



**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

**TESTOVÁNÍ FAKTORŮ OVLIVŇUJÍCÍCH STABILITU  
A SPOTŘEBITELSKOU PŘIJATELNOST NÁLEVVU  
Z KYSANÉHO ZELÍ**

FACTORS AFFECTING STABILITY AND CONSUMER ACCEPTANCE OF SAUERKRAUT WATER

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Bc. Barbora Vašků

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2022

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1734/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Barbora Vašků**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

### Název diplomové práce:

Testování faktorů ovlivňujících stabilitu a spotřebitelskou přijatelnost nálevu z kysaného zelí

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) rešerše – technologie výroby kysaného zelí, složení nálevu
- 2) metody identifikace a charakterizace hlavních složek nálevu (mléčné bakterie, chemické složení)
- 3) optimalizace postupu stabilizace zelné šťávy pasterací
- 4) vývoj směsných ovocno–zeleninových šťáv na bázi nálevu z kysaného zelí, jejich charakterizace a stabilizace
- 5) senzorická analýza směsných šťáv

### Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

-----  
Bc. Barbora Vašků  
studentka vedoucí práce

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

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

V Brně dne 1.2.2022

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací pasterace zelné šťávy za účelem prodloužení její trvanlivosti.

Teoretická část je zaměřena na popis technologie výroby a charakterizaci hlavních složek kysaného zelí a jeho nálevu, možnostmi pasterace a dále se zabývá probiotickými kmeny.

V experimentální části bylo analyzováno složení nálevu z chemického hlediska (bioaktivní látky, cukry, sacharidy), z hlediska mikrobiologického (přítomnost probiotik, patogenních organismů) a dále vliv vybrané pasterace na tyto složky. Jako nejvhodnější byla zvolena pasterace při 90 °C po dobu 0,5 minuty, při které dochází k usmrcení případných patogenů a zároveň k zachování nejvíce původních významných složek zelného nálevu.

Z důvodu ztráty životaschopnosti probiotických bakterií v zelné šťávě po jejím ošetření vybraným pasteračním zákrokem byl následně vybrán vhodný zástupce rodu *Lactobacillus* pro obohacení zelné šťávy. Jako nejlepší probiotický druh pro obohacení zelné šťávy byl zvolen *Lactobacillus plantarum*, u kterého byla stanovena nejvyšší viabilita během skladování v zelné šťávě při 8 °C po dobu 2 týdnů. Z chemického hlediska došlo po 2 týdnech k nárůstu obsahu kyseliny octové a mléčné, obsah vitamínu C zůstal beze změny.

Nakonec byla provedena sensorická analýza pro zhodnocení návrhu kombinovaného ovocno-zeleninového nápoje. Z výsledků sensorické analýzy byl jako sensoricky nejlepší zvolen nápoj vzniklý smícháním zelné šťávy s jablečno-řepným džusem v poměru 2:1.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Zelná šťáva, kysané zelí, bakterie mléčného kvašení, probiotika, pasterace, jablko, řepa, *Lactobacillus plantarum*, RT-PCR.

## **ABSTRACT**

This diploma thesis is focused on the optimization of pasteurization of the cabbage juice in order to extend its shelf life.

The theoretical part is focused on the description of the sauerkraut production technology and characterization of the main components of fermented cabbage and its juice, it also deals with pasteurization options and presence of probiotic strains.

In the experimental part, the composition of the brine was analyzed from a chemical point of view (bioactive substances, sugars, carbohydrates), from a microbiological point of view (presence of probiotics, pathogenic organisms) and the effect of selected pasteurization processes on these components. Pasteurization at 90 °C for 0.5 minutes was determined as the most suitable treatment, during which potential pathogens are being eliminated, while most of the original bioactive components are preserved.

After suggesting the effective pasteurization treatment, suitable species of genus *Lactobacillus* was selected to enrich the cabbage juice product because of decreasing of probiotics viability during pasteurization treatment. The strain *Lactobacillus plantarum* was determined as the most suitable probiotic species for cabbage juice enrichment, due its ability to survive in 2 weeks storage at 8 °C in cabbage juice. Chemical composition after 2 weeks of incubation with mentioned organism has changed. Quantity of lactic and acetic acid increased, while no changes in content of vitamin C were observed.

Finally, sensory analysis was performed to evaluate suggested mixed fruit-vegetable drink. According to results of sensory analysis, the drink composed of cabbage juice and apple-beetroot juice in the ratio of 2:1 was found as the most acceptable.

## **KEYWORDS**

Sauerkraut juice, sauerkraut, lactic acid bacteria, probiotics, pasteurization, apple, beetroot, *Lactobacillus plantarum*, RT-PCR.

VAŠKŮ, Barbora. *Testování faktorů ovlivňujících stabilitu a spotřebitelskou přijatelnost nálevu z kysaného zelí*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139332>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

## **PROHLÁŠENÍ:**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová 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:**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za možnost pracovat v jejím týmu. Ráda bych poděkovala své konzultantce Ing. Julii Hoové za cenné rady a celkovou pomoc při zpracování experimentální části. Dále děkuji Ing. Lence Fialové za rady při zpracování molekulární části práce.

# OBSAH

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>11</b>
2.1 Kysané zelí .....	11
2.1.1 Technologie výroby kysaného zelí .....	11
2.1.2 Chemické změny v průběhu fermentace.....	12
2.1.3 Antioxidační vlastnosti .....	12
2.1.4 Kontaminující mikroorganismy .....	13
2.1.5 Rozdíly při použití startovací kultury .....	13
2.1.6 Glukosinoláty.....	13
2.1.7 Změny v průběhu skladování.....	14
2.1.8 Antimikrobiální látky.....	15
2.2 Probiotika .....	15
2.2.1 Účinky probiotik.....	16
2.2.2 Přehled zástupců .....	17
2.2.3 Rod <i>Lactobacillus</i> .....	17
2.2.4 Rod <i>Bifidobacterium</i> .....	18
2.2.5 Testování vlastností probiotických kmenů .....	19
2.2.6 Praktické využití probiotických bakterií.....	19
2.2.7 Prebiotika .....	20
2.3 Pasterace.....	20
2.3.1 Změny bioaktivních látek během pasterace.....	21
2.4 PCR .....	22
2.4.1 Průběh PCR reakce .....	22
2.4.2 Složení reakční směsi .....	23
2.4.3 Výhoda využití PCR pro detekci a identifikaci laktobacilů .....	23
<b>3 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>24</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>25</b>
4.1 Použité chemikálie pro analýzy .....	25
4.2 Použité chemikálie pro kultivace .....	25
4.3 Použité chemikálie pro buněčné linie .....	26
4.4 Použité chemikálie pro PCR a elektroforézu .....	26
4.5 Použité přístroje .....	26

4.6	Analyzované vzorky.....	27
4.7	Použitá buněčná linie .....	27
4.8	Použité bakteriální kultury .....	27
4.9	Pasterace vzorků.....	28
4.10	Měření pH .....	28
4.11	Spektrofotometrické analýzy .....	28
4.11.1	Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu fenolických látek .....	28
4.11.2	Spektrofotometrické stanovení flavonoidů .....	28
4.11.3	Spektrofotometrické stanovení antioxidační kapacity .....	29
4.11.4	Stanovení sacharidů podle Duboise .....	29
4.11.5	Stanovení redukujících cukrů podle Somogyi-Nelsona .....	30
4.12	Úprava vzorků před analýzou .....	30
4.13	Analýza pomocí kapalinové chromatografie .....	31
4.14	Kultivace mikroorganismů obsažených v zelné šťávě.....	31
4.15	Spektrofotometrické stanovení zákalu .....	31
4.16	Kultivace bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> .....	32
4.17	Růstová křivka .....	32
4.18	Obohacení pasterované zelné šťávy probiotickými bakteriemi .....	32
4.19	Stanovení počtu a viability buněk bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> .....	32
4.19.1	Příprava kultury .....	32
4.19.2	Průtoková cytometrie .....	32
4.20	Izolace bakteriální DNA a PCR .....	33
4.20.1	Izolace DNA.....	33
4.20.2	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované DNA.....	33
4.20.3	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase RT-PCR .....	33
4.20.4	Detekce produktů PCR pomocí elektroforézy .....	35
4.21	Testování na buněčné linii Caco-2.....	35
4.21.1	Kultivace buněčné linie Caco-2 .....	35
4.21.2	MTT test.....	36
4.22	Senzorické hodnocení .....	36
4.22.1	Hodnocené vzorky.....	36
4.22.2	Použité metody .....	37
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>38</b>

5.1	Charakterizace zelné šťávy z hlediska bioaktivních látek .....	38
5.1.1	Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu fenolických látek.....	38
5.1.2	Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu flavonoidů .....	38
5.1.3	Spektrofotometrické stanovení antioxidační kapacity .....	39
5.1.4	Shrnutí charakterizace z hlediska bioaktivních látek.....	40
5.2	Charakterizace zelné šťávy z hlediska sacharidů .....	41
5.2.1	Spektrofotometrické stanovení sacharidů podle Duboise.....	41
5.2.2	Spektrofotometrické stanovení redukujících cukrů podle Somogyi-Nelsona ..	41
5.2.3	Shrnutí charakterizace z hlediska obsahu sacharidů a redukujících cukrů.....	42
5.3	Stanovení vybraných organických kyselin a cukrů pomocí HPLC .....	43
5.4	Měření pH .....	43
5.5	MTT test cytotoxicity .....	44
5.6	Mikrobiologická kontrola zelné šťávy .....	45
5.7	Spektrofotometrické měření zákalu .....	45
5.8	Růstová křivka vybraných probiotických bakterií .....	46
5.9	Ověření amplifikace DNA kontrolních kmenů .....	47
5.9.1	Doména <i>Bacteria</i> .....	47
5.9.2	Rod <i>Lactobacillus</i> .....	48
5.9.3	Vybraní zástupci rodu <i>Lactobacillus</i> .....	50
5.10	Zhodnocení efektivity jednotlivých pasteračních kroků .....	51
5.11	Ověření přítomnosti rodu <i>Lactobacillus</i> ve vzorku zelné šťávy .....	52
5.12	Dlouhodobá stabilita zelné šťávy po pasteračním zákroku a přidavku probiotik.....	53
5.13	Charakterizace obohacené šťávy z hlediska bioaktivních látek.....	53
5.13.1	Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu fenolických látek .....	53
5.13.2	Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu flavonoidů.....	54
5.13.3	Spektrofotometrické stanovení antioxidační kapacity .....	55
5.13.4	Shrnutí charakterizace obohacených vzorků z hlediska bioaktivních látek...	56
5.14	Charakterizace obohacené šťávy z hlediska sacharidů .....	56
5.14.1	Spektrofotometrické stanovení sacharidů podle Duboise .....	56
5.14.2	Spektrofotometrické stanovení redukujících cukrů podle Somogyi-Nelsona	57
5.14.3	Shrnutí charakterizace z hlediska obsahu sacharidů .....	58
5.15	Stanovení vybraných organických kyselin a cukrů pomocí HPLC .....	58
5.16	Měření pH obohacených vzorků .....	60



5.17	Sledování stability obohacené zelné šťávy .....	60
5.17.1	Potvrzení přítomnosti zástupců domény <i>Bacteria</i> .....	60
5.17.2	Potvrzení přítomnosti zástupců rodu <i>Lactobacillus</i> .....	62
5.17.3	Potvrzení přítomnosti zástupců <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	63
5.17.4	Potvrzení přítomnosti zástupců <i>Lactobacillus casei</i> .....	65
5.17.5	Potvrzení přítomnosti zástupců <i>Lactobacillus delbrueckii</i> .....	66
5.17.6	Potvrzení přítomnosti zástupců <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	68
5.18	Sledování viability probiotických bakterií v obohacených vzorcích .....	69
5.19	Senzorická analýza.....	71
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>87</b>

# 1 ÚVOD

Fermentované produkty s mléčnými bakteriemi jsou známy již od Starověku, kdy se tyto procesy používaly k uchování potravin. V poslední době stoupá popularita kvašených potravin, jako jsou mléčné výrobky (př. kefir, jogurt), dále nápoj kombucha, nebo právě kysané zelí. Kysané zelí v různých podobách je tradiční pokrm nejen pro obyvatele střední a východní Evropy, ale také například v Asii v podobě kimchi. Kysané zelí je předmětem zkoumání již dlouhou dobu, samotnému nálevu a jeho pozitivním vlastnostem nebyla věnována dosud taková pozornost.

Kysané zelí je považováno za dobrý zdroj vitamínů, minerálů, fenolických látek a dalších biologicky aktivních sloučenin. Tradičně se kysané zelí vyrábí spontánní fermentací pomocí bakterií mléčného kvašení, a je tedy zdrojem těchto probiotických bakterií především rodu *Lactobacillus*. Klíčovou roli hrají zmíněné bakterie mléčného kvašení, které jsou zodpovědné za tvorbu organických kyselin, ethanolu a dalších látek a dodávají charakteristickou chuť a aroma tomuto produktu.

Probiotika jsou v posledních letech často zmiňována v souvislosti s jevem antibiotické rezistence, jsou známá svými pozitivními vlastnostmi na udržování rovnováhy střevní mikroflóry a dalšími přínosy.

Tato diplomová práce se zaměřuje na charakterizaci nálevu získaného po vymačkání a filtraci kysaného zelí. Hlavní náplní práce je optimalizovat proces tepelné pasterace, aby bylo dosaženo zdravotní nezávadnosti a prodloužení doby skladování. Z důvodu velmi specifické chuti tohoto nálevu je pro větší spotřebitelskou přijatelnost součástí práce vývoj směsného ovocno-zeleninového nápoje. Pro zachování lokálního charakteru byl zvolen džus vyrobený z jablek a červené řepy, což jsou plodiny běžně pěstované v České republice. Vzniklý nápoj by tak mohl být přijatelnější pro širší spektrum spotřebitelů, zejména dětí. Práce byla řešena ve spolupráci s regionálním průmyslovým výrobcem kysaného zelí.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kysané zelí

Kysané zelí je tradiční pokrm široce konzumovaný ve střední a východní Evropě [1]. Zelí se zpracovává spontánní fermentací za použití přímého solení k uvolnění šťávy ze zelí [2]. Klíčovou roli hrají bakterie mléčného kvašení, které mají schopnost produkovat organické kyseliny, bakteriociny a vitamíny, jakož i těkavé sloučeniny, které ovlivňují aromatický profil fermentovaných potravin.

Glukóza a fruktóza jsou hlavními cukry přeměňovanými na kyselinu mléčnou a další sloučeniny, které se zasluhují o aroma a chuť kysaného zelí. Hlavním produktem kvašení je kyselina mléčná, následovaná kyselinou octovou, v menším množství lze také nalézt kyselinu citronovou a jablečnou. Tyto kyseliny se vyskytují přirozeně v syrovém zelí, mohou být také produkovány mikroorganismy [1].

#### 2.1.1 Technologie výroby kysaného zelí

Po odstranění košťálů a vnějších listů se čerstvé zelí nakrájí a smíchá s 2–3 % soli. Zelí je rychle obklopeno nálevem a pokryto plastovou fólií, aby bylo zajištěno vyloučení vzduchu [3].

Sůl má v technologii kysaného zelí několik funkcí. Jedná se o konzervant, inhibitor endogenních pektolytických enzymů pro zachování textury, dále také zvyšuje osmotický tlak v důsledku uvolnění šťávy. V uvolněné šťávě jsou ponořeny nakrájené kusy zelí, čímž jsou podpořeny anaerobní podmínky [4].

Následuje vlastní kvašení. Jedná se o komplexní mikrobiologický proces charakterizovaný činností homofermentativních i heterofermentativních bakterií mléčného kvašení (BMK). Tento proces může být rozdělen na čtyři fáze [5].

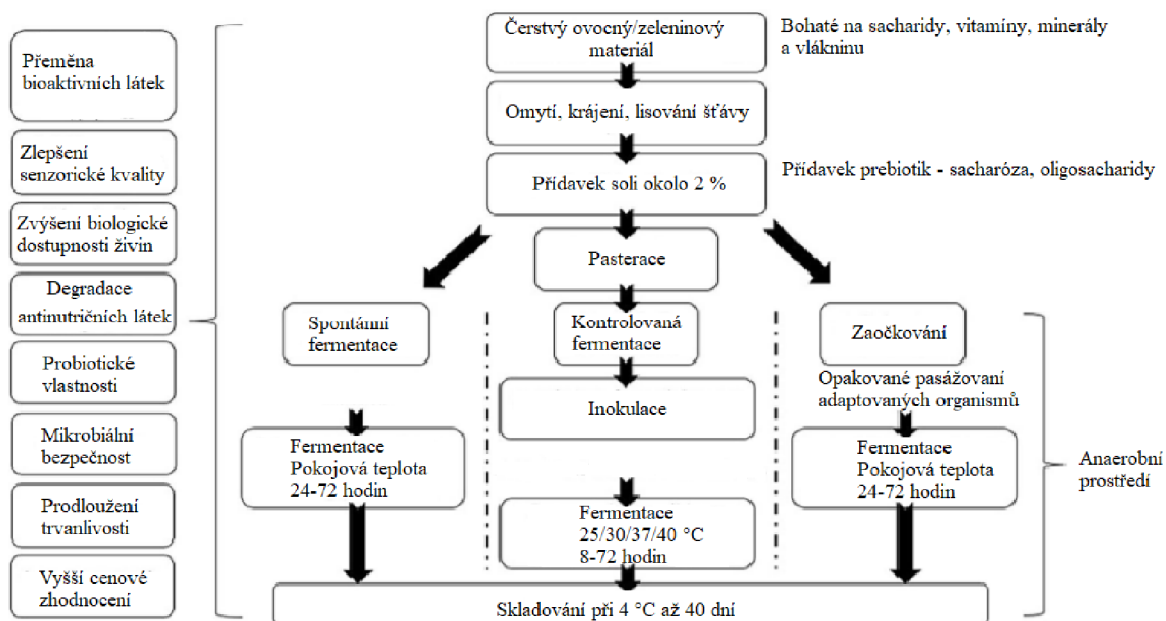
V první fázi dominují aerobní bakterie. Tato část trvá okolo tří dní, je charakteristická postupným přechodem na anaerobní stav a poklesem pH díky produkci organických kyselin [5]. V druhé fázi začínají dominovat fakultativně anaerobní BMK, jako je například *Leuconostoc mesenteroides*. Tato fáze trvá obvykle 3–6 dní [6]. Jako heterofermentativní bakterie produkuje oxid uhličitý, který podporuje anaerobní podmínky a také předchází oxidaci vitamínu C a ztrátě barvy. Díky přítomnosti fruktózy se produkuje také kyselina octová [5].

Ve třetí fázi dochází k útlumu heterofermentativních BMK a nástupu homofermentativních BMK jako je *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus brevis* [6]. Pozdější studie ukázaly také přítomnost dalších bakterií jako jsou *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus sake* nebo *Lactobacillus curvatus* [4].

Na začátku fermentace představují BMK pouze 1 % z celkové mikroflóry, o dva dny později je to již 90 % celkové mikroflóry. Za tuto dobu dojde k poklesu pH v důsledku tvorby kyselin, což způsobí inhibici kompetitivní mikroflóry [5].

Tvorba kyseliny mléčné pokračuje, až je dosaženo pH okolo 3,8, kdy dochází k ukončení fermentace [5]. Takto kyselé podmínky umožňují zachování kyseliny askorbové, výsledný produkt obsahuje až 15 mg vitamínu C na 100 g [4]. Kvašení kysaného zelí trvá několik týdnů v závislosti na zapojených mikroorganismech a podmínkách kvašení, sensorických

vlastnostech a cukernatosti. Sekundární fermentace, jako jsou fermentace prováděné kvasinkami, jsou nežádoucí [3]. Proces výroby kysaného zelí je zobrazen na obrázku 1.



Obrázek 1 – Obecné schéma fermentačního procesu, převzato a upraveno z [7]

### 2.1.2 Chemické změny v průběhu fermentace

Při kvašení zelí vzniká kyselina mravenčí, mléčná a octová. Výjimkou je kyselina šťavelová, jejíž obsah klesá. Přítomnost kyseliny mléčné, octové a dalších organických kyselin je důležitým faktorem pro inhibici alimentárních patogenů. Nízká hodnota pH činí organické kyseliny rozpustné v tucích a umožňuje jim difundovat buněčnou membránou až do cytoplazmy patogenů, což má pozitivní roli při podpoře zdraví v lidském organismu. V malém množství může kysané zelí obsahovat také kyselinu jantarovou. Jedná se o důsledek toho, že vzniká jako první krok při heterofermentativním mléčném kvašení [8].

### 2.1.3 Antioxidační vlastnosti

Kysané zelí má významnou schopnost pohlcovat volné radikály díky fenolickým sloučeninám, které se v syrovém zelí přirozeně vyskytují. Tyto látky se nacházejí v buňkách syrového zelí jako volné molekuly i ve vazebných formách. Mikroorganismus *Lactobacillus plantarum* je schopen během fermentačního procesu uvolňovat některé navázané fenolické sloučeniny, a tím zvyšovat antioxidační aktivitu zelí [8].

Kyselina askorbová je bioaktivní sloučenina přítomná v zelí a spolu s fenolickými sloučeninami přispívá k její antioxidační kapacitě. Během fermentace může dojít ke zvýšení i snížení obsahu této látky. Ke zvýšení obsahu kyseliny askorbové dochází v důsledku působení mikroorganismů během fermentačního procesu a v důsledku degradace antioxidační sloučeniny zvané askorbigen v kyselém prostředí. Ztráty kyseliny askorbové během fermentace zelí lze přičíst účasti kyseliny askorbové na tvorbě askorbigenu. To na druhou stranu přispívá ke zvýšení antioxidační kapacity kvašeného zelí [8].

#### 2.1.4 Kontaminující mikroorganismy

Syrové zelí může obsahovat řadu patogenních mikroorganismů, jako jsou *Escherichia coli* nebo *Listeria monocytogenes*, které tolerují nízké pH. Z tohoto důvodu je většina kysaného zelí v Evropě pasterovaná [6].

Výsledky studie autorů Conner, Brackett a Beuchat v roce 1986 odhalily, že zelná šťáva je dobrým substrátem pro růst dvou testovaných kmenů *L. monocytogenes* a podporují důkazy, že zelenina, jako je zelí, by mohla sloužit jako vektor pro přenos lidské listeriózy [9]. Přírodní zdroj tohoto patogenu nebyl plně popsán, ale bakterie byla izolována z různých zdrojů, včetně půdy, výkalů, odpadních vod, siláže a vegetace. U sporadických výskytů lidské listeriózy nebyla specifická role zeleniny při přenosu choroby jasně definována; v kanadském ohnisku však bylo podezření, že zelí hnojené infikovanými ovčimi výkaly vedlo ke kontaminaci *L. monocytogenes* a že prodloužené skladování zelí v chladu umožnilo proliferaci patogenu [9].

Na začátku kvašení byly detekovány bakterie rodu *Enterobacter*. Detekce pouze během prvních 2–4 dní je odůvodnitelná jejich citlivostí na kombinaci soli a zvyšující se kyselosti. Podobně jako enterobakterie byly na počátku kvašení identifikovány také zástupci kvasinek a plísní, jejichž množství nebylo po devíti dnech detekovatelné [4]. *Leuconostoc mesenteroides* vykazuje antimikrobiální a antifungální aktivitu, která zřejmě vykazuje schopnost inhibovat růst filmotvorných bakterií [10].

#### 2.1.5 Rozdíly při použití startovací kultury

Studie Müllera et al. (2018) sledovala rozdíl v zastoupení mikroorganismů při použití startovacích kultur *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* a spontánního kvašení [10]. Při použití startovacích kultur dominovaly laktobacily. Maximum zjištěných BMK bylo již první den, což je mnohem rychlejší než při spontánním kvašení. Tento jev může vysvětlovat větší inhibici enterobakterií. Dalším rozdílem byl rychlý pokles pH, kdy po jednom dni bylo pH již pod hodnotou 4 [11]. Zástupci rodu *Leuconostoc* se široce používají jako startovací kultury kimchi, a to díky příznivému vlivu na sensorické vlastnosti [12].

U spontánního kvašení byla zjištěna větší rozmanitost bakterií, která zahrnovala také enterobakterie a pseudomonády v prvních dnech fermentace, v pozdějších stádiích především laktobacily. Naopak pH bylo po jednom dni na hodnotě 5,5 a pod hodnotu 4 pokleslo až po třech dnech fermentace [11].

#### 2.1.6 Glukosinoláty

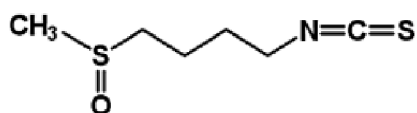
Glukosinoláty (GLS) jsou sekundární metabolity rostlin, které jsou rozpustné ve vodě. Všechny mají společnou základní strukturu sestávající z  $\beta$ -D-thioglukosidové skupiny, sulfonované skupiny a variabilního postranního řetězce odvozeného od jedné z osmi základních aminokyselin.

Glukosinoláty nemají žádný přímý biologický účinek. V průběhu fermentace jsou hydrolyzovány pomocí enzymů skupiny myrozináz, čímž vzniká celé spektrum biologicky aktivních produktů. Epidemiologické důkazy podporují možnost, že produkty rozkladu glukosinolátů mohou chránit před rakovinou, zejména rakovinou gastrointestinálního traktu a plic. Kromě jejich chemopreventivních účinků proti rakovině podpořilo několik studií *in vitro*

a *in vivo* roli glukosinolátových metabolitů při snižování rizika kardiovaskulárních onemocnění, neurodegenerace nebo diabetu [13].

V kysaném zelí je nejhojněji zastoupen askorbinogen, který vykazuje významné antikarcinogenní vlastnosti [14]. Askorbinogen vzniká enzymatickou hydrolýzou glukobrassinu na indol-3-karbinol a následnou reakcí s kyselinou L-askorbovou [15]. Několik studií prokázalo antikarcinogenní účinek askorbinogenu díky jeho schopnosti indukovat aktivaci enzymů metabolizujících xenobiotika a apoptózu nádorových buněk. Kromě toho askorbinogen uplatňuje ochranný účinek na DNA a snižuje hladinu estrogenu, čímž snižuje možnost tvorby genotoxických látek a propůjčuje pokožce ochranu proti oxidativnímu stresu [16].

V průběhu fermentace se uvolňuje řada dalších produktů, jako je sulforafan (obrázek 2), který vzniká hydrolýzou glukorafaninu. Mezi další zástupce látek identifikovaných v zelí patří glukobrassicin, sinigrin, glukobrassicin, sinigrin, glukobrassicin, 1-methoxyglukobrassicin a 4-methoxyglukobrassicin [17].



Obrázek 2 – struktura sulforafanu, převzato a upraveno z [17]

### 2.1.7 Změny v průběhu skladování

Skladování zelí v lednici za běžných podmínek po dobu 3 měsíců ukázalo značný nárůst BMK, aerobních i anaerobních mezofilních bakterií. Zároveň došlo ke snížení obsahu některých bioaktivních sloučenin. Peñas et al. (2014) ve své studii představili výhody skladování v dusíkaté atmosféře [14]. Na konci skladování byl zjištěn obsah všech skupin organismů 35 log CFU/g, tedy nižší než u klasicky skladovaného produktu. Zelí uložené v dusíkaté atmosféře po 3 měsících vykazovalo vyšší antioxidační kapacitu, obsah vitamínu C, askorbinogenu a dalších GLS. Uložení v dusíkaté atmosféře umožňuje efektivní způsob vylepšení mikrobiální kvality výsledného produktu [14].

Stejný tým se zabýval také skladováním a změnami po použití vysokého tlaku jako pasteračního zákroku. I přes snížení obsahu některých bioaktivních sloučenin (především vitamínu C) lze tuto metodu považovat za účinnou pro zlepšení mikrobiální kvality [16].

Ve studii Yoona et al (2006) byla sledována schopnost vybraných laktobacilů přežít i po ukončení fermentace. Byla zkoumána schopnost tří bakterií mléčného kvašení *L. casei*, *L. plantarum* a *L. delbrueckii* využívat šťávu ze zelí pro buněčnou syntézu a produkci kyseliny mléčné bez doplňku živin. *L. plantarum* i *L. delbrueckii* byly schopny přežít nízké pH během skladování v chladu při 4 °C. Naproti tomu *L. casei* nebyl schopen přežít vysokou kyselost a po pouhých 2 týdnech skladování v chladu při 4 °C buňky zcela ztratily životaschopnost [18].

### 2.1.8 Antimikrobiální látky

Nedávný nárůst počtu případů rezistence na antibiotika vědce povzbudil k přehodnocení alternativních terapeutických možností. Úroveň rezistence na antibiotika je znepokojující díky výraznému zpomalení vývoje nových antibiotik. Jednou z možností, jak kompenzovat nedostatek nových antibiotik, je zavést bakteriociny jako terapeutické možnosti v klinické praxi [19].

Mnoho studií zjistilo, že bakterie mléčného kvašení mohou vylučovat antimikrobiální peptid obecně označovaný jako bakteriocin. Bakteriocin se obvykle produkuje, když se bakterie mléčného kvašení kultivují do konce logaritmické fáze. Když koncentrace bakteriocinu dosáhne určité úrovně, může zabíjet nebo inhibovat určité mikroorganismy, čímž funguje i jako biologický konzervant [20].

Ve studii autorů Ge et al. byl izolován *Lactobacillus paracasei* ze šťávy z kysaného čínského zelí. Bylo prokázáno, že tento organismus produkuje nový bakteriocin – Paracin 1.7 [21].

Paracin 1.7. má molekulovou hmotnost přibližně 10 kDa [22]. Je citlivý na proteinázu K, odolný vůči záhřevu (121 °C po dobu 20 minut) a je aktivní v širokém rozmezí pH 3–8. Kromě zmíněných výhod má Paracin 1.7 široké spektrum inhibice a bylo prokázáno, že inhibuje růst široké škály grampozitivních a gramnegativních bakterií [17].

Ve studii autorů Peng et al. (2021) byl z jačího jogurtu izolován bakteriocin Plantaricin LP 21–2 [23]. Tento bakteriocin produkovaný organismem *Lactobacillus plantarum* má molekulovou hmotnost 1362,84 Da a vykazuje široké antimikrobiální spektrum proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím a kvasinkám druhů *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* a *Saccharomyces cerevisiae*. Plantaricin je odolný vůči záhřevu (96% antibakteriální aktivita po ohřevu při 121 °C po dobu 15 minut) a kyselinám (pH 2–5), ale může být inhibován proteázami. Kromě toho Plantaricin působil na buněčné membrány a tvořil póry, které zabíjely bakterie. Tato zjištění ukazují, že bakteriocin má potenciál být použit při konzervaci potravin; stávající výzkum však zůstává nedostatečný [23].

Nisin je bakteriocin produkovaný *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, který je široce využíván jako potravinový konzervant již více než 60 let. FDA (Food and Drug Administration, USA) klasifikuje nisin jako GRAS (Generally Recognized as Safe) a jeho použití jako přísady pro konzervaci potravin je povoleno v mnoha dalších zemích. Nisin je neškodný, tepelně stabilní a komerčně dostupný pro použití v různých potravinářských výrobcích. Nisin neztrácí svou antimikrobiální aktivitu po pasterizaci, sterilizaci a dalších metodách zpracování. Bylo prokázáno, že je účinný v různých potravinových systémech, protože inhibuje růst četných grampozitivních patogenních bakterií. Nisin se často používá v mléčných výrobcích a konzervovaných potravinách, protože je účinný při inhibici proliferace tepelně odolných mikroorganismů tvořících spory, zejména těch, které patří do rodů *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Listeria* a *Clostridium* [24].

## 2.2 Probiotika

Probiotika byla definována jako živé mikroorganismy, které při podávání v adekvátním množství přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele [25].

### 2.2.1 Účinky probiotik

Zdraví prospěšné účinky probiotik jsou výsledkem složitých mechanismů, někdy se překrývajících, které jsou obecně přísně kmenově specifické, i když některé z nich mohou být běžně sdíleny mezi různými kmeny patřícími do stejné taxonomické skupiny, jako je rod [26].

Protože se jedná o biologické organismy, probiotika pravděpodobně vyjadřují více než jeden mechanismus, který může přispět k danému klinickému výsledku, což komplikuje výzkumné úsilí o identifikaci mechanismů probiotické funkce u lidí [27].

