



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PŘÍPRAVA DOPLŇKŮ STRAVY PRO DĚTI S OBSAHEM PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ A OVOCNÉ SLOŽKY

PREPARATION OF FOOD SUPPLEMENTS FOR CHILDREN CONTAINING PROBIOTIC BACTERIA
AND FRUIT COMPONENTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Vendula Vetchá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1703/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Vendula Vetchá**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Příprava doplňků stravy pro děti s obsahem probiotických bakterií a ovocné složky

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Zpracování rešerše na dané téma
- 2) Návrh optimálního složení probiotického doplňku stravy a jeho charakterizace
- 3) Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Vendula Vetchá
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

V Brně dne 1.2.2021

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na přípravu doplňku stravy s obsahem probiotické kultury a ovocné složky. Účelem práce bylo zjistit, který z vybraných extraktů bude mít vliv na růst probiotické kultury a zároveň bude obsahovat určitý podíl fenolických sloučenin, flavonoidů, vitamínu C a vykazovat antioxidační aktivitu.

Teoretická část práce je zaměřena na střevní mikrobiotu, problematiku probiotických bakterií a na charakterizaci enkapsulačních metod probiotických bakterií.

V experimentální části byly charakterizovány použité extrakty čajů a ovocných sirupů, byla analyzována antimikrobiální účinnost proti modelovým mikroorganismům *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Serratia marcescens*. Dále byla testována přímá interakce probiotických bakterií *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* a *Bifidobacterium breve* v prostředí extraktů. Pomocí modelového trávení byla zkoumána viabilita probiotických buněk v interakci s vybranými extrakty během a po skončení trávení. V poslední části byly připraveny enkapsulované částice obsahující probiotickou kulturu a směs čaje a sirupu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Probiotické bakterie, modelové trávení, enkapsulace, alginátové částice, doplněk stravy

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on the preparation of supplementary food with probiotic culture and fruit components. The aim of this work was to determine which of the selected extracts will affect the growth of probiotics and also will contain a certain proportion of phenolic compounds, flavonoids, vitamin C and show antioxidant effects.

The theoretical part of the work is focused on the intestinal microbiota, the issue of probiotics and the characterization of encapsulation methods of probiotics.

We used extracts of teas and fruit syrups in the experimental part. The antimicrobial activity against model microorganisms *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Serratia marcescens* was analyzed. Interaction of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve* in extracts were tested. After model digestion, cell viability of probiotic bacteria in combination with extracts was examined during and after digestion. In the last part, encapsulated particles containing probiotics and a mixture of tea and syrup were prepared.

KEYWORDS

Probiotic bacteria, model digestion, encapsulation, alginate particles, food supplement

VETCHÁ, Vendula. *Příprava doplňků stravy pro děti s obsahem probiotických bakterií a ovocné složky*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131449>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Petra Matoušková.

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 Ing. Petře Matouškové Ph.D. za vedení bakalářské práce, motivaci při studiu a za poskytnutí cenných rad. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Julii Hoové za trpělivost, ochotu, se kterou mi vždy vše vysvětlila, za příjemnou spolupráci v laboratoři a za kamarádský přístup v kritické chvíli. Můj velký dík patří také mé mamince a celé rodině. Na závěr bych chtěla poděkovat svým nejlepším kamarádkám za jejich nekonečnou podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Střevní mikrobiota	10
2.1.1	Tvorba mikrobioty u novorozenců	11
2.1.2	Střevní mikrobiota v závislosti na výživě dítěte.....	12
2.1.3	Vliv střevní mikrobioty na hostitele	13
2.2	Probiotické bakterie.....	13
2.2.1	Historie	13
2.2.2	Definice probiotik.....	14
2.2.3	Charakteristika probiotik	14
2.2.4	Bakterie mléčného kvašení	14
2.2.5	Nejpoužívanější rody bakterií mléčného kvašení jako probiotika.....	15
2.2.6	Rod <i>Lactobacillus</i>	15
2.2.7	Rod <i>Bifidobacterium</i>	16
2.2.8	Pozitivní účinky probiotik na zdraví člověka	16
2.2.9	Negativní účinky probiotik na zdraví člověka.....	17
2.2.10	Probiotické výrobky s obsahem ovocné složky.....	18
2.3	Charakteristika rostlinných extraktů	18
2.3.1	BIO Dětský fenyklový čaj, LEROS Baby	19
2.3.2	Dětský čaj s malinou, LEROS Baby.....	19
2.3.3	BIO čaj pro kojící matky, LEROS Baby	20
2.4	Enkapsulace aplikovaná v potravinářství	21
2.4.1	Metody enkapsulace probiotických mikroorganismů.....	22
2.4.1.1	Extruze.....	22
2.4.1.2	Emulgace	22
2.4.1.3	Sprejové sušení	22

2.4.1.4	Sprejové chlazení.....	23
2.4.1.5	Lyofilizace	23
2.4.2	Enkapsulátor	24
2.5	Probiotické doplňky na českém trhu	25
3	CÍL PRÁCE.....	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
4.1	Použité chemikálie	28
4.2	Použité přístroje a pomůcky	28
4.3	Použité mikroorganismy.....	29
4.4	Použité extrakty	29
4.5	Kultivace probiotických kultur v tekutém médiu.....	30
4.6	Přímá interakce probiotických kultur s jednotlivými extrakty	30
4.7	Charakterizace použitých extraktů	30
4.7.1	Stanovení obsahu fenolických sloučenin.....	30
4.7.2	Stanovení obsahu celkových flavonoidů	31
4.7.3	Stanovení antioxidační aktivity	31
4.8	Stanovení vitamínu C titrační metodou (pomocí 2,6-dichlorfenolindofenolu)	32
4.8.1	Příprava odměrného roztoku.....	32
4.8.2	Standardizace odměrného roztoku.....	32
4.8.3	Vlastní stanovení ve vzorcích	32
4.9	Antimikrobiální test.....	32
4.9.1	Příprava medií a kultivace mikroorganismů pro antimikrobiální test	33
4.9.2	Antimikrobiální test	33
4.10	Modelové trávení směsi obsahující probiotikum a extrakt	33
4.10.1	Příprava modelové žaludeční šťávy.....	34
4.10.2	Příprava modelové pankreatické šťávy.....	34
4.10.3	Příprava modelové žlučové šťávy.....	34

4.11	Stanovení viability pomocí průtokového cytometru	34
4.12	Enkapsulace	34
4.13	Příprava alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými bakteriemi	34
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
5.1	Charakterizace použitých čajů.....	36
5.1.1	Stanovení fenolických sloučenin v použitých čajích.....	36
5.1.2	Stanovení celkových flavonoidů v použitých čajích	36
5.1.3	Stanovení antioxidační aktivity v použitých čajích	37
5.1.4	Stanovení vitamínu C v použitých čajích	38
5.2	Charakterizace použitých sirupů	39
5.2.1	Stanovení fenolických sloučenin v použitých sirupech.....	39
5.2.2	Stanovení celkových flavonoidů v použitých sirupech	40
5.2.3	Stanovení antioxidační aktivity v použitých sirupech.....	40
5.2.4	Stanovení vitamínu C v použitých sirupech	41
5.3	Antimikrobiální test.....	42
5.4	Přímá interakce extraktů s probiotickými bakteriemi	45
5.4.1	Extrakty čajů.....	46
5.4.2	Extrakty sirupů.....	47
5.4.3	Porovnání výsledků zákalu s výsledky průtokového cytometru.....	48
5.5	Vliv použitých extraktů na viabilitu probiotických bakterií během simulovaného trávení.....	50
5.6	Návrh optimálního složení produktu	54
6	ZÁVĚR.....	57
6.1	Seznam použité literatury	59

1 ÚVOD

Užívání probiotických doplňků stravy se stalo v současné době snad již módním trendem. Probiotické doplňky jak pro děti, tak i pro dospělé jsou hojně propagovány v televizních reklamách a je možné je zakoupit hned v několika různých formách, jako žvýkací tablety, kapky nebo kapsle k polykání. Záleží pouze na zákazníkovi, jaký typ produktu si vybere.

Probiotika jsou vyzdvihována především díky svým pozitivním vlivům na zdraví konzumenta. Jejich užívání stimuluje imunitní systém, napomáhají předcházet střevním onemocněním, zabraňují zácpě nebo průjmovým onemocněním či mají pozitivní vliv na atopické ekzémy. Užívání probiotických doplňků se doporučuje hlavně při užívání antibiotik. Antibiotika ovlivňují složení lidské střevní mikrobioty, která je pro každého jedince specifická a je utvářena již od narození. Probiotické bakterie napomáhají k jejímu rychlejšímu znovu osidlování po požívání antibiotik.

Cílem této práce bylo zpracování rešerše na dané téma. Dále navržení optimálního složení produktu s obsahem probiotických bakterií s ovocnou složkou, a to na základě zjištěných vlastností použitých extraktů a jejich interakci s probiotickými kulturami.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Střevní mikrobiota

Pojem střevní mikrobiota je dnes již velmi známým a populárním slovním spojením, které jistě každý z nás zná z televizních reklam, prezentujících doplňky stravy pro zlepšení střevní mikrobioty, či různých propagačních letáčků. Je stále možné setkat se s dřívějším pojmem „střevní mikroflóra“.

V lidském střevě se nachází okolo 10^{13} – 10^{14} mikroorganismů, které představují střevní mikrobiotu, s více než 100–150 krát více geny než náš vlastní genom [1]. Střevní mikrobiota je společenstvo mikrobů nebo přesněji řečeno mikroorganismů, které se nacházejí v lidském střevě. Slovo mikrobiom se používá pro popsání mikrobiálních genomů [2]. I přesto jsou slova „střevní mikrobiom“ a „střevní mikrobiota“ dost často zaměňovány. Dle lokalizace lze mikrobiom rozdělit do čtyř mikrosystémů [3]: mikrobiom urogenitálního traktu, mikrobiom gastrointestinálního traktu, mikrobiom dýchacích cest a kožní mikrobiom na povrchu lidského těla, přičemž nejvíce mikrobioty, až 95%, se nachází v gastrointestinálním traktu, konkrétně v tlustém střevě [2].

Lidský mikrobiom je utvářen spoluexistencí bakterií, virů, protozoa (prvoků) a řadou zástupců z domény archaea. Zastoupení těchto pěti společenstev může být rozdílné a v průběhu života jedince se může dále měnit. K nejprostudovanějším částem lidského mikrobiomu patří gastrointestinální trakt, který je hostitelem pěti hlavních bakteriálních kmenů – *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* a *Verrucomicrobia*, které tvoří střevní mikrobiotu zdravého jedince, viz Tabulka č. 1. Přestože je zastoupení u zdravých dospělých osob obdobné, vyskytují se také různé variace na rodové i druhové úrovni [3, 4].

Střevní mikrobiom hraje klíčovou roli v mnoha fyziologických procesech hostitele, je součástí jeho energetického metabolismu, metabolismu léčiv a podílí se i na ochraně těla před patogeny [3].

Tabulka 1 Nejvíce zastoupené bakterie [5]

Doména	Kmen	Třída	Řád	Čeleď	Rod
Bakterie	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>
	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidiales</i>	<i>Bacteroidiaceae</i>	<i>Bacteroides</i>
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>

2.1.1 Tvorba mikrobioty u novorozenců

Existoval předpoklad, že mikrobiota u dětí se začíná tvořit postnatálně čili od prvního dne narození dítěte. Střevní mikrobiota je ale utvářena mnohem dříve, a to již v průběhu těhotenství, kdy dítě polyká plodovou vodu, která obsahuje mikroorganismy. Osídlování lidského střeva tedy začíná již v břiše matky, což potvrzuje i fakt, že společně žijící členové rodiny mají stejné složení mikrobioty, to je ovšem podmíněno i jinými faktory. Během prvních měsíců vývinu dítěte postupně dochází ke kolonizaci střevního epitelu. Nejprve aerobními a fakultativně anaerobními mikroorganismy, následně až obligátně anaerobními mikroorganismy a bakteriemi rodu *Bifidobacterium* [2].

Utváření střevní mikrobioty je závislé na průběhu celého těhotenství a hlavním faktorem pro tvorbu mikrobioty je způsob porodu dítěte, kojení, požití antibiotik během prvního roku života a způsob výživy dítěte [6, 7].

Ve švédské studii z roku 2015 byl charakterizován střevní mikrobiom během prvního roku života v závislosti na způsobu porodu dítěte a způsobu výživy. Pro detailní charakterizaci střevního mikrobiomu byly odebrány vzorky stolice od 98 matek při porodu s normálním průběhem těhotenství, přičemž 15 z nich rodilo pomocí císařského řezu a zbytek přirozenou vaginální cestou. Vzorky novorozenců byly odebrány ve 4. a 12. měsíci života. Kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidetes* patřily k nejvíce zastoupeným, po nich hned následovaly kmeny *Actinobacteria* a *Proteobacteria*. Po porovnání fekálního mikrobiomu kojenců narozením císařským řezem jejich mikrobiom na rozdíl od mikrobiomu vaginálně narozených jedinců obsahoval rody *Enterobacter* *hormonaechei*, *E. cancerogenus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *H. aegyptius*, *H. influenzae*, *H. haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. aureus*, *Streptococcus australis* a *Veillonella dispar*, *V. parvula*, což nasvědčuje skutečnosti, že na tvorbě střevní mikrobioty těchto jedinců se podílejí kožní i orální mikroby, ale překvapivě také mikroby z okolního prostředí. Střevní mikrobiota u vaginálně narozených kojenců byla osídlena nejhojněji rody *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides*, *Escherichia* či *Shigella* [6].

Studie ukazuje, že i střevní mikrobiota matek přispěla k tvorbě mikrobioty u novorozenců, při porovnání zastoupení taxonů, ze 187 taxonů, které byly přítomny u vaginálně narozených dětí, bylo 135 objeveno i u matek, a to především ty nejpodstatnější *Escherichia*, *Shigella*, *Bifidobacterium longu*, *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis*. Tato situace naznačuje, že existuje vertikální přenos z matky na dítě. Při porovnání narozených císařským řezem nebyl prokázán přenos z matky na dítě, způsobem porodu došlo k narušení přenosu. Bylo tedy zjištěno, že 72 % prvotních mikrobů se u vaginálně narozených novorozenců shodovalo s mikroby

obsaženými ve stolici matky dítěte, na rozdíl od novorozenců narozených císařským řezem, kde bylo zjištěno pouze 41 % z raných kolonizátorů střevního epitelu. U těchto jedinců bylo méně časté sdílení bakterií rodu *Bacteroides*, ale sdílení *Enterococcus faecalis* bylo zachováno. I bakterie rodu *Bifidobacterium* byly pozorovány při přenosu z matky na dítě. Výsledky studie ukazují, že prvotní kolonizátoři střeva novorozence pocházejí od matky a že způsob narození je důležitým faktorem pro formování střevní mikrobioty kojenců na počátku jejich života [6, 7, 8].

2.1.2 Střevní mikrobiota v závislosti na výživě dítěte

Mikrobiomy novorozenců a čtyřměsíčních kojenců byly obohaceny o geny schopné degradovat cukry získané z mateřského mléka, které je primárním zdrojem výživy. U převážně kojených kojenců se po čtyřech měsících objevily rody, známe dnes pod názvem probiotika, a to *L. Johnsonii*, *L. asseri*, *L. paracasei*, *L. casei* a *B. longum*. Na rozdíl od kojenců krmených převážně umělou výživou, u kterých převažovala přítomnost *Clostridium difficile*, *Granulicatella adiacens*, *Citrobacter* a *Enterobacter cloacae*. Přerušování kojení mělo velký vliv na posun střevní mikrobioty k podobě dospělého jedince. U 12měsíčních kojenců bylo složení obohaceno o bakterie *Bacteroides*, *Bilophila*, *Roseburia*, *Clostridium* a *Anaerostipes*. U dětí kojených i po dovršení jednoho roku života převládaly bakterie *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Collinsella*, *Megasphaera* a *Veillonella*, které jsou obsaženy v mateřském mléce. Silný vliv na zránění mikrobioty mají tedy dva významné faktory, za prvé je to ukončení kojení a za druhé přechod na pevnou stravu. V tomto okamžiku, kdy dítě přechází z převážně tekuté stravy na tuhou, se střevní mikrobiota dítěte již velmi podobá dospělému jedinci [6].

2.1.3 Vliv střevní mikrobioty na hostitele

Střevní mikrobiota výrazně ovlivňuje život hostitele, a to pozitivně i negativně, viz tabulka č. 2.

Tabulka 2 Vlivy střevních bakterií na hostitele [9]

Pozitivní vlivy střevní mikrobioty na hostitele	Negativní vlivy střevní mikrobioty na hostitele
Vazba potenciálních mutagenů	Produkce toxinů
Produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (butyrátu, propionátu, acetátu) a monosacharidů z fermentovatelné vlákniny	Aktivace prokarcinogenů
Syntéza vitamínu B a vitamínu K (foláty a biotin napomáhají regulovat proliferaci sliznice tlustého střeva)	Syntéza karcinogenních a genotoxických látek z nestravitelných součástí potravy
Přímé působení na sliznici (ovlivnění funkce imunitního systému, složení hlenu, neuro-humorální regulaci)	Ovlivnění metabolismu žlučových kyselin, kdy dochází k transformaci primárních žlučových kyselin na sekundární, které jsou promotory tlustostřevních tumorů, jsou genotoxické a karcinogenní a napomáhají při selekci buněk rezistentních vůči apoptóze.
	Metabolismus tlustostřevních bakterií vedoucí k aktivaci enzymů, např. betaglukonidáz, které svoji následovnou činností mohou způsobit uvolnění karcinogenního metabolitu vzniklého v játrech v tračníku.

2.2 Probiotické bakterie

2.2.1 Historie

Termín poprvé použili Daniel M. Lilly a Rosalie H. Stillwell v roce 1965. Poprvé jako probiotika označili látku, která byla produkována jedním prvokem a podněcovala růst druhého prvoka. Později se začal termín používat jako označení krmných doplňků, které byly určeny pro hospodářská zvířata a lidi. Význam slova „probiotikum“ znamená „pro život“ a je opakem slova „antibiotikum“. První definici probiotik formuloval Fuller v roce 1989. Lidé však přijímali živé kultury bakterií jako součást jejich potravy již dávno před vymezením významu slova, a proto je jako počátek teorie probiotik uváděn rok 1907. V tomto roce byla publikována tzv. „optimistická studie o prodloužení věku“ (Ilja Mečnikov). V této práci píše o tom, že dlouhověkost lidí žijících v balkánských zemích je způsobena tím, že pravidelně konzumují mléčné kysané výrobky, které obsahují živé bakterie [11].

2.2.2 Definice probiotik

Probiotika jsou definovaná jako mikroorganismy, jejichž požití v přiměřeném množství může být zdraví prospěšné pro konzumenta [11]. Jindy se můžeme dočíst o probiotikách jako doplňcích stravy, které příznivě ovlivňují hostitele tím, že zlepšují jeho střevní mikrobiální rovnováhu. Probiotika obecně mají výborný vliv na zdraví konzumenta, chrání ho před možnými nemocemi způsobenými potravinami [12].

2.2.3 Charakteristika probiotik

Probiotika jsou tedy zdraví prospěšné mikroorganismy, které přirozeně osidlují střevní mikrobiotu hostitele a inhibují působení patogenů. Tyto mikroorganismy obvykle patří do skupiny bakterií mléčného kvašení. Jejich důležitou schopností je kolonizace střevní sliznice, k tomu se nejčastěji využívají dva rody bakterií, rod *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* [13]. Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují, nebo dokonce mění složení střevní mikrobioty, např. věk, nemoci, stres, strava či užívání léčiv [14].

Probiotické bakterie jsou prospěšné jak u lidí, tak i u zvířat. Běžně se přidávají do mléčných kysaných produktů, sýrů, fermentovaných masných produktů, ale i do sušenek. Můžeme je užívat i ve formě výživového suplementu v kapslích nebo prášku [11].

2.2.4 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení, často označované zkratkou BMK, jsou používány při fermentaci potravin a krmiv. Obecně jsou považovány za velmi prospěšné organismy. Podle současné klasifikace patří BMK do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli* a řádu *Lactobacillales*. Mezi nejvýznamnější bakterie mléčného kvašení patří rody *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* a *Streptococcus* [14].

