



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PROBIOTIKA A PREBIOTIKA A MOŽNOSTI
JEJICH KOENKAPSULACE

PROBIOTICS AND PREBIOTICS AND THEIR CO-ENCAPSULATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Karolína Šnajdarová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2016



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

Zadání bakalářské práce

| | | |
|-------------------------|---|----------------------------------|
| Číslo bakalářské práce: | FCH-BAK1055/2015 | Akademický rok: 2015/2016 |
| Ústav: | Ústav fyzikální a spotřební chemie | |
| Student(ka): | Karolína Šnajdarová | |
| Studijní program: | Chemie a chemické technologie (B2801) | |
| Studijní obor: | Chemie pro medicínské aplikace (2808R031) | |
| Vedoucí práce | prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. | |
| Konzultanti: | Ing. Petra Matoušková, Ph.D. | |

Název bakalářské práce:

Probiotika a prebiotika a možnosti jejich koenkapsulace

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- zpracování přehledné rešerše zaměřená na probiotika, prebiotika a jejich vztah
- optimalizace kultivace probiotických kmenů na vybraných substrátech s obsahem prebiotik
- charakterizace hlavních obsahových složek prebiotik
- koenkapsulace probiotických kmenů s prebiotiky a sledování stability preparátů a zachování životaschopnosti bakterií

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

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

Karolína Šnajdarová
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem probiotických kultur a možností jejich koenkapsulace se specifickými substráty, tzn. prebiotiky. Enkapsulovanými organismy byly *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve*. Jejich specifickými substráty byly inulin, psyllium, jablečná vláknina a konopná vláknina. Prebiotika byla k buňkám přidávána buď nehydrolyzovaná, anebo upravená hydrolyzou.

U částic byla mikroskopicky sledována dlouhodobá stabilita po dobu 6 týdnů v prostředí 2,5% kyseliny citrónové. Jako nejlepší substrát pro růst buněk byla sledována konopná vláknina, na níž byl zaznamenán celkově nejvyšší nárůst buněk v částicích. Částice s přídatkem konopné vlákniny se v modelovém prostředí lidského organismu navíc rozpadaly až pod vlivem střevních šťáv, mohly by být proto využity v potravinových doplňcích s cíleným transportem do střeva.

Práce se také soustředila na charakterizaci obsahových složek prebiotik. Nejvyšší obsah celkových sacharidů byl zaznamenán pro nehydrolyzovaná prebiotika, zejména psyllium. Nejvyšší obsah redukujících sacharidů ve skupině nehydrolyzovaných i hydrolyzovaných prebiotik měla konopná vláknina. Metodou tenkovrstvé chromatografie bylo zjištěno, že hlavními složkami hydrolyzovaných prebiotik jsou glukóza a fruktóza, další obsahové složky tvoří disacharidy a oligosacharidy. Pro charakterizaci prebiotik pomocí HPLC se osvědčila kolona Rezex díky své větší citlivosti. Zde bylo potvrzeno, že hlavní část hydrolyzovaných prebiotik tvoří glukóza a fruktóza, zbytek tvoří malé množství složitějších sacharidů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Probiotika, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, enkapsulace, enkapsulátor, prebiotika, průtoková cytometrie, kapalinová chromatografie, optický mikroskop.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on study of probiotic cultures and options of coencapsulation with specific substrates called prebiotics. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium breve* were used as encapsulated microorganisms. As the specific substrates inulin, psyllium, apple fiber and hemp fiber were tested. Prebiotics was added to probiotics both in untreated form and in hydrolyzed form.

The stability and viability of the cells have been studied by microscopy for the period of 6 weeks. Particles were stored in the enviroment of 2.5% citric acid. As the best substrate for cell growth the hemp fiber was found. The hemp fiber exhibited the highest increase of cells count. During observation of long-term stability in the model digestive conditions, particles with hemp fiber were destroyed in instestinal juices. For that reason, particles with hemp fiber could be used in food supplements with targeted transport.

The bachalor thesis is also focused on characterisation of prebiotics components. The highest amount of total sugars in the group of non-hydrolyzed prebiotics exhibited psyllium. The highest content of reducing sugars both in the groups of non-hydrolyzed and hydrolyzed prebiotic had hemp fiber. By the method of thin-layer chromatography was found out that the main components of hydrolyzed prebiotics are glucose and fructose. Further, some disaccharides and oligosaccharides were obtained by TLC analysis. For characterisation of prebiotics by HPLC the column Rezex exhibited better sensitivity. HPLC analysis confirmed that the main components of prebiotics are glucose and fructose, some more complex carbohydrates were found too.

KEYWORDS

Probiotics, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, encapsulation, encapsulator, prebiotics, flow cytometry, liquid chromatography, optical microscopy.

ŠNAJDAROVÁ, K. *Probiotika a prebiotika a možnosti jejich koenkapsulace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 57 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

Prohlášení

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení a všestrannou pomoc při řešení problémů. Dále bych ráda poděkovala Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za cenné rady, ochotu a pomoc při zpracování experimentální části.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| 1. ÚVOD | 9 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST | 10 |
| 2.1 Probiotika..... | 10 |
| 2.1.1 Struktura mikrobiální buňky | 10 |
| 2.1.2 Grampozitivní a gramnegativní bakterie..... | 11 |
| 2.1.3 Střevní mikroflóra | 11 |
| 2.1.4 Mechanismus účinku probiotik | 12 |
| 2.1.5 Účinky probiotik | 13 |
| 2.1.5.1 Antibiotická léčba | 13 |
| 2.1.5.2 Onemocnění zažívacího traktu..... | 13 |
| 2.1.6 Rizika užívání probiotik | 14 |
| 2.1.7 Využívané bakteriální kmeny..... | 14 |
| 2.1.7.1 Lactobacillus acidophilus..... | 14 |
| 2.1.7.2 Bifidobacterium breve | 15 |
| 2.2 Prebiotika..... | 15 |
| 2.2.1 Mechanismus účinku prebiotik | 15 |
| 2.2.2 Účinky prebiotik..... | 16 |
| 2.2.2.1 Alergická onemocnění | 16 |
| 2.2.2.2 Produkce mastných kyselin..... | 16 |
| 2.2.2.3 Vliv na metabolismus lipidů | 16 |
| 2.2.2.4 Vstřebávání minerálů | 16 |
| 2.2.3 Používaná prebiotika | 16 |
| 2.2.3.1 Inulin | 16 |
| 2.2.3.2 Psyllium | 16 |
| 2.2.3.3 Konopná vláknina | 16 |
| 2.2.3.4 Jablečná vláknina | 17 |
| 2.3 Synbiotika..... | 17 |
| 2.3.1 Koenkapsulace | 17 |
| 2.3.1.1 Mikroenkapsulace | 17 |
| 2.3.2 Metody enkapsulace (mikroenkapsulace)..... | 17 |
| 2.3.2.1 Sprejové sušení | 17 |
| 2.3.2.2 Sprejové chlazení | 18 |
| 2.3.2.3 Vytlačování | 18 |
| 2.3.2.4 Emulgace..... | 18 |
| 2.3.2.5 Fluidní vrstva | 18 |
| 2.3.2.6 Koacervace..... | 18 |
| 2.3.3 Nejčastěji používané materiály vnější vrstvy | 20 |
| 2.3.3.1 Alginát..... | 20 |
| 2.4 Metody používané ke stanovení viability probiotických bakterií | 20 |
| 2.4.1 Průtoková cytometrie | 20 |
| 2.5 Metody používané k charakterizaci prebiotik | 21 |
| 2.5.1 Kapalínová chromatografie | 21 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.5.2 | Tenkvrstvá chromatografie | 22 |
| 3. | CÍLE PRÁCE | 23 |
| 4. | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 24 |
| 4.1 | Použité chemikálie, přístroje a probiotické kultury | 24 |
| 4.1.1 | Chemikálie | 24 |
| 4.1.2 | Přístroje | 24 |
| 4.2 | Použité probiotické kultury a prebiotika | 25 |
| 4.2.1 | Probiotické kultury | 25 |
| 4.2.2 | Prebiotika | 25 |
| 4.2.2.1 | Inulin | 25 |
| 4.2.2.2 | Psyllium | 25 |
| 4.2.2.3 | Konopná vláknina | 26 |
| 4.2.2.4 | Jablečná vláknina | 26 |
| 4.3 | Hydrolyza prebiotik | 26 |
| 4.4 | Charakteristika prebiotik | 26 |
| 4.4.1 | Stanovení celkových cukrů podle Duboise | 26 |
| 4.4.2 | Stanovení redukujících cukrů podle Somogyi-Nelsona | 27 |
| 4.4.2.1 | Příprava roztoků | 27 |
| 4.5 | Stanovení obsahu látek pomocí tenkovrstvé chromatografie | 27 |
| 4.5.1 | Příprava činidla na detekci chromatogramu | 27 |
| 4.5.2 | Příprava vyvíjející směsi | 27 |
| 4.5.3 | Příprava vzorku | 27 |
| 4.5.4 | Postup provedení tenkovrstvé chromatografie | 28 |
| 4.6 | Stanovení obsahu látek pomocí HPLC | 28 |
| 4.7 | Kultivace mléčných bakterií | 28 |
| 4.7.1 | Kultivace probiotik na médiích s přidavkem prebiotik | 29 |
| 4.7.2 | Stanovení viability a koncentrace buněk pomocí průtokového cytometru | 29 |
| 4.8 | Příprava částic | 29 |
| 4.9 | Stanovení stability částic pomocí optické mikroskopie | 30 |
| 4.10 | Stanovení stability částic v modelovém prostředí lidského organismu | 30 |
| 4.10.1 | Složení modelové pankreatické šťávy | 30 |
| 4.10.2 | Složení modelové žaludeční šťávy | 30 |
| 4.10.3 | Složení modelové žlučové šťávy | 30 |
| 4.11 | Stanovení stability částic v modelovém prostředí | 30 |
| 5. | VÝSLEDKY A DISKUSE | 31 |
| 5.1 | Stanovení celkových sacharidů | 31 |
| 5.1.1 | Nehydrolyzovaná prebiotika | 31 |
| 5.2 | Stanovení redukujících sacharidů | 31 |
| 5.2.1 | Nehydrolyzovaná prebiotika | 32 |
| 5.2.2 | Hydrolyzovaná prebiotika | 32 |
| 5.3 | Stanovení obsahu látek pomocí tenkovrstvé chromatografie | 33 |
| 5.4 | Stanovení obsahu látek pomocí HPLC | 34 |
| 5.4.1 | NH ₂ kolona | 35 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.4.2 | Kolona Rezex | 36 |
| 5.5 | Kultivace probiotik na médiích s přídavkem prebiotik | 38 |
| 5.5.1 | Přídavek nehydrolyzovaného prebiotika | 38 |
| 5.5.2 | Přídavek hydrolyzovaného prebiotika | 39 |
| 5.6 | Stanovení viability a koncentrace buněk pomocí průtokového cytometru | 40 |
| 5.6.1 | Použití průtokové cytometrie pro <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 40 |
| 5.6.2 | Použití průtokové cytometrie pro <i>Bifidobacterium breve</i> | 42 |
| 5.7 | Enkapsulace | 45 |
| 5.7.1 | Stanovení viability pomocí průtokové cytometrie | 46 |
| 5.8 | Stanovení dlouhodobé stability částic | 46 |
| 5.9 | Stanovení stability částic v modelovém prostředí lidského organismu | 50 |
| 5.9.1 | Stanovení stability částic v žaludeční šťávě | 50 |
| 5.9.2 | Stanovení stability částic v pankreatické šťávě | 51 |
| 5.9.3 | Stanovení stability částic v žlučové šťávě | 51 |
| 6. | ZÁVĚR | 52 |
| 7. | SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ | 53 |
| 8. | SEZNAM ZKRATEK | 57 |

1. ÚVOD

V posledních letech se mnoho významných studií zabývá využitím probiotik, prebiotik a hlavně jejich kombinací (synbiotik) k léčbě mnoha zdravotních problémů přes alergie až k problémům trávicího ústrojí. Probiotické organismy jsou obsaženy v jogurtech, kefirech a dalších mléčných výrobcích a působí blahodárně na střevní mikroflóru. Prebiotika a vlákniny se využívají při redukci váhy, při problémech s obezitou, svou přítomností ve střevech snižují riziko rakoviny tlustého střeva a měla by proto tvořit významnou část energetického příjmu. Probiotika s prebiotiky, tzv. synbiotika, jsou často užívána ve formě doplňků stravy. Výhodou synbiotik je velmi příznivý vliv na organismus a zdravotní stav pacienta. Pokud jsou probiotika vyživována vhodnými prebiotiky, posílí se tak jejich vlastnosti a jsou účinnější. Například v poslední době se probiotika stala nedílnou součástí léčby antibiotiky, kdy zabraňují nežádoucím účinkům antibiotik, jako je zejména porušení střevní mikroflóry nebo různé záněty. Předpokládá se i jejich budoucí využití v léčbě alergických onemocnění. Dá se říci, že synbiotika mají v léčbě mnoha zdravotních problémů velkou budoucnost.

Synbiotikum lze vytvořit metodou zvanou koenkapsulace. Rozumí se tím zapouzdření probiotických organismů s vhodným prebiotikem. Velmi důležité je zjistit, které prebiotikum je nejvíce vhodné pro daný mikroorganismus a v jaké koncentraci je třeba jej k probiotikům přidat. Hlavním úkolem enkapsulace je poté ochrana aktivních biomolekul před vnějšími vlivy, dále aby zůstaly stabilní během skladování, nedocházelo k reakcím s potravinovou matricí, a aby byla částice schopná projít trávicím ústrojím až do střeva. Jako nosný materiál k enkapsulaci se často využívá alginát, což je polysacharid izolovaný z hnědých řas.

Kromě potravinářství by další oblastí zájmu mohla být aplikace v kosmetice. Zde by správně vyživená probiotika mohla sloužit jako jedna ze surovin pro výrobu farmaceutických přípravků, kde by plnily funkci složky s antimikrobiálním účinkem.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotika

Pojem probiotika je odvozen od řeckého ‚pro‘ a ‚bios‘, což může být vyloženo jako ‚pro život‘. Jako probiotika jsou obecně označovány živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v přiměřeném množství, ovlivňují pozitivně zdraví hostitele. Velmi často se jedná o monokultury či směsné kultury živých mikroorganismů. Zlepšují vlastnosti střevní mikroflóry, a tím následně zlepšují zdravotní stav člověka nebo i zvířete [1,2].

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

Mezi probiotika řadíme laktobacily, bifidobakterie, streptokoky, enterokoky a sacharomycety. Nejčastěji používanými probiotiky jsou laktobacily, bifidobakterie, kvasinkové mikroorganismy a grampozitivní koky. Významným zástupcem laktobacilů je *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis* nebo *L. fermentum*. Hojně využívané jsou také bifidobakterie a zde je významným zástupcem *B. bifidum* a *B. adolescentis*. Z kvasinkovitých mikroorganismů můžeme zmínit *Saccharomyces boulardii*. U uvedených kmenů bakterií dochází navíc k vzájemnému posílení, tzn., že například po podání kmene bakterií *Lactobacillus* se v trávicím traktu zvýší počet těchto bakterií a zvýší se také počet bakterií ve skupině *Streptococcus* [3].

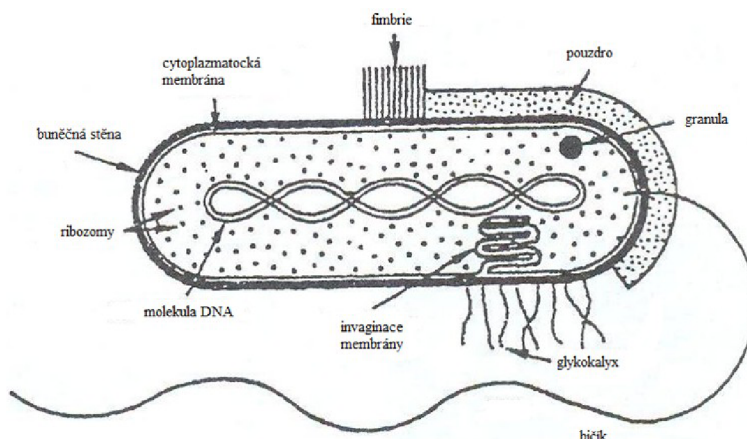
2.1.1 Struktura mikrobiální buňky

Bakterie jsou mikroskopické jednobuněčné organismy. Jsou schopny přežít v extrémních podmínkách, některé druhy bakterií zvládají extrémně vysoké i extrémně nízké teploty. Bakterie dosahují délky okolo několika mikrometrů a jejich typickým tvarem jsou tyčinky nebo koky.

Každá mikrobiální buňka je od vnějšího prostředí oddělena silnou strukturou, která se nazývá buněčná stěna. Ta dává mikrobiální buňce tvar a chrání ji před mechanickými vlivy a osmotickým tlakem vnějšího prostředí. Základní složkou buněčné stěny je peptidoglykan. Pod buněčnou stěnou je jemná elastická membrána, tzv. cytoplazmatická membrána. Cytoplazmatická membrána tvoří osmotické rozhraní buňky a vnějšího prostředí. Nad buněčnou stěnou může být pouzdro, tvořené bílkovinou nebo polysacharidem. Pouzdro bakterii uděluje odolnost. U některých druhů bakterií také vyčnívají nepohyblivé fimbrie a u jiných pohyblivé bičíky.

Vnitřní obsah buněk tvoří cytoplazma a jaderný materiál. Cytoplazma se skládá z buněčného roztoku, což je vodný roztok enzymů, meziproductů metabolismu a některých anorganických iontů. Zásobními látkami, přítomnými v cytoplazmě, jsou glykogen a kyselina poly- β -hydroxymáselná. Jsou zdrojem uhlíku a energie. Cytoplazma obsahuje také ribozomy, kde probíhá syntéza bílkovin. Jaderným materiálem tzv. nukleoidem, je deoxyribonukleová

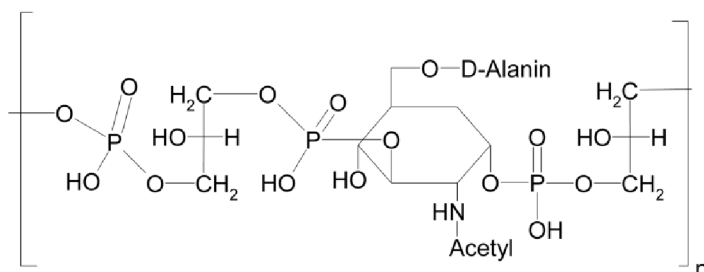
kyselina (DNA), která je stočená do kruhu a v buňce vytváří jedinou molekulu, která představuje chromozom [4].



Obrázek 1: Schéma buňky mikroorganismů [5]

2.1.2 Grampozitivní a gramnegativní bakterie

Jak již bylo řečeno, vnější část bakteriální buňky je tvořena pevnou buněčnou stěnou, jejíž hlavní složkou je peptidoglykan. Podle struktury buněčné stěny se bakterie dělí na grampozitivní a gramnegativní. U grampozitivních bakterií je buněčná stěna tvořena silnou peptidoglykanovou vrstvou, vyplněnou kyselinou teichoovou. Gramnegativní bakterie mají stěnu z tenké vrstvy peptidoglykanů bez kyseliny teichoové, ale obsahují tzv. vnější membránu. Ta je složena z fosfolipidů, strukturálních a enzymových proteinů, lipoproteinů a sacharidů [4].