Tyto mechanismy zahrnují:

- 1) posílení funkce epiteliální bariéry
- 2) modulaci střevní mikroflóry
- 3) kompetitivní vyloučení a inhibici patogenů
- 4) produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (považováno za typický společný mechanismus sdílený mezi kmeny)
- 5) produkci dalších malých sloučenin s rovněž systémovou aktivitou
- 6) modulaci imunitního systému s kmenově specifickými různorodými aktivitami [28].

Posílení střevní bariéry lze považovat za častý mechanismus sdílený na druhové úrovni mezi kmeny [29]. Střevní mikroflóra hraje důležitou roli při syntéze vitamínu K a několika složek vitamínů skupiny B, podílí se na rozkladu různých fenolických sloučenin, účastní se metabolizace xenobiotik a léků. V neposlední řadě mikroflóra udržuje střevní homeostázu a brání nadměrnému růstu rezistentních patogenů [30].

Například *Lactobacillus rhamnosus* je spojován se zvýšenou funkcí střevní bariéry a expresí epiteliálních proteinů těsného spojení. Naopak, pokud dojde k přemnožení patogenů *Clostridium*, jedná se často o příznak střevní mikrobiální dysbiózy a zvýšené propustnosti střev (tzv. syndrom netěsného střeva) [30]. Ve skutečnosti tvoří střevní epiteliální buňky, které jsou propojené proteiny těsným spojením, hlavní gastrointestinální bariéru chránící hostitele před škodlivými mikroorganismy a toxickými látkami. Při narušení této střevní bariéry se zvyšuje propustnost střeva, což způsobuje onemocnění gastrointestinálního traktu a dysfunkci dalších orgánů [26].

Mikrobiota může také hrát roli ve fungování jiných orgánových systémů včetně mozku [30]. Interakce mikrobioty a hostitele nejen ovlivňují trávicí trakt hostitele, ale jsou také zapojeny do mnoha imunologických a fyziologických reakcí, které ovlivňují různá místa a systémy těla [31].

Ukázalo se také, že normální střevní mikroflóra se účastní zvyšování koncentrací kyseliny pyrohroznové, kyseliny citrónové, kyseliny fumarové a kyseliny jablečné v séru. Tyto metabolity jsou indikátory vyššího energetického metabolismu [29].

V průběhu života člověka mikrobiota kolonizuje střeva od narození a začíná se stabilizovat v prvních letech života. U zdravých dospělých jedinců vykazuje mikrobiota vyšší komplexnost a rozmanitost. Na složení mikrobioty má vliv mnoho faktorů prostředí, z nichž nejdůležitější jsou strava, způsob podávání, užívání léků (antibiotik) a stárnutí [32].

Modulace střevní mikroflóry ve skutečnosti představuje potenciální nástroj pro podporu a obnovu zdraví a lze ji dosáhnout přizpůsobením dostupnosti živin konkrétním prospěšným bakteriím, použitím probiotik [26].



## 2.2.2 Přehled zástupců

Probiotické bakterie patří především do rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Nicméně jsou známí i zástupci patřící mezi sporulující bakterie nebo kvasinky. Přehled nejvýznamnějších zástupců je uveden níže.

- Bakterie mléčného kvašení
  - Rod *Lactobacillus* – *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. brevis*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. cellobiosus*, *L. crispatus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaris*, *L. fermentum*, *L. gallinarum*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. lactis*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*;
  - Rod *Streptococcus* – *Streptococcus salivaris* spp. *thermophiles*;
  - Rod *Lactococcus* – *L. lactis cremoris*;
  - Rod *Leuconostoc* – *Lc. mesenteroides*;
  - Rod *Pediococcus* – *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*.
- Bifidobakterie
  - Rod *Bifidobacterium* – *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. essensis*, *B. infantis*, *B. laterosporum*, *B. thermophilum*, *B. longum*.
- Propionibakterie
  - Rod *Propionibacterium* – *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii*.
- Enterobakterie
  - Rod *Enterococcus* – *E. faecalis*, *E. faecium*.
- Sporulující bakterie
  - Rod *Bacillus* – *B. alcalophilus*, *B. cereus*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. subtilis*.
- Další bakterie
  - Rod *Escherichia coli* – *E. coli*;
  - Rod *Sporolactobacillus* – *S. inulinus*.
- Kvasinky
  - Rod *Saccharomyces* – *S. cerevisiae boulardii* [33]

## 2.2.3 Rod *Lactobacillus*

Tento rod je řazen do čeledi Lactobacillaceae. Jedná se o psychrofilní, nepohyblivé organismy tyčinkovitého tvaru. Jedná se o nesporulující, grampozitivní, fakultativně anaerobní mikroorganismy.

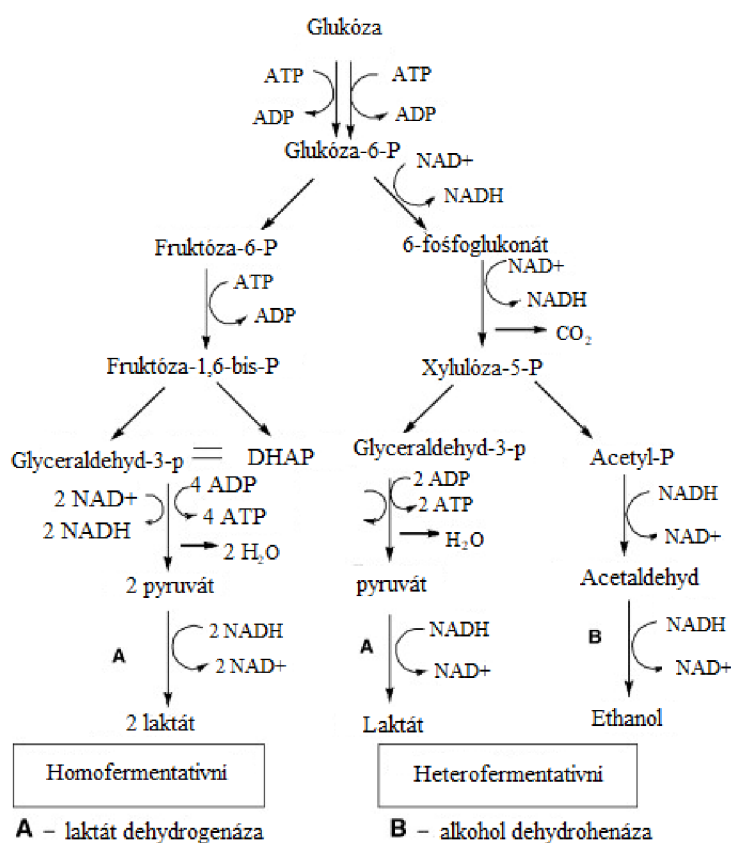
Většina zástupců vyžaduje aktivitu vody nad 0,95, růst se zcela zastaví při aktivitě vody pod 0,92 [34]. Optimální pH pro růst je v rozmezí 5,5–6,5, teplotní rozsah je široký mezi 5–45 °C [35].

Laktobacily mají komplexní nutriční požadavky na aminokyseliny, peptidy, nukleotidové báze, vitamíny, minerály, mastné kyseliny a sacharidy [36].

Homofermentativní druhy fermentují převážně cukry na kyseliny mléčnou [34]. Jsou schopné získat až 85 % kyseliny mléčné z glukózy. Fermentace je ekvivalentní vzniku 2 molů kyseliny mléčné z 1 molu glukózy [35].

Heterofermentativní druhy fermentují cukr (glukózu) na kyselinu mléčnou a další látky jako je ethanol a produkují oxid uhličitý. Tvorba plynu je pravidelně příčinou kažení potravin [34]. Výtěžek kyseliny mléčné je nižší, pohybuje se okolo 50 %. Každý mol glukózy je metabolizován za vzniku 1 molu kyseliny mléčné, 1 molu ethanolu a 1 molu oxidu uhličitého [35]. Srovnání homofermentativního a heterofermentativního metabolismu je zobrazeno na obrázku 3.

Třetí skupinou jsou obligátně heterofermentativní druhy, které vedle kyseliny mléčné produkují také kyselinu octovou a oxid uhličitý [35].



Obrázek 3 – Metabolismus laktobacilů, převzato a upraveno z [36]

## 2.2.4 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* byl historicky uvažován v rámci skupiny BMK především pro produkci kyseliny mléčné a podobné morfologie. Postupem času bylo zjištěno, že mají jedinečný způsob kvašení cukru a jsou fylogeneticky odlišné (příbuznější skupině grampozitivních bakterií *Actinomycetaceae*). Bifidobakterie jsou přirozeným obyvatelům gastrointestinálního traktu lidí a zvířat, s prospěšnými rolemi pro zdraví hostitele [37].

Řadí se mezi grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé anaerobní bakterie [38]. Bifidobakterie se vyznačují speciální metabolickou dráhou, která jim umožňuje produkovat kyselinu octovou a kyselinu mléčnou v molárním poměru 3:2, bez tvorby oxidu uhličitého. Jedná se o vybíravé bakterie náročné na živiny. Optimální pH pro růst se pohybuje mezi pH 6,0–7,0, k inhibici růstu dochází při dosažení pH 4,5–5,0. Jedná se o mezofilní organismy s teplotním optimem 37–41 °C [39].

### 2.2.5 Testování vlastností probiotických kmenů

Podle pokynů pro hodnocení probiotik v potravinách, které zveřejnila společná pracovní skupina FAO/WHO, jsou dva z aktuálně nejrozšířenějších testů *in vitro* odolnost vůči žaludeční kyselosti a žlučovým solím. Další experimenty používané k charakterizaci probiotik jsou produkce antimikrobiálních sloučenin, schopnost modulovat imunitní reakce a adheze ke tkáním střeva. Mechanismus, kterým mohou probiotika antagonizovat patogeny, zahrnuje produkci antimikrobiálních sloučenin, jako je kyselina mléčná, kyselina octová, peroxid vodíku a bakteriociny.

I když jsou zástupci rodu *Lactobacillus* klasifikovány jako GRAS mikroorganismy, a to kvůli jejich dlouhému a bezpečnému používání jako startovací kultury ve fermentovaných produktech, je důležité posoudit bezpečnost těchto mikroorganismů, pokud jsou určeny k využití jako potravinářské přídatné látky. S ohledem na rostoucí obavy z rezistence vůči antibiotikům je třeba analyzovat i potenciální rezistenci probiotik. Probiotické kmeny, stejně jako bakterie používané v potravinách, mohou obsahovat geny rezistence, které mohou být přeneseny na patogenní bakterie. Z tohoto důvodu by probiotické kmeny určené pro trh měly být testovány na přenositelné geny rezistence [40].

### 2.2.6 Praktické využití probiotických bakterií

Probiotika se používají převážně v mléčných výrobcích, protože mléko je příznivé kultivační médium pro probiotika. Probiotické mléčné výrobky však nejsou vhodné pro určité skupiny spotřebitelů, protože přibližně 65 % světové populace trpí intolerancí laktózy a dalšími nemocemi jako je alergie na mléčnou bílkovinu, nebo alergie na přítomnost cholesterolu v mléčných výrobcích. Tyto zdravotní problémy a zvyšující se trend dietních možností, jako je vegetariánství a veganství, podpořily posun k více nemléčným potravinám, jako jsou probioticky fermentované cereálie, nemléčné náhražky mléka a ovocné a zeleninové šťávy [41].

Ovocné šťávy byly navrženy jako ideální substrát pro vývoj nemléčných probiotických nápojů. Kromě zdravých složek ovocných šťáv, jako jsou vitamíny, antioxidanty a fenolické látky, nabízejí také několik výhod pro růst a přežití probiotických mikroorganismů. Konkrétně obsahují vysoký obsah živin a cukrů, které jsou důležité pro růst probiotik a v kombinaci s rychlým průchodem drsným kyselým prostředím žaludku mají za následek vysokou životaschopnost probiotických buněk [42].

Ve studii Conforia et al. (2016) byly vyvinuty nové nemléčné fermentované nápoje z mrkve, jahod, fenyklu, melounu, cibule a rajčat pomocí mikroorganismů komerčního vodního kefiru (obsahoval podle výrobce přibližně  $10^9$  CFU/g zástupců *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Saccharomyces*) [43]. Výsledky ukázaly, že bakterie mléčného kvašení a

kvasinky byly schopny růst v testovaných šťávách, největší zastoupení mikroorganismů bylo stanoveno ve šťávě z melounu. Za spotřebitelsky nej přijatelnější byl přijat kefir z mrkve [43].

### 2.2.7 Prebiotika

V roce 1995 definovali Gibson a Roberfroid prebiotika jako nestravitelnou složku potravy, která příznivě ovlivňuje hostitele selektivní stimulací růstu a/nebo aktivity jedné nebo omezeného počtu bakterií v tlustém střevě, a tím zlepšuje zdraví hostitele [44]. Tato definice brala v potaz pouze mikrobiální změny v lidském střevě. Později byla tato definice rozšířena a redefinována jako „selektivně fermentovaná složka potravy, která umožňuje specifické změny; jak ve složení, tak v aktivitě v gastrointestinální mikrobioty, která má přínos pro pohodu a zdraví hostitele“ [45].

V závislosti na této definici musí prebiotika splňovat následující kritéria, která jsou ověřena testy *in vivo* a *in vitro*:

- a) nestravitelnost (odolnost vůči žaludečním kyselinám s nízkým pH, enzymatickému trávení a střevní adsorpci);
- b) fermentace střevními mikroorganismy;
- c) selektivní stimulace aktivity a růstu střevních bakterií [44].

Přestože probiotika i prebiotika sdílí běžné mechanismy účinku (především při modulaci endogenní flóry), liší se ve složení a metabolismu. Úloha prebiotik v GIT je lépe známá než úloha probiotik. Prebiotika, podobně jako další nestravitelné sacharidy, vykazují osmotický účinek na GIT (dokud nejsou fermentovány) a po fermentaci zvyšují produkci intestinálního plynu [46].

S výjimkou inulinu jsou jako prebiotika známé směsi nestravitelných oligosacharidů (řetězce obsahující 3–10 jednotek). Oligosacharidy jsou nízkomolekulární sacharidy s nízkým stupněm polymerizace. Vykazují vlastnosti typické pro dietní vlákninu a vyskytují se v některých druzích zeleniny jako fruktany (česnek, cibule, chřest a pórek), stachyóza v sójových bobech nebo galaktooligosacharidy v mateřském mléce. Oligosacharidy jsou snadno rozpustné ve vodě, mají mírně sladkou chuť, jsou schopné vázat vodu a mají želírovací schopnosti [47].

Glykosidická vazba je odolná trávicím enzymům, díky čemuž jsou oligosacharidy málo zpracovány v GIT a jsou k dispozici jako substrát pro probiotika. Jsou fermentovány za produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (octová, propionová, máselná, mléčná kyselina) a plynů (oxid uhličitý, vodík, methan) [47].

## 2.3 Pasterace

Pasterace je tepelná úprava, při které se potraviny zahřejí pod 100 °C. Používá se k minimalizaci zdravotních rizik způsobených patogenními mikroorganismy v nekyselých potravinách a k prodloužení trvanlivosti kyselých potravin, jako jsou ovocné šťávy, na několik dní nebo týdnů inaktivaci mikroorganismů a/nebo inaktivaci enzymů [48].

Sterilizace eliminuje nejen živé buňky, ale také spory. Lze použít různé kombinace času a teploty [49]. V praxi mohou přežít některé více tepelně odolné sporotvorné organismy; ty však nejsou patogenní, jsou termofilní povahy a nemohou růst při okolní teplotě skladování. Tento stav se nazývá komerční sterilita [50].

Tepelná pasterizace je mírné tepelné ošetření běžně používané pro konzervaci široké škály potravin. Může však mít negativní vliv na kvalitu potravin, a proto byly objeveny nové technologie pasterizace: vysokotlaké zpracování, pulzní elektrické pole, ohmický ohřev, mikrovlnný ohřev a další. Tyto nekonvenční techniky mohou také ovlivnit vlastnosti potravin v závislosti na potravinové matici a podmínkách ošetření. Je třeba dále pracovat na optimalizaci podmínek procesu, které zaručí bezpečnost potravin a zároveň minimalizují její dopad na kvalitu potravin [51].

Ultrazvuková sterilizace je slibná metoda netepelného zpracování a potenciální alternativa k tradiční tepelné pasterizaci. Aplikace sonifikace by mohla podle nedávných studií vytvořit vysoce kvalitní, mikrobiologicky bezpečné a vysoce nutričně hodnotné šťávy, jako je pomerančový nebo ostružinový džus [52,53]. Bylo zjištěno, že sonifikace je účinná při zvyšování hladiny kyseliny askorbové v jablečné šťávě [54].

Mikrovlnná sterilizace poskytuje podobné výhody jako konvenční sterilizace, ale může dále zlepšit kvalitu produktu a zkrátit dobu vystavení energii, proto si zachovává přirozenější organoleptické vlastnosti šťávy a má nižší riziko, že způsobí ztrátu rozhodujících termolabilních živin [55].

Ultra-vysokotlaká sterilizace je nová sterilizační technologie, která umožňuje zpracovávat různé druhy potravin v kontinuální tekutině, s vysokou účinností inaktivuje patogenní a většinu kvasnic se mikroorganismů. Jednou z hlavních výhod této metody je, že méně poškozuje funkční a nutriční vlastnosti ovocné šťávy, jako je její antioxidační kapacita, složení fenolických látek a obsah provitaminu A, vitamínu C, ve srovnání s běžně používanými tepelnými úpravami [54,52].

Evropská komise zařadila produkty ošetřené vysokým tlakem do kategorie nových potravin regulovaných legislativou. Stručně řečeno, různé způsoby sterilizace mají své vlastnosti, výhody a nevýhody, a proto mají různé účinky na suroviny [52].

### **2.3.1 Změny bioaktivních látek během pasterace**

Dosud byla dokumentována široká škála reakcí na pasterizaci, od žádné změny až po významný pokles [56,57,58]. Zdá se, že jednoduchý tepelný rozklad je nejpravděpodobnější příčinou ztrát bioaktivních sloučenin po sterilizaci, a to závisí na jejich chemické struktuře, přičemž molekuly sestávající z nenasycené struktury jsou náchylnější k degradaci. Kromě toho může rozpuštěný kyslík v tekutých potravinách zvýšit rychlost degradace bioaktivních sloučenin [59].

Hlavní sledovanou látkou většiny studií byl vitamín C, dochází také k poklesu glukosinolatů, karotenoidů, anthokyanů, fenolických látek, tokoferolů nebo flavonoidů [56,57,58,59].

Vitamín C je přítomen v ovoci a zelenině, často se také přidává během zpracování, aby se zabránilo zejména enzymatickému hnědnutí. Ačkoli byl vitamín C pravděpodobně nejvíce studovaným vitamínem, pokud jde o ztráty během tepelných úprav, stále existují nedostatky v pochopení jeho ztráty. Vitamín C se skládá ze dvou sloučenin, z nichž obě nesou vlastnost vitamínu: kyselina askorbová (redukováná forma) a kyselina dehydroaskorbová (oxidovaná

forma). Plody mohou obsahovat obě formy, přičemž poměry se liší v závislosti na druhu, fyziologickém stavu apod. Tyto molekuly mají různou náchylnost k oxidaci a tepelné degradaci. Kyselina askorbová může být snadno oxidována a převáděna sdruženou oxidačně-redukční reakcí s chinony polyfenolů na kyselinu dehydroaskorbovou. Oxidace polyfenolů tak vede ke ztrátě kyseliny askorbové. Kyselina dehydroaskorbová může být dále hydrolyzována na kyselinu 2,3-diketoglutarovou, která následuje reakční řetězec degradace cukru. Kyselina askorbová je tedy vysoce citlivá na degradaci oxidací, ale je velmi stabilní v anaerobních podmínkách. Naopak kyselina dehydroaskorbová je citlivá na Streckerovu tepelnou degradaci nezávisle na koncentraci kyslíku. Kyslík může být limitujícím činidlem, zejména v hermeticky uzavřených nádobách nebo v uzavřených procesních smyčkách. Jakmile je zásobárna rozpuštěného kyslíku vyčerpána, degradace kyseliny askorbové se zastaví nebo se alespoň zpomalí [49].

Dietní vláknina odpovídá polysacharidům (a stopám ligninu), které tvoří jejich buněčné stěny. Tepelné ošetření má omezený vliv na celkový obsah vlákniny. Obecně vede k modifikaci rovnováhy rozpustné/nerozpustné vlákniny zvýšením rozpustné vlákniny v důsledku degradace pektinu [49].

## 2.4 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla vynalezena Mullisem v roce 1983 a patentována v roce 1985. Její princip je založen na použití DNA polymerázy, jedná se tedy o *in vitro* replikace specifických sekvencí DNA. Tato metoda může generovat desítky miliard kopií konkrétního fragmentu DNA (cílové DNA) z templátu DNA [60].

### 2.4.1 Průběh PCR reakce

PCR zahrnuje enzymatickou syntézu milionů kopií specifického segmentu DNA. Exponenciální amplifikace velmi malého množství templátové DNA je dosaženo použitím tepelně stabilní DNA polymerázy a automatizovaného tepelného bloku, který je schopen rychlých změn teploty.

Molekula templátové DNA je zpočátku denaturována na dva jednotlivé řetězce zahřátím na vysokou teplotu (typicky 90–95 °C) v první fázi cyklu PCR.

Druhá fáze cyklu spočívá v ochlazení reakce, což umožňuje nasedání jednořetězcových oligonukleotidových primerů na denaturovanou templátovou molekulu. Dva malé oligonukleotidy, které jsou komplementární k sekvencím na opačných vláčknech templátové molekuly a které lemují segment DNA, který má být amplifikován, se používají jako primery pro DNA polymerázu.

Třetím stupněm reakce je prodloužení nového vlákna z temperovaného primeru ve směru 5' až 3' tepelně stabilní polymerázou. To se provádí při optimální teplotě pro polymerázu (68–72 °C).

Po prvním cyklu byla každá templátová molekula amplifikována na dvě molekuly. Ty jsou zase denaturovány v dalším cyklu a amplifikovány za vzniku čtyř molekul. Čtyři molekuly jsou zesíleny na osm ve třetím cyklu a tak dále. Každý následující cyklus účinně zdvojnásobuje množství produktu DNA. Třífázový cyklus denaturace, nasedání a extenze primeru se

v typickém postupu PCR opakuje 25–40krát. Produktem takové reakce je velké množství dvouvláknové molekuly DNA, jejíž délka je určena vzdáleností mezi primery. Produkty PCR jsou vizualizovány elektroforézou následovanou barvením fluorescenčními barvivy nebo hybridizací se značenými oligonukleotidovými sondami [61].

#### **2.4.2 Složení reakční směsi**

PCR se provádí v pufované reakční směsi sestávající z páru primerů, templátové DNA, DNA polymerázy, hořčnatých ( $Mg^{2+}$ ) iontů a deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP). Pufr udržuje pH reakční směsi a dodává draselné ( $K^+$ ) nebo amonné ( $NH_4^+$ ) ionty pro optimální enzymatickou aktivitu. Tyto ionty podporují nasedání primerů na templátovou DNA, destabilizují nedokonalou vazbu mezi primery a necílovými oblastmi a zvyšují specifitu PCR [62].

Primery se vážou na požadované segmenty DNA a vymezují je, což umožňuje syntézu DNA pomocí DNA polymeráz [62]. Nejčastěji používanou polymerázou je enzym izolovaný z *Thermus aquaticus* (Taq DNA polymeráza) [61].

#### **2.4.3 Výhoda využití PCR pro detekci a identifikaci laktobacilů**

Laktobacily je často obtížné od sebe odlišit klasickými mikrobiologickými technikami, protože většina z nich má podobné nutriční a růstové požadavky, dále je také analýza fenotypových charakteristik časově náročná. Rychlé a přesné analytické techniky jsou důležité pro kontrolu kvality probiotických produktů, *in situ* identifikaci probiotik a monitorování, a proto se moderní molekulární techniky stávají stále důležitější. Pro analýzu genotypových charakteristik bylo široce přijato několik technik, včetně hybridizace DNA-DNA, elektroforézy celobuněčného proteinu na gelu s dodecylsulfátem sodným a polyakrylamidem a analýzy náhodně amplifikované polymorfni DNA [63]. V současnosti se pro bakteriální taxonomii a identifikaci běžně používají identifikační metody využívající sekvence genu 16S rRNA. Obecně platí, že kmeny, které vykazují >98% podobnost v sekvenci tohoto genu, jsou považovány za stejný druh [64].

Naproti tomu metody identifikace bakteriálních druhů založené na PCR jsou obecně považovány za rychlé, jednoduché a přesné [64]. RT-PCR poskytuje možnost monitorovat průběh PCR reakce. Nepřetržité monitorování fluorescence umožňuje kvantifikaci počátečního počtu kopií, zatímco kontinuální monitorování pomalého zahřívání poskytuje kvalitativní informace o ampliconu po PCR. Teplota tání, při které taje duplex DNA, poskytuje informaci o konkrétní sekvenci [62].

### **3 CÍLE PRÁCE**

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) rešerše - technologie výroby kysaného zelí, složení nálevu
- 2) metody identifikace a charakterizace hlavních složek nálevu (mléčné bakterie, chemické složení)
- 3) optimalizace postupu stabilizace zelné šťávy pasterací
- 4) vývoj směsných ovocno-zeleninových šťáv na bázi nálevu z kysaného zelí, jejich charakterizace a stabilizace
- 5) senzorická analýza směsných šťáv



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie pro analýzy

ABTS, Sigma-Aldrich (SRN)  
Dusitan sodný, LachNer (ČR)  
Chlorid hlinitý, LachNer (ČR)  
Ethanol UV-VIS, LachNer (ČR)  
Fenol, LachNer (ČR)  
Folin-Ciaultovo činidlo, LachNer (ČR)  
D-fruktóza, Sigma-Aldrich (SRN)  
D-glukóza, Sigma-Aldrich (SRN)  
Hexakvanoželeznatan draselný, Lachema (ČR)  
Hydrogenarseničnan sodný, Sigma-Aldrich (SRN)  
Hydrogenuhličitan sodný, LachNer (ČR)  
Hydroxid sodný, LachNer (ČR)  
Katechin, Sigma-Aldrich (SRN)  
Kyselina citrónová, Sigma-Aldrich (SRN)  
Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (SRN)  
Kyselina L-mléčná, Sigma-Aldrich (SRN)  
Kyselina octová 99,8%, LachNer (ČR)  
Kyselina octová, Sigma-Aldrich (SRN)  
Kyselina sírová 96%, LachNer (ČR)  
Molybdenan amonný, LachNer (ČR)  
Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (SRN)  
Propidiumjodid, eBioscience (USA)  
Sacharóza, Sigma-Aldrich (SRN)  
Síran měďnatý pentahydrát, LachNer (ČR)  
Síran sodný, LachNer (ČR)  
Síran zinečnatý, LachNer (ČR)  
Trolox, Sigma-Aldrich (SRN)  
Uhličitan sodný, LachNer (ČR)  
Vínan sodno-draselný, Lachema (ČR)

### 4.2 Použité chemikálie pro kultivace

Agar powder, Himedia (IND)  
Endo agar, Himedia (IND)  
LB broth, Miller, Sigma-Aldrich (SRN)  
MRS, Himedia (IND)  
McConkey médium, Himedia (IND)  
YPD broth, Sigma-Aldrich (SRN)  
HiCrome Listeria Itavian-Agosti Agar, Himedia (IND)  
L. mono Enrichment Supplement I, Listeria selective supplement, Himedia (IND)

### 4.3 Použité chemikálie pro buněčné linie

Antibiotic-Antimycotic 100X (Biosera), Biotech (SRN)  
Dodecylsírán sodný, Serva (SRN)  
EMEM médium - Sigma-Aldrich (SRN)  
Ethanol pro UV/VIS, Lach:ner (ČR)  
Fetální bovinní sérum, HyClone (USA)  
Kyselina chlorovodíková, LachNer (ČR)  
MTT, Duchefa Biochemie (NL)  
Trypsin, Versene EDTA, P-Lab (ČR)  
Trypanová modř, Biotech (SRN)

### 4.4 Použité chemikálie pro PCR a elektroforézu

Agaróza pro elektroforézu, Serva, Heidelberg, (SRN)  
DNA standard FastGene 100 bp DNA Ladder, Malamité (ČR)  
Ethanol p.a., Penta, Chrudim (ČR)  
Ethylendiamintetraoctová kyselina, Serva, Heidelberg (SRN)  
GelRed, Biotium (USA)  
Midori Green Advance, Elisabeth Pharmacon (ČR)  
Omni DNA extraction kit, Elisabeth Pharmacon (ČR)  
PCR ultra H<sub>2</sub>O, Top-Bio (ČR)  
Primery, Elisabeth Pharmacon (ČR)  
Red load, Top-Bio (ČR)  
qPCR 2x SYTO-9, Master Mix, Top-Bio (ČR)  
Tris-báze (Tris-hydroxymethyl-aminomethan), Serva, Heidelberg, (SRN)

### 4.5 Použité přístroje

Analytické váhy, Boeco (SRN)  
CellCulture CO<sub>2</sub> Inkubátor, ESCO (SRN)  
Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (SRN)  
Centrifuga miniSpin plus, Eppendorf (SRN)  
Cycler Rotor-gene 6000, Corbett Life Science (USA)  
ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (SRN)  
HPLC sestava Ultimate 3000 s UV/VIS a RI detektorem –Thermo Fisher (USA)  
Inverzní biologický mikroskop I-101 L-scientific, Laboserv (ČR)  
Nanodrop - NanoPhotometer® N60, IMPLEN (SRN)  
PCR box, Biosan (LT)  
Průtokový cytometr Apogee A50, Apogee Flow Systems (GB)  
Předvážky Ohaus, ScoutPro (USA)  
Spektrofotometr, Helios δ, Unicam (GB)  
Termostat INCU-Line, VWR (USA)  
Transluminátor Azure Biosystems c200, Thermo Fisher Scientific (USA)  
Vortex, Vitrum (SRN)

Zařízení na elektroforézu Easy – Cast, Owl Scientific (USA)

Zdroj elektrického napětí na elektroforézu Enduro 300 V, Labnet International (USA)

#### 4.6 Analyzované vzorky

Jako hlavní vzorek byla v práci použita Tuřanská zelná šťáva (obrázek 4). Složení zelné šťávy uvedené na obale: šťáva z kysaného zelí, sůl a kmín. Výživové údaje uvedené výrobcem na 100 ml: energetická hodnota: 45 kJ/11 kcal, tuky 0,1 g (z toho nasycené mastné kyseliny <0,1 g), sacharidy 1,6 g (z toho cukry 1,0 g), bílkoviny 0,3 g, sůl 2 g.

Pro senzorickou analýzu byl dále použit džus Jablko řepa značky Albert (lisovaný za studena, pasterovaný), který obsahuje 60 % jablečné šťávy a 40 % šťávy z červené řepy. Výživové údaje uvedené výrobcem na 100 ml: energetická hodnota 183 kJ/43 kcal, tuky 0,1 g (z toho nasycené mastné kyseliny 0,1 g), sacharidy 10,2 g (z toho cukry 10,0 g), bílkoviny 0,5 g, sůl 0,04 g.



Obrázek 4 – ukázka použitých výrobků k analýze

#### 4.7 Použitá buněčná linie

Pro *in vitro* testování byla zvolena adherentní buněčná linie Caco-2 ze sbírky buněčných kultur Cell Lines Services (Německo).

#### 4.8 Použité bakteriální kultury

Bakteriální kultury, které byly v práci použity, jsou uvedené v tabulce 1 a byly získány z České sbírky mikroorganismů, Brno, ČR (Czech Collection of Microorganisms, CCM).

Tabulka 1 – Kultury použité v experimentální části

<b>Čisté bakteriální kultury</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 4833
<i>Lactobacillus casei</i> 4798
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 7190
<i>Lactobacillus plantarum</i> 7039

#### 4.9 Pasterace vzorků

Vzorek čerstvé zelné šťávy byl zahříván po dobu různé kombinace teploty a času pro dosažení pasteračního efektu. Zvolené kombinace teploty a doby záhřevu jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 – Pasterační zákroky

<b>Aplikované pasterační zákroky</b>
teplota 70 °C po dobu 3 minut
teplota 80 °C po dobu 2 minut
teplota 90 °C po dobu 1 minuty
teplota 90 °C po dobu 0,5 minuty

#### 4.10 Měření pH

Před vlastním stanovením byla provedena kalibrace pH metru standardními pufrů (pH 7,01 a 4,01). Hodnota pH byla stanovena třemi měřeními a zaznamenána na 2 desetinná místa. Z naměřených hodnot byla stanovena průměrná hodnota.

