivace se současným přenesením získaných znalostí do výroby humánních doplňků stravy. V této části byly ověřeny základní kultivační techniky pro produkci biofilmové kultury na anorganickém nosiči, zejména pak především statická vsádková kultivace doplněná o znalosti tvorby bakteriálního biofilmu. Dále byla provedena mikrobiologická stanovení počtu kolonií a testy stability biofilmové a planktonické formy kultury při vlivu nižšího pH či aplikace žlučových extraktů. Byla zařazena i mikroskopická pozorování s využitím vysoce sofistikovaných zařízení, mezi něž se řadí i elektronový mikroskop.

Druhá část práce byla založena hlavně na aplikaci poznatků z odborné literatury a laboratorních testů při použití různých sušících technik pro získané bakteriální kultury. Zde byl sledován hlavně parametr vodní aktivity. Základní metodou byla lyofilizace, která byla srovnávána s ve farmacii standardně používanou technikou fluidního sušení. Fluidní sušení je levná, komerční a dobře dostupná metoda sušení. Zde byly odzkoušeny vhodné kombinace protektivních látek pro udržení co nejvyšší viability buněk během sušení a následné doby skladování. Dále byly testovány specifické parametry pro fluidní sušení (teplota sušení).

Disertační práce je založena na myšlence přímé aplikace vědeckých poznatků v nezměněné a funkční formě do praxe se současnou snahou nabídnout koncovému uživateli bezpečný, funkční a zdraví prospěšný preparát. Za tímto účelem byly ze získaných mikrobiálních kultur připraveny vzorky základních lékových forem, které byly dokumentovány základními farmaceutickými zkouškami převážně dle požadavků Českého lékopisu v platném znění. Následně byly prověřeny materiály dostupné ve farmaceutickém průmyslu pro balení pevných lékových forem tak, aby zajistily maximální snížení nebo udržení dosažených parametrů nízké vodní aktivity a zamezily přístupu kyslíku po celou dobu skladování probiotického přípravku.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje

#### 5.1.1 Bakteriální kmeny

V předkládané práci byly použity bakteriální kmeny *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, *Bifidobacterium longum* CCM 4990 a *Bifidobacterium breve* CCM 3763, které byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

Dále byly používány komerčně dostupné bakteriální probiotické kmeny pro potravinářský a farmaceutický průmysl *Lactobacillus rhamnosus* a *Lactobacillus paracasei* vyrobené společností Lallemand (Francie).

#### 5.1.2 Použité chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

MRS agar, Himedia (Indie)

MRS bujón, Himedia (Indie)

MRSC agar, Himedia (Indie)

MRSC bujón, Himedia (Indie)

Ringrův roztok

#### 5.1.3 Ostatní chemikálie a suroviny

Poly (vinylpyrrolidone-co-vinyl acetate) (Sigma Aldrich)

Alginát sodný (Sigma Aldrich)

Karagenan (Sigma Aldrich)

Nanohedvábí (Brenntag)

Kukuřičný škrob (Univar)

Bramborová vláknina (Kuk)

Ovesná vláknina

Fosforečnan vápenatý (Ph. EUR., Jungbunzlauer)

Kaolín (Brenntag)

Oxid křemičitý (Cabot)

Komplexní potravinové matrice (mouka, čočka, mák, kroupy, hrách, pohanka – potravinářská kvalita)

Hydroxypropylmethylcelulóзовé kapsle (Capsugel)

Stearan hořečnatý (Univar)

Isomalt (Beneo)

Mikrokrystalická celulóza (JRS)

Silikagel (Tropack)

#### **5.1.4 Přístroje a zařízení**

Tabletovací lis JCMCO 16 II (Jenn Chian Machinery Co.,LTD., Tchaj-wan)

Kapslovací zařízení Capsugel (Capsugel, Belgie)

Blistrovací zařízení Kwang (Kwang Dah Enterprise Co. LTD., Tchaj-wan)

Stabilitní komora Votch (Vötch, SRN)

Termostat Q cell (Verkon, Polsko)

Svařovací kleště

AquaLab 4TE pro měření vodní aktivity (Decagon Devices, Inc. USA)

Oděroměr (Erweka, SRN)

Analytické váha Mettler Toledo (SRN)

Laboratorní váhy Ohaus (SRN)

Tvrdoměr Sotax (Švýcarsko)

Mikrobiologický laminární box (Labox, Česká republika)

Průmyslová fluidní sušárna (zakázková výroba, Česká republika)

Lyofilizátor Cool Safe superior (Scan Vac, Dánsko)

Běžné laboratorní sklo a vybavení

## 5.2 Kultivace probiotické biofilmové kultury

Schopnost adherence probiotických buněk byla testována pro následující vybrané probiotické kmeny: *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, *Bifidobacterium longum* CCM 4990 a *Bifidobacterium breve* CCM 3763. Kmen *Lactobacillus* byl kultivován na syntetickém MRS bujónu. Kmeny *Bifidobacterium* rostly na MRSC bujónu. Živné půdy byly vždy doplněny o 1,5% vybraného nosiče. Všechny kmeny byly kultivovány při 37°C po dobu 16-24 hodin. Vývoj tvorby biofilmu na nosičích byl podpořen statickou kultivací.

Nosiče byly vybírány ze škály farmaceutických aktivních a pomocných látek, které lze rozdělit do tří kategorií: (i) polymery (Copovidon, alginát sodný, nanohedvábí, bramborová a ovesná vláknina a kukuřičný škrob), (ii) zdroje minerálních látek (fosforečnan vápenatý, kaolín a oxid křemičitý) a (iii) komplexní potravinové matrice (mouka, kroupy, hrách, čočka, mák a pohanka). Nosiče, které obsahovaly velké částice, byly rozdrčeny v třecí misce a přesítovány přes sítko o velikosti 0,5 mm.

Bakteriální buňky byly po kultivaci obarveny pomocí Gramova barvení a vytvořený biofilm byl pozorován nejprve pod optickým mikroskopem (NIKON Eclipse E 400) následně byl biofilm důkladněji pozorován a potvrzen za použití elektronového mikroskopu (MIRA3 TESCAN).

## 5.3 Sledování životaschopnosti probiotických biofilmových buněk v simulovaném prostředí zažívacího traktu

### 5.3.1 Vliv roztoku kyselých solí na viabilitu biofilmových buněk

Vliv roztoku kyselých solí na životaschopnost probiotických biofilmových buněk *Lactobacillus acidophilus* CCM483 byl prováděn v roztoku simulujícím kyselé prostředí žaludku. Roztok se skládal z NaCl (2,05 g/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,60 g/l), CaCl<sub>2</sub> (0,11 g/l) a KCl (0,37 g/l) (190) a následně bylo jeho pH upraveno (pH 1, 2 a 3) roztokem 1 M HCl. Čerstvé biofilmové kultury a planktonické kultury probiotik byly inkubovány s připravenými okyselenými roztoky (37°C, 120 minut). V předepsaných časech 30, 60 a 120 minut byly odebrány vzorky a neutralizovány 1M NaHCO<sub>3</sub>. Počet životaschopných buněk v připravených vzorcích byl stanoven podle modifikované Miles-Misra metody (191, 192). Počet životaschopných buněk byl vyjádřen jako procento životaschopných buněk v čase vzorkování k počtu životaschopných buněk na počátku experimentu. Každý test byl proveden ve třech opakováních.

### 5.3.2 Vliv roztoku žluči na viabilitu biofilmových buněk

Vliv žluči na životaschopnost probiotických biofilmových buněk *Lactobacillus acidophilus* CCM483 byl testován za přítomnosti 0,3% roztoku extraktu žluči (Porcine Bile Extract, Sigma). Vzorky biofilmové a planktonické formy probiotika byly inkubovány v připraveném roztoku při 37°C po dobu 4 hodin (193). V časech 1, 2, 3 a 4 byly odebrány vzorky, u nichž byl stanoven počet životaschopných buněk. Počet životaschopných buněk byl následně vyjádřen jako procento životaschopných buněk v čase vzorkování k počtu životaschopných buněk na počátku experimentu. Každý test byl proveden ve třech opakováních.

## 5.4 Zpracování biofilmových probiotických kultur pro farmaceutické účely

Získané mikrobiální kultury po kultivaci byly dále sušeny do formy prášku. Prášek je nejstabilnější formou probiotických bakterií pro dlouhodobé skladování. Zároveň jsou probiotika ve formě prachu dobře zpracovatelnou surovinou ve farmaceutickém průmyslu.

### 5.4.1 Lyofylizace

Biofilmová kultura *L. acidophilus* CCM 4833 byla použita pro testování účinnosti sušení a výběr vhodného lyoprotektivního média. Kultura *L. acidophilus* byla zaočkována do připravených médií o následujícím složení: a) 10% sladké syrovátky nebo 5,5% komerčního MRS média. Připravené směsi byly doplněny o 1% oxidu křemičitého a o 1% bramborové vlákniny. Kultivace probíhala staticky v kultivačních termostatech při teplotě 37°C po dobu 20 - 24 hodin. Po ukončení kultivace byl odebrán vzorek na stanovení počtu cfu jednotek. Následně bylo vždy 0,5 litrů připravené kultury smícháno se 0,125 kg mikrokrystalické celulózy a s lyoprotektivními látkami v tomto složení: i) 50 g hydroxypropylmethylcelulózy (HPMC), (ii) 50 g HPMC a 250 g manitolu a (iii) 50 g HPMC a 250 g inulinu.

Získané směsi probiotické kultury s lyoprotektanty byly rovnoměrně rozetřeny na lyofilizační tácky a následně byl spuštěn lyofilizační program dle tabulky (Tab. 1). Po ukončení lyofilizace byl stanoven počet cfu jednotek v každém vzorku.

Tab. 1: Program pro lyofilizace probiotických bakterií

Čas (hodiny)	Teplota (°C)	Tlak (Bar)
20:00	-45	1,000
18:00	-25	0,000
10:00	-15	0,000
5:00	15	0,000

#### 5.4.2 Fluidní sušení

##### 5.4.2.1 Fluidní sušení s vybranými protektivními látkami

Biofilmová kultura *L. acidophilus* CCM 4833 byla použita pro testování účinnosti sušení a výběr vhodného protektivního média. Kultura *L. acidophilus* byla zaočkována do připravených médií o následujícím složení: a) 10% sladké syrovátky nebo 5,5% komerčního MRS média. Připravené směsi byly doplněny o 1% oxidu křemičitého a o 1% bramborové vlákniny. Kultivace probíhala staticky v kultivačních termostatech při teplotě 37°C po dobu 20 - 24 hodin. Po ukončení kultivace byl odebrán vzorek na stanovení počtu cfu jednotek. Následně bylo vždy 1,3 litrů připravené kultury smícháno se 3 kg mikrokrystalické celulózy a s protektivními látkami v tomto složení: i) 0,130 kg hydroxypropylmethyl celulózy (HPMC), (ii) 0,130 kg HPMC a 0,5 kg manitolu a (iii) 0,130 kg HPMC a 0,5 kg inulinu.

Připravené směsi byly sušeny ve fluidní sušárně při 25°C po dobu 2 hodin. Po vysušení byl stanoven počet cfu jednotek v jednotlivých vzorcích.

##### 5.4.2.2 Vliv teploty sušícího vzduchu na přežívání probiotik

Dále byla biofilmová kultura rostlá na MRS médiu a připravená dle postupu uvedeného v kapitole 5.4.2.1 a smíchána s protektivními látkami pouze ve variantách a) HPMC a MCC a b) HPMC, MCC a manitol, sušena ve fluidní sušárně při 25°C po dobu 3,5 hodiny a při 35°C po dobu 2 hodin. Po ukončení sušení byl proměřen počet cfu jednotek ve všech vzorcích.

#### 5.4.3 Srovnání vlivu teploty skladování a vodní aktivity na životaschopnost probiotických buněk

Pro sledování životaschopnosti buněk za různých podmínek skladování byla připravena kultura *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833. Kultura rostlá na směsi syntetického média (5,5%) a rekonstituovaného odtučněného mléka (7,5%) byla následně lyofilizována



s přidavkem lyoprotektivních látek (50% manitol). Vodní aktivita probiotické kultury po lyofilizaci byla upravena na 0,1 a 0,25 volným stáním v exikátoru (25°C, 28% vlhkosti). Probiotická kultura byla následně zabalena do hliníkových sáčků (PET/AL/PE) a uložena do lednice (2-8°C) a do stabilitní komory (25°C; 60% vlhkosti). Ve stabilitních bodech 0, 1, 3 a 6 měsíců byly odebírány vzorky, u nichž byl stanoven počet životaschopných buněk vyjádřený jako cfu/g probiotické kultury. Vodní aktivita byla v průběhu testu kontrolována na zařízení AquaLab 4TE.

## 5.5 Technologie lékových forem

### 5.5.1 Výroba probiotických tablet

V následující části práce byl sledován vliv technologických kroků a podmínek na výsledný počet živých buněk po ukočení technologických činností a finalizaci produktu. Pro studium vlivu technologie výroby na životaschopnost buněk byly vybrány přípravky o složení uvedeném v tabulce Tab. 2 a Tab. 3

Tab. 2: Složení probiotických tablet s isomalem

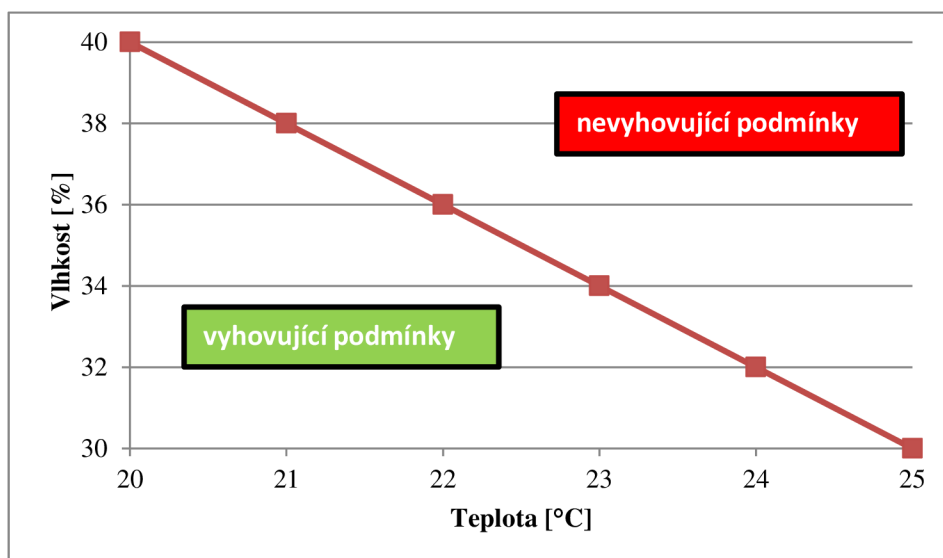
Surovina	%	Hmotnost (mg)/tbl.
Isomalt	80,00	440,00
Lactobacillus plantarum	3,27	18,000
Lactobacillus paracasei	15,27	84,000
Stearan hořečnatý	1,46	8,000
<b>Celkem</b>	<b>100,00</b>	<b>550,00</b>

Tab. 3: Složení probiotických tablet s mikrokrystalickou celulórou

Surovina	%	Hmotnost (mg)/tbl.
Mikrokrystalická celulóza	80,00	440,00
Lactobacillus plantarum	3,27	18,000
Lactobacillus paracasei	15,27	84,000
Stearan hořečnatý	1,46	8,000
<b>Celkem</b>	<b>100,00</b>	<b>550,00</b>

Probiotické kmeny dodávané ke komerčním účelům jsou dle doporučení dodavatele skladovány v lednici (2-8°C) v hliníkových sáčcích. Před použitím je nutné probiotické kmeny temperovat na teplotu místnosti, kde bude probíhat výroba.

Pro nakládání s probiotiky, kdy materiál přichází do kontaktu se vzduchem, je tedy nutné zajistit specifické podmínky pro prostory. Podmínky pro nakládání jsou popsány graficky (Graf 1).



Graf 1: Grafické znázornění klimatických podmínek, které mají být dodržovány při nakládání s probiotickými kmeny v práškové formě

Odvážené a přesáté suroviny (síto 1 mm) byly ručně homogenizovány, na závěr byl přidán stearan hořečnatý a tabletovina byla znovu důkladně promíchána. Získaná směs byla tabletována na tabletovacím lisu JCMCO 16 II, který byl vybaven razidlem formátu konvexní čochka 12 mm. Váha tablety byla nastavena na 550 mg ± 5 % (hmotnostní odchylka hmotnosti tablety odpovídá aktuální verzi Českého lékopisu).

#### 5.5.1.1 Vliv vodní aktivity na stabilitu produktu

Tabletovina obsahující probiotické bakterie a isomalt připravená dle kapitoly 5.5.1, byla použita pro test, zda výchozí hodnota vodní aktivity tabletoviny má negativní vliv na dlouhodobé skladování. Vodní aktivita tabletoviny byla upravena na hodnotu menší než 0,1 a druhý vzorek měl vodní aktivitu 0,2 – 0,3. Takto připravené tabletoviny byly lisovány na pevnost 70 N. Vyrobene tablety byly uloženy do ALU sáčků, doplněny o silikagel (na 10.000 tbl po 500 mg bylo použito 0,25 kg silikagelu) a uloženy do stabilitní komory při 25°C a vlhkosti 60%. V časech 0, 3, 6, 9, 12, 18 a 24 měsíců byl stanovován počet živých buněk v tabletách.

### **5.5.1.2 Stanovení poklesu počtu živých buněk během procesu výroby tablet**

V rámci tohoto testu byl postup shodný s přípravou tablet s obsahem isomaltu dle kapitoly 5.5.1. Vstupní komerční kmeny, tabletovina a hotové tablety byly podrobeny analýze počtu cfu jednotek. Následně byly ze získaných hodnot vypočítány počty cfu jednotek na tabletu a poklesy živých buněk během technologického procesu výroby tablet.

### **5.5.1.3 Hodnocení vlivu pevnosti tablety na počet živých buněk během tabletování**

Pro test vlivu tabletovacího tlaku na životaschopnost probiotických buněk v tabletě byla připravená tabletovina dle kapitoly 5.5.1. Připravená tabletovina o vodní aktivitě  $< 0,3$  byla tabletována na tabletovacím lisu JCMCO 16 II za různých lisovacích tlaků tak, aby získané tablety měly výslednou pevnost přibližně 70, 90 a 120 N. Tablety byly zanalyzovány na počet cfu jednotek a dále byly stanoveny technologické parametry – pevnost, oděr, výška tablety a vodní aktivita tabletoviny.

### **5.5.1.4 Stanovení délky vysoušení tablet v závislosti na obsahu vysoušedla**

Pro následující test byly použity tablety připravené dle kapitoly 6.4.1.3. Tablety byly rozváženy do hliníkových vzorkovacích sáčků. Jednotlivé vzorky byly doplněny o 10 nebo 14 % vysoušedla a neprodušně uzavřeny (zavařeny svařovacími kleštěmi). Takto připravené vzorky byly uloženy do lednice při teplotě 2 - 8 °C. V daných časových intervalech 0, 3 a 6 dní byla potřebná část vzorků vytažena z lednice, 2 hodiny byly vzorky temperovány a následně byla na přístroji AquaLab 4TE stanovena jejich vodní aktivita. Jako vysoušedlo byl použit silikagel.

### **5.5.1.5 Vliv pevnosti a složení tablet na počet cfu a vodní aktivitu v průběhu skladování**

Pro stanovení stability probiotických tablet o různých pevnostech byly připraveny tablety dle postupu uvedeného v kapitole 6.4.1.3. Tablety byly rozváženy do hliníkových vzorkovacích sáčků. Jednotlivé vzorky byly doplněny 10 % vysoušedla a neprodušně uzavřeny (zavařeny svařovacími kleštěmi). Takto připravené vzorky byly uloženy do stabilizní komory při teplotě 25 °C a 60 % relativní vlhkosti. Ve zvolených časových intervalech 0, 3 a 6 měsíců byly vzorky odebrány a podrobeny stanovení počtu živých buněk v tabletě. Současně byla stanovena i vodní aktivita tablet.

## 5.5.2 Výroba probiotických kapslí

Výroba kapslí s obsahem probiotických kultur byla připravena dle tabulky (Tab. 4). Pro výrobu kapslí byl vybrán speciální typ škrobu určený pro látky citlivé na vodu. Tento typ škrobu standardně disponuje nízkou vodní aktivitou ( $< 0,025$ ). Zároveň tento škrob špatně váže vodu a udržuje si tak nízkou vodní aktivitu i při delším kontaktu se vzduchem. Rychlost adsorpce vody na materiál pak závisí na podmínkách okolního prostředí (teploty, relativní vlhkost) a na aktuální vodní aktivitě škrobu.

Odvážené a přesáté suroviny byly ručně homogenizovány, na závěr byl přidán stearan hořečnatý a kapslovina byla znovu důkladně promíchána. Ihned po namíchání byla proměřena vodní aktivita připravené kapsloviny. Kapslovina je vyhovující, pokud je vodní aktivita  $< 0,1$ . Výsledný homogenizát byl plněn na poloautomatickém kapslovacím zařízení Capsugel do transparentních HPMC kapslí velikosti 1.

Tab. 4: Složení kapslí s obsahem probiotik

Surovina	%	Hmotnost (mg)/cps.
Kukuřičný škrob	85,57	260,20
Lactobacillus plantarum	4,50	12,00
Lactobacillus paracasei	9,00	25,00
Stearan hořečnatý	0,93	2,80
<b>Celkem</b>	<b>100,00</b>	<b>300,00</b>

Takto připravené kapsle byly zavařeny do hliníkových sáčků a uloženy do stabilizní komory při 25 °C a 60% relativní vlhkosti. Ve stanovených časech 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 a 24 byly odebrány vzorky na stanovení počtu cfu jednotek (dle Miles – Misra metody) a vodní aktivity, která byla stanovována na zařízení AquaLab 4TE.