Bakterie mléčného kvašení jsou především nesporulující, anaerobní, grampozitivní nepohyblivé tyčinky, jejichž hlavním metabolickým produktem je laktát. Podle toho je následně můžeme rozdělit na homofermentativní a heterofermentativní bakterie, viz Tabulka 3 [15].

- homofermentativní bakterie – jediným produktem fermentace sacharidů je kyselina mléčná
- heterofermentativní bakterie – fermentací sacharidů nevzniká pouze kyselina mléčná, ale i kyselina octová, CO₂, popřípadě i ethanol.

Tabulka 3 Rody bakterií mléčného kvašení, typ jejich fermentace, hlavní produkty a konfigurace [15]

Rod	Typ fermentace	Hlavní produkty	Konfigurace kyseliny mléčné
<i>Lactococcus</i>	Homofermentativní	laktát	L (+)
<i>Streptococcus</i>	Homofermentativní	laktát	L (+)
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativní	laktát	DL, L (+)
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentativní	laktát	DL
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativní	laktát : acetát : CO ₂ 1:1:1	D (-)
<i>Bifidobacterium</i>	Heterofermentativní	laktát : acetát 1:1	L (+)

Jejich hlavním probiotickým účelem je stabilizovat střevní mikrobiotu člověka. Pomáhají ovšem i při infekcích, které jsou způsobeny bakteriemi a viry, zlepšují či obnovují stav mikrobioty po podávání antibiotik, pomáhají při zánětlivých střevních onemocněních a stimulují imunitní systém. Probiotické účinky bakterií jsou vždy kmenově specifické. Některé pozitivní efekty byly prokázány in vitro, jiné in vivo na zvířatech nebo lidech [12].

2.2.5 Nejpoužívanější rody bakterií mléčného kvašení jako probiotika

Hlavními zástupci probiotických bakterií mléčného kvašení jsou *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* a *Enterococcus faecium*. Probiotická funkce BMK je především u těch BMK, které mají původ v traktu člověka nebo zvířete a jsou schopné zde přežít a namnožit se. Dříve byl řazen mezi BMK i rod *Bifidobacterium*, který nyní patří do kmene *Actinobacteria* [12].

2.2.6 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus*, viz Obrázek 1, patří do skupiny grampozitivních, fakultativně anaerobních nebo mikroaerofilních bakterií tyčinkovitého tvaru, které pravidelně nesporulují. Běžně jsou velmi rozšířené, nachází se obvykle i v lidském těle. Přirozeně se vyskytují v ústní dutině, v trávicím traktu nebo vagíně. Preferují prostředí o pH v rozmezí 4,5–6,5 a teplota optimální pro jejich růst se pohybuje v rozsahu 15–45 °C. Jejich hlavním metabolickým produktem je kyselina mléčná, která vzniká zkvašením (fermentací) sacharidů. Proto je hlavním zástupcem skupiny bakterií mléčného kvašení, které se hojně využívají jak v potravinářském průmyslu, tak v biotechnologickém průmyslu. Kyselina mléčná dokáže snižovat pH prostředí, a zabraňuje tak vzniku a působení patogenních bakterií [15].



Obrázek 1 *Lactobacillus acidophilus* [16]

2.2.7 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie, viz Obrázek 2, jsou grampozitivní heterofermentativní bakterie. Jsou striktně anaerobní, nesporulují, nepohybují se a obvykle jsou kokovitěho nebo tyčinkovitěho tvaru. Nachází se jednotlivě, ale i v kratších nebo delších řetězcích. Jejich optimální teplota pro růst je v rozmezí 37–41 °C, minimální hraniční teplota je 25 °C, maximální hraniční teplota dosahuje až na 45 °C. Bifidobakterie nemají rády velmi kyselé prostředí, což je důvod, proč jejich optimální pH pro růst je v rozsahu 6,5–7 [15].



Obrázek 2 *Bifidobacterium animalis* [17]

2.2.8 Pozitivní účinky probiotik na zdraví člověka

Výhod probiotik, které působí na zdraví člověka, je nespočetně mnoho. Jejich účinek se také odvíjí od věku a fyziologického stavu konzumenta. Užívání probiotik se doporučuje, buď preventivně, nebo cíleně pro zlepšení zdravotního stavu, např. při a po užívání antibiotik, podpoření imunity, nebo před cestou do exotických zemí. Mezi hlavní pozitivní účinky na zdraví člověka patří především [11]:

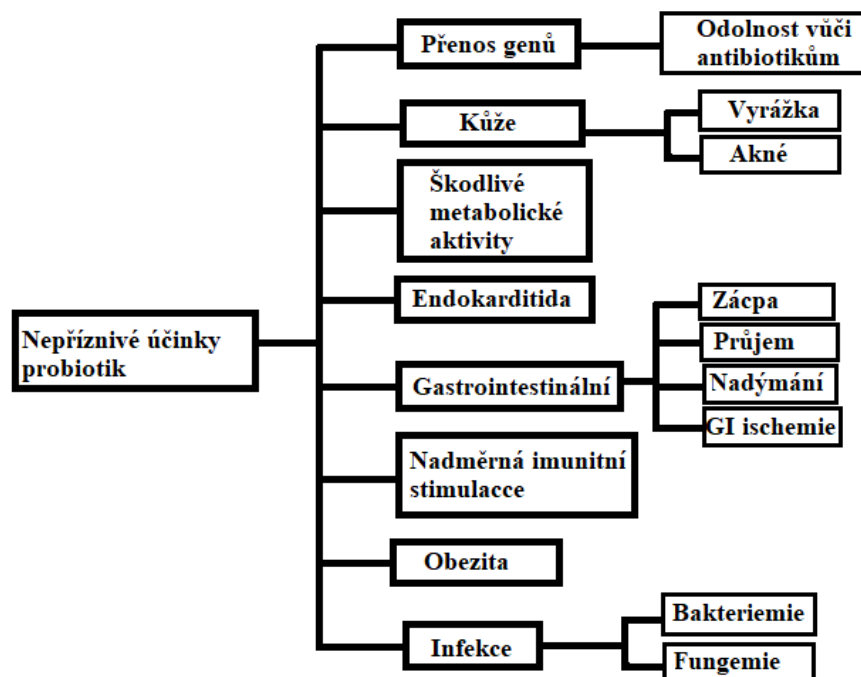
- pozitivní vliv na atopické ekzémy a alergie
- prevence kolorektálního karcinomu
- předcházení zácpě a průjemovým onemocněním
- zabránění rotavirové infekci kojenců
- stimulace imunity
- přecházení a mírnění zánětlivých střevních onemocnění

2.2.9 Negativní účinky probiotik na zdraví člověka

Ačkoliv jsou probiotika známá svými pozitivními účinky, nalezneme se i několik vedlejších účinků, které může jejich užívání způsobit.

Evropský úřad pro bezpečnost potravin sice považuje běžné druhy probiotických bakterií za bezpečné a nezávadné, ale stejně jako Americký úřad pro kontrolu potravin, doposud neschválil žádný druh probiotik pro prevenci a léčbu zdravotních komplikací. Důvodem zamítnutí bylo nedostatečné prozkoumání mechanismu účinku probiotických bakterií [18].

Světová zdravotnická organizace podpořila testování probiotik z hlediska bezpečnosti. Proběhla řada testů na produkci toxinů, rezistenci vůči antibiotikům a celková analýza metabolických aktivit. Na následujícím Obrázku 3 lze vidět přehled možných vedlejších účinků způsobených užíváním probiotik.



Obrázek 3 Možné nežádoucí účinky [18]

Jiné studie navrhují, jak předcházet vedlejším účinkům, které se mohou u konzumenta vyskytnout. V první řadě je doporučeno snížit dávku. Lidské tělo si na nižší dávku přivykne snáz a postupně je možné dávku opět navýšit dle potřeby. Dalším doporučením, jak zamezit nežádoucím účinkům, je pít dostatečné množství tekutin. Touto cestou můžeme potlačit průjem, nadýmání, křeče, vyrážky či akné [18].

2.2.10 Probiotické výrobky s obsahem ovocné složky

Probíhají výzkumy zkoumající probiotické kultury na bázi ovocné nebo zeleninové složky. Hlavním důvodem jsou výhody, které ovocné anebo zeleninové šťávy poskytují. Ovocné šťávy jsou bohatým zdrojem živin, které jsou obohaceny okyselujícími látkami, od nichž se očekává, že by mohly prodloužit dobu trvanlivosti, a to tím způsobem, že vytvoří anaerobní prostředí, které probiotické bakterie vyžadují, toho lze snadno dosáhnout odstraněním kyslíku. Další výhodou ovocných šťáv je také přirozená přítomnost cukrů, které podporují růst probiotických bakterií. Velkou výhodou je i rychlé trávení ovocných šťáv, které v žaludku zůstávají jen krátkou chvíli, což je výhodné i pro probiotické bakterie, které nejsou vystaveny dlouhému působení velmi kyselého prostředí v žaludku. Jsou využívány druhy ovoce a zeleniny jako jsou jablka, ananas, pomeranče, meloun, černý rybíz, maliny, borůvky, banán, kešu jablko, granátové jablko, mrkev a červená řepa a další. Například ve šťávě z kešu jablka byl i po 6 týdnech skladování počet životaschopných buněk *L. casei* větší než 8,00 log KTJ/ml, stejný trend se objevil u ananasového a melounového džusu [19].

Enkapsulace probiotických buněk je další možnost, jak lépe ochránit probiotické bakterie před působením kyselých trávicích šťáv a zároveň může prodloužit životaschopnost buněk během skladování. Probiotické bakterie mohou být enkapsulovány do částic obvykle kulovitého tvaru, které jsou vytvářeny z alginátu a jejich povrch je opatřený chitosany, účelem je ještě zvýšit ochranu probiotických bakterií [19].

2.3 Charakteristika rostlinných extraktů

Chronická onemocnění patří mezi největší problém moderní lidské společnosti. Jedná se především o kardiovaskulární a cerebrovaskulární onemocnění, rakovinu či cukrovku. I přestože lidské tělo má přirozený obranný systém proti škodlivým vlivům volných radikálů, každodenní stres a špatné stravování snižují obranyschopnost vůči těmto vlivům. Antioxidační vlastnosti bioaktivních látek jsou vyzdvihovány, díky schopnosti chránit buněčné systémy lidského těla před oxidačním poškozením pomocí různých mechanismů, a tím snižují riziko chronických onemocnění [20].

Mezi bioaktivní látky řadíme fenolické sloučeniny, flavonoidy, antokyany, vitamin C, vitamin E. Polyfenoly jsou nejrozšířenější sloučeniny, které vykazují redukční účinky v lidské stravě. Potraviny bohaté na obsah bioaktivních látek jsou především víno, káva, čaj, ovocné džusy, čokoláda a ovoce [21].

2.3.1 BIO Dětský fenyklový čaj, LEROS Baby

Dětský čaj připravený z plodu fenyklu z ekologického zemědělství, který podporuje trávení, působí jako přírodní antioxidant, pomáhá při plynatosti a nadýmání [22]. Fenykl obecný neboli *Foeniculum vulgare* je hlavní složkou zmíněného produktu. Lidově je fenykl nazýván jako italský kopr, úkrop nebo sladký kopr apod. Fenykl je bylina z čeledi miříkovitých a pěstuje se především pro její plody, semena, která obsahují silice, anethol, estragol, fenchon, fenyلكarboxylové kyseliny, flavonoidy, pryskyřice, furanokumariny, mastný olej, vitaminy A, B, C, E, které mají expektorační a sekretomotorické účinky. Fenykl obecný lze tedy použít jako slabé spasmolytikum proti nadýmání [23].

2.3.2 Dětský čaj s malinou, LEROS Baby

V malinovém dětském čaji nalezneme 38 % růže šípkové, 23 % ibišku súdánského a 20 % jabloně. Přítomnost maliníku je v 10% zastoupení. V případě maliníku, *Rubus idaeus*, jsou sbírány listy, které nejsou běžně součástí čajových směsí, nalezneme je ale v čajích působících na metabolismus. Růže šípková neboli *Rosa canina* či jednoduše šípek, je zdroj významných látek, které se nachází v plodu rostliny. Sbíraný plod obsahuje taniny, sorbitol, vitamin C v poměrně velkém zastoupení až 1,7 %, kyselinu jablečnou či kyselinu citronovou. Čaj z šípků je vhodné konzumovat například při nachlazení. Ibišek súdánský latinsky *Hibiscus sabdariffa*, sbíraný pro svůj květ, napomáhá snižovat cholesterol v organismu a obsahuje fenolické sloučeniny, polysacharidy, kyselinu vinnou, kyselinu jablečnou i kyselinu citronovou. Do čajových směsí se přidává nejen kvůli svému obsahu, ale i z důvodu sensorických vlastností, kdy zvýrazňuje barvu i chuť čaje. *Daucus carota*, nám známá jako mrkev obecná, je v první řadě nepostradatelným zdrojem vitaminu A, který má pozitivní vliv na lidský zrak. Je přidávána pro své dietetické účinky při střevních či žaludečních poruchách u kojenců. Jablň, *Malus domestica*, sbíranou částí je plod, který obsahuje vitamin C, organické kyseliny, polysacharidy a především vlákninu, která upravuje trávení a slouží jako prebiotikum [24].

2.3.3 BIO čaj pro kojící matky, LEROS Baby

Kojící čaj pro matky je výhradně BIO, poněvadž jednotlivé přísady pocházejí z kontrolovaného ekologického zemědělství. Stejně jako v předchozích dětských čajích i zde ve složení nesmí chybět růže šípková, tentokrát až v obsahu 52 %, dále je zde hojně zastoupena jestřabina lékařská v obsahu 20 %, rybíz černý 18 % a poslední komponentou je levandule lékařská 5 %. Růže šípková již byla popsána v předchozích odstavcích. U jestřabiny lékařské lidově kozího ruta je sbírána a pro výrobu čajů používá její nať. O jestřabině se říká, že pomáhá redukovat hladinu cukru v krvi, stimuluje tvorbu mateřského mléka. Jestřabina bývá také označována jako diuretikum. V případě rybízu černého, neboli *Ribes nigrum*, se sbírají listy, ale hlavně plody, které obsahují anthokyany, flavonové glykosidy, sacharidy a organické kyseliny. V listech najdeme flavonoidy jako hyperin a astragalin, prodelfininy a v nižším zastoupení i silice. Čaj z listů se používá například při zánětech močových cest nebo dýchacích cest. Poslední komponentou čaje je levandule lékařská, kde jsou oceňovány aroma a zklidňující účinky. Sbírá se její nať i květ, který obsahuje 1–3 % silic, glykosidy a třísloviny. Levandule působí jako uklidňující prostředek při nervovém vyčerpání, potížích se spaním, přidává se do koupelí, kde napomáhá regeneraci a hojení různých oděrek a ran. I její využití v kosmetice je věhlasně známé [25].



Obrázek 4 Čaje značky LEROS vybrané pro experimentální použití [24, 25]

2.4 Enkapsulace aplikovaná v potravinářství

Enkapsulace je definována jako proces zachycení jedné substance dané aktivní látky, substancí druhou určitým obalovým materiálem. Enkapsulovaná aktivní látka uvnitř částice bývá nazývána jako jádro nebo výplň. Naopak látka, která se nachází na povrchu částice a zapouzdřuje danou aktivní látku uvnitř, se označuje jako obal, někdy také jako kapsule, ale můžeme se setkat i s označením nosič [26].

Existuje nespočet aplikací enkapsulace v potravinářství. Metoda enkapsulace je využívána například při zakomponování bioaktivních molekul a živých buněk do potravin. Lze ji tedy využít jako způsob obohacení potravin o antioxidanty, minerály, vitaminy, lutein, mastné kyseliny a další i spolu s živými organismy například probiotickými bakteriemi. Princip enkapsulace je založen na zapouzdření bioaktivní složky, která je zcela obalena a chráněna bariérou. Jiné zdroje uvádí definici enkapsulace jako technologie balené látek o různém skupenství do malých částic, kapslí, jejichž obsah je postupně uvolňován v závislosti na podmínkách. Zmíněné částice mohou být různých rozměrů od několika málo nanometrů až po několik milimetrů. Hlavním účelem enkapsulace je uchování stability bioaktivních sloučenin a zabránění interakce s potravinovou částicí [26].

Existuje mnoho látek, které lze použít k enkapsulaci jak kapalných, tak látek plyných, problém ovšem nastává v legislativě, kdy předpisy pro potravinářská aditiva jsou přísnější než v případě léčiv a je nutné, aby potravinářský proces splňoval požadavky udávané Evropským úřadem pro bezpečnost potravin [26].

Při výběru materiálu musí být kladen důraz také na funkčnost materiálu, který by měl poskytovat stabilitu aktivní látce. Obecně materiály použité pro enkapsulaci musí také splňovat následující kritéria: musí být potravinářského původu, musí být schopné vytvořit bariéru mezi obsahem a okolním prostředím a musí být biologicky odbouratelné, proto drtivá většina materiálu používaných v potravinářství pro enkapsulaci jsou biomolekuly, přesněji polysacharidy. Běžně se používá škrob a jeho deriváty jako amyulóza, amylopektin, dextriny nebo celulóza. Používají se také rostlinné extrakty, pektiny a rozpustné sójové polysacharidy, mořské extrakty jako karagenany a alginát nebo mikrobiální a živočišné polysacharidy jako dextrans, chitosan, xanthan nebo gellan [26].

2.4.1 Metody enkapsulace probiotických mikroorganismů

2.4.1.1 Extruze

Extruze patří mezi jednoduché a nepříliš nákladné technologie. Je široce využívána při enkapsulaci probiotických bakterií. Ačkoliv jde o techniku nenáročnou, je schopna zajistit vysokou životaschopnost enkapsulovaných buněk [27, 28].

Tato technika pracuje s polymerním hydrokoloidním roztokem, který je smíchán s mikrobiální kulturou. Za vysokého tlaku je vzniklá suspenze vytlačována tryskou do síťovacího činidla a přeměnou hydrokoloidního roztoku tak dochází ke gelovatění neboli tvorbě gelu v podobě kuliček [27, 28].

Nevýhodou této techniky je její časová náročnost, je pomalá, a proto ji nelze využít při velkovýrobě. Další nevýhodou této techniky je, že není schopna vyrábět částice menší než 500 μm [27].

2.4.1.2 Emulgace

Další běžně využívanou technikou při enkapsulování probiotik je emulgace. Emulze se skládá ze dvou fází. Z fáze dispergované, která obsahuje buněčnou suspenzi, a z fáze kontinuální, která může být olej nebo organický roztok. [27, 28]

Homogenizací směsi pomocí povrchově aktivních látek se připraví emulze. Emulze je tedy disperze dvou vzájemně nemísitelných kapalin se stabilizačním činidlem a větší afinitou k fázi kontinuální než k dispergované fázi. Částice se vytváří v kontinuální fázi pomocí síťovacího činidla nebo pomocí procesu ochlazování. Vyrobené mikrokuličky jsou následně centrifugovány nebo filtrovány. Jejich velikost se pohybuje mezi 25 μm až 2 mm a je řízena hned několika faktory: rychlostí míchání, rychlostí přidávání síťovacího činidla, koncentrací povrchově aktivní látky a poměrem vody v oleji [27].

Emulgátory obecně zlepšují stabilitu emulze, a to díky snížení povrchového napětí. Použití emulgátorů také způsobuje menší velikost kuliček, což je žádoucí jev [27].

Nevýhodou při výrobě mikrokapslí o různém tvaru i velikosti je přítomnost dalšího polymerního roztoku k potahování buněk [27].

Výsledkem této techniky jsou tedy menší průměry mikrokapslí s vyšší životaschopností probiotických bakterií a je snazší je škálovat [27].

2.4.1.3 Sprejové sušení

Sprejové sušení je nízkonákladová technika, která se již běžně používá v potravinářském průmyslu a je také vhodná pro mikroenkapsulaci probiotik. Jde o rychlou techniku s vysokou produktivitou.

Princip této metody je založen na atomizaci roztoku obsahující enkapsulované činidlo ve vysokoteplotním plynu, který neprodleně vytvoří prášek [27].

