

Uplatněná certifikovaná metodika

ISBN 978-80-904348-9-9

Výběr mikroskopických řas pro aplikaci do fermentovaných výrobků

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Česká zemědělská univerzita v Praze

EcoFuel Laboratories s.r.o.

MVDr. Gabriela Krausová, Ph.D.

Ing. Ivana Hyršlová

Ing. Jana Smolová

Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

Ing. Olga Kronusová

Ing. Petr Kaštánek, Ph.D.

Obsah

1	Úvod.....	3
2	Cíl metodiky.....	4
3	Vlastní popis metodiky.....	5
3.1	Vliv mikrořas na růst bakterií mléčného kysání a bifidobakterií.....	5
3.2	Aplikační formy mikrořas.....	5
3.3	Senzorické hodnocení.....	6
3.4	Fermentované výrobky a skladování.....	6
3.5	Testování cytotoxicity (MTT) a adherence mikrořas na tkáňových kulturách.....	6
3.5.1	Kultivace tkáně.....	6
3.5.2	Založení 24-jamkové destičky.....	7
3.5.3	Cytotoxicita (MTT).....	7
3.5.4	Test adherence.....	7
4	Srovnání „novosti postupů“.....	8
5	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	9
6	Ekonomické aspekty.....	9
7	Seznam související použité literatury.....	10
8	Publikace předcházející metodice.....	12
9	Jména oponentů a názvy jejich organizací.....	13
10	Dedikace.....	13

1 Úvod

V současnosti je velký důraz kladen na vývoj nových funkčních potravin, které mají přidanou hodnotu v podobě obsahu zdraví prospěšných látek a které mohou také pomoci v prevenci a léčbě civilizačních chorob, jako např. například obezita, cukrovka či choroby cévního a oběhového systému. Jedním z nejznámějších zástupců tzv. superpotravin jsou mikroskopické řasy. Řasy a sinice mají v současné době velký potenciál, a to zejména v potravinářství, kde jsou používány jako aditiva. Díky svým nutričním hodnotám a zdraví prospěšným účinkům se využívají k výrobě doplňků stravy z mikrořas zejména rod *Chlorella* (nejvíce používaná *C. vulgaris*) a z sinic rod *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). Mikrořasy představují bohatý zdroj nutričně cenných látek, mezi které patří proteiny, vitaminy, pigmenty, antioxidanty, nenasycené mastné kyseliny a v neposlední řadě oligo- a poly-sacharidy, které mohou sloužit jako energetický zdroj pro střevní bakterie a tím působit prebioticky. Prebiotika jsou definována jako látky, které jsou selektivně využívány mikrobiotou hostitelského organismu a podílejí se tím na zlepšení jeho zdraví. Navíc, musí být odolná proti enzymatickému trávení gastrointestinálním traktem a musí se dostat nenatrávené až na místo jejich působení, tj. do tlustého střeva. Kromě látek sacharidické povahy se může jednat také např. o polyfenoly a polynenasycené mastné kyseliny převedené na příslušné konjugované mastné kyseliny, za předpokladu, že se prokáže jejich prospěšný účinek na hostitele (Gibson a kol., 2017). *Chlorella* i *Spirulina* akumulují vysoce kvalitní proteiny s vyváženým aminokyselinovým profilem dle WHO doporučení týkajících se lidských esenciálních aminokyselin (Caporgno a kol., 2018). Nelze opomenout pigmenty, např. chlorofyl a, xantofyl, β -karoten, echinenon, C-fykocyanin, zeaxantin, allofykocyanin a další. Tato barviva přinášejí významné zdravotní benefity, např. fykocyanin vykazuje antioxidační, protizánětlivé či neuroprotektivní účinky (Romay a kol., 2003). Nejdůležitější sacharidovou sloučeninou v buňkách *Chlorelly* z hlediska prospěšnosti pro lidský organismus je β -1, 3-glukan (nevětvený polysacharid tvořený jednotkami β -D-glukosy, velmi dobře fermentovatelný v tlustém střevě), který patří mezi polysacharidy označující se jako „ve vodě rozpustná vláknina“, díky čemuž funguje jako aktivní imunostimulátor, vylučuje volné radikály a redukuje hladinu krevních lipidů, zejména pak hladinu cholesterolu (Mišurcová et al. 2012). *Spirulina* obsahuje přibližně 13,5 % sacharidů, které jsou složeny převážně z glukosy společně s rhamnosou, mannosou, xylosou, galaktosou a dvěma cukry, 2-O-methyl-L-rhamnosou a 3-O-methyl-L-rhamnosou. Přítomné jsou také sulfátované polysacharidy, mající důležité bioaktivní vlastnosti, např. antioxidační, antikoagulační, antivirové a antitumorové (Behasthipour a kol., 2013; El-Baky a