## 5.6 Primární balení probiotických přípravků

### 5.6.1 Srovnání používaných blistrovacích fólií

#### 5.6.1.1 Výběr blistrovací fólie

*Pro sledování závislosti počtu životaschopných probiotických buněk ve finální formulaci balené v různých typech blistrů byly použity vybrané fólie dle tabulky (Tab. 5).*

*Tab. 5: Seznam používaných blistrovacích fólií*

<b>Typ fólie</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Složení vrstev</b>
PVC (jednovrstevná)	Ergis-eurofilms	PVC
PVDC (duplex)	Klöckner	PVC/PVDC
Triplex PVDC	Klöckner	PVC/PVDC/PVC
Triplex PE	Gallazzi	PVC/PE/PVDC

#### **5.6.1.2 Příprava pevné lékové formy**

Pro srovnání blistrovacích fólií byly připraveny kapsle s obsahem probiotické směsi dle složení uvedeného v tabulce (Tab. 6). Odvážené a přesáté suroviny byly ručně homogenizovány, na závěr byl přidán stearan hořčnatý a kapslovina byla znovu důkladně promíchána. Výsledný homogenizát byl plněn na ručním kapslovacím zařízení do transparentních HPMC kapslí velikosti 1.

*Tab. 6: Složení pevné lékové formy pro test srovnání blistrovacích fólií*

<b>Surovina</b>	<b>%</b>	<b>Hmotnost (mg)/cps.</b>
Kukuřičný škrob	85,57	260,20
Lactobacillus plantarum	4,50	12,00
Lactobacillus paracasei	9,00	25,00
Stearan hořčnatý	0,93	2,80
<b>Celkem</b>	<b>100,00</b>	<b>300,00</b>

#### **5.6.1.3 Blistrování vzorků**

Blistrování produktu probíhalo na blistrovacím zařízení KWANG. Pro blistrování byly nastaveny podmínky dle doporučení dodavatele příslušné fólie. Druhá část blistru byla tvořena hliníkovou fólií o tloušťce 0,020 mm. Po zablistrování byla provedena zkouška těsnosti blistru.

#### **5.6.1.4 Stabilitní hodnocení vzorků balených do různých blistrovacích fólií**

Připravené blistry byly řádně označeny a vloženy do stabilitní komory. Stabilitní komora byla nastavena dle parametrů pro dlouhodobou stabilitní studii; tj. 25°C a 60% vlhkosti (dle Českého lékopisu 2009, Doplněk 15).

V předem stanovených intervalech 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 23, 35, 46 a 60 týdnů byly odebrány vzorky na stanovení vodní aktivity. Pro získání přesnějších výsledků byla vodní aktivita stanovována pro kapslovinu ze čtyř vysypaných kapslí a pro prázdné vysypané kapsle. Měření vodní aktivity bylo prováděno na zařízení AquaLab 4TE, vždy při 25°C. V posledním stabilním bodě byl stanoven počet životaschopných buněk.

## 5.7 Statistické zpracování výsledků

Na vyhodnocení byl použit Studentův dvouvýběrový nepárový T-test. Tento test dokáže určit, zda dvě normální rozdělení mající stejný rozptyl, z nichž pochází dva nezávislé výběry, mají stejné střední hodnoty. Tedy že pocházejí z jednoho stejného vzorku. Shodnost rozptylů byla ověřena F-testem. Pokud výsledná hodnota  $p > 0,05$  jsou rozptyly obou dat stejné a může být použit T-test.

T-test je následně vypočítán podle vzorce:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{X_1X_2} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

kde:

$$S_{X_1X_2} = \sqrt{\frac{1}{2}(S_{X_1}^2 + S_{X_2}^2)}$$

$s_{x1}$  – směrodatná odchylka souboru 1

$s_{x2}$  – směrodatná odchylka souboru 2

$\bar{X}_1$  – průměr souboru 1

$\bar{X}_2$  – průměr souboru 2

$n_1$  – počet hodnot v souboru 1

$n_2$  – počet hodnot v souboru 2

Vypočítána hodnota byla srovnána jako s tabelovanými hodnotami pro hladinu významnosti 0,05 a převedena na p. Pokud  $p < 0,05$  jsou soubory ze skupin s odlišnou střední hodnotou – jsou tedy odlišné při 95% pravděpodobnosti.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Kultivace probiotické biofilmové kultury

Přehled vybraných nosičů pro studium tvorby biofilmu u vybraných probiotických kmenů a schopnost těchto kmenů tvořit biofilmovou vrstvu na nosiči je shrnuta v tabulce (Tab. 7).

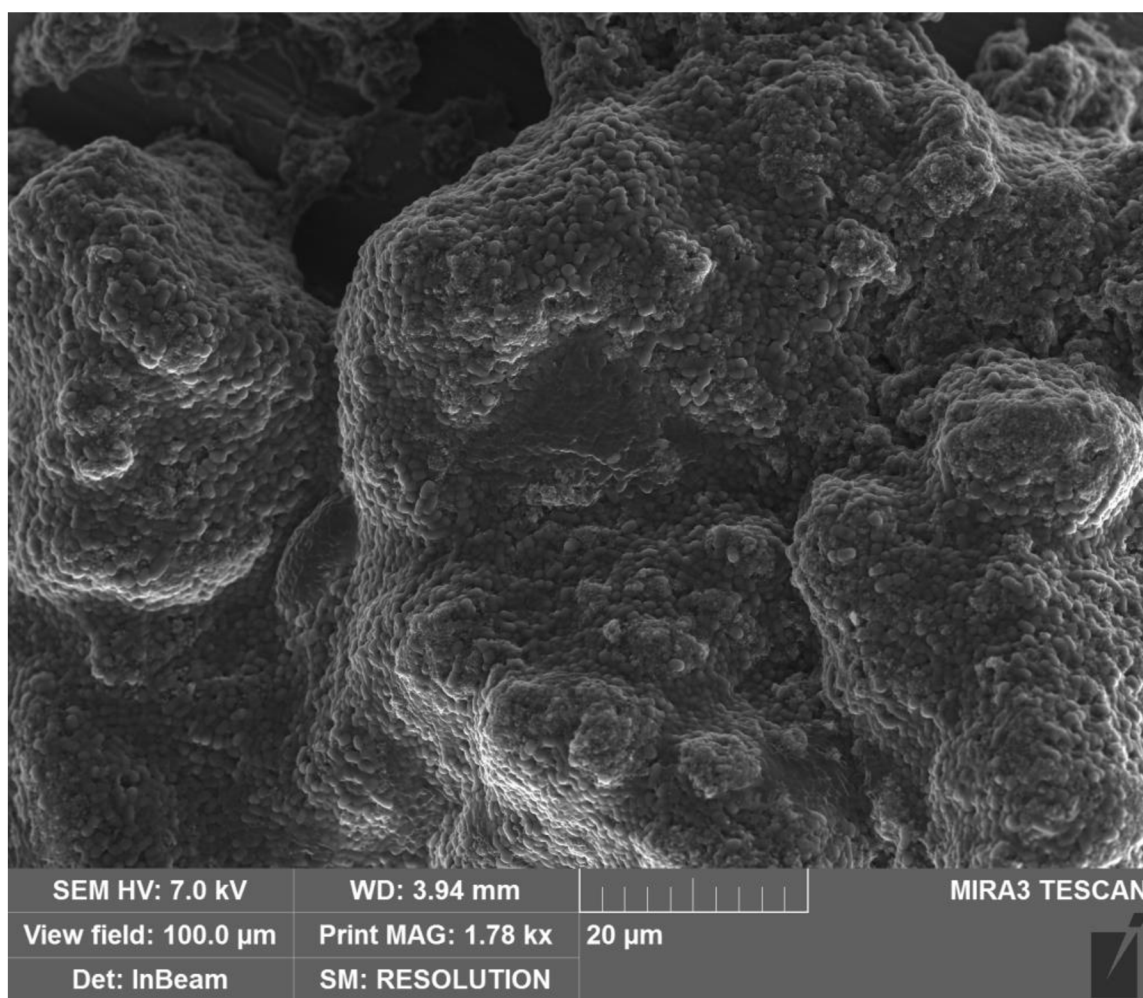
Tab. 7: Tvorba probiotického biofilmu (*L. acidophilus*, *B. longum* a *B. breve*) na vybraných nosičích

Vybraný nosič	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (CCM 4833)	<i>Bifidobacterium longum</i> (CCM 4990)	<i>Bifidobacterium breve</i> (CCM 3763)
<b>Polymery</b>			
copovidon	X	X	X
Alginát sodný	XX	XX	XX
Nanohedvábí	X	X	X
Bramborová vláknina	XX	XX	X
Karagenan	XX	X	X
Ovesná vláknina	XX	XX	XX
Kukuřičný škrob	X	X	X
<b>Zdroje minerálních látek</b>			
Fosforečnan vápenatý	X	X	X
Kaolín	X	X	X
Oxid křemičitý	XXX	XXX	X
<b>Komplexní potravinové matrice</b>			
Mouka hladká	X	X	X
Kroupy (jemně mleté)	X	X	X
Hrách (jemně mletý)	XX	X	XX
Čočka (jemně mletá)	X	X	X
Mák (jemně mletý)	X	X	X
Pohanka (jemně mletá)	XX	XX	XX

\* Data jsou hodnocena jako míra adheze probiotických buněk na nosič, kde X znamená nepřilnavost buněk na povrch, XX vyjadřuje nízkou míru adheze a XXX značí částečnou nebo plnou adhezi probiotických buněk na nosič.

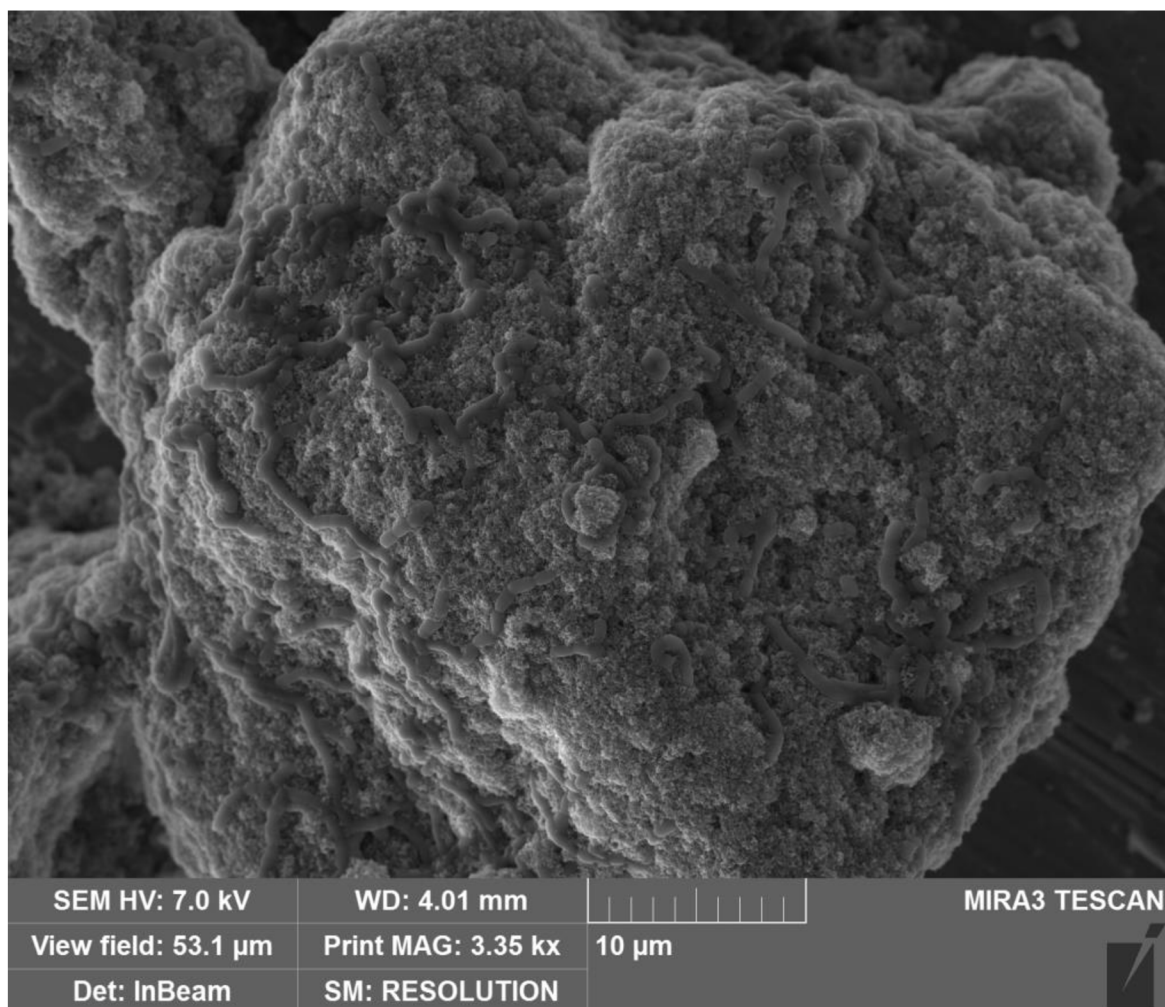
Ze všech testovaných materiálů pouze oxid křemičitý je nosičem, který umožňuje na svém povrchu tvořit biofilmovou vrstvu probiotických buněk, a to jak v případě kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, tak v případě *Bifidobacterium longum* CCM 4990

(Obr. 1). Kmen *Bifidobacterium breve* CCM 3763 netvořil biofilm na částicích oxidu křemičitého ani na jiných nosičích studovaných v této práci. Celá řada nosičů (alginát sodný, bramborová vláknina, ovesná vláknina a pohanka) vykazovala při prvotním sledování určitou míru adheze v přítomnosti *L. acidophilus* a *B. longum*. Tato adheze byla ale později identifikována spíše jako záchyt probiotických buněk do komplexní nebo polymerní struktury nosiče a adheze buněk byla vyloučena. Jev zachytávání buněk do struktury nosiče byl pozorován také v případě *B. breve* v kombinaci s alginátem sodným, ovesnou vlákninou, hrachem a jemně mletou pohankou.



a)





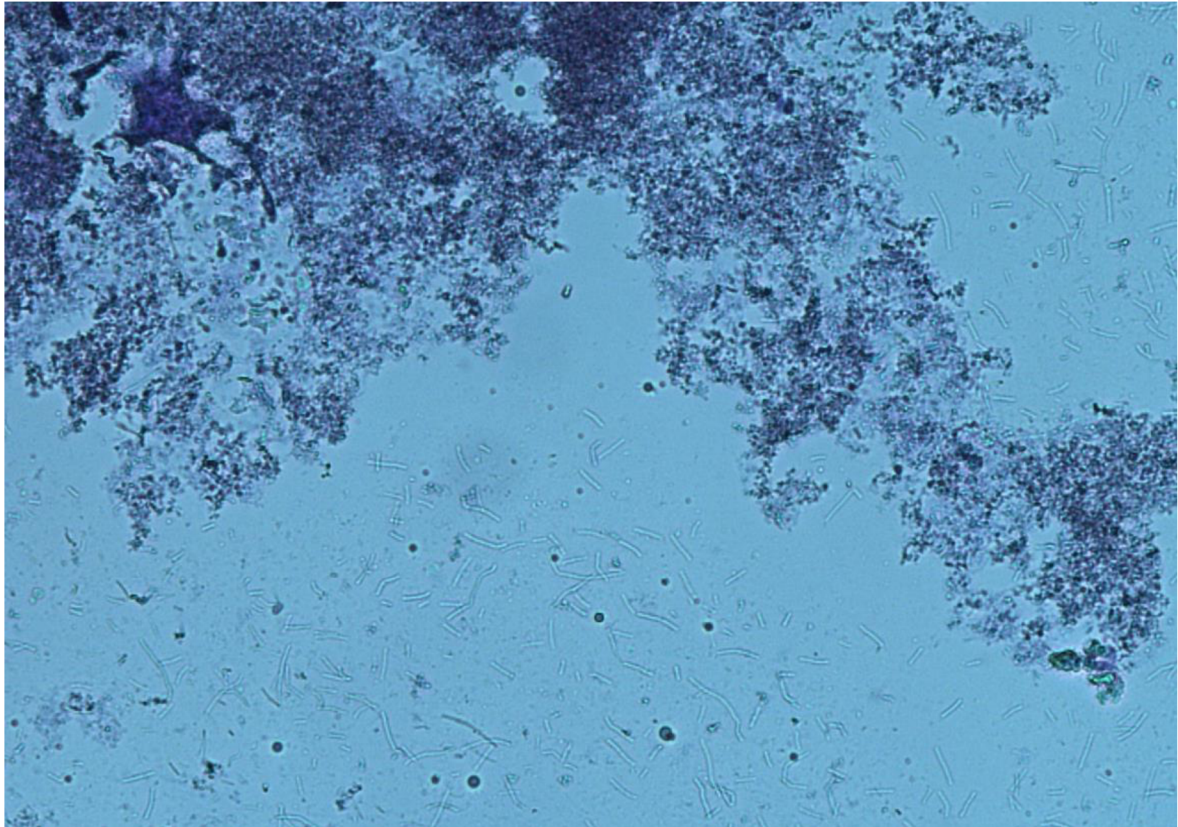
b)

Obr. 1: Fotografie biofilmu a) *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 a b) *Bifidobacterium longum* CCM 4990; pod elektronovým mikroskopem (MIRA3 Tescan) na částici oxidu křemičitého

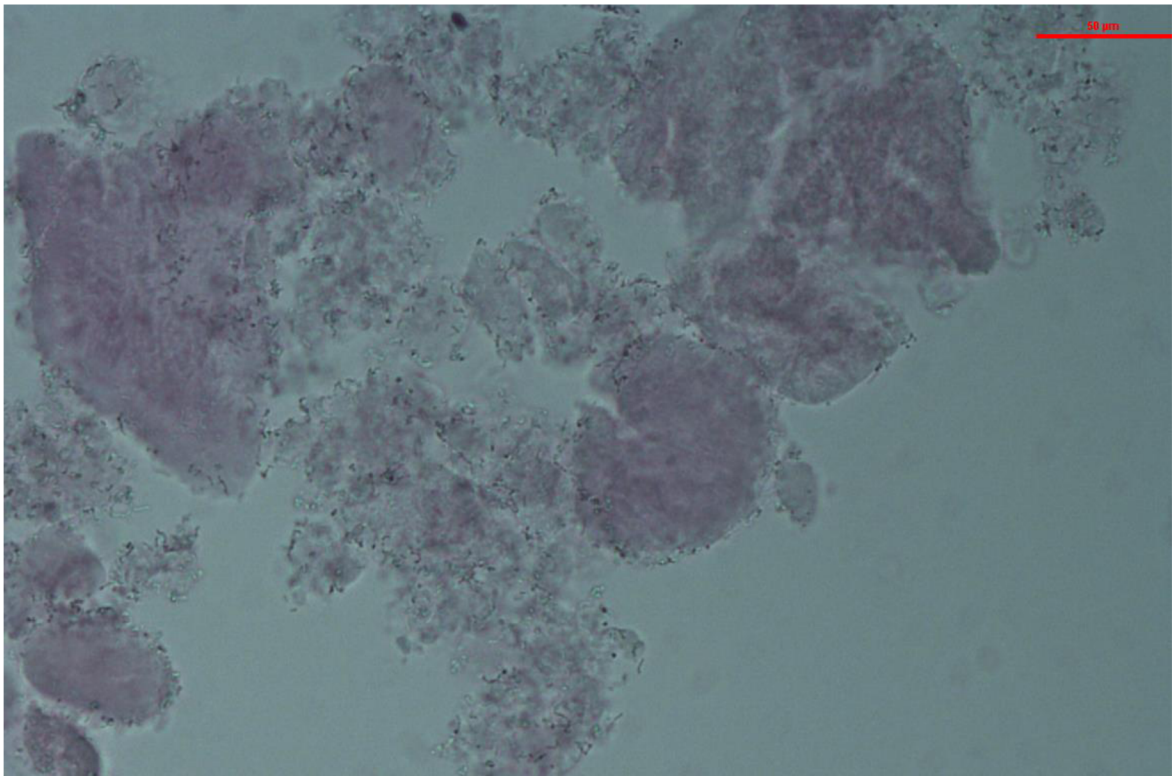
Celá řada nosičů ale naopak nevykazovala žádné znaky adherence probiotických buněk ani náznak zachytávání buněk do komplexní nebo polymerní struktury nosičů. Mezi takové nosiče patřil copovidon, nanohedvábí, kukuřičný škrob, fosforečnan vápenatý, kaolín, mouka, kroupy, mák nebo jemně mletá čočka. Na obrázku (Obr. 2) je patrný rozdíl mezi tvorbou biofilmu kmenu *L. acidophilus* na oxidu křemičitém a pozorování planktonické formy bakteriální kultury v přítomnosti kukuřičného škrobu, který se ukázal jako nevhodná částice pro tvorbu biofilmu.