Obrázek 2: Struktura kyseliny teichoové [6]

Na principu grampozitivních a gramnegativních bakterií funguje velmi důležitá mikrobiologická metoda nazývána Gramovo barvení. Jako grampozitivní bakterie se pak označují takové bakterie, jejichž usmrcené buňky po odbarvení Gramovým barvicím roztokem a moření jodovým roztokem neztrácejí toto barvivo působením rozpouštědel (tj. acetonu či ethanolu). Jako gramnegativní označujeme takové bakterie, u kterých je toto barvivo z buněk uvedenými rozpouštědly vyplavováno. Tyto rozdíly jsou způsobeny právě díky různé struktuře buněčné stěny. Gramova barvení se využívá při diagnostice bakterií nebo určení jednotlivých bakteriálních druhů [4].

2.1.3 Střevní mikroflóra

Probiotika jsou velmi důležitou součástí střevní mikroflóry, zlepšují její vlastnosti i celkový stav. Střevní mikroflóra je součástí trávicího ústrojí. Trávicí ústrojí je domovem více

než 10^{13} mikroskopických bakterií. Tato bakteriální flóra slouží k mnoha důležitým účelům v organismu. Jde například o syntézu některých vitamínů B, syntézu aminokyselin nebo o transformaci žluči, která hraje klíčovou roli v metabolismu glukózy a cholesterolu [7].

Lidské tělo má vyvinutý komplexní obranný imunitní systém, jehož posláním je buď rozpoznat a zničit nepříznivé vlivy na lidský organismus nebo vyvinout mechanismy, které umožňují, aby se minimalizovaly následky škodlivých vlivů. Konkrétně před patogeny jako jsou bakterie, paraziti nebo viry je lidský organismus chráněn pomocí bariér tvořených kůží, sliznicemi a střevním obranným systémem. Střevní obranný systém obsahuje přibližně 80% buněk imunitního systému. Obranný systém ve střevech je závislý na třech složkách, a to právě na střevní mikroflóře, střevní sliznici a dále na střevním epitelu [5,7,8].

Jako střevní mikroflóra jsou označovány bakterie obývající tlusté střevo. Žijí zde jednak bakterie hnilobné, které produkují amoniak, sulfan nebo fenoly a jednak bakterie kvasné, které produkují methan a oxid uhličitý. Činností střevních bakterií vznikají také vitamíny B₁₂ a K. Střevo je samo o sobě považováno za tzv. aktivní orgán, a to v důsledku bohaté bakteriální flóry a díky jeho metabolické aktivitě [5,7,8].

2.1.4 Mechanismus účinku probiotik

Jednotlivé mikroorganismy gastrointestinálního traktu představují nejkompexnější ekosystém v lidském těle a tvoří těsně integrovaný celek s hostitelem. Tato bakteriální komunita hraje klíčovou roli v lidské výživě a zdraví tím, že podporuje přísun živin, prevenci patogenní kolonizace a udržuje normální slizniční imunitu. Za určitých patologických okolností, jako je například onemocnění akutním průjmem či za antibiotické léčby může dojít ke zhoršení stavu střevní mikroflóry. Snížení účinků střevní mikroflóry má obecně negativní vliv na hostitelské prostředí a může být spojeno s vyšší citlivostí na enteropatogenní bakterie. Právě v takových případech je výhodné užívat probiotika [9].

Pozitivní účinek probiotických mikroorganismů v mikrobiálním ekosystému člověka je vysvětlován tak, že probiotika iniciují aktivaci určitých genů v buňkách, a tak příznivě ovlivňují široké spektrum různých střevních funkcí. Například probiotika kmenů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* jsou velmi důležité pro prevenci invaze enteropatogenů. Produkují kyselinu mléčnou a ta následně vede k odstranění škodlivých patogenů. *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* jsou účinné i při modulaci prozánětlivé odpovědi v intestinálních epitelálních buňkách, které byly napadeny enteropatogeny, jako je například *Salmonella typhimurium*. Probiotikum *Saccharomyces boulardii* zvyšuje reakce intestinálního globulinu a inhibuje protizánětlivé cytosiny. *Saccharomyces boulardii* sice není přítomno v lidském střevě, ale dá se získat s povrchu tropických stromů jihovýchodní Asie [7,9].

Probiotika zároveň produkují substance, kterými mohou inhibičně působit na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Mezi tyto látky patří organické kyseliny, peroxid vodíku a bakteriociny. Snižují nejen počet živých buněk, ale ovlivňují metabolismus bakterií a produkci toxinů [3,9]. Mechanizmy možného působení probiotik jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Mechanismy působení probiotik [3]

| Tabulka 4. Mechanismy možného působení probiotik |
|--|
| Stabilizace střevní flóry kompeticí s patogenními mikroorganismy o vazebná místa na receptorech a o živiny |
| Produkce mastných kyselin s krátkými řetězci (zvl. kyselina máselná) |
| Pokles pH střevního obsahu |
| Zvýšení rozpustnosti minerálních látek |
| Omezení zpětné resorpce žlučových kyselin |
| Stabilizace střevní slizniční bariéry, úprava střevní permeability |
| Produkce antimikrobiálních substancí |
| Modifikace toxinů a toxinových receptorů |
| Stimulace imunitní odpovědi na patogeny (zvýšená produkce sekrečních IgA, IgG, IgM, protizánětlivě působících cytokinů IL-10, TGF- β ; snížená produkce prozánětlivých cytokinů TNF- α , Interferonu- γ stejně jako mediátorů zánětu např. matrix metalloproteinás). |

2.1.5 Účinky probiotik

2.1.5.1 Antibiotická léčba

V dnešní době praktičtí lékaři často předepisují antibiotika. Ty však mohou kromě jiných vedlejších účinků měnit prostředí gastrointestinální flóry tím, že kromě ničení škodlivých mikroorganismů ničí i mikroorganismy člověku prospěšné. To často vede ke snížené odolnosti vůči patogenům, jako je například *Clostridium difficile*. Snížená odolnost může poté způsobit průjemová onemocnění. Probiotika mohou pomoci vyvážit střevní mikroflóru a zmírnit příznaky průjmu u pacientů léčených antibiotiky. Také mohou zabránit vzniku vaginálních zánětů u žen. Je to z toho důvodu, že probiotika na rozdíl od antibiotik trvale podporují veškeré tělesné mechanismy a prospěšné bakterie, posilují celkový zdravotní stav člověka a nemají pro jinak zdravé jedince negativní vedlejší účinky [10,11].

2.1.5.2 Onemocnění zažívacího traktu

Probiotika byla úspěšně zkoušena v léčbě Crohnovy choroby tlustého střeva. Počet opakování hlavních příznaků nemoci se může u některých pacientů zmenšit na polovinu, pokud je probiotikum podáváno během remisní fáze = fáze klidu [3].

Další nemocí, kdy mohou probiotické bakterie postiženému pomoci je tzv. syndrom dráždivého tračníku, který je definován jako funkční střevní porucha charakterizována bolestí břicha a potížemi s vyprazdňováním [12].

Velmi nebezpečnou nemocí trávicího traktu je i tzv. rotavirus, vyskytující se zejména u batolat a malých dětí. Je jednou z nejčastějších příčin akutního průjmu u dětí v průmyslových zemích a ve vyspělých zemích světa. Rotavirus napadá a replikuje se v epiteliálních buňkách tenkého střeva. To má za následek částečné narušení střevní sliznice. U silných průjmů existuje velké riziko dehydratace dítěte. Některá probiotika, zejména laktobacily a bifidobakterie mohou zkrátit rotavirový průjem přibližně o 1 den [12].

Další působení probiotik může být ve střevní mikroflóře starších lidí. Lidská střevní mikroflóra vykazuje změny s věkem, a to jak v jeho druhové rozmanitosti, tak v počtu bakterií. U starších lidí jsou výrazně redukovány bifidobakterie, zatímco enterobakterie a *Escherichia coli* jsou ve větším počtu ve srovnání s mladými dospělými. Tyto změny

mohou vést k vyšší hnilobě v tlustém střevě a případně i vyšší náchylnost k onemocnění, jako je gastroenteritida a infekce *Clostridium difficile* [13].

2.1.6 Rizika užívání probiotik

Užívání probiotik má i několik rizikových faktorů. Jedním z nich může být interakce probiotik s léky na předpis. Další riziko nastává pro pacienty trpící nesnášenlivostí laktózy nebo trpící mléčnými alergiemi, kteří některá probiotika vůbec nemohou užívat. Dále může nastat riziko i pro pacienty se sníženou imunitou (například díky chemoterapii), u kterých by se mohla vyvinout vážnější infekce. Nasazení probiotik v těchto případech musí být konzultováno s lékařem.

Podle většiny studií nemají probiotika větší vedlejší účinky než placebo. Teoreticky však mohou způsobit několik nežádoucích vedlejších účinků. Patří mezi ně riziko vzniku systémových infekcí, škodlivé metabolické vlivy bakteriálních buněk, poškození imunitního systému a je zde také riziko přenosu genetického materiálu mezi probiotiky a rezidentní střevní mikroflórou a s tím spojený výskyt rezistence k antibiotikům. Patogenita jednotlivých mikroorganismů je uvedena v tabulce 2. Probiotické organismy jsou všeobecně považovány za nepatogenní a zřídka jsou spojovány s případy oportunních infekcí. Ty se mohou vyskytnout především u dětí, jejichž střevní bariéra ještě není plně vyvinutá, u jedinců se střevní bariérou poškozenou onemocněním, radioterapií nebo antibiotickou léčbou a u jedinců se sníženou imunitou [14].

Tabulka 2: Patogenita vybraných probiotik [14]

| Rod | Patogenita |
|------------------------|---|
| <i>Bifidobacterium</i> | Většinou nepatogenní, několik samostatných případů humánních infekcí |
| <i>Enterococcus</i> | Některé kmeny jsou oportunně patogenní, hemolytické a rezistentní k ATB |
| <i>Lactobacillus</i> | Většinou nepatogenní, několik případů oportunních infekcí (většinou u imunosuprimovaných pacientů) |
| <i>Lactococcus</i> | Většinou nepatogenní |
| <i>Leuconostoc</i> | Většinou nepatogenní, několik izolovaných případů infekce |
| <i>Streptococcus</i> | Orální streptokoky (včetně <i>S. thermophilus</i>) většinou nepatogenní; někteří mohou být oportunně patogenní |
| <i>Saccharomyces</i> | Většinou nepatogenní, několik samostatných případů humánních infekcí |

2.1.7 Využívané bakteriální kmeny

2.1.7.1 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus je mikroorganismus patřící do rodu *Lactobacillus*, jehož druhy se vyskytují v mléce, v ústech a v trávicím traktu savců. Patří mezi homofermentativní mléčné bakterie, které při zkvašování sacharidů produkují prakticky jen kyselinu mléčnou, fermentují glukózu a laktózu na laktát a odtud pochází jméno tohoto rodu. Laktobacily jsou robustní nesporelující grampozitivní tyčinky. Jsou mikroaerofilní, anebo fakultativně anaerobní.

Lactobacillus acidophilus je tyčinková bakterie. Vyskytuje se jednotlivě, ve dvojicích nebo tvoří krátké řetězky. Optimální teplota pro růst je 39°C. Tento kmen má díky svým vhodným vlastnostem využití v mlékárenství při výrobě acidofilního mléka, podmásli a smetany, dále pak ve zdravotnictví [4,15].

2.1.7.2 *Bifidobacterium breve*

Bifidobacterium breve je bakterie patřící do rodu Bifidobakterie. Ty jsou grampozitivní, anaerobní bakterie ve tvaru tyčinek, které bývají často na jednom konci rozštěpeny. Vyskytují se jak jednotlivě, tak i v řetězcích nebo hvězdicovitém uspořádání. Patří k běžné flóře dutiny ústní a zažívacího traktu. *Bifidobacterium breve* jsou anaerobní bakterie, jejich tvarem jsou tyčinky. Úkolem *Bifidobacterium breve* v zažívacím traktu je ničit nežádoucí mikroflóru ve střevě [4,15].

2.2 Prebiotika

Jako prebiotika jsou označovány oligosacharidy nebo polysacharidy, které jsou nestravitelné trávicími enzymy v lidském organismu a selektivně zvyšují aktivitu některých skupin prospěšných bakterií. Prebiotika jsou ve střevě fermentovány prospěšnými bakteriemi za produkce mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Svou přítomností v tlustém střevě snižují riziko vzniku rakoviny (zejména rakoviny tlustého střeva a konečníku) a zvyšují schopnost vstřebávání vápníku a hořčíku. Zdrojem prebiotik jsou zelenina (cibule, česnek, pórek, rajčata), obiloviny (zelený ječmen), rostliny (čekanka, jitrocel indický), anebo ovoce (banány). Významným a široce používaným prebiotikem je tedy vláknina a její výrobky (pektiny, xylany a celulózy) [16,17].

Nestravitelné sacharidy můžeme považovat za prebiotika za předpokladu, že jsou odolné vůči žaludeční kyselině a enzymům v organismu, prokazují citlivost na fermentaci střevními bakteriemi a mají schopnost zvýšení životaschopnosti i aktivity prospěšných mikroorganismů. U lidí by prebiotika měla představovat asi 10% celkového energetického příjmu a asi 20% objemu celkového příjmu potravy [16,17].

Mezi nejznámější prebiotika řadíme například galaktooligosacharidy (GOS), inulin a deriváty inulinu, což jsou fruktooligosacharidy (FOS). GOS jsou odvozeny z laktózy, která se přirozeně vyskytuje v savčím mléce, a skládají se z řetězců monomerů galaktózy. Inulin je znám jako rozpustná vláknina. Je to směs polysacharidů složená z řetězce fruktózových jednotek. Inulin je rezervní polysacharid hlíznatých a oddenkových rostlin a vyskytuje se převážně u kořenů čekanky, topinambury a hlíz dahlie [16,18].

2.2.1 Mechanismus účinku prebiotik

Prebiotika jsou schopny regulovat a kontrolovat různé tělesné funkce, přispívají k dobrému zdravotnímu stavu a snižují riziko některých onemocnění. Enzymatická konverze prebiotik poskytuje široké spektrum látek, jako například mastných kyselin s krátkým řetězcem (zejména kyseliny máselné), některé aminokyseliny (například arginin nebo cystein), polyaminy, růstové faktory, vitamíny, a antioxidanty. Tyto látky zahrnují významnou část nutričních potřeb sliznice tlustého střeva a účastní se mnoha metabolických procesů. Fruktooligosacharidy, inulin i další prebiotika zároveň stimulují růst a aktivitu bifidobakterií a laktobacilů [17].

2.2.2 Účinky prebiotik

2.2.2.1 Alergická onemocnění

Alergické reakce jako je astma, ekzém, kopřivka, rýma či senná rýma jsou velmi časté u dnešních dětí i dospělých. U některých dětí se mohou vyvinout již na počátcích kojenecké výživy. Je prokázáno, že prebiotika přidaná navíc do kojenecké výživy mohou pomoci zabránit vyvinutí ekzému u dětí. Prebiotika jsou přítomna v mateřském mléce i samy o sobě. Jsou to hlavně nestravitelné oligosacharidy, jako jsou například fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy, které jsou přítomny v mateřském mléce v poměru 1:9 [10].

2.2.2.2 Produkce mastných kyselin

Fermentace prebiotik vede k produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem, které mají příznivé účinky na sliznici tlustého střeva. Přímou či nepřímou ovlivňují střevní záněty, karcinogenezi, minerální dostupnost a kolonizaci patogeny, dále také enzymovou aktivitu a výrobu dusíkatých metabolitů. Máselná kyselina je využívána epitelálními buňkami tlustého střeva jako zdroje energie a je kromě toho i růstový faktor. Propionát má zase protizánětlivé účinky. Inulin přispívá ke snížení rizika vzniku rakoviny tlustého střeva [12].

2.2.2.3 Vliv na metabolismus lipidů

U prebiotik byl také prokázán vliv na lipidový metabolismus jater. Podle některých studií inulin a fruktooligosacharidy snižují hladinu triacylglycerolů a snižují i koncentrace celkového cholesterolu [30].

2.2.2.4 Vstřebávání minerálů

Bylo také prokázáno, že prebiotikum inulin výrazně zvyšuje vstřebávání vápníku a zvyšuje mineralizaci kostí v průběhu pubertálního růstu [12].

2.2.3 Používaná prebiotika

2.2.3.1 Inulin

Inulin je polysacharid (fruktooligosacharid), který u rostlin z čeledi hvězdnicovitých nahrazuje škrob jako zásobní látku. Jde o jemný bílý prášek, který se ve střevě chová jako rozpustná vláknina – neštěpí se amylázou. Štěpí jej však bakteriální enzymy a on pak slouží jako zdroj energie pro symbiotické střevní bakterie [19].

2.2.3.2 Psyllium

Psyllium (jitrocel indický – *Plantago ovata*) je rostlina s květy a krátkými listy porostlá jemným chmýřím. Vyskytuje se hlavně v Indii, ale také v Iráku, Pákistánu a Austrálii. K léčení se využívá hlavně osemení, respektive vyčištěné obaly semen, která jsou nejbohatší na rozpustnou vlákninu. Psyllium napomáhá snižovat hladinu cholesterolu a cukru v krvi, přispívá ke snížení rizika rakoviny tlustého střeva a konečníku [2].

2.2.3.3 Konopná vláknina

Konopná vláknina je vyráběna z konopných semínek speciálním secím postupem. Tato nerozpustná vláknina podporuje střevní peristaltiku a napomáhá tak vyprazdňování. Kromě toho dokáže velmi dobře zasytit [20].

2.2.3.4 Jablečná vláknina

Jablečná vláknina se získává ze sušených jablek, která se po usušení namelou. Je známá pod názvem pektin. Patří mezi měkké neboli rozpustné vlákniny. Napomáhá zlepšit stav střev, zejména při zácpě a při průjmeh. Pozitivně ovlivňuje hladinu krevního cukru a cholesterolu [21].

2.3 Synbiotika

Kombinace prebiotika s probiotikem se nazývá synbiotikum. V synbiotiku je probiotikum kombinováno s prebiotikem, které je pro něj specifické. Tato kombinace potom přispívá k prodloužení přežití probiotika, pro které je prebiotikum specifickým substrátem vhodným k fermentaci. Cílem synbiotik je také zlepšit kolonizační potenciál probiotických kmenů v rámci střevní mikroflóry tím, že poskytují selektivní substrát pro růst. Kromě toho, synbiotika mohou stimulovat růst původních bifidobakterií a laktobacilů v hostitelské střevní mikroflóře. Mezi probiotikem a synbiotikem platí synergický vztah, kdy prebiotika slouží probiotikům jako zdroj energie a uhlíku [3,13,22].

K vytvoření synbiotika lze využít i metodu zvanou koenkapsulace.

2.3.1 Koenkapsulace

Probiotické výrobky jsou velmi důležité díky příznivému působení na zdraví. Velkým problémem je však nízká úroveň přežití těchto mikroorganismů v potravinách a také v gastrointestinálním traktu. Vytvoření probiotik s fyzickou bariérou a správnou výživou prebiotiky je účinný přístup k ochraně mikroorganismů a právě tímto směrem se vydává většina potravinářských i farmaceutických firem. Jednou z neúčinnějších metod je metoda mikroenkapsulace [23].