kol., 2014; Vo a kol., 2015). Mikroskopické řasy vykazují také díky vysokému obsahu karotenoidů (u *C. vulgaris* je to výhradně lutein, např. u *C. ellipsoidea* je to pak antheraxantin a zeaxantin) například antiproliferační efekt proti nádorovým buňkám (Cha et al. 2008). Příjem *C. vulgaris* ve stravě snižuje celkovou jaterní i sérovou koncentraci lipidů, triacylglycerolů i celkového cholesterolu a zvyšuje vylučování lipidů do exkrementů. Noguchi et al. (2013) prokázali, že příjem *Chlorelly* ve stravě snižuje velikost tukových buněk a zlepšuje inzulínovou citlivost a snižuje glukosovou intoleranci. Podávání *C. vulgaris* u myši také zabraňuje dyslipidémii indukované vysokým obsahem tuků snížením hladiny triglyceridů, cholesterolu a volných mastných kyselin (Vecina et al. 2014). Díky obsahu poly- a oligo-sacharidů, mohou mít potraviny doplněné o řasovou biomasu i další pozitivní vlivy, mezi které patří také prebiotický účinek. Výsledky výzkumu naznačují jejich pozitivní vliv na růst prospěšných střevních bakterií rodů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *E.coli* (Pulz a kol., 2004). Přídavek řas *C. vulgaris* nebo *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) stimuluje růst a udržuje životaschopnost bakterií *L. acidophilus* a *Bifidobacterium lactis* v jogurtu (Beheshtipour et al. 2012).

Na základě dostupné literatury, i námi provedeného testování, je možné se domnívat, že mikrořasy mohou podpořit růst prospěšných mikroorganismů a plnit tak prebiotickou funkci, přičemž tato schopnost je kmenově – a zřejmě i druhově specifická. Důležitou roli zde hrají také kultivační podmínky, složení jednotlivých biomas nebo také způsob zpracování biomasy, zejména stupeň dezintegrace. Prebiotický účinek mohou plnit již zmiňované oligo- a polysacharidy, ale také další látky obsažené v mikrořasách, jako např. polyfenoly, polynenasycené mastné kyseliny, příp. další bioaktivní látky zde přítomné. Vzhledem k možnému synbiotickému účinku mikrořas a probiotik, je vhodné tyto řasy aplikovat společně s probiotickými bakteriemi nebo bakteriemi mléčného kvašení (startérovými kulturami) do výrobků, zejména fermentovaných, jako např. jogurty, nápoje (na mléčné i nemléčné bázi).

2 Cíl metodiky

Cílem předkládané metodiky je podat ucelené shrnutí metod a postupů pro testování mikrořas a výběr jejich nejvhodnější koncentrace a aplikačních forem pro použití do mléčných i nemléčných fermentovaných výrobků se zdravotním benefitem pro konzumenta.