Jako potahovací materiál pro enkapsulaci probiotik je možné použít například maltodextrin, modifikovaný škrob, arabskou gumu, alginát, karboxymethylcelulózu, guarovou gumu, sójový protein nebo kaseinát sodný [27, 28].

Proces může být prováděn kontinuálně, důležité je brát ale zřetel na kontrolu a nastavení parametrů, např. vstupní a výstupní teplota. Sprejové sušení představuje aplikaci kapalného nástřiku na malé kapičky o velikosti 10–150 μm , které jsou následně rozprášeny do horkého a suchého vzduchu vyhřátého na teplotu 150–250 $^{\circ}\text{C}$. Vhodný probiotický kmen pro tuto techniku by měl být vybrán na základě odolnosti vůči osmotickému, oxidačnímu a tepelnému stresu [28].

2.4.1.4 Sprejové chlazení

Sprejové chlazení je obdobný proces jako sprejové sušení, u obou těchto metod dochází ke vzniku malých kapiček. Tato metoda je založená na vstřikování studeného vzduchu do komory, kde dochází k atomizaci matrice, což způsobí tuhnutí částic [27].

Jako zapouzdřovací materiál lze použít triglyceridy, mastné kyseliny, oleje, vosky a další látky na bázi lipidů. Pro získání stejnoměrných částic je nutné dbát na parametry procesu, jako je teplota roztavené matrice během zpracování, teplota komory a rozprašovacího vzduchu, tlak rozprašovacího vzduchu a průtok přiváděného vzduchu [27].

Použití lipidových matic jako stěn materiálů může prodloužit životaschopnost buněk během skladování a řízeně uvolňovat zapouzdřené buňky v gastrointestinálním traktu při působení intestinálních lipáz. Příkladem mohou být jednovrstevné částice vyrobené pomocí hydrogenovaného palmového oleje jako obalového materiálu, který představoval nejlepší ochranný účinek pro probiotika během doby skladování [27].

2.4.1.5 Lyofilizace

Lyofilizace je velmi oblíbenou metodou používanou při mikroenkapsulaci probiotik pro zvýšení jejich skladovatelnosti [28].

Proces lyofilizace lze rozdělit do tří hlavních částí: zmrazení, primární sušení a sekundární sušení. Fáze zmrazení musí být co nejrychlejší, aby se zabránilo tvorbě velkých krystalů a následně i poškození buněk. Celý proces lze snadno řídit a hlídat jeho podmínky, především rychlost zmrazování nebo teplotu, které mohou výrazně ovlivnit velikost ledových krystalů. Ve fázi zmrazování dochází ke krystalizaci vody, což způsobuje chemické i osmotické poškození, stejně jako koncentrace zbylých látek v nezmrazené frakci. Přebytečná zmrzlá voda se odstraní

pomocí sublimace při primárním sušení. Při sekundárním sušení dochází desorpci zbylé nezmrazené vody [28].

Lyofilizace je časově náročná i nákladná metoda, jejíž proces má stále několik nedostatků, může například poničit buněčnou membránu, povrchové proteiny nebo buněčnou stěnu, čímž sníží schopnost viability po vysušení, protože voda představuje významný faktor při udržení stability buňky [28].

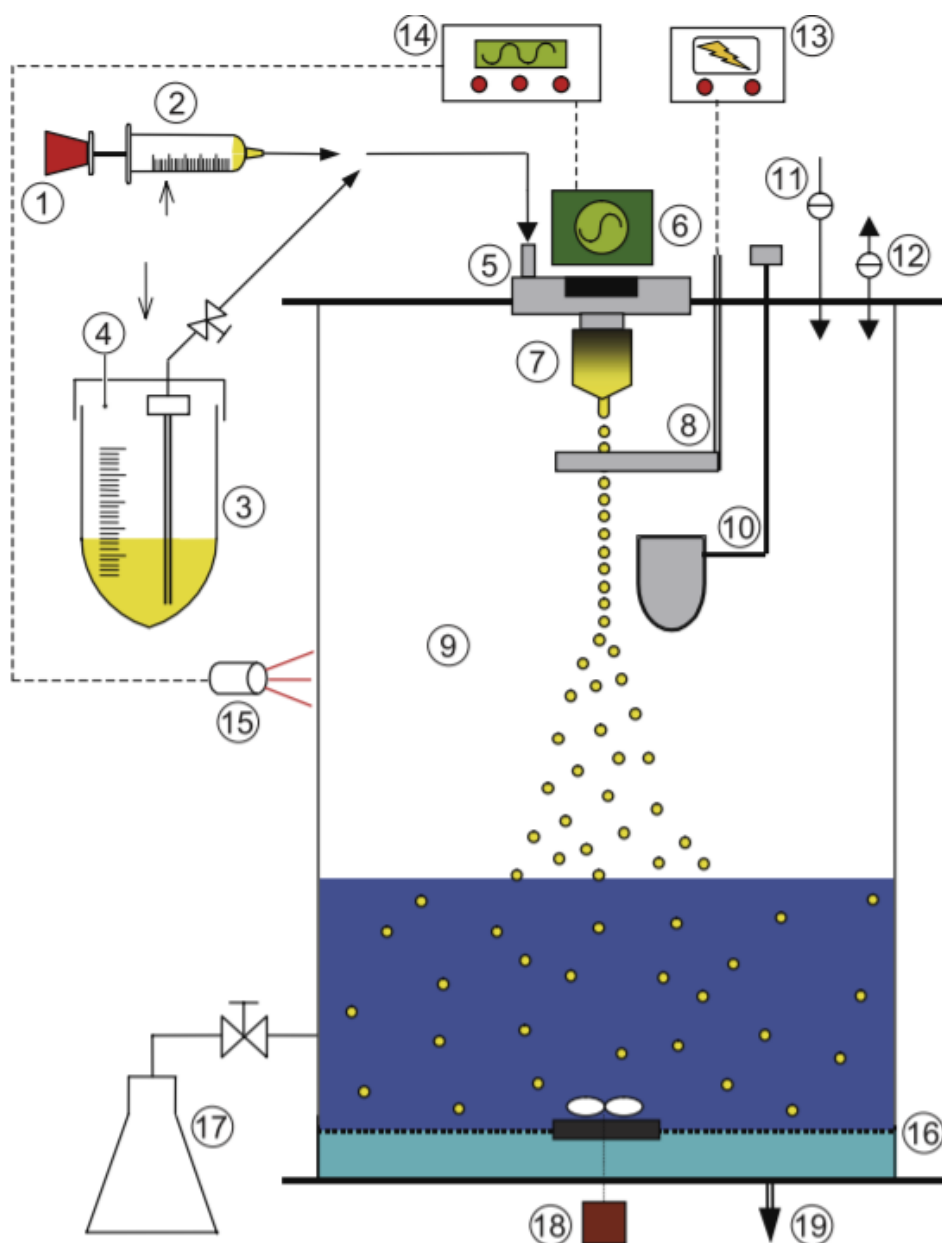
2.4.2 Enkapsulátor

Enkapsulátor B-395 Pro je poloautomatický laboratorní přístroj používaný pro polymerní enkapsulaci chemických sloučenin, biomolekul, léků, příchutí a vůně, buněk i mikroorganismů za sterilních i nesterilních podmínek. Tvorba kuliček je založena na principu, kdy řízený laminární proud kapaliny je přerušen vibracemi s optimální frekvencí a dochází tak ke vzniku stejně velkých částic [29].

Materiál, jež má být enkapsulován, například buňky, mikroorganismy, chemické nebo biologické látky, jsou smíchány s enkapsulačním polymerem, kterým bývá nejčastěji alginát. Takto vzniklá směs je převedena do stříkačky nebo tlakové láhve. Následně je směs vtlačena do pulzační komory, buď stříkačkovým čerpadlem, nebo tlakem vzduchu. Kapalina poté přechází vyvrtaným otvorem trysky a při výstupu z trysky dochází k rozdělení na kapičky stejné velikosti. Vzniklé kapičky pak prochází elektrickým polem mezi tryskou a elektrodou, kde získávají povrchový náboj. Díky působení elektrostatických odpuzivých sil se kuličky při poklesu do vytvrzovacího roztoku rozptýlí [29].

Při dodržení optimálních podmínek je zřetelně viditelný řetěz kapiček. Špatně utvořené kapičky, které se vyskytují na začátku a konci výrobního procesu, jsou zachyceny odtokovým kalíškem. V závislosti na několika parametrech dochází k produkci 50 až 5 000 kuliček za sekundu, ty se následně shromáždí ve vytvrzovacím roztoku v reakční nádobě, která musí být elektricky uzemněna. Vytvrzovací roztok je neustále promícháván magnetickým míchadlem, aby nedocházelo ke shlukování kuliček. Výsledná velikost kuliček závisí na několika faktorech, jako je frekvence vibrací, amplitudě, velikosti trysky, rychlosti toku a fyzikální vlastnosti směsi produktu a polymeru [29].

Enkapsulátor B-395 Pro se skládá z několika hlavních částí, jsou to řídicí jednotka s injekčním čerpadlem, elektrický a pneumatický systém a reakční nádoba. Výhodou je, že všechny části přístroje, které jsou v přímém kontaktu s částicemi je možné sterilizovat pomocí autoklávování [29].



Obrázek 5 Schéma procesu enkapsulace přístrojem Enkapsulátor B -395 Pro [29]

2.5 Probiotické doplňky na českém trhu

Na českém trhu lze vybírat ze široké škály různých probiotických doplňků stravy. Výrobci nabízejí doplňky lišící se vzhledem, složením a cenou.

Vzhled samotného doplňku obvykle souvisí i s tím, pro kterou věkovou skupinu je určen. Pro kojence lze vybrat doplněk v podobě kapek nebo prášku, které jsou snadno aplikovatelné a je možné je přimíchat do stravy či nápoje. Pro děti od 3 let a dospělé jsou v nabídce probiotické doplňky v podobě žvýkacích tablet nebo polykacích kapslí s různými, převážně ovocnými příchutěmi [30, 31, 32, 33, 34].

Složení a cena probiotického doplňku spolu úzce souvisí, lépe řečeno cena se odvíjí od složení produktu. Probiotické doplňky jsou dostupné s rozdílným obsahem kmenů probiotických bakterií a s různou hodnotou CFU (počet jednotek tvořící kolonie), která udává počet životaschopných kolonií na konci expirace, viz následující tabulka, kde jsou porovnány čtyři probiotické produkty pro děti [30, 31, 32, 33, 34].

Tabulka 4 Porovnání probiotických produktů podle ceny a obsahu probiotických kmenů [30, 31, 32, 33, 34]

Produkt	Počet v balení	Počet probiotických kmenů	CFU	Cena za balení
BioGaia® , probiotické kapky	40 dávek	1	$1 \cdot 10^8$	459,- Kč
Bio-Kult Infantis , sáčky pro kojence	16 dávek	7	$1 \cdot 10^9$	170,- Kč
Natural Swiss Flora Protect Jr. , Probiotika pro děti	60 kapslí	12	$12,5 \cdot 10^9$	660,- Kč
Dr. Formulated , Živé bakterie pro děti	30 kapslí	14	$5 \cdot 10^9$	688,- Kč

Z Tabulky 4 výše je patrné, že čím více probiotických kmenů doplněk obsahuje, tím více roste i jeho cena. Důležitým faktorem, který ovlivňuje cenu produktu, je také počet dávek nebo kapslí, které balení obsahuje, a dávkování. Produkt od výrobce Natural Swiss Flora Protect Jr. by se tak mohl zdát jako nejvýhodnější z hlediska počtu tablet, počtu probiotických kmenů a ceny. Není tomu ale tak, balení sice obsahuje 60 kapslí, ale jejich dávkování je 1–2 denně. Zatímco produkt firmy Dr. Formulated obsahuje 30 kapslí a je podáván pouze jednou denně, obsahuje až 14 kmenů probiotických bakterií a je jen nepatrně dražší. Pokud porovnáme hodnoty CFU, produkt Natural Swiss Flora Protect Jr. má tyto hodnoty jednoznačně nejvyšší, a tedy i počet živých kolonií na konci expirace je nejvyšší.

Užívání jakýchkoliv doplňků stravy je vždy dobré prokonzultovat s lékařem.

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je vývoj a charakterizace doplňků stravy s obsahem probiotických bakterií pro dětskou výživu.

1. Zpracování rešerše na dané téma.
2. Návrh optimálního složení probiotického doplňku stravy a jeho charakterizace.
3. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Alginát sodný, Sigma-Aldrich (USA)
Bile salts, Sigma-Aldrich (USA)
BHI (Brain Heart Infusion) Broth, Himedia (Indie)
Chlorid hlinitý hexahydrát, Lach:Ner (Česká republika)
Chlorid vápenatý dihydrát, Penta (Česká republika)
Dusitan sodný, Lach:Ner (Česká republika)
Ethanol, Lach:Ner (Česká republika)
Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (Česká republika)
Hydrogen uhličitán sodný, Penta (Česká republika)
Hydroxid sodný p. a., Lach:Ner (Česká republika)
Kyselina chlorovodíková 35%, Lach:Ner (Česká republika)
Kyselina L-askorbová, Sigma-Aldrich (Německo)
MRS Broth Médium, Himedia (Indie)
Nutrient Broth Médium, Himedia (Indie)
Pankreatin (vepřový pankreas), Sigma-Aldrich (Německo)
Pepsin, Sigma-Aldrich (Německo)
Propidiumjodid, eBioscience (USA)
Uhličitán sodný p. a., Lach:Ner (Česká republika)
2,6-dichlorfenolindofenol, Sigma-Aldrich (Německo)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (Německo)
Automatické pipety o různém objemu, Discovery (Německo)
Běžné laboratorní sklo a pomůcky
Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (Německo)
Enkapsulátor Buchi B-395 Pro (Švýcarsko)
ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (Německo)
Mikrocentrifuga Mikro 120, Hettich Zentrifugen (Německo)
Laminární box Aura mini, BioAir (Itálie)
Průtokový cytometr Apogee A50, Apogee Flow Systems (Velká Británie)
Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Německo)

Spektrofotometr Helios γ , Unicam (Velká Británie)

Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000 (Německo)

Termostat Memmert GmbH Co. KG (Německo)

Vortex REax Top, Heidolph (Německo)

4.3 Použité mikroorganismy

Při experimentální práci byly použity probiotické bakterie kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4822, *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bifidobacterium breve* CCM 7825^T. Pro antimikrobiální stanovení byly použity mikroorganismy *Escherichia coli* CCM 7395, *Micrococcus luteus* CCM 1569, *Serratia marcescens* CCM8587 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 získané z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.4 Použité extrakty

Pro experimentální práci byly vybrány tři druhy čajů značky Leros, jeřabinový čaj pro kojící matky, malinový dětský čaj a fenyklův dětský čaj (Obrázek 6). Extrakt čaje byl připraven dle návodu uvedeného na obale výrobku a následně probíhala extrakce po dobu 24 hodin při daných podmínkách. Dále byly použity 4 sirupy značky JUPÍ, a to ananasový sirup, citronový sirup, sirup s příchutí lesní směs a bezinkový sirup. Jako osmý vzorek byla zvolena čerstvě vymačkaná šťáva z pomeranče.



Obrázek 6 Použité vzorky čajů při experimentální práci

4.5 Kultivace probiotických kultur v tekutém médiu

Kultivace probiotických kultur *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* i *Bifidobacterium breve* byla provedena za pomoci komerčního MRS média. MRS médium bylo připraveno dle návodu uvedeného výrobcem na obalu. V Erlenmayerově baňce bylo rozmícháno 55,15 g média v 1000 ml destilované vody. Následně bylo smíchané médium sterilováno po dobu 60 minut v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem při teplotě 100 °C.

Po zchladnutí bylo medium zaočkováno 10% inokulem probiotického kmene do sterilních plastových zkumavek v laminárním boxu Aura. Samotná kultivace probíhala v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

4.6 Přímá interakce probiotických kultur s jednotlivými extrakty

Při přímé interakci probiotik s extrakty byla použita mikrotitrační 96jamková destička. Do níž bylo postupně pipetováno 230 µl sterilního tekutého MRS media, připraveného stejně jako v kapitole 4.5. Dále bylo do každé jamky napipetováno 75 µl bakteriální kultury a 25 µl daného extraktu. Blanky byly připraveny stejným postupem, pouze místo 25 µl bylo pipetováno 25 µl sterilní destilované vody.

Růst bakteriálních kultur byl analyzován v čase 0 hodin, hned po napipetování destičky. Po měření byla destička vložena do termostatu při teplotě 37 °C na dobu 24 hodin a v čase 24 hodin byl změřen nárůst nebo úbytek bakteriální kultury pomocí optické hustoty. Měření probíhalo pomocí přístroje ELISA Reader při vlnové délce 630 nm.

4.7 Charakterizace použitých extraktů

4.7.1 Stanovení obsahu fenolických sloučenin

Do zkumavky bylo vždy napipetováno 50 µl vzorku, k němu bylo přidán 1 ml destilované vody a 1 ml směsi Folin-Ciocalteuova činidla s destilovanou vodou v poměru 1:9. Po 5 minutách inkubace při laboratorní teplotě byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Vzniklé roztoky byly promíchány pomocí přístroje Vortex a po 15 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla změřena absorbance pomocí přístroje Helios γ při vlnové délce 750 nm oproti blanku. Blank byl připraven stejným způsobem, pouze místo 50 µl vzorku bylo napipetováno 50 µl destilované vody. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních, ze kterých byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.

Kalibrační křivka byla sestrojena stejným postupem. Jako standard byla použita kyselina gallová, kdy byla připravena kalibrační řada roztoků v rozmezí koncentrací od 0,1 do 0,7 mg/ml. Z rovnice kalibrační křivky $A_{750} = 1,566 4 \cdot c$ se spolehlivostí $R^2 = 0,998 9$ byl následně vypočten obsah fenolických sloučenin ve vzorku.

4.7.2 Stanovení obsahu celkových flavonoidů

Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml vzorku, který byl předem zředěn dle potřeby. Bylo přidáno 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného. Zkumavky byly promíchány pomocí přístroje Vortex a ponechány 5 minut v klidu při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého. Vzniklé roztoky byly opět promíchány pomocí přístroje Vortex a po uplynutí 5 minut bylo přidáno 1,5 ml 1M roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Vzorky byly opět promíchány a po dobu 15 minut ponechány stát při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla u každého vzorku ve třech paralelních měřeních změřena absorbance pomocí přístroje Helios γ při vlnové délce 510 nm. Z naměřených hodnot absorbance vzorků byl spočten průměr a směrodatná odchylka.

Kalibrační křivka byla připravena stejným postupem, místo 0,5 ml vzorku byl použit roztok katechinu. Byla připravena kalibrační řada v rozmezí koncentrací 0,05–0,3 mg/ml. Ze získané rovnice kalibrační křivky $A_{510} = 3,855 2 \cdot c$ s korelačním faktorem $R^2 = 0,999 3$ byl následně stanoven obsah celkových flavonoidů ve vzorku.

4.7.3 Stanovení antioxidační aktivity

Roztok ABTS o koncentraci 7 mmol/l byl připraven rozpuštěním ve vodě a následně byl do něj přidán peroxodisíran draselný do dosáhnutí koncentrace 2,45 mmol/l. Připravený roztok byl ponechán po dobu 12 hodin ve tmě. Před měřením byl roztok zředěn 96% ethanolom na výslednou absorbanci $A = 0,700 \pm 0,02$. Absorbance je měřena proti ethanolu při vlnové délce 734 nm.

Do eppendorfky bylo napipetováno 10 μ l vzorku a následně byl přidán 1 ml roztoku ABTS⁺⁺. Eppendorfka byla vložena do tmy, po uplynutí 10 minut byla změřena absorbance. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních. Referenční vzorek připravený z 10 μ l destilované vody a 1 ml roztoku ABTS⁺⁺ byl použit jako A_0 .

Kalibrační křivka byla sestrojena stejným postupem, kde místo 10 µl vzorku byla pipetována kalibrační řada Troloxu v rozmezí koncentrací 50–400 mg/ml. U kalibrační řady byla následně změřena absorbance při vlnové délce 734 nm. Kalibrační přímka byla zhotovena z rozdílu hodnot počáteční absorbance A_0 a z absorbancí kalibrační řady naměřených po 10 minutách ve tmě. Antioxidační aktivita jednotlivých vzorků byla stanovena z rovnice kalibrační přímky $A_{734} = 0,0011 \cdot c$ s faktorem spolehlivosti $R^2 = 0,9994$.