2.3.1.1 Mikroenkapsulace

Mikroenkapsulace neboli zapouzdření může být definována jako proces, ve kterém jsou buňky zapouzdřeny pomocí membrány, a to pro snížení poškození buněk nebo kvůli zabránění ztráty buněk. Je to proces, který zachovává aktivní činidla v nosném materiálu a je užitečným nástrojem pro zlepšení dodání bioaktivních molekul a živých buněk do místa určení. Materiály použité pro ochranný plášť musí být potravinářské, biologicky rozložitelné a schopné tvořit bariéru mezi vnitřní fází a jeho okolím. Nejčastěji jsou pro zapouzdření používány různé polysacharidy. Nicméně v některých případech jsou vhodné pro zapouzdření i například lipidy. Zapouzdření musí být účinné takovým způsobem, aby po průchodu trávicím traktem došlo k úspěšnému uvolnění mikroorganismů ve střevě. Mezi výhody mikroenkapsulace buněk patří hlavně ochrana před bakteriofágy a škodlivými faktory při cestě synbiotik trávicím traktem a dále také ochrana při zmrazení a skladování. [23,24]

2.3.2 Metody enkapsulace (mikroenkapsulace)

Nejvýznamnější metodou je metoda sprejového sušení a chlazení:

2.3.2.1 Sprejové sušení

Mikroenkapsulace sprejovým sušením je využívána od roku 1950, kdy byla poprvé využita k zapouzdření ochucující sloučeniny v potravinářství. V současné době je tato metoda široce používána pro zapouzdřování bioaktivních sloučenin. Sprejové sušení je rychlá metoda

zapouzdření, je zároveň také reprodukovatelná a flexibilní. Může být proto využita pro celou řadu zapouzdřovacích materiálů a bioaktivních látek. Hlavním omezením této metody je, že enkapsulované materiály musí být rozpustné ve vodě a také je vyžadována vysoká teplota. K zapouzdření může být využita celá řada materiálů, jako například arabská guma, škrob, maltodextriny, alginát, karagenan, guarová guma nebo CMC.

V první fázi je enkapsulovaná složka začleněna do roztoku nosiče. Směs je pod tlakem následně zavedena do atomizujícího zařízení. Zde je pomocí vysokotlakých trysek směs pomocí rozprašovače sprejována do prostoru sušárny. Během sušení dochází k tvorbě filmu na povrchu kapky, voda se vypařuje, koncentrace látky v kapce stoupá, až nakonec dojde ke vzniku suché částice. Na závěr dochází ke shromažďování částic na dně [25].

2.3.2.2 Sprejové chlazení

Tato metoda je velice podobná sprejovému sušení, ale provádí se při nižších teplotách. Sprejové chlazení je metoda založená na přidání bioaktivní složky k nosiči. Aktivní látka může být rozpuštěna v lipidech, může být přítomná jako suchá částice nebo ve vodné emulzi. Směs bioaktivní látky a obalového materiálu je pak vstříkována do chlazeného prostoru v chladicí komoře, což způsobí ztuhnutí stěny nosiče a vznik mikročástic [22].

2.3.2.3 Vytlačování

Metoda vytlačování je technika, kdy je tavenina (nejčastěji složená ze sacharózy, či maltodextrinu) protlačována přes jeden nebo více otvorů a poté dochází k jejímu zchlazení chladným prostředím, případně dehydratací rozpouštědlem. U této metody lze však jako nosič využít i polymerní roztok, který je následně vytlačen tryskou ve formě kapky do roztoku zesíťovacího činidla. Nejčastěji se jedná o 0,6-3% alginát sodný, který je následně zesíťován pomocí 0,05 až 1,5 M roztok chloridu vápenatého. Kapající nástroj může být jednoduše pipeta, injekční stříkačka, vibrační tryška, vodní fréza nebo rozprašovací kotouč. Ve srovnání s jinými technikami bylo zjištěno, že vytlačování je nejlepší technologie pro rozsáhlé průmyslové aplikace a že je účinné zejména pro výrobu velmi malých částic [26].

2.3.2.4 Emulgace

Další často používanou metodou je emulgace. Této metody se využívá většinou v případě ve vodě rozpustných potravinářských činidel. Emulze se skládá ze dvou nemísitelných fází, kdy jedna látka je dispergovaná ve druhé ve formě malých kapiček. Dva nejčastější typy emulzí jsou voda v oleji a olej ve vodě. Emulze vznikají nejčastěji mechanickým způsobem, kdy se využívá různých homogenizérů. Emulze olej ve vodě se může sušit pomocí různých metod sušení, jako je například sprejové sušení nebo lyofilizace a tím lze získat částice v suchém stavu [26].

2.3.2.5 Fluidní vrstva

Fluidní vrstva je technika zapouzdření, kdy je nanášen povlak na práškové částice v dávkovacím zařízení. Za specifické teploty pak dochází k atomizaci potahového materiálu. Potahový materiál může být vodný roztok celulózy nebo derivátů škrobů či proteinů [26].

2.3.2.6 Koacervace

Metoda koacervace je široce využívána pro mikroenkapsulaci mnoha hydrofobních léčiv a hojně se využívá v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Komplexní koacervace je

spontánní oddělení fází kapalina/kapalina, k níž dochází v důsledku elektrostatické interakce vzniklé při smísení dvou opačně nabitých koloidů. Vytvoří se dvě fáze, a to tzv. horní fáze, která obsahuje jen málo polymerů a je bohatá na rozpouštědlo a na tzv. spodní fázi, která se skládá z polymerů. Během koacervace se vytváří drobné kapky, které se usazují nebo spojují. Pokud jsou v roztoku přítomna jádra rozpouštědla, kapky polymerů se kolem nich hromadí a po přidání vhodného síťovacího činidla vytváří stěnu částice. Mícháním roztoku se navíc může předejít shlukování a sedimentaci kapek [26,27].

Přehled významných metod a jejich krátké postupy jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Významné metody mikroenkapsulace [28]

| Mikroenkapsulační techniky | Druhy materiálů pro pokrytí | Hlavní kroky v procesu |
|----------------------------|--|--|
| Sprejové sušení | Ve vodě rozpustné polymery | <ol style="list-style-type: none"> 1. Příprava roztoků, včetně mikroorganismů 2. Rozprašování produktu zaváděného do spreje 3. Sušení spreje 4. Separace sušené látky ve formě produktu |
| Sprejové tuhnutí | Vosky, mastné kyseliny, ve vodě rozpustné a ve vodě nerozpustné polymery, monomery | <ol style="list-style-type: none"> 1. Příprava roztoků, obsahujících jádro (např. probiotika) 2. Tuhnutí povrchu tuhnutím rozpuštěných materiálů tvořících obal 3. Odstranění nerozpustných materiálů sorpcí, používá se extrakce nebo odpařovací techniky |
| Fluidní vrstva | Ve vodě nerozpustné a ve vodě rozpustné polymery, lipidy, vosky | <ol style="list-style-type: none"> 1. Příprava povlakových roztoků 2. Fluidizace částic tvořících jádro 3. Pokrývání částic povlakovými roztoky |
| Vytlačování | Ve vodě rozpustné a ve vodě nerozpustné polymery | <ol style="list-style-type: none"> 1. Příprava roztoků povlakových materiálů 2. Disperze materiálů tvořící jádro 3. Chlazení nebo pokrytí směsí pomocí dehydratační kapaliny |
| Koacervace | Ve vodě rozpustné polymery | <ol style="list-style-type: none"> 1. Materiály tvořící jádro se dispergují v roztoku potahovacího polymeru 2. Nanášení povlaku, je toho dosaženo kontrolovaným, fyzikální mísení a pokrytím 3. Ztuhnutí povlaku teplem nebo desolvací za vzniku funkčních mikrokapslí 4. Vytlačování směsi pokrývných materiálů v opačně nabitých roztocích 5. Lyofilizace mikrokapslí nebo jejich sušení v peci |

2.3.3 Nejčastěji používané materiály vnější vrstvy

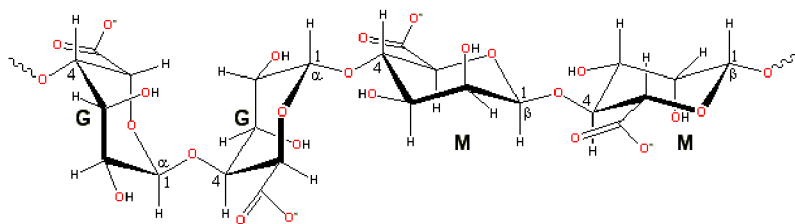
Zapouzdření probiotik v biologicky rozložitelné polymerní matici má řadu výhod. Matricové perličky nebo mikrokapsle mohou podléhat dalším povrchovým úpravám. Tato vnější vrstva může být použita ke změně estetické a sensorické vlastnosti výrobku, a může být rovněž funkční a poskytovat vyšší úroveň ochrany k buňkám. Kromě toho může mít potahová vrstva vlastnosti, které umožňují zpožděné uvolňování buněk nebo uvolnění v reakci na změnu pH [28].

Pro zapouzdření probiotických mikroorganismů jsou využívány různé polymerní materiály. Slouží hlavně k ochraně proti nízkým pH a vysoké koncentraci žluči a pro zvýšení fyzikální stability. Mikrokapsle nebo korádkové systémy, které využívají různé biopolymery, jsou velmi jednoduché na přípravu v laboratorním měřítku, a případně zapouzdřené přísady mohou být hydrofilní, hydrofobní, tekuté, nebo viskózní, atd. Bohužel, náklady jsou velmi vysoké a tyto metody mají i další nevýhody. Většina z konvenčně vyráběných mikrokapslí (např. alginátové kuličky/mikrokapsle), mají tendenci být velmi porézní, což umožňuje rychlou a snadnou difuzi vody a jiných tekutin dovnitř a ven z matrice. Mikrokapsle a mikrokuličky jsou navrženy tak, aby postupně uvolňovaly aktivní složky. Mikrokapsle mohou být otevřeny mnoha různými způsoby například teplem, solvatací, difúzí a tlakem. Povlak může být také navržen tak, aby se otevřel ve specifických oblastech těla [28].

Nejrozšířenějším materiálem pro vnější obal vhodný pro enkapsulaci je alginát sodný, u nějž bylo zjištěno, že zvyšuje přežití probiotik o 80-95%. Výhodou alginátu sodného je i to, že je to biokompatibilní, levný a netoxický materiál. Buňky potažené alginátem jsou chráněny před kyselostí žaludeční šťávy a zároveň poté alginát umožní jejich uvolnění v prostředí střeva [29].

2.3.3.1 Alginát

Alginát je nerozvětvený polymer, který se skládá z kyseliny manuronové a jejího epimeru kyseliny guluronové. Alginát je izolován z různých přírodních zdrojů. Jsou to produkty různých bakterií a hnědých řas [30].



Obrázek 3: Vzorec alginátu [31]

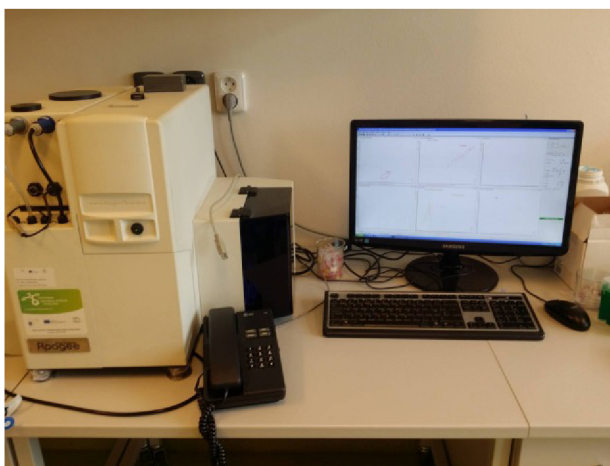
2.4 Metody používané ke stanovení viability probiotických bakterií

2.4.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která využívá principy mikroskopie a citlivé detekce světelného signálu. Umožňuje měření a analýzu fyzikálně-chemických vlastností buňky nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem. Buňky jsou unášeny proudem nosné kapaliny do měrné cely, kde jsou analyzovány laserovým paprskem - ve

chvíli, kdy buňka tento paprsek kříží, dochází k lomu a rozptylu světla. Podle směru a úhlu lomu bývá označován jako „forward scatter“ (přímý rozptyl) a „side scatter“ (boční rozptyl).

V analyzovaných buňkách se vhodnou metodou znázorní detekovaná látka tak, aby ji mohl rozpoznat detekční systém přístroje. Využívá se barvení methylenovou modří a nebo fluorochromy. Některé buňky jsou sice schopny vnitřní fluorescence díky přítomnosti vnitřních fluoroforů (například cytochromy, peroxidáza, hemoglobin), ale ve většině případů se užívá velmi specifických fluorochromů. U fluorochromů je vhodné, aby se jejich absorpční maximum co nejvíce blížilo vlnovým délkám běžně používaných laserů. Mezi velmi často využívaná fluorescenční barviva řadíme například propidiumjodid. Ten vykazuje fluorescenci po vmezeření do DNA mrtvých buněk. [32,33].



Obrázek 4: Průtokový cytometr Apogee

2.5 Metody používané k charakterizaci prebiotik

2.5.1 Kapalinová chromatografie

Obecně je chromatografie separační metoda, při které se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek je umístěn vždy na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fáze je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdržují složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají složky méně zdržované.

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. O separaci složek zde výrazně rozhoduje nejen interakce vzorku se stacionární fází, ale i použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fází. Čas, jaký stráví v jedné nebo druhé fází, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě rozdílné rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii. Kapalinová chromatografie je vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin. Pracuje se obvykle eluční metodou. Kapalinový chromatograf se skládá z čerpadla, směšovacího zařízení, dávkovacího zařízení, kolony a termostatu. Mezi nejčastěji používané

detektory řadíme fotometrický detektor, refraktometrický detektor, fluorescenční detektor nebo i hmotnostní spektrometr

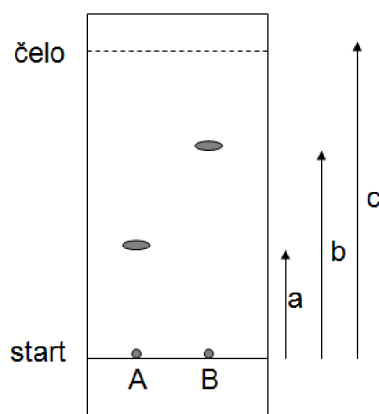
Mezi varianty kapalinové chromatografie patří HPLC neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Součástí aparatury je výkonné vysokotlaké čerpadlo, které umožňuje průtok kapaliny kolonou menších rozměrů a separace je díky tomu účinnější [34].

2.5.2 Tenkovrstvá chromatografie

V této chromatografické technice je stacionární fáze umístěna v ploše. Je součástí tenké vrstvy na vhodné podložce ze skla, hliníku nebo polyesteru. V tenkovrstvé chromatografii se podle použité tenké vrstvy, která je obvykle na bázi silikagelu nebo oxidu hlinitého, uplatňuje adsorpce, případně jí konkuruje rozdělování. Vzorek se nanáší pomocí kapiláry nebo mikropipety na start, který je blízko jednomu konci plochy. Tímto koncem se po vyschnutí rozpouštědla ponoří podložka s tenkou vrstvou do mobilní fáze. Systém se umístí v prostoru nasyceném parami mobilní fáze. Mobilní fáze vzlíná tenkou vrstvou pomocí kapilárních sil, pohybuje se přes start a unáší s sebou složky vzorku tím rychleji, čím méně se poutají na stacionární fázi a čím jsou lépe rozpustné v mobilní fázi. Proto se vzorek rozdělí na jednotlivé zóny. Vyhodnocení se ukončí před dosažením konce plochy. Čelo se ihned označí (po odpaření rozpouštědla již nemusí být rozeznatelné). Pokud složky nejsou tvořeny barevnými látkami, provede se jejich detekce. Použit můžeme postřík aerosolem činidla, které se složkami reaguje na barevné sloučeniny nebo pozorování pod ultrafialovou lampou, kdy fluoreskující látky se jeví jako světlé skvrny na tmavém pozadí [34].

V našem případě byla zvolena tenká vrstva **Silufol** a jelikož vzorky nebyly složeny z barevných látek, byla použita detekce pomocí postříku detekčním činidlem.

Vyhodnocení této metody je postaveno na retenčních (retardačních) faktorech. Podíl vzdálenosti středu skvrny od startu a čela od startu se nazývá retenční (retardační faktor) R_f . V daném systému a za daných podmínek je retenční faktor pro určitou látku konstantou. Retenční faktor známé složky určíme ze standardu a podle této hodnoty ji vyhledáme v neznámém vzorku. Výhodou planárních technik je možnost provádět více analýz současně na jediné tenké vrstvě. Nejistíme-li skvrnu se stejným retenčním faktorem, je přítomnost této složky ve vzorku vyloučena, zjistíme-li ji, je přítomnost složky pravděpodobná [34].



Obrázek 5: Vyhodnocení chromatografie na tenké vrstvě [35]

3. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem předložené práce bylo studium probiotických kultur, testování možností jejich koenkapsulace se specifickými substráty (prebiotiky) a sledování životaschopnosti enkapsulovaných bakterií v modelových fyziologických prostředích. Dalšími cíly byla charakterizace prebiotik a jejich hlavních obsahových složek. Za tímto účelem byly provedeny následující dílčí úkoly:

1. Zpracování přehledné literární rešerše zaměřené na probiotika, prebiotika a jejich vztah.
2. Optimalizace kultivace probiotických kmenů na vybraných substrátech s obsahem prebiotik.
3. Charakterizace hlavních obsahových složek prebiotik.
4. Koenkapsulace probiotických kmenů s prebiotiky, sledování stability preparátů a zachování životaschopnosti bakterií.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie, přístroje a probiotické kultury

4.1.1 Chemikálie

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

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

4.1.2 Přístroje

Analytické váhy – Boeco (SRN)
Předvážky Ohaus ScoutPro (USA)
Předvážky Kern 440-33 (Německo)
Optický mikroskop – Intracomicro LM666PC/∞LED (ČR)
Fluorescenční mikroskop Olympus IX71, Microtime 200 (Německo)
Bürkerova komůrka Marienfeld (Německo)
Mikrocentrifuga –Mikro 200, Hettich Zentrifugen (UK)
Spektrofotometr –Helios γ , Unicam (UK)
Enkapsulátor – Büchi B-395 Pro (CH)

Průtokový cytometr - Apogee A50, Apogee Flow Systems (GB)
 Sestava HPLC, Ultimate 3000 (ČR):
 Termostat – Column oven LCO 101
 Pumpa – Dionex UltiMate 3000 Pump
 Detektor – Dionex UltiMate 3000 Diode Array Detector
 Kolona Rezex ROA – Organic Acid H+ (8%), 7,8 x 300 mm (Phenomenex – USA)
 Kolona Supelcosil™ LC-NH2, 5µm, 4,6 x 250 mm (Phenomenex – USA)
 Vortex Heidolph Reax top (Německo)
 Magnetická míchačka Lavat (ČR)

4.2 Použité probiotické kultury a prebiotika

4.2.1 Probiotické kultury

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

4.2.2 Prebiotika

V práci byly použity vzorky inulinu, psyllia, konopné vlákniny a jablečné vlákniny (viz obrázek 6). Tyto vlákniny jsou běžně dostupné ve specializovaných obchodech se zdravou výživou.