3 Vlastní popis metodiky

3.1 Vliv mikrořas na růst bakterií mléčného kysání a bifidobakterií

Prebiotický efekt jednobuněčných řas je posuzován na základě růstu vybraného souboru bakterií mléčného kvašení (BMK) a bifidobakterií používaných při výrobě mléčných fermentovaných výrobků, především z rodů *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Bifidobacterium*. Po 18-hodinové kultivaci jsou vybrané kmeny odstředěny (5 min, 6500 rpm), odstředěné buňky jsou promyty a resuspendovány ve fyziologickém roztoku na koncentraci $10^4 \sim 10^5$ KTJ/ml. Testované médium s mikrořasami je složeno ze základního média (10 g tryptonu, 10 g peptonu, 5 g kvasničného extraktu, 1 ml Tween 80, 0,5 g L-cysteinu, 1 l vody) a 0,1 %, 0,5 %, 1,0 % a 3,0 % mikroskopické řasy nebo jejich částí. Hodnota pH média je upravena na 7. Médium je následně sterilováno při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Jako pozitivní kontrola se používá Wilkins Chalgren (WCH) bujon, jako negativní kontrola čisté bazální medium (bez přídavku cukru). Po 24 hodinách kultivace je změřeno pH a stanoveny počty mikroorganismů pomocí plotnové metody dle kultivačních podmínek vybraných kmenů (Tab. 1). Dále je u vzorků stanoven obsah kyseliny mléčné a octové pomocí kapilární elektroforézy s vodivostní detekcí (ITP). Všechny vzorky jsou měřeny v triplicátech.

Tab. 1 – Přehled médií a kultivačních podmínek

Rod	Médium	Kultivační podmínky
<i>Lactobacillus</i>	MRS agar pH 5,7	37 °C / 3 dny anaerobně
<i>Bifidobacterium</i>	MRS agar pH 6,2 L-cystein	37 °C / 3 dny anaerobně
<i>Lactococcus</i>	M17 agar	30 °C / 2 dny aerobně
<i>Streptococcus</i>	M17 agar	30 °C / 2 dny aerobně

3.2 Aplikační formy mikrořas

a) prášková forma – získá se kultivací mikrořas na příslušných médiích se kultivují v nerezových fermentorech nebo fotobiorekatorech a poté se sklízí centrifugací a sprejově suší ve sprejové sušárně.

b) horkovodné extrakty mikrořas – získají se vodnou extrakcí práškové biomasy mikrořas, kde je vhodně nastaven extrakční poměr, teplota a doba extrakce tak, aby si vodný extrakt udržel maximum aktivních látek. Vodný extrakt se následně odděluje od biomasy centrifugací

a vodný extrakt je sušen ve formičce při teplotě 35-39 °C za vniku suchého vodného extraktu řasy.

c) kostičky mikrořas s kakaovým máslem jako nosičem – získají se smícháním práškové suché biomasy řasy s kakaovým máslem a za rozpuštění másla při teplotě 34 °C se obě suroviny promíchají do homogenního stavu; procentuální zastoupení řasy ve směsi tvoří 10-40 % a kakaového másla 60-90 % (dle typu); následně se směs aplikuje do formy a nechá se vychladit. Na doladění chuti je možný také přídavek jablečného prášku nebo zeleninového prášku, příp. medu a dalších látek.

3.3 Senzorické hodnocení

Pro výběr nejvhodnější koncentrace použité mikrořasy je dalším důležitým kritériem vliv na sensoriku plánovaného fermentovaného výrobku. Vybraný druh mléka (kravské, kozí, ovčí), syrovátka nebo nemléčná matrice je smíchána s testovanými koncentracemi (0,1 % - 3, 0 %) řasy a následně sensoricky hodnocena pořadovou zkouškou dle normy ČSN ISO 8587, kdy jsou hodnoceny parametry ovlivněné přídavkem mikrořasy, tedy barva, chuť, vůně a celkový dojem výrobku. Vzorčky jsou řazeny od nejlepšího po nejhorší.