Za adhezi bakteriální buňky na povrch nosiče je odpovědných několik parametrů, mezi něž se velkou měrou zasazuje zejména povrch probiotické buňky a vrchní vrstva nosiče. Výslednou vlastnost interagujících povrchů pak zajišťuje součet nespecifických a specifických interakcí. Mezi nespecifické interakce jsou řazeny zejména elektrostatické a hydrofobní síly, sterické stínění, van der Waalsovy síly, teplota, pH nebo hydrodynamické síly (194). Nespecifické

interakce jsou vedeny přes strukturní výběžky buněčné stěny (pili). Tyto struktury jsou řízeny geneticky (195). Tvorba biofilmu byla již dříve popsána a intenzivně studována v případě patogenních mikroorganismů, v této práci ale bylo ověřeno, že i prospěšné probiotické bakterie mají genetickou výbavu a mohou syntetizovat proteinové struktury na povrchu svých buněk. Tyto struktury mohou být následně využity při adhezi na pečlivě vybraný abiotický povrch ve formě volného nosiče, jehož použití dovoluje evropská legislativa do doplňků stravy a dietetických veterinárních přípravků.



a)



b)

*Obr. 2: Sledování tvorby biofilmu kmene *L. acidophilus* CCM 4833 v přítomnosti a) kukuřičného škrobu, b) oxidu křemičitého; pod optickým mikroskopem NIKON Eclipse E 400. Probiotické buňky byly vizualizovány barvením dle Grama.*

Naše studie také potvrdila, že schopnost adheze buněk na nosič a následná tvorba biofilmu je kmenově specifická vlastnost bakteriálního kmene. Některé probiotické buňky pravděpodobně nemají genetickou výbavu na to, aby mohly přilnout k abiotickému povrchu a tvořit na něm souvislý biofilm. V průběhu testování se nepodařilo nalézt kmeny, které by vykazovaly stejné vlastnosti adheze na všech vybraných površích. Tato hypotéza byla podložena již dříve dalšími autory, kteří studovali formování biofilmu na polystyrenových mikrodestičkách (196) nebo krycích sklíčkách (197).

## **6.2 Sledování životaschopnosti probiotických biofilmových buněk v simulovaném prostředí zažívacího traktu**

Probiotické mikroorganismy mohou mít prospěšný efekt na zdraví hostitele, pokud jsou dodávány v adekvátním množství do zažívacího traktu hostitele. Právě adekvátní množství je kritickým parametrem. Zažívací trakt hostitele disponuje celou řadou ochranných mechanismů, které mají škodlivý vliv na mikrobiální buňky a často dochází k jejich úhynu. Nejvýznamnější vliv na úhyn buněk má kyselé prostředí žaludku a přítomnost žluči a

žlučových kyselin v tenkém střevě. Odolnost vůči těmto prostředím je zásadní při transportu probiotických buněk do místa určení – tlustého střeva hostitele (198).

### **6.2.1 Vliv roztoku kyselých solí na viabilitu biofilmových buněk**

Probiotické bakterie ve formě biofilmu mají vyšší toleranci ke kyselému solnému roztoku, který navozuje v experimentu prostředí žaludku, než planktonická forma buněk. Výsledky srovnávacího testu jsou uvedeny v tabulce (Tab. 8).

Při pH 1 byla vyšší životaschopnost u biofilmových buněk sledována ve všech studovaných případech. Nejvyšší rozdíl životaschopnosti biofilmu a planktonické formy byl sledován v čase 120 minut, kdy planktonická forma vykazovala pouze  $71,9 \pm 3,2$  % živých buněk, ale biofilmová probiotika si zachovala  $90,5 \pm 0,1$  % své životaschopnosti.

Při zvýšení pH (pH 2) byla zaznamenána určitá zvýšená tolerance planktonických buněk k prostředí. Tato adaptace planktonických buněk byla sledována po 30 minutách inkubace vzorku. Výsledné hodnoty pro vzorek obohacený nosičem a bez něj se statisticky nelišily na zvolené hranici významnosti ( $p > 0,05$ ). Při delším působení kyselého prostředí již docházelo k poklesu počtu živých buněk v případě kultury bez nosiče, kdežto biofilmová kultura vykazovala resistenci vůči kyselému pH 2. Nejvyšší pokles buněk v kultuře bez nosiče byl sledován po 120 minutách inkubace, kdy počet živých buněk poklesl na  $75,5 \pm 2,3$  %, kdežto biofilmová kultura stále obsahovala  $90,7 \pm 0,4$  % živých buněk.

Při dalším navýšení pH (pH 3) byla znovu sledována zvýšená odolnost k přítomnému prostředí. Po 60 minutách působení byla sledována statistická shodnost výsledků na zvolené hladině významnosti ( $p > 0,05$ ). Po 60 minutové inkubaci obsahovala planktonická kultura  $88,4 \pm 1,3$  % živých buněk a biofilmová kultura vykazovala  $94,8 \pm 0,4$  % životaschopných buněk. Nevyšší rozdíl byl opět pozorován při působení kyselého prostředí po dobu 120 minut.

Tab. 8: Sledování životaschopnosti buněk po působení kyselého roztoku (pH 1, 2, 3)

pH	Doba [minuty]	Změna viability buněk bez nosiče [%]	Změna viability buněk s nosičem [%]
1	30	75,5 ± 1,8	95,7 ± 0,4
	60	71,9 ± 3,2	93,2 ± 0,2
	120	71,9 ± 3,2	90,5 ± 0,1
2	30	(85,5 ± 3,2) <sup>a</sup>	(95,6 ± 2,6) <sup>a</sup>
	60	86,5 ± 1,5	91,8 ± 0,3
	120	75,5 ± 2,3	90,7 ± 0,4
3	30	84,7 ± 2,3	94,8 ± 0,3
	60	(88,4 ± 1,3) <sup>b</sup>	(94,8 ± 0,4) <sup>b</sup>
	120	75,5 ± 1,8	93,8 ± 0,7

\* Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky odlišné na dané hladině významnosti ( $p > 0,05$ ).

Tímto testem byla potvrzena hypotéza, že probiotická kultura roste na volném nosiči může vykazovat vyšší počet živých buněk po působení kyselého prostředí než kultivace submerzní. Ve všech studovaných případech bylo u planktonických vzorků po 120 minutách kolem 72 % živých buněk, ale v biofilmových vzorcích přesahovala životaschopnost buněk 90 %. Rozdíl v počtu živých buněk mezi planktonickou a biofilmovou formou se pohyboval kolem 15 %. Tyto výsledky podporují dřívější publikace, které sice nepopisují biofilm na volném nosiči, ale pouze dostatečně koncentrované imobilizované buňky. Tyto buňky jsou následně schopny indukovat mezibuněčnou komunikaci nazývanou „quorum sensing“, která spouští jak mechanické, tak geneticky řízené procesy na obranu buněčné komunity při měnících se podmínkách prostředí (199).

Test dále prokázal závislost přežívání buněk na pH okolního prostředí. Nebyla ale prokázána lineární závislost poklesu počtu živých buněk s poklesem pH ani u jednoho ze studovaných vzorků.



### 6.2.2 Vliv extraktu žluči na viabilitu biofilmových buněk

Sledování životaschopnosti probiotických buněk biofilmu při působení žluči bylo srovnáno s viabilitou planktonických buněk za stejných podmínek. Výsledky srovnání jsou uvedeny v tabulce (Tab. 9).

Tab. 9: Sledování životaschopnosti buněk po působení 0,3% roztoku prasečí žluči

Doba [minuty]	Změna viability buněk	
	bez nosiče [%]	s nosičem [%]
0	100,0 ± 1,6	100,0 ± 0,7
60	78,9 ± 1,8	97,5 ± 1,0
120	77,3 ± 0,7	95,6 ± 1,9
180	74,2 ± 1,4	97,0 ± 1,2
240	68,2 ± 1,1	98,2 ± 1,0

Probiotické mikroorganismy jsou schopné odolávat určité koncentraci žluči, což vychází zejména z předpokladu, že musí projít zaživacím traktem, který takové podmínky standardně udržuje. Tolerance vůči žluči u probiotických mikroorganismů se liší v rámci jednotlivých druhů (200) a závisí především na původním biotopu, ze kterého byl daný kmen či druhu izolován. Dnes je již známo, že kmeny izolované ze zaživacího traktu lidské populace mají vyšší schopnost přežít než probiotické buňky izolované z jiných zdrojů (201).

V předložené práci přítomnost žluči významně понížila počet životaschopných buněk. S přibývajícím dobou expozice se téměř lineárně snižovala životaschopnost planktonických buněk. Po 240 minutovém působení poklesl počet životaschopných buněk o více jak 30 % (68,2 ± 1,1 %). Tento fenomén ale nebyl zaznamenán v případě biofilmové probiotické kultury. Kultura doplněná nosičem vykazovala po celou dobu hodnocení vysoké procento životaschopnosti buněk a procento živých buněk nekleslo pod 95 % (95,6 ± 1,9%; po 120 minutách). Zatímco úhyn planktonických buněk vykazoval lineární pokles, biofilmové buňky si udržovaly téměř konstantní míru poklesu po celou dobu sledování. Po 240 minutovém působení byla naměřena životaschopnost buněk v biofilmu 98,2 ± 1,0 %.

Tyto výsledky předpovídají, že probiotické mikroorganismy mohou za určitých podmínek disponovat stejnými vlastnostmi jako například komenzální mikroorganismy nebo patogeny.

Tyto mikroorganismy cíleně tvoří biofilm na různých organických i anorganických strukturách a chrání své buňky před kontaktem se škodlivými vlivy vnějšího prostředí (202).

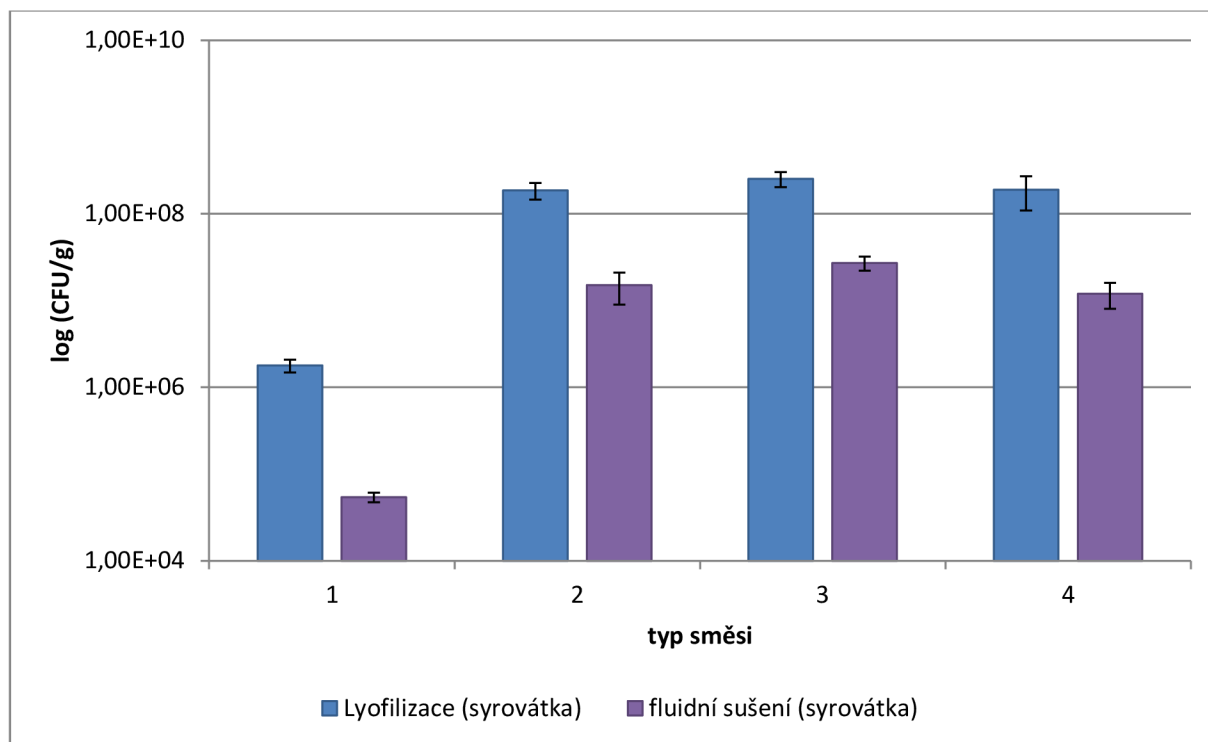
### **6.3 Zpracování biofilmových probiotických kultur pro farmaceutické účely**

#### **6.3.1 Srovnání účinnosti lyofilizace a fluidního sušení pro probiotické směsi**

Pro zpracování tekuté kultury lze použít celou řadu sušících technik. Pro tuto práci byly vybrány dvě sušící techniky – lyofilizace a fluidní sušení. Pro srovnání těchto metod byly připraveny kultivace bakteriální kultury *L. acidophilus* a následně byly sušeny v kombinaci s protektivními činidly. Výsledky srovnání lyofilizace a fluidního sušení v případě, že kultura vyrůstala na sladké syrovátce, jsou uvedeny v grafu (Graf 2). Lyofilizace je šetrnější technikou pro průmyslovou výrobu práškových probiotických směsí. Ovšem lyofilizace i fluidní sušení musí být provedeno za přítomnosti protektivních látek v médiu. Mezi vybranými kombinacemi protektivních látek není patrný významný rozdíl při lyofilizačním sušení a výsledné hodnoty koncentrace živých buněk se pohybují kolem hodnoty  $2,0 \cdot 10^8$  cfu/g sušené směsi.

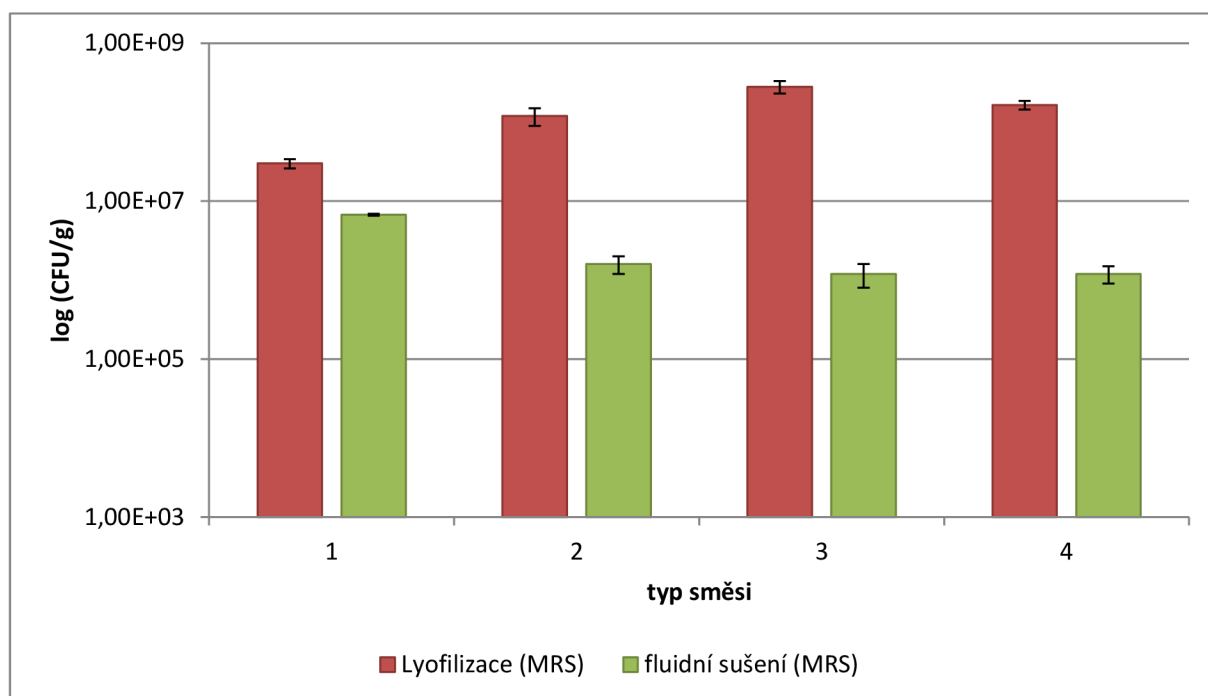
Mírné rozdíly jsou pozorovány mezi směsmi použitými pro fluidní sušení. V tomto případě byla nejvyšší životaschopnost buněk naměřena u kombinace MCC, HPMC a manitolu a dosahovala k hodnotě  $(2,7 \pm 0,5) \cdot 10^7$  cfu/g sušené směsi. Manitol je obecně užívanou protekční látkou při sušení probiotik (204, 205) Výběr vhodného protekčního média je ovšem kritický u obou metod. Kombinace MCC a HPMC vede k poklesu počtu buněk během procesu sušení.

Při srovnání lyofilizace a fluidního sušení jsou již patrné významné rozdíly. V případě sušení směsi doplněné o manitol dosahuje rozdíl počtu živých buněk po stanovení 91%, u směsi obsahující inositol byl sledován pokles živých buněk téměř o 94%.



Graf 2: Srovnání metody sušení probiotické kultury s nošičem lyofilizací a fluidním sušením. Kultura *L. acidophilus* roste na sladké syrovátce byla sušena ve směsi 1) s MCC (kontrola), 2) ve směsi s HPMC, 3) v kombinaci MCC, HPMC a manitol a 4) MCC, HPMC a inulin.

Podobné výsledky byly získány i v případě, že kultura *L. acidophilus* vyrůstala na syntetickém médiu (Graf 3). Zatímco při fluidním sušení jsou jen patrné mírné rozdíly v počtu živých buněk u sledovaných protekčnických médií, u lyofilizace byl naměřen nejvyšší počet živých buněk v médiu obsahujícím pouze MCC a HPMC ( $(2,8 \pm 0,5) \cdot 10^7$  cfu/g).





*Graf 3: Srovnání metody sušení probiotické kultury s nošičem lyofilizací a fluidním sušením. Kultura L. acidophilus roste na syntetickém MRS médiu byla sušena ve směsi 1) s MCC, 2) ve směsi s HPMC, 3) v kombinaci MCC, HPMC a manitol a 4) MCC, HPMC a inulin.*

Dále byl pozorován vliv kultivačního média probiotického kmene (Tab. 10). Syntetické MRS médium negativně ovlivňuje fluidní sušení bakteriálního kmene. Dle předložených výsledků došlo k poklesu počtu živých buněk za přítomnosti MRS média při fluidním sušení až o 96% ve srovnání se sladkou syrovátkou ve směsi s MCC, HPMC a manitolem.

*Tab. 10: Srovnání viability probiotických buněk po sušení za použití různých protektivních a kultivačních médií*

proces sušení kultivační médium	lyofilizace		fluidní sušení	
	MRS	syrovátka	MRS	syrovátka
MCC	$(3,0 \pm 0,4) \cdot 10^7$	$(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(6,7 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(5,4 \pm 0,7) \cdot 10^4$
MCC, HPMC	$(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^8$	$(1,9 \pm 0,4) \cdot 10^8$	$(1,6 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^7$
MCC, HPMC, manitol	$(2,8 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(2,5 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(2,7 \pm 0,5) \cdot 10^7$
MCC, HPMC isomalt	$(1,65 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(1,9 \pm 0,8) \cdot 10^8$	$(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^7$

Vyšší počet živých buněk v syrovátkovém médiu je pravděpodobně způsoben komplexností použitého média. Syrovátka obsahuje komplex přírodních látek, z nichž některé mohou plnit funkci doplňkového protektiva a tím se významně liší od nakupovaných syntetických médií (206).

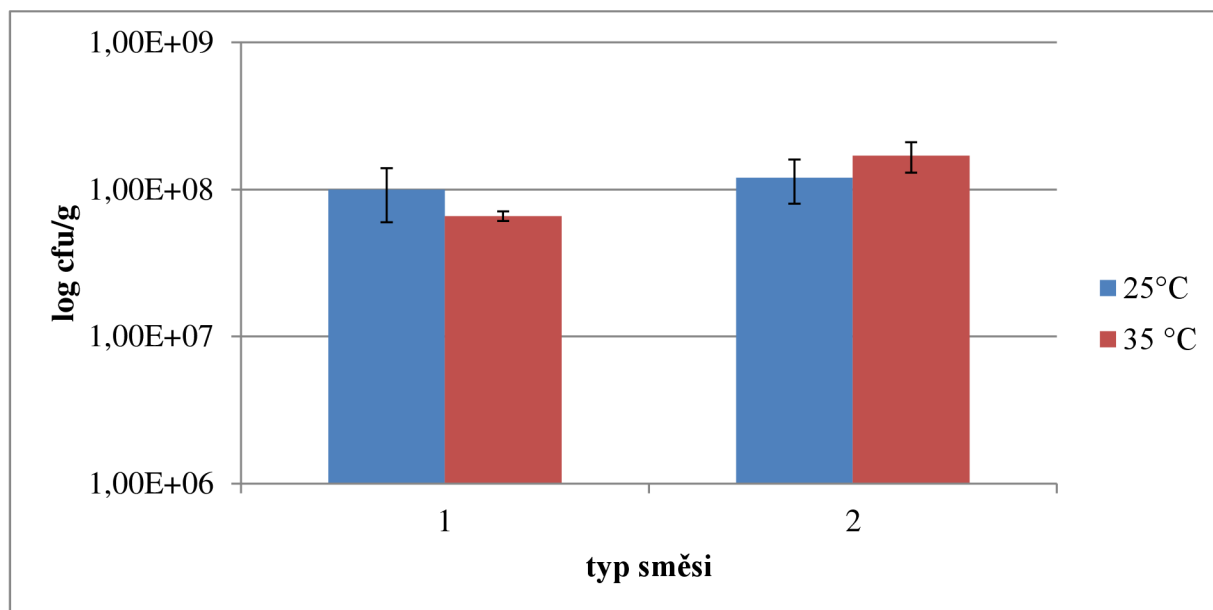
Při tomto testu byl obecně sledován nižší počet živých buněk po fluidním sušení. Pokles životaschopnosti buněk může být způsoben dlouhým procesem sušení při relativně vysoké teplotě v kombinaci s vysokou vlhkostí. Další nevýhodou metody je vysoká vodní aktivita, která po fluidním sušení zůstává v produktu a pro dlouhodobé skladování by bylo nutné volnou vodu z produktu odsušit.