#### 4.11 Spektrofotometrické analýzy

##### 4.11.1 Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu fenolických látek

K 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla zředěného vodou 1:9 byl přidán 1 ml vody a 50 µl vzorku. Po promíchání se roztok nechal pět minut stát a poté bylo přidáno 1,5 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Po promíchání a 15minutovém stání byla měřena absorbance při 750 nm. Jako kalibrační roztok byla použita kyselina gallová v koncentračním rozmezí 0,1–0,7 mg/ml. Výsledná koncentrace fenolických látek byla vypočítána pomocí následující kalibrační rovnice.

$$A = 1,2498 \cdot c$$

$$R^2 = 0,980 \quad (1)$$

##### 4.11.2 Spektrofotometrické stanovení flavonoidů

K 0,5 ml stanovovaného vzorku bylo přidáno 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% dusitanu sodného. Po promíchání se roztok nechal 5 minut stát a potom byl přidán 0,2 ml 10% chloridu hlinitého. Po promíchání se nechal roztok pět minut stát a poté byl přidán 1,5 ml 1 M roztoku hydroxidů sodného a 1 ml destilované vody. Roztok se nechal 15 minut stát. Poté byla změřena

absorbance při 510 nm. Jako kalibrační roztok byl použit roztok katechinu v ethanolu v koncentračním rozmezí 0,05–0,3 mg/ml. Výsledná koncentrace flavonoidů byla vypočítána pomocí následující kalibrační rovnice.

$$\begin{aligned} A &= 3,0062 \cdot c \\ R^2 &= 0,995 \end{aligned} \quad (2)$$

#### 4.11.3 Spektrofotometrické stanovení antioxidační kapacity

ABTS bylo rozpuštěno v destilované vodě na koncentraci  $c=7$  mmol/l. Radikálový kationt  $ABTS^{*+}$  byl získán reakcí s 2,45 mmol/l peroxidisíranu draselného. Roztok byl ponechán nejméně 12 hodin ve tmě při laboratorní teplotě. Před použitím byl radikál zředěný ethanolom na absorbanci  $A=0,700 \pm 0,020$  při 734 nm proti ethanolu. Do zúžené kyvety byl napipetován 1 ml radikálu, následně bylo přidáno 10  $\mu$ l extraktu a byl zaznamenán pokles absorbance po 10 minutách. Blank byl připraven použitím 10  $\mu$ l destilované vody. Pro kalibraci byl připraven roztok Troloxu v rozmezí koncentrací 50–400  $\mu$ g/ml. Celková antioxidační aktivita byla vypočítána pomocí následující kalibrační rovnice a vyjádřena jako hodnota TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

$$\begin{aligned} A &= 0,0011 \cdot c \\ R^2 &= 0,986 \end{aligned} \quad (3)$$

#### 4.11.4 Stanovení sacharidů podle Duboise

K 1 ml vzorku byl přidán 1 ml 5% fenolu s 5 ml koncentrované  $H_2SO_4$ . Roztok byl ihned zamíchán a po dobu 30 minut byl inkubován při laboratorní teplotě. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 490 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí roztoku glukózy o koncentraci v rozmezí 0,02–0,1 mg/ml. Výsledná koncentrace celkových sacharidů byla vypočítána pomocí následující kalibrační rovnice.

$$\begin{aligned} A &= 6,576 \cdot c \\ R^2 &= 0,992 \end{aligned} \quad (4)$$

#### 4.11.5 Stanovení redukujících cukrů podle Somogyi-Nelsona

K 1 ml vzorku bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II. Následně byl vzorek umístěn do vroucí lázně po dobu 10 minut. Poté byl vzorek ochlazen tekoucí vodou na laboratorní teplotu. K ochlazeného vzorku bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III. Vzniklý oxid měďný byl rozpuštěn promícháním na vortexu. Nakonec byl doplněn objem na 10 ml a byla proměřena absorbance při 720 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí roztoku glukózy o koncentraci v rozmezí 0,01 – 0,1 g/l.

$$\begin{aligned} A &= 17,438 \cdot c \\ R^2 &= 0,995 \end{aligned} \quad (5)$$

- Somogyi-Nelsonovo činidlo I  
12 g uhličitanu sodného, 8 g hydrogenuhličitanu sodného a 6 g vinanu sodno-draselného bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. 72 g síranu sodného bylo rozpuštěno v 300 ml destilované vody. Oba roztoky byly poté smíchány.
- Somogyi-Nelsonovo činidlo II  
4 g pentahydrátu síranu měďnatého a 24 g síranu sodného bylo rozpuštěno ve 200 ml destilované vody.
- Somogyi-Nelsonovo činidlo III  
25 g molybdenanu amonného bylo rozpuštěno v 450 ml destilované vody. Do roztoku bylo přidáno 21 ml koncentrované kyseliny sírové. 3 g heptahydrátu arseničnanu sodného byly rozpuštěny v 25 ml destilované vody a oba roztoky byly smíchány. Připravený roztok byl ponechán po dobu 48 hodin ve tmě při laboratorní teplotě.

#### 4.12 Úprava vzorků před analýzou

K 0,1 ml vzorku bylo přidáno 9,9 ml destilované vody. Ke zředěnému vzorku bylo přidáno 0,5 ml Carrezova činidla I a po promíchání bylo pomalu přidáno 0,5 ml Carrezova činidla II. Vzorek byl poté 5 minut centrifugován při 8 000 otáčkách za minutu. Vyčištěný vzorek byl připraven k analýzám pomocí kapalinové chromatografie.

- Carrezovo činidlo I  
219 g dihydrátu octanu zinečnatého a 30 g 99,8% kyseliny octové bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody.
- Carrezovo činidlo II  
106 g hexakvanoželeznatanu draselného bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody.

### 4.13 Analýza pomocí kapalinové chromatografie

Pro analýzu vybraných zástupců organických kyselin a cukrů byla použita metoda kapalinové chromatografie (HPLC) s reverzní fází. Měření probíhalo na přístroji Ultimate 3 000.

Vzorky byly nanášeny na kolonu pomocí dávkovací smyčky o objemu 20 µl. Dělení směsi probíhalo na koloně Rezex™ ROA-Organic Acid H+ (8%), LC Column 300 x 7,8 mm při 30 °C. Jako mobilní fáze byla použita 5 mmol kyselina sírová a průtok byl po optimalizaci zvolen 0,2 ml/min. Pro detekci cukrů byl použit refraktometrický detektor, pro detekci organických kyselin UV/VIS detektor při vlnové délce 210 nm. Ze získaných chromatogramů byly zjištěny plochy píků a sestaveny kalibrační křivky (rozmezí 0,2–5 mg/ml) pro kvantitativní stanovení vybraných látek. Získané kalibrační rovnice jsou uvedeny v tabulce 3. Obdobně byly proměřeny vzorky, které byly před vlastním stanovením vyčerény podle postupu v bodě 4.12 a jejich koncentrace byla stanovena pomocí kalibrační křivky.

Tabulka 3 – Rovnice kalibračních křivek pro vybrané stanovované látky

Vzorek	Rovnice kalibrační křivky	Retenční čas [min]	
Kyselina citrónová	$y = 33,585 \cdot x + 0,226$	8,173	(6)
Sacharóza	$y = 9,101 \cdot x - 2,790$	8,242	(7)
D–Glukóza	$y = 5,995 \cdot x + 0,183$	9,425	(8)
Kyselina L–askorbová	$y = 172,650 \cdot x - 0,672$	9,740	(9)
D–Fruktóza	$y = 6,115 \cdot x - 0,001$	10,050	(10)
Kyselina L–mléčná	$y = 38,610 \cdot x - 1,630$	11,860	(11)
Kyselina octová	$y = 52,703 \cdot x + 33,164$	14,047	(12)

### 4.14 Kultivace mikroorganismů obsažených v zelné šťávě

Vzorek čerstvé zelné šťávy byl křížovým roztěrem přenesen na Petriho misku s vybraným médiem a byl kultivován při 37 °C po dobu 24–72 hodin. Vzhled na misce byl kontrolován a vyhodnocen vizuálně. Pro kultivaci byly použity následující média – YPD médium pro růst kvasinek, LB médium pro růst bakterií, MRS médium pro růst laktobacilů, McConkey agar a Endův agar pro růst gramnegativních bakterií. Pro selektivní kultivaci listerií bylo připraveno médium podle návodu s přidavkem suplementů pro rozlišení kolonií.

### 4.15 Spektrofotometrické stanovení zákalu

Do 96 jamkové destičky bylo napipetováno 230 µl tekutého média připraveného dle návodu a 25 µl vzorku šťávy kysaného zelí. Stanovení bylo provedeno v triplicátech. Pro sledování byly použity 3 různá média pro kultivaci různých skupin mikroorganismů – LB medium, MRS medium a YPD medium. Byl sledován růst mikroorganismů v podobě změny zákalu při 630 nm v čase 0 a po 24 hodinách pomocí přístroje ELISA readeru. Z rozdílu hodnot absorbcí v čase byl poté vyhodnocen nárůst/úbytek buněk.

#### **4.16 Kultivace bakterií rodu *Lactobacillus***

Bakteriální kultury *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* a *Lactobacillus plantarum* byly kultivovány v komerčním MRS médiu, které bylo připraveno podle návodu na obalu (5,15 g MRS média na 100 ml vody), a sterilováno 60 minut v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem. Práce s probiotickými bakteriemi byla prováděna ve sterilním laminárním boxu. Připravené sterilní médium bylo přelito do plastových zkumavek, které byly zaočkovány inokulem dané probiotické kultury. Kultivace probíhala v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin.

#### **4.17 Růstová křivka**

U všech probiotických kmenů uvedených v kapitole 4.8 byla změřena růstová křivka ve třech různých prostředích. Jako kultivační médium byly použity čerstvá zelná šťáva, džus smíchaný se zelnou šťávou v poměru 2:1 a tekuté MRS médium. Na kultivaci byla použita 96 jamková destička, do každé jamky bylo napipetováno 200 µl příslušného média, přidáno 100 µl vodné suspenze probiotických buněk o koncentraci 10<sup>5</sup> buněk v 1 ml. Chování buněk v jednotlivých prostředích bylo sledováno po dobu 24 hodin ve 30minutových intervalech při vlnové délce 630 nm.

#### **4.18 Obohacení pasterované zelné šťávy probiotickými bakteriemi**

Vybrané čisté kultury byly nejprve kultivovány v MRS médiu podle návodu v bodě 4.16. Po 24 hodinách růstu byly zpracovány podle bodu 4.19.1. Po zjištění obsahu buněk pomocí průtokové cytometrie byly buněčné kultury naředěny na výslednou koncentraci 10<sup>5</sup> buněk. Čerstvá zelná šťáva, která byla pasterována při 90 °C po dobu 0,5 minuty, byla zaočkována vytvořenou suspenzí v poměru 1:14. Takto připravená zelná šťáva se ponechala kultivovat 24 hodin při 37 °C. Po uplynutí byly zaočkované vzorky přesunuty do lednice o teplotě 8 °C, kde byly skladovány po dobu dvou týdnů.

#### **4.19 Stanovení počtu a viability buněk bakterií rodu *Lactobacillus***

##### **4.19.1 Příprava kultury**

Bakteriální kmeny uvedené v kapitole 4.8 byly kultivovány podle postupu v bodě 4.16. Po uplynutí 24 hodin byly vzorky centrifugovány při 2 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl odlit, bylo přidáno 5 ml sterilního PBS. Buňky byly rozsuspendovány a opět zcentrifukovány za stejných podmínek. Supernatant byl odlit a získaný sediment buněk byl rozsuspendován v 10 ml destilované vody.

##### **4.19.2 Průtoková cytometrie**

Pro toto stanovení byla použita vodná suspenze buněk připravená podle postupu v bodě 4.19.1, která byla tisíckrát naředěna destilovanou vodou. Ke stanovení viability bylo k 1 ml suspenze přidáno 5 µl propidiumjodidu (koncentrace 1 mg/ml). Po přidavku propidiumjodidu byly



vzorky ponechány 15 minut ve tmě. Následně proběhla analýza na průtokovém cytometru pro stanovení počtu buněk a určení procentuálního zastoupení živých buněk.

## **4.20 Izolace bakteriální DNA a PCR**

### **4.20.1 Izolace DNA**

Pro izolaci DNA byl použit komerční set – Omni Bacteria DNA Kit. Byl odebrán 1 ml buněčných kultur. Odebraný vzorek byl centrifugován po dobu 10 minut při 4 000 x g. Supernatant byl odlit. K sedimentu bylo přidáno 200 µl TE pufru, peletka byla rozsuspendována. Následně bylo přidáno 10 µl lysozymu a probíhala inkubace ve vodní lázni po dobu 10 minut při 37 °C. Následně bylo přidáno 25 µl roztoku proteázy a 100 µl DLB pufru. Směs byla vortexována po dobu 10 sekund a po důkladném promíchání probíhala inkubace při 55 °C po dobu 1 hodiny. Po inkubaci bylo do směsi přidáno 5 µl RNázy A, směs byla promíchána a probíhala inkubace po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Obsah zkumavky byl zcentrifugován při 10 000 x g po dobu 2 minut. Supernatant byl odlit do nové 1,5 ml zkumavky bez porušení peletky. K supernatantu bylo pak přidáno 220 µl BB pufru, směs byla promíchána na vortexu a poté inkubována při 65 °C po dobu 10 minut. Po inkubaci bylo přidáno 220 µl 100% ethanolu a směs byla míchána 20 sekund při maximální rychlosti. Do sběrné zkumavky o objemu 2 ml byla vložena kolonka Omni DNA Mini Column. Vzorek byl následně do této kolonky nalit včetně jakýchkoliv precipitátů a následně proběhla centrifugace po dobu 1 min při 10 000 x g. Byl odlit supernatant a kolonka byla vložena zpět do sběrné nádoby. Poté bylo přidáno 500 µl CBH pufru a provedena centrifugace při 10 000 x g po dobu 1 minuty. Filtrát byl znovu odstraněn a kolonka byla vložena do čisté zkumavky. Následně bylo napipetováno 700 µl DW pufru. Směs byla centrifugována při 10 000 x g po dobu 1 minuty. Po odlití supernatantu byl opakován krok s přidavkem 700 µl DW pufru a následnou centrifugací. Poté byla provedena centrifugace při 10 000 x g po dobu 2 minut, aby došlo k vysušení. Kolonka byla následně vložena do čisté Eppendorfovy zkumavky a na kolonku bylo napipetováno 50 µl EB pufru předehřátého na 65 °C. Po 5 minutách stání při 65 °C byla zkumavka zcentrifugována po dobu 1 minuty při 10 000 x g a DNA byla eluována do roztoku EB pufru.

### **4.20.2 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované DNA**

Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena na přístroji Nanodrop 2000. Vzorek nukleové kyseliny byl nanesen na kyvetu a proměřen v rozsahu vlnových délek 220–330 nm. Nukleová kyselina byla následně naředěna na koncentraci 10 ng/µl. Takto připravená DNA byla použita pro polymerázovou řetězovou reakci.

### **4.20.3 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase RT-PCR**

Všechny komponenty byly nejprve rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány. V boxu byla sterilně smíchána PCR směs, jejíž složení je uvedené v tabulce 4.

Tabulka 4 – reakční komponenty pro PCR

Komponenta	Množství [μl]
Voda pro PCR	9,5
SYTO-9 qPCR 2x Master Mix	12,5
Primer 1 (10 pmol/μl)	1
Primer 2 (10 pmol/μl)	1
Vlastní DNA	1

Sekvence zvolených primerů, které jsou specifické pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druhově specifické PCR se nachází v tabulce 5.

Tabulka 5 – Specifické primery

Primer	Sekvence (5' - 3')	Velikost produktu (bp)
<i>Doména Bacteria</i>		
1	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T
2	R_ub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT
		466
<i>Rod Lactobacillus</i>		
1	F_allact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA
2	R_allact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT
		92
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		
1	Aci 16SI	AGC TGA ACC AAC AGA TTC AC
2	16SII	ACT ACC AGG GTA TCT ATT CC
		800
<i>Lactobacillus casei</i>		
1	PrI	CAG ACT GAA AGT CTG ACG G
2	CasII	GCG ATG CGA ATT TCT TTT TC
		132
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		
1	R_delb	CAC TTG TAC GTT GAA AAC TGA ATA TCT TAA
2	F_delbr	CGA ACT CTC TCG GTC GCT TT
		94
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
1	Lfpr	GCC GCC TAA GGT GGG ACA GAT
2	PlanII	TAA CCT AAC GGT AAA TGC GA
		400 200

Následně byla zahájena amplifikace s využitím konkrétního teplotního profilu pro dané primery. Teplotní programy jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 – teplotní programy PCR

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA	Melt analýza
<i>Doména Bacteria</i>					50–99 °C/ 5 s pro každý stupeň
94 °C/5 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min	
	30 cyklů				
<i>Rod Lactobacillus</i>					
95 °C/5 min	94 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min	
	30 cyklů				
<i>Lactobacillus acidophilus</i>					
94 °C/5 min	94 °C/30 s	58 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min	
	35 cyklů				
<i>Lactobacillus casei</i>					
94 °C/5 min	94 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min	
	30 cyklů				
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>					
95 °C/5 min	94 °C/1 min	58 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/5 min	
	35 cyklů				
<i>Lactobacillus plantarum</i>					
94 °C/5 min	94 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min	
	30 cyklů				

#### 4.20.4 Detekce produktů PCR pomocí elektroforézy

Nejprve byl připraven 1,2% agarózový gel pro detekci PCR produktů, kdy byla navážka rozpuštěna v 0,5×TBE pufru. Suspenze byla rozvařena v mikrovlnné troubě. Po vychladnutí na teplotu cca 60 °C bylo přidáno fluorescenční barvivo Midori Green (5 µl barviva/100 ml). Suspenze byla nalita do připravené formy. Gel byl ponechán k tuhnutí po dobu 30 minut a do komůrek vzniklých po vyjmutí hřebínku byly nanášeny produkty PCR smíšené v poměru 5:1 s nanášecím pufrům Red load. Do jedné z komůrek byl nanášen DNA standard (100 bp) o objemu 5 µl (dle doporučení výrobce), obsahující fragmenty DNA o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp. Po vložení do elektroforetické vany byl gel převrstven 0,5 × TBE 0, pufrům do výšky 5 cm nad gel. Elektroforéza probíhala po dobu 1,5–2 hodiny při konstantním napětí 60 V. Gel byl vyhodnocen v UV světle na transluminátoru TVR- 3121 při vlnové délce 305 nm.

#### 4.21 Testování na buněčné linii Caco-2

##### 4.21.1 Kultivace buněčné linie Caco-2

Buněčná linie byla hlubokozmrazená ve speciálních zkumavkách s kryoprotektantem DMSO.

Po rozmražení byly buňky přeneseny do zkumavky obsahující PBS pufr a následně zcentrifugované (5 minut, 230 rcf). Poté byl odlit supernatant a buňky byly rozsuspendované v 5 ml média a přeneseny do kultivační lahvičky.

Kultura byla po rozmrazení překontrolována mikroskopem a uchovávána v termostatu při teplotě 37 °C, 5% obsahem CO<sub>2</sub> a 95% vlhkostí.

Kultivační médium bylo měněno dle potřeby, 2–3krát týdně. Po dosažení 70–80% konfluence bylo provedeno pasážování.

Z kultivační lahvičky bylo odstraněno médium. Buňky byly opakovaně promyty PBS puftrem, poté byl přidán trypsin, a buňky byly inkubovány 5 minut. Následně byl obsah kultivační lahvičky přenesen do centrifugační zkumavky a stočen na centrifuze (5 minut, 300 rcf). Supernatant byl slit, peleta buněk byla rozsuspendována v 5 ml média a přenesena do lahviček, které byly doplněny médiem na požadovaný objem.

#### **4.21.2 MTT test**

Na vlastní MTT stanovení je potřeba 100 µl média s koncentrací  $1,5 \cdot 10^4$  buněk na jednu jamku mikrotitrační destičky. Počet buněk byl zjištěn pomocí barvení trypanovou modří a následně bylo provedeno vhodné ředění.

Připravená suspenze buněk byla napipetována po 100 µl na 96-jamkovou mikrotitrační destičku. Buňky byly uloženy do termostatu po dobu 24 hodin. Po uplynutí 24 hodin bylo odpipetované médium a přidáno 100 µl testovaných vzorků. Takto připravená destička byla ponechána 24 hodin v inkubátoru. Poté byly jednotlivé vzorky odpipetované a do každé jamky bylo přidáno 20 µl MTT v PBS. Buňky byly ponechány 3 hodiny v inkubátoru, následně byl odpipetován obsah destiček, bylo přidáno 100 µl 10% SDS. Destička byla obalená alobalem a ponechána ve tmě 24 hodin. Jako poslední krok byla změřena absorbance pomocí ELISA readeru při 540 nm.

### **4.22 Senzorické hodnocení**

Hodnocení probíhalo během jednoho dne, a to 15. listopadu 2021 v čase od 9 do 15 hodin. Hodnocení se zaměřovalo na vzhled, vůni a chuť předkládaných vzorků ovocno-zeleninových šťáv. Senzorického hodnocení se zúčastnilo celkem 24 hodnotitelů, z nichž 15 bylo žen a 9 mužů. Hodnocení se zúčastnili většinou hodnotitelé z řad studentů a doktorandů chemické VUT v Brně, jejichž hodnocení odpovídá běžným spotřebitelům.

#### **4.22.1 Hodnocené vzorky**

Hodnotitelům bylo předloženo 6 vzorků. 2 vzorky byly pouze varianty zelné šťávy, zbylé 4 byly směsné ovocno-zeleninové šťávy. Složení jednotlivých vzorků je uvedeno v tabulce 7.

Tabulka 7 – Složení hodnocených nápojů

<b>Kód vzorku</b>	<b>Složení</b>
C9U	Čerstvá zelná šťáva
P6K	Sterilovaná zelná šťáva
L4B	Směs s čerstvou šťávou v poměru 1:1
A1V	Směs se sterilovanou šťávou v poměru 1:1
O3T	Směs s čerstvou šťávou v poměru 2:1
Y8J	Směs s čerstvou šťávou v poměru 1:2

#### 4.22.2 Použité metody

Formulář sensorického hodnocení je uveden v příloze 1. Pro hodnocení vzhledu a konzistence byla využita pětibodová stupnice, kde stupeň 1 byl vynikající, stupeň 5 nevyhovující. Jednotlivé aspekty vůně a chutě byly také hodnoceny pomocí pětibodové stupnice, kde stupeň 1 byl nezatelný, naopak stupeň byl velmi výrazný.

Poslední částí hodnocení byl pořadový test, kdy hodnotitelé seřadili vzorky dle vlastních preferencí.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem experimentální části práce bylo najít optimální způsob pasterace pro zelnou šťávu, aby byla zvýšena její mikrobiální stabilita, ale zároveň nedošlo k výrazným změnám chemického složení. Byla provedena charakterizace sacharidů a cukrů, vybraných organických kyselin, vybraných bioaktivních látek a měření pH. Z mikrobiálního hlediska bylo sledováno hlavně případné zastoupení patogenů po pasteraci i před, zároveň také negativní vliv na viabilitu probiotických bakterií.

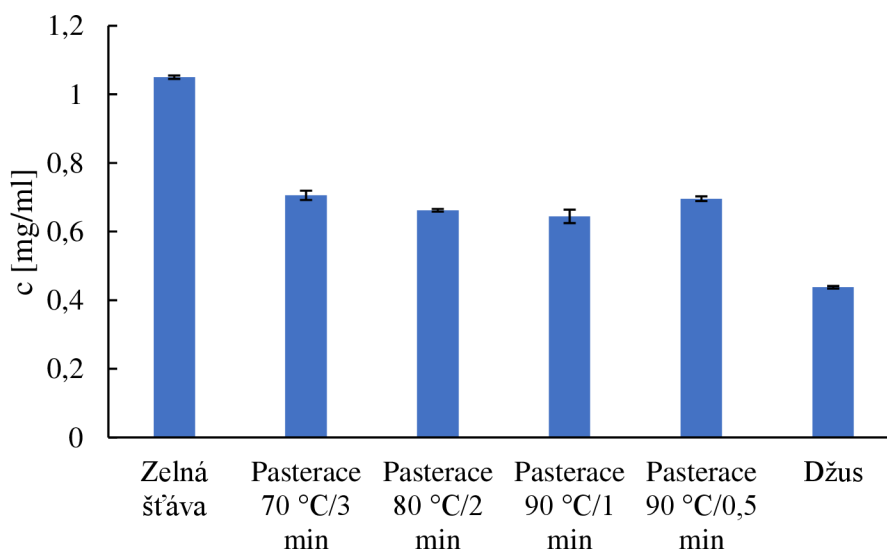
Z důvodu zvýšení atraktivity výsledného nápoje byla čistá zelná šťáva kombinována s jablečno-řepným džusem. Tento džus byl také charakterizován pomocí stejných metod. Výsledný nápoj byl podroben sensorické analýze.

### 5.1 Charakterizace zelné šťávy z hlediska bioaktivních látek

#### 5.1.1 Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu fenolických látek

Ve sledovaných vzorcích byl stanoven celkový obsah fenolických látek podle postupu v bodě 4.11.1. Koncentrace v jednotlivých extraktech byla vypočtena podle rovnice (1). Z naměřených tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Přehled obsahu fenolických látek v jednotlivých vzorcích je uveden v souhrnné tabulce 8.

Nejvyšší obsah byl dle očekávání stanoven v čerstvé zelné šťávě. Nejmenší negativní účinek měla pasterace na 90 °C po dobu 0,5 minut. Obecně lze říct, že všechny pasterační zákroky měly na zelnou šťávu velmi podobný účinek (obrázek 5).

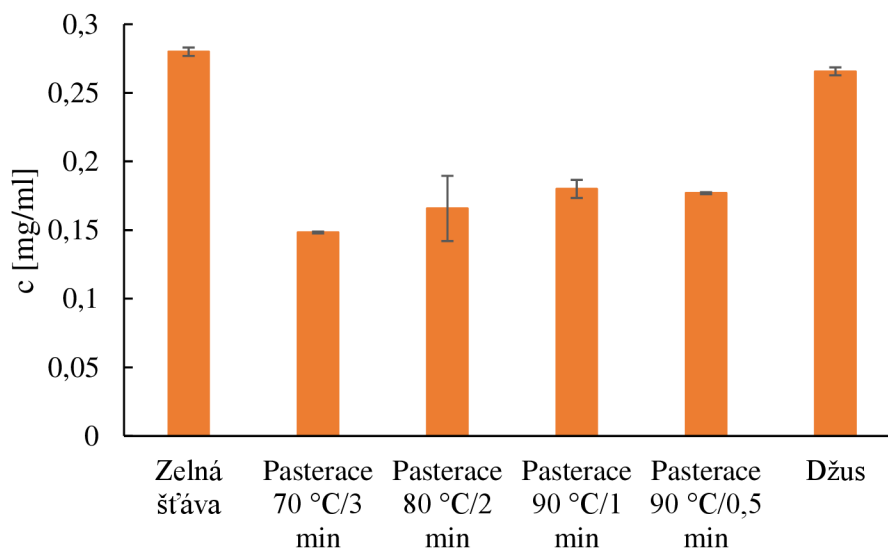


Obrázek 5 – Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek

#### 5.1.2 Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu flavonoidů

Ve sledovaných vzorcích byl stanoven celkový obsah flavonoidů podle postupu v bodě 4.11.2. Koncentrace v jednotlivých extraktech byla vypočtena podle rovnice (2). Z naměřených tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Přehled obsahu flavonoidů v jednotlivých

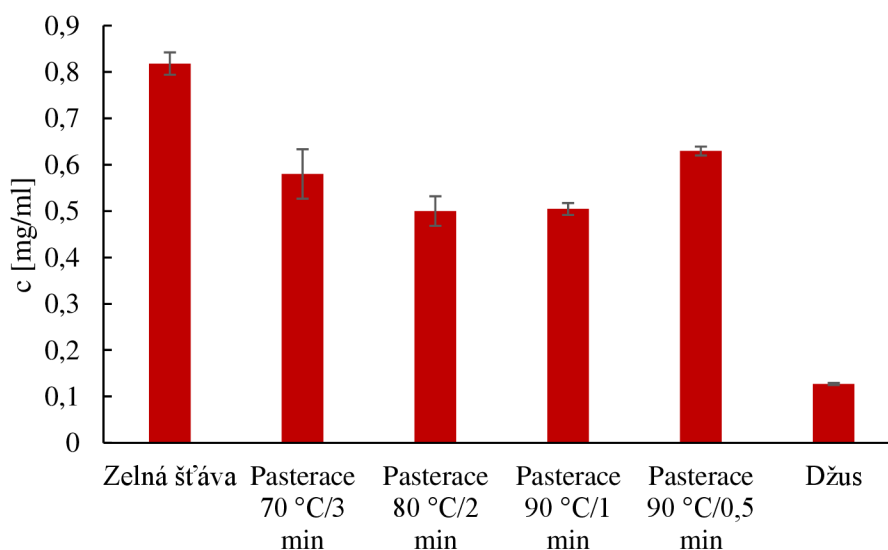
vzorcích je zobrazen v souhrnné tabulce 8. Vysoký obsah flavonoidů byl stanoven ve vzorku džusu, což může být způsobeno vysokým obsahem červených pigmentů z červené řepy (obrázek 6.). Pasterace měla obdobný negativní vliv jako u fenolických látek, nejvyšší pokles byl zaznamenán u pasterace na 70 °C po dobu 3 minut.



Obrázek 6 - Naměřené hodnoty flavonoidů

### 5.1.3 Spektrofotometrické stanovení antioxidační kapacity

Ve sledovaných vzorcích byla stanovena celková antioxidační kapacita podle postupu v bodě 4.11.3. Antioxidační kapacita byla vypočtena podle rovnice (3). Z naměřených tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Přehled zjištěné antioxidační aktivity v jednotlivých vzorcích je zobrazen v souhrnné tabulce 8. Podobně jako v případě celkového obsahu fenolických látek byl nejnižší obsah stanoven ve vzorku džusu (obrázek 7). Stejně jako v předchozích případech byla nejšetnější pasterace na 90 °C po dobu 0,5 minut.



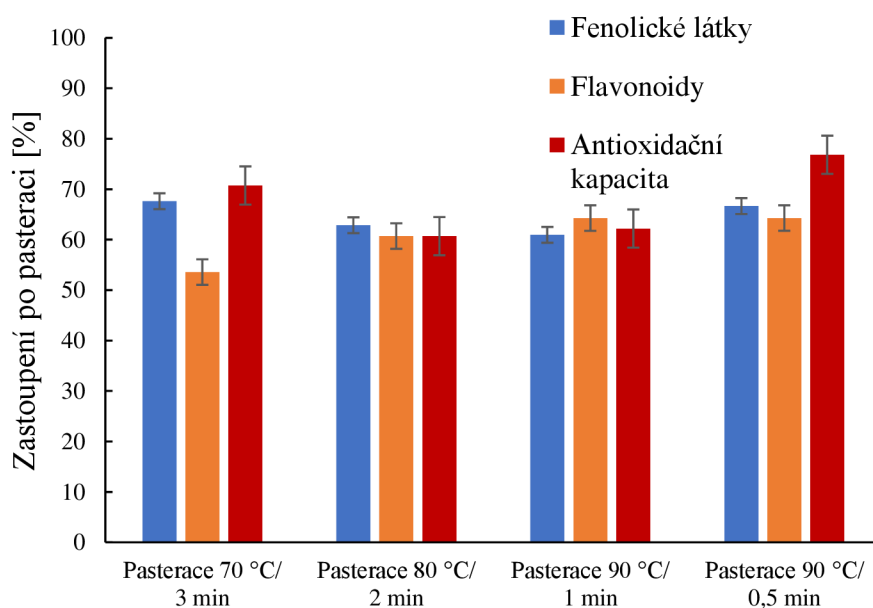
Obrázek 7 – Naměřená antioxidační aktivita TEAC

### 5.1.4 Shrnutí charakterizace z hlediska bioaktivních látek

Jako základní charakteristika zkoumaných vzorků byly stanoveny obsahy vybraných bioaktivních látek ve vzorcích čerstvé a pasterované zelné šťávy a pro porovnání také jablečno-řepného džusu.

Dle předpokladů byl nejvyšší obsah aktivních látek stanoven v nepasterované zelné šťávě. Působením zvýšení teploty došlo ke ztrátě aktivních látek. Přehled naměřených hodnot jednotlivých vzorků je souhrnně uveden v tabulce 8 a graficky znázorněn na obrázku 8.