3.4 Fermentované výrobky a skladování

V následující fázi je nejlépe hodnocená koncentrace mikrořasy nebo její část na základě prebiotického efektu na vybraný soubor mikroorganismů, zdravotního benefitu pro konzumenta a sensoriky aplikována do fermentovaného výrobku. Přídavek řasy do mléka nebo nemléčné matrice je vždy před sterilací, která probíhá při teplotě 115 °C po dobu 30 minut. Po sterilaci je medium inokulováno příslušnými mlékařskými kulturami (jogurtovou, smetanovou, probiotickou apod.). Fermentace probíhá dle technologických podmínek pro vyvíjený fermentovaný výrobek. Poté jsou u výrobků stanoveny počty příslušných mikroorganismů plotnovou metodou, hodnota pH a také proběhne sensorické hodnocení. Skladování probíhá po dobu 28 dnů při teplotě 6-8 °C, kdy jsou po 14 a 28 dnech opět stanoveny počty mikroorganismů, pH a sensorické změny.

3.5 Testování cytotoxicity (MTT) a adherence mikrořas na tkáňových kulturách

3.5.1 Kultivace tkáně

Buněčné linie kolorektálního adenokarcinomu Caco-2 a HT29 jsou kultivovány v kultivačních lahvích, o velikosti 75 cm², v 15 ml Dulbecco's Modified - Eagle's Medium (DMEM) media, které je obohaceno o 10 % Fetal bovine serum (FBS), o 1 % hydrogenuhličitanu sodného, o 1 % pyruvátu sodného, dále také o 1 % neesenciálních

aminokyselin a 1 % penicilinu (10 000 jednotek) a streptomycinu (100 mg). Kultivace probíhá po dobu 7 dní. Každý druhý den je medium vyměněno za čerstvé. Po sedmi dnech jsou buněčné linie sklizeny. V prvním kroku jsou buňky opláchnuty 5 ml PBS (Phosphate buffered saline), které je následně odstraněno. Poté je k buňkám přidáno 5 ml 1× trypsinu, který se nechá působit 3-5 minut. Po uplynutí této doby je triton zneutralizován, a to přidáním 5 ml DMEM media. Pomocí plastové škrabky jsou buněčné linie uvolněny a obsah lahve je přenesen do 15 ml zkumavky typu Falcon a centrifugován při $200 \times g$ po dobu 10 minut. Staré medium je odstraněno a je přidáno medium nové v objemu 5 ml, ve kterém jsou buňky rozpuštěny. Do nové kultivační lahve je připraveno 15 ml DMEM media. Ze zkumavky je odebrán 1 ml suspenze a přenesen do této nové kultivační lahve. Kultivační láhev je umístěna do CO₂ inkubátoru (37 °C a 5 % CO₂ atmosféra).

3.5.2 Založení 24-jamkové destičky

Z buněčné suspenze, která je důkladně rozpuštěna, je odebráno 100 µl, smícháno se 100 µl tripanové modře a následně nanášena na Bürkerovu komůrku a vypočte se koncentrace buněk v 1 ml suspenze. Do směsi je přidáno $3,6 \times 10^4$ Caco-2 a $0,4 \times 10^4$ HT29. Tato směs je pipetována na jamku v objemu 500 µl a takto připravená destička je uložena v kultivačním boxu. Po dobu 14 dní je každé 2 – 3 dny vyměněno medium za čerstvé.

3.5.3 Cytotoxicita (MTT)

Připravená buněčná suspenze o koncentraci $2,5 \times 10^3$ buněk/ ml je pipetována do 96-jamkové destičky v množství 200 µl. Po 24 hodinách je odstraněno staré medium a přidáno 100 µl nového media spolu s testovanými vzorky mikrořas v daných koncentracích. Takto jsou testované vzorky s buňkami inkubovány po dobu 72 h. Po této době je medium se vzorky odstraněno a nahrazeno 100 µl čistým mediem s MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,2-diphenyl-2H-tetrazol bromid) (1 µg/ ml). Po 2 hodinách v CO₂ inkubátoru je medium s MTT odstraněno a nahrazeno 100 µl DMSO. Absorbance je měřena při 555 nm a 720 nm jako referenční hodnoty. Procento životaschopných buněk je vypočteno v porovnání s kontrolou, kde jsou buňky bez přidání mikrořas. Následně se stanoví bezpečné koncentrace pro další testování adherence probiotik na buněčný model.