### 6.3.2 Vliv teploty fluidní sušárny na produkt

Pro fluidní sušení je ideální vysoká teplota. V případě probiotických přípravků, které jsou citlivé na vyšší teplotu, je nutné tento parametr důsledně kontrolovat, zejména pokud jsou probiotika vystaveny vyšší teplotě v kombinaci s vysokou vodní aktivitou. Z tohoto důvodu byl sledován vliv teploty a délky sušení na výsledný počet živých buněk po sušení.

Graf 4 prezentuje získané výsledky. Za použití teploty 25°C nebyl pozorován významný rozdíl mezi počtem živých buněk v závislosti na použitém protektivním médiu. Vliv

protektivního média byl zaznamenán při 35°C, kdy vzorek doplněný o manitol vykazoval o 61 % vyšší počet živých buněk  $((1,7 \pm 0,4) \cdot 10^8 \text{ cfu/g})$  než formulace bez manitolu  $((6,6 \pm 0,5) \cdot 10^7 \text{ cfu/g})$ .

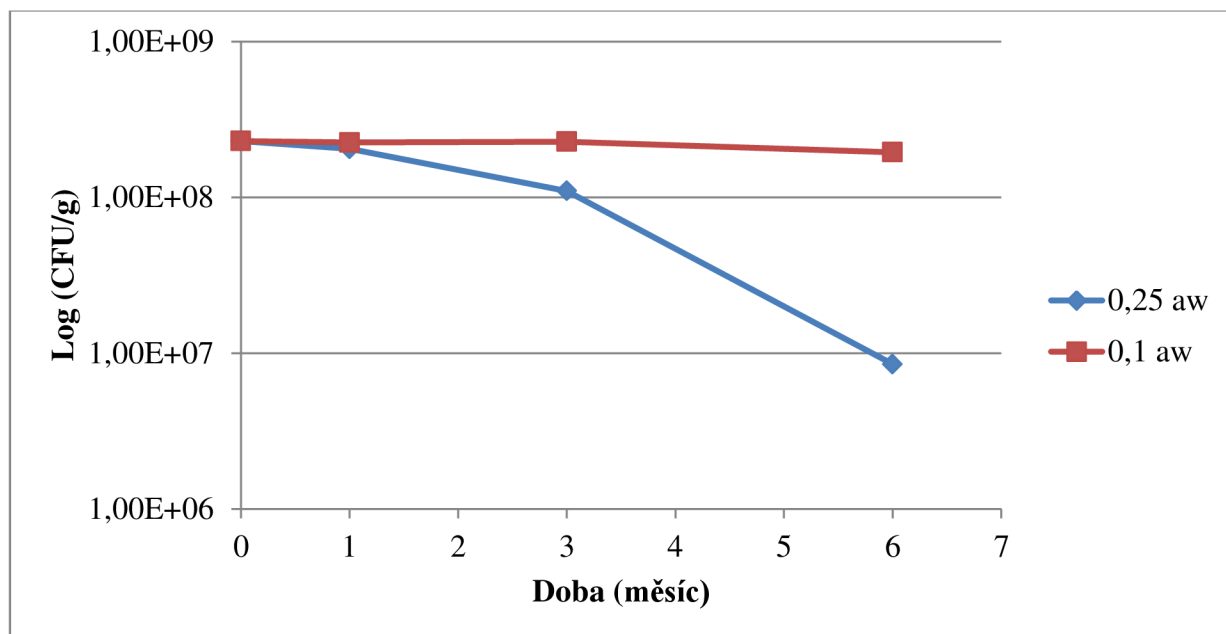


Graf 4: Vliv teploty a délky sušení na počet cfu jednotek v sušené směsi doplněné (i) o MCC a HPMC a (ii) o MCC, HPMC a manitol

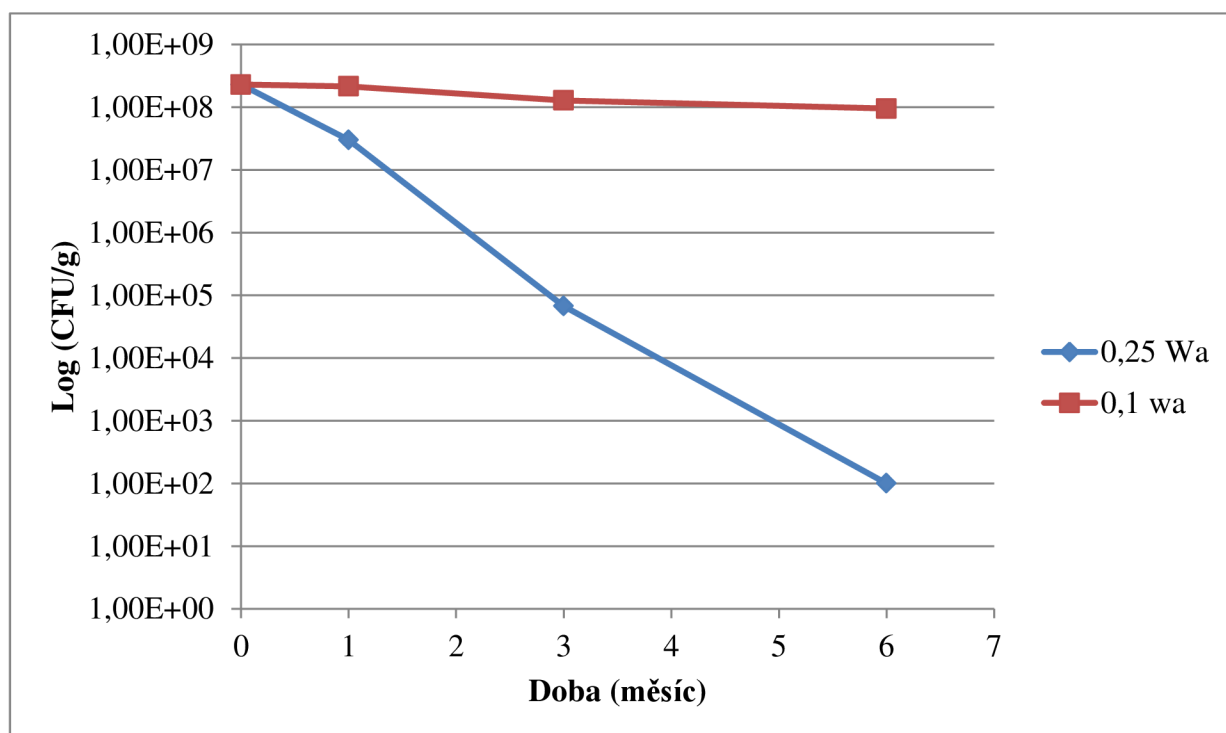
Ve formulaci obsahující manitol je mírně patrný vliv teploty na výslednou viabilitu buněk. Počet živých buněk po fluidním sušení při 25°C po dobu 3,5 hodiny byl  $(1,2 \pm 0,4) \cdot 10^8 \text{ cfu/g}$ , kdežto po 2 hodinovém fluidním sušení při teplotě 35°C by počet živých buněk stanoven na  $(1,7 \pm 0,4) \cdot 10^8 \text{ cfu/g}$ . Teplota sušení zřejmě nemá takový význam a spíše se projevuje v kombinaci s vodní aktivitou a délkou sušení. Proto lze říci, že pro sušení probiotik je vhodnější teplota 35°C, která zajistí kratší čas sušení a zamezí tak dlouhodobé expozici bakteriálních buněk dostupné vodě v produktu.

### 6.3.3 Srovnání vlivu teploty skladování a vodní aktivity na životaschopnost probiotických buněk

Cílem testu bylo sledování schopnosti přežívání probiotických buněk při různých skladovacích podmínkách a za různých podmínek vodní aktivity.



Graf 5: Sledování počtu životaschopných buněk v probiotiku při různých vodních aktivitách směsí skladovaných v lednici (2-8°C)



Graf 6: Sledování počtu životaschopných buněk v probiotiku při různých vodních aktivitách směsí skladovaných při 25°C.

Závislost přežívání probiotických přípravků závisí na teplotě skladování. Pokud je udržována nízká teplota 2-8°C, jsou probiotické buňky schopny přežít. Po 6 měsících obsahovaly vzorky skladované v lednici více jak  $5 \cdot 10^6$  cfu/g (Graf 5). Tato hodnota splňuje kritérium dané evropskou legislativou na probiotický přípravek.

Přežívání probiotických buněk může být zvýšeno udržením nízké vodní aktivity i při skladování za vyšších teplot (Graf 6). Pokud byl vzorek skladován při 25°C a nízké vodní aktivitě (0,1), poklesla životaschopnost buněk o 59 % ( $9,5 \cdot 10^7$  cfu/g). Jakmile byla vodní aktivita zvýšena na 0,25, uhynulo téměř 100% probiotických buněk ( $< 1,0 \cdot 10^2$  cfu/g). Kombinace nízké teploty a nízké vodní aktivity je nejvhodnější pro skladování probiotických přípravků. Při skladování v lednici a vodní aktivitě 0,1 byl po 6 měsících sledován pokles v životaschopnosti buněk pouze 3% ( $2 \cdot 10^8$  cfu/g). Při vodní aktivitě 0,25 byl sledován razantnější pokles (o 15%), ale ve srovnání se vzorky skladovanými při pokojové teplotě, je viabilita buněk vyšší.

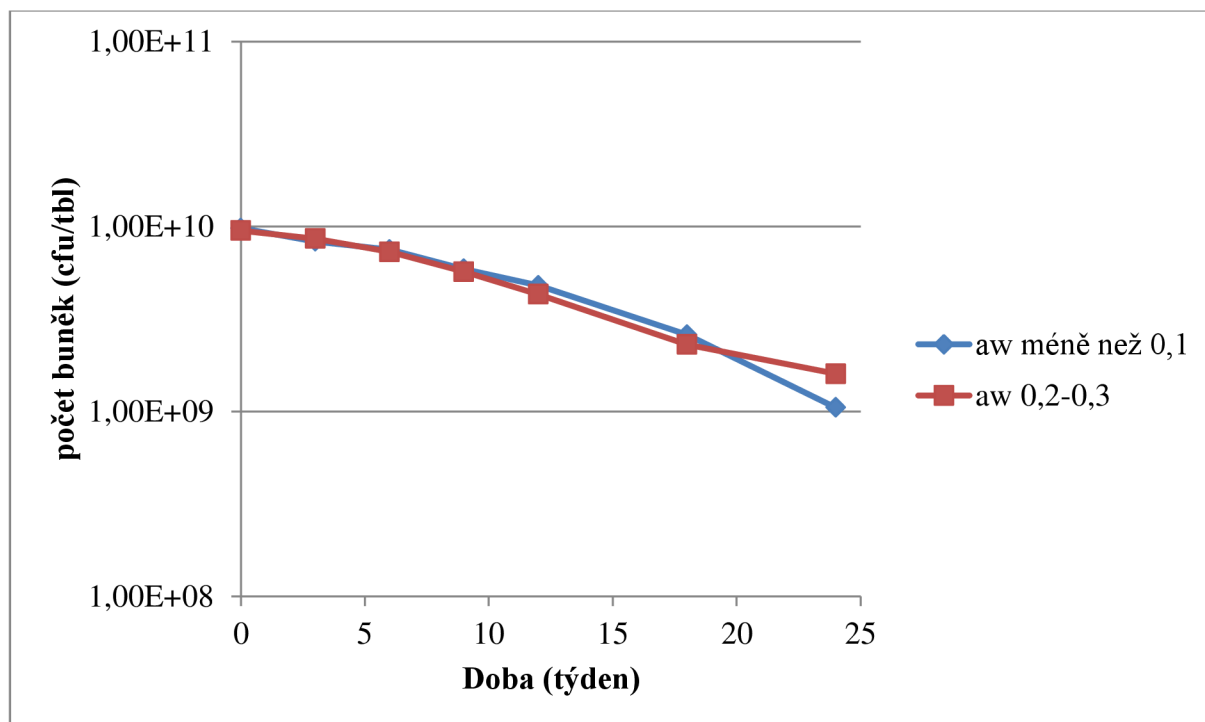
Získané výsledky dokládají, že pokud je nutné skladovat probiotické přípravky po delší časový úsek za pokojové teploty, je zároveň nutné snížit vodní aktivitu skladovaného produktu či vzorku. Tento fakt významně ovlivňuje výběr obalových materiálů pro probiotické přípravky zejména ve formě doplňků stravy. Při výběru primárních obalových materiálů je nutné tedy zajistit, aby probiotické přípravky měly na vstupu před balením nízkou vodní aktivitu (pod 0,15) a byly baleny do materiálů nepropustných pro vodní páru a kyslík.

## **6.4 Technologie lékových forem**

### **6.4.1 Výroba probiotických tablet**

#### ***6.4.1.1 Vliv vodní aktivity vstupní tabletoviny na stabilitu výsledného produktu***

Výsledky stanovení počtu živých buněk v tabletě, která je připravena z vysušené tabletoviny ( $a_w < 0,1$ ) a nevysušené tabletoviny ( $a_w 0,2-0,3$ ), v průběhu skladování jsou uvedeny v grafu (Graf 7).



Graf 7: Životaschopnost buněk v tabletě připravené z tabletoviny o vodní aktivitě <0,1 a z tabletoviny o vodní aktivitě 0,2 - 0,3.

Stabilitní hodnocení prokázalo, že počet životaschopných buněk se v uvedených případech neliší a lze tedy vyrábět tablety jak z tabletoviny, která byla předem vysušena (aw 0, 1), tak i z tabletoviny, která při tabletování měla vyšší hodnoty vodní aktivity (aw 0,2-0,3). Současně bylo doloženo, že krátkodobé vystavení probiotické kultury vyšší vodní aktivitě (do 0,3) nemá významný vliv na následnou stabilitu v průběhu skladování.

V rámci technologie výroby tablet je z praktického hlediska snadnější připravit tabletovinu, která je vysušena na hodnotu menší než 0,3 aw. Takto lehce prosušená směs nenasává tak rychle vlhkost z prostředí (do 25°C; do 30% vlhkosti) a s takto upravenou surovinou je tedy snadnější manipulace.

Práce s již vysušeným materiálem (aw 0,1) je nerealizovatelná ve standárním farmaceutickém velkoobjemovém procesu výroby. Tabletovina je složena z materiálů, které vysoce absorbují vodu a rychle dosahují rovnováhy vodní aktivity mezi sledovaným materiálem a prostředím a hodnota vodní aktivity rychle dosahuje přibližně na 0,3.

#### 6.4.1.2 Stanovení poklesu počtu živých buněk během procesu výroby tablet

Veškeré nakládání s probiotickým kmenem znamená obecně úhyn části probiotické kultury a to zejména vlivem mechanického namáhání nebo teploty a vlhkosti. Sledování krátkodobé expozice vlhkosti během procesu tabletování bylo diskutováno v kapitole 6.4.1.2.

V této kapitole je sledováno, jak se změní počty živých buněk, podléhá-li probiotická kultura základnímu procesu technologického zpracování – síťování a homogenizace či tabletování.

Na základě stanovení počtu cfu jednotek u zdrojových probiotických kmenů byl stanoven počáteční teoretický počet cfu jednotek v tabletě ( $1,8 \cdot 10^{10}$  cfu/tbl.) Po síťování a homogenizaci poklesl počet cfu jednotek o 60 % ( $7,2 \cdot 10^9$  cfu/tbl.). Na závěr byl stanoven počet cfu jednotek ve finální tabletě o pevnosti 70 – 90 N. Tableta obsahovala pouze  $3,6 \cdot 10^9$  cfu/tbl., což představovalo pouze 20 % původního teoretického počtu živých buněk v tabletě.

Při teoretickém návrhu tablet je potřeba počítat s poklesem počtu živých buněk vlivem technologického zpracování. Tento pokles byl na základě testu vypočítán na 80% a pro standardní farmaceutickou výrobu je proto nutné pracovat při teoretickém návrhu probiotických tablet s 80 – 100% navýšením počtu živých buněk.

#### 6.4.1.3 Hodnocení vlivu pevnosti tablety na počet živých buněk během tabletování

Výsledky technologických a mikrobiologických parametrů tablet s obsahem inositolu a mikrokrystalické celulózy ihned po tabletování jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 11) a (

Tab. 12).

Tab. 11: Parametry tablet s obsahem inositolu ihned po lisování

Číslo vzorku	pevnost [N]	lisovací síla [kN]	oděr [%]	výška tablety [mm]	aw před sušením	aw po sušení	cfu/tbl.
1a	$69 \pm 1$	2,3	0,50	$6,09 \pm 0,01$	0,15	0,05	$(9,2 \pm 0,3) \cdot 10^9$
2a	$87 \pm 2$	2,8	0,37	$5,98 \pm 0,02$	0,15	0,07	$(4,9 \pm 0,6) \cdot 10^9$
3a	$121 \pm 4$	3,2	0,25	$5,76 \pm 0,01$	0,15	0,05	$(7,4 \pm 0,3) \cdot 10^9$

Tab. 12 Parametry tablet s obsahem mikrokrystalické celulózy ihned po lisování

Číslo vzorku	pevnost [N]	lisovací síla [kN]	oděr [%]	výška tablety [mm]	aw před sušením	aw po sušení	cfu/tbl.
1b	$74 \pm 2$	2,1	0,55	$6,50 \pm 0,02$	0,15	0,10	$(8,3 \pm 0,5) \cdot 10^9$
2b	$93 \pm 5$	2,8	0,42	$6,32 \pm 0,04$	0,15	0,11	$(8,1 \pm 0,3) \cdot 10^9$
3b	$126 \pm 3$	3,0	0,35	$6,12 \pm 0,02$	0,15	0,10	$(7,3 \pm 0,6) \cdot 10^9$

V případě tabletoviny s isomaltem byl pozorován nejvyšší pokles počtu živých buněk ( $(4,9 \pm 0,6) \cdot 10^9$  cfu/tbl) ve vzorku tabletovaném při lisovací síle 2,8 kN ( $87 \pm 2$  N). Ačkoliv byl očekáván nejvyšší pokles počtu živých buněk v případě nejvyšší pevnosti/nejvyšší

lisovací síly, zde tento trend nebyl pozorován. Pokles počtu živých buněk mohl být způsoben vyšší vodní aktivitou, která po vysoušení zůstala v tabletě (0,7) oproti zbývajícím dvěma vzorkům. Může se ale také jednat o chybu, která vznikla v průběhu výroby nebo při nakládání se vzorkem před stanovením. Nejvyšší počet živých buněk byl dle očekávání naměřen u vzorku, který byl lisován silou 2,3 kN a výslednou pevností  $69 \pm 1$  N.

Tablety obsahující jako plnidlo mikrokrytalickou celulózu již vykazovaly lineární pokles počtu cfu jednotek při zvyšování lisovací síly. Zatímco při lisovací síle 2,1 kN (pevnost tablety  $74 \pm 2$  N) bylo v tabletě  $(8,3 \pm 0,5) \cdot 10^9$  živých buněk, při lisovací síle 3,0 kN obsahovala tableta pouze  $(7,3 \pm 0,6) \cdot 10^9$  živých buněk. V tomto případě bylo potvrzeno, že vyšší lisovací tlaky mají vliv na životaschopnost buněk v tabletě. Pokud ale vezmeme v úvahu rozdíly v počtu živých buněk pro jednotlivé pevnosti tablet, pokles počtu buněk pouze o 2 % byl pozorován při navýšení pevnosti tablety ze  $74 \pm 2$  N na  $93 \pm 5$  N. Pokles počtu buněk o dalších 10 % byl pozorován při navýšení pevnosti tablety z  $93 \pm 5$  N na  $126 \pm 3$ .

Dle získaných výsledků byla pro rutinní výrobu navržena pevnost tablet 70 – 80 N v případě, že je pomocnou látkou isomalt (cukerná složka). V případech, kdy plnidlem je mikrokrytalická celulóza (nebo podobná vláknina), se může pevnost pohybovat v rozmezí 70 – 90 N. Pevnost nižší jak 70 N nebyla testována. Tablety o pevnosti nižší než 70 N jsou příliš křehké a při dalším nakládání (oprašování, blistrování) může docházet k jejich rozbíjení či drolení, což vede ke znehodnocení tablet. Dále nebyla testována ani pevnost vyšší jak 120 N, kdy je již předpokládáno vysoké procento poklesu živých buněk vlivem lisování.

#### **6.4.1.4 Stanovení délky vysoušení tablet v závislosti na obsahu vysoušedla**

Vysoušení je důležitou součástí procesu výroby tablet, zvláště v případě, že připravovaná tabletovina má vodní aktivitu v rozmezí 0,1 – 0,3. Pro vysoušení tablet byla zvolena šetrná technika, kdy jsou nalisované tablety zavařeny do pro vzduch nepropustných hliníkových sáčků s přídavkem silikagelu. Takto připravené sáčky mohou být následně uloženy do prostředí v rozmezí teplot 2 – 8 °C (lednice). Ačkoliv vysoušení trvá přibližně týden, skladování za nižších teplot současně zajišťuje vyšší ochranu buněk před zvýšenou vodní aktivitou.

Výsledky naměřených hodnot vodních aktivit pro jednotlivé vzorky tablet s přídavkem 10 % a 14 % silikagelu jsou uvedeny v tabulce (Tab. 13).