Nejmenší úbytek aktivních látek byl zaznamenán v případě pasterace 90 °C po dobu 0,5 minuty. Při této pasteraci došlo k poklesu celkových fenolických látek o třetinu, poklesu flavonoidů o 36 % a k poklesu antioxidační aktivity o 23 %.



Obrázek 8 – Procentuální zastoupení fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacity po pasteraci

Tabulka 8 – Přehled obsahu fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacity v jednotlivých vzorcích

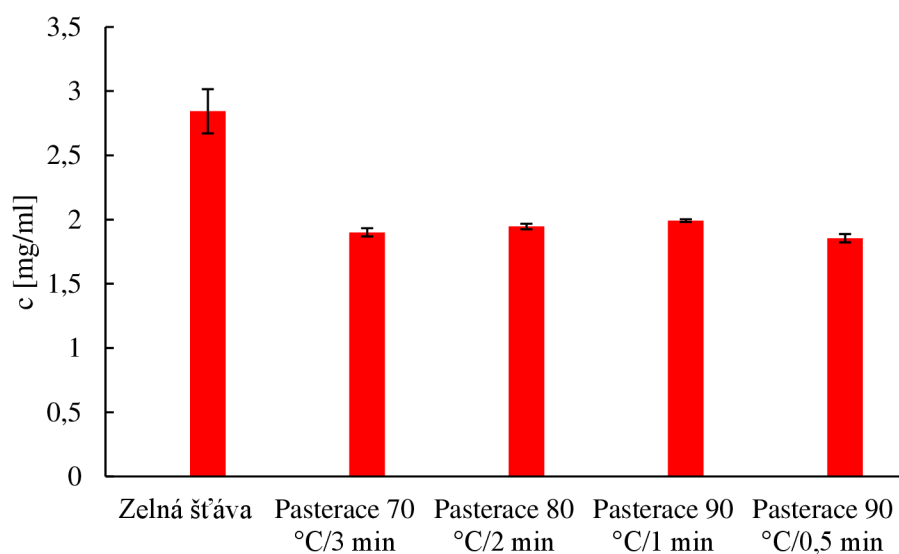
Vzorek	Fenolické látky [mg/ml]	Flavonoidy [mg/ml]	Antioxidační kapacita TEAC [mg/ml]
Čerstvá zelná šťáva	1,05 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,82 ± 0,02
Pasterace 70 °C/3 min	0,71 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,58 ± 0,05
Pasterace 80 °C/2 min	0,66 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,50 ± 0,03
Pasterace 90 °C/1 min	0,64 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,51 ± 0,01
Pasterace 90 °C/0,5 min	0,70 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,63 ± 0,01
Džus	0,44 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,13 ± 0,02



## 5.2 Charakterizace zelné šťávy z hlediska sacharidů

### 5.2.1 Spektrofotometrické stanovení sacharidů podle Duboise

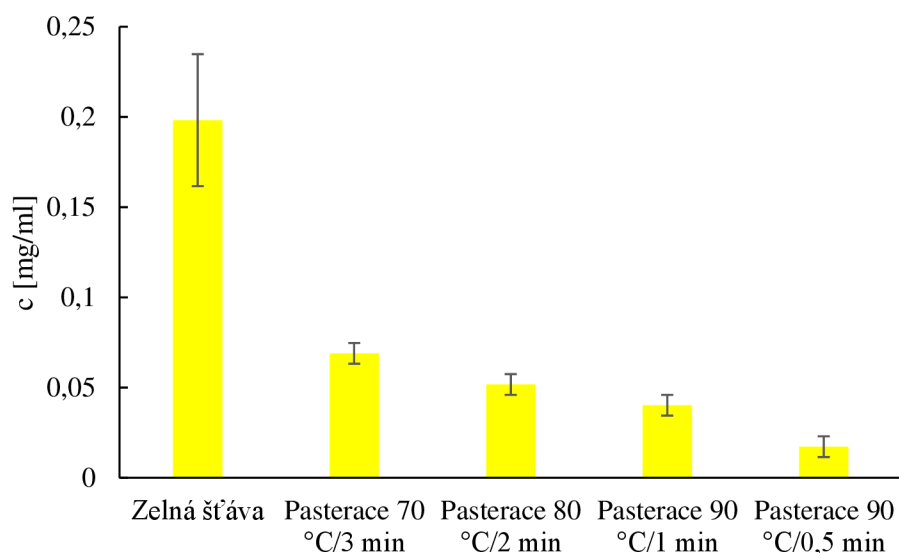
Ve sledovaných vzorcích byl stanoven obsah sacharidů podle postupu v bodě 4.11.4. Z naměřených tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Přehled stanovených koncentrací jednotlivých vzorků je uveden v souhrnné tabulce 9. Během pasterace došlo ke snížení obsahu sacharidů přibližně o třetinu, viz obrázek 9. K nejvyššímu poklesu o 35 % došlo u pasterace na 90 °C po dobu 0,5 minuty. Nejmenší úbytek byl zaznamenán u pasterace při 90 °C po dobu 1 minuty, kdy došlo k poklesu o 30 %.



Obrázek 9 – Naměřené hodnoty sacharidů pro vzorky zelné šťávy

### 5.2.2 Spektrofotometrické stanovení redukcí cukrů podle Somogyi-Nelsona

Ve sledovaných vzorcích byl stanoven obsah redukcí cukrů podle postupu v bodě 4.11.5. Z naměřených tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Přehled stanovených koncentrací jednotlivých vzorků je uveden v souhrnné tabulce 9. Během pasterace došlo k výraznému snížení obsahu cukrů, v případě pasterace při 90 °C po dobu 0,5 minuty došlo ke snížení až o 90 % (obrázek 10). K nejmenšímu poklesu došlo v případě pasterace při 70 °C po dobu 3 minut, kdy došlo k poklesu o 60 %.



Obrázek 10 – Naměřené hodnoty redukujících cukrů pro vzorky zelné šťávy

### 5.2.3 Shrnutí charakterizace z hlediska obsahu sacharidů a redukujících cukrů

Pomocí spektroskopických měření bylo zjištěno, že pasteračním zákrokem dochází ke výraznému poklesu obsahu sacharidů a redukujících cukrů. Nejvyšší pokles byl zaznamenán u pasterace při 90 °C po dobu 0,5 minut, kdy došlo k poklesu sacharidů o 35 % a poklesu redukujících cukrů o 90 %. Dále byl nejvyšší obsah sacharidů a cukrů dle očekávání stanoven u vzorku džusu.

Sacharidy, které se objevují v potravinách, jsou stabilní hlavně v pevném stavu, neutrálním pH a pokojové teplotě, jejich tepelná stabilita je nízká, Při ohřevu snadno podléhají dehydrataci a další degradaci, jako je karamelizace nebo pyrolýza. V kyselém prostředí může docházet k hydrolyze polysacharidů a oligosacharidů, které mohou být dále dehydratovány a degradovány na sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností jako jsou furfural nebo hydroxymethylfurfural [65].

Tabulka 9 – Přehled obsahu sacharidů a redukujících cukrů v jednotlivých vzorcích

Vzorek	Sacharidy [mg/ml]	Redukující cukry [mg/ml]
Čerstvá zelná šťáva	2,84 ± 0,02	0,20 ± 0,03
Pasterace 70 °C/3 min	1,90 ± 0,03	0,07 ± 0,01
Pasterace 80 °C/2 min	1,94 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Pasterace 90 °C/1 min	1,99 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Pasterace 90 °C/0,5 min	1,86 ± 0,03	0,02 ± 0,01
Džus	256,06 ± 1,05	17,38 ± 2,60

### 5.3 Stanovení vybraných organických kyselin a cukrů pomocí HPLC

Stanovení pomocí kapalinové chromatografie bylo provedeno podle postupu v bodě 4.13. Obsahy vybraných organických kyselin – kyselina L-askorbová, kyselina mléčná, kyselina octová, kyselina citrónová a vybraných cukrů – D-glukóza, D-fruktóza a sacharóza jsou uvedeny v tabulce 10.

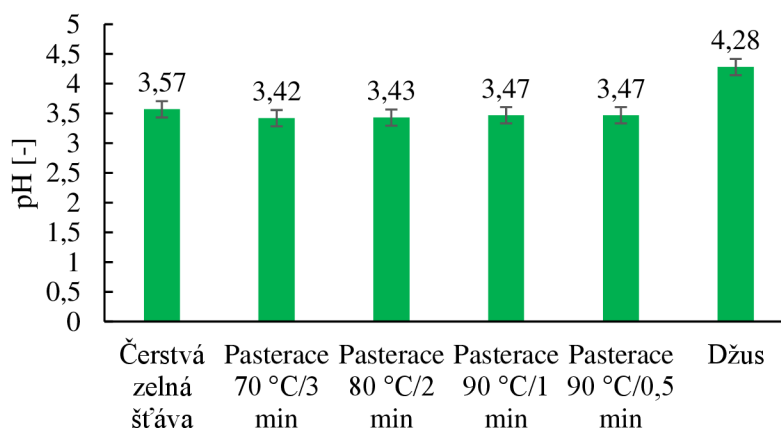
Dle očekávání a výsledků spektrofotometrických stanovení (viz kapitola 5.2.3) byl u vzorku džusu stanoven vyšší obsah jednoduchých cukrů než u zelné šťávy, zároveň byla u vzorku džusu stanovena kyselina citrónová. Podle očekávání nebyla u tohoto vzorku detekována kyselina L-mléčná, protože se nejedná o fermentovaný produkt.

Tabulka 10 - Naměřené koncentrace vybraných analytů

Vzorek	Analyt	Koncentrace [mg/ml]
Čerstvá zelná šťáva	D-fruktóza	11,36 ± 0,40
	Kyselina L-mléčná	8,22 ± 0,41
	Kyselina octová	145,53 ± 0,42
	Kyselina L-askorbová	0,43 ± 0,08
Džus	Sacharóza	34,13 ± 2,48
	D-glukóza	4,45 ± 0,40
	D-fruktóza	22,63 ± 1,53
	Kyselina octová	151,93 ± 1,64
	Kyselina L-askorbová	1,43 ± 0,25
	Kyselina citrónová	691,58 ± 2,44

### 5.4 Měření pH

Stanovení pH bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.10. Z naměřených tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Nejvyšší pH bylo naměřeno u vzorku čerstvé zelné šťávy. V průběhu pasterace došlo k mírnému poklesu pH, hodnoty se však liší minimálně, viz obrázek 11.



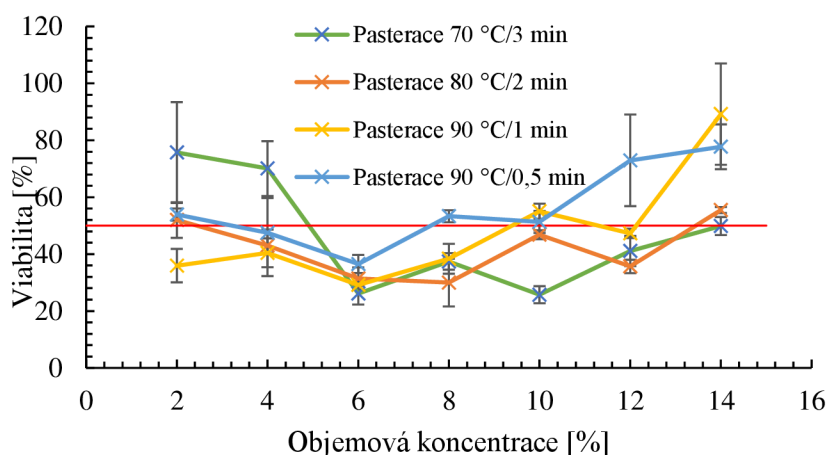
Obrázek 11 – Naměřené hodnoty pH

## 5.5 MTT test cytotoxicity

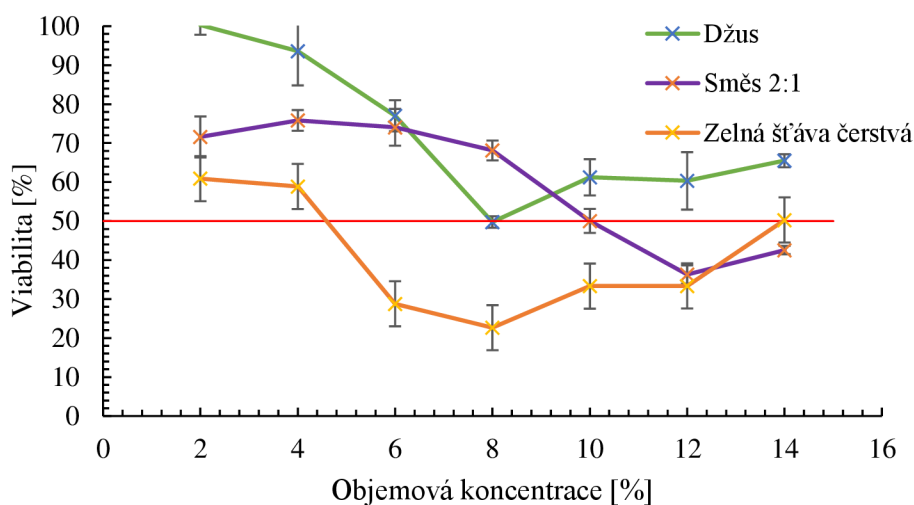
Bezpečnost pasterované zelné a směsné šťávy byla ověřena pomocí testu cytotoxicity. Cytotoxický efekt byl testován na buněčné linii střevních nádorových buněk Caco-2 podle postupu uvedeného v kapitole 4.21.2. Testovány byly pasterované vzorky, vzorek čerstvé šťávy, vzorek džusu a směsná šťáva v poměru 2:1. Z naměřených tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.

Z následujících grafů (obrázek 12 a obrázek 13) je zřejmé, že hranici úhynu nejméně 50 % buněk některé testované vzorky zelné šťávy překročily. Viabilita buněk mohla být negativně ovlivněna nízkým pH zelné šťávy. Jedním z faktorů nízké viability Caco-2 buněk může být také přítomnost mikroorganismů, které využívají živiny v médiu potřebné pro růst Caco-2 buněk. Dalším faktorem ovlivňujícím viabilitu buněk mohla být přítomnost volné glukózy, která hraje zásadní roli ve výživě buněk.

Nejmenší vliv na viabilitu buněk měl vzorek džusu, u kterého nedošlo k poklesu pod hranici 50 %. Ze všech vzorků měl právě džus nejvyšší obsah volné glukózy a také mírnější pH v porovnání se vzorky zelné šťávy. Největší vliv na viabilitu měl vzorek čerstvé zelné šťávy, u kterého nebyla překročena hranice 50 % pouze u nízkých objemových koncentrací (2–4 %).



Obrázek 12 – výsledky MTT testu cytotoxicity pro pasterované vzorky zelné šťávy



Obrázek 13 – výsledky MTT testu cytotoxicity pro vzorek džusu, směsné šťávy a čerstvé zelné šťávy

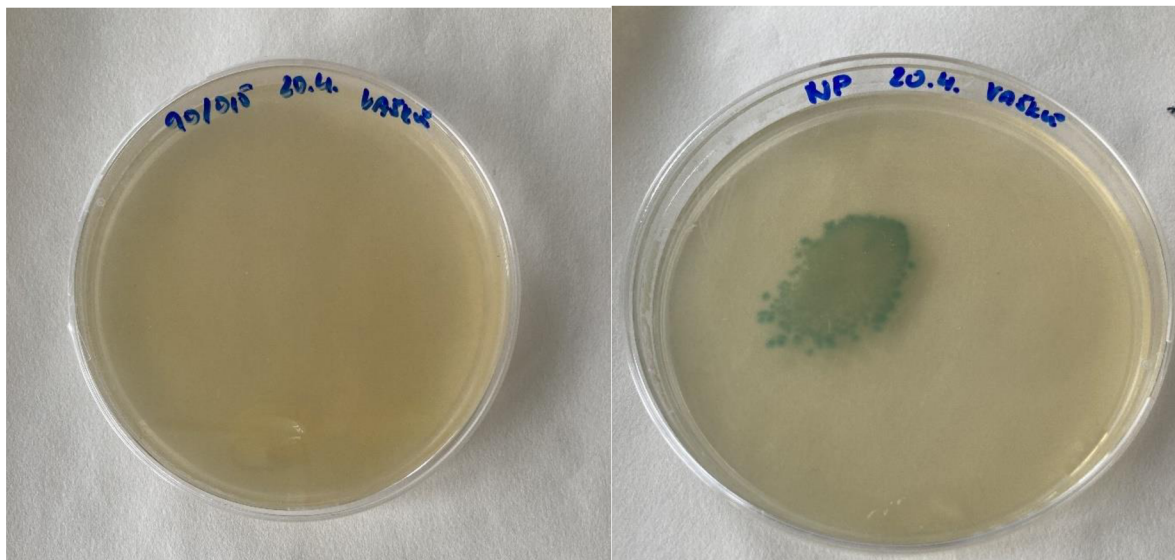
## 5.6 Mikrobiologická kontrola zelné šťávy

Kultivace probíhala podle postupu v bodě 4.14. Média byla vybrána na základě předchozích kultivací pomocí křížových roztěrů na pevném médiu.

Byl potvrzen růst organismů na LB agaru, který se využívá pro kultivaci bakterií. V kysaném zelí se vedle bakterií mléčného kvašení objevují i další bakterie, například *Leuconostoc mesenteroides* nebo *Pediococcus pentasaceus* [66]. Dále byl potvrzen růst organismů na MRS agaru, který se využívá pro kultivaci probiotických bakterií a jejich přítomnost v zelné šťávě je žádoucí. Byl potvrzen růst mikroorganismů na YPD agaru, který se využívá pro kultivaci kvasinek, které jsou v zelné šťávě nežádoucími sekundárními kontaminanty. V práci Satora et al. (2020) byly jako nejčastější kvasinky v kysaném zelí identifikovány *Debaryomyces hansenii*, *Clavispora lusitaniae* a *Rhodotorula mucilaginosa* [67].

Na McConkey agaru a Endově agaru nebyly nalezeny žádné kolonie. Tato média se používají pro potvrzení koliformních bakterií, které ve vzorcích nebyly identifikovány. Absence těchto kontaminantů je žádoucí a ukazuje na zdravotní nezávadnost zelné šťávy.

Pro ověření zdravotní nezávadnosti byla provedena kultivace na selektivním médiu pro rod *Listeria*, které je schopné od sebe vizuálně odlišit jednotlivé druhy (obrázek 14). Při kultivaci nepasterované šťávy vyrostla na misce modrozelená kolonie listerií, bez žlutých okrajů, což indikuje, že se nejedná o patogenní *Listerii monocytogenes*. Při kultivaci pasterovaných médií nenarostly na miskách žádné kolonie.



Obrázek 14 – Ukázka kultivace listerií, vlevo pasterace 90 °C/0,5 min, vpravo nepasterovaná zelná šťáva

## 5.7 Spektrofotometrické měření zákalu

Pro měření zákalu byly vybrány média na základě křížových roztěrů. Vybraná média zahrnují celé spektrum organismů, přes bakterie a specificky bakterie mléčného kvašení, tak kvasinky.

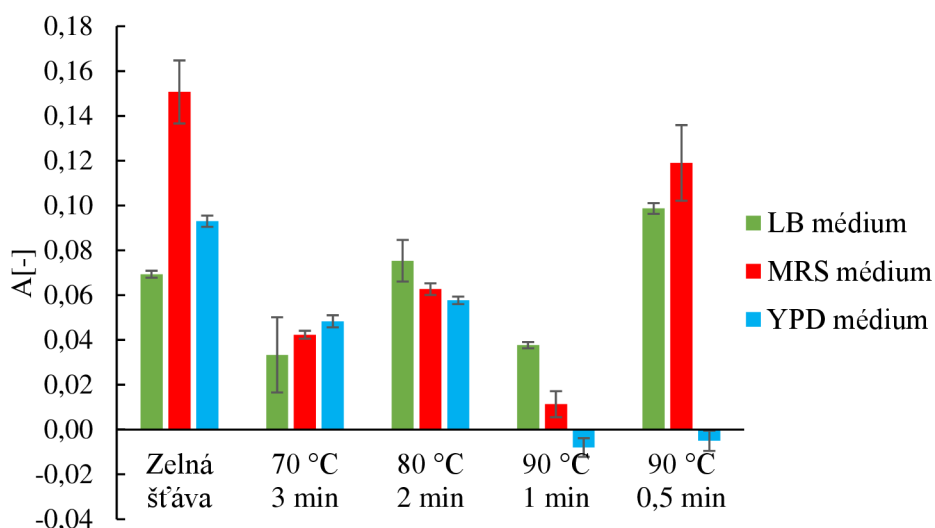
Při kultivaci v LB médiu byl sledován růst bakterií, také je používán pro kultivace *E. coli*. Srovnatelný a zároveň největší inhibiční účinek byl zjištěn u pasterace při 70 °C po dobu 3 minut a u pasterace při 90 °C po dobu 1 minuty. Lze říct, že je zde minimální rozdíl při

aplikaci pasterace na vysokou teplotu s kratší dobou působení a na nižší teplotu s delším působením.

Při kultivaci v MRS médiu byl sledován růst laktobacilů. Lze pozorovat výrazný negativní účinek pasterace na viabilitu laktobacilů. Je zřejmé, že nejšetrnější pasterací byla pasterace při 90 °C po dobu 0,5 minut, zatímco pasterace při stejné teplotě po dobu 1 minuty vedla k masivnímu úhynu mikroorganismů. Nejvyšší koncentrace laktobacilů byla dle očekávání stanovena u vzorku čerstvé nepasterované šťávy.

Při kultivaci na YPD médiu byl sledován růst kvasinek, které jsou v případě zelné šťávy nežádoucí. Pomocí pasterace na 90 °C bylo dosaženo inhibice kvasinek. Při všech pasteracích došlo ke snížení obsahu kvasinek.

Z následujících hodnot vyplývá, že nejvhodnější pasterací byla kombinace 90 °C po dobu 0,5 minuty, kdy došlo k inhibici kvasinek, poklesu obsahu bakterií včetně žádoucích laktobacilů, ale tento pokles byl v tomto případě nejnižší. Výsledky jsou uvedeny souhrnně na obrázku 15.

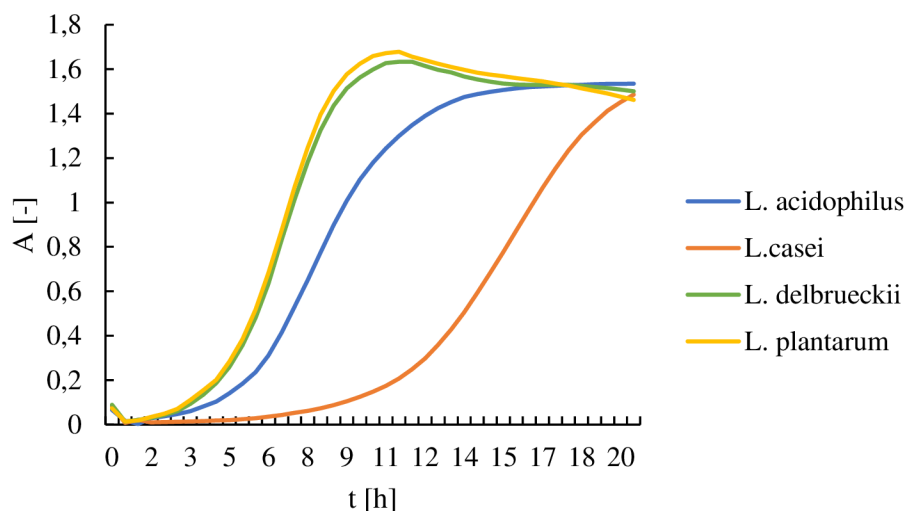


Obrázek 15 – Grafické znázornění změn zákalu kultur pěstovaných ve vybraných médiích

## 5.8 Růstová křivka vybraných probiotických bakterií

Pro sledování životního cyklu byly změřeny růstové křivky vybraných probiotických organismů. Měření bylo provedeno podle postupu v bodě 4.17. Byla provedena tři paralelní měření ve třech různých prostředích – MRS médium, čerstvá zelná šťáva a džus smíchaný se zelnou šťávou v poměru 2:1. Kultivace probíhala po dobu 20 hodin, což odpovídá obvyklé době růstu bakterií od lag fáze do fáze odumírání.

Při kultivaci v MRS médiu organismy zřejmě nebyly kultivovány dostatečně dlouho na to, aby bylo dosaženo fáze odumírání. Růst mohl být ovlivněn podmínkami kultivace, zejména přítomností kyslíku. Většina organismů dosáhla přechodu mezi exponenciální a stacionární fází mezi 5–10 hodinou, opožděný byl *Lactobacillus casei*, u kterého tento přechod nastal mezi 8–15 hodinou. Průběh růstových křivek je zaznamenán na obrázku 16.



Obrázek 16 – Růstová křivka vybraných zástupců rodu *Lactobacillus* v MRS médiu

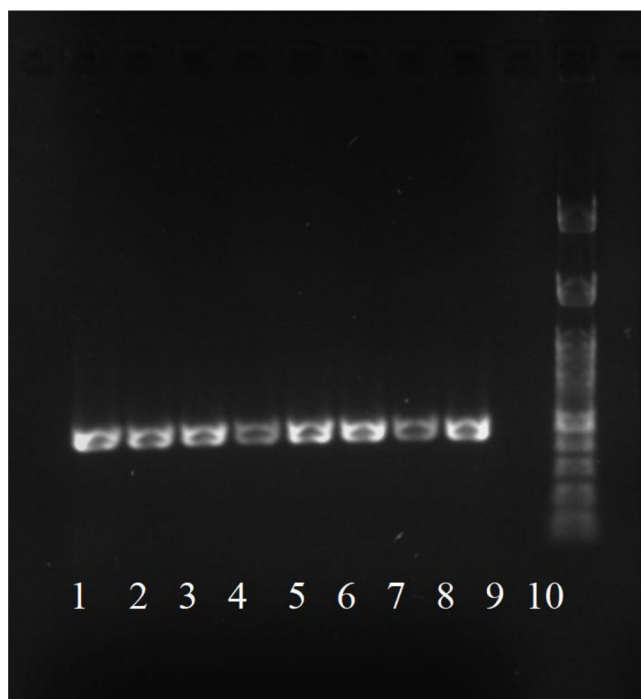
V případě kultivace v zelné a směsné šťávě bylo dosaženo pouze adaptační fáze. Změny v naměřených hodnotách absorbance jsou minimální, nedocházelo k extrémnímu úbytku nebo nárůstu počtu buněk. Důvodem dlouhé adaptace mohlo být nízké pH a adaptace organismů na nové prostředí. Z tohoto důvodu musela kultivace probíhat déle, aby měly organismy dostatek času překonat adaptační fázi. Další experimenty probíhaly s odběry po 7 a 14 dnech.

## 5.9 Ověření amplifikace DNA kontrolních kmenů

Na základě literatury byly sledovány v biologickém materiálu 4 probiotické organismy, které se v zelné šťávě přirozeně vyskytují nebo jsou schopny v ní přežít – *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* a *Lactobacillus plantarum* [18,68]. U těchto organismů byla nejprve vyzkoušena specifita primerů a teplotních programů. Následně mohly být tyto organismy identifikovány v zelné šťávě.

### 5.9.1 Doména *Bacteria*

Amplifikace izolované DNA byla ověřena pomocí s PCR primery F\_eub a R\_eub, které jsou uvedeny v tabulce 5. PCR směs a amplifikace byla provedena podle kapitoly 4.20.3 a produkty byly následně detekovány na agarózovém gelu podle kapitoly 4.20.4. U všech vzorků byl úspěšně detekován specifický produkt o velikost 466 bp. Výsledek gelové elektroforézy je zaznamenán na obrázku 17. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v tabulce 11.



Obrázek 17 – Výřez gelové elektroforézy pro doménu *Bacteria*

Tabulka 11 – Schéma nanesení PCR produktů pro doménu *Bacteria*

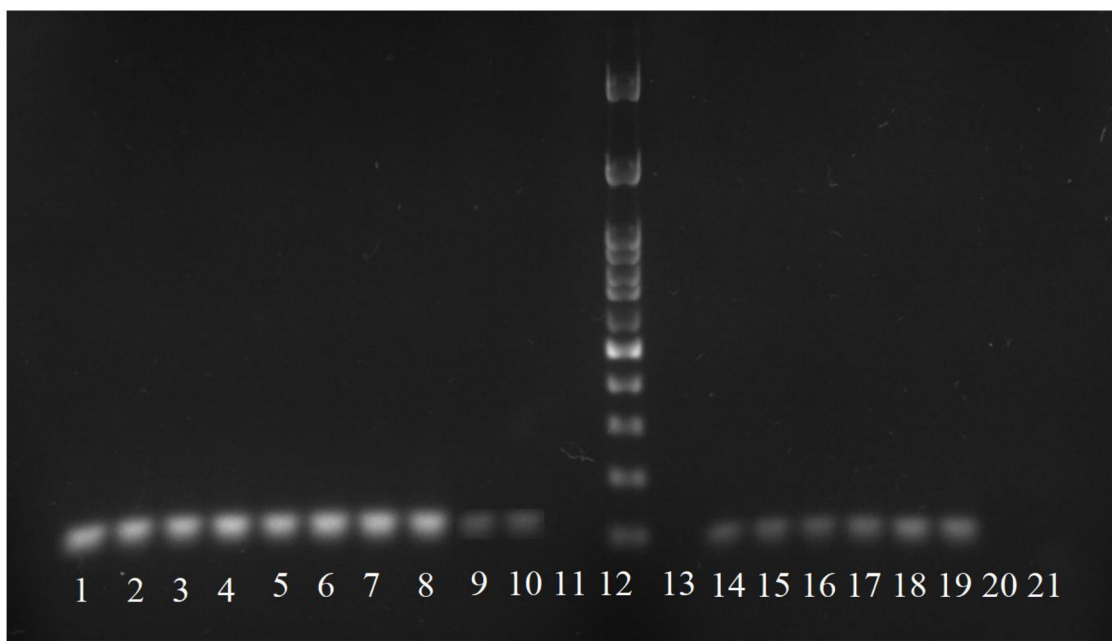
Běh	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+++
2		+++
3	<i>Lactobacillus casei</i>	+++
4		++
5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+++
6		+++
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	++
8		+++
10	Standard	+++

Legenda: + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován

### 5.9.2 Rod *Lactobacillus*

Amplifikace izolované DNA byla ověřena pomocí s PCR s primery F\_allact a R\_allact, které jsou uvedeny v tabulce 5. PCR směs a amplifikace byla provedená podle kapitoly 4.20.3 a produkty byly následně detekovány na agarózovém gelu podle kapitoly 4.20.4. U všech vzorků byl úspěšně detekován specifický produkt o velikost 92 bp. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus rhamnosus*, která byla zapůjčena konzultantkou práce. Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na obrázku 18. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v tabulce 12.