3.5.4 Test adherence

Pro zjištění adhezenčních vlastností je použita modifikovaná metodika dle (Jensen et al. 2012). Staré medium je odsáto z každé jamky a buněčná monovrstva je 3× propláchnuta PBS.

Poté jsou přidány testované koncentrace mikrořas na monovrstvu střevních buněk. Destička je následně inkubována po dobu 2 hodin, při 37 °C a v 5 % atmosféře CO₂. Po uplynutí této doby jsou jamky 3× promyty PBS, pro odstranění neadherovaných bakterií na monovrstvu, která je následně rozrušena přidáním 300 µl 1% Tritonu-X100 na jamku po dobu 30 s a dále doplněny 700 µl PBS. Vytvořená suspenze s životaschopnými bakteriemi je standardně zředěna a poté naočkována na Petriho misky a zalita Rogosa agarem. Po 72 hodinách inkubace za aerobních podmínek a při 37 °C jsou spočítány KTJ a je stanovena adherence, vyjádřená jako procento adhereovaných bakterií na množství celkově přidaných bakterií.

4 Srovnání „novosti postupů“

Vzhledem k předpokládaným prebiotickým vlastnostem jednobuněčných řas je výhodné přidávat je do fermentových výrobků pro zlepšení funkčnosti těchto produktů a také na podporu životaschopnosti probiotických bakterií jak ve výrobcích, tak v zažívacím traktu. Přestože mléko je jako růstové médium velmi vhodné, chybí mu některé nutrienty pro probiotika. Z tohoto důvodu se mnoho výzkumů soustřeďuje na fortifikaci základních medií prebiotiky, které mají pozitivní vliv na růst probiotik (Beheshtipour *et al.* 2013). Fermentované mléčné výrobky s obsahem „živých bakterií“ patří u většiny populace k oblíbeným a často konzumovaným produktům. Pro splnění legislativních požadavků je ale nutné zachování životaschopnosti zde přítomných „živých bakterií“ v přesně daném počtu až do konce doby trvanlivosti. Jak bylo studii podloženo, přidavek řas *Chlorella vulgaris* nebo *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) dokáže stimulovat růst a pomoci v udržování životaschopnosti bakterií *L. acidophilus* a *Bifidobacterium lactis* v průběhu skladování (Beheshtipour *et al.* 2013).

Zatímco doplňky stravy (např. ve formě tablet a prášků) s obsahem mikrořas se v tržní síti vyskytují v dostatečném množství a produktové škále, mléčné výrobky obsahující mikrořasy na domácím trhu nejsou zatím k dispozici. Jejich aplikace do těchto typů výrobků je limitovaná zejména z pohledu sensorického. Cílem je proto najít vhodné aplikační formy a koncentrace těchto mikrořas tak, aby sensorická hodnota finálních výrobků nebyla negativně ovlivněna, ale současně aby zde byly tyto komponenty zastoupeny v dostatečném množství pro dosažení deklarovaných zdravotních benefitů. Použití mikrořas a produktů z nich v potravinářském průmyslu naráží i na další limitace. Produkce mikrořas (biomasy) a zejména pak další zpracování řasové biomasy (desintegrace, extrakce apod.) ve velkém měřítku je stále

ještě ekonomicky poměrně náročná. Kromě toho existují také legislativní překážky v podobě schvalovacích procesů regulačními orgány. V současné době jsou pro potravinářství schválené pouze rody *Chlorella* a *Spirulina*, nicméně na seznamu potravin nového typu (Prováděcí nařízení komise (EU) 2017/2470 ze dne 20. 12. 2017) se vyskytují také například oleje z mikrořas *Schizochytrium* sp. bohatý na DHA a EPA, které jsou schválené pro širokou škálu použití od mléčných výrobků, přes cereálie či roztíratelné tuky až po doplňky stravy. Další schválenou mikrořasou je *Tetraselmis chuii*, mořská zelená mikrořasa spadající do čeledi *Chlorodendrales* s možností použití do omáček, ochucovadel a doplňků stravy.