Obrázek 6: Použitá prebiotika

4.2.2.1 Inulin

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

4.2.2.2 Psyllium

- Název: 100 % originalní psyllium – indická vláknina
- Značka: Medicol
- Složení: Rozemleté osemení jitrocele indického

- Výrobce: ASP CZECH s.r.o.
- Zakoupeno: Zdravá výživa NC Královo pole

4.2.2.3 Konopná vláknina

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

4.2.2.4 Jablečná vláknina

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

4.3 Hydrolýza prebiotik

Jako hydrolýza je obecně označována reakce, kdy je spotřebována voda. V našem případě jde o úpravu prebiotik, kdy se hydrolýzou prebiotika rozloží na mono- či oligosacharidy. Existuje několik způsobů hydrolýzy – alkalická, enzymatická a kyselá. V této práci je využívána hydrolýza kyselá, a to zejména díky své velké účinnosti.

Do zkumavek byl navážen 1 g hydrolyzované složky (prebiotika), ke kterému byly přidány 3 ml 1,2 M HCl a dále 5 ml 50% methanolu. Poté došlo k hodinovému zahřívání při 100°C ve vroucí vodní lázni. Byly provedeny i úpravy množství přidávaných látek pro průběh hydrolýzy – tzn. methanolu a HCl. Abychom pro práci získali více hydrolyzátu, bylo množství navýšeno nejprve na 9 ml HCl a 15 ml HCl, později bylo navýšeno na 12 ml HCl a 20 ml methanolu. Tato hydrolýza probíhala v Erlenmayerových baňkách o objemu 50 ml. Hydrolyzáty byly poté zfiltrány. Byly uchovávány pro další použití při teplotě kolem 4°C.

4.4 Charakteristika prebiotik

4.4.1 Stanovení celkových cukrů podle Duboise

Pro stanovení celkových cukrů byla využita metoda dle Duboise. Tato metoda je založena na dehydrataci cukrů koncentrovanou kyselinou sírovou a následné kondenzaci vzniklého furfuralu s fenolem za vzniku barevných kondenzačních produktů. Jde tedy o kolorimetrickou reakci. Tyto barevné produkty jde poté spektrofotometricky stanovit [36].

1 ml vzorku byl smíchán s 1 ml 5% fenolu a s 5 ml koncentrované H₂SO₄. Roztok byl zamíchán a nechal se 30 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 490 nm. Stanovení bylo provedeno pro glukózu, kdy byla získána kalibrační křivka pro rozmezí koncentrací 0,02 – 0,1 mg/ml. Následně byla reakce provedena pro daná nehydrolyzovaná prebiotika, kdy bylo naváženo vždy 0,1 g na 10 ml. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Z výsledných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

4.4.2 Stanovení redukujících cukrů podle Somogyi-Nelsona

Pro stanovení redukujících cukrů byla použita metoda podle Somogyi-Nelsona. Je to reakce, která je založena na redukcí měďnatých solí. Vyloučený Cu_2O se pak stanovuje spektrofotometricky, jde také o kolorimetrickou reakci, kdy dostáváme barevné produkty [36].

Reakce probíhala tak, že byl 1 ml vzorku smíchán s 0,5 ml Somogyi-Nelsonovým činidlem I. a II. Následně byl vzorek umístěn do vroucí lázně na 10 minut a poté ochlazen tekoucí vodou na laboratorní teplotu. Do ochlazeného vzorku bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III. Vzniklý Cu_2O byl poté důkladně rozpuštěn promícháním na vortexu. Na konec byl doplněn objem na 10 ml a došlo k měření absorbance při 720 nm. Reakce byla provedena pro glukózu, kdy byla získána kalibrační křivka pro rozmezí koncentrací 0,01 – 0,1 g/l. Reakce také byla provedena pro hydrolyzovaná i nehydrolyzovaná prebiotika, kdy každý vzorek byl proměřen opět třikrát. Z výsledných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

4.4.2.1 Příprava roztoků

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

Somogyi-Nelsonovo činidlo II: 4 g pentahydrátu síranu měďnatého byly smíchány s 24 g síranu sodného a 200 ml destilované vody.

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

4.5 Stanovení obsahu látek pomocí tenkovrstvé chromatografie

4.5.1 Příprava činidla na detekci chromatogramu

4 g difenylaminu byly rozpuštěny v 50 ml acetonu, poté byly přidány 4 ml anilinu a 28 ml H_3PO_4 . Po dokonalém rozmíchání a vytvoření homogenní směsi bylo přidáno 150 ml acetonu. Vzniklo hnědě zbarvené činidlo.

4.5.2 Příprava vyvíjející směsi

Bylo smícháno 50 ml butanolu, 12,5 ml kyseliny octové a 62,5 ml destilované vody. Směs byla umístěna do zakryté kádinky, aby neunikaly páry vyvíjející směsi do okolí.

4.5.3 Příprava vzorku

Pro stanovení byly použity vzorky nehydrolyzovaných prebiotik, ale dále byly charakterizovány i jejich hydrolyzáty připravené dle postupu v kapitole 4.3. Byly zvoleny tři časy hydrolyzy a to 20 minut, 1 hodina a 2 hodiny. Ze standardů byl použit vždy 5% roztok příslušného sacharidu (glukóza, fruktóza, sacharóza, laktóza, maltóza, arabinóza, rhamnóza, xylóza, galaktóza).

4.5.4 Postup provedení tenkovrstvé chromatografie

Na desce Silufol byl označen obyčejnou tužkou start přibližně 1 cm od okraje. Vzorky byly na desku nanášeny pomocí mikropipety tak, aby maximální velikost skvrny byla 2 – 3 mm. Další vzorky byly nanášeny ve vhodné vzdálenosti od sebe tak, aby nedošlo k jejich vzájemnému smíšení. Po nanesení byl chromatogram vysušen v sušárně a byl umístěn do chromatografické kolony s vyvíjející směsí. Mobilní fázi u tenkovrstvé chromatografie jsou organická rozpouštědla a pro správné vyvíjení chromatogramu by měla být chromatografická komora nasycena parami mobilní fáze. Chromatografická komora byla připravena tak, že do ní byla nalita mobilní fáze v takovém množství, aby při vložení tenké vrstvy nebyla startovní linie (nanášené vzorky) ponořena do mobilní fáze. Rychlost vzlínání mobilní fáze závisí na vlastnostech složek, které daný vzorek obsahuje a na materiálu stacionární fáze. Látky, které se více poutají ke stacionární fázi, budou unášeny mobilní fází pomaleji.

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

4.6 Stanovení obsahu látek pomocí HPLC

Bylo provedeno měření na dvou různých kolonách. V prvním případě byla jako mobilní fáze použita směs acetonitrilu a destilované vody a v poměru 75 : 25. Eluce byla izokratická, kolona byla v termostatu zahřívána na 30°C a průtok byl nastaven na 1 ml za minutu. Byla použita kolona Supelco Luna NH₂. Pomocí dávkovací smyčky o objemu 20 µl byl na kolonu aplikován vzorek a detekce látek probíhala na refraktometrickém detektoru. Vzorky byly před analýzou filtrovány na membránových filtrech o průměru 0,45 µm.

V druhém případě byla jako mobilní fáze použita pouze okyselená voda připravena z destilované vody a kyseliny orthofosforečné v poměru 99 : 1. Eluce byla izokratická, kolona byla v termostatu zahřívána na 60°C. Průtok byl nastaven na 0,5 ml za minutu. Byla použita kolona Rezex ROA-Organic Acid H⁺. Pomocí dávkovací smyčky o objemu 20 µl byl na kolonu aplikován vzorek a detekce látek probíhala na refraktometrickém detektoru. Vzorky byly před analýzou filtrovány také na membránových filtrech o průměru 0,45 µm.

4.7 Kultivace mléčných bakterií

Pro kultivaci bakteriálních kultur *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve* bylo použito komerční MRS médium. Médium bylo vždy smícháno v Erlenmayerově baňce s destilovanou vodou v poměru daném výrobcem, tedy 55,15 g média na 1000 ml destilované vody a sterilizováno v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut. Obě kultury byly vždy zaočkovány ve sterilním boxu. Očkování bylo prováděno do plastových zkumavek. Bylo očkováno vždy 1 ml kultury do 10 ml média do malých plastových zkumavek, anebo 3 ml kultury do 20 až 40 ml média do větších plastových zkumavek.

Kultivace probíhala při 37°C po dobu 24 hodin. Poté byly kultury použity ke stanovení viability na průtokovém cytometru, k zaočkování na další práci, případně k enkapsulaci a tvorbě částic.

4.7.1 Kultivace probiotik na médiích s přidavkem prebiotik

Probiotika *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve* byly kultivovány v MRS médiu. Do média byly přidány zvolené hydrolyzované i nehydrolyzované prebiotika v různých koncentracích, aby bylo zjištěno, jaká koncentrace je pro jejich růst nejlepší. Byla připravena série zkumavek s přidavkem a bez přidavku prebiotika. Zvolená neupravená prebiotika (inulin, psyllium, jablečná a konopná vláknina) byla přidávána do média v koncentraci 10 a 100 mg/ml. Hydrolyzovaná prebiotika byla přidávána dle schématu uvedeného v tabulce 4. Kultivace probíhala ve zkumavkách při 37 °C v 10 ml sterilního média a zaočkování bylo provedeno 5 % 24-hodinového inokula. V 24.hodině byl proveden sterilní odběr a ve vzorcích byl stanoven počet buněk a jejich viabilita. Toto stanovení bylo provedeno spektrofotometricky měřením zákalu při 630 nm. Viability buněk byla sledována mikroskopicky barvením methylenovou modří. Pro stanovení množství buněk a jejich viability bylo rovněž využíváno průtokové cytometrie, kde bylo jako fluorescenční sondy využito propidiumjodidu.

Tabulka 4: Schéma přidavků hydrolyzovaných prebiotik v jednotlivých seriích

| | Inulin | Psyllium | Konopná vláknina | Jablečná vláknina |
|-----------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|
| 1. | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml |
| 2. | 2,5 ml inulinu+2,5 ml MRS | 2,5 ml psyllia+2,5 ml MRS | 2,5 ml konopné vlákniny+2,5 ml MRS | 2,5 ml jablečné vlákniny+2,5 ml MRS |
| 3. | 0,5 ml inulinu+4,5 ml MRS | 0,5 ml psyllia+4,5 ml MRS | 0,5 ml konopné vlákniny+4,5 ml MRS | 0,5 ml jablečné vlákniny+4,5 ml MRS |

4.7.2 Stanovení viability a koncentrace buněk pomocí průtokového cytometru

Odebrané vzorky buněk pro toto stanovení byly 10x naředěny destilovanou vodou, bylo odebráno 0,1 ml buněčné kultury a bylo přidáno 0,9 ml destilované vody. K 1 ml takto připraveného vzorku bylo přidáno 5 µl propidiumjodidu (1 mg/ml) a vzorky byly ponechány k obarvení 10 minut ve tmě. Vzorky se ponechávají vždy po dobu 10 minut ve tmě, aby došlo k dostatečnému průniku barviva do buněk a k jeho plnému vmezeření do DNA. Následně byly buňky analyzovány.

4.8 Příprava částic

Buňky probiotik po 24 hodinách kultivace byly podrobeny analýze na průtokovém cytometru. Došlo ke stanovení koncentrace a viability buněk. Poté byly kultury určené k enkapsulaci centrifugovány při 5000 otáčkách po dobu 10 minut. Kapalná složka byla po centrifugaci odlita a buňky byly následně rozsuspendovány v 2% alginátu. Poté byly rozděleny na sérii 6 vzorků (bez přidavku prebiotika, s přidavkem glukózy a s přidavkem 0,5 g jednotlivých prebiotik – inulin, psyllium, jablečné vlákniny a konopné vlákniny. Pro přípravu částic byl použit enkapsulátor B-395 Pro (BÜCHI) s tryskami o velikosti 450 a 1000 µm. Jako srážecí roztok byl použit 1% roztok CaCl₂. Připravené částice byly zfiltrány

a umístěny do modelového prostředí 2,5% kyseliny citronové. Posléze byly použity pro stanovení dlouhodobé stability viz kapitola 5.8.

4.9 Stanovení stability částic pomocí optické mikroskopie

Optická mikroskopie byla použita ke sledování velikosti připravených částic, morfologie připravených částic, ke stanovení počtu a viability buněk uvnitř částice, dále také ke stanovení počtu a viability buněk uvolněných z částic při dlouhodobém uchovávání v modelovém prostředí, případně při působení modelových trávicích šťáv. Po této době, tj. po 1 týdnu, 3 týdnech a 6 týdnech, byly jednotlivé částice i roztok pozorován pod optickým mikroskopem. Pro sledování uvolněného množství buněk byla k pozorování využita i Bürkerova komůrka.

4.10 Stanovení stability částic v modelovém prostředí lidského organismu

Stabilita částic byla stanovena v žaludeční, pankreatické a žlučové šťávě. Vzorky byly připraveny vložením částice nejprve do žaludeční šťávy, následně do pankreatické šťávy a nakonec do žlučové šťávy. Pod optickým mikroskopem byla sledována viabilita bakterií uvnitř částice a jejich uvolněné množství působením šťávy. Do žaludeční a v pankreatické šťávy byly enkapsulované bakterie umístěny na 20 minut při teplotě 37°C, ve žlučové šťávě byly po dobu 40 minut při teplotě 37°C.

4.10.1 Složení modelové pankreatické šťávy

Pankreatická šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pankreatinu a 1,5 g NaHCO₃ ve 100 ml destilované vody. V roztoku bylo pH upraveno na hodnotu 8,9.

4.10.2 Složení modelové žaludeční šťávy

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

4.10.3 Složení modelové žlučové šťávy

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

4.11 Stanovení stability částic v modelovém prostředí

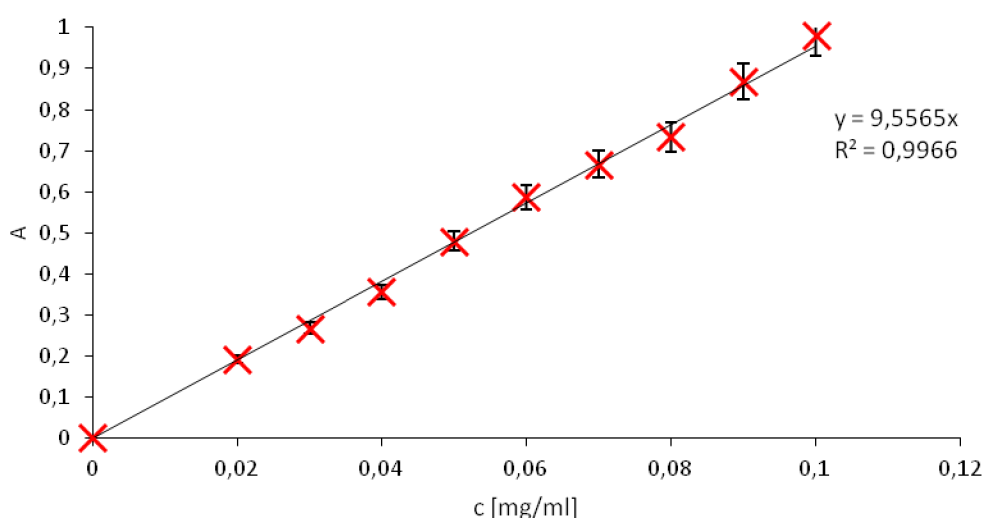
Pro optimální růst bakterií *Lactobacillus acidophilus* je nejvhodnější prostředí, které má pH 3-4. Proto jako modelová potravina byla zvolena 2,5% kyselina citrónová o tomto pH. Částice byly ponechány po dobu 6 týdnů v tomto modelovém prostředí. Stabilita částic byla sledována pod optickým mikroskopem po týdnu, po 3 týdnech a po 6 týdnech.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

V rámci experimentální práce byla nejprve charakterizována prebiotika.

5.1 Stanovení celkových sacharidů

Podle pracovního postupu uvedeného v kapitole 4.4.1 byla nejprve stanovena kalibrační křivka glukózy (obrázek 7). Rovnice regrese má tvar $y = 9,5565x$. Dále bylo stanovení celkových cukrů provedeno pro daná nehydrolyzovaná prebiotika. U každého byla absorbance změřena třikrát a výsledná absorbance je průměrem těchto tří hodnot. Pomocí rovnice regrese byl vypočítán obsah celkových cukrů v každém prebiotiku i se směrodatnou odchylkou. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5.



Obrázek 7: Kalibrační křivka glukózy pro stanovení celkových cukrů

5.1.1 Nehydrolyzovaná prebiotika

Z výsledků (tabulka 5) je patrné, že nejvyšší hodnotu absorbance a tedy i nejvyšší obsah celkových cukrů mělo psyllium. Naopak jablečná vláknina a konopná vláknina mají velmi malý obsah celkových sacharidů.

Tabulka 5: Obsah celkových cukrů u jednotlivých druhů prebiotik

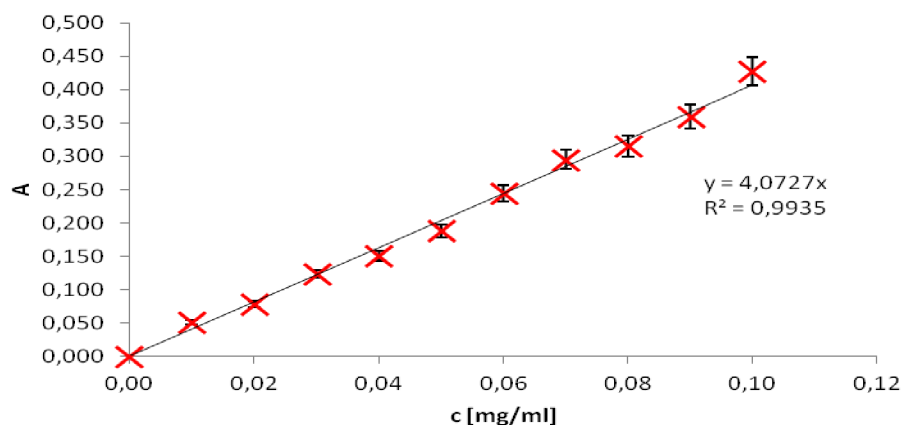
| Prebiotika | Koncentrace [mg/ml] | Průměrná absorbance | Obsah celkových cukrů [mg/ml] | Obsah celkových cukrů [mg/g] |
|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Inulin | 10 | 0,509 | $0,05 \pm 0,01$ | 5,33 |
| Psyllium | 10 | 0,923 | $0,10 \pm 0,01$ | 9,66 |
| Jablečná vláknina | 10 | 0,083 | $0,01 \pm 0,00$ | 0,87 |
| Konopná vláknina | 10 | 0,018 | $0,00 \pm 0,00$ | 0,19 |

5.2 Stanovení redukujících sacharidů

Podle pracovního postupu uvedeného v kapitole 4.4.2 byla stanovena kalibrační křivka glukózy. Rovnice regrese má tvar $y = 4,0727x$. Kalibrační křivka je znázorněna na

obrázku 8. Dále bylo stanovení redukujících cukrů provedeno pro daná nehydrolyzovaná i hydrolyzovaná prebiotika. U každého byla absorbance změřena třikrát a výsledná absorbance je průměrem těchto tří hodnot.