Obrázek 18 – výřez gelové elektroforézy pro rod *Lactobacillus*

Tabulka 12 - Schéma nanesení PCR produktů pro rod *Lactobacillus*

Běh	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	++
2		++
3		++
4		++
5	<i>Lactobacillus casei</i>	++
6		++
7		++
8		++
9	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+
10		+
12	Standard	+++
14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	++
15		++
16		++
17		++
18	Pozitivní kontrola	++
19	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	++
20	Negativní kontrola	-
21		-

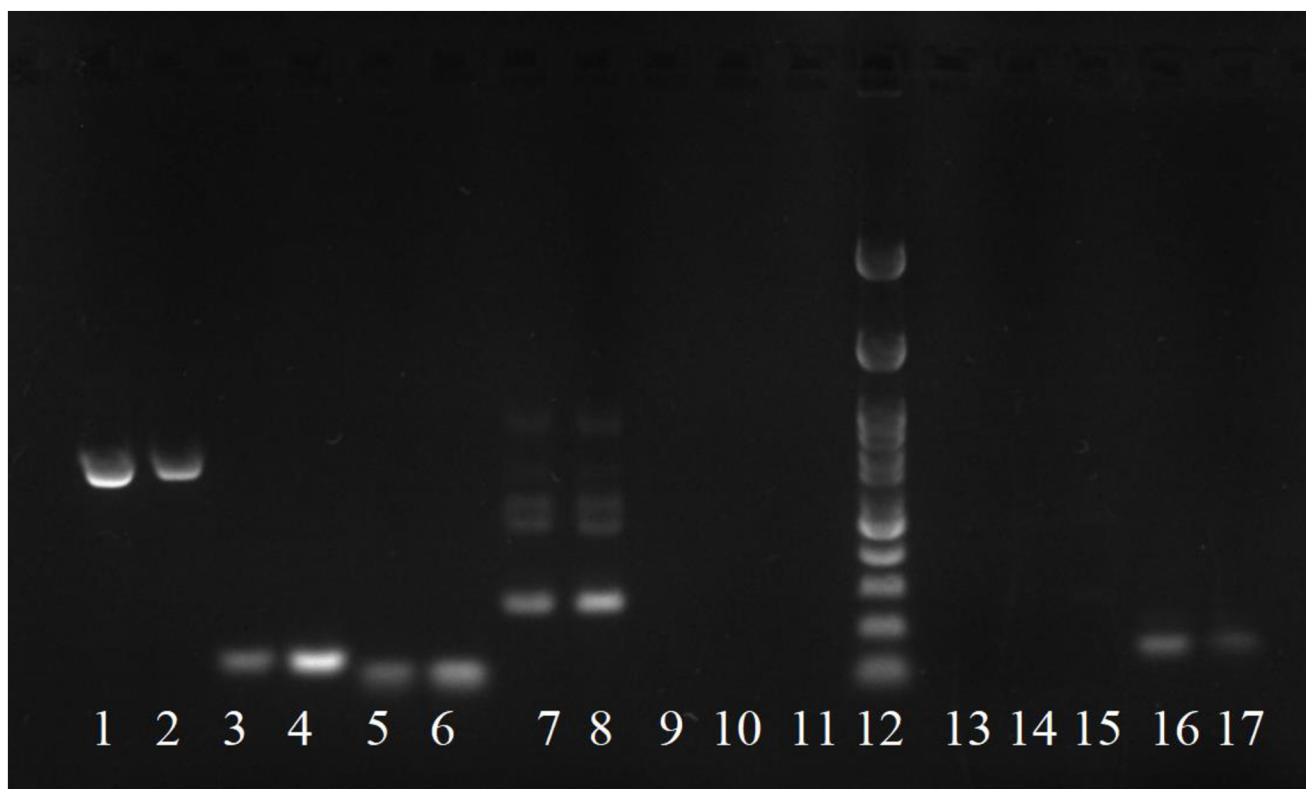
Legenda: + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), - produkt nedetekován

### 5.9.3 Vybraní zástupci rodu *Lactobacillus*

Amplifikace izolované DNA byla ověřena pomocí s PCR se specifickými primery pro jednotlivé druhy, které jsou uvedeny v tabulce 5. PCR směs a amplifikace byla provedena podle kapitoly 4.20.3 a produkty byly následně detekovány na agarózovém gelu podle kapitoly 4.20.4. U všech vzorků byl úspěšně detekován specifický produkt o různé velikosti. Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na obrázku 19. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v tabulce 13.

Z důvodu velké podobnosti křivek tání u amplifikace domény a rodu byla u organismů *L. casei* a *L. plantarum* ověřena specifita primerů. Byla provedena PCR reakce s DNA *L. casei* a primery Lfor a PlanII, a také PCR reakce s DNA *L. plantarum* a primery PrI a CasII. Specifičnost primerů byla potvrzená, byly detekovány pouze nespecifické produkty v případě *L. plantarum*, v případě *L. casei* nebyly potvrzeny žádné PCR produkty.

U vzorku *L. acidophilus* byl detekován produkt o velikosti 750 bp, u vzorku *L. casei* produkt o velikosti 132 bp, u vzorku *L. delbrueckii* produkt o velikosti 92 bp a u vzorku *L. plantarum* byl detekován produkt o velikosti 200 a 400 bp. Potvrzené DNA jednotlivých druhů byly dále v práci používány jako pozitivní kontroly.



Obrázek 19 - výřez gelové elektroforézy pro vybrané zástupce

Tabulka 13 - Schéma nanesení PCR produktů vybraných zástupců

Běh	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+++
2		+++
3	<i>Lactobacillus casei</i>	++
4		+++
5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	++
6		++
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++
8		+++
9	Negativní kontrola	–
10		–
12	Standard	+++
14	<i>Lactobacillus casei</i> *	–
15		–
16	<i>Lactobacillus plantarum</i> *	+
17		+

Legenda: + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován

\* Použití nespecifických primerů

## 5.10 Zhodnocení efektivity jednotlivých pasteračních kroků

Na základě předchozích měření byla zvolena jako optimální pasterace při 90 °C po dobu 0,5 minuty. Tato kombinace teploty a času byla zvolena z důvodu toho, že měla nejmenší negativní účinek na obsah aktivních látek, kdy došlo k poklesu fenolických látek a flavonoidů přibližně o třetinu, antioxidační aktivita poklesla o čtvrtinu. Zároveň byla tato pasterační metoda nejšetnější k probiotickým bakteriím, kdy došlo k nejnižšímu poklesu viability v porovnání s ostatními pasteracemi. Tato pasterace byla účinná pro inhibici nežádoucích kvasinek. Při této pasteraci dále nebyli nalezeni žádní zástupci rodu *Listeria*, stejně jako zástupci koliformních bakterií, proto lze šťávu považovat z mikrobiologického hlediska za zdravotně nezávadnou.

Pasterace při 90 °C je v souladu s vyhláškou č. 397/2021 Sb., která označuje pasterovanou zeleninou výrobek s nálevem v neprodyšně uzavřeném obalu, jehož pH je nižší nebo rovno 4,0 a při tepelném ošetření bylo dosaženo prohřátí obsahu spotřebitelského balení na 80 až 90 °C [69].

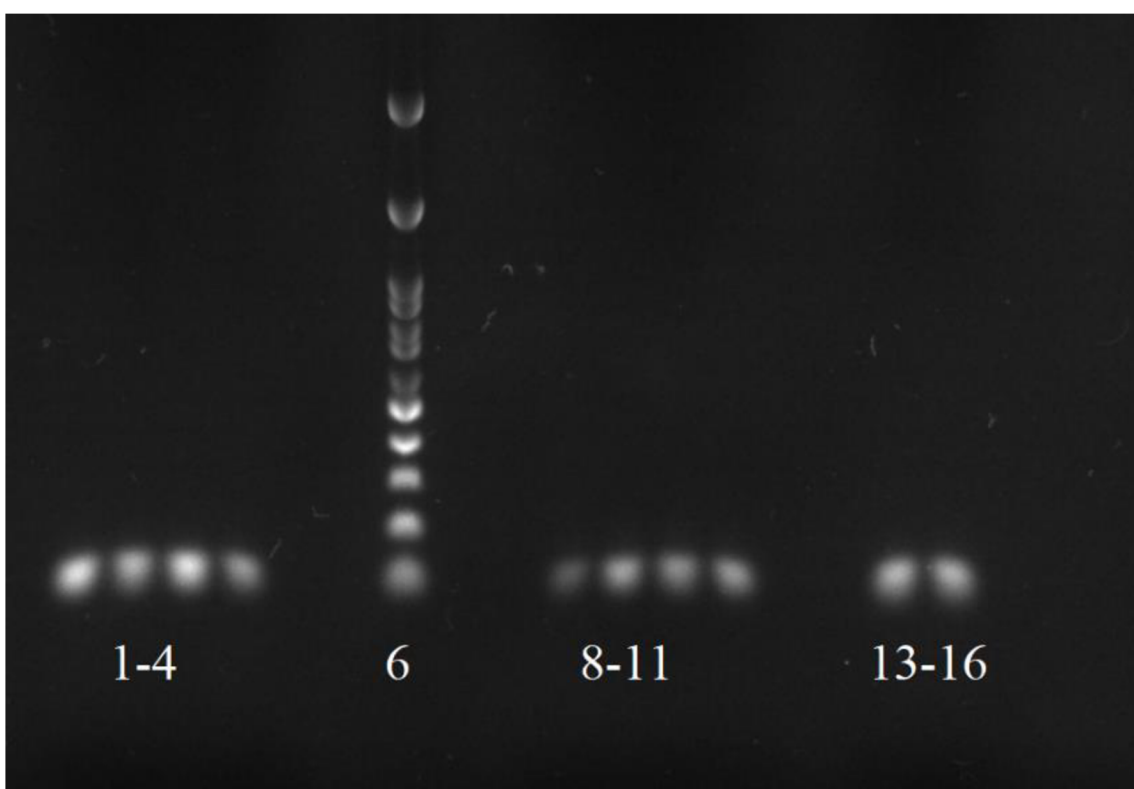
Následující experimenty byly prováděny již pouze s vybranou pasterací. Kvůli ztrátě významné části probiotických bakterií s příznivým vlivem na lidský organismus bylo přistoupeno k obohacení pasterované šťávy. Cílem tohoto kroku bylo zpětně do nápoje přidat probiotické organismy, které byly usmrceny v průběhu pasterace.

Pro obohacení byly zvoleny samostatné organismy vybrané v kapitole 5.9 a také směsi. Pomocí PCR a gelové elektroforézy bylo potvrzeno, že bakterie rodu *Lactobacillus* se v zelné šťávě přirozeně vyskytují (kapitola 5.11) a měly by tedy být schopné ve šťávě přežít.

Byly vytvořeny dvě směsi, které obě v základu obsahovaly *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei*. Do směsi 1 byl přidán také *Lactobacillus plantarum*, do směsi 2 byl přidán *Lactobacillus delbrueckii*. Tyto kombinace byly zvoleny na základě podobnosti životního cyklu organismů *L. plantarum* a *L. delbrueckii* vyplývajícího z růstové křivky a zároveň odlišností od zbývajících dvou organismů (obrázek 16). Cílem směsí bylo také ověřit, zda růst více druhů bude mít symbiotický nebo antagonický účinek v porovnání s obohacením samostatnou kulturou.

### 5.11 Ověření přítomnosti rodu *Lactobacillus* ve vzorku zelné šťávy

Pomocí metody PCR byla ověřena přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* ve vzorku čerstvé a pasterované zelné šťávy. S izolovanou DNA byla provedena PCR reakce s primery F\_allact a R\_allact, které jsou uvedeny v tabulce 5. PCR směs a amplifikace byla provedená podle kapitoly 4.20.3 a produkty byly následně detekovány na agarózovém gelu podle kapitoly 4.20.4. U obou vzorků byla prokázána přítomnost zástupců rodu *Lactobacillus* pomocí PCR produktů o velikosti 92 bp. Tento závěr je ve shodě s výsledky spektrofotometrického měření zákalu (kapitola 5.7). Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na obrázku 20. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v tabulce 14.



Obrázek 20 - výřez gelové elektroforézy pro potvrzení rodu *Lactobacillus*

Tabulka 14 - Schéma nanesení PCR produktů

Běh	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	Čerstvá nepasterovaná zelná šťáva	++
2		++
3		++
4		+
6	Standard	+++
8	Pasterovaná zelná šťáva 90 °C/0,5 min	+
9		++
10		++
11		++
13	Pozitivní kontrola	++
14		++
15	Negativní kontrola	-
16		-

Legenda: + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován

## 5.12 Dlouhodobá stabilita zelné šťávy po pasteračním zákroku a přidavku probiotik

Z důvodu ztráty probiotických bakterií teplotním záhřevem bylo přistoupeno k obohacení pasterované šťávy a sledování stability. Při měření růstové křivky bylo zjištěno, že 24 hodinová kultivace není dostatečně dlouhá doba pro růst těchto bakterií, proto bylo zvoleno sledování po 1 a 2 týdnech.

Na základě článku Yoon et al. (2006) lze předpokládat, že *L. casei* nebude schopen v zelné šťávě přežít, na rozdíl od *L. plantarum* a *L. delbrueckii* [18]. Z tohoto důvodu byl tento organismus přidán do směsi, a bylo sledováno, zda přítomnost dalších probiotik nebude mít pozitivní vliv na jeho životaschopnost.

V případě, že bude potvrzena schopnost organismů přežít, lze očekávat snížení pH v důsledku tvorby organických kyselin, dále lze očekávat změny v obsahu sacharidů a cukrů.

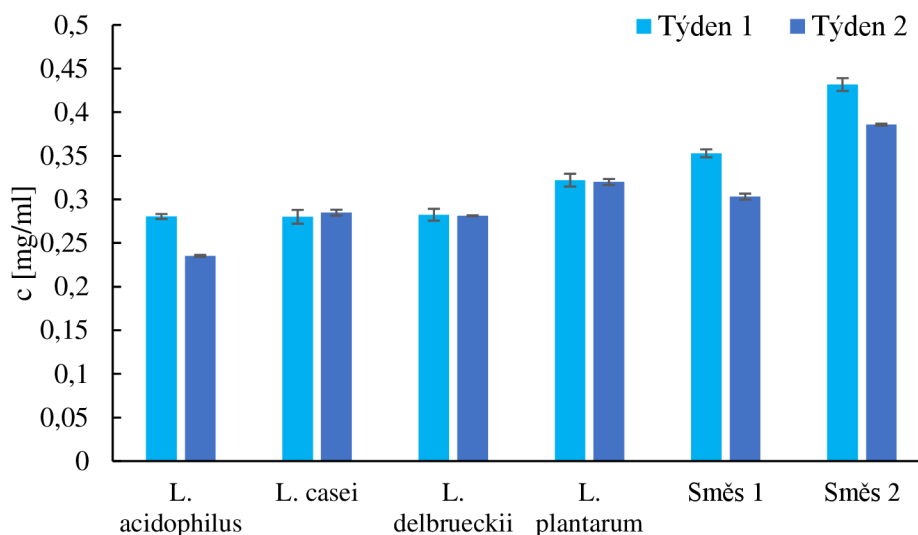
Jako základní charakteristika obohacených vzorků byly sledovány stejné parametry jako u vzorků čerstvé a pasterované šťávy, tedy obsah bioaktivních látek, obsah sacharidů a cukrů a obsah vybraných organických kyselin.

## 5.13 Charakterizace obohacené šťávy z hlediska bioaktivních látek

### 5.13.1 Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu fenolických látek

Ve sledovaných vzorcích byl stanoven celkový obsah fenolických látek podle postupu v bodě 4.11.1. Koncentrace v jednotlivých extraktech byla vypočtena podle rovnice (1). Z naměřených tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Přehled obsahu fenolických látek v jednotlivých vzorcích je uveden v souhrnné tabulce 15.

Výchozí obsah fenolických látek byl stanoven na  $0,32 \pm 0,01$  mg/ml. Obecně lze konstatovat, že po prvním týdnu dochází k poklesu obsahu fenolických látek, po druhém týdnu dochází k udržení hodnoty, případnému k mírnému poklesu (obrázek 21).

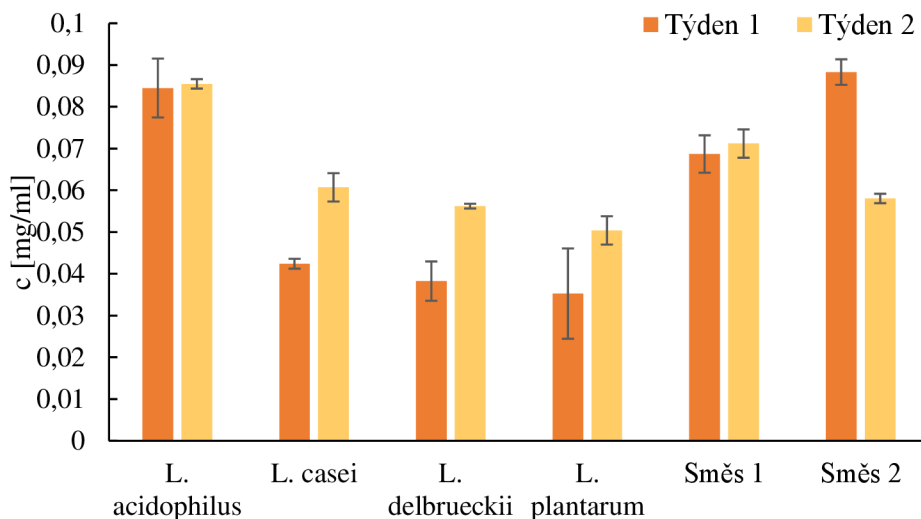


Obrázek 21 - Naměřené hodnoty fenolických látek pro obohacené vzorky

### 5.13.2 Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu flavonoidů

Ve sledovaných vzorcích byl stanoven celkový obsah flavonoidů podle postupu v bodě 4.11.2. Koncentrace v jednotlivých extraktech byla vypočtena podle rovnice (2). Z naměřených tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Přehled obsahu flavonoidů v jednotlivých vzorcích je zobrazen v souhrnné tabulce 15.

Výchozí obsah fenolických látek byl stanoven na  $0,20 \pm 0,01$  mg/ml. Hladina flavonoidů je obdobná pro všechny vzorky, kde došlo k výraznému poklesu obsahu flavonoidů o více než polovinu. K největšímu poklesu došlo u vzorku samostatného *L. casei*, *L. delbrueckii* a *L. plantarum*, kde zůstala pouze polovina aktivních látek. Nejmenší pokles ze samostatných organismů byl zaznamenán u *L. acidophilus*, který je obsažen v obou směsích, což může být také důvod, proč je zde obsah flavonoidů mírně vyšší než u samostatných vzorků (obrázek 22).

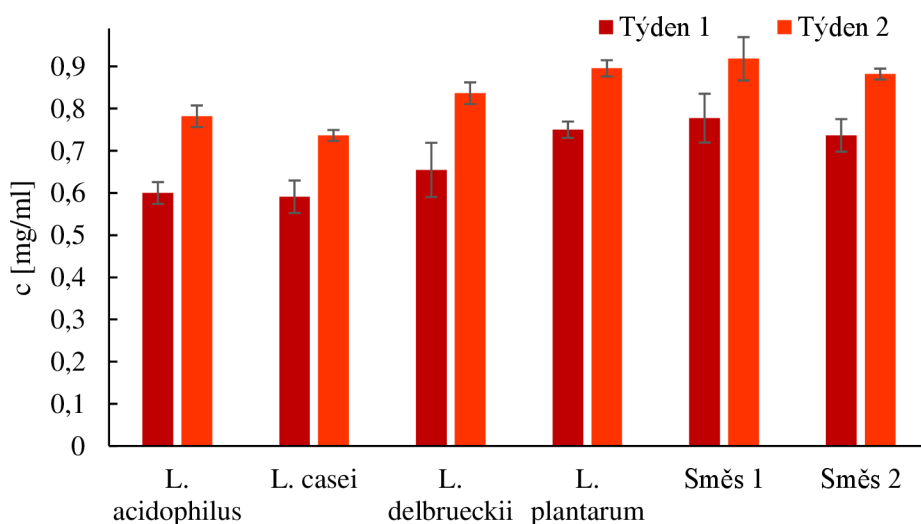


Obrázek 22 - Naměřené hodnoty flavonoidů pro obohacené vzorky

### 5.13.3 Spektrofotometrické stanovení antioxidační kapacity

Ve sledovaných vzorcích byla stanovena celková antioxidační kapacita podle postupu v bodě 4.11.3. Antioxidační kapacita byla vypočtena podle rovnice (3). Z naměřených tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Přehled zjištěné antioxidační aktivity v jednotlivých vzorcích je zobrazen v souhrnné tabulce 15.

Výchozí antioxidační kapacita byla stanovena na hodnotu  $0,75 \pm 0,05$  mg/ml TEAC. V případě antioxidační aktivity je situace velmi podobná jako s obsahem flavonoidů. Nejnižší obsah byl stanoven u vzorků obsahující *L. acidophilus*, *L. casei* a *L. delbrueckii*. U všech vzorků byl zaznamenán nárůst v druhém týdnu měření (obrázek 23).



Obrázek 23 - Naměřená antioxidační aktivita TEAC pro obohacené vzorky

### 5.13.4 Shrnutí charakterizace obohacených vzorků z hlediska bioaktivních látek

Cílem tohoto stanovení bylo zjistit, zda má obohacení probiotiky vliv na obsah aktivních látek, a to jak pozitivní, tak negativní. Před obohacením byl stanoven obsah fenolických látek na  $0,32 \pm 0,01$  mg/l, obsah flavonoidů na  $0,20 \pm 0,01$  mg/ml a antioxidační kapacita na hodnotu  $0,75 \pm 0,05$  mg/ml TEAC.

U šťávy obohacené většinou použitých kmenů se po 2 týdnech skladování hodnoty fenolických látek výrazně nemění, u všech vzorků s výjimkou *L. casei* však došlo ke zvýšení antioxidační kapacity TEAC.

Tabulka 15 - Přehled obsahu fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacity v obohacených vzorcích

Vzorek	Fenolické látky [mg/ml]		Flavonoidy [mg/ml]		Antioxidační kapacita TEAC [mg/ml]	
	Týden 1	Týden 2	Týden 1	Týden 2	Týden 1	Týden 2
<i>L. acidophilus</i>	$0,28 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,03$	$0,78 \pm 0,01$
<i>L. casei</i>	$0,28 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,04$	$0,74 \pm 0,01$
<i>L. delbrueckii</i>	$0,28 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,06$	$0,84 \pm 0,03$
<i>L. plantarum</i>	$0,33 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,02$
Směs 1	$0,35 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,06$	$0,92 \pm 0,05$
Směs 2	$0,43 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,74 \pm 0,04$	$0,88 \pm 0,01$

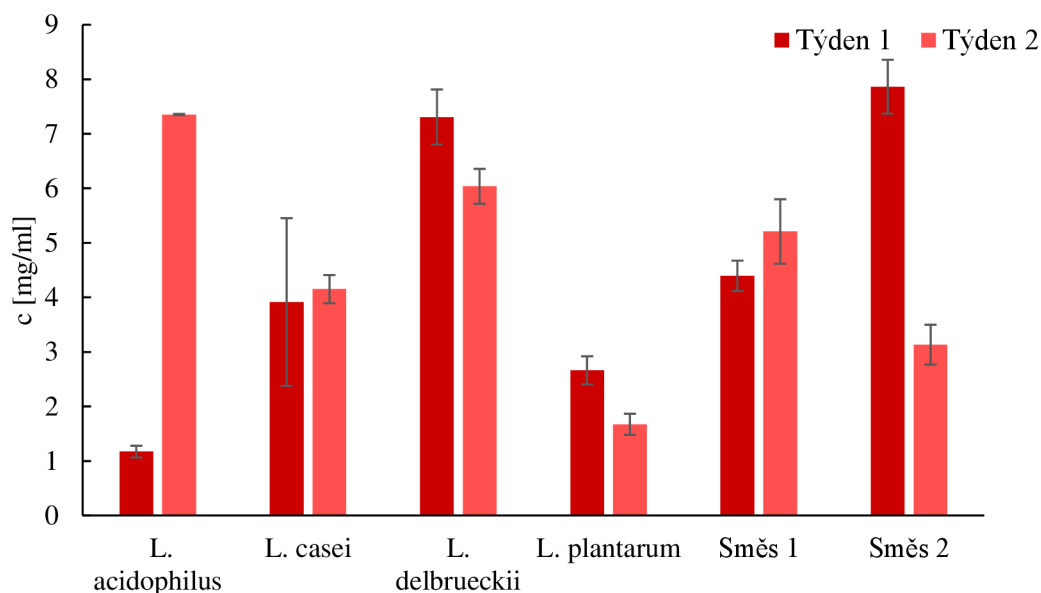
### 5.14 Charakterizace obohacené šťávy z hlediska sacharidů

#### 5.14.1 Spektrofotometrické stanovení sacharidů podle Duboise

Ve sledovaných vzorcích byl stanoven obsah sacharidů podle postupu v bodě 4.11.4. Z naměřených tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Přehled stanovených koncentrací jednotlivých vzorků je uveden v souhrnné tabulce 16.

Před obohacením byl obsah sacharidů stanoven na  $1,86 \pm 0,03$  mg/ml. U většiny vzorků (mimo *L. acidophilus*) byl po týdnu 1 zaznamenán nárůst koncentrace sacharidů (obrázek 24). Obsah po druhém týdnu zůstal téměř nezměněn u *L. casei*, došlo k nárůstu u *L. acidophilus* a směsi 1. U zbytku vzorků došlo k poklesu obsahu sacharidů. Obecně lze říci, že kromě vzorku obohaceného *L. plantarum* došlo ke zvýšení obsahu sacharidů oproti počáteční hodnotě.



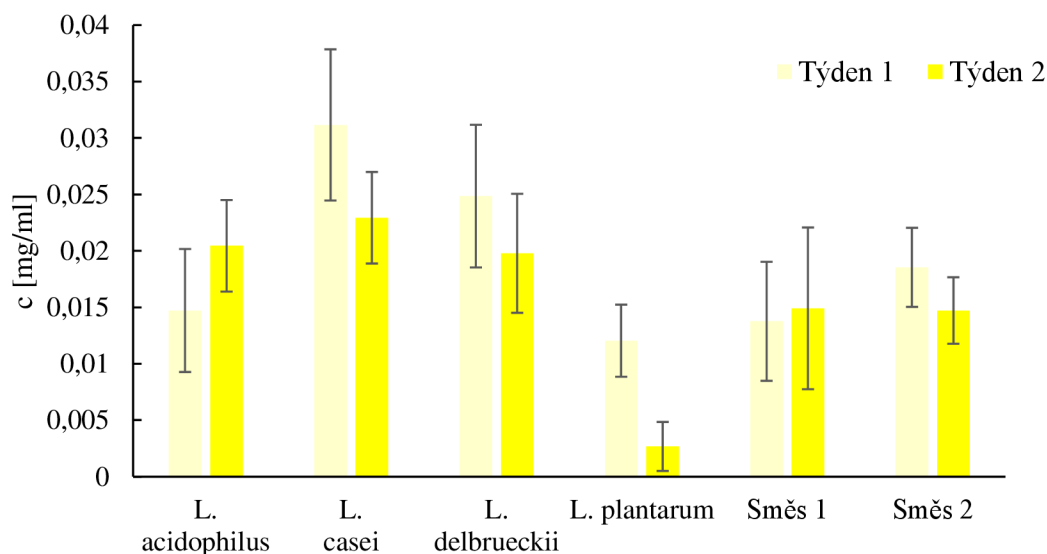


Obrázek 24 – Naměřené koncentrace sacharidů pro obohacené vzorky

### 5.14.2 Spektrofotometrické stanovení redukujících cukrů podle Somogyi-Nelsona

Ve sledovaných vzorcích byl stanoven obsah redukujících cukrů podle postupu v bodě 4.11.5. Z naměřených tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Přehled stanovených koncentrací jednotlivých vzorků je uveden v souhrnné tabulce 16.

Před obohacením byl obsah redukujících cukrů stanoven pomocí této metody na  $17,24 \pm 0,57 \mu\text{g/ml}$ . Po týdnu 2 byl obsah redukujících cukrů u směsí a vzorku obsahující *L. plantarum* nižší než na počátku, naopak u samostatných organismů byl obsah vyšší než na počátku (obrázek 25). V případě jednotlivých vzorků je vidět stejný trend poklesu/nárůstu po týdnu 2 jako u stanovení celkových sacharidů v bodě 5.14.1.



Obrázek 25 – Naměřené koncentrace redukujících cukrů pro obohacené vzorky

### 5.14.3 Shrnutí charakterizace z hlediska obsahu sacharidů

Cílem tohoto stanovení bylo zjistit, zda má obohacení probiotiky vliv na obsah sacharidů a redukcí cukrů. Před obohacením byl obsah sacharidů stanoven na  $1,86 \pm 0,03$  mg/ml a obsah redukcí cukrů na  $17,24 \pm 0,57$   $\mu$ g/ml.

Po dvoutýdenním skladování došlo ke změnám v obsahu sacharidů i cukrů. U sacharidů došlo k postupnému nárůstu obsahu sacharidů, výjimkou je vzorek obohacený o *L. plantarum*, u kterého došlo k poklesu oproti původnímu stavu o 10 %. Stejný trend, tedy zvýšení obsahu, lze sledovat i u redukcí cukrů po dvou týdnech u všech samostatných vzorků s výjimkou směsí, u kterých došlo k poklesu o 14–15 %.

Tabulka 16 - Přehled obsahu sacharidů a redukcí cukrů v obohacených vzorcích

Vzorek	Sacharidy [mg/ml]		Redukující cukry [ $\mu$ g/ml]	
	Týden 1	Týden 2	Týden 1	Týden 2
<i>L. acidophilus</i>	$1,17 \pm 0,11$	$7,35 \pm 0,11$	$14,72 \pm 0,55$	$20,45 \pm 0,41$
<i>L. casei</i>	$3,92 \pm 0,15$	$4,15 \pm 0,26$	$31,16 \pm 0,67$	$22,94 \pm 0,41$
<i>L. delbrueckii</i>	$7,31 \pm 0,51$	$6,04 \pm 0,32$	$24,85 \pm 0,63$	$19,78 \pm 0,52$
<i>L. plantarum</i>	$2,66 \pm 0,26$	$1,67 \pm 0,19$	$12,04 \pm 0,32$	$26,76 \pm 0,22$
Směs 1	$4,39 \pm 0,28$	$5,21 \pm 0,59$	$13,76 \pm 0,53$	$14,91 \pm 0,72$
Směs 2	$7,86 \pm 0,49$	$3,13 \pm 0,37$	$18,54 \pm 0,35$	$14,72 \pm 0,30$

### 5.15 Stanovení vybraných organických kyselin a cukrů pomocí HPLC

Stanovení pomocí kapalinové chromatografie bylo provedeno podle postupu v bodě 4.13. Z naměřených dvou hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Obsah vybraných organických kyselin – kyselina L-askorbová, kyselina mléčná, kyselina octová a vybraných cukrů – D-glukóza, D-fruktóza a sacharóza jsou uvedeny v tabulce 17.

V žádném vzorku nebyla stanovena kyselina citronová. Obsah kyseliny L-askorbové byl shodně ve všech vzorcích stanoven na  $0,43 \pm 0,01$  mg/ml.

U vzorků zaočkovaných samostatným organismem byl v týdnu 1 stanoven obsah sacharózy v shodném množství okolo 25 mg/ml, v týdnu 2 nebyla detekována v žádném ze vzorků. To ukazuje na schopnost zástupců rodu *Lactobacillus* využít sacharózu, což bylo potvrzeno ve studii Hosaka et al. (2020) [70]. Při měření vstupního vzorku zelné šťávy, která byla obohacena, nebyla sacharóza detekována, což ukazuje na schopnost rodu *Lactobacillus* štěpit oligosacharidy [71].

U vzorku obohaceného *L. acidophilus* nedošlo během skladování k výraznému nárůstu kyseliny mléčné a octové, došlo zároveň ke zvýšení obsahu cukrů.

U vzorku zaočkovaného *L. casei* nedošlo po týdnu 2 k výrazné změně koncentrace kyseliny mléčné, zároveň došlo ke snížení obsahu kyseliny octové, což může ukazovat na nízkou viabilitu buněk tohoto druhu.

U vzorku *L. plantarum* nebyla po týdnu 2 detekována žádná D-glukóza, došlo k poklesu fruktózy, ale zároveň nedošlo ke zvýšení obsahu kyseliny mléčné. Tento trend může ukazovat na syntézu exopolysacharidů., která byla u tohoto druhu již potvrzena [72].

U směsi 1 došlo ke zvýšení obsahu D-glukózy i D-fruktózy, pravděpodobně získanou ze štěpení sacharózy. Zároveň došlo ke zvýšení obsahu kyseliny mléčné, což ukazuje na aktivitu probiotických bakterií. V případě směsi 2 došlo ke snížení obsahu cukrů a zároveň zvýšení obsahu kyseliny octové i mléčné, což opět naznačuje aktivitu probiotických bakterií.