4.8 Stanovení vitamínu C titrační metodou (pomocí 2,6-dichlorfenolindofenolu)

4.8.1 Příprava odměrného roztoku

Odměrný roztok 2,6-dichlorfenolindofenolu o koncentraci $0,0005 \text{ mol/dm}^3$ byl připraven navážením 0,0339 g dané látky, která byla následně kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 250 ml a doplněna po rysku destilovanou vodou.

4.8.2 Standardizace odměrného roztoku

V malém objemu 2% kyseliny chlorovodíkové byla rozpuštěna navážka kyseliny L-askorbové o hmotnosti 10 mg a následně byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 10 ml, která byla doplněna po rysku 2% kyselinou chlorovodíkovou.

Do třech titračních baněk bylo napipetováno 10 ml 2% kyseliny chlorovodíkové a 1 ml standardu. Vzniklé roztoky byly titrovány odměrným roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolu o koncentraci $0,0005 \text{ mol/dm}^3$ do světla růžového zbarvení trvajících minimálně 15 sekund.

4.8.3 Vlastní stanovení ve vzorcích

Při vlastním stanovení byly pipetovány 4 ml vzorku do malého objemu 2% kyseliny chlorovodíkové v odměrné baňky o objemu 100 ml, baňka byla následně doplněna po rysku 2% kyselinou chlorovodíkovou a promíchána. Poté bylo vždy do třech titračních baněk napipetováno 25 ml vzniklého roztoku. Takto připravené roztoky byly titrovány odměrným roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolu o koncentraci $0,0005 \text{ mol/dm}^3$ do světla růžového zbarvení trvajících minimálně 15 sekund.

4.9 Antimikrobiální test

Při antimikrobiálním stanovení byly jako modelové mikroorganismy použity dvě gramnegativní bakterie, a to *Serratia marcescens* a *Escherichia coli*, a dvě grampozitivní bakterie, a sice *Staphylococcus epidermidis* a *Micrococcus luteus*.

4.9.1 Příprava medií a kultivace mikroorganismů pro antimikrobiální test

Pro kultivaci vybraných modelových mikroorganismů byly připraveny dvě různá média. Pro mikroorganismy *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* a *Micrococcus luteus* bylo připraveno médium Nutrient Broth, které bylo rozmícháno v destilované vodě tak, aby mělo koncentraci 25 g/l pro potřebný objem.

Pro kultivaci bakterie *Staphylococcus epidermidis* bylo připraveno médium BHI Broth navážením daného množství tak, aby koncentrace byla 37 g/l pro potřebný objem.

Média byla následně sterilována po dobu 60 minut při 100 °C v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem. Po zchladnutí bylo 50 ml média přelito do menších Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml. Poté byla média zaočkována 10% inokulem. Zaočkované baňky byly vloženy na temperovanou třepačku při 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí 24 hodin bylo ze zaočkovaných baněk odpipetováno potřebné množství do sterilního média tak, aby odpovídala požadované koncentraci buněk pro antimikrobiální stanovení.

4.9.2 Antimikrobiální test

Do 96jamkové destičky bylo pipetováno 150 µl bakteriální kultury, ke které bylo přidáno 50 µl čaje (antimikrobiální látky) v různé koncentraci. Byly zhotoveny blanky, kde místo čaje bylo pipetováno 50 µl sterilní destilované vody.

Růst bakterií v podobě změny zákalu byl měřen v čase 0 hodin a poté v čase 24 hodin. Měření probíhalo pomocí přístroje ELISA Reader při vlnové délce 630 nm.

4.10 Modelové trávení směsi obsahující probiotikum a extrakt

Modelové trávení probíhalo za použití žaludeční šťávy a směsi pankreatické a žlučové šťávy. Byla sledována stabilita probiotických kultur ve směsi s extraktem při nasimulovaném průchodu trávicím traktem, kde docházelo k působení předem připravených modelových trávicích šťáv.

Nejprve bylo 0,5 ml probiotické kultury smíseno s 4,5 ml extraktu, tato směs byla ponechána po dobu 15 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Následně byla vzniklá směs vystavena působení žaludeční šťávy v poměru 1:1. Po uplynutí 30 minut, kdy byly vzorky inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C byl odebrán 1 ml z jednotlivých vzorků do Eppendorf zkumavek k dalším analýzám. Ke zbytku byly přidány pankreatická a žaludeční šťáva opět v poměru 1:1. Takto vzniklé směsi byly vloženy na temperovanou třepačku při teplotě 37 °C a byly ponechány inkubovat po dobu 90 minut. Po uplynutí této doby byl opět odebrán 1 ml jednotlivých vzorků k následujícím analýzám do Eppendorf zkumavek.

Po úplném skončení simulovaného trávení bylo 30 µl daného vzorku (odebraného v průběhu nebo na konci trávení) napipetováno do mikrotitrační destičky k 300 µl MRS media a vzorky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C v termostatu. Pomocí přístroje ELISA Reader byl při vlnové délce 630 nm analyzován zákal v čase 0 hodin a znovu přeměřen v čase 24 hodin, zda došlo k nárůstu nebo úbytku bakteriální kultury.

4.10.1 Příprava modelové žaludeční šťávy

Žaludeční šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pepsinu ve 100 ml destilované vody a přidáním 840 µl 35% kyseliny chlorovodíkové. Celkové pH žaludeční šťávy odpovídalo hodnotě pH 0,9 [35].

4.10.2 Příprava modelové pankreatické šťávy

Pankreatická šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pankreatinu a 1,5 g hydrogenuhličitanu sodného ve 100 ml destilované vody. Celkové pH pankreatické šťávy odpovídalo požadované hodnotě pH 8,9–9 [35].

4.10.3 Příprava modelové žlučové šťávy

Žlučová šťáva byla připravena rozpuštěním 0,8 g ve 200 ml fosfátového pufru. Konečné pH žlučové šťávy odpovídalo hodnotě pH 8 [35].

4.11 Stanovení viability pomocí průtokového cytometru

Buňky probiotických bakterií byly centrifugovány při 5 000 ot./min. po dobu 10 minut, následně byl odpipetován supernatant a buňky byly promyty destilovanou vodou a opět zcentrifugovány za stejných podmínek. Poté byl supernatant odpipetován a buňky byly rozsuspendovány v destilované vodě a dle potřeby řádně naředěny. Dále byly přidány 2 µl propidiumjodidu o koncentraci 5 mg/ml a vzorky s probiotickými bakteriemi byly ponechány po dobu 5 minut ve tmě. Nakonec proběhlo vlastní měření pomocí průtokového cytometru a odečtení výsledků.

4.12 Enkapsulace

4.13 Příprava alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými bakteriemi

Probiotická kultura *Lactobacillus acidophilus* byla vybrána k enkapsulaci do alginátových částic spolu s extraktem čaje a sirupem. Probiotické bakterie byly začkovány do předem připraveného sterilního MRS média a po dobu 24 hodin byly kultivovány při teplotě 37 °C v termostatu.

Po uplynutí této doby byly probiotické buňky zcentrifugovány při 5 000 otáčkách po dobu 10 minut. Následně byl odlit supernatant a buňky byly rozsuspendovány a promyty destilovanou vodou. Buňky byly znovu zcentrifugovány po dobu 10 minut při 5 000 otáčkách a poté opět rozsuspendovány v 10 ml destilované vody.

K 15 ml 2% roztoku alginátu sodného bylo přidáno 5 ml bakteriální kultury, 20 ml vybraného čaje a 10 ml vybraného sirupu. Pro výrobu částic byl použit enkapsulátor Buchi B-395 Pro. Velikost trysky byla zvolena 1 000 μm . Jako vytvrzovací roztok byl použit 1% roztok chloridu vápenatého, ve kterém byly částice ponechány po dobu 15 minut do vytvrdnutí.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato bakalářská práce je zaměřena na přípravu doplňku stravy s obsahem probiotické kultury a ovocné složky. Cílem této práce bylo zjistit, zda některý z vybraných extraktů bude stimulovat růst probiotické kultury a zároveň bude vykazovat vysoký obsah bioaktivních látek. Dalším cílem bylo zajistit navrhnout optimální složení doplňku a zabezpečit viabilitu probiotických buněk po průchodu simulovaným trávicím procesem pomocí jedné z enkapsulačních metod.

5.1 Charakterizace použitých čajů

5.1.1 Stanovení fenolických sloučenin v použitých čajích

Metoda využívající Folin-Ciocalteuovo činidlo je jedna z nejjednodušších a nejpoužívanějších metod pro stanovení fenolických sloučenin v ovoci a zelenině. Princip této metody spočívá v redukci Folin-Ciocalteuova činidla přítomnými fenolickými látky, což vede ke vzniku molybdeno-wolframové modři, kterou lze spektrofotometricky změřit [36].

Naměřené hodnoty absorbcí jednotlivých vzorků byly zprůměrovány a následně přepočteny na obsah fenolických sloučenin v 1 g čaje. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5 Obsah fenolických sloučenin v jednotlivých vzorcích použitých čajů

Vzorek	Obsah fenolických sloučenin (mg/g)
Malinový čaj	294,07 ± 4,00
Jeřabinový čaj	300,72 ± 4,62
Fenyklový čaj	317,43 ± 0,50
Výluh - malinový čaj	62,37 ± 0,51
Výluh - jeřabinový čaj	59,17 ± 0,61
Výluh - fenyklový čaj	39,82 ± 0,09

Z grafického znázornění obsahu fenolických sloučenin, viz Obrázek 7, je patrné, že vysoký obsah fenolických látek vykazovaly všechny vzorky čajů. U výluhů čajů byl obsah fenolických sloučenin až 6krát menší. Na vysoký obsah fenolických látek v čajích mohla mít vliv také horká voda, kterou byly čaje při přípravě zality.

5.1.2 Stanovení celkových flavonoidů v použitých čajích

Obsah flavonoidů ve vzorcích čajů byl stanoven dle postupu uvedeném v kapitole 4.7.2. Princip metody je založen na vzniku komplexů chloridu hlinitého s keto nebo hydroxyskupinou flavonoidů nebo flavonů. Vznik komplexů je doprovázen vznikem oranžového až hnědého zbarvení, které lze analyzovat spektrofotometricky [37].

V Tabulce 6 je uveden obsah celkových flavonoidů přepočítaný na 1 g daného čaje. Z výsledků je zřejmé, že nejvíce flavonoidů je obsaženo v jeřabinovém čaji (23,13 mg/g) a v jeho výluhu (21,91 mg/g), viz Obrázek 7. Poměrně vysoký obsah vykazoval i vzorek malinového čaje (15,83 mg/g) a jeho výluh (12,24 mg/g). U vzorku fenyklové čaje (7,40 mg/g) i výluhu fenyklového čaje (2,92 mg/g) bylo zaznamenáno nejmenší množství v porovnání s malinovým i jeřabinovým čajem. Je důležité brát v potaz, že malinový i jeřabinový čaj byly syté červené a oranžové barvy, na rozdíl od čaje fenyklového, který měl barvu lehce nažloutlou. Flavonoidy jsou obecně látky žluté barvy. Malinový a jeřabinový čaj tak mohly svoji sytou barvou zvyšovat hodnotu absorbance, a tedy i výsledný obsah flavonoidů ve vzorku, s tím může souviset výrazně nízký obsah flavonoidů ve fenyklovém čaji.

Tabulka 6 Obsah celkových flavonoidů v jednotlivých vzorcích použitých čajů

Vzorek	Obsah celkových flavonoidů (mg/g)
Malinový čaj	15,83 ± 0,63
Jeřabinový čaj	23,13 ± 1,46
Fenyklový čaj	7,40 ± 0,68
Výluh - malinový čaj	12,24 ± 0,17
Výluh - jeřabinový čaj	21,91 ± 0,61
Výluh - fenyklový čaj	2,92 ± 0,36

5.1.3 Stanovení antioxidační aktivity v použitých čajích

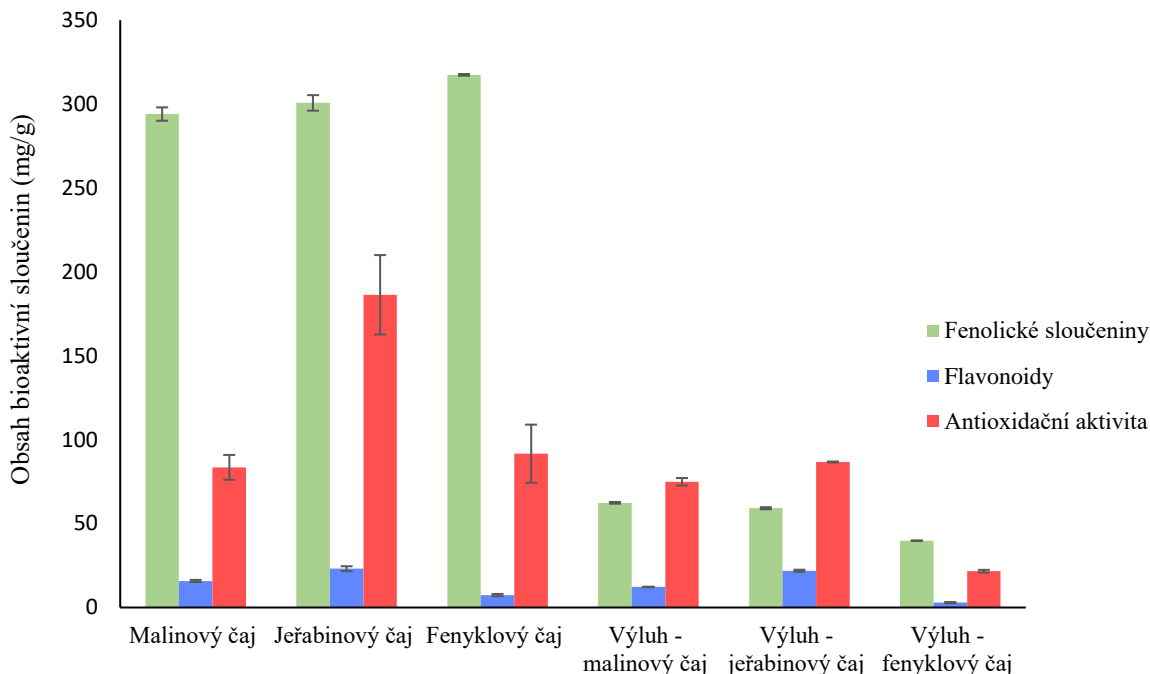
Metoda používající ABTS neboli metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) je jednou z nezákladnějších a nejpoužívanějších pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Zkouší se schopnost vzorku zhaset kation-radikál ABTS^{•+}. Antiradikálová aktivita je srovnávána s antiradikálovou aktivitou látky Troloxu, která je používána pro zhotovení kalibrační křivky. Antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, zhasíjí radikál ABTS^{•+}, což lze sledovat fotometricky na základě změn absorpčního spektra ABTS^{•+}. Radikálem může být například hydroxyl, peroxy nebo superoxidový anion-radikál [38].

Výsledné hodnoty naměřených absorbancí jednotlivých extraktů čajů byly přepočteny na hmotnost ekvivalentního množství Troloxu v 1 g daného druhu čaje, viz Tabulka 7.

Tabulka 7 Antioxidační aktivita jednotlivých vzorků použitých čajů

Vzorek	Antioxidační aktivita (mg/g)
Malinový čaj	83,52 ± 7,42
Jeřabinový čaj	186,36 ± 23,66
Fenyklový čaj	91,67 ± 17,32
Výluh - malinový čaj	74,93 ± 8,23
Výluh - jeřabinový čaj	86,73 ± 0,28
Výluh - fenyklový čaj	21,64 ± 0,32

Z grafického znázornění na Obrázku 7 lze vidět, že největší antioxidační aktivitu vykazuje vzorek jeřabinového čaje (186,36 mg/g), stejně tomu tak je porovnáme-li pouze výluhy. Výsledná antioxidační aktivita je ve většině případech podobná obsahu fenolických sloučenin i flavonoidů v jednotlivých vzorcích.



Obrázek 7 Souhrnné grafické znázornění obsahu bioaktivních látek v jednotlivých použitých čajích

5.1.4 Stanovení vitamínu C v použitých čajích

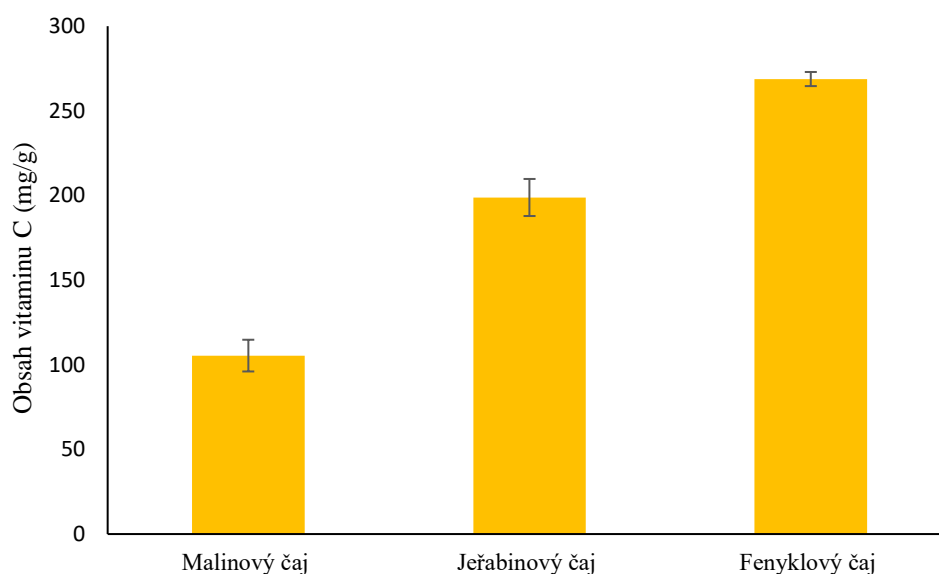
Vitamin C je jedním z přírodních antioxidantů, který je obsažen především v ovoci a zelenině. Díky jeho antioxidačním vlastnostem je často přidáván do ovocných šťáv za účelem inhibice enzymatického hnědnutí a předcházení oxidativním změnám. Titrační metoda stanovení vitamínu C 2,6-dichlorfonolindofenolem je běžně používanou metodou. Spolu s chromatografickou metodou patří mezi normalizované metody. Tato metoda je používána při stanovení kyseliny askorbové v potravinách a zemědělských a potravinářských surovinách. Metoda využívající 2,6-dichlorfenolindofenol je založena na redoxní reakci, dochází k oxidaci kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou a k barevné změně z modrozeleného zbarvení do světle růžového zbarvení [39]. Vitamin C byl též stanoven dle postupu uvedeného v kapitole 4.8, přičemž na základě předešlých naměřených hodnoty byly proměřeny extrakty připravené dle postupu uvedeném na obalu výrobcem.

Doporučená denní dávka pro zdravého dospělého jedince je 80 mg dle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 450/2004 Sb., o označování výživové hodnoty potravin [39]. Vypočtené množství vitamínu C v daném vzorku čaje je uvedeno v následující Tabulce 8.

Tabulka 8 Obsah vitamínu C v jednotlivých vzorcích čajů

Vzorek	Obsah vitamínu C (mg/g)
malinový čaj	105,41 ± 9,37
jeřabinový čaj	198,81 ± 10,94
fenyklový čaj	268,77 ± 4,17

Nejvíce vitamínu C bylo staveno ve vzorku fenyklového čaje (268,77 mg/g), viz Obrázek 8. V případě jeřabinového čaje (198,81 mg/g) byl obsah vitamínu C nižší, stejně tak i v malinovém čaji, kde bylo zjištěno 105,41 mg/g. Vzhledem k doporučené denní dávce lze říct, že obsah vitamínu C byl ve všem vzorcích převyšující tuto hodnotu.



Obrázek 8 Grafické znázornění obsahu vitamínu C v jednotlivých vzorcích čajů

5.2 Charakterizace použitých sirupů

5.2.1 Stanovení fenolických sloučenin v použitých sirupech

Stanovení obsahu fenolických sloučenin v jednotlivých vzorcích sirupů bylo provedeno stejným postupem jako v případě čajů. Obsah látek je uveden v mg na jeden ml daného sirupu. Výsledky jsou shrnuty v následující Tabulce 9.