Pomocí rovnice regrese byl vypočítán obsah redukujících cukrů v každém prebiotiku i se směrodatnou odchylkou. Výsledné hodnoty pro nehydrolyzovaná prebiotika jsou uvedeny v tabulce 6. Výsledné hodnoty pro hydrolyzovaná prebiotika jsou uvedeny v tabulce 7.



Obrázek 8: Kalibrační křivka glukózy pro stanovení redukujících cukrů

5.2.1 Nehydrolyzovaná prebiotika

Z výsledků vyplývá, že nejvyšší hodnotu obsahu redukujících cukrů má u nehydrolyzovaných prebiotik konopná vláknina. Nejmenší obsah redukujících cukrů má inulin (viz tabulka 6).

Tabulka 6: Obsah redukujících cukrů u jednotlivých nehydrolyzovaných druhů prebiotik

| Prebiotika | Koncentrace [mg/ml] | Průměrná absorbance | Obsah redukujících cukrů [mg/ml] | Obsah redukujících cukrů [mg/g] |
|-------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Inulin | 20 | 0,457 | 0,11 ± 0,02 | 5,61 |
| Psyllium | 20 | 0,578 | 0,14 ± 0,02 | 7,10 |
| Jablečná vláknina | 20 | 0,487 | 0,12 ± 0,02 | 5,98 |
| Konopná vláknina | 20 | 1,386 | 0,34 ± 0,02 | 17,02 |

5.2.2 Hydrolyzovaná prebiotika

Z výsledků uvedených v tabulce 7 je vidět, že u tohoto stanovení nejsou uvedeny hodnoty pro jablečnou vlákninu. Jablečná vláknina při velké koncentraci vytváří při hydrolyze gel, který rychle tuhne. Proto nemohla být dále spektrofotometricky analyzována. U ostatních hydrolyzovaných vzorků byl obsah redukujících cukrů hodně podobný, nejvyšší obsah měla konopná vláknina, nejnižší psyllium.

Tabulka 7: Obsah redukujících cukrů u jednotlivých druhů hydrolyzovaných prebiotik

| Prebiotika | Koncentrace [mg/ml] | Průměrná absorbance | Obsah redukujících cukrů [mg/ml] | Obsah redukujících cukrů [mg/g] |
|-------------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Inulin | 10 | 0,396 | 0,10 ± 0,01 | 9,72 |
| Psyllium | 10 | 0,382 | 0,09 ± 0,01 | 9,38 |
| Konopná vláknina | 10 | 0,399 | 0,10 ± 0,08 | 9,79 |

5.3 Stanovení obsahu látek pomocí tenkovrstvé chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie byla provedena pro hydrolyzované vzorky prebiotik. Ty byly podrobeny hydrolýze po dobu 20 minut, 1 hodinu (1) a 2 hodiny (2). Stanovení bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.5. V tabulce 8 jsou uvedeny vypočítané retardační faktory. Retardační faktory byly vypočítány podle obrázku 5 v kapitole 2.5.2.

Tabulka 8: Vypočítané retardační faktory jednotlivých prebiotik

| | Retardační faktory | | | |
|------------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Rf ₁ | Rf ₂ | Rf ₃ | Rf ₄ |
| Glukosa | 0,25 | | | |
| Fruktosa | 0,36 | | | |
| Inulin | 0,21 | 0,38 | 0,66 | 0,75 |
| Inulin (1) | 0,19 | 0,35 | 0,65 | 0,75 |
| Inulin (2) | 0,21 | 0,35 | 0,64 | 0,77 |
| Psyllium | 0,82 | | | |
| Psyllium (1) | 0,78 | | | |
| Psyllium (2) | 0,48 | | | |
| Jablečná vláknina | 0,38 | | | |
| Jablečná vláknina (1) | 0,22 | 0,38 | | |
| Jablečná vláknina (2) | 0,20 | 0,40 | | |
| Konopná vláknina | 0,28 | 0,37 | | |
| Konopná vláknina (1) | 0,29 | 0,37 | | |
| Konopná vláknina (2) | 0,14 | 0,22 | 0,42 | |

Vypočítané hodnoty retardačních faktorů byly porovnány s retardačními faktory standardů. Retardační faktory vybraných standardů různých sacharidů jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Retardační faktory standardů

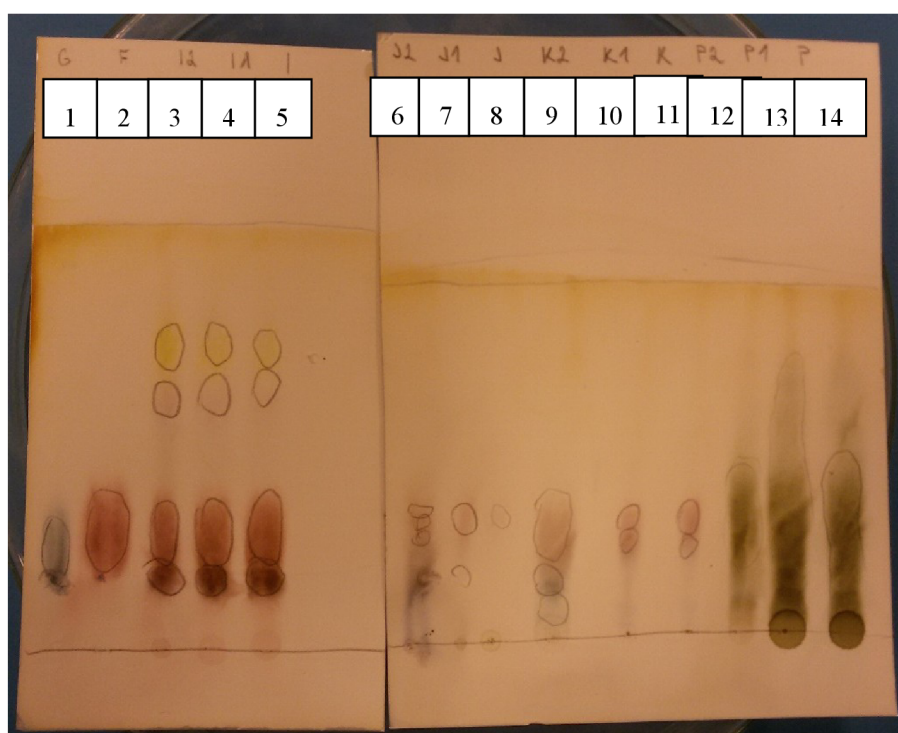
| | Rf | | Rf | | Rf |
|------------------|------|------------------|------|------------------|------|
| Glukóza | 0,26 | Laktóza | 0,07 | Rhamnóza | 0,47 |
| Fruktóza | 0,29 | Maltóza | 0,11 | Xylóza | 0,40 |
| Sacharóza | 0,15 | Arabinóza | 0,30 | Galaktóza | 0,20 |

Metoda tenkovrstvé chromatografie sloužila pro optimalizaci hydrolýzy. Z výsledků tenkovrstvé chromatografie vyplývá, že zatímco inulin obsahoval po všech třech typech hydrolýzy čtyři složky, psyllium obsahovalo jen jednu složku. Jablečná vláknina po 20

minutách hydrolýzy obsahovala jen jednu složku, po jedné hodině a dvou hodinách obsahovala složky dvě. Konopná vláknina obsahovala po 20 minutách a jedné hodině hydrolýzy dvě složky, po dvou hodinách hydrolýzy už složky tři. Bylo zjištěno, že optimální doba hydrolýzy je pro většinu použitých substrátů 1 hodina, pouze v případě konopné vlákniny je optimální doba hydrolýzy 2 hodiny.

Při porovnání výsledných retardačních faktorů vzorků a standardů je zřejmé, že nejvíce zastoupenou složkou je glukóza. Ta se po hydrolýze nacházela ve všech typech prebiotik kromě jablečné vlákniny. Dalším sacharidem je fruktóza, která se po hydrolýze nacházela ve vzorku inulinu a jablečné vlákniny. Dalšími složkami byly složitější látky, jako například disacharidy nebo oligosacharidy

Na obrázku 9 můžeme vidět výsledek tenkovrstvé chromatografie a jednotlivé vrstvy. Vzorky z levé strany: 1-odpovídá glukóze, 2-fruktóza, 3-hydrolyzovaný inulin (2hodiny), 4-hydrolyzovaný inulin (1 hodina), 5-hydrolyzovaný inulin (20 minut), 6-hydrolyzovaná jablečná vláknina (2 hodiny), 7-hydrolyzovaná jablečná vláknina (1 hodina), 8-hydrolyzovaná jablečná vláknina (20 minut), 9-hydrolyzovaná konopná vláknina (2 hodiny), 10-hydrolyzovaná konopná vláknina (1 hodina), 11-hydrolyzovaná konopná vláknina (20 minut), 12-hydrolyzované psyllium (2 hodiny), 13 – hydrolyzované psyllium (1 hodina) a 14-hydrolyzované psyllium (20 minut).



Obrázek 9: Výsledek tenkovrstvé chromatografie

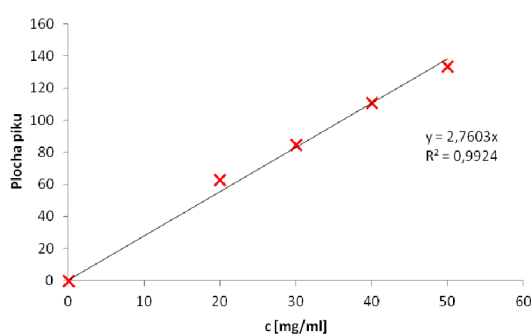
5.4 Stanovení obsahu látek pomocí HPLC

Pomocí HPLC byla analyzována jak nehydrolyzovaná, tak hydrolyzovaná prebiotika. Stanovení probíhalo na dvou kolonách, a to na koloně NH₂ pro stanovení sacharidů a na koloně Rezex pro organické kyseliny a sacharidy. Dále byly stanoveny kalibrační křivky glukózy, fruktózy (na koloně NH₂ i na koloně Rezex) a také maltózy a sacharózy (jen na

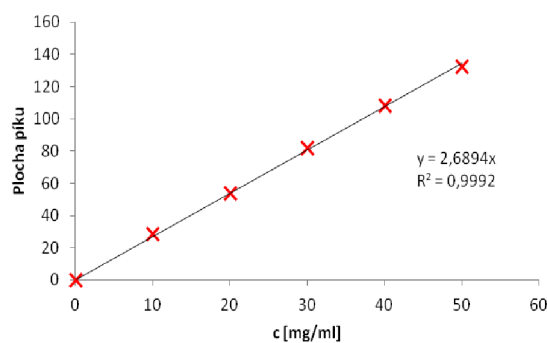
koloně NH₂). Na koloně Rezex byly pomocí standardů stanoveny retenčních časy některých dalších obsažených složek, a to například disacharidů a oligosacharidů. Postup stanovení je uveden v kapitole 4.6.

5.4.1 NH₂ kolona

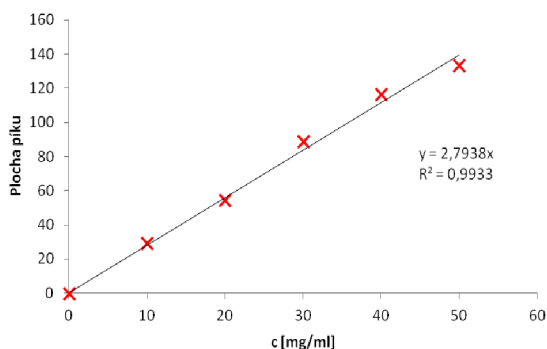
Pomocí NH₂ kolony byly stanoveny kalibrační křivky glukózy pro koncentrační řadu 20-50 mg/ml, fruktózy pro koncentrační řadu 10-50 mg/ml, maltózy 10-50 mg/ml a sacharózy 20-50 mg/ml. Každý vzorek byl analyzován dvakrát a v grafech daných kalibrací jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření. Kalibrační křivka glukózy je uvedena na obrázku 10, kalibrační křivka fruktózy na obrázku 11, kalibrační křivka maltózy na obrázku 12 a kalibrační křivka sacharózy na obrázku 13.



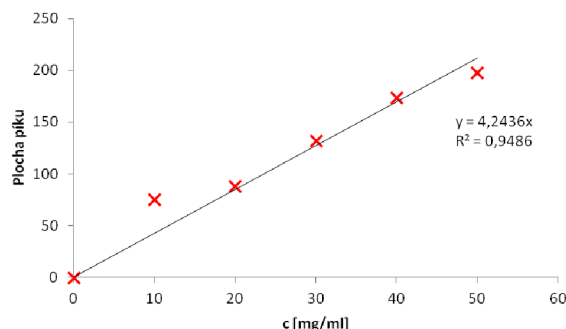
Obrázek 10: Kalibrační křivka glukózy



Obrázek 11: Kalibrační křivka fruktózy



Obrázek 12: Kalibrační křivka maltózy



Obrázek 13: Kalibrační křivka sacharózy

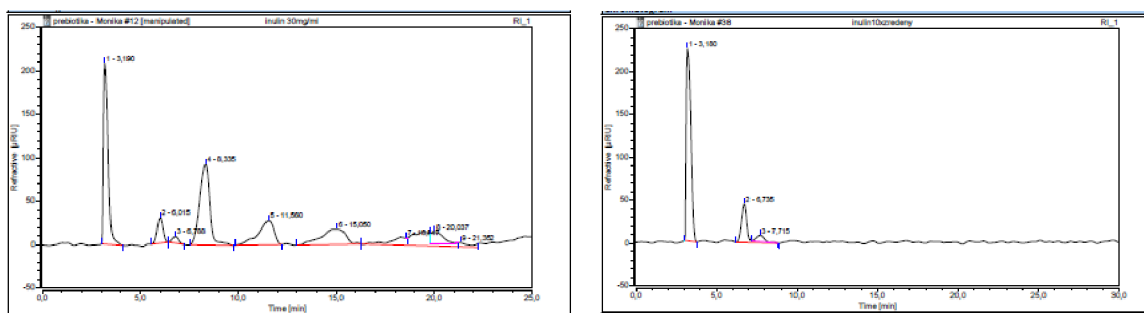
Dále byly na koloně analyzovány vzorky nehydrolyzovaných a hydrolyzovaných prebiotik. Výsledné chromatogramy byly porovnány s chromatogramy glukózy a fruktózy. V kalibracích se retenční čas glukózy pohyboval kolem času 6,5 min, retenční čas fruktózy 5,5 – 6 min. Následně byly odečteny plochy píků u chromatogramů všech nehydrolyzovaných i hydrolyzovaných prebiotik. Výsledné plochy píků jsou uvedeny v tabulce 10. Z plochy píků byl posléze vypočítán obsah glukózy a fruktózy u všech vzorků v mg/ml.

Tabulka 10: Hodnoty obsahů glukózy a fruktózy pro analyzovaná prebiotika na koloně NH₂

| Nehydrolyzovaná prebiotika | Plocha píku - glukóza | Obsah glukózy [mg/ml] | Plocha píku - fruktóza | Obsah fruktózy [mg/ml] |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Inulin | 34,22 | 12,40 | 8,18 | 3,04 |
| Psyllium | 0,43 | 0,15 | 0,14 | 0,05 |
| Jablečná vláknina | 0,72 | 0,26 | 0,92 | 0,34 |
| Konopná vláknina | 8,96 | 3,25 | 3,47 | 1,29 |
| Hydrolyzovaná prebiotika | Plocha píku - glukóza | Obsah glukózy [mg/ml] | Plocha píku - fruktóza | Obsah fruktózy [mg/ml] |
| Inulin | 18,83 | 6,82 | 98,93 | 36,79 |
| Psyllium | 6,64 | 2,41 | 142,49 | 52,98 |
| Jablečná vláknina | 0,88 | 0,32 | 202,91 | 75,45 |
| Konopná vláknina | 0,05 | 0,02 | 21,99 | 8,18 |

Z výsledků je patrné, že u nehydrolyzovaných prebiotik měl nejvyšší obsah glukózy i fruktózy inulin. Nejmenší obsah obou složek byl zaznamenán u psyllia. U hydrolyzovaných prebiotik měl nejvíc glukózy opět inulin, avšak největší obsah fruktózy byl zaznamenán u jablečné vlákniny. Nejmenší obsah obou složek měla konopná vláknina.

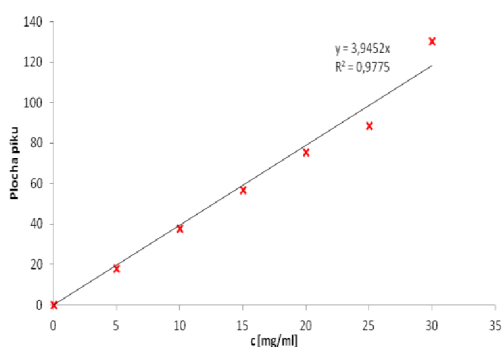
Obrázek 14 ukazuje záznamy z kapalinového chromatografu pro analýzu inulinu. Na obrázku vlevo je uveden chromatogram znázorňující výsledek analýzy nehydrolyzovaného inulinu. Můžeme vidět, že kromě glukózy a fruktózy obsahuje vzorek i celou řadu dalších píků, které odpovídají různým disacharidům či oligosacharidům. Na chromatogramu vpravo je vidět výstup analýzy hydrolyzovaného inulinu. Při hydrolyze došlo k rozpadu disacharidů a oligosacharidů na glukózu a fruktózu, kdy můžeme už vidět jen píky těchto dvou monosacharidů. U ostatních prebiotik byly zaznamenány podobné výsledky.



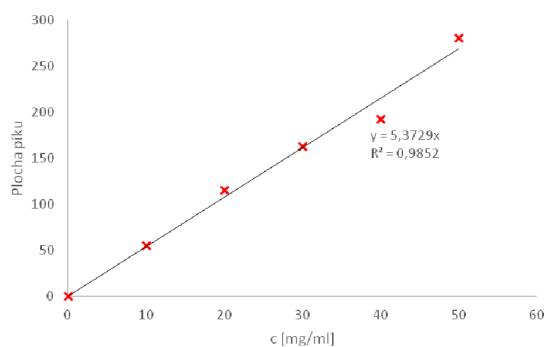
Obrázek 14: Chromatogramy inulinu - na obrázku vlevo je výsledek analýzy nehydrolyzovaného inulinu, na obrázku vpravo výsledek analýzy hydrolyzovaného inulinu

5.4.2 Kolona Rezex

Na koloně Rezex byly stanoveny dvě kalibrační křivky, a to kalibrační křivka glukózy pro koncentrační řadu 5-30 mg/ml a fruktózy v koncentraci 10-50 mg/ml. Výsledné kalibrační křivky znázorňují následující dva grafy. Kalibrační křivka glukózy je uvedena na obrázku 15 a kalibrační křivka fruktózy je uvedena na obrázku 16. Každý vzorek byl analyzován dvakrát a v grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření.