Tab. 13: Závislost délky vysoušení tablet na různém množství vysoušedla pro různé druhy tablet o různých pevnostech

Plnidlo tablety	Množství vysoušedla	Pevnost tablety [N]	0. den sušení	3. den sušení	6. den sušení
isomalt	14%	70	0,160	0,046	0,042
		90	0,162	0,049	0,048
		120	0,156	0,053	0,050
	10%	70	0,160	0,048	0,041
		90	0,162	0,049	0,048
		120	0,156	0,063	0,056
MCC	14%	70	0,163	0,087	0,080
		90	0,155	0,102	0,094
		120	0,160	0,103	0,095
	10%	70	0,163	0,092	0,084
		90	0,155	0,104	0,093
		120	0,160	0,107	0,097

Isomalt je vhodnější pomocnou látkou pro tabletování probiotik z hlediska následného sušení tablet. Zatímco u isomaltových tablet klesla vodní aktivita pod hodnotu 0,1 již po třech dnech sušení, tablety s mikrokrytalickou celulózu se dostaly pod hranici vodní aktivity (0,1) až po 6 dnech, a i tak zůstala vodní aktivita dvakrát vyšší než v případě isomaltových tablet.

Vyšší rychlost sušení isomaltu může být podpořena jednodušší molekulovou strukturou isomaltu. Isomalt je řazen mezi deriváty sacharózy na bázi alkoholů. Mikrokrytalická celulóza je komplexní polysacharid se složitou strukturou, která je schopna velice snadno ve struktuře zachytávat vodu. Struktura isomaltu oproti mikrokrytalické celulóze nezachytává a nezadržuje ve své struktuře volnou vodu a lze ji snadněji z této jednoduché struktury odstranit.

Vybraná množství silikagelu neměla rozdílný vliv na délku sušení, pokud porovnáme tablety se shodnými vstupními parametry. Lze tedy předpokládat, že pro vysoušení tablet stačí 10 % silikagelu nebo méně. Při 10 % obsahu silikagelu je kapacita vysoušedla dostatečně vysoká na to, aby nebyla zbytečně prodlužována doba sušení tablet.



Naopak zajímavé výsledky byly pozorovány v případě sledování vodní aktivity v závislosti na pevnosti tablety v průběhu vysoušení. Zatímco v isomaltových tabletách s 10% obsahem silikagelu a pevností 70 N byla vodní aktivita 0,041, tableta o pevnosti 120N skladovaná za stejných podmínek měla vodní aktivitu 0,056. Stejný trend byl pozorován i u tablet lisovaných z mikrokrytalické celulózy. V tabletě o pevnosti 70 N (10% vysoušedla) byla vodní aktivita 0,084, kdežto tableta o pevnosti 120 N obsahovala vodní aktivitu 0,097.

Tato lineárně rostoucí závislost je pravděpodobně dána faktem, že tvrdost tablety ovlivňuje rychlost prostupu volné vody tabletou a tím pádem dochází k vyššímu zadržování vody ve struktuře tablety. Při práci s tabletami, které je nutno po tabletování vysoušet je tedy doporučována co možná nejnižší pevnost finální tablety.

#### 6.4.1.5 Vliv pevnosti a složení tablet na počet cfu a vodní aktivitu v průběhu skladování

Z výsledků prezentovaných v tabulce (Tab. 14) je patrné, že při skladování probiotických tablet s isomaltem má pevnost tablet vliv na počet živých buněk v doplňku stravy. Po 6 měsících skladování byly počty živých buněk při pevnosti tablety 70, 90 a 120 N stanoveny na  $(3,5 \pm 0,2) \cdot 10^9$ ,  $(3,7 \pm 0,3) \cdot 10^9$  a  $(3,6 \pm 0,5) \cdot 10^9$  cfu/tabletu. Ačkoliv došlo k poklesu počtu živých buněk po 6 měsíčním sledování, menší pokles byl překvapivě zaznamenán v případě tablet o pevnosti 120 N (pokles živých buněk o 51 % buněk). U tablet lisovaných na pevnost 70 N byl pokles živých buněk vyšší a z původních  $(9,2 \pm 0,3) \cdot 10^9$  cfu/tabletu poklesl počet živých buněk na konečných  $(3,5 \pm 0,2) \cdot 10^9$  cfu/tabletu. Pokles živých buněk tedy dosáhl 62%.

Zajímavostí v tomto případě byla skutečnost, že za dobu 6 měsíců došlo k významnému navýšení vodní aktivity ve sledovaných vzorcích tablet. V případě isomaltových tablet lisovaných při pevnosti 70 N vzrostla vodní aktivita z počátečních 0,055 na konečných 0,091. Tablety lisované na 120 N vykazovaly nižší nárůst vodní aktivity než tablety o pevnosti 70 N.

Tab. 14: Životaschopnost buněk v tabletě s obsahem isomaltu a jejich vodní aktivita při skladování v závislosti na pevnosti tablety

Pevnost tablety [N]	0. měsíců		3. měsíce		6. měsíců	
	cfu/tbl	aw	cfu/tbl	aw	cfu/tbl	aw
<b>70</b>	$(9,2 \pm 0,3) \cdot 10^9$	0,055	$(5,7 \pm 0,3) \cdot 10^9$	0,076	$(3,5 \pm 0,2) \cdot 10^9$	0,091
<b>90</b>	$(4,9 \pm 0,6) \cdot 10^9$	0,073	$(5,6 \pm 0,5) \cdot 10^9$	0,063	$(3,7 \pm 0,3) \cdot 10^9$	0,087
<b>120</b>	$(7,4 \pm 0,3) \cdot 10^9$	0,054	$(5,1 \pm 0,3) \cdot 10^9$	0,063	$(3,6 \pm 0,5) \cdot 10^9$	0,087

Zajímavé závěry vychází z výsledků počtu cfu jednotek a vodních aktivit tablet obsahujících mikrokrystalickou celulózu. Tyto výsledky jsou prezentovány v tabulce (Tab. 15). Zatímco u tablet o pevnosti 70 N došlo k poklesu počtu živých buněk o 35 %, u tablet o pevnosti 90N byl naměřen pokles o 31 % a u nejpevnějších tablet byl stanoven pokles životaschopných buněk pouze o 25 % po 6 měsících skladování. V případě tablet s mikrokrystalickou celulózu byla vodní aktivita nad hodnotou 0,1 a kolem této hodnoty vodní aktivita oscillovala v následných stabilitních bodech. Pokud pomíneme zdroj zvyšování vodní aktivity, lze z výsledků vyvodit, že u tablet s vyšší pevností dochází k pomalejšímu transportu vody v tabletě a tedy vyšší ochraně buněk obsažených v tabletě. Této teorii napomáhá i fakt, že mikrokrystalická celulóza má komplexní strukturu, která může zadržovat vodu nebo právě zamezovat jejímu transportu v matrix tablety.

*Tab. 15: Životaschopnost buněk v tabletě s obsahem mikrokrystalické celulózy a jejich vodní aktivita při skladování v závislosti na pevnosti tablety*

Pevnost tablety [N]	0. měsíců		3. měsíce		6. měsíců	
	cfu/tbl	aw	cfu/tbl	aw	cfu/tbl	aw
<b>70</b>	$(8,3 \pm 0,5) \cdot 10^9$	0,106	$(8,0 \pm 0,6) \cdot 10^9$	0,090	$(5,4 \pm 0,7) \cdot 10^9$	0,102
<b>90</b>	$(8,1 \pm 0,3) \cdot 10^9$	0,116	$(6,9 \pm 0,7) \cdot 10^9$	0,087	$(5,6 \pm 0,5) \cdot 10^9$	0,099
<b>120</b>	$(7,3 \pm 0,5) \cdot 10^9$	0,102	$(6,1 \pm 0,4) \cdot 10^9$	0,090	$(5,5 \pm 0,4) \cdot 10^9$	0,116

Ačkoliv bylo dříve uvedeno, že tablety s pevností 120 N nejsou vhodné pro rutinní výrobu probiotických tablet, tento test vykazuje přesně opačné výsledky a jako nejvhodnější pevnost tablety udává 120 N. Vyšší pevnost pravděpodobně brání, jak transportu vlhkosti z tablety při vysoušení (viz kapitola 6.4.1.4), tak zpomaluje distribuci vlhkosti z okolí do tablety.

Příčina navýšení vodní aktivity během skladování nebyla identifikována. Navýšení vodní aktivity bylo pravděpodobně způsobeno při vzorkování tablet v jednotlivých stabilitních bodech. Svou roli mohl sehrát i nedokonalý svár hliníkového sáčku nebo mikroskopické trhliny v sáčku, které vznikají při manipulaci s obalovým materiálem.

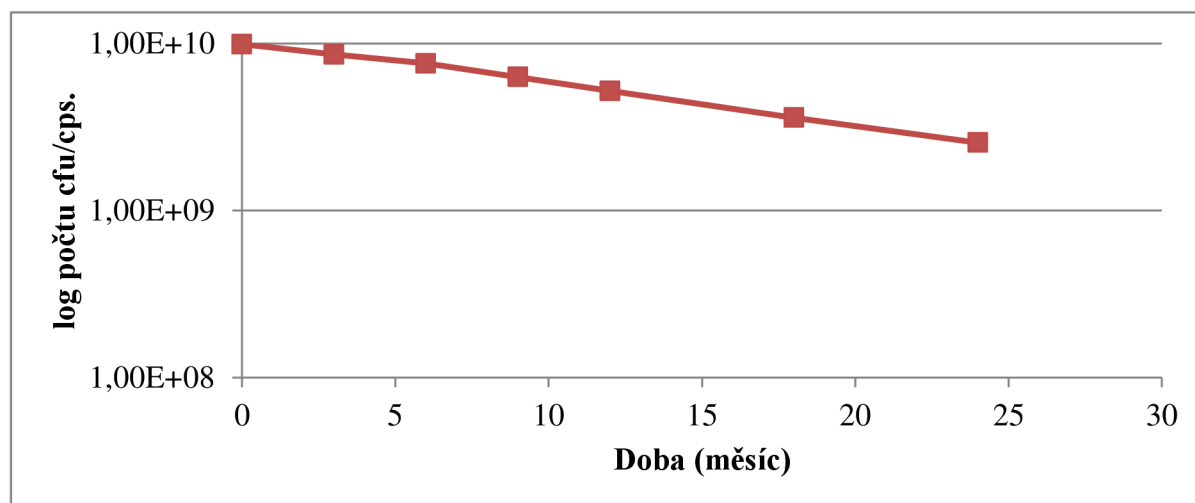
#### 6.4.2 Výroba probiotických kapslí

Kapsle jsou široce používanou lékovou formou pro doplňky stravy s obsahem probiotik. Oproti tabletám mají kapsle celou řadu výhod, které zabezpečují snadnější nakládání s probiotickými kmeny a současně zachovávají vysoký počet živých buněk ve finálním produktu.

Nespornou výhodou je již samotná technologie výroby. Při produkci kapslí jsou využívány kapslovací linky, které plní kapsli předepsaným množstvím kapsloviny pouhým zahrnutím. Při této technologii není vyvíjen tlak na probiotické buňky, jako je tomu při procesu tabletování, a proto tato technologie nemá tak kritický vliv na úhyn buněk.

Kapslování je obecně technologie, která využívá suroviny i s větším prachovým podílem částic. To nabízí celou řadu materiálů, které nelze využít pro tablety, ale jsou vhodné právě pro kapslování. Jednou z těchto surovin je speciálně upravený škrob, který má nízkou vodní aktivitu a zajišťuje tak vhodné prostředí pro látky citlivé na vlhkost.

Formulace obsahující speciální škrob a probiotickou kulturu byla podrobena stabilitní zkoušce. Výsledky stability jsou zachyceny na grafu (Graf 8).



Graf 8: Vliv škrobu na stabilitu probiotického přípravku ve formě kapsle

Získané výsledky potvrzují, že použitý škrob je skutečně vhodným materiálem pro produkci kapslí s probiotickou kulturou. Kapsle i po 24 měsících vykazují vysokou koncentraci živých buněk. V rámci 2 roční stability došlo k poklesu počtu živých buněk pouze o jeden řád.

## 6.5 Primární balení probiotických přípravků

### 6.5.1 Srovnání používaných blistrovacích fólií

Jak již bylo uvedeno v teoretické části práce (viz Kapitola 3.4.3), přítomnost kyslíku a obsah vody (vodní aktivita) jsou kritické parametry pro přežívání probiotických mikrobiálních buněk. Pro komerční účely je proto vybírán takový primární obalový materiál, který má co nejnižší hodnoty OTR a WVTR.

Vybrané blistrovací fólie byly nejprve podrobeny srovnávací studii, zahrnující především parametry propustnosti pro vzdušný kyslík vyjádřený jako OTR - Oxygen transmission rate (29°C; 0% RH) a vodní páru, kterou popisuje parametr WVTR – Water vapour transmission rate (38°C; 90% RH). Zatímco OTR udává objem kyslíku, který projde přes danou plochu za jednotku času, WVTR vyčísluje hmotnost vodní páry, která projde přes danou plochu za daný čas. Srovnání parametrů vybraných blistrovacích fólií je uvedeno v tabulce (Tab. 16)

Tab. 16: Porovnání parametrů OTR a WVTR pro vybrané blistrovací fólie

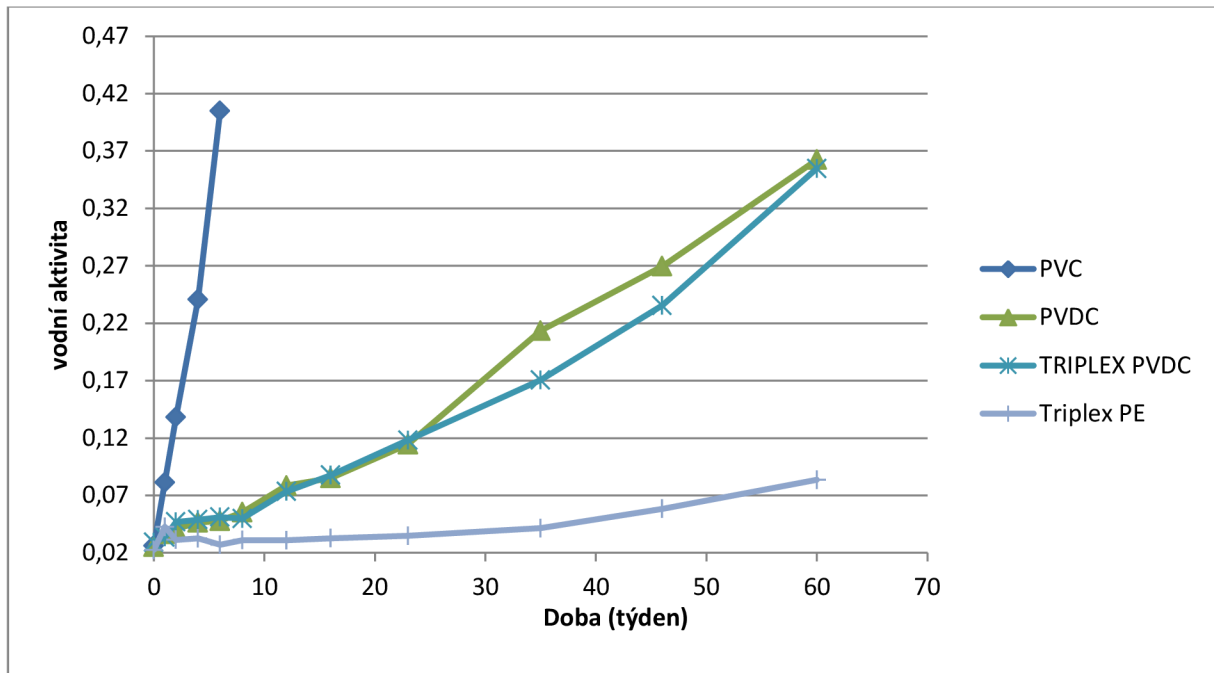
Typ fólie	OTR [ $\text{cm}^3/\text{m}^2 \times \text{den}$ ]	WVTR [ $\text{g H}_2\text{O} / (\text{m}^2 \times \text{den})$ ]
PVC	< 16	$\leq 6,0$
PVDC	0,70	0,55
Triplex PVDC	0,22	0,25
Triplex PE	< 0,10	0,07

Tab. 17: Výsledky měření vodní aktivity náplně kapsle a životaschopnosti probiotických buněk při ukončení stabilitní studie

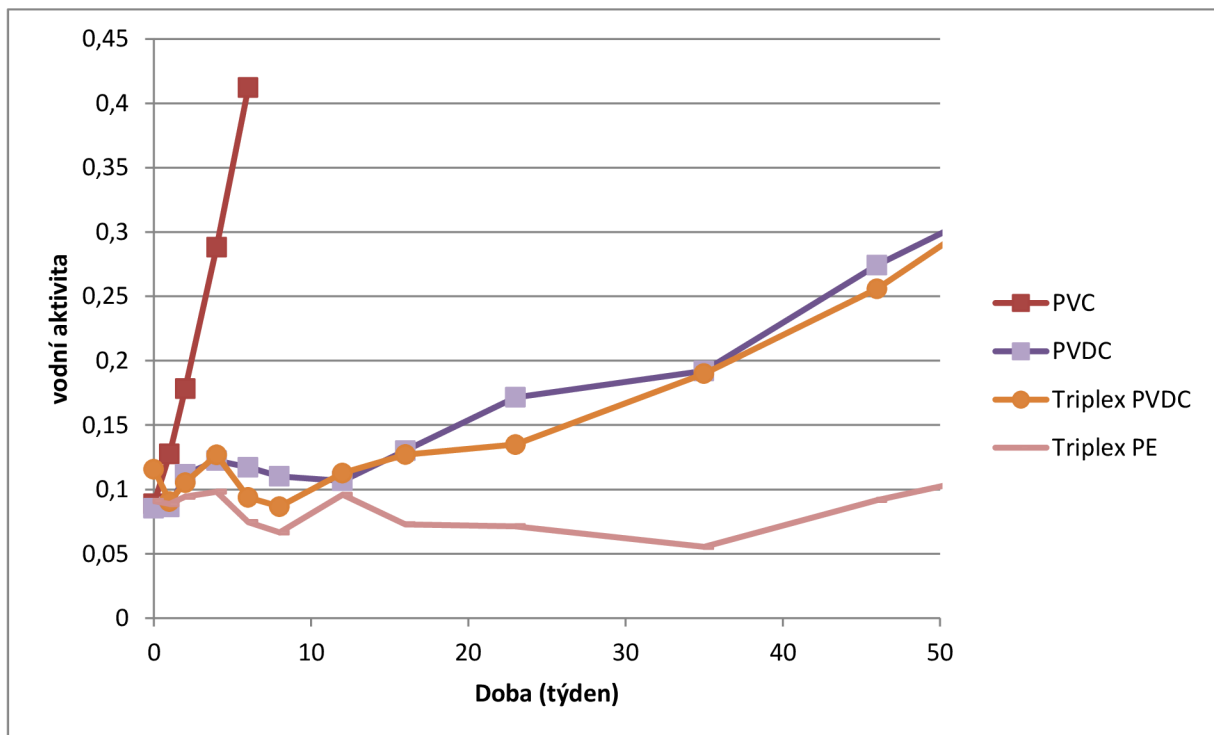
typ fólie	Doba (týden)												CFU/cps
	0	1	2	4	6	8	12	16	23	35	46	60	
PVC	0,03	0,08	0,14	0,24	0,40	-	-	-	-	-	-	-	< 2.10 <sup>5</sup>
PVDC	0,03	0,04	0,04	0,05	0,05	0,06	0,08	0,09	0,11	0,21	0,27	0,36	< 2.10 <sup>5</sup>
Triplex PVDC	0,03	0,03	0,05	0,05	0,05	0,05	0,07	0,09	0,12	0,17	0,24	0,35	< 2.10 <sup>5</sup>
Triplex PE	0,02	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,06	0,08	5,4.10 <sup>9</sup>

Tab. 18: Výsledky měření vodní aktivity prázdné kapsle

typ fólie	Doba (týden)											
	0	1	2	4	6	8	12	16	23	35	46	60
PVC	0,09	0,13	0,18	0,29	0,41	-	-	-	-	-	-	-
PVDC	0,09	0,09	0,11	0,12	0,12	0,11	0,11	0,13	0,17	0,19	0,27	0,36
Triplex PVDC	0,12	0,09	0,11	0,13	0,09	0,09	0,11	0,13	0,13	0,19	0,26	0,37
Triplex PE	0,09	0,09	0,09	0,10	0,07	0,07	0,10	0,07	0,07	0,06	0,09	0,13



Graf 9: Sledování parametru vodní aktivity náplně kapsli skladovaných v různých typech blistrovacích fólií podobu skladování (25°C; 60% vlhkost)



Graf 10: Sledování parametru vodní aktivity prázdné kapsle skladované (25°C; 60% vlhkost) v různých typech blistrovacích fólií

Z výsledků v tabulce (Tab. 16) je pak patrné, že jednoduchá jednovrstevná blistrovací fólie PVC, má mnohonásobně vyšší OTR a WVTR parametry než ostatní srovnávané fólie. Tudiž je předpoklad, že PVC bude nejméně vhodným materiálem pro dlouhodobé uchovávání

probiotických matric. Naopak folie Triplex PE, vykazuje velmi nízké propustnosti jak pro vodní páru, tak pro kyslík a z vybraných fólií disponuje nejvhodnějšími parametry pro skladování probiotických přípravků.