Tabulka 9 Obsah fenolických sloučenin v jednotlivých vzorcích použitých sirupů

Vzorek	Obsah fenolických sloučenin (mg/ml)
Pomeranč	1,15 ± 0,03
Ananas	0,54 ± 0,01
Lesní směs	0,72 ± 0,02
Citron	0,55 ± 0,00
Bezinka	0,49 ± 0,01

Z Tabulky 9 i z Obrázku 9 je patrné, že nejvíce jich obsahoval vzorek čerstvé pomerančové šťávy (1,15 mg/ml) a sirup s příchutí lesní směs (0,72 mg/ml). Příchutě citron (0,55 mg/ml), ananas (0,54 mg/ml) a bezinka (0,49 mg/ml) vykazovaly podobné zastoupení fenolických látek. V ovocných sirupech Jupí je výrobcem udáváno 20 % ovocné šťávy. Lze tedy očekávat, že při použití čerstvých šťáv ovoce by obsah fenolických sloučenin mohl být až 5krát vyšší nebo podobný jako v případě pomerančové šťávy.

5.2.2 Stanovení celkových flavonoidů v použitých sirupech

Metoda stanovení obsahu flavonoidů v použitých vzorcích sirupů byla stejná jako v případě čajů. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v následující Tabulce 10 v mg na jeden ml sirupu.

Tabulka 10 Obsah celkových flavonoidů v jednotlivých vzorcích použitých sirupů

Vzorek	Obsah celkových flavonoidů (mg/ml)
Pomeranč	0,13 ± 0,01
Ananas	0,03 ± 0,00
Lesní směs	0,01 ± 0,00
Citron	0,03 ± 0,00
Bezinka	0,01 ± 0,00

Z naměřených hodnot i z Obrázku 9 je znát, že nejvíce flavonoidů bylo obsaženo ve vzorku čerstvé pomerančové šťávy (0,13 mg/ml), stejně jako obsah fenolických sloučenin. Naopak u vzorku sirupu s příchutí lesní směs (0,01 mg/ml) by se dalo očekávat, že zastoupení flavonoidů bude podobné jako zastoupení fenolických sloučenin, ale u tohoto vzorku bylo zjištěno nejmenší množství.

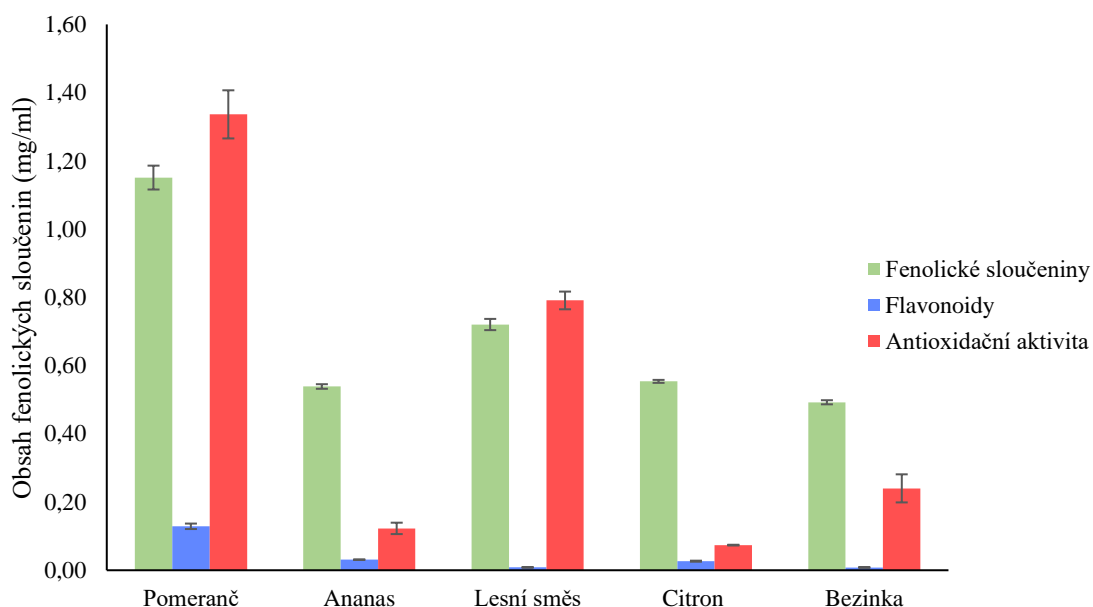
5.2.3 Stanovení antioxidační aktivity v použitých sirupech

Pro stanovení antiradikálové aktivity jednotlivých sirupů byla použita stejná metoda jako v případě stanovení čajů. V Tabulce 11 jsou shrnuty výsledky měření. Antioxidační aktivita je uvedena v mg na jeden ml sirupu.

Tabulka 11 Antioxidační aktivita jednotlivých použitých sirupů

Vzorek	Antioxidační aktivita (mg/ml)
Pomeranč	1,34 ± 0,15
Ananas	0,12 ± 0,02
Lesní směs	0,79 ± 0,03
Citron	0,07 ± 0,00
Bezinka	0,24 ± 0,04

Ovocné šťávy mají obecně vysokou antioxidační aktivitu, což se potvrdilo i v tomto případě, kdy největší antioxidační aktivitu vykazoval vzorek čerstvé pomerančové šťávy (1,34 mg/ml). Vysoká antioxidační aktivita byla také zaznamenána v případě sirupu s příchutí lesní směs (0,79 mg/ml). Ve vzorku citronového sirupu byla naopak detekována nejmenší antioxidační aktivita.



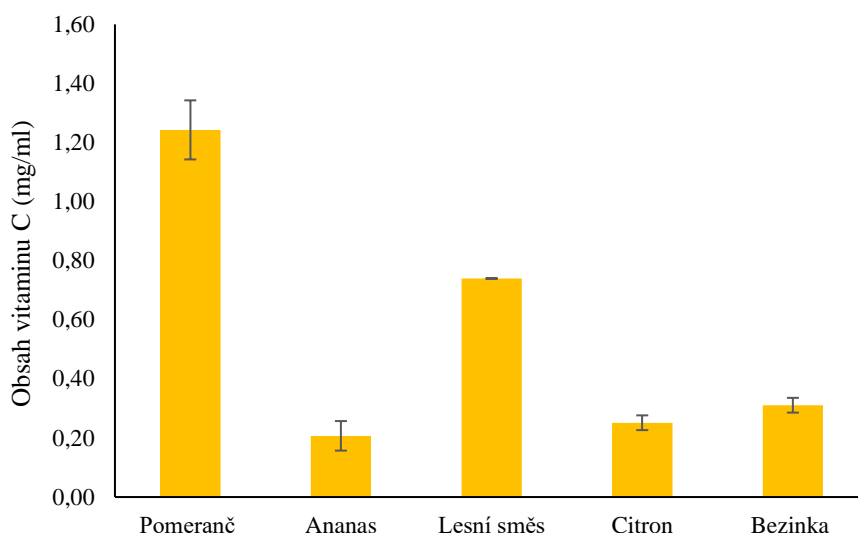
Obrázek 9 Souhrnné grafické znázornění obsahu bioaktivních látek v jednotlivých vzorcích sirupů

5.2.4 Stanovení vitamínu C v použitých sirupech

Stanovení vitamínu C ve vzorcích sirupu bylo provedeno stejným způsobem jako v případě čajů. Výsledné hodnoty jsou shrnuty v následující Tabulce 12, kde je obsah vitamínu C vyjádřen v mg na ml sirupu.

Tabulka 12 Obsah vitamínu C v jednotlivých vzorcích sirupů

Vzorek	Obsah vitamínu C (mg/ml)
Pomeranč	1,24 ± 0,10
Ananas	0,21 ± 0,05
Lesní směs	0,74 ± 0,00
Citron	0,25 ± 0,03
Bezinka	0,31 ± 0,03

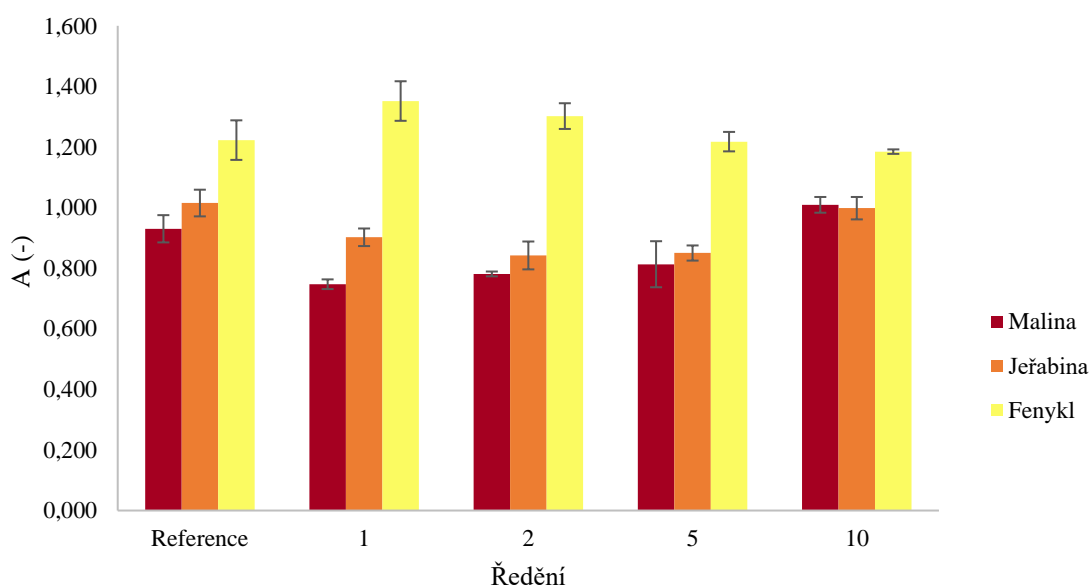


Obrázek 10 Grafické znázornění obsahu vitamínu C v jednotlivých vzorcích sirupů

Z Tabulky 12 i grafického znázornění obsahu vitamínu C v jednotlivých vzorcích sirupu můžeme vidět, že největší zastoupené bylo analyzováno ve vzorku čerstvé pomerančové šťávy (1,24 mg/ml) a sirupu s příchutí lesní směs (0,74 mg/ml). Nejmenší obsah vykazoval vzorek ananasového sirupu (0,21 mg/ml).

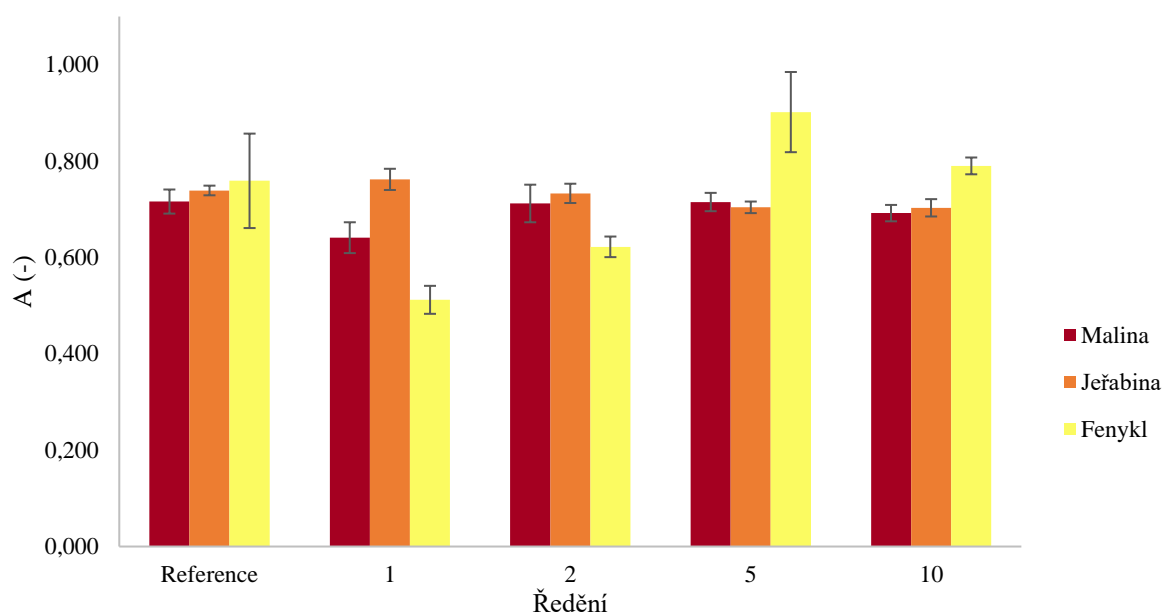
5.3 Antimikrobiální test

Pro lepší charakterizaci vlastností čajů byl zvolen test antimikrobiální aktivity. Zvolená metoda stanovení je založena na spektrofotometrickém měření změny zákalu pomocí přístroje ELISA Reader (viz postup v kapitole 4.9). V tomto stanovení považujeme nárůst kultury za nežádoucí.



Obrázek 11 Grafické znázornění vlivu jednotlivých vzorků čajů na *Escherichia coli*

Z Obrázku 11 je v případě malinového a jeřabinového čaje patrná inhibice bakteriální kultury. V obou případech klesá antimikrobiální účinnost s klesající koncentrací čaje ve vzorku. Lze tvrdit, že malinový i jeřabinový čaj mají antimikrobiální účinek a nepodporují růst *Escherichia coli* ve vzorcích. Fenykový čaj v tomto případě svoji antimikrobiální účinnost vůči použité bakteriální kultuře neprokázal, v jeho případě vidíme, že čím větší koncentrace čaje ve vzorku je, tím větší nárůst bakteriální kultury byl zaznamenán. V následující Tabulce 13 jsou uvedeny procentuální hodnoty, kde pozorujeme stejný trend, kladná procenta představují úbytek bakteriální kultury, záporná procenta, představují nárůst kultury, což je v tomto případě nežádoucí.

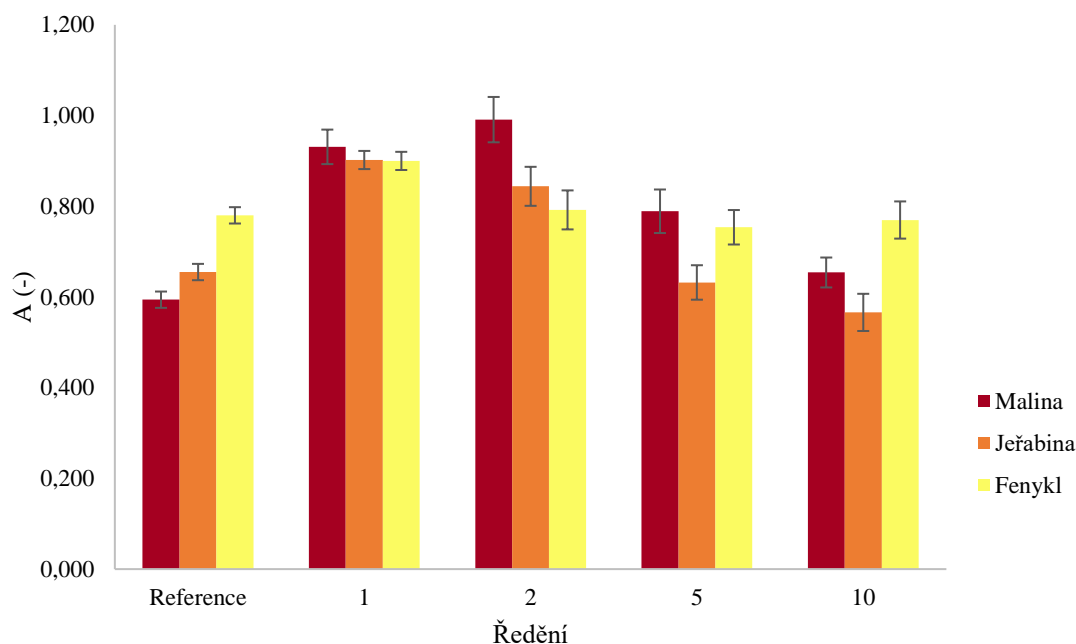


Obrázek 12 Grafické znázornění vlivu jednotlivých vzorků čajů na *Serratia marcescens*

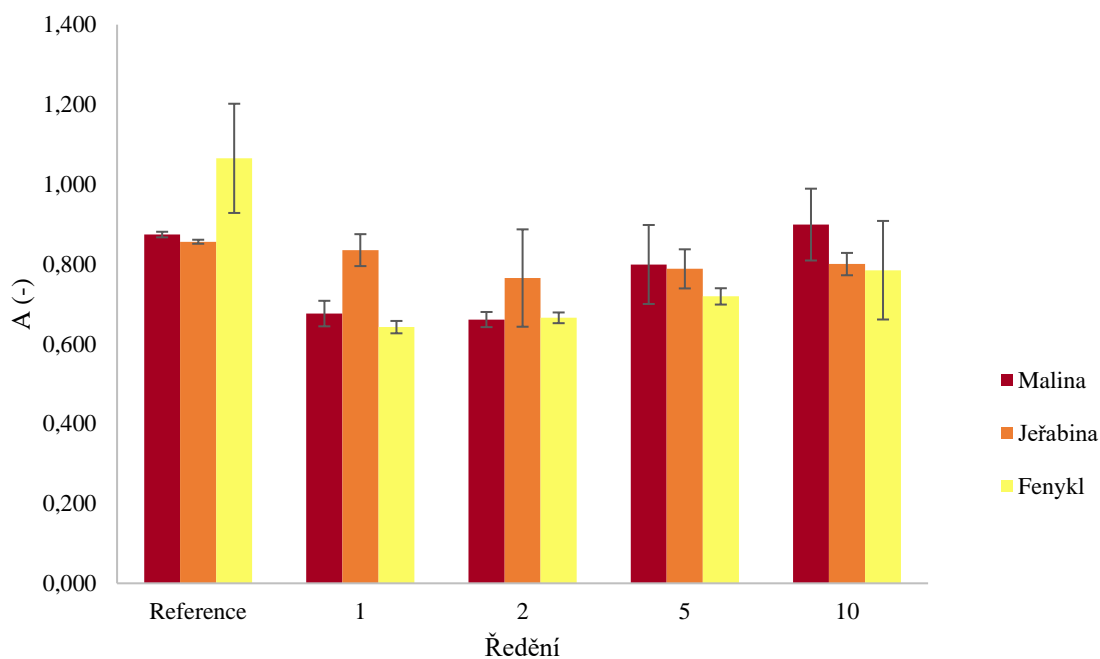
Tabulka 13 Antimikrobiální účinnost jednotlivých vzorků čajů při použití modelových mikroorganismů *E. Coli* a *S. Marcescens*

Bakteriální kultura	Ředění vzorku	C _{vzorku} [mg/ml]	MALINA		JEŘABINA		FENYKL	
			Rozdíl OD (-)	Rozdíl OD (%)	Rozdíl OD (-)	Rozdíl OD (%)	Rozdíl OD (-)	Rozdíl OD (%)
<i>E. Coli</i>	1	8	0,183 ± 0,023	19,7	0,133 ± 0,015	11,1	0,129 ± 0,001	-10,55
	2	4	0,149 ± 0,029	16,0	0,173 ± 0,002	17,0	0,079 ± 0,023	-6,49
	5	1,6	0,117 ± 0,031	12,6	0,165 ± 0,019	16,3	0,005 ± 0,033	0,41
	10	0,8	0,079 ± 0,019	-8,5	0,017 ± 0,007	1,7	0,038 ± 0,058	3,11
<i>S. Marcescens</i>	1	8	0,075 ± 0,007	10,5	0,023 ± 0,012	-3,1	0,247 ± 0,127	32,54
	2	4	0,004 ± 0,014	0,6	0,006 ± 0,010	0,8	0,137 ± 0,135	18,05
	5	1,6	0,001 ± 0,006	0,1	0,035 ± 0,002	4,7	0,143 ± 0,007	-18,80
	10	0,8	0,024 ± 0,008	3,4	0,036 ± 0,008	4,9	0,031 ± 0,139	-4,08

V případě *Serratia marcescens* vyplývá z Obrázku 12 i z Tabulky 13, že největší antimikrobiální účinek vykazuje nejkoncentrovanější vzorek fenyklového čaje, s klesající koncentrací klesá také antimikrobiální účinek a dochází k nárustu bakteriální kultury. I u malinového čaje lze pozorovat antimikrobiální účinek, který má stejný trend a s klesající koncentrací klesá antimikrobiální účinnost. V případě jeřabinového čaje je největší antimikrobiální aktivita analyzována u nejzředěnějšího vzorku, naopak nejkoncentrovanější vzorek stimuloval růst bakteriální kultury.