Obrázek 15: Kalibrační křivka glukózy



Obrázek 16: Kalibrační křivka fruktózy

Na koloně Rezex byly také analyzovány vzorky nehydrolyzovaných a hydrolyzovaných prebiotik. Výsledné chromatogramy byly porovnány s chromatogramy glukózy a fruktózy. V kalibracích se retenční čas glukózy pohyboval kolem času 12,5 min, retenční čas fruktózy okolo 13,5 min. Následně byly odečteny plochy píků u chromatogramů všech nehydrolyzovaných i hydrolyzovaných prebiotik. Výsledné plochy píků jsou uvedeny v tabulce 11. Z plochy píků byl posléze vypočítán obsah glukózy a fruktózy u všech vzorků v mg/ml.

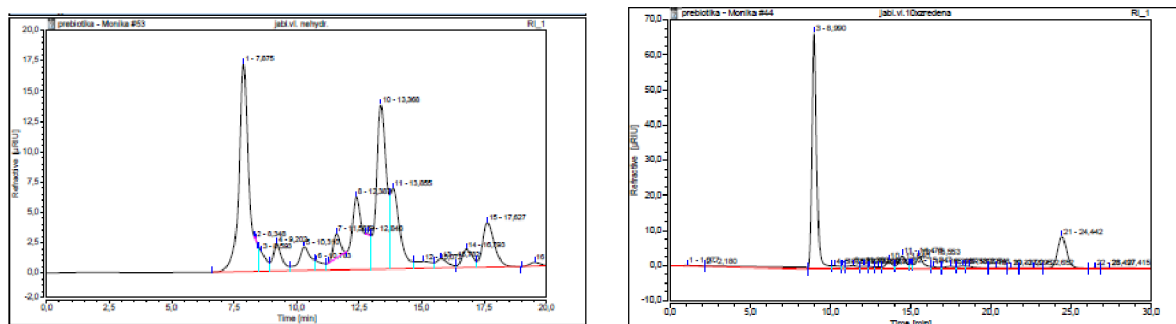
Tabulka 11: Hodnoty pro obsah glukózy a fruktózy pro daná analyzovaná prebiotika na koloně Rezex

| Nehydrolyzovaná prebiotika | Plocha píku – glukóza | Obsah glukózy [mg/ml] | Plocha píku – fruktóza | Obsah fruktózy [mg/ml] |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Inulin | 83,20 | 21,09 | 32,36 | 6,27 |
| Psyllium | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Jablečná vláknina | 3,45 | 0,87 | 6,18 | 1,20 |
| Konopná vláknina | 28,19 | 7,15 | 14,01 | 2,72 |
| Hydrolyzovaná prebiotika | Plocha píku – glukóza | Obsah glukózy [mg/ml] | Plocha píku – fruktóza | Obsah fruktózy [mg/ml] |
| Inulin | 4,35 | 110,32 | 1686,76 | 326,99 |
| Psyllium | 3,31 | 83,99 | 1585,42 | 307,35 |
| Jablečná vláknina | 1,53 | 38,70 | 365,87 | 70,93 |
| Konopná vláknina | 2,06 | 52,24 | 154,41 | 29,93 |

Nejvyšší obsah glukózy u nehydrolyzovaných prebiotik na koloně Rezex zaznamenal inulin, nejmenší obsah můžeme vidět u psyllia. Naopak u hydrolyzovaných prebiotik můžeme vidět, že glukóza je nejvíce zastoupenou složkou právě u psyllia. Nejmenší obsah glukózy je u jablečné vlákniny. Co se týká fruktózy, tak fruktóza je u nehydrolyzovaných i hydrolyzovaných prebiotik nejvíce zastoupena u inulinu. Nejmenší obsah fruktózy vykazuje konopná vláknina.

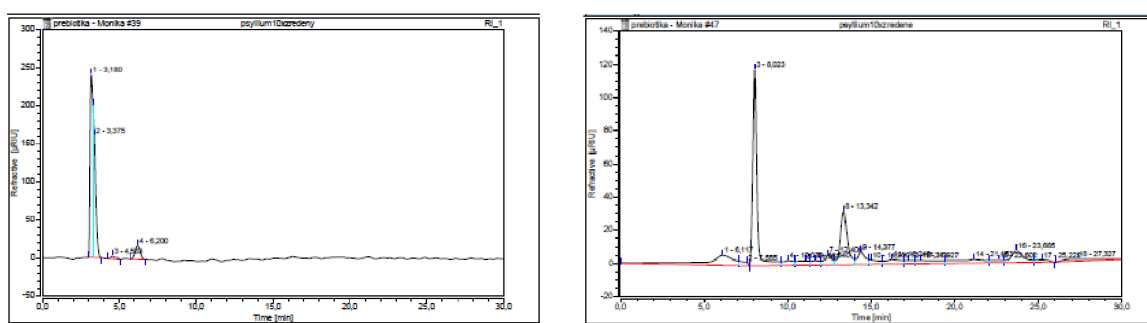
Následující chromatogramy (viz obrázek 16) ukazují výsledky analýzy jablečné vlákniny. Chromatogram vlevo znázorňuje výstup z analýzy nehydrolyzované jablečné vlákniny. Můžeme vidět několik větších píků. Na obrázku vpravo je vidět výsledek z analýzy hydrolyzované vlákniny. Můžeme vidět dva majoritní píky a několik malých píků. Pozorována byla také přítomnost dalších látek, jako například disacharidu sacharózy, která má retenční čas kolem 11 až 12 minuty nebo oligosacharidů maltohexózy (retenční čas je

mezi 8. až 9. minutou) a rafinózy (9. až 10. minuta). Retenční časy těchto látek byly zjištěny analýzou standardů. Tyto disacharidy a oligosacharidy se vykytovaly u všech analyzovaných prebiotik, ale byly viditelné až při analýze na koloně Rezex, která je více citlivá.



Obrázek 16: Chromatogram analýzy jablečné vlákniny, nalevo výsledek analýzy nehydrolyzovaného vzorku, napravo analýza hydrolyzovaného vzorku

Jak již bylo zmíněno, kolona Rezex se jevila pro analýzu prebiotik jako citlivější. Je to viditelné i na následujících chromatogramech hydrolyzovaného vzorku psyllia (viz obrázek 17). Obrázek vlevo ukazuje analýzu pomocí NH₂ kolony. Je patrné, že vidíme jen píky glukózy a fruktózy. Pokud se podíváme na obrázek vpravo, je zde znázorněn výstup z analýzy hydrolyzovaného psyllia na koloně Rezex. Zde můžeme vidět kromě píků glukózy a fruktózy celou řadu dalších píků, které mohou odpovídat různým disacharidům nebo oligosacharidům, které se během hydrolyzy nerozpadly. NH₂ kolona není tak citlivá, aby tyto další píky zaznamenala. Pro přesnější stanovení se tedy více hodí kolona Rezex.



Obrázek 17: Srovnání výstupů z NH₂ kolony a z kolony Rezex, na obrázku vlevo chromatogram z kolony Supelco Luna NH₂ pro hydrolyzované psyllium, na obrázku vpravo chromatogram hydrolyzovaného psyllia na koloně Rezex

5.5 Kultivace probiotik na médiích s přidavkem prebiotik

Kultivace probiotik probíhala podle postupu popsaného v kapitole 4.7. Probiotika byla kultivována s přidavkem jednak nehydrolyzovaných prebiotik a též hydrolyzovaných prebiotik.

5.5.1 Přidavek nehydrolyzovaného prebiotika

K probiotickým kmenům *Lactobacillus acidophilus* (dále LA) a *Bifidobacterium breve* (dále BB) byla přidána prebiotika ve dvou koncentracích, a to 1 mg/ml a 10 mg/ml. Kultivace

prebiotik poté probíhala v termostatu při 37°C. Po 24 hodinách byla změřena absorbance při vlnové délce 630 nm. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12: Výsledky měření absorbance po 24-hodinové kultivaci při přidavku nehydrolyzovaných prebiotik

| | Absorbance | | Absorbance |
|----------------------------------|------------|--------------------------------|------------|
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 0,488 | <i>Bifidobacterium breve</i> | 0,308 |
| LA + inulin 1 mg/ml | 0,520 | BB + inulin 1 mg/ml | 0,303 |
| LA + inulin 10 mg/ml | 0,453 | BB + inulin 10 mg/ml | 0,303 |
| LA + jablečná vláknina 1 mg/ml | 0,308 | BB + jablečná vláknina 1 mg/ml | 0,325 |
| LA + jablečná vláknina 10 mg/ml | 0,300 | BB+ jablečná vláknina 10 mg/ml | 1,027 |
| LA + konopná vláknina 1 mg/ml | 0,938 | BB + konopná vláknina 1 mg/ml | 0,548 |
| LA + konopná vláknina 10 mg/ml | 0,257 | BB + konopná vláknina 10 mg/ml | 0,116 |
| LA + psyllium 1 mg/ml | 0,580 | BB + psyllium 1 mg/ml | 0,284 |
| LA + psyllium 10 mg/ml | 0,384 | BB + psyllium 10 mg/ml | / |

Z výsledků je patrné, že největší absorbance a tedy koncentrace buněk byla zaznamenána u buněk *Lactobacillus acidophilus* s přidavkem konopné vlákniny v koncentraci 1 mg/ml a dále u buněk *Bifidobacterium breve* s přidavkem jablečné vlákniny v koncentraci 1 mg/ml. Psyllium v koncentraci 10 mg/ml u *Bifidobacterium breve* vytvořilo hustý gel, a proto nemohlo být spektrofotometricky stanoveno. Probiotika s prebiotiky v koncentraci 10 mg/ml byla analyzována také průtokovou cytometrií. Výsledky jsou znázorněny v tabulce 13.

Tabulka 13: Výchozí koncentrace buněk u probiotik s přidavkem prebiotika v koncentraci 10 mg/ml

| Vzorek | Koncentrace buněk [evt/ μ l] |
|-----------------------|----------------------------------|
| LA | 6668 |
| LA + inulin (10mg/ml) | 5574 |
| LA + JV (10mg/ml) | 7909 |
| LA + KV (10mg/ml) | 11642 |
| BB | 4939 |
| BB + inulin (10mg/ml) | 4584 |
| BB +JV (10mg/ml) | 4477 |
| BB + KV (10mg/ml) | 4360 |

Z výsledků (viz tabulka 13) vyplývá, že největší koncentrace buněk byla zaznamenána u *Lactobacillus acidophilus* s přidavkem konopné vlákniny. Naopak nejnižší koncentrace buněk byla zaznamenána u *Bifidobacterium breve* s přidavkem také konopné vlákniny.

5.5.2 Přídavek hydrolyzovaného prebiotika

Množství přidaného hydrolyzovaného prebiotika je uvedeno v tabulce 4 v kapitole 4.7.1. Po přidání daného množství prebiotika následovala kultivace v termostatu při 37°C. Po 24 hodinách byla změřena spektrofotometricky absorbance při vlnové délce 630 nm. Hodnoty absorbancí jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14: Absorbance pro LA a BB po 24 hodinové kultivaci s přidáním různých koncentrací hydrolyzovaných prebiotik

| Měření zákalu : $\lambda=630$ nm | | | |
|----------------------------------|------------|-----------|------------|
| Vzorek | Absorbance | Vzorek | Absorbance |
| LA blank | 0,307 | BB blank | 0,247 |
| LA I 5 | 0,677 | BB I 5 | 0,647 |
| LA I 2,5 | 0,485 | BB I 2,5 | 0,466 |
| LA I 0,5 | 0,166 | BB I 0,5 | 0,16 |
| LA PS 5 | 0,206 | BB PS 5 | 0,193 |
| LA PS 2,5 | 0,148 | BB PS 2,5 | 0,146 |
| LA PS 0,5 | 0,118 | BB PS 0,5 | 0,112 |
| LA KV 5 | 0,658 | BB KV 5 | 0,685 |
| LA KV 2,5 | 0,559 | BB KV 2,5 | 0,489 |
| LA KV 0,5 | 0,206 | BB KV 0,5 | 0,225 |
| LA JV 5 | 0,314 | BB JV 5 | 0,305 |
| LA JV 2,5 | 0,305 | BB JV 2,5 | 0,295 |
| LA JV 0,5 | 0,135 | BB JV 0,5 | 0,110 |

Poněvadž hydrolyzáty zejména jablečné a konopné vlákniny obsahovaly kousky pevných částic, které tvořily zákal, byla pro kontrolu použita ještě metoda průtokové cytometrie. Ta dokáže zákal odlišit od živých buněk.

5.6 Stanovení viability a koncentrace buněk pomocí průtokového cytometru

Pro přesnější stanovení počtu buněk byla použita průtoková cytometrie. Pracovní postup je uveden v kapitole 4.7.2. Průtokovou cytometrií byl analyzován počet buněk u obou kultur, to je u *Lactobacillus acidophilus* i u *Bifidobacterium breve* a k obarvení buněk bylo použito fluorescenční barvivo propidiumjodid.

5.6.1 Použití průtokové cytometrie pro *Lactobacillus acidophilus*

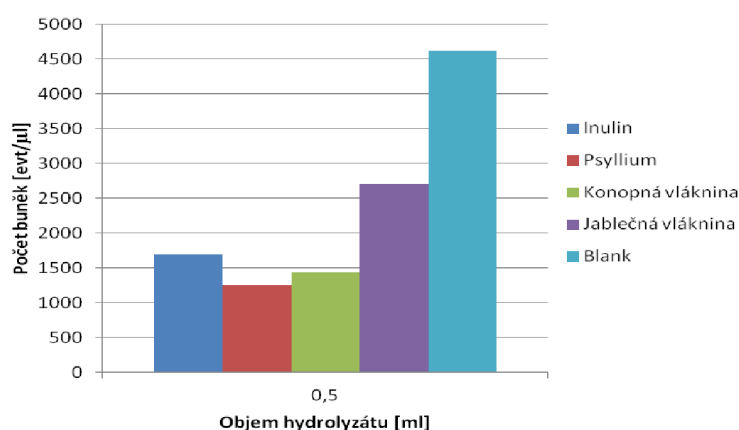
V tabulce 15 je uveden vliv na počet buněk *Lactobacillus acidophilus* při přidávacích různých objemů hydrolyzátu.

Z výsledků (viz tabulka 15) je patrné, že nejlepší růst buňky zaznamenaly na hydrolyzátu jablečné vlákniny, kde přírůstek hydrolyzátu tvořil 5 ml. Stejně tak uspokojivých výsledků bylo dosaženo u 0,5 ml přírůstku hydrolyzátu jablečné vlákniny a u 5 ml přírůstku hydrolyzátu konopné vlákniny. Nejméně buňky rostly na 5 ml přírůstku psyllia.

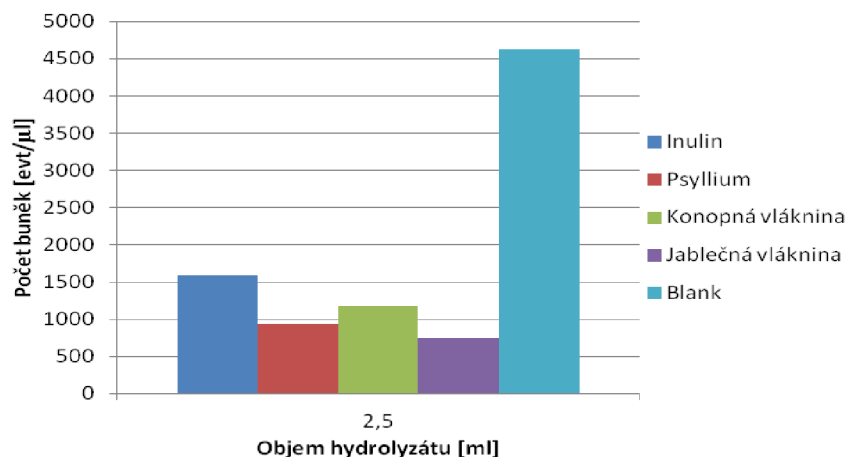
Tabulka 15: Hodnoty počtu buněk v evt/ μ l *Lactobacillus acidophilus* po přidavcích rozdílných objemů různých typů prebiotik

| Prebiotika | Objem hydrolyzátu [ml] | Počet buněk [evt/ μ l] | Mrtvé buňky [%] |
|-------------------|------------------------|----------------------------|-----------------|
| Inulin | 5 | 735 | <1 |
| | 2,5 | 1597 | <1 |
| | 0,5 | 1693 | 2,8 |
| Psyllium | 5 | 458 | <1 |
| | 2,5 | 931 | <1 |
| | 0,5 | 1250 | 2,3 |
| Konopná vláknina | 5 | 2042 | <1 |
| | 2,5 | 1180 | <1 |
| | 0,5 | 1443 | <1 |
| Jablečná vláknina | 5 | 2852 | <1 |
| | 2,5 | 745 | <1 |
| | 0,5 | 2702 | <1 |
| Blank | 5 ml MRS | 4622 | 7,5 |

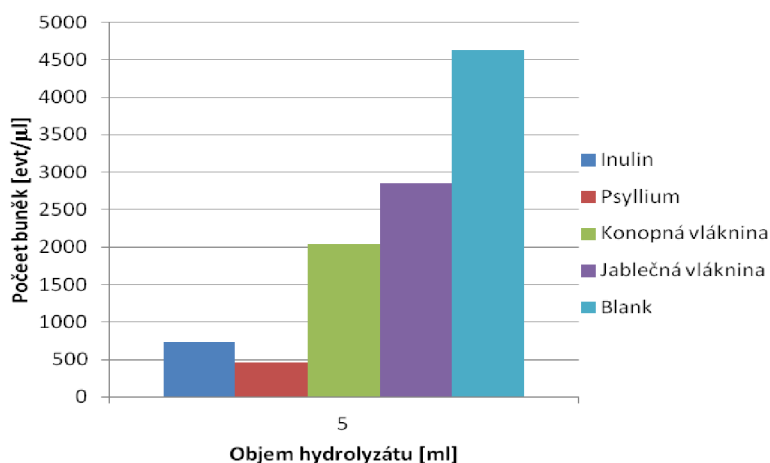
Počet buněk v evt/ μ l po přidavcích různých objemů daných prebiotik je znázorněn v následujících grafech (obrázek 18, obrázek 19, obrázek 20), kdy je do grafů vynesena i hodnota počtu buněk pro blank, který tvořilo 5 ml MRS média. Analýza byla provedena vždy dvakrát, v grafech jsou průměrné hodnoty ze dvou měření.