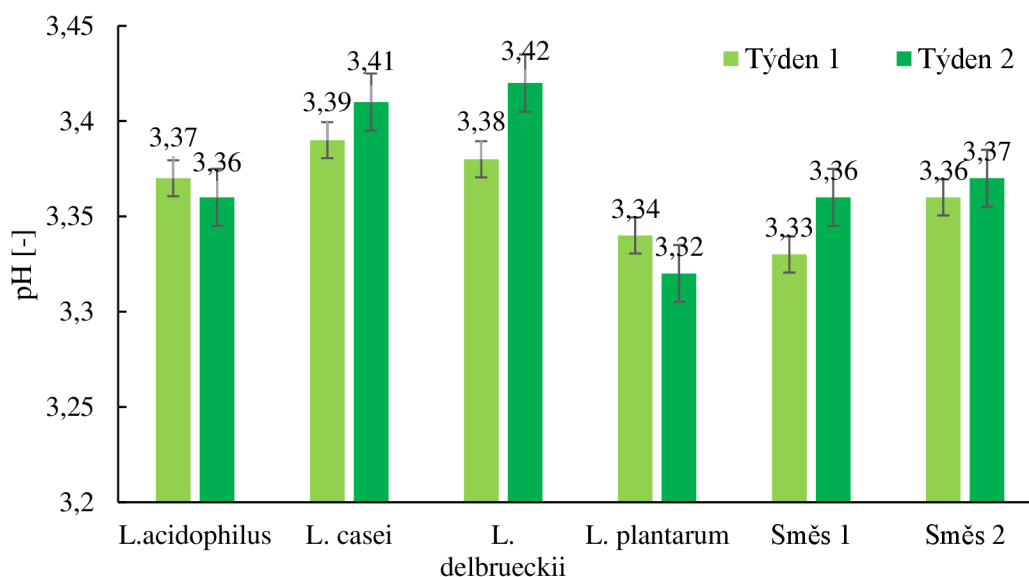
Tabulka 17 – Naměřené koncentrace vybraných analytů pro obohacené vzorky

Vzorek	Analyt	Týden 1 [mg/ml]	Týden 2 [mg/ml]	Změna
<i>L. acidophilus</i>	Sacharóza	25,49 ± 0,13	–	≈
	D-fruktóza	1,84 ± 0,03	3,31 ± 0,31	↓
	D-glukóza	0,09 ± 0,01	1,11 ± 0,08	↑
	Kyselina L-mléčná	10,12 ± 0,43	10,61 ± 0,01	↑
	Kyselina octová	165,06 ± 0,22	172,05 ± 0,67	↑
	Kyselina L-askorbová	0,43 ± 0,01	0,43 ± 0,01	≈
<i>L. casei</i>	Sacharóza	25,53 ± 0,07	–	≈
	D-glukóza	1,81 ± 0,03	1,28 ± 0,02	↑
	D-fruktóza	3,88 ± 0,01	3,25 ± 0,02	↓
	Kyselina L-mléčná	9,41 ± 0,23	9,35 ± 0,12	↑
	Kyselina octová	213,61 ± 0,28	153,34 ± 0,184	↑
	Kyselina L-askorbová	0,43 ± 0,01	0,43 ± 0,01	≈
<i>L. delbrueckii</i>	Sacharóza	25,3 ± 0,05	–	≈
	D-glukóza	1,34 ± 0,02	1,24 ± 0,07	↑
	D-fruktóza	3,40 ± 0,03	1,94 ± 0,02	↓
	Kyselina L-mléčná	9,30 ± 0,09	7,53 ± 0,05	↓
	Kyselina octová	142,97 ± 0,25	152,00 ± 0,03	↑
	Kyselina L-askorbová	0,43 ± 0,01	0,43 ± 0,01	≈
<i>L. plantarum</i>	Sacharóza	25,65 ± 0,01	–	≈
	D-glukóza	2,46 ± 0,03	–	≈
	D-fruktóza	2,97 ± 0,08	1,47 ± 0,08	↓
	Kyselina L-mléčná	10,19 ± 0,59	8,91 ± 0,02	↑
	Kyselina octová	175,33 ± 0,50	183,43 ± 0,83	↑
	Kyselina L-askorbová	0,43 ± 0,01	0,43 ± 0,01	≈
Směs 1	D-glukóza	0,35 ± 0,03	1,29 ± 0,03	↑
	D-fruktóza	2,24 ± 0,06	3,36 ± 0,02	↓
	Kyselina L-mléčná	8,76 ± 0,04	10,58 ± 0,01	↑
	Kyselina octová	218,86 ± 0,11	159,80 ± 0,16	↑
	Kyselina L-askorbová	0,43 ± 0,01	0,43 ± 0,01	≈
Směs 2	D-glukóza	25,57 ± 0,06	1,88 ± 0,01	↑
	D-fruktóza	1,97 ± 0,04	1,96 ± 0,01	↓
	Kyselina L-mléčná	8,77 ± 0,10	9,86 ± 0,02	↑
	Kyselina octová	187,67 ± 0,73	201,23 ± 0,28	↑
	Kyselina L-askorbová	0,43 ± 0,01	0,43 ± 0,01	≈

Vysvětlivky:  $\approx$  beze změny,  $\downarrow$  pokles,  $\uparrow$  nárůst, – nedetekováno, tendenci nelze určit. Změna je brána v rozdílu vstupní suroviny a týdnu 2.

## 5.16 Měření pH obohacených vzorků

Stanovení pH bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.10. Z naměřených tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. pH výchozí pasterované šťávy bylo stanoveno na hodnotu 3,47. U všech vzorků došlo k poklesu pH během prvního týdne skladování (obrázek 26.) Tato skutečnost mohla napomáhat k velmi malému poklesu fenolických látek a antioxidační aktivity. Během druhého týdne došlo u většiny vzorků k mírnému zvýšení pH, hodnota ale nedosáhla výchozí hodnoty před obohacením. Výjimkou jsou vzorky obohacené organismy *L. acidophilus* a *L. plantarum*, kde došlo mírnému poklesu pH.



Obrázek 26 – Naměřené hodnoty pH pro obohacené vzorky

## 5.17 Sledování stability obohacené zelné šťávy

Zelná šťáva s přidavkem probiotických kultur byla připravena podle návodu v bodě 4.18. Ze všech vzorků byla izolována DNA podle bodu 4.20.1., dále byla stanovena její čistota a koncentrace podle bodu 4.20.2 a byla provedena PCR reakce se specifickými primery uvedenými v tabulce 5. Izolace byly provedeny ve dvou odběrech, jeden a dva týdny od zaočkování kultur.

### 5.17.1 Potvrzení přítomnosti zástupců domény *Bacteria*

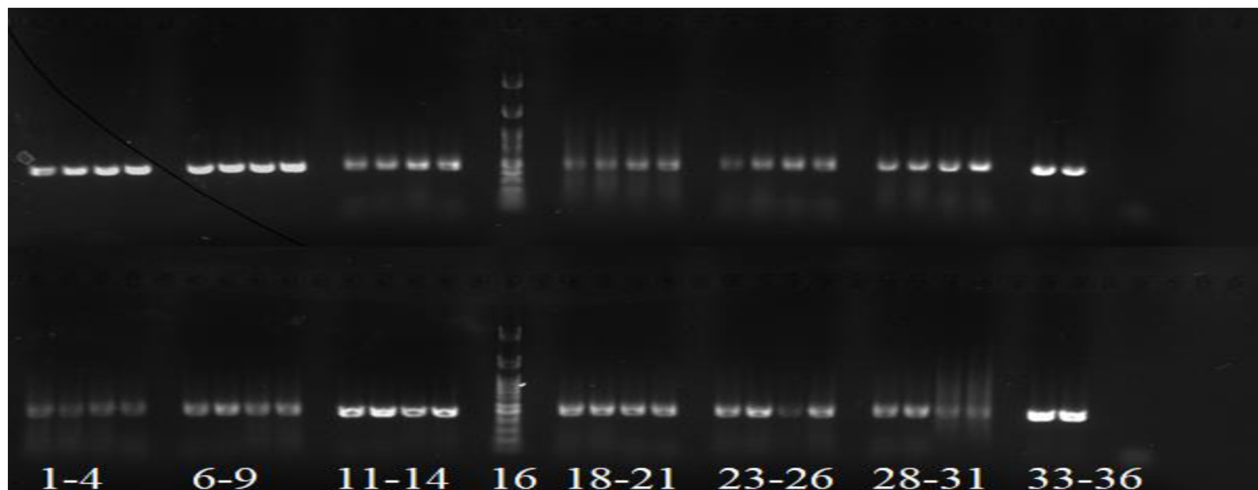
Přítomnost DNA bakterií byla ověřena metodou PCR v reálném čase. Použitím specifických primerů R\_eub a F\_eub (uvedeny v tabulce 5) byly amplifikovány úseky DNA o délce 466 bp. Produkty PCR byly nanášeny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza podle postupu v bodě 4.20.4. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus*

*plantarum*, která byla získána bodě 5.9.3. Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na obrázku 27. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v tabulce 18.

Tabulka 18 – Schéma nanesení PCR produktů pro potvrzení domény *Bacteria*

Běh	Vzorek	Detekce PCR produktu – týden 1	Detekce PCR produktu – týden 2
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+++	+
2		+++	+
3		+++	+
4		+++	+
6	<i>Lactobacillus casei</i>	+++	++
7		+++	++
8		+++	++
9		+++	++
11	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	++	+++
12		++	+++
13		++	+++
14		++	+++
16	Standard	+++	+++
18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	++	++
19		++	++
20		++	++
21		++	++
23		Směs 1 - <i>Lactobacillus acidophilus</i>	++
24	<i>Lactobacillus casei</i>	++	++
25	<i>Lactobacillus plantarum</i>	++	+
26		++	++
28	Směs 2 - <i>Lactobacillus acidophilus</i>	++	++
29	<i>Lactobacillus casei</i>	++	++
30	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	++	+
31		++	+
33	Pozitivní kontrola	+++	+++
34	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++	+++
35	Negativní kontrola	–	–
36		–	–

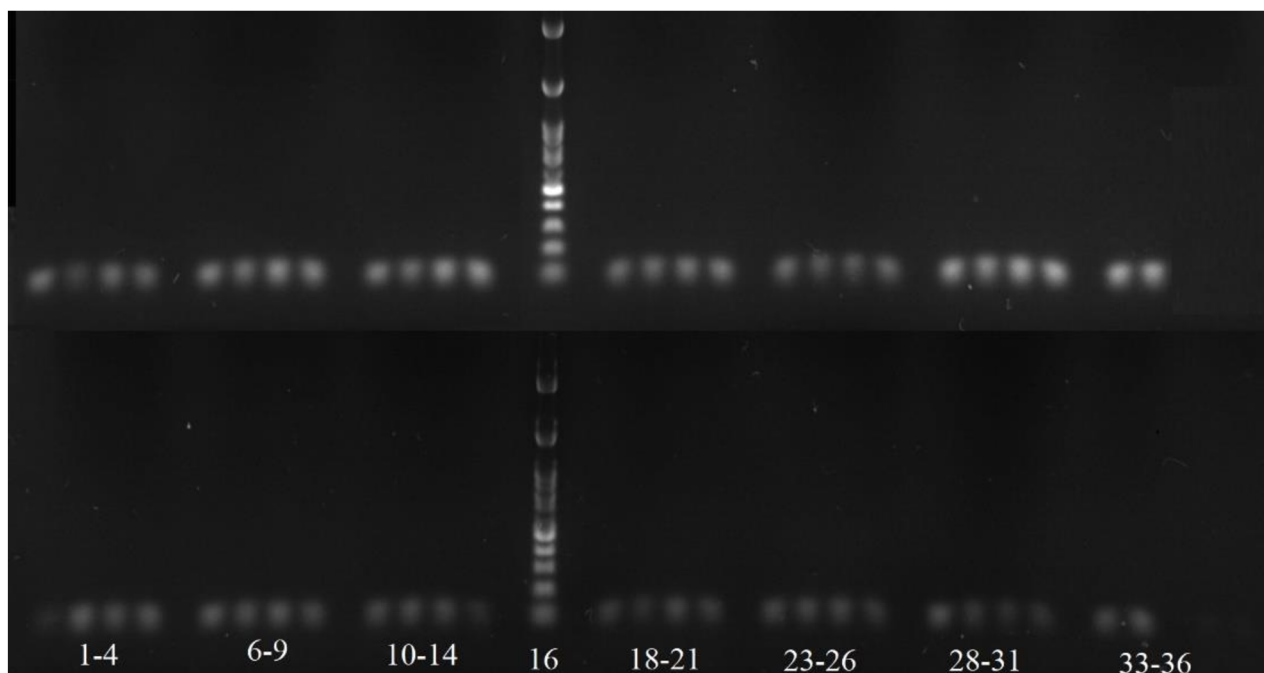
Legenda: + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován



Obrázek 27 - výřez gelové elektroforézy pro doménu *Bacteria*, nahoře pro týden 1, dole pro týden 2

### 5.17.2 Potvrzení přítomnosti zástupců rodu *Lactobacillus*

Přítomnost DNA bakterií rodu *Lactobacillus* byla ověřena metodou PCR v reálném čase. Použitím specifických primerů R\_allact a F\_allact (tabulka 5) byly amplifikovány úseky DNA o délce 92 bp. Produkty PCR byly naneseny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza podle postupu v bodě 4.20.4. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus plantarum*, která byla získána ověřena v bodě 5.9.3. Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na obrázku 28. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v tabulce 19.



Obrázek 28 - výřez gelové elektroforézy pro rod *Lactobacillus*, nahoře pro týden 1, dole pro týden 2

Tabulka 19 – Schéma nanesení PCR produktů pro potvrzení přítomnosti bakterií rodu *Lactobacillus*

Běh	Vzorek	Detekce PCR produktu – týden 1	Detekce PCR produktu – týden 2
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	++	+
2		++	++
3		++	++
4		++	++
6	<i>Lactobacillus casei</i>	++	++
7		++	++
8		++	++
9		++	++
11	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	++	++
12		++	++
13		++	++
14		++	+
16	Standard	+++	+++
18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	++	++
19		++	++
20		++	++
21		++	++
23	Směs 1 - <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	++	++
24		++	++
25		++	++
26		++	++
28	Směs 2 - <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	++	++
29		++	++
30		++	++
31		++	++
33	Pozitivní kontrola	++	++
34	<i>Lactobacillus plantarum</i>	++	++
35	Negativní kontrola	–	–
36		–	–

Legenda: + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován

### 5.17.3 Potvrzení přítomnosti zástupců *Lactobacillus acidophilus*

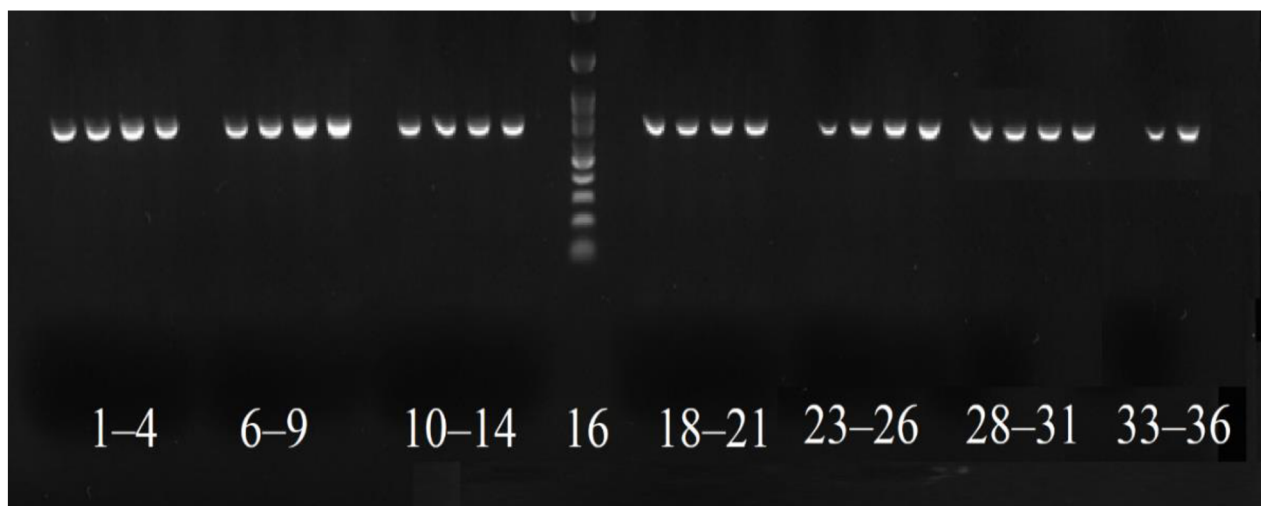
Ve vybraných vzorcích, které byly zaočkovány čistou kulturou obsahující *Lactobacillus acidophilus*, byla ověřena přítomnost DNA tohoto druhu metodou PCR v reálném čase. Použitím specifických primerů Aci16SI a 16SII (tabulka 5) byly amplifikovány úseky DNA o délce 800 bp. Produkty PCR byly nanášeny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza podle postupu v bodě 4.20.4. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus acidophilus*, která byla ověřena v bodě 5.9.3. Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na obrázku 29. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v tabulce 20.

Tabulka 20 - Schéma nanesení PCR produktů pro potvrzení přítomnosti *Lactobacillus acidophilus*

Běh	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	Týden 1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	++
2		++
3		++
4		++
6	Týden 2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	++
7		++
8		++
9		++
11	Směs 1 - Týden 1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	++
12		++
13		++
14		++
16	Standard	+++
18	Směs 1 - Týden 2 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	++
19		++
20		++
21		++
23	Směs 2 - Týden 1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	++
24		++
25		++
26		++
28	Směs 2 - Týden 2 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	++
29		++
30		++
31		++
33	Pozitivní kontrola	+++
34	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+++
35	Negativní kontrola	-
36		-

Legenda: + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), - produkt nedetekován

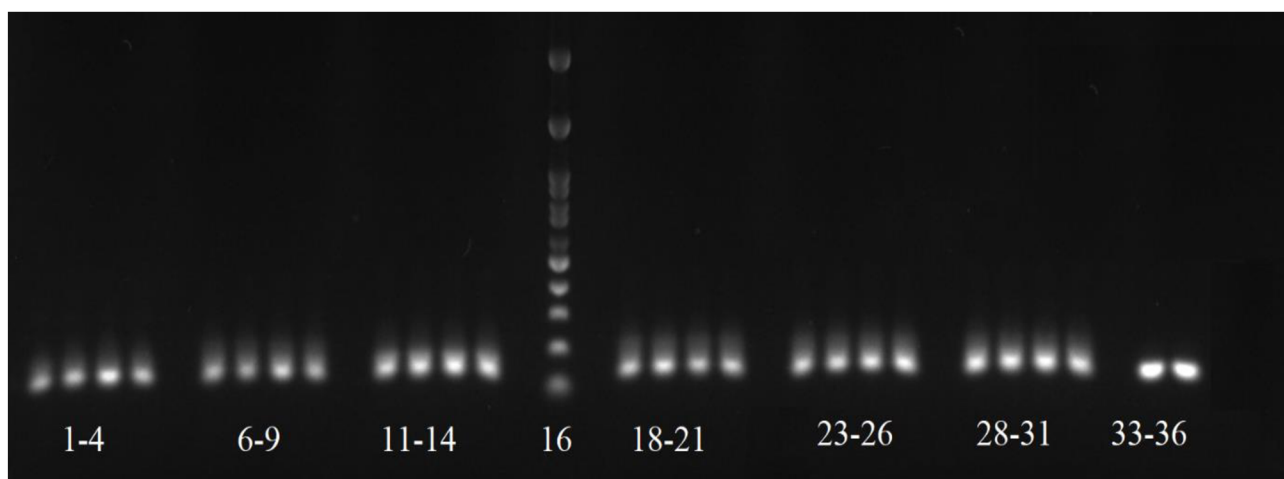




Obrázek 29 - výřez gelové elektroforézy pro *Lactobacillus acidophilus*

#### 5.17.4 Potvrzení přítomnosti zástupců *Lactobacillus casei*

Ve vybraných vzorcích, které byly zaočkovány čistou kulturou obsahující *Lactobacillus casei*, byla ověřena přítomnost DNA tohoto druhu metodou PCR v reálném čase. Použitím specifických primerů PrI a CasII (tabulka 5) byly amplifikovány úseky DNA o délce 132 bp. Produkty PCR byly nanášeny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza podle postupu v bodě 4.20.4. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus casei*, která byla ověřena v bodě 5.9.3. Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na obrázku 30. Schéma nanášení vzorků je uvedeno v tabulce 21.



Obrázek 30 - výřez gelové elektroforézy pro *Lactobacillus casei*

Tabulka 21 - Schéma nanesení PCR produktů pro potvrzení přítomnosti *Lactobacillus casei*

Běh	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	Týden 1 <i>Lactobacillus casei</i>	++
2		++
3		++
4		++
6	Týden 2 <i>Lactobacillus casei</i>	++
7		++
8		++
9		++
11	Směs 1 - Týden 1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	++
12		++
13		++
14		++
16	Standard	+++
18	Směs 1 - Týden 2 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	++
19		++
20		++
21		++
23	Směs 2 - Týden 1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	++
24		++
25		++
26		++
28	Směs 2 - Týden 2 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	++
29		++
30		++
31		++
33	Pozitivní kontrola	+++
34	<i>Lactobacillus casei</i>	+++
35	Negativní kontrola	–
36		–

Legenda: + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován

#### 5.17.5 Potvrzení přítomnosti zástupců *Lactobacillus delbrueckii*

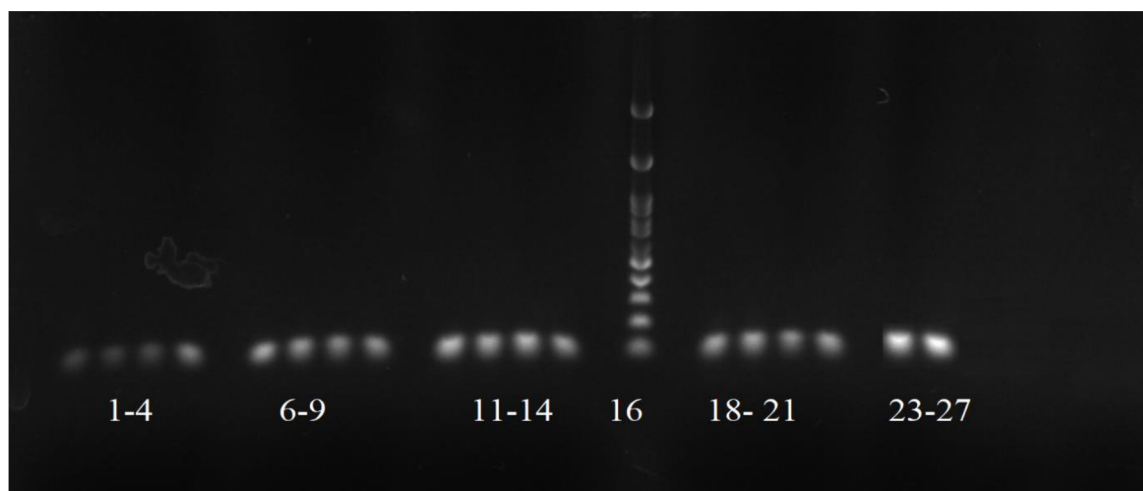
Ve vybraných vzorcích, které byly zaočkovány čistou kulturou obsahující *Lactobacillus delbrueckii*, byla ověřena přítomnost DNA tohoto druhu metodou PCR v reálném čase. Použitím specifických primerů R\_delbr a F\_delbr (tabulka 5) byly amplifikovány úseky DNA o délce 94 bp. Produkty PCR byly nanášeny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza podle postupu v bodě 4.20.4. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA

*Lactobacillus delbrueckii*, která byla ověřena v bodě 5.9.3. Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na obrázku 31. Schéma nanesení vzorků je uvedeno v tabulce 22.

Tabulka 22 - Schéma nanesení PCR produktů pro potvrzení přítomnosti *Lactobacillus delbrueckii*

Běh	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	Týden 1 <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+
2		+
3		+
4		++
6	Týden 2 <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	++
7		++
8		++
9		++
11	Směs 2 - Týden 1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+++
12		+++
13		+++
14		+++
16	Standard	+++
18	Směs 2 - Týden 2 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+++
19		+++
20		+++
21		+++
23	Pozitivní kontrola <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+++
24		+++
25	Negativní kontrola	-
26		-

Legenda: + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), - produkt nedetekován



Obrázek 31 – výřez gelové elektroforézy pro *Lactobacillus delbrueckii*

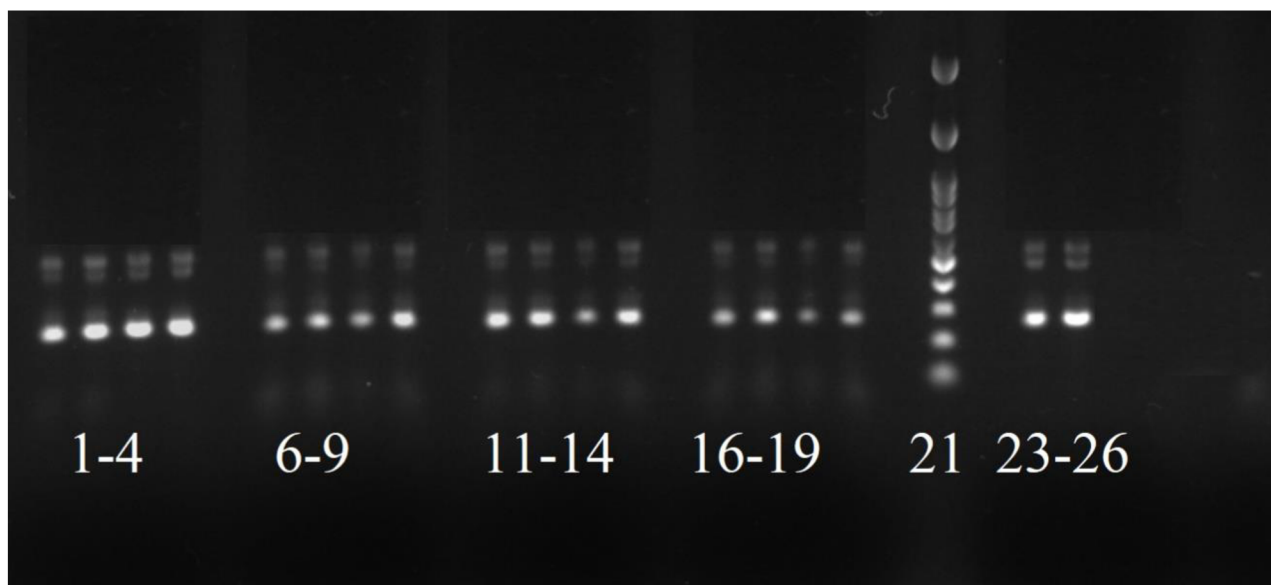
### 5.17.6 Potvrzení přítomnosti zástupců *Lactobacillus plantarum*

Ve vybraných vzorcích, který byly zaočkovány čistou kulturou obsahující *Lactobacillus plantarum* byla ověřena přítomnost DNA tohoto druhu metodou PCR v reálném čase. Použitím specifických primerů Lfpr a PlanII (tabulka 5) byly amplifikovány úseky DNA o délce 200 a 400 bp. Produkty PCR byly nanесeny na agarózový gel a následně byla provedena gelová elektroforéza podle postupu v bodě 4.20.4. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus plantarum*, která byla ověřena v bodě 5.9.3. Výsledek gelové elektroforézy lze vidět na obrázku 32. Schéma nanесení vzorků je uvedeno v tabulce 23.

Tabulka 23- Schéma nanесení PCR produktů pro potvrzení přítomnosti *Lactobacillus plantarum*

Běh	Vzorek	Detekce PCR produktu
1	Týden 1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	++
2		++
3		++
4		++
6	Týden 2 <i>Lactobacillus plantarum</i>	++
7		++
8		++
9		++
11	Směs 1 - Týden 1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	++
12		++
13		++
14		++
16	Směs 1 - Týden 1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	++
17		++
18		++
19		++
21	Standard	+++
23	Pozitivní kontrola <i>Lactobacillus plantarum</i>	++
24		++
25	Negativní kontrola	–
26		–

Legenda: + produkt detekován (+ slabá, ++ střední, +++ silná intenzita), – produkt nedetekován



Obrázek 32 - výřez gelové elektroforézy pro *Lactobacillus plantarum*

### 5.18 Sledování viability probiotických bakterií v obohacených vzorcích

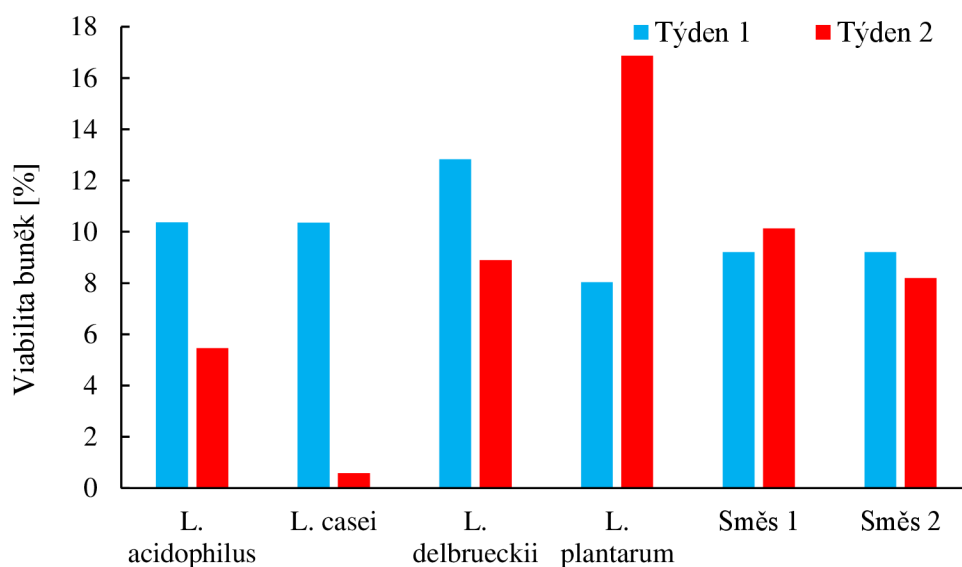
Přítomnost jednotlivých druhů v obohacených šťávách po následném zaočkování do MRS média byla u všech zástupců potvrzena pomocí metody RT-PCR. Pomocí průtokové cytometrie byla sledováno zastoupení živých a mrtvých buněk v jednotlivých vzorcích po jednom a dvou týdnech. Počet buněk v jednotlivých vzorcích je uveden v tabulce 24 pro týden 1 a v tabulce 25 pro týden 2 a graficky znázorněn na obrázku 33.

Po dvoutýdenním skladování vykazoval největší viabilitu vzorek obohacený organismem *Lactobacillus plantarum*, a to přesto, že v týdnu 1 byla jeho viabilita stanovena jako nejnižší ze sledovaných vzorků. Tento závěr je také v souladu s naměřeným pH, které bylo ze všech vzorků nejnižší, což souvisí s produkcí organických kyselin. Dále bylo potvrzeno, že přežití probiotik může záviset na produkci exopolysacharidů probiotickým kmenem, kterou tento druh disponuje [61].

Naopak jako organismus s nejnižší viabilitou byl stanoven *Lactobacillus casei*. Přestože byla viabilita po prvním týdnu skladování stanovena na 10,36 %, po druhém týdnu poklesla na hodnotu 0,58 % a lze tedy zhodnotit, že tento organismus není vhodný pro obohacení. Tento závěr se v souladu s výsledky studie Yoon et al. (2006) [18].

Podobně byl vyhodnocen organismus *L. acidophilus*. Jeho viabilita po dvou týdnech vykazovala 5,46 % a v porovnání s týdnem 1 měla klesající tendenci. *L. delbrueckii* se vyznačoval také klesající tendencí, po dvou týdnech byla jeho viabilita stanovena na 8,89 %.

V případě směsi byla největší viabilita stanovena u směsi 1, která obsahuje *L. plantarum*, který bude velmi pravděpodobně zodpovědný za tuto vyšší aktivitu. Nárůst není tak vysoký jako v případě čisté kultury *L. plantarum*, což může být způsobeno markantním úbytkem buněk *L. casei* a také *L. acidophilus*.