Obrázek 13 Grafické znázornění vlivu jednotlivých vzorků čajů na *Staphylococcus epidermidis*



Obrázek 14 Grafické znázornění vlivu jednotlivých vzorků čajů na *Micrococcus luteus*

Antimikrobiální aktivita v případě *Staphylococcus epidermidis*, viz Obrázek 13, nebyla ve většině vzorcích prokázána, pouze malá inhibice bakteriální kultury byla zaznamenána u nejzředěnějších vzorů jeřabinového a fenyklového čaje.

V případě *Micrococcus luteus* je již z grafického znázornění, viz Obrázek 14, znatelná inhibice růstu bakteriální kultury ve všech použitých vzorcích čajů.

Tabulka 14 Antimikrobiální účinnost jednotlivých vzorků čajů při použití modelových mikroorganismů *S. Epidermidis* a *M. Luteus*

Bakteriální kultura	Ředění vzorku	Cvzorku [mg/ml]	MALINA		JEŘABINA		FENYKL	
			Rozdíl OD (-)	Rozdíl OD (%)	Rozdíl OD (-)	Rozdíl OD (%)	Rozdíl OD (-)	Rozdíl OD (%)
<i>S. Epidermidis</i>	1	8	0,337 ± 0,020	-56,7	0,247 ± 0,002	-37,7	0,120 ± 0,063	-15,38
	2	4	0,397 ± 0,032	-66,8	0,189 ± 0,025	-28,9	0,012 ± 0,014	-1,54
	5	1,6	0,195 ± 0,030	-32,8	0,023 ± 0,020	3,5	0,026 ± 0,041	3,38
	10	0,8	0,060 ± 0,015	-10,1	0,089 ± 0,023	13,6	0,010 ± 0,008	1,32
<i>M. Luteus</i>	1	8	0,198 ± 0,025	22,7	0,021 ± 0,035	2,5	0,423 ± 0,121	39,72
	2	4	0,213 ± 0,012	24,4	0,091 ± 0,177	10,6	0,400 ± 0,123	37,53
	5	1,6	0,075 ± 0,092	8,6	0,068 ± 0,044	7,9	0,346 ± 0,116	32,49
	10	0,8	0,025 ± 0,083	-2,9	0,056 ± 0,023	6,5	0,280 ± 0,013	26,32

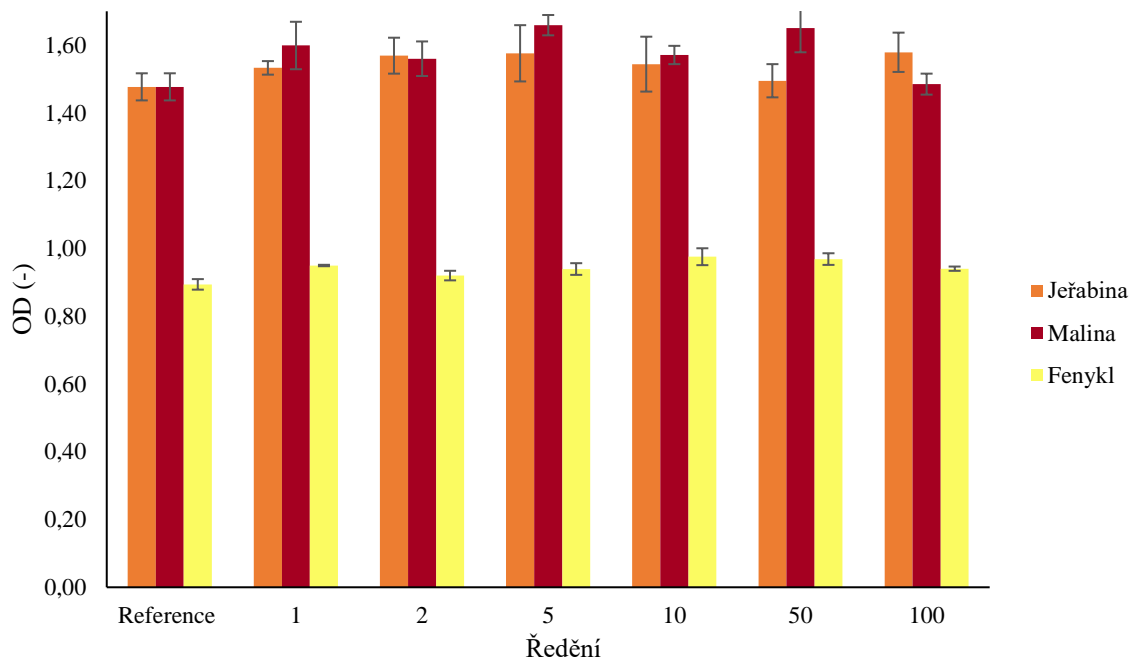
Vliv malinového i jeřabinového čaje na gramnegativní bakterie byl pozitivní. Ve většině případech došlo k inhibici růstu bakteriální kultury. Podobná inhibice nastala i v případě bakterie *Micrococcus luteus*, která ovšem patří do skupiny grampozitivních bakterií, stejně jako probiotické bakterie a očekávala se spíše stimulace jako v případě *Staphylococcus epidermidis*.

V případě gramnegativních bakterií by se dalo očekávat, že antimikrobiální účinnost čajů bude podpořená i přítomností probiotické kultury *Lactobacillus acidophilus*, která má antagonistické účinky na růst gramnegativních bakterií.

5.4 Přímá interakce extraktů s probiotickými bakteriemi

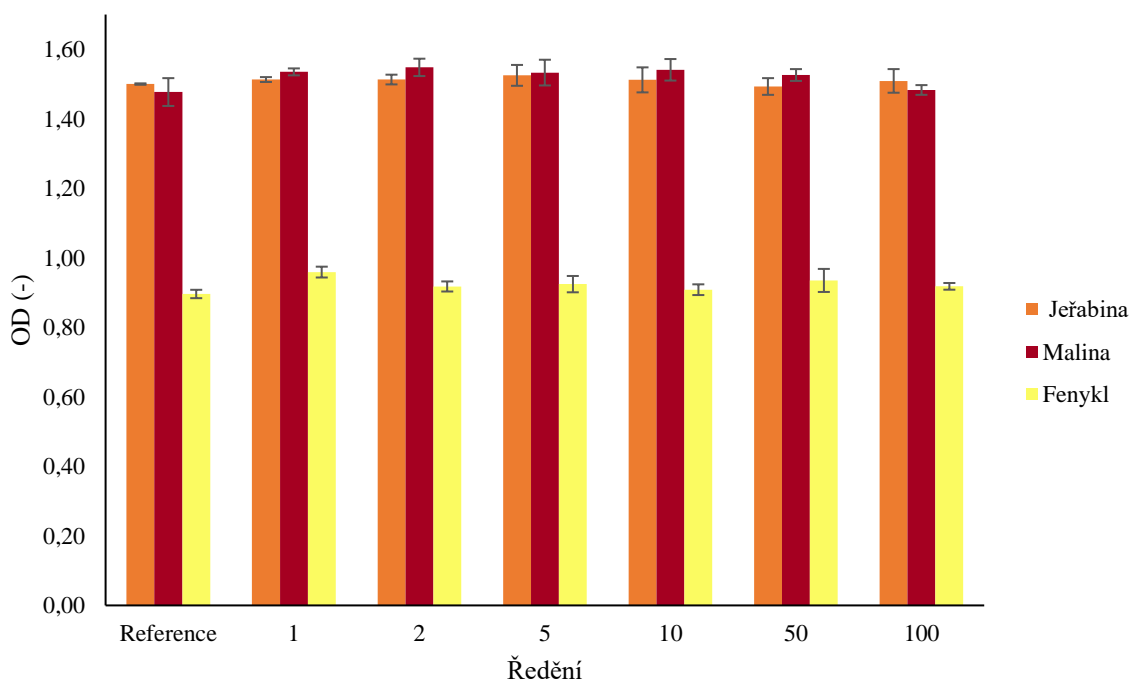
Probiotické bakterie *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* a *Bifidobacterium breve* byly ponechány v optimálním kultivačním prostředí obohaceném o extrakt čaje nebo ovocného sirupu interagovat po dobu 24 hodin. Byl změřen zákal v čase 0 a poté přeměřen v čase 24 hodin, pro zjištění, zda přítomnost vybraných extraktů vedla ke stimulaci nebo inhibici růstu probiotických bakterií.

5.4.1 Extrakty čajů

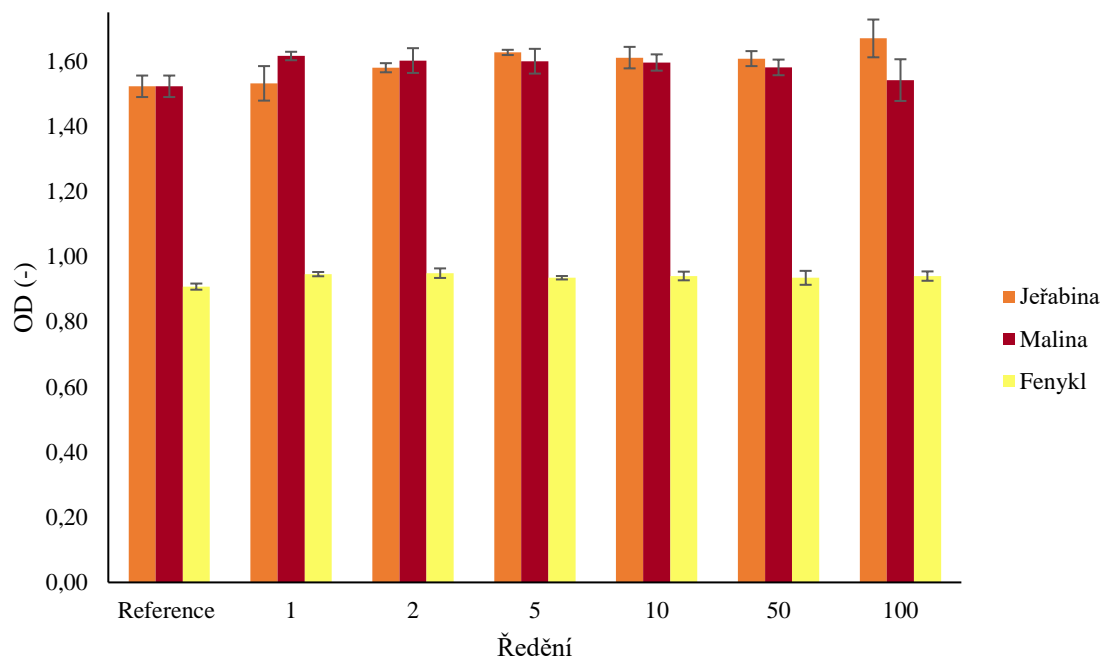


Obrázek 15 Grafické znázornění nárůstu probiotické kultury *L. acidophilus* v použitých vzorcích čajů

Pro porovnání, zda došlo k nárůstu nebo inhibici dané probiotické kultury, je jako první v grafu na Obrázku 15 uveden referenční vzorek. V případě *Lactobacillus acidophilus* je z grafu patrné, že oproti referenčnímu vzorku nedošlo v žádném případě k markantnímu nárůstu kultury. Pouze v případě malinového čaje lze vidět větší nárůst kultury oproti referenci.



Obrázek 16 Grafické znázornění nárůstu probiotické kultury *L. casei* v použitých vzorcích čajů



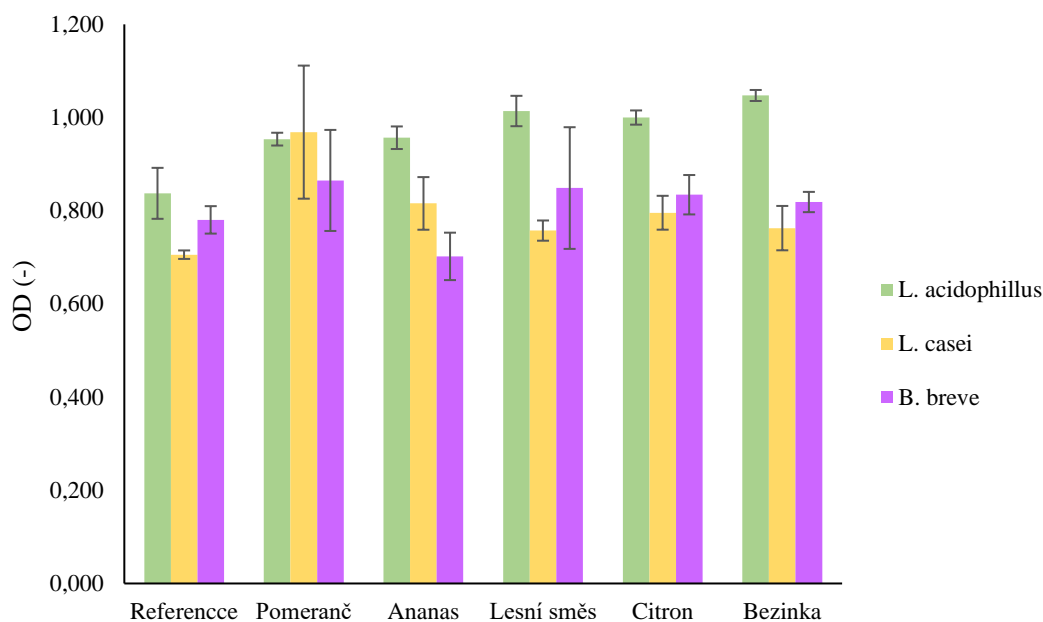
Obrázek 17 Grafické znázornění nárustu probiotické kultury *B. breve* v použitých vzorcích čajů

I v případě *Lactobacillus casei* a *Bifidobacterium breve* nedošlo v žádném vzorku čaje při různém ředění k významnému nárustu probiotické kultury v porovnání s referenčním vzorem. U *Lactobacillus casei* lze pozorovat pouze mírný nárůst kultury u malinového čaje, v případě *Bifidobacterium breve* naopak u čaje jeřabinového.

Obsah bioaktivních látek byl u všech vzorků čajů srovnatelný, a tedy podpora viability probiotických bakterií je ve všech případech na stejné úrovni. Přesto byla potvrzena inhibice fenyklovým čajem.

5.4.2 Extrakty sirupů

Stejně jako u čajů, tak i v případě ovocných sirupů bylo analyzován, který z vybraných vzorků bude mít nejvýraznější vliv na růst a viabilitu probiotických bakterií. Analýza byla provedena stejně jako v případě čajů, postup je uveden v kapitole 4.6.



Obrázek 18 Graf přímé interakce probiotických bakterií v prostředí jednotlivých sirupů v porovnání s referenčním vzorkem

Z Obrázku 18 je patrné, že při přímé interakci probiotik s ovocnými sirupy byl ve většině případech znatelný nárůst probiotické kultury u všech třech kmenů bakterií. Pouze v případě *Bifidobacterium breve* v kombinaci s ananasovým sirupem došlo k inhibici.

U *Lactobacillus acidophilus* lze pozorovat výrazný nárůst ve všech vzorcích oproti referenčnímu vzorku. Největší nárůst je ale zaznamenán v prostředí bezinkového sirupu a sirupu s příchutí lesní směs.

Pomerančová šťáva nejvíce stimulovala růst *Lactobacillus casei* v porovnání s referenčním vzorkem. U sirupu lesní směs došlo k nejmenšímu nárůstu této kultury.

Stimulace růstu při použití ovocných sirupů byla očekává především díky obsahu cukru, který podporuje růst probiotické kultury a v sirupech je obsaženo jeho hojné množství.

5.4.3 Porovnání výsledků zákalu s výsledky průtokového cytometru

Pro zjištění viability probiotických kultur byly vzorky přeměřeny pomocí průtokového cytometru (viz postup uvedený v kapitole 4.11) a porovnány s naměřenými výsledky zákalu (viz postup uvedený v kapitole 4.6), který demonstruje nárůst kultury v přítomnosti vzorku za 24 hodin.

Z Tabulky 15 lze vyčíst, že největší nárůst buněk byl detekován ve vzorku bezinkového sirupu (25,08 %) a sirupu s příchutí lesní směs (21,10 %). I v případě citronového sirupu (19,43 %) byl nárůst zaznamenaný pomocí zákalu velký, naopak zjištěná životaschopnost buněk v citronovém sirupu byla nejmenší. Největší viabilita byla zaznamenána v případě pomerančové šťávy (87,10 %) a ve vzorku sirupu lesní směs (85,66 %)

Tabulka 15 Přímá interakce *L. acidophilus* s jednotlivými sirupy, nárůst kultury a viabilita buněk po 24 hodinách

Bakteriální kultura	<i>Lactobacillus acidophilus</i>				
Vzorek	Rozdíl OD (-)	Rozdíl OD (%)	Buňky	CFU/ml	Procentuálně (%)
Reference	0,837 ± 0,055	-	živé	1,64 · 10 ⁸	95,43
			mrtvé	0,78 · 10 ⁷	4,57
Pomeranč	0,116 ± 0,041	13,89	živé	0,79 · 10 ⁸	87,10
			mrtvé	0,12 · 10 ⁸	12,90
Ananas	0,119 ± 0,030	14,25	živé	1,03 · 10 ⁸	82,70
			mrtvé	0,29 · 10 ⁸	17,30
Lesní směs	0,177 ± 0,022	21,10	živé	1,17 · 10 ⁸	85,66
			mrtvé	0,19 · 10 ⁸	14,34
Citron	0,163 ± 0,039	19,43	živé	0,69 · 10 ⁸	48,79
			mrtvé	0,73 · 10 ⁸	51,21
Bezinka	0,210 ± 0,043	25,08	živé	1,21 · 10 ⁸	79,01
			mrtvé	0,32 · 10 ⁸	20,99

Tabulka 16 Přímá interakce *L. casei* s jednotlivými sirupy, nárůst kultury, viabilita buněk po 24 hodinách

Bakteriální kultura	<i>Lactobacillus casei</i>				
Vzorek	Rozdíl OD (-)	Rozdíl OD (%)	Buňky	CFU/ml	Procentuálně (%)
Reference	0,706 ± 0,009	-	živé	1,45 · 10 ⁸	96,81
			mrtvé	0,48 · 10 ⁷	3,19
Pomeranč	0,263 ± 0,134	37,27	živé	0,13 · 10 ⁸	95,68
			mrtvé	0,57 · 10 ⁶	4,32
Ananas	0,110 ± 0,047	15,59	živé	1,13 · 10 ⁸	97,03
			mrtvé	0,35 · 10 ⁷	2,97
Lesní směs	0,052 ± 0,013	7,32	živé	0,94 · 10 ⁸	96,32
			mrtvé	0,36 · 10 ⁷	3,68
Citron	0,090 ± 0,027	12,75	živé	1,24 · 10 ⁸	95,53
			mrtvé	0,58 · 10 ⁷	4,47
Bezinka	0,057 ± 0,039	8,08	živé	1,32 · 10 ⁸	96,83
			mrtvé	0,43 · 10 ⁷	3,17

Tabulka 17 Přímá interakce *B. breve* s jednotlivými sirupy, nárůst kultury, viabilita buněk po 24 hodinách

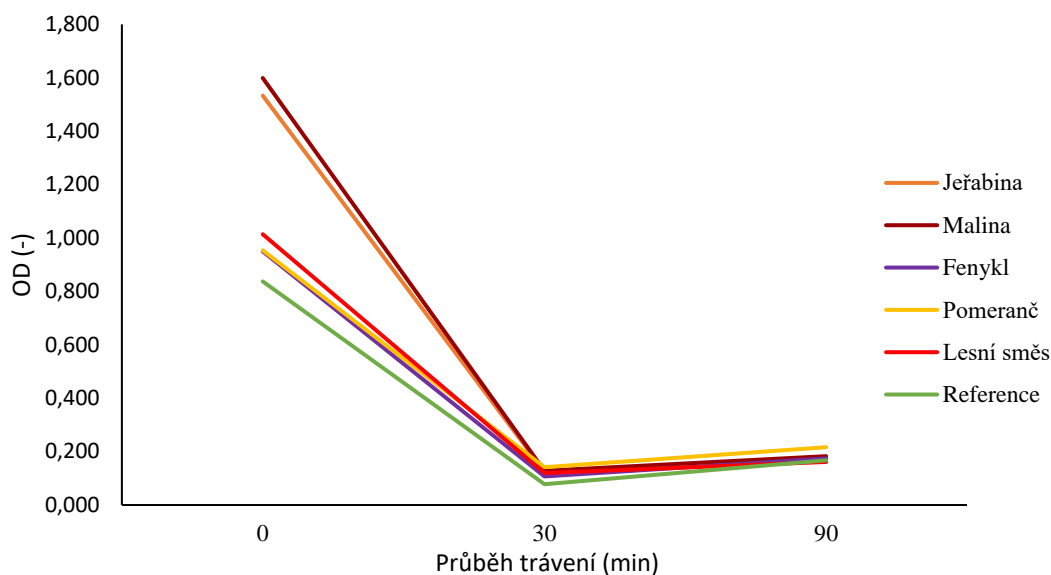
Bakteriální kultura	<i>Bifidobacterium breve</i>				
Vzorek	Rozdíl OD (-)	Rozdíl OD (%)	Buňky	CFU/ml	Procentuálně (%)
Reference	0,780 ± 0,029	-	živé	1,43·10 ⁸	89,80
			mrtvé	0,16·10 ⁸	10,20
Pomeranč	0,085 ± 0,079	10,85	živé	1,19·10 ⁸	81,80
			mrtvé	0,26·10 ⁸	18,20
Ananas	0,078 ± 0,021	-10,04	živé	1,34·10 ⁸	77,95
			mrtvé	0,38·10 ⁸	22,05
Lesní směs	0,068 ± 0,101	8,76	živé	1,05·10 ⁸	81,15
			mrtvé	0,24·10 ⁸	18,85
Citron	0,054 ± 0,013	6,92	živé	0,93·10 ⁸	71,43
			mrtvé	0,37·10 ⁸	28,57
Bezinka	0,038 ± 0,008	4,91	živé	1,11·10 ⁸	71,97
			mrtvé	0,43·10 ⁸	28,03

V případě *Lactobacillus casei* byl detekován největší nárůst kultury v čerstvé pomerančové šťávě (37,27 %). Životaschopnost buněk ve všech vzorcích je velmi vysoká v porovnání s *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve*.