Obrázek 18: Graf znázorňující počet buněk *Lactobacillus acidophilus* po přidavku 0,5 ml hydrolyzátu



Obrázek 19: Graf znázorňující počet buněk *Lactobacillus acidophilus* po přidavku 2,5 ml hydrolyzátu



Obrázek 20: Graf znázorňující počet buněk *Lactobacillus acidophilus* po přidavku 5 ml hydrolyzátu

5.6.2 Použití průtokové cytometrie pro *Bifidobacterium breve*

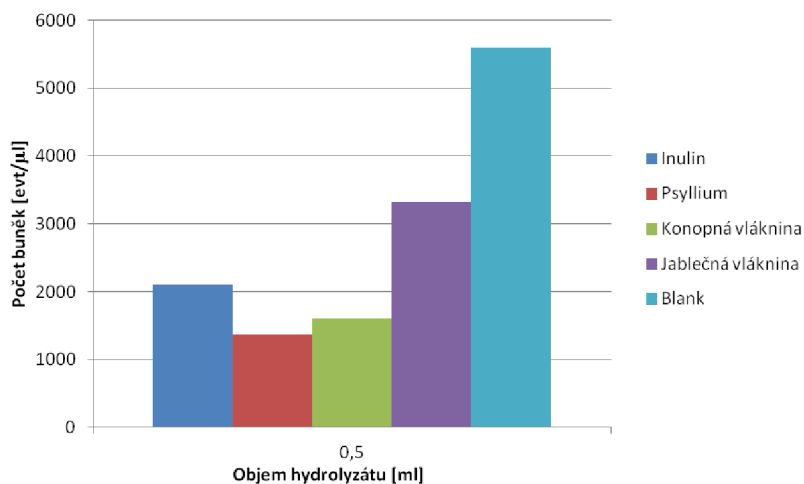
Stanovení počtu buněk průtokovou cytometrií bylo použito i pro bakterie *Bifidobacterium breve*. Byl sledován vliv použité koncentrace hydrolyzátu na viabilitu buněk. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 16.

Nejvyšší hodnota počtu buněk byla zaznamenána při přidavku 0,5 ml hydrolyzátu jablečné vlákniny. Dobrého výsledku dosáhl i inulin, taktéž po přidavku 0,5 ml hydrolyzátu. Nejmenší počet buněk byl zaznamenán po přidavku 5 ml hydrolyzátu inulinu.

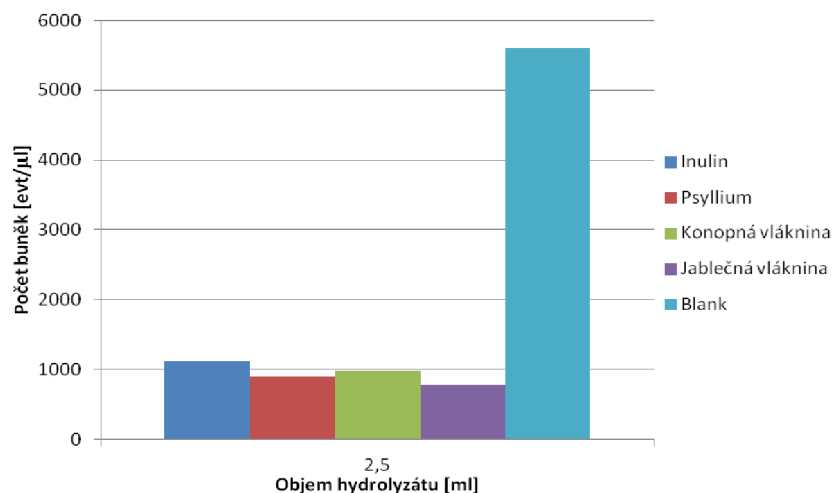
Tabulka 16: Hodnoty počtu buněk v evt/ μ l pro *Bifidobacterium breve* po přidavcích rozdílných objemů různých typů prebiotik

| Prebiotika | Objem hydrolyzátu [ml] | Počet buněk [evt/ μ l] | Mrtvé buňky [%] |
|-------------------|------------------------|----------------------------|-----------------|
| Inulin | 5 | 599 | <1 |
| | 2,5 | 1117 | <1 |
| | 0,5 | 2106 | <1 |
| Psyllium | 5 | 709 | <1 |
| | 2,5 | 894 | <1 |
| | 0,5 | 1375 | <1 |
| Konopná vláknina | 5 | 1519 | <1 |
| | 2,5 | 987 | <1 |
| | 0,5 | 1603 | <1 |
| Jablečná vláknina | 5 | 1236 | <1 |
| | 2,5 | 785 | <1 |
| | 0,5 | 3323 | <1 |
| Blank | 5 ml MRS | 5594 | <1 |

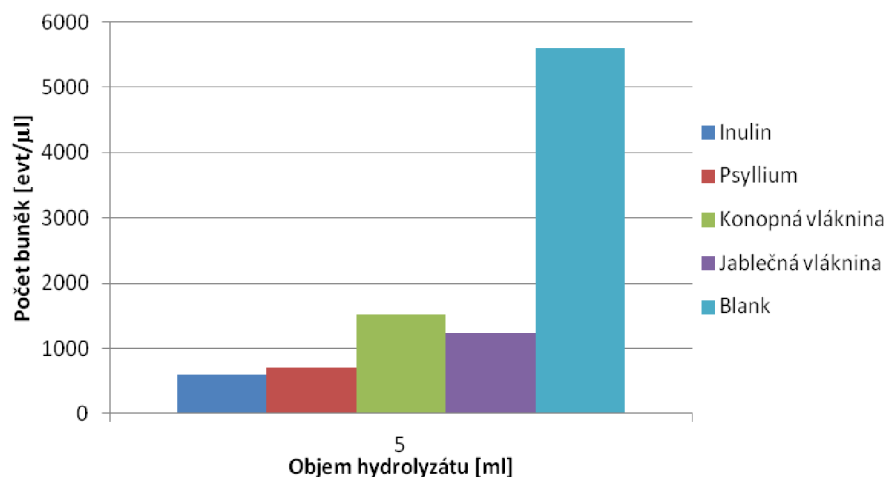
Počet buněk v evt/ μ l po přidavcích určitého množství daných prebiotik je znázorněn v následujících grafech (obrázek 21, obrázek 22, obrázek 23), kdy je porovnáván s počtem buněk blanku.



Obrázek 21: Graf znázorňující počet buněk *Bifidobacterium breve* po přidavku 0,5 ml hydrolyzátu



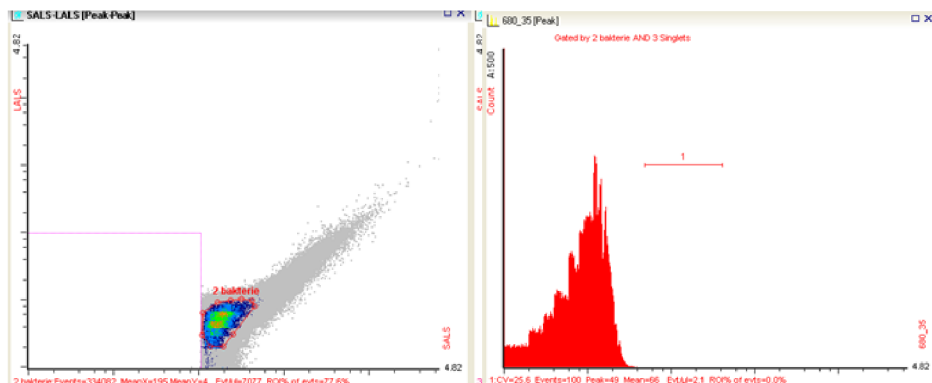
Obrázek 22: Graf znázorňující počet buněk *Bifidobacterium breve* po přidavku 2,5 ml hydrolyzátu



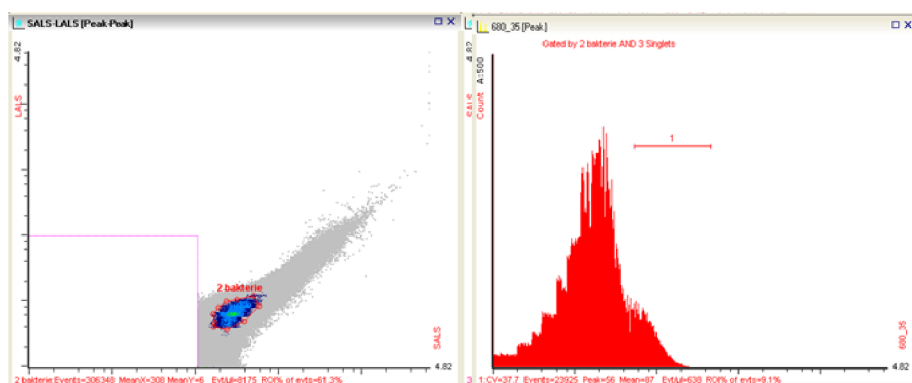
Obrázek 23: Graf znázorňující počet buněk *Bifidobacterium breve* po přidavku 2,5 ml hydrolyzátu

Z výsledků vyplývá, že buňky obou kmenů rostou lépe na komerčním MRS médiu. Zároveň jsou ale schopny růst i na hydrolyzátech. Růst na hydrolyzátech byl sice horší, ale viabilita byla po 24 hodinách téměř 100%. Buňky tedy rostly pomalu, ale neumíraly. Naopak na MRS médiu rostly velmi rychle, ale také rychleji umíraly. Prebiotika a jejich hydrolyzáty by tedy šlo využít v praxi jako levnější variantu komerčních médií pro růst probiotik.

Obrázek 24 a obrázek 25 ukazují příklad výstupu z průtokového cytometru. První zaznamenává výsledky pro *Bifidobacterium breve* po 24-hodinové kultivaci. Druhý se týká kmenu *Lactobacillus acidophilus*, taktéž po 24-hodinové kultivaci.



Obrázek 24: Příklad výstupu z průtokového cytometru - buňky *Bifidobacterium breve* po 24 hodinách kultivace, na obrázku vlevo můžeme vidět ohrazení buněk s jejich koncentrací, ze kterých je následně v pravém okně vypočítán poměr živých a mrtvých buněk, na obrázku vpravo je pak tedy vidět pík, který obsahuje počet živých buněk



Obrázek 25: Příklad výstupu z průtokového cytometru - buňky *Lactobacillus acidophilus* po 24 hodinách kultivace, na obrázku vlevo můžeme vidět ohrazené buňky s jejich koncentrací, ze kterých je následně v pravém okně vypočítán poměr živých a mrtvých buněk, na obrázku vpravo jsou pak vidět dva píky, větší pík více vlevo odpovídá počtu živých buněk, menší pík více vpravo znázorňuje počet mrtvých buněk

5.7 Enkapsulace

Pracovní postup enkapsulace buněčných kultur s prebiotiky je uveden v kapitole 4.8. Enkapsulace byla provedena pomocí enkapsulátoru při různé koncentraci buněk, dále s nehydrolyzovanými (první enkapsulace) i hydrolyzovanými prebiotiky (druhá enkapsulace). Byly také připraveny různě velké částice za použití různě velkých trysek. Byly vytvořeny menší částice o průměru 1 mm (třetí enkapsulace) a větší částice o průměru 2 až 4 mm (první a druhá enkapsulace). Po enkapsulaci bylo sledováno množství volných buněk a byla potvrzena 100 % enkapsulační účinnost. Některé z vytvořených částic jsou zobrazeny na obrázku 26.



Obrázek 26: Enkapsulované částice *Lactobacillus acidophilus* s přidavkem hydrolyzovaného prebioitka – na obrázku vlevo jsou částice jablečné vlákniny, ve středu jsou znázorněny částice psyllia, na obrázku vlevo jsou číré částice inulinu

5.7.1 Stanovení viability pomocí průtokové cytometrie

Před enkapsulací bylo provedeno stanovení viability pomocí průtokové cytometrie (tabulky 17 - 19).

Tabulka 17: Výchozí koncentrace buněk před první enkapsulací

| Vzorek | Výchozí koncentrace buněk [evt/ml] | Počet živých buněk [%] | Počet mrtvých buněk [%] |
|--------|------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| LA | 1856 | 98 | 2 |
| BB | 18 643 | 93 | 7 |

Tabulka 18: Výchozí koncentrace buněk před druhou enkapsulací

| Vzorek | Výchozí koncentrace buněk [evt/ml] | Počet živých buněk [%] | Počet mrtvých buněk [%] |
|--------|------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| LA | 5 458 | 90 | 10 |
| BB | 7541 | 90 | 10 |

Tabulka 19: Výchozí koncentrace buněk před třetí enkapsulací

| Vzorek | Výchozí koncentrace buněk [evt/ml] | Počet živých buněk [%] | Počet mrtvých buněk [%] |
|--------|------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| LA | 5410 | 99,1 | 0,9 |
| BB | 8851 | 99,4 | 0,4 |

5.8 Stanovení dlouhodobé stability částic

Dlouhodobá stabilita částic byla měřena pomocí optické mikroskopie. Stabilita byla měřena vždy po 1 týdnu, 3 týdnech a 6 týdnech. Jednotlivé částice byly vždy měřeny neobarvené a pro stanovení viability buněk i obarvené methylenovou modří, do které byly umístěny vždy na 10 minut. Pro sledování uvolněného množství buněk z částic byla k pozorování využita i Bürkerova komůrka. Zjištěné stability jsou uvedeny v tabulkách 20 - 25. Jako INU je označován inulin, jako GLU glukóza, jako PSY psyllium, JV jablečná vláknina a jako KV konopná vláknina.

Tabulka 20: Výsledky sledování dlouhodobé stability u částic *Lactobacillus acidophilus* připravených první enkapsulací

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

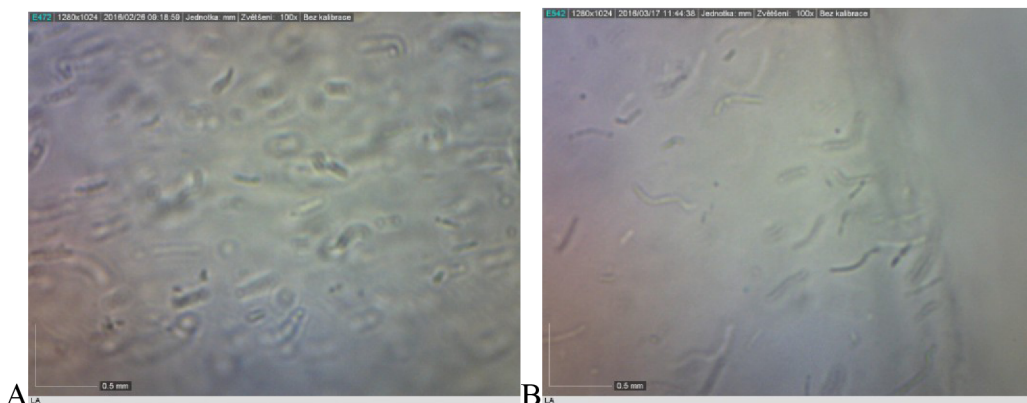
Tabulka 21: Tabulka nárůstu počtu buněk u jednotlivých typů částic

| | 1. týden [%] | 3. týden [%] | 6. týden [%] |
|---------------|--------------|--------------|--------------|
| LA | 80 | 120 | 130 |
| LA+GLU | 60 | 120 | 150 |
| LA+INU | 50 | 100 | 120 |
| LA+PSY | 30 | 100 | 130 |
| LA+KV | 30 | 110 | 160 |
| LA+JV | / | / | / |

Z tabulky 20 s výsledky sledování dlouhodobé stability vyplývá, že první den byla u buněk zachována 100% viabilita. Po uplynutí prvního týdne měly nejvíce živých buněk částice s přidavkem glukózy a inulinu, naopak nejmenší viabilita byla u psyllia, kde byla i největší úmrtnost - 10%. Při sledování stability po třech týdnech byla zjištěna nejvyšší viabilita u částic obsahujících inulin a konopnou vlákninu. Nejmenší počet buněk bylo u částic psyllia, kde úmrtnost dosahovala již 25 %. Po uplynutí 6 týdnů se jeví jako nejlepší prebiotikum inulin a konopná vláknina, které měly viabilitu 80 % a obsahovaly tak nejméně mrtvých buněk. Částice s jablečnou vlákninou nemohly být měřeny, protože vláknina a její kusy znemožnily pozorování pod mikroskopem.

Z tabulky 21 je patrné, že během prvního týdne zaznamenaly největší skok v počtu buněk částice bez přidavku prebiotika. Ve třetím týdnu bylo zjištěno, že největší nárůst mají opět buňky bez přidavku prebiotika a také buňky s přidavkem glukózy. V šestém týdnu je již patrné, že celkově největší nárůst zaznamenaly částice s přidavkem konopné vlákniny.

Buňky enkapsulované v částicích jsou vidět na obrázku 27 – jako příklad slouží částice s přidavkem glukózy.



Obrázek 27: Alginátová částice s buňkami *Lactobacillus acidophilus* s přídavkem glukózy obarveno methylenovou modří A) po 1 týdnu B) po 3 týdnech, zvětšení 1600x

Tabulka 22: Výsledky sledování dlouhodobé stability u částic *Lactobacillus acidophilus* připravených druhou enkapsulací

| | 1. den | | 1. týden | | 3. týden | | 6. týden | |
|---------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
| | živé [%] | mrtvé [%] | živé [%] | mrtvé [%] | živé [%] | mrtvé [%] | živé [%] | mrtvé [%] |
| LA | 100 | 0 | 95 | 5 | 90 | 10 | 80 | 20 |
| LA+GLU | 100 | 0 | 98 | 2 | 90 | 10 | 85 | 15 |
| LA+INU | 100 | 0 | 100 | 0 | 93 | 7 | 85 | 15 |
| LA+PSY | 100 | 0 | 95 | 5 | 90 | 10 | 80 | 20 |
| LA+KV | 100 | 0 | 97 | 3 | 90 | 10 | 85 | 15 |
| LA+JV | / | / | / | / | / | / | / | / |

Tabulka 23: Tabulka nárůstu počtu buněk u jednotlivých typů částic *Lactobacillus acidophilus* připravených druhou enkapsulací

| | 1. týden | 3. týden | 6. týden |
|---------------|----------|----------|----------|
| LA | 50 | 130 | 140 |
| LA+GLU | 30 | 120 | 160 |
| LA+INU | 50 | 150 | 160 |
| LA+PSY | 100 | 180 | 200 |
| LA+KV | 40 | 120 | 150 |
| LA+JV | / | / | / |

Z tabulky 22 pro sledování dlouhodobé stability částic *Lactobacillus acidophilus* připravených druhou enkapsulací je patrné, že první den byla u všech zachována 100% životnost všech buněk.

Po uplynutí jednoho týdne si inulin zachoval stále 100% životnost, naopak částice s čistými buňkami a s psyliem zaznamenaly již jen 95% úmrtnost. Po třech týdnech měli všechny částice kromě částic s inulinem 90% životnost. Částice s inulinem se pohybovala okolo hodnoty 93 % živých buněk. V posledních týdnu sledování stability se částice s přídavkem glukózy, inulinu a konopné vlákniny držely na hodnotě viability okolo 85 %.

Tabulka 23 sledující nárůst buněk ukazuje, že během prvního týdne zaznamenaly největší nárůst částice s psyliem. U nich nárůst pokračoval během třetího i šestého týdne, až dosáhl celkově hodnoty 200 %.