Stabilitní studie prokázala nevhodnost použití PVC. Již po 4 týdnech vzrostla vodní aktivita nad kritickou hranici vodní aktivity 0,15. Po 6 týdnech byla stabilita v PVC blistrech ukončena, vodní aktivita náplně kapsle byla 0,40 (Tab. 17, Tab. 18). PVC fólie je hojně užívaný typ materiálu pro primární balení standardních látek. Díky velkým propustnostem pro vodní páru a kyslík je PVC obecně nevhodnou fólií právě pro materiály sensitivní na kyslík a vzdušnou vlhkost.

PVDC i Triplex PVDC patří do kategorie více vrstevných fólií. Parametry OTR a WVTR se od sebe významně neliší, ačkoliv PVDC je fólie složená ze dvou vstev a Triplex PVDC je řazena do kategorie triplexových fólií. Provedený test odhalil, že oba typy fólií mají téměř identické hodnoty vodních aktivit v průběhu stability (Tab. 17, Tab. 18). V 35. týdnu byla překročena u obou měřených vzorků kritická hodnota (0,15) vodní aktivity. Po 60 týdnech stabilitní studie byla naměřena vodní aktivita náplně kapsle 0,36 v případě skladování v PVDC folie a 0,35 v případě skladování vzorku v Triplex PVDC fólii. Ačkoliv tyto fólie vykazují vhodnější parametry než PVC, pro skladování probiotik nejsou doporučovány.

Vhodnou fólií pro dlouhodobou stabilitu přípravků obsahujících probiotika je Triplex PE řazená mezi triplexové folie. Vzorky balené do Triplex PE fólie vykazovaly po celou dobu stabilitního sledování nízké hodnoty vodních aktivit a žádný ze stabilitních bodů nepřesáhl kritickou hranici vodní aktivity (0,15). Po 60 týdnech byla naměřena vodní aktivita 0,08.

Ve stabilitní studii byla také sledována vodní aktivita kapslí, ve kterých byl produkt rozplněn (Tab. 18, Graf 10). Vodní aktivita samotných kaplí je vždy vyšší než vodní aktivita náplně. Dá se tedy předpokládat, že kapsle disponuje větším množstvím vody a zadržuje ji ve své struktuře. Kapsle neplní funkci bariéry, ale předává postupně vodu dostupnou v okolí, do materiálu uzavřeného v kapsli.

V 60. týdnu stabilitní studie byla stanovena životaschopnost probiotických buněk (Tab. 17). Zatímco kapsle balené v PVDC a Triplex PVDC folii obsahují méně než  $2 \cdot 10^5$  cfu/kapli, kaple balené v Triplex PE vykazují stále vysoký počet životaschopných buněk ( $5,4 \cdot 10^9$  cfu/kapli). Pro balení probiotických přípravků byly vybrány blistry tvořené fólií Triplex PE.

## 7 ZÁVĚRY

V rámci předložené práce byla studována schopnost probiotických bakteriálních buněk (*Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, *Bifidobacterium breve* CCM 3763 a *Bifidobacterium longum* CCM 4990) tvořit biofilm na volných nosičích. Druhá část práce se zabývala srovnáním sušících technik pro uchovávání biofilmových kultur. Poslední část práce se zabývala technologickým zpracováním probiotických kultur, jejich primárním balením a následným stabilitním hodnocením.

- První část práce se zabývá studiem vhodného volného nosiče pro probiotické kultury. Jako nejvhodnější nosič se z širokého spektra testovaných surovin byly určeny částice oxidu křemičitého, na nichž byl pod mikroskopem pozorován souvislý biofilm tvořený bakteriemi *L. acidophilus* a *B. breve*. Komplexní potravinové matrice vykazovaly nejprve částečnou adhezi, později bylo ale pozorováno spíše zachytávání buněk do struktury a tvorba biofilmu nebyla potvrzena.
- Biofilmová kultura *L. acidophilus* vykazovala ve srovnání s planktonickou formou vyšší odolnost vůči nízkému pH. Například při pH 1 a po době působení 120 minut byl naměřen počet živých buněk nižší o 20% vůči vzorku s biofilmovou kulturou. Pouze ve dvou případech (pH 2, doba působení 30 minut a pH 3, doba působení 60 minut) vykazovala planktonická forma probiotika určitou adaptaci na přítomné prostředí. Testem byl potvrzen předpoklad, že biofilmová kultura má vyšší odolnost vůči kyselému pH než standardní planktonická kultura.
- Vyšší odolnost biofilmu byla zaznamenána také při působení žlučových solí. Po působení 0,3% roztoku žlučových solí po dobu 240 minut byl pozorován 30% pokles životaschopných buněk u planktonické kultury, kdežto biofilmová vykazovala pokles v počtu živých buněk pouze 5%.
- Testováním technologií sušení získaných biofilmových kultur byla potvrzena maximální výtěžnost živých buněk lyofilizačním sušením. Vzorky sušené lyofilizačně vykazovaly až o 90% vyšší životaschopnost buněk než kultury sušené fluidně. Jako nejvhodnější kryoprotektivní médium se ukázala kombinace MCC, HPM a manitolu.
- Ačkoliv fluidní sušení není tak účinné, lze jej využít při sušení tekutých biofilmových kultur. Zde byla patrná závislost na protektivních látkách. Manitol byl stanoven jako nejvhodnější protektivní materiál. Pro fluidní sušení je následně vhodná vyšší teplota

sušení (35 °C), která vyžaduje kratší čas namáhání buněk (rychlejší snížení vodní aktivity) a po ukončení sušení pak zajistí vyšší počet živých buněk ve směsi.

- Vodní aktivita byla následně potvrzena jako jeden z hlavních parametrů pro přežívání probiotických buněk. Jestliže se hodnota vodní aktivity pohybuje kolem 0,1, je zajištěna minimálně dvouletá životaschopnost buněk i při 25 °C. Pohybuje-li se aktivita vody mezi 0,2-0,3 nebo výše, je životaschopnost buněk značně omezena, a to na přibližně 6 měsíců, přičemž může být prodloužena pouze za udržení nízké teploty (2 - 8 °C).
- Podmínky na zpracování probiotických kmenů do pevných lékových forem jsou dány jednotlivými druhy lékových forem. Bylo ověřeno, že příprava tablet a tabletovin může probíhat za vyšší vodní aktivity (0,3), pokud je finální tableta v co nejmenším časovém rozsahu vysušena na požadovanou vodní aktivitu 0,1.
- Sledováním životaschopnosti buněk během technologického zpracování tablet byl potvrzen významný pokles životaschopných buněk. Finální tableta vysušená na vodní aktivitu 0,1 obsahovala pouze 20% živých buněk. Proto je nutné při teoretickém návrhu tablet ve výrobě s tímto poklesem kalkulovat.
- Významný vliv na životaschopnost buněk má i způsob tabletování. Minimální vliv na počet živých buněk byl prokázán při pevnosti 70 -90 N u tablet s obsahem MCC a 70 - 80 N v případě tablet s obsahem isomaltu. Při následném sušení tablet s přídavkem silikagelu bylo pozorováno, že právě vyšší pevnost ovlivňuje i rychlost vysoušení tablet. Následné vyšší hodnoty vodní aktivity mají pak vliv na počet živých buněk v tabletách. Pro farmaceutickou produkci byla proto navržena pevnost tablet jako v testu, kde byl sledován vliv počtu živých buněk na tabletovací síle.
- V průběhu skladování vycházely po 6 měsících překvapivě nevyšší počty živých buněk u tablet o pevnosti 120 N. Pravděpodobnou příčinou je fakt, že tablety o vyšší pevnosti nepřijímají tak snadno vodu do struktury, není navyšována jejich aktivita a tím pádem se v průběhu stability udržuje vyšší počet živých buněk v pevnějších tabletách. Příjem vody do matrix tablety je ovlivněn také složením tablety. Použití polymerních látek sice zabraňuje vysoušení, ale pokud je matrix důkladně vysušena, hůře přijímá vodu zpět do struktury.



- Využití kapsle jako lékové formy pro doplňky stravy s probiotikem je velice výhodnou formou. Nejenže při technologickém zpracování není probiotická kultura vysoce namáhána jako například u tablety, výběrem vhodného plnidla lze navíc ovlivnit veškeré parametry a zajistit tak stabilní formulaci po celou dobu expirace hotového produktu.
- Poslední část práce se zabývá balením do primárních obalů nebo takzvaných blistrů. Nejlepší výsledky a nejdelší stabilita probiotických přípravků byla zaznamenána při balení do triplexové folie, která má nízké hodnoty pro propustnost vodní páry a kyslíku. Standardně užívané folie (např. PVC nebo PVDC) nejsou vhodným materiálem pro balení probiotik.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. OMID, MORADI MOGHADDAM. PROBIOTICS IN CRITICALLY ILL PATIENTS. *ANESTHESIOLOGY AND PAIN MEDICINE*. 2011, roč. 1, č. 2, s. 58–60. ISSN 2228-7523.
2. NARAYANAN, Rita. Current legislations on probiotic products. *Access International Journals of Agricultural Sciences*. 2013, roč. 1, č. 2, s. 18–24.
3. KHAN, Abdul Arif, Mohsin KHURSHID, Shahanavaj KHAN a Aws ALSHAMSAN. Gut Microbiota and Probiotics: Current Status and Their Role in Cancer Therapeutics. *Drug Development Research*. 2013, roč. 74, č. 6, s. 365–375. ISSN 1098-2299. doi 10.1002/ddr.21087.
4. JOINT, F. A. O. WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. *ftp. fao. org/es/esn/food/wgreport2. pdf*. Accessed. 2007, roč. 16.
5. WALLACE, Taylor C, Francisco GUARNER a Karen MADSEN. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutrition Reviews*. 2011, roč. 69, č. 7, s. 392–403. ISSN 1753-4887. doi 10.1111/j.1753-4887.2011.00402.x.
6. JARDINE, Shelly. Probiotics. In: *Ingredients handbook prebiotics and probiotics*. Wiley-BlackWELL. Leatherhead: Leatherhead Publishing, 2009. s. 79–113. ISBN 9781905224524.
7. KLIJN, Adrienne, Annick MERCENIER a Fabrizio ARIGONI. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, roč. 29, č. 3, s. 491–509. ISSN 1574-6976. doi 10.1016/j.fmrre.2005.04.010.
8. VAN DER WERF, Mariët J. a Koen VENEMA. Bifidobacteria: Genetic Modification and the Study of Their Role in the Colon. *J. Agric. Food Chem.* 2000, roč. 49, č. 1, s. 378–383. ISSN 0021-8561. doi 10.1021/jf000952o.
9. KALLIOMÄKI, Marko, Jean-Michel ANTOINE, Udo HERZ a JERRY M. WELLS. Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Prevention and Management of Allergic Diseases by Probiotics. *The Journal of Nutrition*. 2010, roč. 140, č. 3, s. 713S–721S. ISSN 0022-3166, 1541-6100. doi 10.3945/jn.109.113761.

10. ECK, Peter a James FRIEL. Should Probiotics be considered as Vitamin Supplements? *Gastroenterology*. 2013, roč. 138, č. 1, s. 789–791. doi 10.4172/vms.1000e124.
11. JIN BAEK, Young a Byong H. LEE. Probiotics and Prebiotics as Bioactive Components in Dairy Products. In: Young W. Park Ph D. ADJUNCTESSOR, ed. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. S.l.: Wiley-Blackwell, 2009. s. 287–310. ISBN 9780813821504.
12. WEICHSELBAUM, E. *Probiotics and health: a review of the evidence*. *Nutrition Bulletin*. 2009, roč. 34, č. 4, s. 340–373. ISSN 1467-3010. doi 10.1111/j.1467-3010.2009.01782.x.
13. CORTHÉSY, Blaise a H. Rex GASKINS. Cross-Talk between Probiotic Bacteria and the Host Immune System. *The Journal of Nutrition*. 2007, roč. 137, č. 3, s. 781S–790S. ISSN 0022-3166, 1541-6100.
14. CEAPA, Corina, Harm WOPEREIS a Lahcene REZAÏKI. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2013, roč. 27, č. 1, s. 139–155. ISSN 1521-6918. doi 10.1016/j.bpg.2013.04.004.
15. FLOROU-PANERI, Panagiota, Efterpi CHRISTAKI a Eleftherios BONOS. Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. In: Marcelino KONGO, ed. *Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes* [online]. S.l.: InTech, 2013. s. 589–614. [vid. 4. červen 2013]. ISBN 978-953-51-0955-6. Dostupné z: [http://cdn.intechopen.com/pdfs/42328/InTech-Lactic\\_acid\\_bacteria\\_as\\_source\\_of\\_functional\\_ingredients.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/42328/InTech-Lactic_acid_bacteria_as_source_of_functional_ingredients.pdf).
16. PAVLOVIC, Nebojsa, Karmen STANKOV a Momir MIKOV. Probiotics--Interactions with Bile Acids and Impact on Cholesterol Metabolism. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, roč. 168, č. 7, s. 1880–95. ISSN 02732289. doi 10.1007/s12010-012-9904-4.
17. CHONG, Esther Swee a LAN. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014, roč. 30, č. 2, s. 351–74. ISSN 0959-3993. doi 10.1007/s11274-013-1499-6.
18. SANZ, Yolanda, Inmaculada NADAL a Ester SANCHEZ. Probiotics as Drugs Against Human Gastrointestinal Infections. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. 2007, roč. 2, č. 2, s. 148–156. ISSN 1574-891X. doi 10.2174/157489107780832596.

19. VANDENPLAS, Yvan, Geert HUYS a Georges DAUBE. Probiotics: an update. *Jornal de Pediatria*. 2015, roč. 91, č. 1, s. 6–21. ISSN 0021-7557. doi 10.1016/j.jpmed.2014.08.005.
20. SALMINEN, Seppo, Sonja NYBOM a Jussi MERILUOTO. Interaction of probiotics and pathogens—benefits to human health? *Current Opinion in Biotechnology*. duben 2010, roč. 21, č. 2, s. 157–167. ISSN 0958-1669. doi 10.1016/j.copbio.2010.03.016.
21. ROSSI, Maddalena, Alberto AMARETTI a Stefano RAIMONDI. Folate Production by Probiotic Bacteria. *Nutrients*. 2011, roč. 3, č. 1, s. 118–134. ISSN 2072-6643. doi 10.3390/nu3010118.
22. SALMINEN, Seppo a Atte von WRIGHT. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Third Edition*. Marcel Dekker. Inc. USA: CRC Press, 2004. ISBN 9780824752033.
23. LENOIR-WIJNKOOP, Irene, Mary Ellen SANDERS a Michael D. CABANA. Probiotic and Prebiotic Influence Beyond the Intestinal Tract. *Nutrition Reviews*. 2007, roč. 65, č. 11, s. 469–489. ISSN 1753-4887. doi 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00272.x.
24. MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 1990, roč. 6, č. 4, s. 263–267. ISSN 1476-5535. doi 10.1007/BF01575871.
25. VENTURA, Marco, Marina ELLI, Roberto RENIERO a Ralf ZINK. Molecular microbial analysis of Bifidobacterium isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Ecology*. 2001, roč. 36, č. 2-3, s. 113–121. ISSN 1574-6941. doi 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00831.x.
26. FELIS, G. E. a F. DELLAGLIO. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current issues in intestinal microbiology*. 2007, roč. 8, č. 2, s. 44. ISSN 1467-3037.
27. TAMIME, A. Y, R. K ROBINSON a A. Y TAMIME. *Tamime and Robinson's yoghurt : science and technology*. Cambridge; New York: Woodhead ; CRC, 2007. ISBN 9781845692131.
28. TANNOCK, G. W. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Mol Biol*. 1999, roč. 1, č. 1, s. 53–64. ISSN 1467-3037.

29. SELA, David, Neil PRICE a David MILLS. Metabolism of bifidobacteria. In: *Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects*. S.l.: Horizon Scientific Press, 2010. ISBN 9781904455684.
30. PALFRAMAN, R. J., G. R. GIBSON a R. A. RASTALL. Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Current issues in intestinal microbiology*. 2003, roč. 4, č. 2, s. 71–75. ISSN 1467-3037.
31. GOMES, Ana M.P. a F.Xavier MALCATA. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. 1999, roč. 10, č. 4–5, s. 139–157. ISSN 0924-2244. doi 10.1016/S0924-2244(99)00033-3.
32. VENTURA, B, Francesca TURRONI a Francesca BOTTACINI,. Where we stand now and where we are going. In: *Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects*. S.l.: Horizon Scientific Press, 2010. ISBN 9781904455684.
33. LIU, Dawei, Shuai WANG a Bin XU. Proteomics analysis of *Bifidobacterium longum* NCC2705 growing on glucose, fructose, mannose, xylose, ribose, and galactose. *PROTEOMICS*. 2011, roč. 11, č. 13, s. 2628–2638. ISSN 1615-9861. doi 10.1002/pmic.201100035.
34. SADOWSKY, M. J a Richard Lincoln WHITMAN. TAXONOMY, PHYLOGENY, AND PHYSIOLOGY OF FECAL INDICATOR BACTERIA. In: *The fecal bacteria* [online]. Washington, DC: ASM Press, 2011. [vid. 6. prosinec 2012]. ISBN 155581686X. Dostupné z: <http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=4177>.
35. CRONIN, Michelle, Marco VENTURA, Gerald F. FITZGERALD a Douwe VAN SINDEREN. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, roč. 149, č. 1, s. 4–18. ISSN 0168-1605. doi 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.019.
36. POMPEI, Anna, Lisa CORDISCO a Alberto AMARETTI. Folate Production by *Bifidobacteria* as a Potential Probiotic Property. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, roč. 73, č. 1, s. 179–185. ISSN 0099-2240, 1098-5336. doi 10.1128/AEM.01763-06.
37. HOU, Jen-Wan, Roch-Chui YU a Cheng-Chun CHOU. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Research International*. 2000, roč. 33, č. 5, s. 393–397. ISSN 0963-9969. doi 10.1016/S0963-9969(00)00061-2.

38. O'CONNOR, E. B., E. BARRETT, G. FITZGERALD, C. HILL, C. STANTON a R. P. ROSS. Production of Vitamins, Exopolysaccharides and Bacteriocins by Probiotic Bacteria. In: Adnan TAMIME, ed. *Probiotic Dairy Products* [online]. S.l.: Blackwell Science Ltd, 2007. s. 167–194. [vid. 9. leden 2013]. ISBN 9780470995785. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470995785.ch8/summary>.
39. BEENA DIVYA, Jayakumar, Kontham KULANGARA VARSHA a Kesavan MADHAVAN NAMPOOTHIRI. Probiotic fermented foods for health benefits. *Engineering in Life Sciences*. 2012, roč. 12, č. 4, s. 377–390. ISSN 1618-2863. doi 10.1002/elsc.201100179.
40. BIAVATI, B., M. VESCOVO, S. TORRIANI a V. BOTTAZZI. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*. 2000, roč. 50, č. 2, s. 117–131. ISSN 1869-2044.
41. FUKUDA, Shinji, Hidehiro TOH a Koji HASE. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 2011, roč. 469, č. 7331, s. 543–547. ISSN 0028-0836. doi 10.1038/nature09646.
42. CHEIKHYOUSSEF, Ahmad, Natascha POGORI a Wei CHEN. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, roč. 125, č. 3, s. 215–222. ISSN 0168-1605. doi 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.012.
43. PARVEZ, S., K.a. MALIK, S. AH KANG a H.-Y. KIM. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*. 2006, roč. 100, č. 6, s. 1171–1185. ISSN 13645072. doi 10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x.
44. SAVADOGO, A., AT Cheik OUATTARA a HN Imael BASSOLE. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. *African Journal of Biotechnology*. 2009, roč. 5, č. 9. ISSN 1684-5315. doi 10.4314/ajb.v5i9.42771.
45. FIELD, D., P. M. O. CONNOR, P. D. COTTER, C. HILL a R. P. ROSS. The generation of nisin variants with enhanced activity against specific Gram-positive pathogens. *Molecular microbiology*. 2008, roč. 69, č. 1, s. 218–230. ISSN 1365-2958. doi 10.1111/j.1365-2958.2008.06279.x.
46. LEE, Ju-Hoon, Xiulan LI a Daniel J. O'SULLIVAN. Transcription Analysis of a Lantibiotic Gene Cluster from *Bifidobacterium longum* DJO10A. *Applied and Environmental*

*Microbiology*. 2011, roč. 77, č. 17, s. 5879–5887. ISSN 0099-2240, 1098-5336. doi 10.1128/AEM.00571-11.

47. O' SHEA, Eileen F, Paul D COTTER, R Paul ROSS a Colin HILL. Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 2013, roč. 24, č. 2, s. 130–134. ISSN 0958-1669. doi 10.1016/j.copbio.2012.12.003.

48. FELIS, G. E., F. DELLAGLIO a S. TORRIANI. Taxonomy of Probiotic Microorganisms. In: Dimitris CHARALAMPOPOULOS a R. A. RASTALL, ed. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. S.l.: Springer Science & Business Media, 2009. s. 591–638. ISBN 9780387790572.

49. NAYAK, Sukanta Kumar. *Biology of Eucariotic Probiotics*. In: Min-Tze LIONG, ed. *Probiotics: Biology, Genetics and Health Aspects* [online]. S.l.: Springer Science & Business Media, 2011. s. 29–56. ISBN 9783642208386. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=gshjWAmoGlQC>.

50. LUDWIG, Wolfgang a Karl-Heinz SCHLEIFER. Lactobacillales. In: Paul VOS, ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. 2*. S.l.: Springer Science & Business Media, 2011. s. 465–532. ISBN 9780387684895.