Obrázek 33 – Viabilita buněk pro jednotlivé vzorky po skladování

Tabulka 24 – Viabilita probiotických buněk po týdnu skladování

Vzorek	Počet buněk [CFU/ml]		Viabilita [%]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2,94 · 10 <sup>8</sup>	Ž	3,05 · 10 <sup>7</sup>
		M	2,64 · 10 <sup>8</sup>
<i>Lactobacillus casei</i>	6,45 · 10 <sup>7</sup>	Ž	6,68 · 10 <sup>6</sup>
		M	5,79 · 10 <sup>7</sup>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	2,38 · 10 <sup>8</sup>	Ž	3,05 · 10 <sup>7</sup>
		M	1,98 · 10 <sup>8</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,09 · 10 <sup>8</sup>	Ž	1,68 · 10 <sup>7</sup>
		M	1,83 · 10 <sup>8</sup>
Směs 1 – <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i>	1,77 · 10 <sup>8</sup>	Ž	1,63 · 10 <sup>7</sup>
		M	1,51 · 10 <sup>8</sup>
Směs 2 – <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i>	2,15 · 10 <sup>8</sup>	Ž	1,98 · 10 <sup>7</sup>
		M	1,85 · 10 <sup>8</sup>

Legenda: Ž–živé, M–mrtvé

Tabulka 25 – Viabilita probiotických buněk po dvou týdnech skladování

Vzorek	Počet buněk [CFU/ml]		Viabilita [%]	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6,01·10 <sup>7</sup>	Ž	3,28·10 <sup>6</sup>	5,46
		M	5,68·10 <sup>7</sup>	
<i>Lactobacillus casei</i>	6,46·10 <sup>7</sup>	Ž	3,75·10 <sup>5</sup>	0,58
		M	5,79·10 <sup>6</sup>	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	8,49·10 <sup>7</sup>	Ž	7,55·10 <sup>6</sup>	8,89
		M	7,37·10 <sup>7</sup>	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5,02·10 <sup>7</sup>	Ž	8,47·10 <sup>6</sup>	16,87
		M	3,87·10 <sup>7</sup>	
Směs 1 – <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i>	7,67·10 <sup>7</sup>	Ž	7,77·10 <sup>6</sup>	10,13
		M	6,40·10 <sup>7</sup>	
Směs 2 – <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i>	1,67·10 <sup>8</sup>	Ž	1,37·10 <sup>7</sup>	8,20
		M	1,47·10 <sup>8</sup>	

Legenda: Ž–živé, M–mrtvé

## 5.19 Senzorická analýza

Součástí experimentální části bylo provést senzorickou analýzu zelné šťávy. Cílem této části bylo zhodnotit senzorické vlastnosti zelné šťávy. Protože se předpokládalo, že díky obsahu organických kyselin a nízkému obsahu cukrů by nápoj nemusel být atraktivní pro řadu spotřebitelů, byla šťáva zkombinována s jablečno-řepným džusem. Tento přídatek má za cíl zamaskovat některé výrazné chutě zelné šťávy a zvýšit tak atraktivitu výsledného nápoje i pro děti.

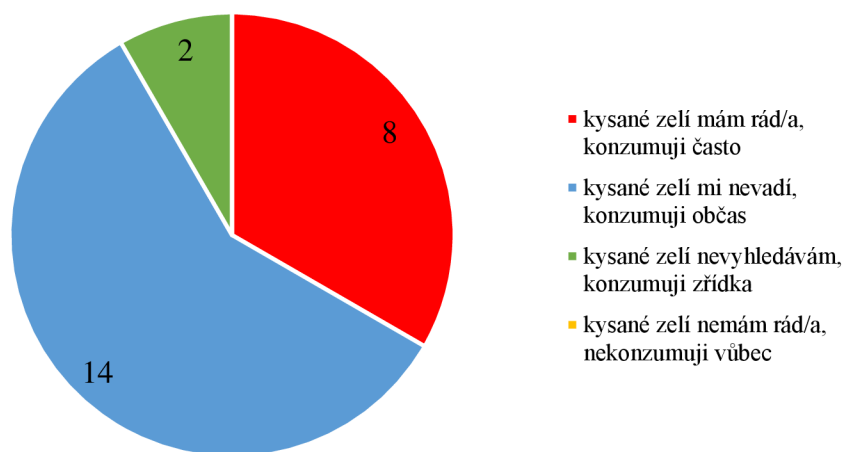
Pro optimalizaci finálního poměru ovocno-zeleninového nápoje bylo kromě všech výše uvedených analýz také provedeno senzorické hodnocení.

Hodnotitelé obdrželi vzorek čerstvé zelné šťávy, sterilované zelné šťávy a směsné vzorky s jablečno-řepným džusem viz obrázek 34. Přesné složení předložených vzorků k senzorickému hodnocení je uvedeno v tabulce 7.



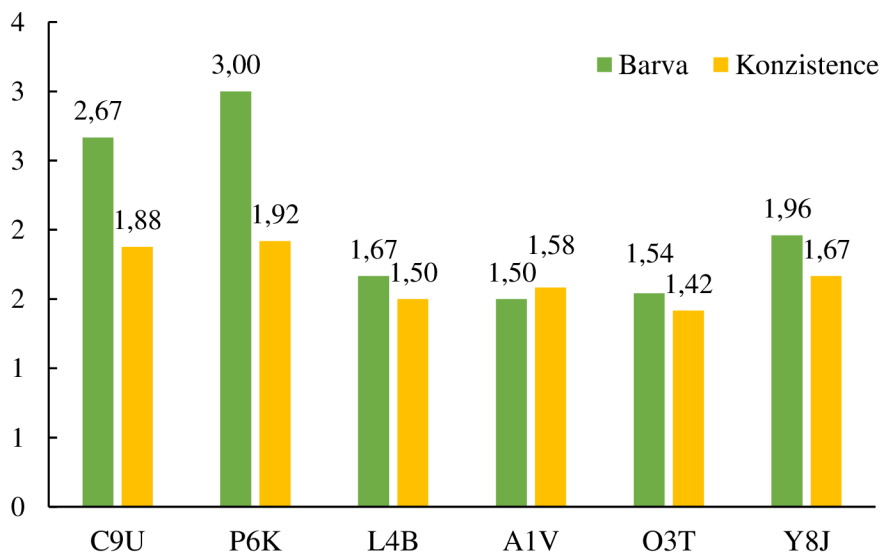
Obrázek 34 – ukázka hodnocených vzorků

Hodnocení se zúčastnilo 23 hodnotitelů ve věku 20-29 let, pouze jeden hodnotitel ve věku 50-59 let. V úvodu dotazníku hodnotitelé charakterizovali svůj vztah ke kysanému zelí výběrem z možností (obrázek 35). Nejčastěji zvolenou možností byl neutrální vztah s občasnou konzumací. Žádný z hodnotitelů nevybral možnost, že kysané zelí nekonzumuje vůbec a nemá ho rád.



Obrázek 35 - Grafické znázornění vztahu hodnotitelů ke konzumaci kysaného zelí

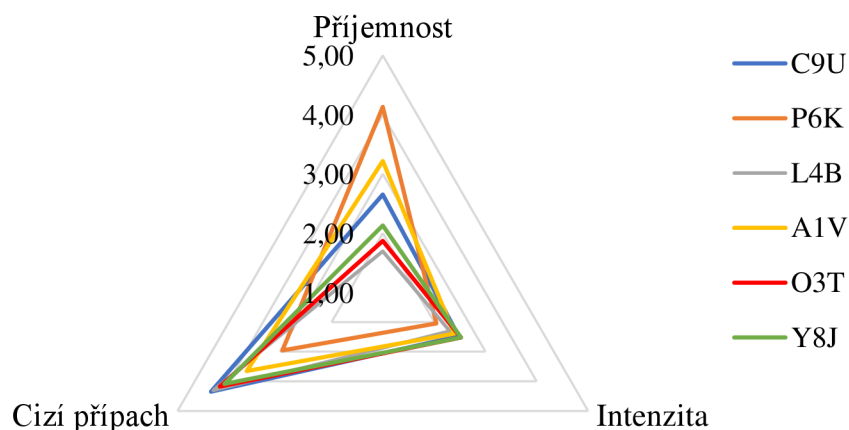
Hodnotitelé nejprve hodnotili vizuální charakteristiku vzorku. Průměrné hodnoty jsou znázorněny na obrázku 36. Parametr konzistence byl hodnocen u všech vzorků podobně, bez výrazných rozdílů. Hodnocení barvy nebylo tak jednoznačné, lépe byly hodnoceny červeně zbarvené vzorky obsahující jablečno-řepnou šťávu, oproti vzorkům žlutě zbarvené zelné šťávy.



Obrázek 36 – Grafické znázornění hodnocení parametrů vzhledu

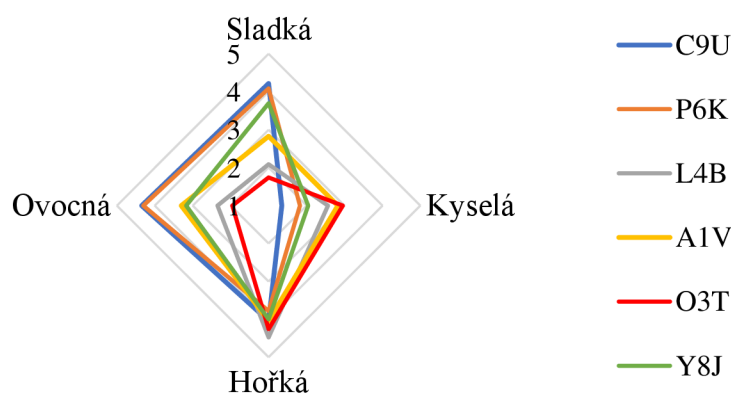


Dalším hodnoceným aspektem byla vůně. Na následujícím Obrázek 37 jsou prezentovány 3 hlavní charakteristiky – příjemnost vůně, její intenzita a přítomnost cizího příchachu. Vzorky se od sebe příliš neodlišují v síle cizího příchachu ani intenzitě vůně. Významný rozdíl mezi vzorky byl zaznamenán v případě příjemnosti vůně. Nejhuře hodnocený byl vzorek P6K, který reprezentuje sterilovanou zelnou šťávu, následovaný vzorkem A1V, který obsahoval také ve směsi s džusem sterilovanou šťávu v poměru 1:1.



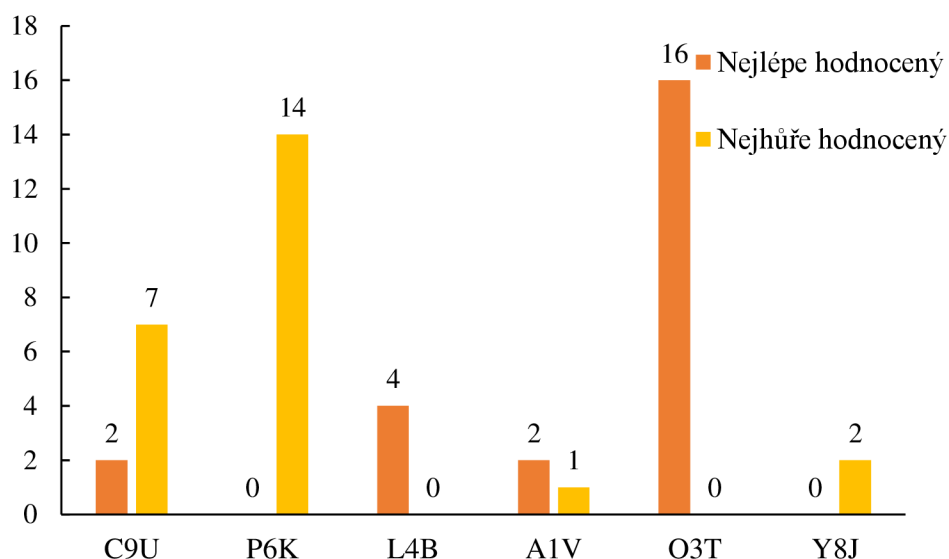
Obrázek 37 – Grafické znázornění hodnocení vybraných parametrů vůně

Posledním hodnoceným aspektem byla chuť. Vzorky se příliš neodlišují v hořkosti, naopak výrazné rozdíly byly shledány u sladké, ovocné a kyselé chuti. Vzorky C9U a P6K, které oba obsahují pouze zelnou šťávu, byly hodnoceny jako nejvíce kyselé. Sladká, ovocná a hořká chuť u nich nebyly podle hodnotitelů výrazné (obrázek 38). V získaných známkách se od sebe tyto vzorky významně neliší. Jako nejvíce sladký a ovocný byl vyhodnocen vzorek O3T, který obsahoval nejvyšší podíl jablečno-řepné šťávy. Na druhém místě se umístil vzorek L4B, který obsahoval poměr čerstvé zelné šťávy a džusu 1:1. Lze shrnout, že kladnější hodnocení obdržely vzorky obsahující jablečno-řepnou šťávu oproti samostatné zelné šťávě.



Obrázek 38 – Grafické znázornění hodnocení vybraných parametrů chuti

Na závěr sensorického hodnocení byl hodnotiteli proveden pořadový test. Hodnotitelé zde seřadili vzorky dle svých preferencí (Obrázek 39). Jak se dalo předpokládat na základě dílčích hodnocení, na prvním místě se umístil vzorek O3T, který zvolilo 16 hodnotitelů. Tento vzorek, následovaný vzorkem L4B jasně ukazuje větší oblíbenost směsných nápojů, kde byla ostrá chuť zelné šťávy zmírněna chutí ovocného džusu. Tento trend dokazuje i výsledek nejhůře hodnoceného vzorku (P6K zvolený 14 hodnotiteli), následovaný vzorkem C9U zvoleným 7 hodnotiteli. Oba nejhůře hodnocené vzorky reprezentovaly pouze čistou zelnou šťávu.



Obrázek 39 – Grafické znázornění výsledků pořadového testu

Z výsledků sensorické analýzy vyplývá, že spotřebitelé dle očekávání více ocenili směsné šťávy obsahující džus, díky kterému byla potlačena ostrá chuť zelné šťávy. Tento nápoj kombinuje sladkou a ovocnou chuť použitého ovoce s pozitivními vlastnostmi zelné šťávy.

## 6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá výběrem optimálního pasteračního zákroku pro zelnou šťávu. Po zvolení vhodné pasterace a charakterizaci zelného produktu byl navrhnut směsný ovocno-zeleninový nápoj, který byl podroben senzoričké analýze. Pro kombinaci se zelnou šťávou byl zvolen džus složený z jablek a červené řepy.

První část experimentální práce se věnovala optimalizaci a výběru vhodného tepelného ošetření zelné šťávy. Cílem pasterace bylo prodloužit možnou dobu skladování a zajistit tak zdravotní nezávadnost. Nejprve byl charakterizován vstupní vzorek nepasterované zelné šťávy z chemického a mikrobiálního hlediska. V zelné šťávě byla potvrzena přítomnost bakterií, kvasinek, zástupců rodu *Lactobacillus* a na selektivním médiu přítomnost nepatogenního zástupce rodu *Listeria*. Nebyla prokázána přítomnost koliformních bakterií.

Následně byly zvoleny 4 teplotní profily a byly sledovány změny v obsahu sacharidů a redukujících cukrů, dále v obsahu fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivity.

Jako nejvhodnější byla potvrzena pasterace při 90 °C po dobu 0,5 minuty. Tato pasterace se ukázala jako nejšetrnější k bioaktivním látkám. Došlo k mírnému poklesu celkových fenolických látek o 33 %, poklesu flavonoidů o 36 % a k poklesu antioxidační aktivity o 23 %. Pro srovnání, nejméně účinnou se ukázala pasterace při 80 °C po dobu 2 minut, při které došlo k poklesu celkových fenolických látek o 37 %, poklesu flavonoidů o 40 % a k poklesu antioxidační aktivity o 39 %. V případě sacharidů a redukujících cukrů došlo sice během pasterace k výrazným změnám, pokles hodnot se ovšem výrazně nelišil mezi jednotlivými režimy pasterace.

Při pasteraci 90 °C po dobu 0,5 minuty došlo k inhibici zástupců kvasinek, což bylo žádoucí a zajistilo tak nemožnost sekundárního kvašení. Dále došlo k inhibici růstu zástupců *Listeria*, což je nezbytné pro bezpečnost, a bylo také jedním z hlavních sledovaných parametrů. Při pasteraci došlo rovněž k úbytku bakterií mléčného kvašení, což byl sice očekávaný, ale nežádoucí jev. Z důvodu zdravotních benefitů, které přináší konzumace laktobacilů, bylo navrženo obohacení pasterované šťávy vybranými zástupci rodu *Lactobacillus*. Přítomnost zástupců rodu *Lactobacillus* byla pak potvrzena ve vzorku pasterované i nepasterované šťávy pomocí metody PCR v reálném čase.

Druhá část experimentální práce pak využívala ověřený režim pasterace 90 °C po dobu 0,5 minut a vedla k vývoji obohacené směsné šťávy. Na základě rešerše byly zvoleny 4 probiotické organismy, které se v zelné šťávě přirozeně vyskytují: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* a *Lactobacillus plantarum*. Bylo provedeno měření růstové křivky ve 3 různých kultivačních prostředích po dobu 24 hodin. Pomocí růstových křivek byla nalezena shoda v chování *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus delbrueckii*. Z tohoto důvodu byly tyto organismy použity ve směsích odděleně. V dalších dvou kultivačních prostředích – zelné šťávě a džusu nebylo dosaženo ani exponenciální fáze. Změna podmínek kultivace a složení média byla zjevně pro mikroorganismy náročná, za dobu 24 hodin probíhala pouze adaptační fáze, nedošlo k výraznému nárůstu ani úbytku.

Zelná šťáva podrobená pasteraci byla zaočkována vybranými zástupci a sledována její stabilita a změny složení po dobu 2 týdnů. Byly vytvořeny dvě různé směsi probiotik a dále byly použity také samostatné organismy. Směs 1 obsahovala *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum*, směs 2 obsahovala *Lactobacillus acidophilus*,

*Lactobacillus casei* a *Lactobacillus delbrueckii*. Byly sledovány změny v chemickém složení po 1 a 2 týdnech od zaočkování.

Pomocí metody RT-PCR byla prokázána přítomnost všech organismů po jednom i dvou týdnech. Tato metoda pouze potvrdila přítomnost použitých druhů, pomocí metody průtokové cytometrie pak byl stanoven počet a viabilita bakterií. Po prvním týdnu vykazovaly nejvyšší schopnost přežít bakterie *Lactobacillus delbrueckii*, jejich viabilita byla stanovena na 12,82 %. Organismy *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* vykazovaly viabilitu okolo 10,40 %. Nejhorší se po prvním týdnu jevil *Lactobacillus plantarum* s viabilitou 8,03 %. Obě směsi měly shodně viabilitu 9,21 %.

Po druhém týdnu došlo k výrazným změnám. Nejvhodnějším organismem pro obohacení se ukázal být *L. plantarum* s viabilitou 16,87 %. Naopak došlo téměř k úplnému odumření buněk *L. casei*, jehož viabilita byla stanovena na 0,58 %. Tento organismus je tedy zcela nevhodný pro obohacení zelné šťávy. Podobně byl vyhodnocen organismus *L. acidophilus*, jehož viabilita klesla po dvou týdnech na 5,46 %. *L. delbrueckii* se vyznačoval také klesající tendencí, po dvou týdnech byla jeho viabilita stanovena na 8,89 %. V případě směsi nebyl prokázán pozitivní vliv přídavku směsi mikroorganismů, procento živých zástupců odpovídalo *L. plantarum*, respektive *L. delbrueckii* u směsi 2.

Vedle sledování životaschopnosti organismů, byly sledovány také změny v chemickém složení obohacené šťávy. V případě šťávy obohacené o *L. plantarum* došlo po dvou týdnech k poklesu obsahu sacharidů, který se projevil ve zvýšení obsahu redukcujících cukrů. V případě bioaktivních látek došlo k zachování obsahu fenolických látek, výraznému poklesu flavonoidů (až o 80 %) a nárůstu antioxidantní aktivity. Značný pokles obsahu flavonoidů byl zaznamenán také u ostatních obohacených vzorků. Pomocí kapalinové chromatografie byly sledovány také změny v obsahu organických kyselin, kdy došlo k mírnému nárůstu kyseliny mléčné i octové, což potvrzuje aktivitu tohoto organismu. Obsah vitamínu C zůstal nezměněn.

Třetí částí experimentální práce byla optimalizace chuti a tudíž spotřebitelské přijatelnosti výsledného nápoje. Zelná šťáva obohacená o probiotické bakterie nabízí mnoho příznivých účinků pro spotřebitele, avšak díky nízkému pH a ne příliš atraktivnímu vzhledu by na trhu s největší pravděpodobností neobstála. Pro zvýšení atraktivity, přijatelnosti i pro děti a zachování lokálního charakteru byl jako navrhovaná kombinace zvolen jablečno-řepný džus. Díky své sladkosti a nevýrazné chuti se snadno kombinoval s výraznou chutí zelné šťávy. Pro nalezení optimálního poměru džusu a zelné šťávy byla provedena sensorická analýza. Jako finální kompozice byl navržen nápoj obsahující zelnou šťávu a džus v poměru 1:2.

V případě použití obohacené šťávy a následného uvedení ovocno-zeleninového nápoje na trh by bylo ještě vhodné provést dlouhodobé testy stability, aby mohla být stanovena doba expirace. Hlavními sledovanými body by měla být změna chemického složení a viabilita probiotik. Z důvodu mírnějšího pH a vyššímu obsahu cukrů lze předpokládat, že by v tomto nápoji viabilita probiotik mohla narůst, což by mělo za následek úbytek cukrů a syntézu organických kyselin, nemuselo by to však po určitou dobu negativně ovlivnit výslednou kvalitu nápoje.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SATORA, Paweł, Magdalena SKOTNICZNY, Szymon STRNAD a Weronika PIECHOWICZ. Chemical composition and sensory quality of sauerkraut produced from different cabbage varieties. *LWT*. 2021, **136**. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820313141>
- [2] YANG, Xiaozhe, Wenzhong HU, Zhilong XIU, et al. Comparison of northeast sauerkraut fermentation between single lactic acid bacteria strains and traditional fermentation. *Food Research International*. 2020, **137**. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996920305780>
- [3] R., Di Cagno., Filannino, P. a Gobbetti M., ed. Fermented Foods: Fermented Vegetables and Other Products. BENJAMIN, Caballero, Finglas PAUL M a Toldrá FIDEL. *Encyclopedia of Food and Health* [online]. 2nd edition. Elsevier, 2016 [cit. 2021-10-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472002841>
- [4] WOLKERS-ROOIJACKERS, J.C.M., S.M. THOMAS a M.J.R. NOUT. Effects of sodium reduction scenarios on fermentation and quality of sauerkraut. *LWT - Food Science and Technology*. 2013, **54**(2), 383-388. ISSN 00236438 Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643813002521>
- [5] Sauerkraut and Kimchi. *Food microbiology*. 4th edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry, [2016], s. 370-375. ISBN 978-1-84973-960-3.
- [6] PEÑAS, Elena, Juana FRIAS, Rosario GOMEZ a Concepción VIDAL-VALVERDE. High hydrostatic pressure can improve the microbial quality of sauerkraut during storage. *Food Control*. 2010, **21**(4), 524-528. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713509002321>
- [7] SZUTOWSKA, Julia. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: a systematic literature review. *European Food Research and Technology* [online]. 2020, **246**(3), 357-372 [cit. 2021-11-14]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-019-03425-7
- [8] DRAŠKOVIĆ BERGER, Mirna, Anita VAKULA, Aleksandra TEPIĆ HORECKI, et al. Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) fermentation: Variation of bioactive compounds, sum of ranking differences and cluster analysis. *LWT* [online]. 2020, **133** [cit. 2021-10-31]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2020.110083
- [9] CONNER, D E, R E BRACKETT a L R BEUCHAT. Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1986, **52**(1), 59-63 [cit. 2022-02-28]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.52.1.59-63.1986

- [10] PARK, Jung-Min, Jin-Ho SHIN, Da-Jeong BAK, et al. Effect of a *Leuconostoc mesenteroides* strain as a starter culture isolated from the kimchi. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2013, **22**(6), 1729-1733 [cit. 2021-11-02]. ISSN 1226-7708. Dostupné z: doi:10.1007/s10068-013-0273-8
- [11] MÜLLER, Alexandra, Niels RÖSCH, Gyu-Sung CHO, et al. Influence of iodized table salt on fermentation characteristics and bacterial diversity during sauerkraut fermentation. *Food Microbiology* [online]. 2018, **76**, 473-480 [cit. 2021-11-02]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2018.07.009
- [12] LEE, Mo-Eun, Ja-Young JANG, Jong-Hee LEE, Hae-Woong PARK, Hak-Jong CHOI a Tae-Woon KIM. Starter Cultures for Kimchi Fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, **25**(5), 559-568 [cit. 2021-11-02]. ISSN 1017-7825. Dostupné z: doi:10.4014/jmb.1501.01019
- [13] ALMUSHAYTI, Albatul Y., Kirsten BRANDT, Michael A. CARROLL a Michael J. SCOTTER. Current analytical methods for determination of glucosinolates in vegetables and human tissues. *Journal of Chromatography A* [online]. 2021, **1643** [cit. 2021-11-13]. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967321001849>
- [14] PEÑAS, E., C. MARTÍNEZ-VILLALUENGA, J.-M. PIHLAVA a J. FRIAS. Evaluation of refrigerated storage in nitrogen-enriched atmospheres on the microbial quality, content of bioactive compounds and antioxidant activity of sauerkrauts. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2015, **61**(2), 463-470 [cit. 2021-10-31]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2014.11.049
- [15] MARTINEZ-VILLALUENGA, C., E. PEÑAS, B. SIDRO, M. ULLATE, J. FRIAS a C. VIDAL-VALVERDE. White cabbage fermentation improves ascorbigen content, antioxidant and nitric oxide production inhibitory activity in LPS-induced macrophages. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2012, **46**(1), 77-83 [cit. 2021-11-13]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2011.10.023
- [16] PEÑAS, Elena, Rocío I. LIMÓN, Concepción VIDAL-VALVERDE a Juana FRIAS. Effect of storage on the content of indole-glucosinolate breakdown products and vitamin C of sauerkrauts treated by high hydrostatic pressure. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2013, **53**(1), 285-289 [cit. 2021-11-13]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2013.01.015GE,
- [17] SASAKI, Katsunori, Makiko NEYAZAKI, Kazutoshi SHINDO, Toshiya OGAWA a Masaki MOMOSE. Quantitative profiling of glucosinolates by LC-MS analysis reveals several cultivars of cabbage and kale as promising sources of sulforaphane. *Journal of*

*Chromatography B* [online]. 2012, **903**, 171-176 [cit. 2021-11-13]. ISSN 15700232.  
Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2012.07.017

[18] YOON, Kyung Young, Edward E. WOODAMS a Yong D. HANG. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*. 2006, **97**(12), 1427-1430. ISSN 09608524. Dostupné z:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852405003391>

[19] MATHUR, Harsh, Des FIELD, Mary C. REA, Paul D. COTTER, Colin HILL a R. Paul ROSS. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, **8** [cit. 2022-03-18]. ISSN 1664-302X. Dostupné z:  
doi:10.3389/fmicb.2017.01205

[20] YE, Zeming, Bitian JIANG, Dongni GAO, Wenxiang PING a Jingping GE. *Bacillus* spp. increase the Paracin 1.7 titer of *L. paracasei* HD1.7 in sauerkraut juice: Emphasis on the influence of inoculation conditions on the symbiotic relationship. *LWT* [online]. 2021, **146** [cit. 2021-11-02]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2021.111443

[21] GE, J., W. PING, G. SONG a et al. Paracin 1.7, a bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* HD1.7 isolated from Chinese cabbage sauerkraut, a traditional Chinese fermented vegetable food. *Acta microbiologica Sinica* [online]. 2009, **vol 49**(5), 609-616 [cit. 2021-11-02]. Dostupné z: <https://europemc.org/article/med/19637568>

[22] Jingping, Yanyang SUN, Xing XIN, Ying WANG a Wenxiang PING. Purification and Partial Characterization of a Novel Bacteriocin Synthesized by *Lactobacillus paracasei* HD1-7 Isolated from Chinese Sauerkraut Juice. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1), 1735-1743 [cit. 2021-11-02]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep19366

[23] PENG, Shudong, Jiajia SONG, Weiyu ZENG, Hongwei WANG, Yu ZHANG, Jinwei XIN a Huayi SUO. A broad-spectrum novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SHY 21-2 from yak yogurt: Purification, antimicrobial characteristics and antibacterial mechanism. *LWT* [online]. 2021, **142** [cit. 2022-03-18]. ISSN 00236438. Dostupné z:  
doi:10.1016/j.lwt.2021.110955

[24] SANTOS, Johnson C.P., Rita C.S. SOUSA, Caio G. OTONI, et al. *Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging* [online]. 2018, **48**, 179-194 [cit. 2022-03-18]. ISSN 14668564. Dostupné z:  
doi:10.1016/j.ifset.2018.06.008

[25] Hill, C., Guarner, F., Reid, G. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *National Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014, **11**, 506-517. ISSN 1759-5053. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

- [26] DE BELLIS, Palmira, Angelo SISTO a Paola LAVERMICOCCA. Probiotic bacteria and plant-based matrices: An association with improved health-promoting features. *Journal of Functional Foods* [online]. 2021, **87** [cit. 2021-11-13]. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2021.104821
- [27] SANDERS, M. E., D. MERENSTEIN, C. A. MERRIFIELD a R. HUTKINS. Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin* [online]. 2018, **43**(3), 212-225 [cit. 2021-11-13]. ISSN 14719827. Dostupné z: doi:10.1111/nbu.12334
- [28] LEBEER, Sarah, Jos VANDERLEYDEN a Sigrid C. J. DE KEERSMAECKER. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2008, **72**(4), 728-764 [cit. 2021-11-13]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00017-08
- [29] JANDHYALA, Sai Manasa. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2015, **21**(29) [cit. 2021-11-14]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787
- [30] PARKER, Aimée, Sonia FONSECA a Simon R. CARDING. Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and brain health. *Gut Microbes* [online]. 2020, **11**(2), 135-157 [cit. 2021-11-13]. ISSN 1949-0976. Dostupné z: doi:10.1080/19490976.2019.1638722
- [31] CANTU-JUNGLES, T. M., B. R. HAMAKER a María Mercedes ZAMBRANO. New View on Dietary Fiber Selection for Predictable Shifts in Gut Microbiota. *MBio* [online]. 2020, **11**(1) [cit. 2021-11-14]. ISSN 2161-2129. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.02179-19
- [32] TSAI, Yu-Ling, Tzu-Lung LIN, Chih-Jung CHANG, Tsung-Ru WU, Wei-Fan LAI, Chia-Chen LU a Hsin-Chih LAI. Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases. *Journal of Biomedical Science* [online]. 2019, **26**(1) [cit. 2021-11-14]. ISSN 1423-0127. Dostupné z: doi:10.1186/s12929-018-0493-6
- [33] GUPTA, Ramesh, ed. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity* [online]. Academic Press, 2016 [cit. 2022-02-12]. ISBN 9780128021651. Dostupné z: 10.1016/B978-0-12-802147-7.00055-3
- [34] FEINER, Gerhard. *Meat Products Handbook: Practical Science and Technology* [online]. Cambridge: Elsevier Science, 2006 [cit. 2022-02-13]. ISBN 9781845691721. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMHPST0H/meat-products-handbook/meat-products-handbook>
- [35] TIN SIN, Lee a Bee SOO TUEEN. *Poly(lactic Acid): A Practical Guide for the Processing, Manufacturing, and Applications of PLA* [online]. 2nd edition. Cambridge:



Elsevier Science, 2019 [cit. 2022-02-13]. ISBN 9780128144725. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpPAAPGPMU/polylactic-acid-practical/polylactic-acid-practical>

[36] REDDY, Gopal, Md. ALTAF, B.J. NAVEENA, M. VENKATESHWAR a E. Vijay KUMAR. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review. *Biotechnology Advances*. 2008, **26**(1), 22-34. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2007.07.004

[37] *Innovative Food Processing Technologies: A Comprehensive Review, Volume 1-3* [online]. Cambridge: Elsevier Science, 2021 [cit. 2022-02-13]. ISBN 978-0-12-815782-4. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt012RYEK4/innovative-food-processing/title-page>

[38] *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology* [online]. 3rd edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2012 [cit. 2022-02-13]. ISBN 978-1-84755-916-6. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpHCMFWME3/handbook-culture-media/handbook-culture-media>

[39] *Dairy Processing and Quality Assurance* [online]. 2nd edition. John Wiley, 2016 [cit. 2022-02-13]. ISBN 9781118810279. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpDPQAE003/dairy-processing-quality/dairy-processing-quality>

[40] VIZOSO PINTO, Maria G., Charles M.A.P. FRANZ, Ulrich SCHILLINGER a Wilhelm H. HOLZAPFEL. Lactobacillus spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2006, **109**(3), 205-214 [cit. 2022-03-19]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.029

[41] LILLO-PÉREZ, Siegfried, María GUERRA-VALLE, Patricio ORELLANA-PALMA a Guillermo PETZOLD. Probiotics in fruit and vegetable matrices: Opportunities for nondairy consumers. *LWT* [online]. 2021, **151** [cit. 2021-11-14]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2021.112106

[42] KANDYLIS, Panagiotis, Katerina PISSARIDI, Argyro BEKATOROU, Maria KANELLAKI a Athanasios A KOUTINAS. Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science* [online]. 2016, **7**, 58-63 [cit. 2021-11-14]. ISSN 22147993. Dostupné z: doi:10.1016/j.cofs.2015.11.012

[43] CORONA, Onofrio, Walter RANDAZZO, Alessandro MICELI, Rosa GUARCELLO, Nicola FRANCESCA, Hüseyin ERTEN, Giancarlo MOSCHETTI a Luca SETTANNI. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *LWT - Food Science*