Tabulka 24: Výsledky sledování dlouhodobé stability u částic *Bifidobacterium breve* připravených druhou enkapsulací

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

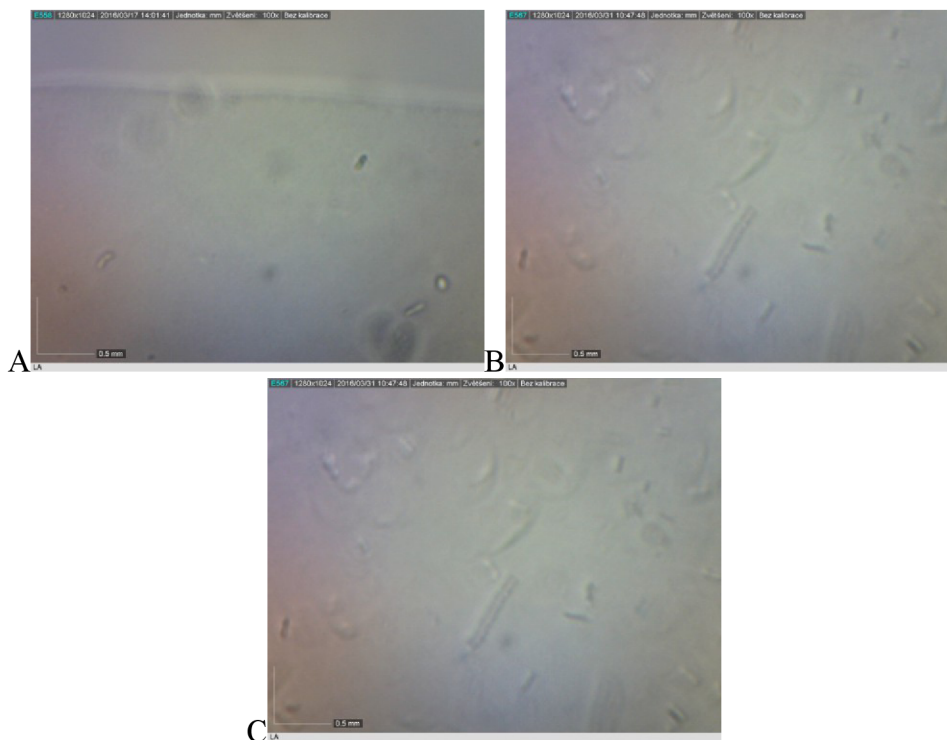
Tabulka 25: Tabulka nárůstu počtu buněk u jednotlivých typů částic *Bifidobacterium breve* připravených druhou enkapsulací

| | 1. týden | 3. týden | 6. týden |
|---------------|----------|----------|----------|
| BB | 40 | 130 | 150 |
| BB+GLU | 30 | 110 | 130 |
| BB+INU | 60 | 150 | 160 |
| BB+PSY | 50 | 130 | 150 |
| BB+KV | 50 | 110 | 180 |
| BB+JV | / | / | / |

Z tabulky 24 pro kmen *Bifidobacterium breve* vyplývá, že si opět všechny částice zachovaly první den 100% životnost. V 1. týdnu si zachovaly 100% životnost částice s přídavkem glukózy a inulinu. Nejmenší viabilitu zaznamenaly buňky bez přídavku prebiotika. Ve 3. týdnu si největší viabilitu držely stále částice s přídavkem glukózy a inulinu. Největší úmrtnost byla zaznamenána u částic bez přídavku prebiotika a s přídavkem konopné vlákniny, kde úmrtnost činila 20 %. V 6. týdnu sledování stability měly největší viabilitu částice s přídavkem inulinu, a to 90 %. Nejhůře na tom byly částice bez přídavku prebiotika, kde úmrtnost činila 30 %.

U bakterií kmene *Bifidobacterium breve* byl během prvního týdne největší nárůst sledován u částic s přídavkem inulinu (viz tabulka 25). Částice s přídavkem inulinu zaznamenaly největší nárůst i během třetího týdne. V šestém týdnu však nejvyšší nárůst zaznamenaly částice s přídavkem konopné vlákniny - asi 180 %.

Na obrázku 28 jsou zaznamenány buňky částice, která je tvořena jen buňkami *Bifidobacterium breve* bez přídavku prebiotika.



Obrázek 28: Alginátová částice s buňkami *Bifidobacterium breve* s přidavkem glukózy obarveno methylenovou modří A) po 1 týdnu B) po 3 týdnech C) po 6 týdnech, zvětšení 1600x

Všechny připravené částice byly navíc během dlouhodobého skladování stabilní a nedocházelo k žádnému výraznému uvolňování buněk v průběhu celého 6-týdenního pozorování. U částic připravených třetí enkapsulací nebyl zaznamenán výrazný rozdíl hodnot v porovnání s částicemi připravenými druhou enkapsulací.

5.9 Stanovení stability částic v modelovém prostředí lidského organismu

Stabilita v simulovaných tělních tekutinách byla sledována u částic vytvořených při druhé enkapsulaci. Vytvořené částice (stáří 14 dní) byly vloženy do modelových tělních tekutin. V pankreatické šťávě a v žaludeční šťávě byly inkubovány po dobu 20 minut a ve žlučové šťávě byly 40 minut, všechno při teplotě 37°C. Po uplynutí každé doby byl vzorek trávicích šťáv na podložním sklíčku pozorován pod mikroskopem. Částice byly obarveny methylenovou modří a byly také sledovány pod mikroskopem. Byl pozorován poměr živých a mrtvých buněk. Počítány byly mrtvé a živé buňky jak uvnitř částice, tak živé a mrtvé buňky uvolněné z částice. Výsledky stanovení stability částic v modelovém prostředí lidského organismu jsou uvedeny v tabulce 26.

5.9.1 Stanovení stability částic v žaludeční šťávě

Při pozorování slitých žaludečních šťáv pod mikroskopem bylo zjištěno, že nedošlo k téměř k žádnému uvolnění buněk ani u jednoho druhu částic. Uvolnilo se maximálně 2 % buněk. Potvrdilo se tedy, že by v případě cesty trávicím traktem částice zvládly projít žaludkem.

5.9.2 Stanovení stability částic v pankreatické šťávě

Při pozorování pankreatických šťáv pod mikroskopem bylo zjištěno, že u částic obsahujících inulin, glukózu a čisté bakterie bez přídavku prebiotika došlo k úplnému rozpadu na malé kousky. Působením pankreatické šťavy, tj. na začátku střeva, došlo k rozpadu 98 až 100 % těchto částic. U částic s konopnou vlákninou, jablečnou vlákninou a psylliem nedošlo k masivnímu rozpadu, ale částice pomalu začala vykazovat změny a došlo k uvolnění asi 15 % buněk.

5.9.3 Stanovení stability částic v žlučové šťávě

Po 40 minutách působení žlučových šťáv došlo k rozpadu částic obsahujících konopnou vlákninu, jablečnou vlákninu a psyllium. Uvolnilo se asi 50 % buněk. Po dalších asi 30 minutách došlo k uvolnění zbytku.

Tabulka 26: Výsledky sledování stability v modelovém prostředí lidského organismu – vztaženo na množství buněk v částicích po působení dané šťavy

| | Čisté buňky | Glukóza | Inulin | Psyllium | Jablečná vláknina | Konopná vláknina |
|---|-------------|---------|--------|----------|-------------------|------------------|
| Žaludeční šťáva - 20 minut | 98 % | 98 % | 98 % | 100 % | 100 % | 100 % |
| Pankreatická šťáva - 20 minut | 0 % | 0 % | 0 % | 75 % | 75 % | 75 % |
| Žlučová šťáva - 40 minut | 0 % | 0 % | 0 % | 25 % | 25 % | 25 % |
| Žlučová šťáva – dalších 30 minut | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % |

Souhrnně lze říci, že působením žaludečních šťáv nedošlo k výraznému poškození částic, naopak působením pankreatických šťáv došlo k úplnému rozpadu částic bez přídavku prebiotika, částic s přídavkem inulinu a částic s přídavkem glukózy. U částic s přídavkem konopné vlákniny, jablečné vlákniny a psyllia došlo k uvolnění jen asi 15 % buněk, avšak následným působením žlučových šťáv po dobu 40 minut došlo k uvolnění až 50 % buněk a po uplynutí dalších 30 minut došlo k rozpadu i těchto částic. Částice obsahující prebiotika spolu s prebiotiky jsou vhodné k cílenému transportu do střeva, odolávají kyselému prostředí žaludku a jsou rozloženy společným působením střevní a žlučové šťavy.

6. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium probiotických kultur a na možnost jejich koenkapsulace se specifickými substráty, tzn. prebiotiky. Enkapsulovanými organismy byly *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve*. Jejich specifickými substráty byly inulin, psyllium, jablečná vláknina a konopná vláknina. Pro oba testované probiotické kmeny bylo zvoleno několik kultivačních médií. Bylo použito MRS médium, následně bylo do média přidáno různé množství nehydrolyzovaných prebiotik a nakonec byly probiotika kultivovány na médiu s přídavkem hydrolyzovaných prebiotik nebo pouze na čistých prebiotických hydrolyzátech. Následně byla probiotika koenkapsulována s různým přídavkem prebiotika do polysacharidových částic. Částice byly připraveny na enkapsulátoru z 2% alginátu s použitím trysky o velikosti 450 a 1000 μm . U připravených částic byla sledována dlouhodobá stabilita v modelovém prostředí 2,5% kyseliny citrónové a rovněž viabilita enkapsulovaných buněk po dobu 6 týdnů. Jako nejlepší substrát byla stanovena konopná vláknina, která měla celkově nejvyšší nárůst buněk v částicích.

V další části této práce byla cílem charakterizace obsahových složek prebiotik. K tomu byly využity spektrofotometrické metody pro stanovení celkových cukrů a stanovení redukujících cukrů, tenkovrstvá chromatografie a HPLC. Nejvyšší obsah celkových cukrů byl zaznamenán u psyllia. Nejvyšší obsah redukujících cukrů ze skupiny nehydrolyzovaných i hydrolyzovaných prebiotik vykazovala konopná vláknina. Metodou tenkovrstvé chromatografie bylo zjištěno, že hlavními složkami hydrolyzovaných prebiotik je glukóza a fruktóza, další obsahové složky tvoří disacharidy a oligosacharidy. Metoda sloužila k optimalizaci hydrolyzy a bylo zjištěno, že optimální doba hydrolyzy je 1 hodina. Pro charakterizaci prebiotik pomocí HPLC se osvědčila kolona Rezex díky větší citlivosti. Metodou HPLC bylo potvrzeno, že hlavní část hydrolyzovaných prebiotik tvoří glukóza a fruktóza, zbytek tvoří malé množství složitější sacharidů.

Celkově lze říci, že pomocí enkapsulátoru je možné úspěšně enkapsulovat do alginátových částic oba typy probiotických bakterií. Přidané prebiotikum pak pozitivně ovlivňuje růst i viabilitu mikroorganismů v částicích. U částic byla navíc potvrzena stabilita po dobu 6 týdnů a enkapsulované bakterie si po celou dobu udržely svou životaschopnost.

Sledována byla také stabilita jednotlivých částic v modelovém prostředí lidského organismu. Částice byly vystaveny působení modelových trávicích šťáv a to žaludeční šťávě, pankreatické šťávě a žlučové šťávě. Působením žaludečních šťáv nedošlo k výraznému poškození částic a uvolněné buňky tvořily maximálně 2 %. Působením pankreatických šťáv došlo k úplnému rozpadu částic bez přídavku prebiotika, částic s přídavkem inulinu a částic s přídavkem glukózy. Naopak u částic s přídavkem konopné vlákniny, jablečné vlákniny a psyllia došlo k uvolnění jen asi 15 % buněk. Dalším působením žlučových šťáv po dobu 40 minut došlo k uvolnění 50 % buněk. Po uplynutí dalších 30 minut došlo k rozpadu i těchto částic. Využití částic s přídavky obou typů vláknin je tedy vhodné k cílenému transportu probiotických kultur do střevního traktu.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SANDERS, M. E., I. LENOIR-WIJNKOOP, S. SALMINEN, D. J. MERENSTEIN, G. R. GIBSON, B. W. PETSCHOW, M. NIEUWDORP, D. J. TANCREDI, CH. J. CIFELLI, P. JACQUES a B. POT. Probiotics and prebiotics: prospects for public health and nutritional recommendations. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014, vol. 1309, issue 1, s. 19-29. DOI: 10.1111/nyas.12377. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/nyas.12377>
- [2] FEINGLOS, M. N., R. D. GIBB, D. L. RAMSEY, R. S. SURWIT a J. W. MCRORIE. Psyllium improves glycemic control in patients with type-2 diabetes mellitus. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 2013, **1**(2), 156-161. DOI: 10.1016/j.bcdf.2013.02.003. ISSN 22126198. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212619813000107>
- [3] NEVORAL, J. Prebiotika, probiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*, 2005, roč. 8, č. 2, s. 59-65. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2005/02/02.pdf>
- [4] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [5] KLABAN, V. *Svět mikrobů (ilustrovaný lexikon mikrobiologie životního prostředí)*. 2. vyd. : Univerzita Hradec Králové, 2001. 416 s. ISBN 80-7041-687-4.
- [6] MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Medical Microbiology, Fifth edition*. [s.l.] : Elsevier, 2005
- [7] LEFKOVITZ, A. L., B. J. ZAROWITZ, G. R. GIBSON a R. A. RASTALL. 2013. It's a microscopic world after all: Prebiotics, probiotics, and synbiotics. *Geriatric Nursing* [online]. **34**(4): 323-325 [cit. 2015-05-12]. DOI: 10.1016/j.gerinurse.2013.06.007. ISSN 01974572. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197457213002024>
- [8] BEZIRTZOGLU, E. a E. STAVROPOULOU. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. *Anaerobe* [online]. 2011, vol. 17, issue 6, s. 369-374 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.03.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996411000345>
- [9] CANDELA, M., F. PERNA, P. CARNEVALI, B. VITALI, R. CIATI, P. GIONCHETTI, F. RIZZELLO, M. CAMPIERI a P. BRIGIDI. Interaction of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, vol. 125, issue 3, s. 286-292. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160508001967>
- [10] MENNINI, T. Probiotics and prebiotics. *Nutrafoods*. 2013, vol. 12, issue 2, s. 66-67. DOI: 10.1007/s13749-013-0017-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13749-013-0017-7>
- [11] MACH, I. 2004. *Doplňky stravy*. Vyd. 1. Praha: Svoboda Servis, 157 s. ISBN 80-86320-34-0

- [12] C. DELATTRE, M. URDACI a LWT.SCHMITTER. *Food Science and Technology* [online]. 2013, vol. 50, issue 1 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.014
- [13] LIKOTRAFITI, E., K. M. TUOHY, G. R. GIBSON a R. A. RASTALL. 2013. Development of antimicrobial synbiotics using potentially-probiotic faecal isolates of *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium longum*. *Anaerobe* [online]. 20: 5-13 [cit. 2015-05-12]. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.01.002. ISSN 10759964. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996413000152>
- [14] SALMINEN S., A. VON WRIGHT, L. MORELLI, P. MARTEAU, D. BRASSART, W. M. DE VOS, R. FONDÉN, M. SAXELIN, K. COLLINS, G. MORGENSEN, S. E. BIRKENLAND, T. MATILLA-SANDHOLM (1998): Demonstration of safety of probiotics – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 93-106
- [15] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5.
- [16] AL-SHERAJI, S. H., A. ISMAIL, M. Y. MANAP, S. MUSTAFA, R. M. YUSOF a F. A. HASSAN. Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*. 2013, vol. 5, issue 4, s. 1542-1553. DOI: 10.1016/j.jff.2013.08.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S175646461300193X>
- [17] FRIC, P. Probiotics and prebiotics — renaissance of a therapeutic principle. *Central European Journal of Medicine* [online]. 2007, vol. 2, issue 3, s. 237-270 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.2478/s11536-007-0031-5. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.2478/s11536-007-0031-5>
- [18] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002, Přer. str. ISBN 80-200-0600-1.
- [19] *Inulin* [online]. [cit. 2016-05-18]. Dostupné z: <http://www.ordinace.cz/clanek/inulin/>
- [20] *ISWARI BIO konopná 60% vláknina* [online]. [cit. 2016-05-18]. Dostupné z: <http://www.superpotravina.cz/superpotravina/eshop/13-1-RAW-food/0/5/868-ISWARI-Bio-Active-Colon-250g-konopna-vlknina>
- [21] *Jablečná vláknina* [online]. [cit. 2016-05-18]. Dostupné z: <http://www.celostnimedicina.cz/jablecna-vlknina-oblibeny-pomocnik-pri-boji-s-nadvahou.htm#ixzz3waTuZWpy>
- [22] OKURO, P. K., M. THOMAZINI, J. C. C. BALIEIRO, R. D. C. O. LIBERAL a C. S. FÁVARO-TRINDADE. Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. *Food Research International* [online]. 2013, vol. 53, issue 1, s. 96-103 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.03.042. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913002172>
- [23] MARTÍN, M. J., F. LARA-VILLOSLADA, M. A. RUIZ a M. E. MORALES. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science*. 2015, vol. 27, s. 15-25. DOI: 10.1016/j.ifset.2014.09.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S146685641400160X>
- [24] NEDOVIC, V., A. KALUSEVIC, V. MANOJLOVIC, S. LEVIC a B. BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food*

- Science* [online]. 2011, vol. 1, s. 1806-1815 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002665>
- [25] DIMA, Ş., C. DIMA a G. IORDĂCHESCU. Encapsulation of Functional Lipophilic Food and Drug Biocomponents. *Food Engineering Reviews* [online]. s. - [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1007/s12393-015-9115-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12393-015-9115-1>
- [26] MOSCHAKIS. *Food and Bioprocess Technology* [online]. vol. 7 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1007/s11947-014-1317-7.
- [27] KAUSHIK, P., K. DOWLING, C. J. BARROW a B. ADHIKARI. Complex coacervation between flaxseed protein isolate and flaxseed gum. *Food Research International* [online]. 2015, vol. 72, s. 91-97 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.03.046. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996915001519>
- [28] ANAL, A. K. a H. SINGH. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science* [online]. 2007, vol. 18, issue 5, s. 240-251 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.01.004. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224407000350>
- [29] SATHYABAMA, S., M. RANJITH KUMAR, P. BRUNTHA DEVI, R. VIJAYABHARATHI a V. BRINDHA PRIYADHARISINI. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2014, vol. 57, issue 1, s. 419-425 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.12.024. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813004957>
- [30] Biopolymers. 2002. Weinheim: Wiley-VCH, 532 s. ISBN 35-273-0226-3
- [31] LEMBRE, P., C. LORENTZ a P. DI. *Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World*[online]. [cit. 2016-05-08]. DOI: 10.5772/51213. ISBN 10.5772/51213. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/exopolysaccharides-of-the-biofilm-matrix-a-complex-biophysical-world>
- [32] *Průtoková cytometrie* [online]. In: . [cit. 2016-05-18]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/biofyz/files/gerontologie/prutokova_cytometrie_prezentace.pdf
- [33] BEMIS, J. C., S. M. BRYCE, M. NERN, M. RASCHKE a A. SUTTER. *Best practices for application of attachment cells to in vitro micronucleus assessment by flow cytometry* [online]. [cit. 2016-01-07]. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.10.007. ISBN 10.1016/j.mrgentox.2015.10.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571815002685>
- [34] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [35] LENÍČEK, Martin. [online]. 10-2011 [cit.2016-04-15]. Dostupné z:<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:TLC.png>

- [36] KÁŠ, J., M. KODÍČEK a O. VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, vi, 258 s. ISBN 80-708-0586-2

8. SEZNAM ZKRATEK

LA – *Lactobacillus acidophilus*

BB – *Bifidobacterium breve*

HPLC – „High-performance liquid chromatography“, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

TLC – „Thin layer chromatography“, chromatografie na tenké vrstvě

GLU – glukóza

INU – inulin

PSY – psyllium

JV – jablečná vláknina

KV – konopná vláknina

CMC – karboxymethylcelulóza