51. FEINER, Gerhard. *Microbiology of specific bacteria*. In: *Meat products handbook practical science and technology* [online]. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006. s. 574–594. [vid. 22. březem 2015]. ISBN 9781845691721. Dostupné z: [http://proxy.lib.iastate.edu:2048/login?url=http://www.foodnetbase.com/books/5360/wp8013\\_fm.pdf](http://proxy.lib.iastate.edu:2048/login?url=http://www.foodnetbase.com/books/5360/wp8013_fm.pdf).

52. Michael P. DOYLE a Robert BUCHANAN, ed. . *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 4th ed. Washington, DC: ASM Press, 2013. ISBN 9781555816261.

53. LJUNGH, Åsa a Torkel WADSTRÖM. *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*. S.l.: Horizon Scientific Press, 2009. ISBN 9781904455417.

54. SENGUPTA, Ranjita, Eric ALTERMANN a Rachel C. ANDERSON. The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Mediators of Inflammation*. 2013, roč. 2013, s. e237921. ISSN 0962-9351. doi 10.1155/2013/237921.

55. RILEY, Margaret A. a Milind A. CHAVAN. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. S.l.: Springer Science & Business Media, 2006. ISBN 9783540366041.

56. MESSAOUDI, S., M. MANAI a G. KERGOURLAY. Lactobacillus salivarius: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology*. 2013, roč. 36, č. 2, s. 296–304. ISSN 0740-0020. doi 10.1016/j.fm.2013.05.010.
57. DA SILVA SABO, Sabrina a Michele VITOLO. Overview of Lactobacillus plantarum as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*. 2014, roč. 64, s. 527–536. ISSN 0963-9969. doi 10.1016/j.foodres.2014.07.041.
58. MARTINEZ, Rafael Chacon Ruiz, Monica WACHSMAN a Nicolas Ignacio TORRES. Biochemical, antimicrobial and molecular characterization of a noncytotoxic bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum ST71KS. *Food microbiology*. 2013, roč. 34, č. 2, s. 376–381.
59. SILVA SABO, Sabrina, Attilio CONVERTI a Svetoslav Dimitrov TODOROV. Effect of inulin on growth and bacteriocin production by Lactobacillus plantarum in stationary and shaken cultures. *International Journal of Food Science & Technology*. 2015, roč. 50, č. 4, s. 864–870. ISSN 1365-2621. doi 10.1111/ijfs.12711.
60. COLLADO, M. Carmen, Jussi MERILUOTO a Seppo SALMINEN. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: In vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*. 2007, roč. 71, č. 1, s. 71–74. ISSN 0167-7012. doi 10.1016/j.mimet.2007.07.005.
61. LAPARRA, J.m. a Y. SANZ. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology*. 2009, roč. 49, č. 6, s. 695–701. ISSN 1472-765X. doi 10.1111/j.1472-765X.2009.02729.x.
62. VERDENELLI, Maria Cristina, Francesca GHELFI a Stefania SILVI. Probiotic properties of Lactobacillus rhamnosus and Lactobacillus paracasei isolated from human faeces. *European Journal of Nutrition*. 2009, roč. 48, č. 6, s. 355–363. ISSN 1436-6207, 1436-6215. doi 10.1007/s00394-009-0021-2.
63. DEL RE, B. a B. SGORBATI. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum. *Letters in Applied Microbiology*. 2000, roč. 31, č. 6, s. 438–442. ISSN 1472-765X. doi 10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x.
64. FORESTIER, Christiane, Christophe DE CHAMPS a Catherine VATOUX. Probiotic activities of Lactobacillus casei rhamnosus: in vitro adherence to intestinal cells and



antimicrobial properties. *Research in Microbiology*. únor 2001, roč. 152, č. 2, s. 167–173. ISSN 0923-2508. doi 10.1016/S0923-2508(01)01188-3.

65. MORITA, H a Fei HE. Adhesion of lactic acid bacteria to caco-2 cells and their effect on cytokine secretion. *Microbiology and immunology*. 2001, roč. 46, č. 4, s. 293–297. ISSN 0385-5600. doi 10.1111/j.1348-0421.2002.tb02698.x.

66. LEE, Yuan-Kun, Kim-Yoong PUONG a Arthur C. OUWEHAND. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology*. 2003, roč. 52, č. 10, s. 925–930. ISSN 0022-2615, 1473-5644. doi 10.1099/jmm.0.05009-0.

67. TRIPATHI, Prachi, Audrey BEAUSSART a David ALSTEENS. Adhesion and Nanomechanics of Pili from the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *ACS Nano*. 2013, roč. 7, č. 4, s. 3685–3697. ISSN 1936-0851. doi 10.1021/nn400705u.

68. JOHANSSON, Malin E. V., Jessica M. Holmén LARSSON a Gunnar C. HANSSON. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011, roč. 108, č. 1, s. 4659–4665. ISSN 0027-8424, 1091-6490. doi 10.1073/pnas.1006451107.

69. JUGE, Nathalie. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in Microbiology*. 2012, roč. 20, č. 1, s. 30–39. ISSN 0966-842X. doi 10.1016/j.tim.2011.10.001.

70. ETZOLD, Sabrina, Olivia I. KOBER a Donald A. MACKENZIE. Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. *Environmental Microbiology*. 2014, roč. 16, č. 3, s. 888–903. ISSN 1462-2920. doi 10.1111/1462-2920.12377.

71. IZQUIERDO, E., M. MEDINA a S. ENNAHAR. Resistance to Simulated Gastrointestinal Conditions and Adhesion to Mucus as Probiotic Criteria for *Bifidobacterium longum* Strains. *Current Microbiology*. 2008, roč. 56, č. 6, s. 613–618. ISSN 0343-8651, 1432-0991. doi 10.1007/s00284-008-9135-7.

72. BOEKHORST, Jos, Quinta HELMER a Michiel KLEEREBEZEM. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology*. 2006, roč. 152, č. 1, s. 273–280. ISSN 1465-2080. doi 10.1099/mic.0.28415-0.

73. BUCK, B. Logan, Eric ALTERMANN, Tina SVINGERUD a Todd R. KLAENHAMMER. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus*

acidophilus NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, roč. 71, č. 12, s. 8344–8351. ISSN 1098-5336. doi 10.1128/AEM.71.12.8344-8351.2005.

74. ROOS, Stefan a Hans JONSSON. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology*. 2002, roč. 148, č. 2, s. 433–442. ISSN 1465-2080.

75. PRETZER, Gabriele, Johannes SNEL, Douwe MOLENAAR a Anne WIERSMA. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*. 2005, roč. 187, č. 17, s. 6128–6136. ISSN 1098-5530. doi 10.1128/JB.187.17.6128-6136.2005.

76. MACKENZIE, Donald A., Faye JEFFERS a Mary L. PARKER. Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*. 2010, roč. 156, č. 11, s. 3368–3378. ISSN 1465-2080. doi 10.1099/mic.0.043265-0.

77. NISHIYAMA, Keita, Koichi NAKAMATA a Shintaro UENO. Adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* mucus-binding factor to mucin and extracellular matrix proteins. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2014, roč. 79, č. 2, s. 271–279. ISSN 1347-6947. doi 10.1080/09168451.2014.972325.

78. JENSEN, Hanne, Stefan ROOS a Hans JONSSON. Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucus-binding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus in vitro. *Microbiology*. 2014, roč. 160, č. Pt 4, s. 671–681. ISSN 1465-2080. doi 10.1099/mic.0.073551-0.

79. TON-THAT, Hung, Sarkis K. MAZMANIAN a Kym F. FAULL. Anchoring of Surface Proteins to the Cell Wall of *Staphylococcus aureus* SORTASE CATALYZED IN VITRO TRANSPEPTIDATION REACTION USING LPXTG PEPTIDE AND NH<sub>2</sub>-GLY<sub>3</sub>SUBSTRATES. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, roč. 275, č. 13, s. 9876–9881. ISSN 0021-9258, 1083-351X. doi 10.1074/jbc.275.13.9876.

80. KANKAINEN, Matti, Lars PAULIN a Soile TYNKKYNNEN. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, roč. 106, č. 40, s. 17193–17198. ISSN 1091-6490. doi 10.1073/pnas.0908876106.

81. VON OSSOWSKI, Ingemar, Reetta SATOKARI a Justus REUNANEN. Functional characterization of a mucus-specific LPXTG surface adhesin from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and environmental microbiology*. 2011, roč. 77, č. 13, s. 4465–4472. ISSN 1098-5336. doi 10.1128/AEM.02497-10.
82. HYNÖNEN, Ulla a Airi PALVA. *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, roč. 97, č. 12, s. 5225–5243. ISSN 0175-7598. doi 10.1007/s00253-013-4962-2.
83. SÁNCHEZ, Borja, Philippe BRESSOLLIER a María C. URDACI. Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2008, roč. 54, č. 1, s. 1–17. ISSN 1574-695X. doi 10.1111/j.1574-695X.2008.00454.x.
84. LORCA, Graciela, María Inés TORINO a Graciela Font de VALDEZ. *Lactobacilli* express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiology Letters*. 2002, roč. 206, č. 1, s. 31–37. ISSN 0378-1097, 1574-6968. doi 10.1111/j.1574-6968.2002.tb10982.x.
85. DIANAWATI, Dianawati, Vijay MISHRA a Nagendra P. SHAH. Stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* during storage at room temperature at low aw. *Food Research International*. 2013, roč. 50, č. 1, s. 259–265. ISSN 0963-9969. doi 10.1016/j.foodres.2012.10.023.
86. DI GIOIA, Diana, Francesca GAGGIA, Loredana BAFFONI a Verena STENICO. Role of Bifidobacteria in the Production of Bioactive Compounds and Detoxification of Harmful Compounds. In: *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*. Taylor&Francis Group, LLC. New York: CRC Press, 2014. s. 291–321. ISBN 9781482206623.
87. WU, Ming-Hsiu, Tzu-Ming PAN a Yu-Jen WU. Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, roč. 144, č. 1, s. 104–110. ISSN 0168-1605. doi 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.003.
88. COCONNIER, M. H., T. R. KLAENHAMMER a S. KERNÉIS. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, roč. 58, č. 6, s. 2034–2039. ISSN 0099-2240, 1098-5336.

89. SÁNCHEZ, Borja, Carmen GONZÁLEZ-TEJEDO a Patricia RUAS-MADIEDO. Lactobacillus plantarum Extracellular Chitin-Binding Protein and Its Role in the Interaction between Chitin, Caco-2 Cells, and Mucin. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, roč. 77, č. 3, s. 1123–1126. ISSN 0099-2240, 1098-5336. doi 10.1128/AEM.02080-10.
90. JIANG, Peng, Jingbao LI, Feng HAN, Gaofei DUAN, Xinzhi LU, Yuchao GU a Wengong YU. Antibiofilm Activity of an Exopolysaccharide from Marine Bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS ONE*. 2011, roč. 6, č. 4, s. 18514–18525. doi 10.1371/journal.pone.0018514.
91. MACFARLANE, Sandra a Bahram BAHRAMI. Chapter 4 - Mucosal Biofilm Communities in the Human Intestinal Tract. In: Sima Sariaslani and Geoffrey M. Gadd ALLEN I. LASKIN, ed. *Advances in Applied Microbiology* [online]. S.l.: Academic Press, 2011. s. 111–143. [vid. 29. srpen 2013]. ISBN 0065-2164. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123870469000050>.
92. MOREAU-MARQUIS, Sophie, Bruce A. STANTON a George A. O'TOOLE. Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2008, roč. 21, č. 4, s. 595–599. ISSN 1094-5539. doi 10.1016/j.pupt.2007.12.001.
93. DUNNE, W. Michael. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, roč. 15, č. 2, s. 155–166. ISSN 0893-8512, 1098-6618. doi 10.1128/CMR.15.2.155-166.2002.
94. KLINE, Kimberly A., Stefan FÄLKER a Sofía DAHLBERG. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell host & microbe*. 2009, roč. 5, č. 6, s. 580–592. ISSN 1931-3128. doi 10.1016/j.chom.2009.05.011.
95. RENDUELES, Olaya, Laetitia TRAVIER a Patricia LATOUR-LAMBERT. Screening of Escherichia coli Species Biodiversity Reveals New Biofilm-Associated Antiadhesion Polysaccharides. *mBio*. 1. červenec 2011, roč. 2, č. 3, s. e00043–11. ISSN 2150-7511. doi 10.1128/mBio.00043-11.
96. RENDUELES, Olaya a Jean-Marc GHIGO. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012, roč. 36, č. 5, s. 972–989. ISSN 1574-6976. doi 10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x.

97. BASSLER, Bonnie L. a Melissa B. MILLER. Quorum sensing. In: *The Prokaryotes* [online]. S.l.: Springer, 2013. s. 495–509. [vid. 15. březen 2015]. ISBN 978-3-642-30123-0. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-30123-0\\_60](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-30123-0_60).
98. KRAVCHENKO, Vladimir V., Richard J. ULEVITCH a Gunnar F. KAUFMANN. Modulation of mammalian cell processes by bacterial quorum sensing molecules. In: *Quorum Sensing* [online]. S.l.: Springer, 2011. *Methods in Molecular Biology*, 692. s. 133–145. [vid. 15. březen 2015]. ISBN 978-1-60761-971-0. Dostupné z: [http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-971-0\\_10](http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-971-0_10).
99. RUTHERFORD, Steven T. a Bonnie L. BASSLER. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012, roč. 2, č. 11, s. a012427. ISSN 2157-1422. doi 10.1101/cshperspect.a012427.
100. KRAJÍČEK M, Ryšávka P. Přípravek obsahující probiotickou kulturu, způsob jeho využití a použití. CZ 303986 B6. 19. červen 2013.
101. MACFARLANE, S. a J.f. DILLON. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, roč. 102, č. 5, s. 1187–1196. ISSN 1365-2672. doi 10.1111/j.1365-2672.2007.03287.x.
102. FOOKS, L. J. a G. R. GIBSON. Probiotics as modulators of the gut flora. *The British Journal of Nutrition*. 2002, roč. 88, č. 1, s. 39–49. ISSN 00071145. doi 10.1079/BJN2002628.
103. KOMÁREK, Pavel a Miloslava RABIŠKOVÁ. *Technologie léků: galenika*. S.l.: Galén, 2006. ISBN 9788072624232.
104. TRIPATHI, M. K. a S. K. GIRI. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 2014, roč. 9, s. 225–241. ISSN 1756-4646. doi 10.1016/j.jff.2014.04.030.
105. NAG, Arup a Shantanu DAS. Effect of trehalose and lactose as cryoprotectant during freeze-drying, in vitro gastro-intestinal transit and survival of microencapsulated freeze-dried *Lactobacillus casei* 431 cells. *International Journal of Dairy Technology*. 2013, roč. 66, č. 2, s. 162–169. ISSN 1471-0307. doi 10.1111/1471-0307.12041.
106. CHEN, Mo a Azlin MUSTAPHA. Survival of freeze-dried microcapsules of  $\alpha$ -galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. *Food Microbiology*. 2012, roč. 30, č. 1, s. 68–73. ISSN 0740-0020. doi 10.1016/j.fm.2011.10.017.

107. FOERST, P., U. KULOZIK a M. SCHMITT. Storage stability of vacuum-dried probiotic bacterium *Lactobacillus paracasei* F19. *Food and Bioproducts Processing*. 2012, roč. 90, č. 2, s. 295–300. ISSN 0960-3085. doi 10.1016/j.fbp.2011.06.004.
108. FELLOWS, P. *Food processing technology: principles and practice*. 2nd. Cambridge, England : Boca Raton, FL: Woodhead Pub. ; CRC Press, 2000. Woodhead Publishing in food science and technology. ISBN 1855735334.
109. FRANKS, Felix. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1998, roč. 45, č. 3, s. 221–229. ISSN 09396411. doi 10.1016/S0939-6411(98)00004-6.
110. *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation and cell technology*. Hoboken, N.J: Wiley, 2010. ISBN 9780471799306.
111. HOTTOT, Aurélie, Julien ANDRIEU a Séverine VESSOT. Sublimation Kinetics during Freeze-Drying of Pharmaceutical Protein Formulation. *Drying Technology*. 2007, roč. 25, č. 5, s. 753–758. ISSN 07373937. doi 10.1080/07373930701370126.
112. *The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: Wiley, 1999. Wiley biotechnology encyclopedias. ISBN 0471138223.
113. AL-HUSSEIN, Anas a Henning GIESELER. The effect of mannitol crystallization in mannitol–sucrose systems on LDH stability during freeze-drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, roč. 101, č. 7, s. 2534–2544. ISSN 1520-6017. doi 10.1002/jps.23173.
114. FRANKS, Felix. Physical Properties of Crystalline and Amorphous Solids. In: *Freeze-drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals [principles and practice]*. Cambridge: RSC Pub., 2007. ISBN 9781615833627.
115. FRANKS, Felix. The proces sequence in Summary. In: *Freeze-drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals [principles and practice]*. S.l.: Royal Society of Chemistry, 2007. s. 13–20. ISBN 978-0-85404-268-5.
116. FISSORE, Davide, Roberto PISANO a Antonello A. BARRESI. Monitoring of the secondary drying in freeze-drying of pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011, roč. 100, č. 2, s. 732–742. ISSN 1520-6017. doi 10.1002/jps.22311.

117. BAHETI, Ankit, Lokesh KUMAR a Arvind K. BANSAL. Excipients used in lyophilization of small molecules. *Journal of Excipients & Food Chemicals*. 2010, roč. 1, č. 1, s. 41–54. ISSN 21502668.
118. PASSOT, Stéphanie, Stéphanie CENARD, Inès DOUANIA, Ioan Cristian TRÉLÉA a Fernanda FONSECA. Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chemistry*. 2012, roč. 132, č. 4, s. 1699–1705. ISSN 0308-8146. doi 10.1016/j.foodchem.2011.06.012.
119. DIANAWATI, Dianawati a Nagendra P. SHAH. Enzyme Stability of Microencapsulated *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 after Freeze Drying and during Storage in Low Water Activity at Room Temperature. *Journal of Food Science*. 2011, roč. 76, č. 6, s. 463–471. ISSN 00221147. doi 10.1111/j.1750-3841.2011.02246.x.
120. ABBAS, K. A., Ola LASEKAN a Sahar K. KHALIL. The Significance of Glass Transition Temperature in Processing of Selected Fried Food Products: A Review. *Modern Applied Science*. 2010, roč. 4, č. 5, s. 3–21. ISSN 19131844.
121. GIULIO, B. De, P. ORLANDO a G. BARBA. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2005, roč. 21, č. 5, s. 739–746. ISSN 0959-3993, 1573-0972. doi 10.1007/s11274-004-4735-2.
122. OVERCASHIER, David E., Thomas W. PATAPOFF a Chung C. HSU. Lyophilization of protein formulations in vials: investigation of the relationship between resistance to vapor flow during primary drying and small-scale product collapse. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1999, roč. 88, č. 7, s. 688–695. ISSN 1520-6017. doi 10.1021/js980445+.
123. WANG, Yi-Chieh, Roch-Chui YU a Cheng-Chun CHOU. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, roč. 93, č. 2, s. 209–217. ISSN 0168-1605. doi 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.001.
124. CARVALHO, Ana S., Joana SILVA, Peter HO, Paula TEIXEIRA, F.Xavier MALCATA a Paul GIBBS. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 2004, roč. 14, č. 10, s. 835–847. ISSN 0958-6946. doi 10.1016/j.idairyj.2004.02.001.

125. JIANG, Ge a Mike AKERS. Mechanistic Studies of Glass Vial Breakage for Frozen Formulations. I. Vial Breakage Caused by Crystallizable Excipient Mannitol. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2007, roč. 61, č. 6, s. 441–451. ISSN 1079-7440, 1948-2124.
126. CASTRO, H.p., P.m. TEIXEIRA a R. KIRBY. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *Journal of Applied Microbiology*. 1997, roč. 82, č. 1, s. 87–94. ISSN 1365-2672. doi 10.1111/j.1365-2672.1997.tb03301.x.
127. FRANKS, Felix. Secondary drying: The removal of unfrozen water. In: *Freeze-drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: principles and practice*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007. s. 121–129. ISBN 9780854042685.
128. WILLIAMS, N. Adeyinka a Yong LEE. The Effects of Cooling Rate on Solid Phase Transitions and Associated Vial Breakage Occurring in Frozen Mannitol Solutions. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 1986, roč. 40, č. 4, s. 135–141. ISSN 1079-7440, 1948-2124.
129. HUBÁLEK, Zdenek. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003, roč. 46, č. 3, s. 205–229. ISSN 0011-2240. doi 10.1016/S0011-2240(03)00046-4.
130. CARVALHO, Ana S., Joana SILVA, Peter HO, Paula TEIXEIRA, F. Xavier MALCATA a Paul GIBBS. Effects of Various Sugars Added to Growth and Drying Media upon Thermotolerance and Survival throughout Storage of Freeze-Dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnology progress*. 2008, roč. 20, č. 1, s. 248–254. ISSN 1520-6033. doi 10.1021/bp034165y.
131. LUECKEL, Barbara, David BODMER a Bernhard HELK. Formulations of Sugars with Amino Acids or Mannitol—Influence of Concentration Ratio on the Properties of the Freeze-Concentrate and the Lyophilizate. *Pharmaceutical Development and Technology*. leden 1998, roč. 3, č. 3, s. 325–336. ISSN 1083-7450, 1097-9867. doi 10.3109/10837459809009860.
132. PYNE, Abira, Rahul SURANA a Raj SURYANARAYANAN. Crystallization of Mannitol below  $T_g'$  during Freeze-Drying in Binary and Ternary Aqueous Systems. *Pharmaceutical Research*. 2002, roč. 19, č. 6, s. 901–908. ISSN 0724-8741, 1573-904X. doi 10.1023/A:1016129521485.