Přestože mikrořasy přinášejí do potravin mnoho zdravotních benefitů, nejdůležitějším limitujícím faktorem pro jejich využití v potravinářství je senzorická přijatelnost finálních výrobků obsahujících tyto řasy, kdy velmi záleží na koncentraci a aplikační formě. Z tohoto důvodu, cílem předkládané metodiky je poskytnout shrnutí metod a postupů pro testování mikrořas a výběr jejich nejvhodnější koncentrace a aplikačních forem pro použití do mléčných i nemléčných fermentovaných výrobků se zdravotním benefitem pro konzumenta.

5 Popis uplatnění certifikované metodiky

Předkládaná certifikovaná metodika bude moci být využita výzkumnými laboratořemi při testování a rozšíření znalostí o vlivu mikroskopických řas na BMK a bifidobakterie. Dalším relevantním okruhem uživatelů pro uplatnění metodiky jsou mlékárenské a potravinářské instituce zabývající se výrobou mléčných i nemléčných fermentovaných výrobků, ale také komerční organizace využívající probiotické mikroorganismy v kombinaci s dalšími složkami s pozitivním benefitem na lidské zdraví (např. f. INGREDIA s.r.o., s kterou je podepsána smlouva o uplatnění předkládané metodiky).

6 Ekonomické aspekty

Tab 2. - Kalkulace provedena pro 1 vzorek na jednotlivá stanovení

Stanovení	Cena materiálu v Kč na 1 stanovení (1 vzorek)	Účetní cena v Kč (materiál, odběr vzorků, práce, vyhodnocení)
Stanovení počtu bifidobakterií	200,-	1000,-
Stanovení počtu BMK	100,-	300,-
ITP	250,-	1500,-
Testování růstu v přítomnosti mikrořasy	30,-	200,-

Senzorické hodnocení	100,-	250,-
Stanovení toxicity	250,-	1800,-
Test adherence	650,-	2750,-
cena v Kč na 1 vzorek	1580,-	7800,-

Tab. 3 - Kalkulace provedena pro 15 vzorků

materiální náklady uživatele	náklady uživatele na práci *	náklady celkem	zisk v Kč	ekonomický přínos v Kč
23 700,-	15 000,-	38 700,-	117 000,-	78 300,-

* uvažujeme o potřebě 50 hod. práce celkově (tj. odběry, primokultivace, testování, apod.) a kalkuluje 300,- Kč/hod.

Produkční cena jedné mikrořasy 3 000 Kč/kg včetně medií, energií kultivace, sklizení a sušení a práce. Tvorba extraktů horkovodních a tvorba směsí biomasy s potravinovými másly, cena na potravinová másla 2000 Kč, práce na optimalizace kultivace třech kmenů řasy chlorela a spiruliny optimalizace teploty, doby extrakce, sušení, testování množství přídavku potravinových másel a ochutnávání produktů v kombinaci s jogurtem, cena času práce formulace jednoho vzorku jedné řasy 1500 Kč.

7 Seznam související použité literatury

Beheshtipour, H., Mortazavian, A.M., Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., Khosravi-Darani, K. (2013). Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* Algae into Probiotic Fermented Milks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(2): 144-154.

Caporgno, M.P., Mathys, A. (2018): Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. *Frontiers in nutrition*, 5, s. 58.

El-Baky, A.H., El-Baz, H.K., El-Latife, S. (2014): Induction of sulfated polysaccharides in *Spirulina platensis* as response to nitrogen concentration and its biological evaluation. *Journal of aquaculture research and development*, 5, s. 1.

Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P. D., Verbeke, K., Reid, G. (2017): The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the

definition and scope of prebiotics, Expert consensus document. *Nature, Reviews, Gastroenterology and Hepatology*, 14, s. 491 – 502.

Cha, K. H., Koo, S. Y., Lee, D. U. (2008). Antiproliferative Effects of Carotenoids Extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on Human Colon Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22): 10521-10526.