Z Tabulky 17 lze vidět, že nárůst probiotické kultury *Bifidobacterium breve* byl menší oproti předešlým kulturám a jeho nárůst byl nejvíce patrný také ve vzorku s čerstvou pomerančovou šťávou (10,85 %), jako v případě *L. casei*.

5.5 Vliv použitých extraktů na viabilitu probiotických bakterií během simulovaného trávení

Modelové trávení mělo za cíl stimulovat stejné podmínky, kterým by probiotické kultury s extraktem byly vystaveny při průchodu trávicím traktem. Metoda stanovení byla popsána v kapitole 4.10. Následující grafy znázorňují časový průběh trávení. V tabulkách jsou shrnuty výsledky, které ukazují viabilitu buněk po trávení, první sloupec tabulky nám říká, jak se buňky reagovaly na prostředí trávicích šťáv, kterým byly vystaveny po dobu 24 hodin. V tomto přídě byl měřen zákal v čase 0 hned po dokončení trávení a v čase 24 hodin. Zbylé dva sloupce ukazují viabilitu buněk v čase 0 hned po dokončení trávení a v čase 24 hodin.

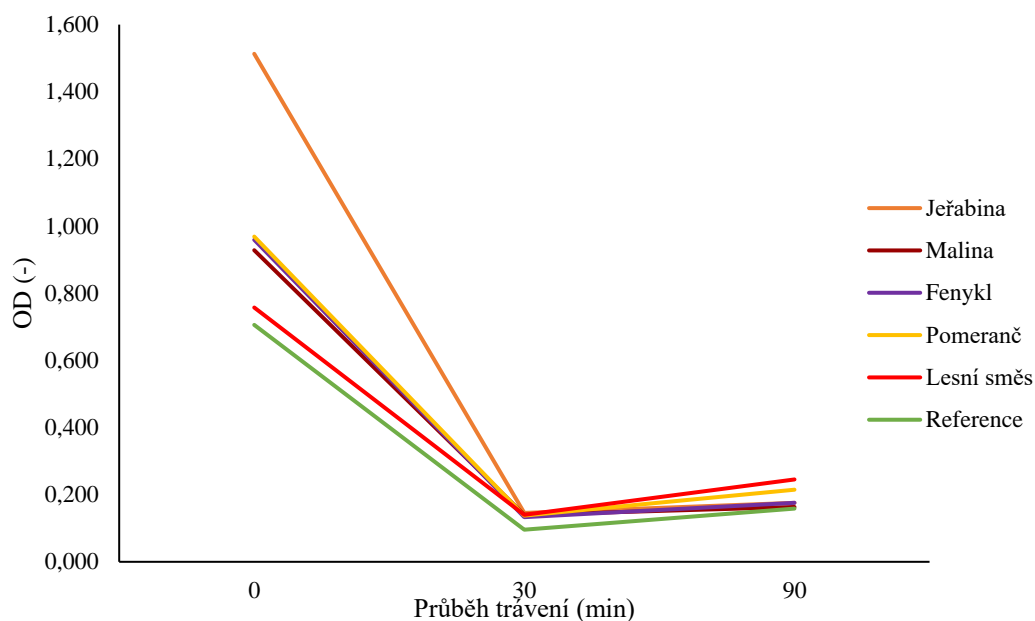


Obrázek 19 Grafické znázornění průběhu trávení směsi probiotických buněk *Lactobacillus acidophilus* a daných extraktů

Tabulka 18 Vliv trávících šťáv na viabilitu *Lactobacillus acidophilus* po dokončení trávení v porovnání se vzorky 24 hodin po trávení

<i>L. acidophilus</i>	ELISA 24 – 0 hodin po trávení		0 hodin PO TRÁVENÍ			24 hodin PO TRÁVENÍ	
	rozdíl OD (-)	rozdíl OD (%)	Buňky	CFU/ml	Procentuálně (%)	CFU/ml	Procentuálně (%)
Reference	0,167 ± 0,002	-	Živé	0,87·10 ⁷	0,52	0,47·10 ⁷	1,14
			Mrtvé	1,65·10 ⁹	99,48	4,13·10 ⁸	98,86
Jeřabinový čaj	0,005 ± 0,000	2,79	Živé	0,27·10 ⁷	1,81	0,37·10 ⁷	0,93
			Mrtvé	1,46·10 ⁸	98,19	4,02·10 ⁸	99,07
Malinový čaj	0,016 ± 0,019	9,78	Živé	0,74·10 ⁷	0,43	0,56·10 ⁷	1,63
			Mrtvé	1,71·10 ⁹	99,57	3,41·10 ⁸	98,37
Fenyklový čaj	0,007 ± 0,013	4,19	Živé	0,14·10 ⁸	0,80	0,18·10 ⁸	4,31
			Mrtvé	1,69·10 ⁹	99,20	4,08·10 ⁸	95,69
Lesní směs	0,006 ± 0,113	-3,59	Živé	0,27·10 ⁷	1,81	0,88·10 ⁸	16,64
			Mrtvé	1,46·10 ⁸	98,19	4,41·10 ⁸	83,36
Pomeranč	0,050 ± 0,009	29,74	Živé	0,31·10 ⁷	2,28	0,24·10 ⁷	0,73
			Mrtvé	1,35·10 ⁸	97,72	3,37·10 ⁸	99,27

Výrazný nárůst probiotické kultury byl u *Lactobacillus acidophilus* zaznamenán pouze u vzorku obsahující šťávu z čerstvého pomeranče (29,74 %). Viabilita buněk v tomto vzorku po uplynutí 24 hodin výrazně klesla. Zajímavá viabilita buněk byla detekována u vzorku sirupu s příchutí lesní směs, ve kterém buňky, vystavené 24 hodin působení trávících šťáv, vykazovaly výraznou viabilitu (16,64 %).

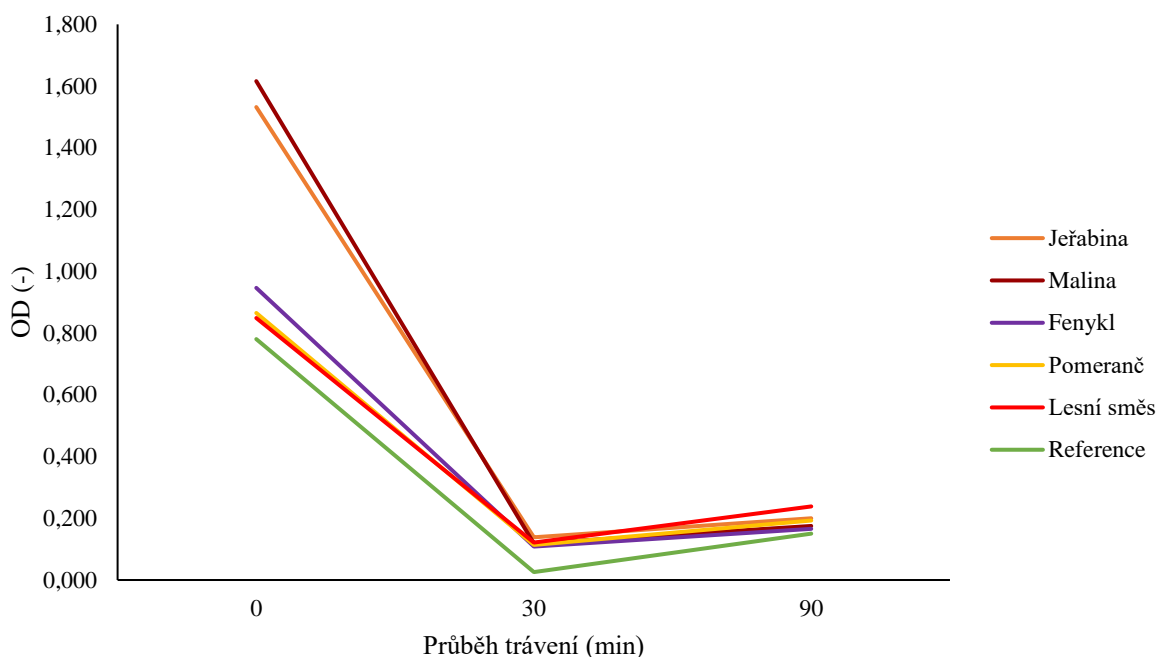


Obrázek 20 Grafické znázornění průběhu trávení směsi probiotických buněk *Lactobacillus casei* a daných extraktů

Tabulka 19 Vliv trávicích šťáv na viabilitu *Lactobacillus casei* po dokončení trávení v porovnání se vzorky 24 hodin po trávení

<i>L. casei</i>	ELISA 24 – 0 hodin po trávení		0 hodin PO TRÁVENÍ			24 hodin PO TRÁVENÍ	
	rozdíl OD (-)	rozdíl OD (%)	Buňky	CFU/ml	Procentuálně (%)	CFU/ml	Procentuálně (%)
Reference	0,159 ± 0,000	-	Živé	0,12 · 10 ⁷	2,15	0,30 · 10 ⁷	0,76
			Mrtvé	1,45 · 10 ⁸	97,85	3,89 · 10 ⁸	99,24
Jeřabinový čaj	0,017 ± 0,006	10,69	Živé	0,41 · 10 ⁷	2,55	0,41 · 10 ⁷	1,08
			Mrtvé	1,55 · 10 ⁸	97,45	3,78 · 10 ⁸	98,92
Malinový čaj	0,004 ± 0,004	2,52	Živé	0,76 · 10 ⁷	5,09	0,71 · 10 ⁷	1,50
			Mrtvé	1,42 · 10 ⁸	94,91	4,67 · 10 ⁸	98,50
Fenyklový čaj	0,017 ± 0,001	10,48	Živé	0,53 · 10 ⁷	0,30	0,57 · 10 ⁷	1,15
			Mrtvé	17,4 · 10 ⁸	99,70	3,87 · 10 ⁸	98,85
Lesní směs	0,086 ± 0,073	54,09	Živé	0,20 · 10 ⁸	12,74	0,9 · 10 ⁷	1,97
			Mrtvé	1,35 · 10 ⁸	87,26	4,51 · 10 ⁸	98,03
Pomeranč	0,050 ± 0,009	34,80	Živé	0,45 · 10 ⁷	3,03	0,36 · 10 ⁷	1,04
			Mrtvé	1,43 · 10 ⁸	96,97	3,44 · 10 ⁸	98,96

U *Lactobacillus casei* vidíme, že v prostředí pomeranče (54,09 %) a sirupu lesní směs (34,80 %) došlo k nárůstu výraznému kultury. Viabilita buněk ale i v těchto dvou případech je po 24 hodinách velmi nízká a převažují mrtvé buňky nad živými.



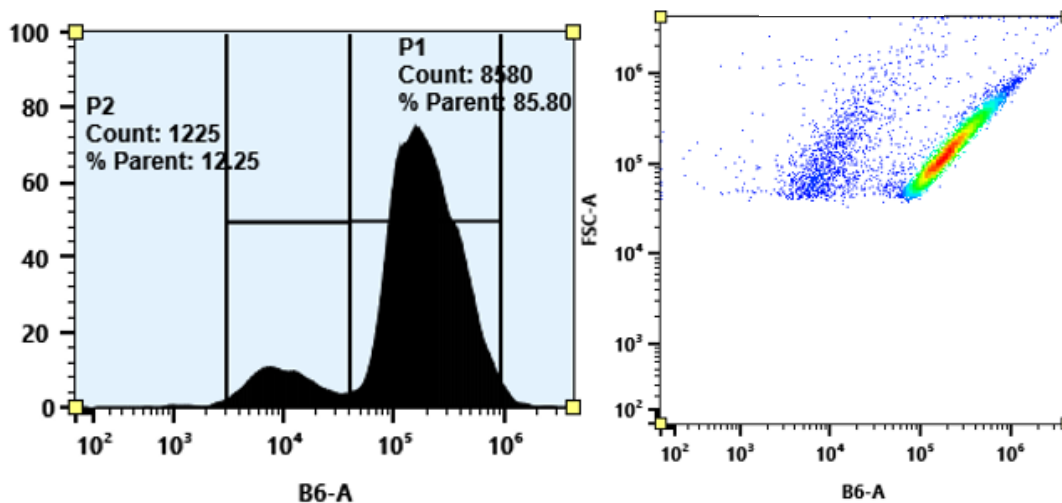
Obrázek 21 Grafické znázornění průběhu trávení směsi probiotických buněk *Bifidobacterium breve* a daných extraktů

Tabulka 20 Vliv trávicích šťáv na viabilitu *Bifidobacterium breve* po dokončení trávení v porovnání se vzorky 24 hodin po trávení

<i>B. breve</i>	PO TRÁVENÍ					24 hodin PO TRÁVENÍ	
	rozdíl OD (-)	rozdíl OD (%)	Buňky	CFU/ml	Procentuálně (%)	CFU/ml	Procentuálně (%)
Reference	0,151 ± 0,010	-	Živé	0,18 · 10 ⁷	1,11	0,86 · 10 ⁷	2,28
			Mrtvé	1,65 · 10 ⁸	98,89	3,68 · 10 ⁸	97,72
Jeřabinový čaj	0,049 ± 0,013	2,79	Živé	0,20 · 10 ⁷	1,33	0,34 · 10 ⁷	0,92
			Mrtvé	1,49 · 10 ⁸	98,67	3,68 · 10 ⁸	99,08
Malinový čaj	0,024 ± 0,005	15,93	Živé	0,23 · 10 ⁷	1,51	0,32 · 10 ⁷	0,77
			Mrtvé	1,53 · 10 ⁸	98,49	4,17 · 10 ⁸	99,23
Fenyklový čaj	0,015 ± 0,004	9,34	Živé	0,16 · 10 ⁷	1,23	0,53 · 10 ⁷	1,13
			Mrtvé	1,32 · 10 ⁸	98,77	4,67 · 10 ⁸	98,87
Lesní směs	0,088 ± 0,001	58,41	Živé	0,21 · 10 ⁸	12,49	0,72 · 10 ⁷	1,55
			Mrtvé	1,44 · 10 ⁸	84,51	4,55 · 10 ⁸	98,45
Pomeranč	0,042 ± 0,026	27,88	Živé	0,15 · 10 ⁷	0,99	0,39 · 10 ⁷	1,46
			Mrtvé	1,54 · 10 ⁸	99,01	2,65 · 10 ⁸	98,54

V případě *Bifidobacterium breve* je nárůst kultury opět znatelný ve vzorcích pomeranče (27,88 %), sirupu lesní směs (58,41 %) a malinového čaje (15,93 %). Viabilita buněk ale ukazuje již po skončení trávení velmi nízké hodnoty, pouze u vzorku sirupu lesní směs (12,49 %) je viabilita výrazně vyšší ve srovnání s ostatními, ale po ponechání buněk v trávicích šťávách po dobu 24 hodin je viabilita ve všech vzorcích nízká až téměř zanedbatelná.

Za účelem udržení vysoké viability buněk po průchodu trávicím procesem byly zhotoveny alginátové částice, do nichž byly enkapsulovány probiotické bakterie spolu s extraktem bohatým na bioaktivní látky. Vytvořené částice viditelně chrání probiotické bakterie před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí a udržují tak viabilitu buněk [40].



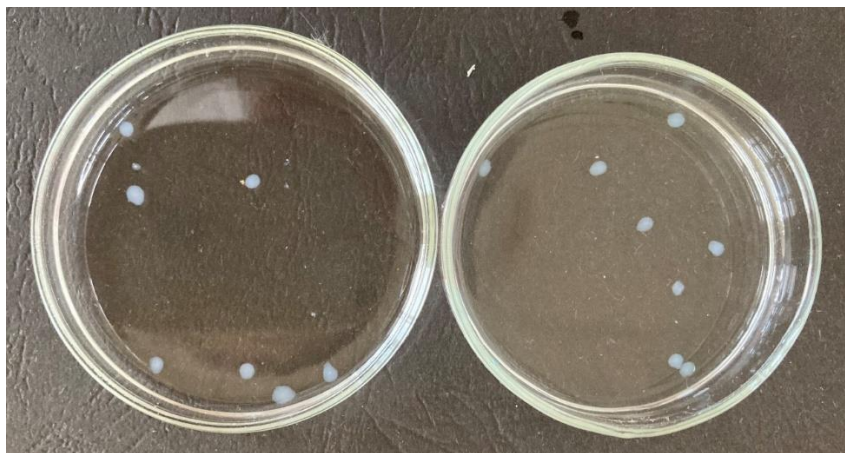
Obrázek 22 Příklad výstupu průtokového cytometru pro vzorek *Bifidobacterium breve* ve směsi se sirupem lesní směs hned po dokončení trávení, první pik představuje živé buňky, druhý pik mrtvé buňky

5.6 Návrh optimálního složení produktu

Pro zhotovení možného výsledného produktu v podobě alginátových částic byly vybrány probiotické bakterie *Lactobacillus acidophilus*, které patří mezi nejběžněji používané probiotické kultury a zároveň představovaly nejvhodnějšího kandidáta díky svým interakcím s extrakty. Navrhovaný produkt byl pro porovnání zhotoven ve dvou možných příchutích, vždy byla použita stejná probiotická kultura.