133. MORGAN, C.A., N. HERMAN, P.A. WHITE a G. VESEY. Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*. 2006, roč. 66, č. 2, s. 183–193. ISSN 0167-7012. doi 10.1016/j.mimet.2006.02.017.
134. LU, Xiaofeng a Michael J PIKAL. Freeze-drying of mannitol-trehalose-sodium chloride-based formulations: the impact of annealing on dry layer resistance to mass transfer and cake structure. *Pharmaceutical development and technology*. 2004, roč. 9, č. 1, s. 85–95. ISSN 1083-7450. doi 10.1081/PDT-120027421.
135. SANTIVARANGKNA, C., B. HIGL a P. FOERST. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiology*. 2008, roč. 25, č. 3, s. 429–441. ISSN 0740-0020. doi 10.1016/j.fm.2007.12.004.
136. LIU, Jinsong, Todd VIVERETTE a Marlin VIRGIN. A Study of the Impact of Freezing on the Lyophilization of a Concentrated Formulation with a High Fill Depth. *Pharmaceutical Development and Technology*. leden 2005, roč. 10, č. 2, s. 261–272. ISSN 1083-7450, 1097-9867. doi 10.1081/PDT-54452.
137. RICHARDS, A.B, S KRAKOWKA a L.B DEXTER. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology*. 2002, roč. 40, č. 7, s. 871–898. ISSN 0278-6915. doi 10.1016/S0278-6915(02)00011-X.
138. TANG, Xiaolin (Charlie), Steven L. NAIL a Michael J. PIKAL. Freeze-Drying Process Design by Manometric Temperature Measurement: Design of a Smart Freeze-Dryer. *Pharmaceutical Research*. 2005, roč. 22, č. 4, s. 685–700. ISSN 0724-8741, 1573-904X. doi 10.1007/s11095-005-2501-2.
139. CROWE, J. H. a L. M. CROWE. Preservation of mammalian cells—learning nature's tricks. *Nature Biotechnology*. 2000, roč. 18, č. 2, s. 145–146. ISSN 1087-0156. doi 10.1038/72580.
140. PIKAL, M.J., S. SHAH, M.L. ROY a R. PUTMAN. The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *International Journal of Pharmaceutics*. 1990, roč. 60, č. 3, s. 203–207. ISSN 0378-5173. doi 10.1016/0378-5173(90)90074-E.

141. FRANKS, Felix. Primary drying. In: *Freeze-drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals [principles and practice]* [online]. Cambridge: RSC Pub., 2007. [vid. 22. květen 2013]. ISBN 9781615833627 1615833625. Dostupné z: <http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?BookID=3045>.
142. CHANG, Liuquan, Deanna SHEPHERD, Joanna SUN a David OUELLETTE. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005, roč. 94, č. 7, s. 1427–1444. ISSN 1520-6017. doi 10.1002/jps.20364.
143. CARVALHO, Ana S., Joana SILVA, Peter HO, Paula TEIXEIRA, F. Xavier MALCATA a Paul GIBBS. Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Le Lait*. 2003, roč. 83, č. 3, s. 203–210. ISSN 0023-7302, 1297-9694. doi 10.1051/lait:2003010.
144. TYMCZYSZYN, E.e., A. GÓMEZ-ZAVAGLIA a E.a. DISALVO. Effect of sugars and growth media on the dehydration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, roč. 102, č. 3, s. 845–851. ISSN 1365-2672. doi 10.1111/j.1365-2672.2006.03108.x.
145. BARRESI, Antonello A., Sabrina GHIO, Davide FISSORE a Roberto PISANO. Freeze Drying of Pharmaceutical Excipients Close to Collapse Temperature: Influence of the Process Conditions on Process Time and Product Quality. *Drying Technology*. 2009, roč. 27, č. 6, s. 805–816. ISSN 07373937. doi 10.1080/07373930902901646.
146. REDDY, Kanchi Bhasker Praveen Kumar, Sharda Prasad AWASTHI, Arenahalli Ningegowda MADHU a Siddalingaiya Gurudutt PRAPULLA. Role of Cryoprotectants on the Viability and Functional Properties of Probiotic Lactic Acid Bacteria during Freeze Drying. *Food Biotechnology*. 2009, roč. 23, č. 3, s. 243–265. ISSN 08905436. doi 10.1080/08905430903106811.
147. CIURZYŃSKA, Agnieszka a Andrzej LENART. Freeze-Drying -- Application in Food Processing and Biotechnology -- A Review. *Polish Journal of Food & Nutrition Sciences*. 2011, roč. 61, č. 3, s. 165–171. ISSN 12300322.
148. CHEN, He, Zhen Xing MA, Guo Wei SHU a Tao QIN. Effect of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , and Ascorbic Acid on Survival of *Lactobacillus acidophilus* during Freeze-Drying.

*Advanced Materials Research*. 2012, roč. 568, s. 279–282. ISSN 1662-8985. doi 10.4028/www.scientific.net/AMR.568.279.

149. PATEL, Sajal M., Takayuki DOEN a Michael J. PIKAL. Determination of End Point of Primary Drying in Freeze-Drying Process Control. *AAPS PharmSciTech*. 2010, roč. 11, č. 1, s. 73–84. ISSN 1530-9932. doi 10.1208/s12249-009-9362-7.

150. DIANAWATI, Dianawati a Nagendra P. SHAH. Survival, acid and bile tolerance, and surface hydrophobicity of microencapsulated *B. animalis* ssp. *lactis* Bb12 during storage at room temperature. *Journal of food science*. 2011, roč. 76, č. 9, s. 592–599. ISSN 1750-3841. doi 10.1111/j.1750-3841.2011.02422.x.

151. MENG, X.C., C. STANTON, G.F. FITZGERALD, C. DALY a R.P. ROSS. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*. 2008, roč. 106, č. 4, s. 1406–1416. ISSN 0308-8146. doi 10.1016/j.foodchem.2007.04.076.

152. ANNOUS, Bassam A., Michael F. KOZEMPEL a Michael J. KURANTZ. Changes in Membrane Fatty Acid Composition of *Pediococcus* sp. Strain NRRL B-2354 in Response to Growth Conditions and Its Effect on Thermal Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, roč. 65, č. 7, s. 2857–2862. ISSN 0099-2240, 1098-5336.

153. AZIM, H., R. KALAVATHY, T. JULIANTO, C. C. SIEO a Y. W. HO. Effect of heat, pH and coating process with stearic acid using a fluidized bed granulator on viability of probiotic *Lactobacillus reuteri* C 10. *African Journal of Biotechnology*. 2014, roč. 11, č. 26, s. 6857–6865. ISSN 1684-5315. doi 10.4314/ajb.v11i26.

154. MILLE, Yannick, Jean-Philippe OBERT, Laurent BENEY a Patrick GERVAIS. New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, roč. 88, č. 1, s. 71–76. ISSN 1097-0290. doi 10.1002/bit.20211.

155. NAG, Arup a Shantanu DAS. Improving ambient temperature stability of probiotics with stress adaptation and fluidized bed drying. *Journal of Functional Foods*. 2013, roč. 5, č. 1, s. 170–177. ISSN 1756-4646. doi 10.1016/j.jff.2012.10.001.

156. BORA, Pushpak S. Physicochemical Properties and Excipient Compatibility Studies of Probiotic *Bacillus coagulans* Spores. *Scientia Pharmaceutica*. 2009, roč. 77, č. 3, s. 625–637. ISSN 00368709. doi 10.3797/scipharm.0904-01.

157. MATHLOUTHI, Mohamed. Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control*. 2001, roč. 12, č. 7, s. 409–417. ISSN 0956-7135. doi 10.1016/S0956-7135(01)00032-9.
158. GRANT, W. D. Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2004, roč. 359, č. 1448, s. 1249–1267. ISSN 0962-8436, 1471-2970. doi 10.1098/rstb.2004.1502.
159. TROLLER, John. *Water Activity and Food*. S.l.: Elsevier, 2012. ISBN 9780323159012.
160. JIMÉNEZ, Maribel, Enrique FLORES-ANDRADE a Luz A. PASCUAL-PINEDA. Effect of water activity on the stability of *Lactobacillus paracasei* capsules. *LWT - Food Science and Technology*. Leden 2015, roč. 60, č. 1, s. 346–351. ISSN 0023-6438. doi 10.1016/j.lwt.2014.09.050.
161. SEMYONOV, David, Ory RAMON a Eyal SHIMONI. Using ultrasonic vacuum spray dryer to produce highly viable dry probiotics. *LWT - Food Science and Technology*. Listopad 2011, roč. 44, č. 9, s. 1844–1852. ISSN 0023-6438. doi 10.1016/j.lwt.2011.03.021.
162. ABE, Fumiaki, Hirofumi MIYAUCHI, Ayako UCHIJIMA, Tomoko YAESHIMA a Keiji IWATSUKI. Effects of storage temperature and water activity on the survival of bifidobacteria in powder form. *International journal of dairy technology*. 2009, roč. 62, č. 2, s. 234–239. ISSN 1471-0307. doi 10.1111/j.1471-0307.2009.00464.x.
163. YING, DanYang, Stephanie SCHWANDER a Rangika WEERAKKODY. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. *Journal of Functional Foods*. 2013, roč. 5, č. 1, s. 98–105. ISSN 1756-4646. doi 10.1016/j.jff.2012.08.009.
164. KURTMANN, Lone, Charlotte U. CARLSEN, Jens RISBO a Leif H. SKIBSTED. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology*. 2009, roč. 58, č. 2, s. 175–180. ISSN 0011-2240. doi 10.1016/j.cryobiol.2008.12.001.
165. DIANAWATI, Dianawati a Nagendra P. SHAH. Survival, Acid and Bile Tolerance, and Surface Hydrophobicity of Microencapsulated *B. animalis* ssp. *lactis* Bb12 during Storage at Room Temperature. *Journal of Food Science*. 2011, roč. 76, č. 9, s. M592–M599. ISSN 1750-3841. doi 10.1111/j.1750-3841.2011.02422.x.

166. HIGL, Bettina, Lone KURTMANN a Charlotte U. CARLSEN. Impact of Water Activity, Temperature, and Physical State on the Storage Stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* Freeze-Dried in a Lactose Matrix. *Biotechnology Progress*. 2007, roč. 23, č. 4, s. 794–800. ISSN 1520-6033. doi 10.1021/bp070089d.
167. ANANTA, E., M. VOLKERT a D. KNORR. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*. 2005, roč. 15, č. 4, s. 399–409. ISSN 0958-6946. doi 10.1016/j.idairyj.2004.08.004.
168. WAGNER, István, Zsombor Kristóf NAGY a Ágnes SUHAJDA. Film Coating as a New Approach to Prepare Tablets Containing Long-Term Stable *Lactobacillus acidophilus*. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*. 2014, roč. 59, č. 1, s. 96–103. ISSN 03245853, 15873765. doi 10.3311/PPch.7315.
169. AMARA, A.A. a A. SHIBL. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. [vid. 29. srpen 2013]. ISSN 1319-0164. doi 10.1016/j.jsps.2013.07.001. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319016413000819>.
170. KLAYRAUNG, Srikanjana, Helmut VIERNSTEIN a Siriporn OKONOGI. Development of tablets containing probiotics: Effects of formulation and processing parameters on bacterial viability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, roč. 370, č. 1–2, s. 54–60. ISSN 0378-5173. doi 10.1016/j.ijpharm.2008.11.004.
171. *Český lékopis 2009:doplňěk 2014*. Praha: Grada, 2014. ISBN 9788024751931.
172. CHAN, E.S. a Z. ZHANG. Bioencapsulation by compression coating of probiotic bacteria for their protection in an acidic medium. *Process Biochemistry*. 2005, roč. 40, č. 10, s. 3346–3351. ISSN 13595113. doi 10.1016/j.procbio.2005.03.001.
173. CHAN, E.S. a Z. ZHANG. Encapsulation of Probiotic Bacteria *Lactobacillus Acidophilus* by Direct Compression. *Food and Bioproducts Processing*. 2002, roč. 80, č. 2, s. 78–82. ISSN 09603085. doi 10.1205/09603080252938708.
174. CALINESCU, Carmen a Mircea Alexandru MATEESCU. Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008, roč. 70, č. 2, s. 582–589. ISSN 0939-6411. doi 10.1016/j.ejpb.2008.06.006.

175. CHÁVEZ, B. E. a A. M. LEDEBOER. Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*. 2007, roč. 25, č. 7-8, s. 1193–1201. ISSN 1532-2300. doi 10.1080/07373930701438576.
176. SILVA, J. P. Sousa, Sérgio C. SOUSA a Paulo COSTA. Development of Probiotic Tablets Using Microparticles: Viability Studies and Stability Studies. *AAPS PharmSciTech*. 2013, roč. 14, č. 1, s. 121–127. ISSN 1530-9932. doi 10.1208/s12249-012-9898-9.
177. SAWICKI, Wiesław a Rafał ŁUNIO. Compressibility of floating pellets with verapamil hydrochloride coated with dispersion Kollicoat SR 30 D. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005, roč. 60, č. 1, s. 153–158. ISSN 0939-6411. doi 10.1016/j.ejpb.2004.11.003.
178. BRACHKOVA, Mariya I., Aida DUARTE a João F. PINTO. Evaluation of the viability of *Lactobacillus* spp. after the production of different solid dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Z 2009, roč. 98, č. 9, s. 3329–3339. ISSN 1520-6017. doi 10.1002/jps.21609.
179. CHEN, He, Jianhua ZHANG a Guowei SHU. SCREENING OF PROBIOTIC GOAT MILK TABLETS USING PLACKETT-BURMAN DESIGN. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*. 2014, roč. 13, č. 4, s. 351–358. ISSN 889-9594. doi 10.17306/J.AFS.2014.4.2.
180. MARZORATI, Massimo, Sam POSSEMIERS a An VERHELST. A novel hypromellose capsule, with acid resistance properties, permits the targeted delivery of acid-sensitive products to the intestine. *LWT - Food Science and Technology*. 2015, roč. 60, č. 1, s. 544–551. ISSN 0023-6438. doi 10.1016/j.lwt.2014.08.040.
181. STEGEMANN, Sven. Capsules as a Delivery System for Modified-Release Products. In: Clive G. WILSON a Patrick J. CROWLEY, ed. *Controlled Release in Oral Drug Delivery*. S.l.: Springer US, 2011. *Advances in Delivery Science and Technology*. s. 277–298. ISBN 978-1-4614-1003-4.
182. HUYGHEBAERT, Nathalie, An VERMEIRE a Jean Paul REMON. Alternative method for enteric coating of HPMC capsules resulting in ready-to-use enteric-coated capsules. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004, roč. 21, č. 5, s. 617–623. ISSN 0928-0987. doi 10.1016/j.ejps.2004.01.002.

183. MAHBUBANI, Krishnaa T., Nigel K. H. SLATER a Alexander D. EDWARDS. Protection of dried probiotic bacteria from bile using bile adsorbent resins. *New Biotechnology*. 2014, roč. 31, č. 1, s. 69–72. ISSN 1871-6784. doi 10.1016/j.nbt.2013.09.001.
184. SILVA, J. Paulo Sousa e a Maria H. AMARAL. Development of Probiotic Dosage Forms. In: J. Paulo Sousa e SILVA a Ana Cristina FREITAS, ed. *Probiotic Bacteria: Fundamentals, Therapy, and Technological Aspects*. S.l.: CRC Press, 2015. s. 227–262. ISBN 9789814411639.
185. LEE, Yuan Kun a Seppo SALMINEN. Mechanisms of Probiotics. In: *Handbook of probiotics and prebiotics* [online]. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, 2009. s. 377–440. [vid. 8. březen 2015]. ISBN 9780470432617. Dostupné z: [http://www.google.com/books?hl=cs&lr=&id=ohZtUQZ4uHwC&oi=fnd&pg=PR5&dq=handbook+of+probiotics+and+prebiotics&ots=aGTyb\\_hmQY&sig=YpX3ZsDT9Mptb\\_D3Faihza b1aI8](http://www.google.com/books?hl=cs&lr=&id=ohZtUQZ4uHwC&oi=fnd&pg=PR5&dq=handbook+of+probiotics+and+prebiotics&ots=aGTyb_hmQY&sig=YpX3ZsDT9Mptb_D3Faihza b1aI8).
186. DONG, Qiu-Yue, Meng-Yan CHEN, Yang XIN a Xue-Yan QIN. Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *International Journal of Food Science & Technology*. 2013, roč. 48, č. 7, s. 1339–1351. ISSN 1365-2621. doi 10.1111/ijfs.12078.
187. KAWASAKI, Shinji, Tsuyoshi MIMURA, Takumi SATOH, Kouji TAKEDA a Youichi NIIMURA. Response of the Microaerophilic Bifidobacterium Species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to Oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, roč. 72, č. 10, s. 6854–6858. ISSN 0099-2240, 1098-5336. doi 10.1128/AEM.01216-06.
188. TALWALKAR, Akshat, Craig W. MILLER, Kaila KAILASAPATHY a Minh H. NGUYEN. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science & Technology*. 2004, roč. 39, č. 6, s. 605–611. ISSN 1365-2621. doi 10.1111/j.1365-2621.2004.00820.x.
189. DOBRUCKA, Renata. Application of active packaging systems in probiotic foods. *LogForum*, 2013, roč. 9, č. 3, s. 167–175. ISSN 1734-459X.
190. CORCORAN, BM, STANTON C, FITZGERALD GF a ROSS RP. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and environmental mikrobiology*. 2005, roč. 71, č. 6, s. 3060-3067. ISSN 1098-5336. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.6.3060-3067.2005>

191. HEDGES AJ. Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. *International journal of food microbiology*. 2002, roč 76, č.3, s. 207-214. ISSN 0168-1605. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00022-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00022-3)
192. Miles, Citation Classic - Estimation Of The Bactericidal Power Of The Blood. *Current Contents/Life Sciences*. 1979; L12-L12.
193. RUAS-MADIEDO Patricia a G.C. de los REYES-GAVILAN. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. 2005; roč. 88 č. 3, s. 843 – 856. ISSN 0022-0302. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72750-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72750-8).
194. DUNNE W Micahel. Bacterial adhesion: Senn any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews*. 2002, roč. 15, č. 2, s. 155-166. ISSN 1098-6618. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>.
195. LONGO Francesca, Claudia VUOTTO a Gianfranco DONELLI. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol*. 2014, roč. 37, č. 2, s. 119-27. ISSN 1121-7138.
196. AOUDIA Nabil a RIEU A. Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food microbiology*. 2016, roč. 53, s. 51-59. ISSN 0740-0020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.009>.
197. KUBOTA Hiromi, Shouko SENDA, Hajime TOKUDA, Hiroo UCHIYAMA a Nobuhiko NOMURA. Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. *Food microbiology*. 2009, roč. 26, č. 6, s. 592-597. ISSN 0740-0020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.001>.
198. TULUMOGLU Sener. Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Journal of Anaerobe*. 2013, roč. 24, s. 36-42. ISSN 1075-9964. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.09.006>.
199. DOLEYRES Y a Lacroix C. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal*. 2005, roč. 15, č. 10, s. 973–988. ISSN 0958-6946. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.11.014>.



200. RUIZ Lorena, Abelardo MARGOLLES a Borja SANCHEZ. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Biotechnology*. 2013; roč. 4, s. 4-8. ISSN 2296-4185. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00396>.
201. PANICKER Aiswarya S. a Pradip BEHRE. Evaluation of bile tolerance in dairy and human origin *Lactobacillus fermentum* strains. *Indian Journal of Dairy Science*. 2014, roč. 67, č. 5, s. 421-425. ISSN 2454-2172.
202. RÖMLING Ute a S. KJELLEBERG. Microbial biofilm formation: a need to act. *Journal of internal medicine*. 2014, roč. 276, č. 2, s. 98–110. ISSN 1365-2796. <http://dx.doi.org/10.1111/joim.12242>
203. SREY Sokunrotanak, Iqbal Kabir JAHID a Sang Do HA. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. 2013, roč. 31, č. 2, s. 572-585. ISSN 0956-7135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>.
204. CARVALHO, Ana S a Joana SILVA Effects of Various Sugars Added to Growth and Drying Media upon Thermotolerance and Survival throughout Storage of Freeze-Dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnology Progress*. 2008, roč. 20, č. 1, s. 248–254. ISSN 1520-6033. <http://dx.doi.org/10.1021/bp034165y>.
205. SANTIVARANGKNA, C., Higl, B. & Foerst, P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiology*. 2008 roč. 25, č. 3, s. 429–441. ISSN 0740-0020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2007.12.004>.
206. SAHADEVA, R. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal*. 2011, roč. 18, č. 4, s. 1515–1522. ISSN 22317546.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	Adenosin trifosfát
BS	buněčná stěna
CFU	colony-forming units (kolonie tvořící jednotky)
CM	cytoplasmatická membrána
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EFSA	European Food Safety Authority
EPS	exopolysacharid
EU	Evropská unie
GIT	gastrointestinální trakt
HPMC	Hydroxypropylmethylcelulosa
MCC	Mikrokrytalická celulóza
MRS	Man-Rogosa-Sharp médiu/agar (specifická půda pro laktobacily)
MUB	specifický protein vážící se na hlen
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenin dinukleotid (oxidovaná forma)
OTR	Oxygen transition rate (rychlost přestupu kyslíku)
WHO	World Health Organisation (Světová zdravotnická organizace)
WVTR	Water vapor transition rate (rychlost přestupu vodní páry)