*and Technology* [online]. 2016, **66**, 572-581 [cit. 2022-03-19]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2015.11.014

[44] GIBSON, Glenn R. a Marcel B. ROBERFROID. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 1995, **125**(6), 1401-1412. ISSN 0022-3166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/125.6.1401

[45] GIBSON, Glenn R., Hollie M. PROBERT, Jan Van LOO, Robert A. RASTALL a Marcel B. ROBERFROID. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 2004, **17**(2), 259-275. ISSN 0954-4224. Dostupné z: doi:10.1079/NRR200479

[46] ROBERFROID, Marcel a Joanne SLAVIN. Nondigestible Oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2000, **40**(6), 461-480. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408690091189239

[47] DELZENNE, N. M. Oligosaccharides: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2003, **62**(1), 177-182. ISSN 0029-6651. Dostupné z: doi:10.1079/PNS2002225

[48] FELLOWS, P.J. Pasteurisation. *Food Processing Technology* [online]. Elsevier, 2009, 2009, 381-395 [cit. 2022-03-19]. ISBN 9781845692162. Dostupné z: doi:10.1533/9781845696344.3.381

[49] SUN, Da-Wen, ed. *Thermal Processing of Fruits and Fruit Juices* [online]. Second edition. Boca Roca: Taylor & Francis, 2012 [cit. 2022-03-19]. ISBN 9781439876787. Dostupné z: <https://hal.inrae.fr/hal-02803675/document>

[50] DEÁK, T. Pasteurization: Food Technologies: Sterilization. MATARJEMI, Yasmine. *Encyclopedia of Food and Health* [online]. Academic Press, 2014, s. 245-252 [cit. 2022-03-24]. ISBN 978-0-12-378613-5. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786128002584>

[51] MOTA, M.J., I. DELGADILLO a J.A. SARAIVA, LOPES, R.P., Pasteurization: Effect on Sensory Quality and Nutrient Composition. CABALLERO, Benjamin, Paul M. FINGLAS a Fidel TOLDRÁ. *Encyclopedia of Food and Health* [online]. Academic Press, 2016, s. 246-263 [cit. 2022-03-24]. ISBN 978-0-12-384953-3. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472005249>

[52] ZU, Danshi, Yueyi ZHANG, Chengcheng KOU, Pushun XI a He LIU. Ultrasonic and other sterilization methods on nutrition and flavor of cloudy apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2022, 2022, **84** [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: doi:10.1016/2022.105975

- [53] TIWARI, B.K., C.P. O'DONNELL a P.J. CULLEN. Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *Journal of Food Engineering* [online]. 2009, **93**(2), 166-171 [cit. 2022-03-31]. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.01.027
- [54] ZHU, Danshi, Yueyi ZHANG, Chengcheng KOU, Pushun XI a He LIU. Ultrasonic and other sterilization methods on nutrition and flavor of cloudy apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2022, **84** [cit. 2022-03-31]. ISSN 13504177. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultsonch.2022.105975
- [55] CAÑUMIR, Juan A., José E. CELIS, Johannes DE BRUIJN a Leslie V. VIDAL. Pasteurisation of Apple Juice by Using Microwaves. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2002, **35**(5), 389-392 [cit. 2022-03-31]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1006/fstl.2001.0865
- [56] TALCOTT, Stephen T., Carmen H. BRENES, Danielle M. PIRES a David DEL POZO-INSFRAN. Phytochemical Stability and Color Retention of Copigmented and Processed Muscadine Grape Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, **51**(4), 957-963 [cit. 2022-05-08]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf0209746
- [57] POLYDERA, A.C, N.G STOFOROS a P.S TAOUKIS. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering* [online]. 2003, **60**(1), 21-29 [cit. 2022-05-08]. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/S0260-8774(03)00006-2
- [58] MERTZ, C., P. BRAT, C. CARIS-VEYRAT a Z. GUNATA. Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry* [online]. 2010, **119**(2), 653-659 [cit. 2022-05-08]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2009.07.009
- [59] M. YAHIA, Elhadi, ed. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*. 2nd edition. Wiley-Blackwell, 2017. ISBN 978-1-119-15794-6.
- [60] KADRI, Karim. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science* [online]. IntechOpen, 2020, 2020-2-12 [cit. 2022-04-30]. ISBN 978-1-78984-089-6. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.86491
- [61] WAGES, J.M. POLYMERASE CHAIN REACTION. *Encyclopedia of Analytical Science* [online]. Elsevier, 2005, 2005, 243-250 [cit. 2022-04-30]. ISBN 9780123693976. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-369397-7/00475-1
- [62] KARUNANATHIE, Harsheni, Ping Siu KEE, Shioh Fern NG, Martin A. KENNEDY a Eng Wee CHUA. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range

PCR. *Biochimie* [online]. 2022, **197**, 130-143 [cit. 2022-04-30]. ISSN 03009084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2022.02.00

[63] KAO, Yi-Ting, Yu-Shan LIU a Yuan-Tay SHYU. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Research International* [online]. 2007, **40**(1), 71-79 [cit. 2022-04-30]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2006.07.018

[64] KIM, Eiseul, Seung-Min YANG, Eun-Ji CHO a Hae-Yeong KIM. Novel real-time PCR assay for *Lactobacillus casei* group species using comparative genomics. *Food Microbiology* [online]. 2020, **90** [cit. 2022-04-30]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2020.103485

[65] SORIA, A.C., M. BROKŁ, M.L. SANZ a I. MARTÍNEZ-CASTRO. Sample Preparation for the Determination of Carbohydrates in Food and Beverages. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* [online]. Elsevier, 2012, 2012, 213-243 [cit. 2022-04-21]. ISBN 9780123813749. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-381373-2.00135-6

[66] PALANI, Kalpana, Britta HARBAUM-PIAYDA, Diana MESKE, Julia Katharina KEPPLER, Wilhelm BOCKELMANN, Knut J. HELLER a Karin SCHWARZ. Influence of fermentation on glucosinolates and glucobrassicin degradation products in sauerkraut. *Food Chemistry* [online]. 2016, **190**, 755-762 [cit. 2022-04-21]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2015.06.012

[67] SATORA, Paweł, Magdalena SKOTNICZNY, Szymon STRNAD a Katarína ŽENIŠOVÁ. Yeast Microbiota during Sauerkraut Fermentation and Its Characteristics. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(24) [cit. 2022-04-21]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21249699

[68] SILVA, Franklin Júnior Moreira Da, Cíntia Marotta FERNANDES, Diana Clara Nunes De LIMA, Rodrigo Oliveira MADEIRA, Eliane M. Furtado MARTINS, Maurilio Lopes MARTINS, Joaquim Mário Neiva LAMAS a Afonso Mota RAMOS. Stability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* in minimally processed cabbage. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation* [online]. 2013, **3**(2) [cit. 2022-04-23]. ISSN 1744-7550. Dostupné z: doi:10.1504/IJPTI.2013.055842

[69] Vyhláška o požadavcích na konzervované ovoce a konzervovanou zeleninu, skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich a banány č. 397/2021 Sb. ze dne 29.10. 2021.

[70] HOSAKA, Hiroki, Mai KAWAMURA, Takako HIRANO, Wataru HAKAMATA a Toshiyuki NISHIO. Utilization of sucrose and analog disaccharides by human intestinal bifidobacteria and lactobacilli: Search of the bifidobacteria enzymes involved in the

degradation of these disaccharides. *Microbiological Research* [online]. 2020, **240** [cit. 2022-04-12]. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2020.126558

[71] GÄNZLE, Michael G. a Rainer FOLLADOR. Metabolism of Oligosaccharides and Starch in Lactobacilli: A Review. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2012, 3 [cit. 2022-04-12]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2012.00340

[72] SILVA, Liliane Andrade, Jose Honorio Pereira LOPES NETO a Haïssa Roberta CARDARELLI. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: technological properties, biological activity, and potential application in the food industry. *Annals of Microbiology* [online]. 2019, **69**(4), 321-328 [cit. 2022-04-12]. ISSN 1590-4261. Dostupné z: doi:10.1007/s13213-019-01456-9

## **8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

BMK – bakterie mléčného kvašení

CFU – jednotka tvořící kolonie z anglického „colonies forming units“

DMSO – dimethylsulfoxid

FDA – Food and Drug Administration

GLS – glukosinoláty

GRAS – všeobecně považovaný za bezpečný z anglického Generally Recognized as Safe

PCR – polymerázová řetězová reakce z anglického „polymerase chain reaction“

WHO – Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

## 9 PŘÍLOHY

### Příloha 1 - Dotazník k senzorické analýze kombinovaných ovocno-zeleninových nápojů.

Osobní charakteristiky:

**Pohlaví:**

- Žena
- Muž
- Nechci uvést

**Věk:**

- méně než 20 let
- 20-29 let
- 30-39 let
- 40-49 let
- 50-59 let
- 60-69 let
- Více než 70 let

#### Jaké je Vaše stanovisko ke konzumaci kysaného zelí?

- Kysané zelí mám rád/a, konzumuji často
- Kysané zelí mi nevadí, konzumuji občas
- Kysané zelí nevyhledávám, konzumuji zřídka
- Kysané zelí nemám rád/a, nekonzumuji vůbec

Senzorické hodnocení:

Vyzkoušejte prosím předložené vzorky nápojů. Sledujte vybrané vlastnosti. Vzorky ohodnoťte jako ve škole (1 – nejlepší, 5 – nejhorší).

Vzorek	Vlastnost	
	Vzhled a barva	Konzistence
C9U		
P6K		
L4B		
A1V		
O3T		
Y8J		

Vyzkoušejte prosím vůni předložené vzorky nápojů. Sledujte vybrané vlastnosti. Vzorky ohodnoťte jako ve škole (1 – nejlepší, 5 – nejhorší). V případě potřeby napište slovní hodnocení do kolony „jiné“.

Vzorek	Vůně					
	Příjemnost	Intenzita vůně	Octová	Ovocná	Cizí přípach	Jiné
C9U						
P6K						
L4B						
A1V						
O3T						
Y8J						

Následně vzorky ochutnejte a ohodnoťte jednotlivé chutě. Vzorky ohodnoťte jako ve škole (1 – nejlepší, 5 – nejhorší). V případě potřeby napište slovní hodnocení do kolony „jiné“.

Vzorek	Chuť					
	Sladká	Kyselá	Hořká	Ovocná	Trpká	Jiné
C9U						
P6K						
L4B						
A1V						
O3T						
Y8J						

Hodnocené vzorky prosím ohodnoťte podle Vašich preferencí. 1 – nejlepší vzorek, 6- nejhorší vzorek. Dva a více vzorků nesmí mít stejné pořadí.

Vzorek	C9U	P6K	L4B	A1V	O3T	Y8J
Pořadí						

Mezi sousedními vzorky jsou rozdíly:

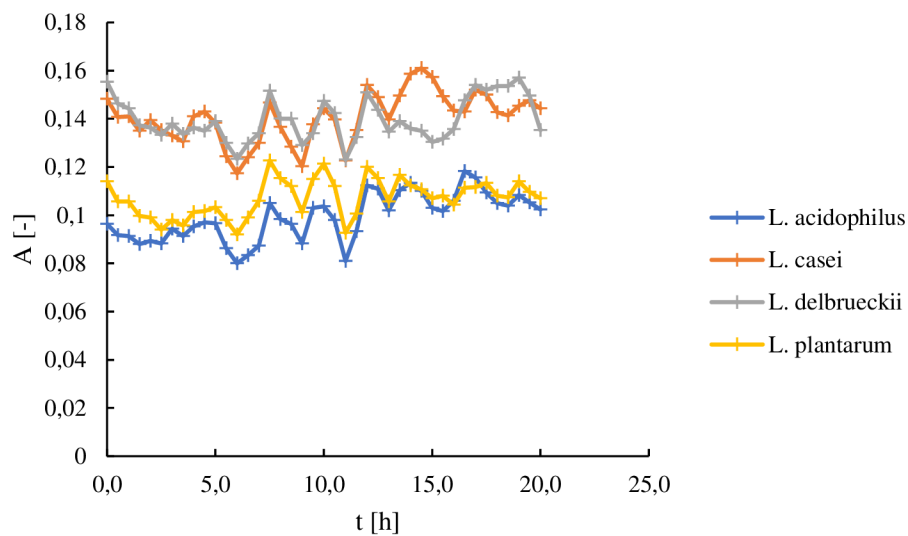
- Žádné
- Nepatrné
- Malé
- Střední
- Zřetelné
- Velké

Mezi prvním a posledním vzorkem je rozdíl:

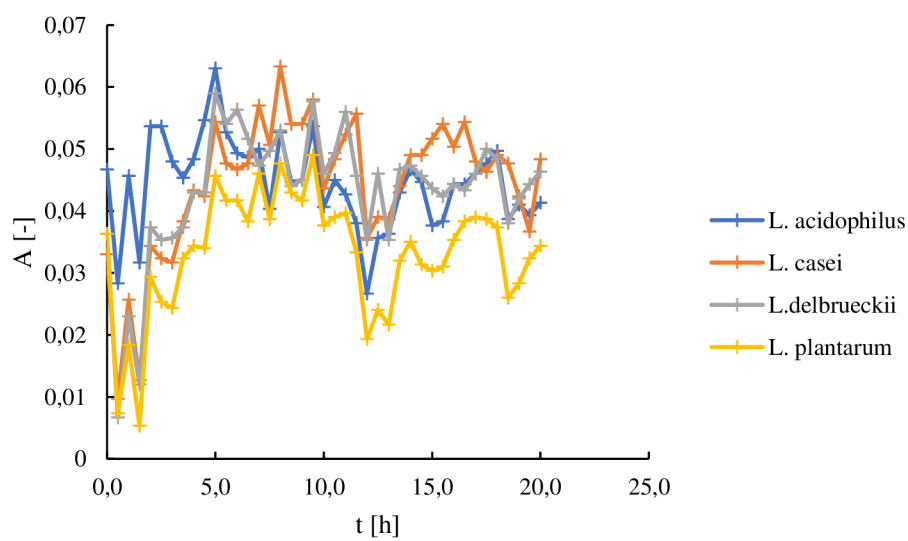
- Žádný
- Nepatrný
- Malý
- Střední
- Zřetelný
- Velký



## Příloha 2 – Růstové křivky probiotických bakterií

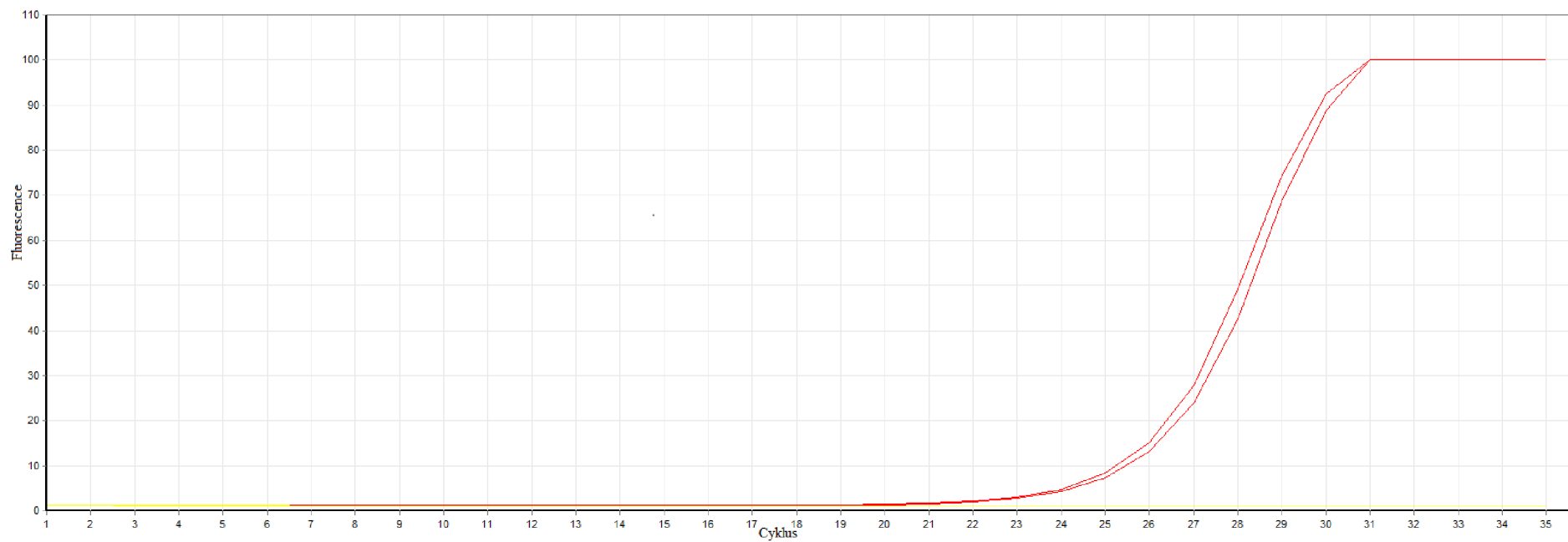


Obrázek 40 – Růstová křivka vybraných zástupců rodu *Lactobacillus* v zelné šťávě

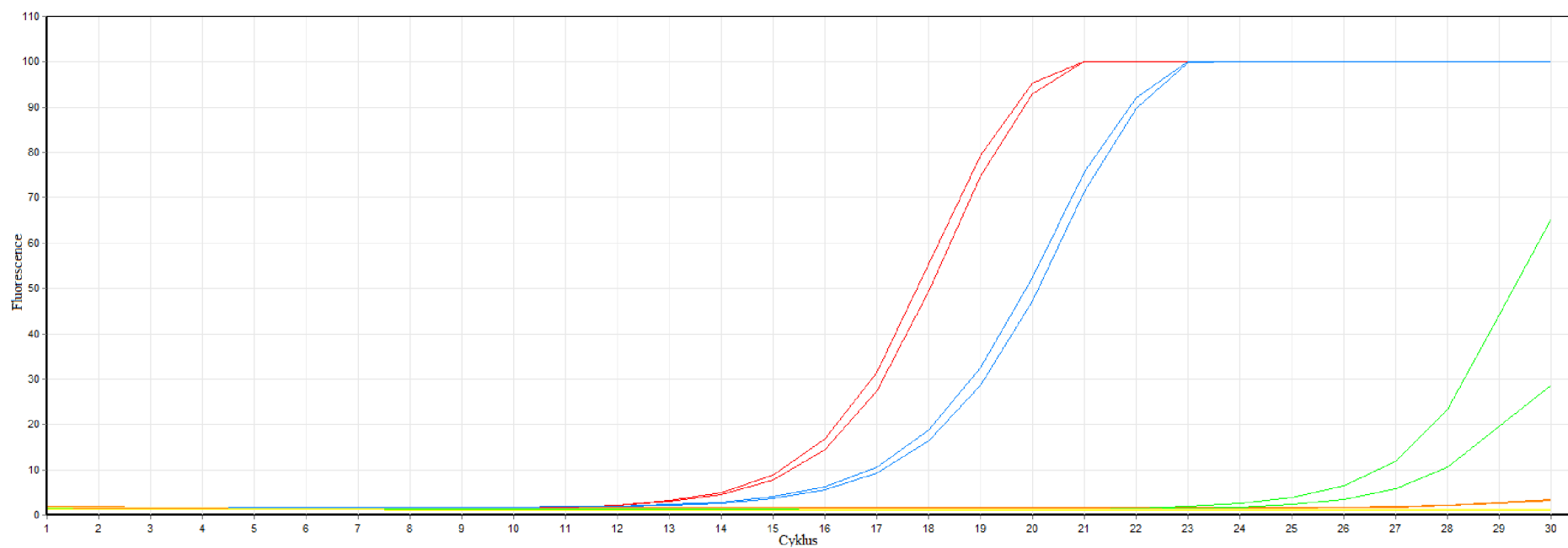


Obrázek 41 – Růstová křivka vybraných zástupců rodu *Lactobacillus* ve směsné šťávě

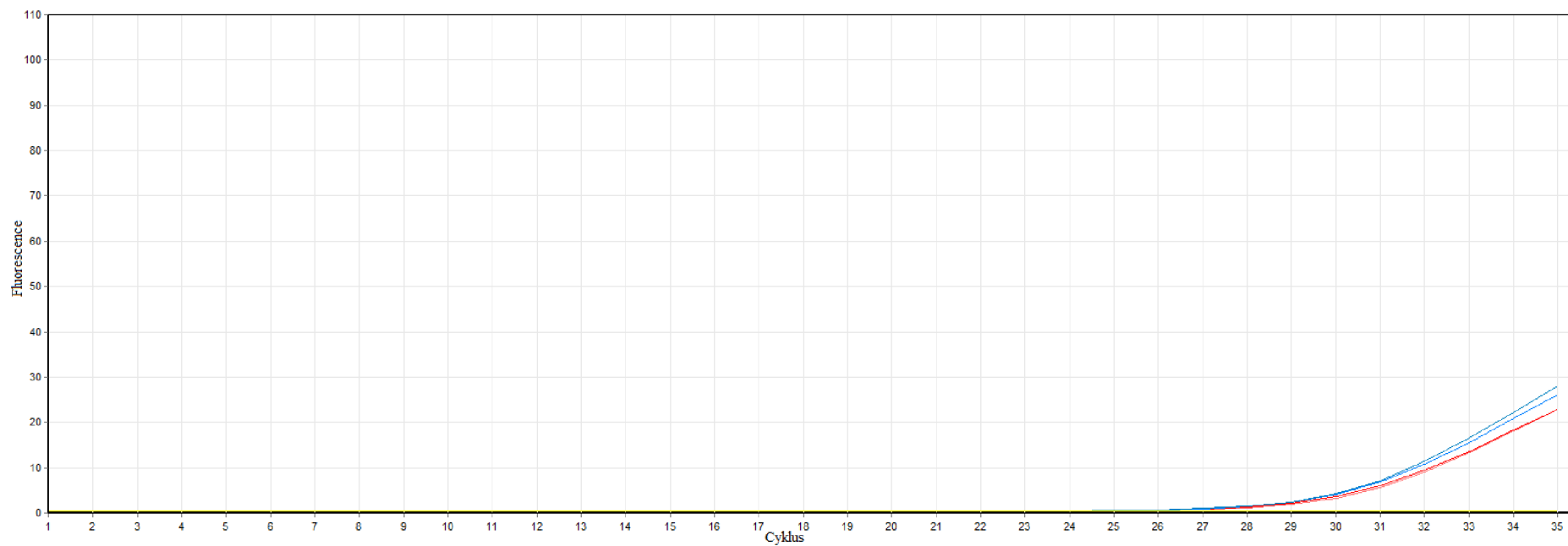
### Příloha 3 – Vybrané amplifikační křivky – potvrzení přítomnosti probiotických bakterií



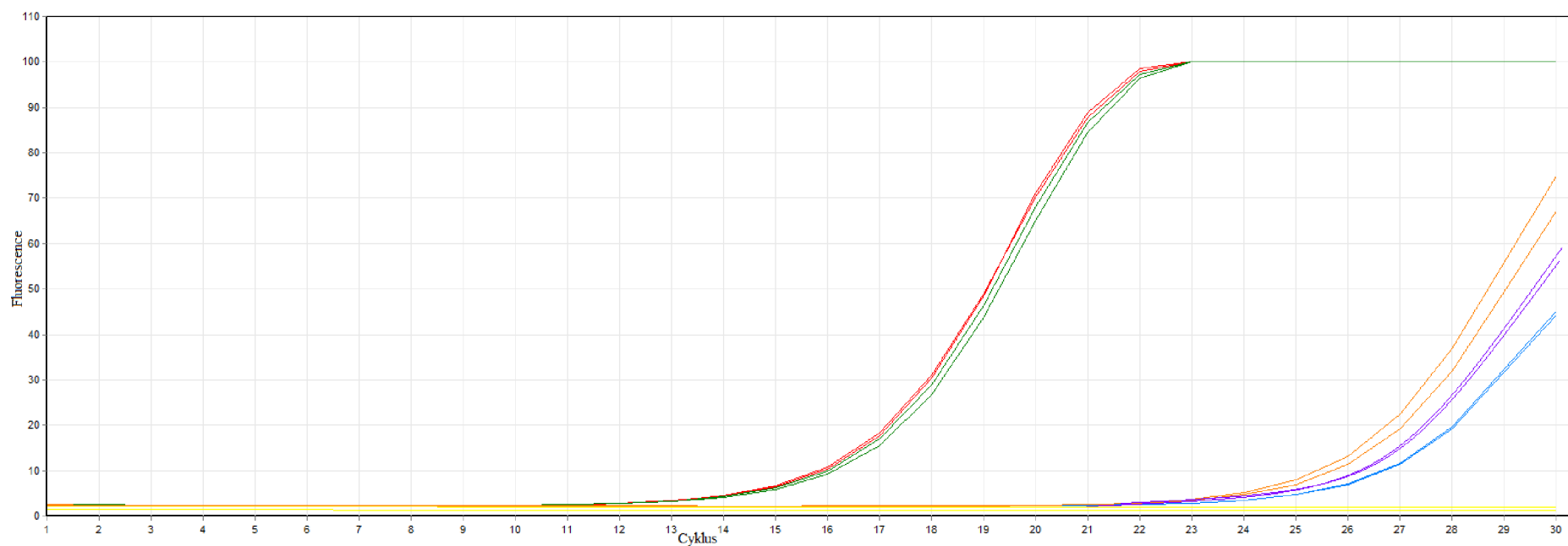
Obrázek 42 - amplifikační křivky pro organismus *Lactobacillus acidophilus* (červeně), negativní kontrola znázorněna žlutě



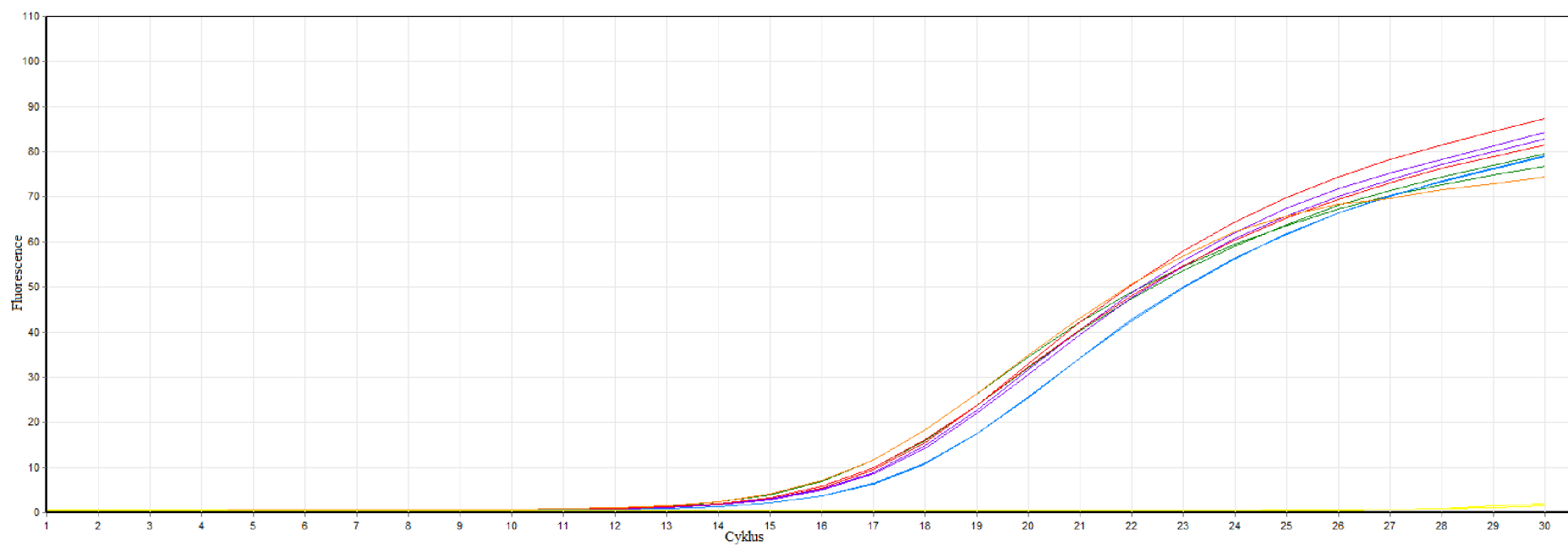
Obrázek 43 - amplifikační křivky pro organismus *Lactobacillus casei* (červeně), *Lactobacillus plantarum* (modře), *Lactobacillus casei* s nespecifickými primery (oranžově) a *Lactobacillus plantarum* s nespecifickými primery, negativní kontrola znázorněna žlutě.



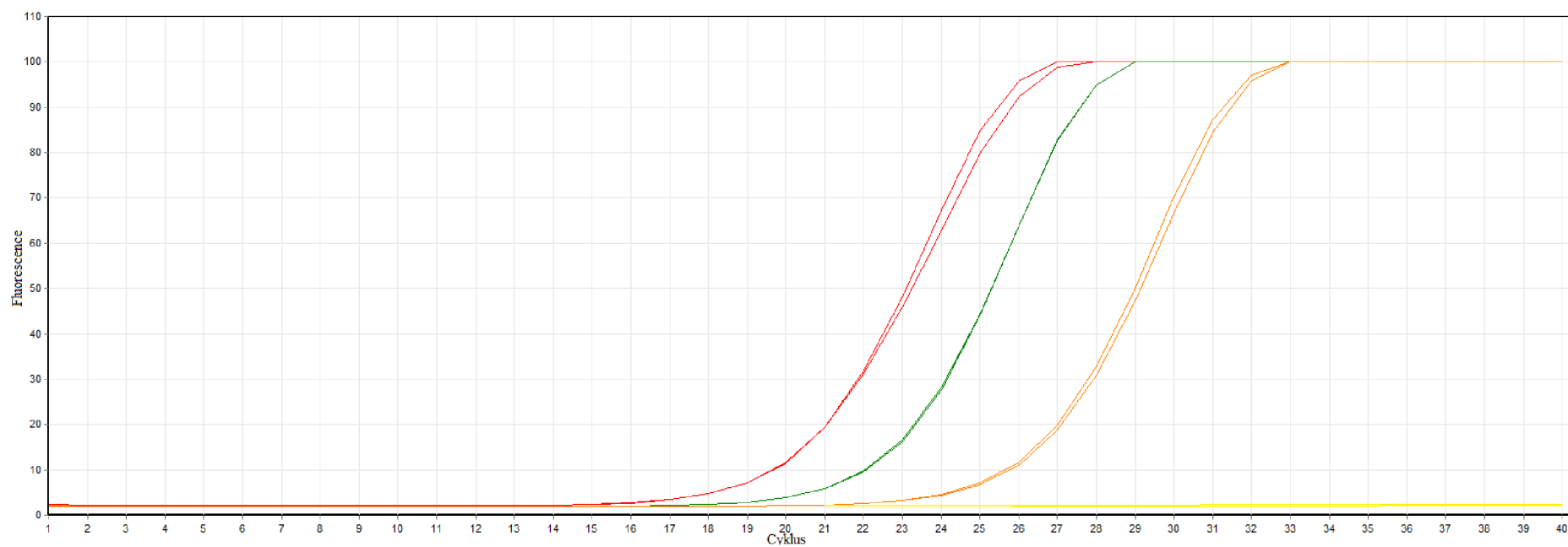
Obrázek 44 - amplifikační křivky pro organismus *Lactobacillus delbrueckii* (červeně a modře), negativní kontrola znázorněna žlutě.



Obrázek 45 - amplifikační křivky pro potvrzení domény *Bacteria* pro organismus *Lactobacillus acidophilus* (zeleně), *Lactobacillus casei* (červeně), *Lactobacillus delbrueckii* (fialově), *Lactobacillus plantarum* (modře). Pozitivní kontrola znázorněna oranžově, negativní kontrola žlutě.



Obrázek 46 - amplifikační křivky pro potvrzení rodu *Lactobacillus* pro organismus *Lactobacillus acidophilus* (červeně), *Lactobacillus casei* (zeleně), *Lactobacillus delbrueckii* (fialově), *Lactobacillus plantarum* (modře). Pozitivní kontrola znázorněna oranžově, negativní kontrola žlutě.



Obrázek 47 - amplifikační křivky pro potvrzení rodu *Lactobacillus* pro izolace z čerstvé a pasterované zelné šťávy. Čerstvá zelná šťáva (zeleně), pasterovaná zelná šťáva při 90 °C/0,5 min (červeně). Pozitivní kontrola znázorněna oranžově, negativní kontrola žlutě.