Jensen, H, Grimmer, S, Naterstad, K, Axelsson, L. (2012). *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 153:216–222. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.020>.

Mišurcová, L., Škrovánková, S., Samek, D., Ambrožová, J., Machů, L., Jeyakumar, A. (2012). Chapter 3 - Health Benefits of Algal Polysaccharides in Human Nutrition. *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press. Volume 66: 75-145.

Nařízení Komise EU 2017/2470 ze dne 20. prosince 2017, kterým se zřizuje seznam Unie pro nové potraviny v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 o nových potravinách.

Noguchi, N., Konishi, F., Kumamoto, S., Maruyama, I., Ando, Y., Yanagita, T. (2013). Beneficial effects of *Chlorella* on glucose and lipid metabolism in obese rodents on a high-fat diet. *Obesity research & clinical practice*, 7(2): e95-e105.

Pulz, O., W. Gross (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6): 635-648.

Romay, C., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez, D., Rimbau, V. (2003): C-phycoyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current protein and peptide science*, 4, s. 207-216.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2): 87-96.

ČSN ISO 8587 (560033) Senzorická analýza - Metodologie - Pořadová zkouška (2008)

Vo, T.S., Ngo, D.H., Kim, S.K. (2015): Nutritional and pharmaceutical properties of microalgal *Spirulina*. *Handbook of marine microalgae*, Boston, Elsevier: s. 299-308.

8 Publikace předcházející metodice

Krausová, G., Karpíšková, K., Smolová, J., Lucáková, S., Brányik, T. (2019). Růst laktobacilů a bifidobakterií na médiu s přidavkem mikroskopických řas. *Mlékařské listy*, 175: 9-14.

Kunová, G., Rada, V., Lisová, I., Ročková, Š., Vlková, E. (2011). *In vitro* fermentability of prebiotic oligosaccharides by lactobacilli. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(1): S49-S54.

Hyršlová, I., Smolová, J., Staňková, B., Bártová, J. (2017). Imunomodulační a prebiotické vlastnosti dunaliella salina. *Mlékařské listy*, 163: 18-21.

Doskocil, I., Hostalkova, A., Safratova, M., Benesova, N., Havlik, J., Havelek, R., Kunes, J., Kralovec, K., Chlebek, J., Cahlikova, L. (2015). Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters*, 13: 394-398.

Musilova, S., Modrackova, N., Doskocil, I., Svejstil, R., Rada, V. (2017). Influence of human milk oligosaccharides on adherence of Bifidobacteria and Clostridia on Caco-2 cells. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 4: 1588-6240.

Prezentace na konferencích:

Krausova, G., Karpiskova, K., Smolova, J., Lucakova, S., Branyik, T.: Influence of cyanobacteria *Spirulina platensis* on growth of gut microbiota. Abstracts book MJPR 2638-1621, p. 34, 2nd International Conference on Pharama & Nutrition, Health and Aging, 1-2. August, Valencia, Spain.

Smolova J., Krausova G., Branyik T., Cadkova A.: Growth promoting efect of isolated *Chlorella* sp. cell walls on bifidobacteria probiotic strains, 13th International Conference of Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health - IPC2019, Prague (Czech Republic), 17. - 20.6.2019.

9 Jména oponentů a názvy jejich organizací

1.) Oponent z oboru: Ing. Eva Šviráková, Ph.D.

Ústav konzervace potravin

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

2.) Oponent ze státní správy: MVDr. Jiří Hlaváček

Odd. veterinární asanace a SEUROP

Státní veterinární správa

10 Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu MZe, NAZV č. QK1910300 s názvem „Využití odpadů z mlékáren pro produkci nových mléčných výrobků a doplňků stravy s přídavkem mikrořas nebo jejich komponent“ a institucionální podpory MZE-RO1419 (DKRVO).

Metodika je zdarma k dispozici všem zájemcům na webové stránce:

http://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/mrasy_2019.pdf