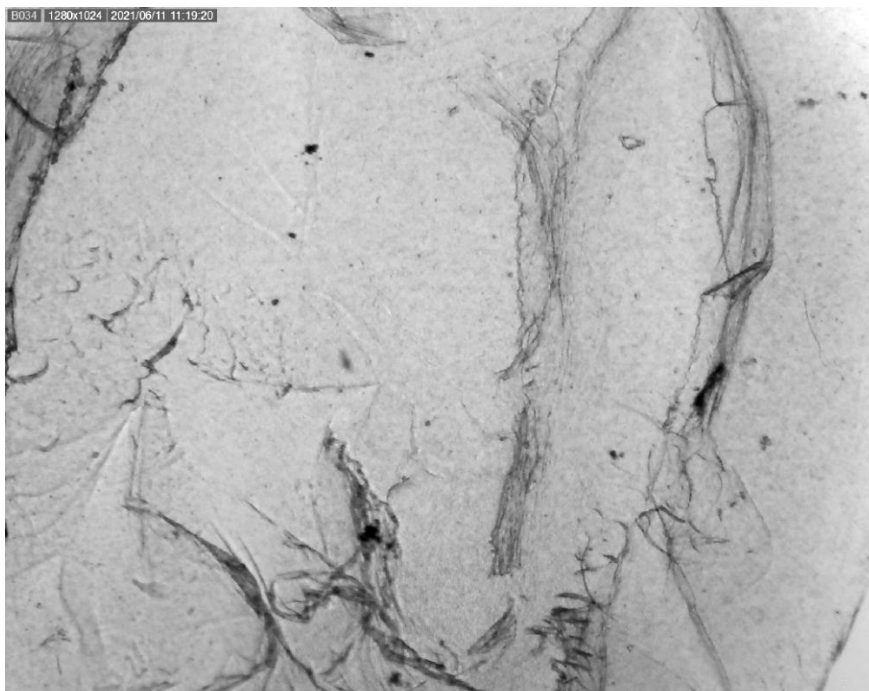
Pro první variantu, viz Obrázek 23 levá Petriho miska, byla použita směs šťávy z pomeranče a čaje. Kombinace fenyklového čaje a šťávy z pomeranče dala vznik světle žluté směsi, ke které byla následně přidána probiotická kultura, alginát a pomocí enkapsulátoru B-395 Pro byly vytvořeny částice. Pomerančová šťáva byla vybrána na základě předešlých stanovení, kdy v jejím případě byl prokázán nejvyšší obsah bioaktivních látek, stimulovala růst probiotické kultury *Lactobacillus acidophilus* a po dokončení trávení byl zjištěn nejvýznamnější vliv na viabilitu probiotických buněk. Obsah částice je tedy následovný: fenyklový čaj, šťáva z pomeranče, probiotická kultura a jako obalový materiál slouží alginát.

Pro druhou variantu, viz obrázek 23 vpravo, by zvolen malinový čaj v kombinaci se sirupem s příchutí lesní směs. Malinový čaj je stejně jako fenyklový bohatý na obsah bioaktivních látek, navíc u něj byla prokázána i výrazná antimikrobiální účinnosti. Sirup lesní směs vykazoval po čerstvé pomerančové šťávě druhé nejlepší výsledky, proto byl jasnou volbou jak složením, tak vizuálně. Ani spojení svou sytě barevných extraktů však nedalo výsledným částicím výrazný barevný vzhled, pouze lehký nádech růžové.

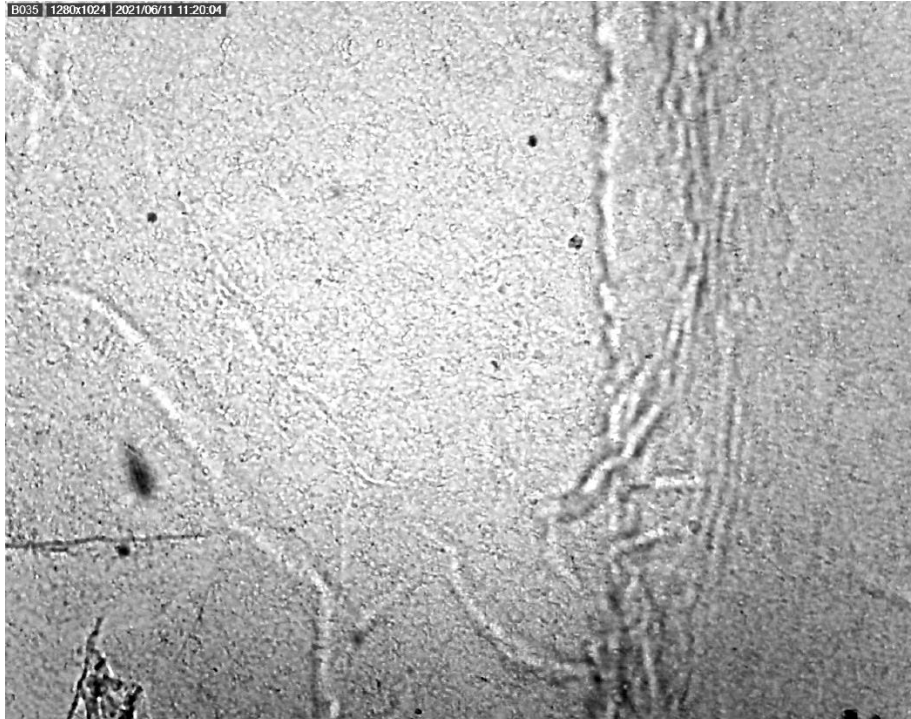


Obrázek 23 Návrh možného produktu, vlevo žlutá varianta vpravo růžová

Částice o velikosti 1 000 μm jsou sensoricky atraktivní. Mohly by být přidávány dětem do nápojů za účelem ozvláštňení nebo místo obyčejného sirupu. Dály by mohly být zakomponovány do pokrmu nebo sloužit jako ozdoba dezertů. Na následujících Obrázcích 24 a 25 lze vidět rozkrojenou částici pod mikroskopem při 10násobném a 100násobném zvětšení.



Obrázek 24 Rozkrojená částice pod mikroskopem při 10násobném zvětšení



Obrázek 25 Probiotické bakterie v rozkrojené částici při 100násobném zvětšení.

6 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce je zaměřena na návrh produktu, který by měl obsahovat probiotické bakterie a ovocnou složku. Cílem práce bylo najít vyhovující kombinaci čaje a sirupu, která během trávení dokáže ochránit probiotickou kulturu a zabezpečit tak její viabilitu.

Teoretická část práce je orientována na popis probiotických bakterií, jejich pozitivních i negativních účinků na lidské zdraví, na metody enkapsulace probiotických bakterií, přičemž jedna z nich byla následně použita v experimentální části. Dále se teoretická část zaměřuje na charakterizaci čajů použitých v experimentální části, screening a porovnání dostupných probiotických doplňků s obsahem ovocné složky na českém trhu.

Pro experimentální část byly vybrány tři vzorky čajů, a to jeřabinový čaj, malinový a fenyklový čaj, 4 vzorky sirupů, a sice ananasový sirup, sirup lesní směs, citronový a bezinkový sirup a jeden vzorek čerstvé pomerančové šťávy.

V první části experimentální práce byly charakterizovány jednotlivé extrakty. Stanovením fenolických sloučenin byl potvrzen fakt, že čaje jsou bohatým zdrojem těchto látek. U všech třech vzorků byl obsah fenolických sloučenin vysoký, nejvyšší hodnota byla analyzována u fenyklového čaje a to 317 mg/g. Při porovnání s naměřeným obsahem flavonoidů byl u fenyklového čaje naměřen nejmenší obsah 7,40 mg/g. Nejvíce flavonoidů bylo detekováno v jeřabinovém čaji, a to 23,13 mg/g, v malinovém čaji bylo stanoveno 15,83 mg/g. Čaje jsou přirozeně známé svojí vysokou antioxidační aktivitou, tento fakt byl potvrzen stanovením využívající roztok ABTS, kdy byla analyzována schopnost vzorku zhášet kation-radikál ABTS^{•+}. Všechny tři vzorky dosahovaly velmi vysokých hodnot. Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u jeřabinového čaje 186,36 mg/g. Posledním charakterizačním stanovením bylo zjištění obsahu vitamínu C. Ve vzorku malinového čaje byl obsah vypočten na 105,41 mg/g, v jeřabinovém čaji 198,81 mg/g a ve vzorku fenyklového čaje byl obsah vitamínu C stanoven na hodnotu 268,77 mg/g. Ve všech těchto případech zjištěné hodnoty několikrát převyšují doporučenou denní dávku pro zdravého dospělého jedince, která činí 80 mg. Stejná stanovení byla provedena i se vzorky sirupů a čerstvou pomerančovou šťávou. Ovocné šťávy jsou druhým největším zdrojem přirozených antioxidantů, tuto skutečnost nám potvrzuje i největší naměřený obsah fenolických sloučenin i flavonoidů ve vzorku čerstvé pomerančové šťávy, která svými hodnotami značně převyšovala sirupy. Pouze v případě sirupu s příchutí lesní směs byl naměřen vyšší obsah fenolických sloučenin než u ostatních sirupů. Nejvyšší antioxidační aktivita byla opět naměřena v případě pomerančové šťávy, kdy dosahovala hodnoty 1,34 mg/ml. Druhá nejvyšší hodnota byla zaznamenána u vzorku sirupu s příchutí lesní směs 0,79 mg/ml. Titrační stanovení vitamínu C ukázalo nejvyšší obsah

vitaminu opět v pomerančové šťávě 1,24 mg/ml a v sirupu s příchutí lesní směs 0,74 mg/ml. Zajímavým zjištěním bylo, že více vitaminu C obsahuje sirup lesní směs než citronový sirup, ve kterém bylo analyzováno pouze 0,25 mg/ml.

Dále byla zkoumána antimikrobiální účinnost čajů vůči modelovým mikroorganismům. Pro toto stanovení byly vybrány bakterie *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus epidermidis*. Antimikrobiální účinnost malinového čaje se nejvíce projevila interakcí s *E. coli* a *M. luteus*, kdy v obou případech byl detekován úbytek bakteriální kultury. Jeřabinový čaj měl stejné pozitivní účinky jako čaj malinový, v nižších koncentracích působil antimikrobiálně i v prostředí *S. epidermidis*. V případě fenyklového čaje byly antimikrobiální účinky projeveny v prostředí *S. marcescens* a *M. luteus*. V prostředí *E. coli* a *S. Epidermidis* fenyklový čaj působil jako stimulant a došlo k výraznému nárůstu kultury.

V druhé části je experimentální práce zaměřena na interakci probiotických kultur s jednotlivými extrakty čajů a sirupů. Při práci byly použity tři probiotické kultury: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* a *Bifidobacterium breve*. Cílem této části práce bylo zjistit, který z extraktů stimuluje růst bakteriální kultury. V případě čajů byl u každé probiotické kultury zaznamenán pozitivní vliv na růst, který ale nebyl nijak výrazný. Lze tedy říct, že probiotickým buňkám prostředí čaje nevadilo, ale výrazně je nedonutilo k nárůstu. V případě sirupů byl nárůst kultur znatelnější, jak bylo očekáváno. Sirupy jsou sladké, obsahují cukr, který vytvořil vhodné podmínky pro namnožení bakterií. V případě *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* byl nárůst kultur zaznamenán ve všech vzorcích oproti referenci. Stejný trend vykazuje i probiotická kultura *Bifidobacterium breve*, u které byl také zaznamenán nárůst ve většině vzorků, pouze ve vzorku ananasového sirupu došlo k inhibici bakteriálních buněk.

Pomocí modelového trávení byla sledována viabilita buněk během simulovaného procesu trávení u vybraných vzorků na základě předešlého testování. Byl analyzován vliv trávicích šťáv na probiotické bakterie během trávení a vyneseno do grafické závislosti. Pomocí průtokového cytometru byla zjištěna viabilita buněk po dokončení trávení a následně ještě přeměřena 24 hodin po skončení trávení. Viabilita buněk po trávení i 24 hodin po trávení byla u všech třech probiotických kultur velmi nízká až zanedbatelná.

Od enkapsulace probiotických bakterií spolu se směsí čaje a sirupu či pomerančové šťávy je očekáváno, že při procesu trávení částice ochrání probiotické buňky a zabezpečí tak jejich vyšší viabilitu, jako tomu bylo v práci Nikolý Hornákové [40].

Navržené optimální složení možného výsledného produktu bylo provedeno na základě předešlých stanovení a za účelem atraktivního vzhledu.

6.1 Seznam použité literatury

- [1] COMAN, Vasile a Dan Christian VODNAR. Gut microbiota and old age: Modulating factors and interventions for healthy longevity. *Experimental Gerontology*. 2020, (141). Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111095>
- [2] AMINI, Mohammad Esmail, Navid SHOMALI, Arash BAKHSHI, et al. Gut microbiome and multiple sclerosis: New insights and perspective. *International Immunopharmacology* [online]. 2020, 88 [cit. 2020-12-18]. ISSN 1567-5769. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107024>.
- [3] PIGGOTT, Damani A. a Susan TUDDENHAM. The gut microbiome and frailty. *Translational Research* [online]. 2020, **221**, 23-43 [cit. 2020-12-18]. ISSN 1931-5244. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.03.012>.
- [4] RYŠÁVKA, Petr. Mikrobiom a vybraná onemocnění. *Praktické lékařství* [online]. Praha: Pharmaceutical Biotechnology, 2019, 2019, , 91-94 [cit. 2020-12-18]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/lek/2019/02/08.pdf>
- [5] MILLION, M., J. - C. LAGIER, D. YAHAV a M. PAUL. Gut bacterial microbiota and obesity. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2013, **19**(4), 305-313 [cit. 2020-12-18]. ISSN 1198-743X. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12172>.
- [6] BÄCKHED, Fredrik, Josefine ROSWALL, Yangqing PENG, Qiang FENG, Huijue JIA a Petia KOVATCHEVA-DATCHARY. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe* [online]. 2015, 2015, **17**(5), 690-703 [cit. 2020-12-18]. ISSN 1931-3128. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- [7] STOKHOLM, Jakob, Jonathan THORSEN, Bo L. CHAWES, Susanne SCHJØRRING, Karen A. KROGFELT, Klaus BØNNELYKKE a Hans BISGAARD. Cesarean section changes neonatal gut colonization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 3, 2016, 2016, (138), 881-889.e2 [cit. 2020-12-18]. ISSN 0091-6749. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.01.028>.
- [8] ARBOLEYA, Silvia, Borja SÁNCHEZ, Christian MILANI, et al. Intestinal Microbiota Development in Preterm Neonates and Effect of Perinatal Antibiotics. *The Journal of Pediatrics* [online]. 2015, **166**(3), 538-544 [cit. 2020-12-18]. ISSN 0022-3476. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.09.041>.
- [9] RYŠÁVKA, Petr. Mikrobiom a vybraná onemocnění. *Praktické lékařství* [online]. Praha: Pharmaceutical Biotechnology, 2019, 2019, , 91-94 [cit. 2020-12-18]. Dostupné z: <https://www.solen.cz>
- [10] KOHOUTOVÁ, MUDr. Darina a prof. MUDr. Jan BUREŠ. *Střevní mikrobiota a kolorektální karcinom* [online]. 2012, , 167-169 [cit. 2020-12-18]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz>
- [11] RADA, Vojtěch. *Využití probiotik, prebiotik a symbiotik* [online]. Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Česká zemědělská univerzita v Praze, 2010 [cit. 2020-06-26]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz>
- [12] *Bakterie mléčného kvašení, probiotika a fermentované mléčné výrobky* [online]. Praha: Potravinářská komora České republiky Česká technologická platforma pro potraviny, 2018 [cit. 2020-06-26]. ISBN 978-80-88019-34-3. Dostupné z: <http://ctpp.cz>

- [13] Kokešová, A., & , P.D. (2009). Imunomodulační účinky probiotik v klinické praxi. *Pediatr. praxi*, 10(3), 169-174.
- [14] Contents lists available at Science Direct Trends in Food Science & Technology journal homepage: www.elsevier.com/locate/tifs Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. Elsevier, 2020 [cit. 2020-06-26].
- [15] GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK. Aplikovaná mikrobiológia požívateľín: princípy mikrobiológie požívateľín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívateľinami. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967064-9-7.
- [16] *Lactobacillus acidophilus*. *GUT MICROBIOTA FOR HEALTH* [online]. [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com>
- [17] *Bifidobacterium animalis* [online]. [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.sciencephoto.com>
- [18] SOTOUEGAN, Farzaneh, Marzieh DANIALI, Shokoufeh HASSANI, Shekoufeh NIKFAR a Mohammad ABDOLLAHI. Reappraisal of probiotics' safety in human. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2019, 129, 22-29 [cit. 2021-7-16]. ISSN 0278-6915. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.032>.
- [19] KUMAR, Bathal Vijaya, Sistla Venkata NAGA VIJAYENDRA a Obulam Vijaya SARATHI REDDY. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *Journal of Food Science and Technology volume* [online]. 2015, 2015, 52, 6112–6124 [cit. 2020-12-18]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-015-1795-2>
- [20] COSTA, A.S.G., M.A. NUNES, I.M.C. ALMEIDA, M.R. CARVALHO, M.F. BARROSO, R.C. ALVES a M.B.P.P. OLIVEIRA. Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. *Food Science and Technology* [online]. 2012, (2), 324-328 [cit. 2021-7-16]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.02.030>.
- [21] SLANINA, Jiří a Eva TÁBORSKÁ. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy* [online]. Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita v Brně, 2004, (98), 239-245 [cit. 2021-7-16]. Dostupné z: http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_05_02.pdf
- [22] Fenykl - italský kopr. *PharmaPoint Lékárna* [online]. [cit. 2020-12-18]. Dostupné z: <https://www.pharmapoint.cz>
- [23] Fenykl obecný. *LEROS* [online]. [cit. 2020-12-18]. Dostupné z: <https://www.leros.cz>
- [24] Dětské čaje. *LEROS* [online]. [cit. 2020-12-18]. Dostupné z: <https://www.leros.cz/>
- [25] Čaj pro kojící matky. *LEROS* [online]. [cit. 2020-12-18]. Dostupné z: <https://www.leros.cz>
- [26] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. 1, 1806-1815 [cit. 2020-12-18]. ISSN 2211-601X. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>.
- [27] RODRIGUES, F.J., M.F. CEDRAN, J.L. BICAS a H.H. SATO. Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food

- applications. *Food Research International* [online]. 2020, (137) [cit. 2021-7-16]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>.
- [28] MISRA, Sourav, Pooja PANDEY a Hari Niwas MISHRA. Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2021, (109), 340-351 [cit. 2021-7-16]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.039>.
- [29] BUCHI. Enkapsulátor B-395 Pro: Manuál. Dostupné z: <https://static1.buchi.com>
- [30] BioGaia®Protectis® probiotické kapky. *BioGaia* [online]. [cit. 2020-12-18]. Dostupné z: <https://www.biogaia.cz>
- [31] BioGaia® Protectis® probiotické žvýkácké tablety. *BioGaia* [online]. [cit. 2020-12-18]. Dostupné z: <https://www.biogaia.cz>
- [32] Bio-Kult Infantis. *Bio-Kult* [online]. [cit. 2020-12-18]. Dostupné z: <https://www.bio-kult.cz>
- [33] Dr. Formulated -Živé bakterie pro děti. *Puravia* [online]. [cit. 2020-12-18]. Dostupné z: <https://www.puravia.cz>
- [34] Flora Protect Jr. Probiotika pro děti. *Natural Swiss* [online]. [cit. 2020-12-18]. Dostupné z: <https://www.detoxikace-organismu.info>
- [35] VRANÍKOVÁ, Barbora, Aleš FRANC, Jan GAJDZIOK a David VETCHÝ. Biorelevantní disoluční media simulující podmínky trávicího traktu. *Chemické listy* [online]. Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a Farmaceutická Univerzita Brno, 2016, (110), 126-132 [cit. 2021-7-26].
- [36] MALTA, L.G. a R.H. LIU. Analyses of Total Phenolics, Total Flavonoids, and Total Antioxidant Activities in Foods and Dietary Supplements. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* [online]. Academic Press, 2014, s. 305-314 [cit. 2021-7-22]. ISBN 9780080931395. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444525123000589>
- [37] Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2002, **10**(3), 178-182 [cit. 2021-7-22].
- [38] PAULOVÁ, Hana a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* [online]. Brno, 2004 [cit. 2021-7-22]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf
- [39] ČSN 56 0050: Stanovení kyseliny L-askorbové [online]. [cit. 2021-7-22]. Dostupné z: <https://shop.normy.biz/detail/4407>
- [40] HORŇÁKOVÁ, Nikola. Příprava přírodních doplňků stravy s obsahem probiotických bakterií a látek s protizánětlivým účinkem. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/123827>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií