



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

VÝVOJ A TESTOVÁNÍ PŘÍRODNÍCH SLOŽEK POTRAVIN PRO DĚTSKOU VÝŽIVU

DEVELOPMENT AND TESTING OF NATURAL FOOD COMPOUNDS FOR INFANTS' NUTRITION

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Julie Hoová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2022

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

ING. JULIE HOOVÁ

**VÝVOJ A TESTOVÁNÍ PŘÍRODNÍCH SLOŽEK
POTRAVIN PRO DĚTSKOU VÝŽIVU**

Autoreferát disertační práce k získání vědecké hodnosti
"Doktor" ve zkratce "Ph.D."

BRNO 2022

Disertační práce byla sepsána v rámci doktorského studijního programu na Vysokém učení technickém v Brně na Ústavu chemie potravin a biotechnologií v prezenční formě studia.

Uchazeč: Ing. Julie Hoová
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT v Brně

Školitel: prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT v Brně

Školitel specialista: Ing. Petra Skoumalová, Ph.D.
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT v Brně

Oponenti:

Autoreferát byl odeslán dne:

Obhajoba disertační práce se koná dne v hodin
před komisí pro obhajoby disertačních prací v zasedací místnosti číslo na
Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně.

S disertační prací je možné se obeznámit na děkanátu Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně.

ABSTRAKT

Předložená disertační práce se zabývá vývojem a testováním přírodních složek potravin pro dětskou výživu. V rámci práce byly vybrány skupiny rostlinných potravin, které byly zkoumány z nutričního hlediska, a také na obsah biologicky významných látek, zejména látek s antioxidačním a antimikrobiálním účinkem. Z nutričního hlediska byl sledován celkový obsah sacharidů, redukující cukry, nerozpustná vláknina, zastoupení celkového dusíku a profil mastných kyselin. Ve vybraných vzorcích byl poté sledován obsah vybraných vitaminů a provitaminů, celkových fenolických látek, flavonoidů, antioxidační kapacita, přírodní barviva, množství fruktanů a β -glukanů, organické kyseliny. Interakce s buňkami byla studována za účelem vyhodnocení antimikrobiálního a cytotoxického účinku.

Dalším sledovaný aspektem této práce byla enkapsulace vybraných extraktů do nanočástic, zejména liposomů o různém složení. U těchto částic byla sledována distribuce velikosti, uniformita, zeta potenciál, enkapsulační účinnost a postupné uvolňování. Slunečnicový a sójový lecithin byl na základě charakterizace vyhodnocen jako nejvhodnější pro přípravu liposomů.

V neposlední řadě byly kultivovány vybrané kmeny probiotických bakterií, u kterých byl sledován vliv použitých technik enkapsulace na jejich viabilitu. Poté byl sledován vliv přítomnosti extrahovaných látek z testovaných rostlinných vzorků na probiotickou viabilitu, a to i v podmínkách modelového trávení. V rámci stanovení viability byly využity techniky kultivační, ale i průtoková cytometrie. Dále byly vybrány extrakty rostlinného původu bohaté na množství biologicky významných látek s potenciálním vlivem nejen na lidský organismus, ale také na metabolismus probiotických bakterií nacházejících se přirozeně v tlustém střevě. Vhodnou kombinací se v této práci jevil mladý ječmen s vybranými zástupci laktobacilů a bifidobakterií.

V poslední fázi práce byl zkoumán přechod specií biogenního prvku selenu, jakožto zástupce přirozených antioxidantů v těle, a to z matky na dítě prostřednictvím raného mateřského mléka – kolostra. V práci byla potvrzena důležitá role kolostra ve výživě novorozenců. V kolostru byla zjištěna přítomnost selenoproteinu P, který je tak dále přijímán dítětem bezprostředně po narození a přispívá k jeho obranyschopnosti.

Celkově lze konstatovat, že i přes nesporný zásadní význam bílkovin představují biologicky aktivní látky rostlinného původu, případně kombinace probiotik a prebiotik, velký přínos a přispívají ke zvýšení nutriční hodnoty a kvality potravin pro dětskou výživu.

KLÍČOVÁ SLOVA: selenometabolity, antioxidanty, doplněk stravy, dětská výživa, enkapsulace, probiotické bakterie

OBSAH

1 Teoretická část	6
1.1 Dětská výživa	6
1.2 Charakteristika dětské stravy	6
1.3 Mateřské mléko	6
1.3.1 Živočišné mléko a mléčná umělá výživa	7
1.3.2 Komplementární výživa	8
1.4 Biologicky aktivní sloučeniny	9
1.4.1 Vitaminy	10
1.4.2 Antioxidanty	10
1.5 Organismy s vysokým obsahem bioaktivních látek	12
1.5.1 Makrořasy a mikrořasy	12
1.5.2 Byliny a koření	12
1.5.3 Probiotické bakterie	12
1.5.4 Mikrobiom u dětí	14
1.6 Enkapsulace	15
1.6.1 Typy částic	15
2 Cíle disertační práce	18
3 Experimentální část	19
3.1 Použité buněčné linie	19
3.2 Použité mikroorganismy	19
3.3 Materiál	19
3.3.1 Vzorčky pro stanovení selenometabolitů a selenoproteinu P	19
3.3.2 Rostlinné materiály	19
3.3.3 Komerční probiotické produkty	20
3.4 Metody pro stanovení základních charakteristik	20
3.4.1 Stanovení selenu v reálných vzorcích kolostra a krevního séra	20
3.4.2 Metody pro stanovení biologicky aktivních látek	20
3.4.3 Příprava částic s enkapsulovanou aktivní složkou a charakterizace	21
3.4.4 Probiotické bakterie	21
3.4.5 Sledování změn viability a uvolňování aktivních látek v průběhu modelového trávení	21
4 Výsledky a diskuze	22
4.1 Stanovení selenometabolitů v reálných vzorcích	22
4.2 Charakterizace rostlinného materiálu z hlediska obsahových látek	22
4.2.1 Charakterizace z hlediska makronutrientů	22
4.2.2 Charakterizace z hlediska obsahu biologicky významných látek	24
4.2.3 Stanovení vybraných sacharidových skupin	24
4.2.4 Stanovení celkových fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivity	24
4.2.5 Stanovení vybraných rostlinných barviv	26
4.2.6 Prvková analýza řas a sinic	26
4.2.7 Antimikrobiální vlastnosti vybraných extraktů	27

4.2.8	Testy cytotoxicity	27
4.3	Enkapsulace vybraných extraktů do liposomů	28
4.3.1	Enkapsulace vodných extraktů rostlinných prášků do liposomů s různým lecithinem	29
4.3.2	Stabilita liposomů připravených z lecithinu různého původu v průběhu modelového trávení	29
4.4	Probiotické bakterie	30
4.4.1	Enkapsulace probiotických bakterií do alginátových částic	32
4.4.2	MTT test biopolymerního materiálu použitého pro enkapsulaci	33
4.4.3	Interakce probiotických buněk s vybranými extrakty	34
5	Závěr	37
6	Seznam použité literatury	40
7	Životopis a publikační činnost	49

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 DĚTSKÁ VÝŽIVA

Postnatální vývoj a růst každého jedince je ovlivněn dostatečným přísunem energie v podobě stravy, jejíž složení je individuální. Složení stravy má značný vliv na zdraví dítěte. Výživa a dostatečný přísun energie se vysoce podílí na vývoji mozku, a to hlavně u předčasně narozených dětí. V postnatálním období je složení stravy zcela závislé na okolí a ostatních dospělých jedincích pro dosažení svých výživových potřeb. Během prvního roku života dítěte stoupají požadavky na přísun energie více než dvakrát, zatímco později se požadavky zvyšují pouze o 10 % za rok ^{[1],[2],[3]}.

Neadekvátní výživa může ovlivnit zdraví dítěte i v jeho pokročilém věku. Možný výskyt civilizačních chorob neboli nemoci západního životního stylu bývají častým problémem. Jedná se převážně o rychlý nárůst hmotnosti dítěte přecházející do obezity a posléze se tak mohou také vyskytovat příznaky zapříčiněné kardiovaskulárními chorobami. Mezi civilizační choroby se kromě obezity dále řadí například alergické a astmatické onemocnění, kožní onemocnění, diabetes mellitus typu 2 ^{[2],[4],[5]}.

1.2 CHARAKTERISTIKA DĚTSKÉ STRAVY

Všechny vyrobené nebo dovezené výrobky určené dětem ve věku do 3 let musí splňovat hygienické požadavky prováděcího právního předpisu, vyhlášky MZ č. 84/2001 Sb., o hygienických požadavcích na hračky a výrobky pro děti do 3 let a také požadavky na složení a označení výrobků dané vyhláškou 54/2004 Sb. Tyto výrobky nesmí poškodit zdraví, musí vyhovovat požadavkům uvedeným ve vyhlášce, a to složením, vlastnostmi a mikrobiologickou čistotou. Dále musí být značeny a vybaveny písemným prohlášením, a to v rozsahu stanoveném vyhláškou o složení a vlastnostech výrobků a potvrzení, že byly hodnoceny za podmínek stanovených prováděcím právním předpisem ^[6].

Vyhláška 54/2004 Sb. zahrnuje následující kategorie potravin ^[7]:

- a) Počáteční a pokračovací kojenecká výživa a výživa malých dětí
- b) Obilné příkrmy a potraviny pro malé děti
- c) Náhrady celodenní stravy pro regulaci hmotnosti
- d) Potraviny pro zvláštní lékařské účely
- e) Potraviny s nízkým obsahem laktózy nebo bezlaktózové

1.3 MATEŘSKÉ MLÉKO

Mateřské mléko je pro kojence významným zdrojem nutričních látek, které pomáhají kojenci vytvářet vlastní imunitní systém a intestinální mikrobiotu a je esenciálním zdrojem pro kojence v jeho prvních 6 měsících života ^{[8],[9]}.

Mléko obsahuje mnoho biologicky aktivních látek, ale také protilátky nebo kmenové buňky s neznámou funkcí, které se následně mohou diferencovat na neurony. Z tohoto důvodu Světová zdravotnická organizace (WHO) a Dětský fond Organizace spojených národů (UNICEF) doporučila začátek přirozeného kojení mateřským mlékem bezprostředně 1 hodinu po narození dítěte a pokračovat výhradně krmením mateřským mlékem po dobu 6 měsíců. Do

konce dvou let života dítěte je následně nutné zahrnovat mateřské mléko v rámci komplementární výživy, pokud tomu zdravotní stav matky a dítěte dovolí ^{[10],[11]}.

Mateřské mléko je ideálním výživovým zdrojem novorozenců a obsahuje imunokompetentní buňky a imunoglobuliny typu IgA, které protektivně působí na střevní sliznici. Kromě toho má mateřské mléko samo o sobě protektivní antimikrobiální aktivitu vůči bakteriím jako je *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii* a streptokokům ^[12].

Vlastnosti a chemické složení lidského mateřského mléka je vědci zkoumáno již od počátku 20. století, a to jak z kvantitativního, tak kvalitativního hlediska. Obsahuje mnoho různých makronutrientů (sacharidy, bílkoviny, tuky a vitaminy) a také nespočet bioaktivních látek. Antimikrobiální a imunomodulační komponenty mateřského mléka kompenzují málo vyvinutý neonatální imunitní systém ^{[13],[14]}.

Jedním z nejdůležitějších biologicky aktivních prvků obsažených v mateřském mléce je selen (Se), a to převážně díky svým antioxidačním a protirakovinným vlastnostem. Přítomnost selenu v mateřském mléce je pro novorozence esenciální. Nízká hladina selenu bývá spojována s komplikacemi v době těhotenství, a to především s preeklampií (křečemi), předčasným porodem nebo například se samovolným potratem. Selen také hraje významnou roli v metabolismu hormonů štítné žlázy, které jsou velmi důležité při vývoji plodu. Štítná žláza obsahuje nejvyšší koncentraci selenu na gram tkáně, a to díky expresi selenoproteinů v tomto orgánu. Selen nalezneme v organismu v mnoha podobách. Jedná se o anorganický selen– Se^(IV) a Se^(VI), a selenometabolity, jako jsou například selenomethionin (SeMet), selenocystein (SeCys), selenocystin (SeC), selenocystamin (SeCa), selenoprotein P (SELENOP), glutathionperoxidáza (GPX) a selen obsahující proteiny (selenoalbumin, SeAlb) ^{[15],[16],[17]}.

Selenoprotein P je glykoprotein, který zprostředkovává transport a distribuci stopového množství selenu. Jeho množství v plazmě je ukazatelem nutričního statusu v těle. V nedávné době byla nalezena přítomnost selenoproteinu P v mateřském mléce, z tohoto důvodu se začal zkoumat přenos selenu z matky na dítě prostřednictvím kojení mateřským mlékem ^[17].

Železo a zinek jsou přítomny v mateřském mléce poměrně v malé koncentraci, ale jejich biologická dostupnost a absorpce je vysoká ^[8].

Mateřské mléko obsahuje mnoho látek pomáhající chránit kojence proti infekcím. Jedná se o velmi hodnotnou ochranu bez vedlejších příznaků, jako je horečka, která bývá pro malé kojence nebezpečnou. Mléko obsahuje například imunoglobuliny, převážně imunoglobulin A (sIgA), který vytváří povrchovou vrstvu na intestinální mukóze a zabraňuje tak vstupu bakterií do buněk. Dále obsahuje bílé krvinky a syrovátkové proteiny, zde se jedná hlavně o lysozym a laktoferrin, inhibující bakterie, viry a plísňe. Také obsahuje důležité oligosacharidy, zabraňující přichycení bakterií na povrch mukózy ^{[8],[9]}.

1.3.1 Živočišné mléko a mléčná umělá výživa

Živočišné mléko se od lidského liší jak v kvantitě nutrientů, tak i ve své kvalitě. Pro kojence mladší 6 měsíců může být zvířecí mléko modifikováno, a to přidáním vody, sacharidů anebo mikronutrientů. Po 6 měsících života mohou kojenci dostávat převařené smetanové mléko. Kojenecká umělá výživa je obvykle vyrobena industriální modifikací kravského mléka nebo sójových produktů. Během výrobního procesu dochází k přidavku nutrientů, aby bylo mléko obsahově co nejpodobnější mléku lidskému. V současnosti se mléka obohacují o probiotické bakterie, rozpustnou probiotickou vlákninu, vitaminy, minerály nebo antioxidanty. Nicméně

kvalitativní rozdíly v tucích a proteinech stále přetrvávají, a navíc chybí protiinfekční a biologicky aktivní sloučeniny, které se nacházejí v lidském mléce^{[8],[9]}.

Umělá výživa bývá navíc často nesterilní, a proto může docházet ke kontaminaci patogenními bakteriemi, jako je *Enterobacter sakazakii* nalezený v práškové umělé mléčné výživě. Sójové umělé výživy obsahují fytoestrogeny s podobnou aktivitou, jakou mají lidské estrogény. Fytoestrogeny mohou potenciálně snižovat plodnost u chlapců anebo zapříčinit předčasnou pubertu u dívek^[8].

Pokud není kojeneček v počátečním období kojení výhradně mateřským mlékem, je krmen tzv. „počáteční“ formulí. Počáteční formule obsahuje upravenou bílkovinu kravského mléka, kdy tato úprava spočívá ve změně poměru syrovátky a kaseinu na poměr 1:1 nebo vyšší. Dále obsahuje laktózu, tuky v potřebném množství s významným podílem nenasycených mastných kyselin, také vitaminy a minerální látky^[9].

Po ukončení 4. měsíce až do konce prvního roku života je pak krmen tzv. „pokračující“ formulí. Pokračující formule obsahuje ve srovnání s kravským mlékem snížené množství bílkovin a od počáteční formule se liší poměrem syrovátky a kaseinu. Kromě laktózy může obsahovat navíc i sacharózu^[9].

U dětí trpících alergickou reakcí na bílkovinu kravského mléka nebo na sníženou aktivitu enzymu laktáza, je možné krmit speciální formulí upravenou dle potřeb dítěte. Jedná se například o hypoantigenní formule nebo sójová či antirefluxní mléka. Také je obecně zakázáno používat složky obsahující lepek a produkty obsahující med musí být ošetřeny tak, aby došlo ke zničení spor *Clostridium botulinum*^{[9],[18]}.

1.3.2 Komplementární výživa

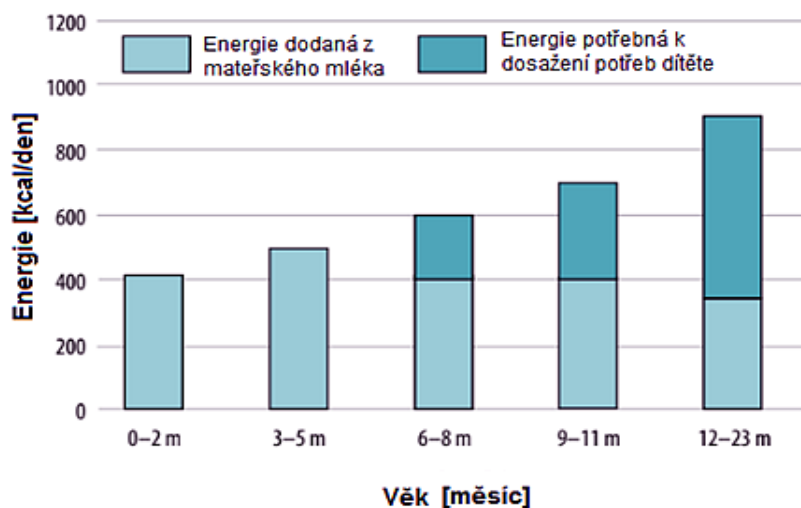
Po uplynutí 6 měsíců života je pro kojence obtížné dosáhnout výživových potřeb pouze z lidského mléka. Trávicí systém je dostatečně vyvinutý na to, aby strávil škrob, proteiny a tuky z nemléčné stravy. Komplementární výživou se rozumí nemléčná výživa kojence, tedy jídlo a tekutiny podávané k mateřskému mléku. Optimální komplementární výživa není postavena pouze na tom, co je dítěti podáváno, ale také jak, kdy, kde a kým je dítě krmeno^{[8],[19]}.

Pokud se komplementární výživa podává později nežli v 6. měsíci, sice dosáhneme redukce vystavení chorob z jídel, avšak dítě je i tak vystaveno mikrobiálním kontaminacím z jeho přirozeného okolí, a to z půdy i z jiných zdrojů. Mikrobiální kontaminace komplementární stravy jsou hlavní příčinou průjmových onemocnění, která jsou obvyklá u dětí mezi 6. a 12. měsícem života. Správnou přípravou a skladováním komplementární stravy lze předcházet kontaminaci a riziku průjmového onemocnění^{[8],[20]}.

Vhodné celkové množství jídla obvykle souvisí s energií (množství vyjádřeno v kilokaloriích [kcal]), které je nutné dítěti dodat. Další nutrienty jsou také důležité a jsou buďto součástí stravy, nebo jsou přidány k základním potravinám. Ve sloupcovém grafu (Obrázek 1) je zobrazeno množství energie, které dítě potřebuje do dovršení dvou let života v porovnání s energií dodávané mateřským mlékem. Z tabulky je patrné, že mateřské mléko pokryje energetické nároky dítěte pouze do 6. měsíce jeho života. Poté dochází k nedostatku, který musí být pokryt komplementární výživou. Z toho tedy vyplývá, že by komplementární strava spolu s mateřským mlékem měla poskytovat dostatečný příjem energie, bílkovin a mikronutrientů^[8].

Mezi základní ingredience komplementární výživy obvykle řadíme cereálie, ovoce a kořenovou zeleninu bohatou na škrob. Kromě tohoto základu by měl být do stravy zařazen

pokrm z masa nebo ryb, které jsou dobrým zdrojem bílkovin, železa a zinku. Játra jsou zdrojem vitamínu A a folátu. Vaječný žloutek je zdrojem proteinů a vitamínu A. Mléčné produkty obstarávají zdroj vápníku, bílkovin a vitaminy skupiny B. Luštěniny jsou výborným zdrojem bílkovin a v menším množství i železa, proto se doporučuje kombinovat s potravinami napomáhající lepšímu vstřebávání železa. Zelenina a ovoce, a to především s vysokým obsahem vitamínu A a vitamínu C, zde se řadí například mrkev, mango, špenát atd. Do dvou let věku by se tuky a cholesterol neměly omezovat, nízkotučná dieta může být v tomto období nebezpečná. Přednost by se ovšem měla dávat nenasyceným mastným kyselinám před nasycenými^{[8],[21]}.



Obrázek 1 Energetické nároky dítěte^[8]

Komplementární strava by měla doplňovat nedostatek železa z mateřského mléka, a to nejlépe ze živočišných zdrojů jako je maso, vnitřní orgány, drůbež či ryby. Rostlinné alternativy kombinované s potravinami bohatými na vitamin C kvůli zlepšení absorpce železa nemohou plně nahradit živočišný zdroj tohoto důležitého mikronutrientu. Také větší množství cukrů obsažených ve sladkých nápojích snižuje chuť dítěte po výživově hodnotnější stravě. Navíc dochází k vytváření zubních kazů a takto nastavená strava vede k nadváze až k obezitě. Čaje a káva obsahují sloučeniny, které mohou interferovat s absorpcí železa. Z tohoto důvodu nejsou tyto nápoje doporučeny k podávání malým dětem^{[8], [20]}.

1.4 BIOLOGICKY AKTIVNÍ SLOUČENINY

V literatuře se často setkáváme s pojmem „funkční potraviny“ nebo „superpotraviny“. V České republice ani v celé Evropě neexistuje žádný oficiální dokument definující tyto dva pojmy. Tyto potraviny mohou napomáhat při prevenci proti metabolickým syndromům a obsahují potencionální bioaktivní sloučeniny, které po konzumaci mohou také sloužit k prevenci metabolických problémů. Existují tak studie zabývající se vlivem konzumace superpotravin na změnu indexu tělesné hmotnosti (BMI), krevního tlaku, koncentraci HDL cholesterolu, koncentraci triacylglycerolů nebo glukózy. Jednotlivé superpotraviny jsou také podrobeny analytické charakterizaci k identifikaci bioaktivních sloučenin^{[4],[22]}.

Biologicky aktivní sloučeniny obsažené v malém množství v potravinách působí na naše zdraví a jejich účinek je nepřetržitě zkoumán. Citrusové plody zabraňují tvorbě zánětu, srdečních chorob a ateroskleróze. Bobulovité ovoce také obsahuje několik biologicky aktivních sloučenin vykazujících antioxidační, protizánětlivé působení^[23].

1.4.1 Vitaminy

Vitaminy patří mezi důležité mikroutrienty a jejich dostatečná hladina je základním předpokladem pro správné fungování organismu.

Vitaminy nalezneme v potravinách, tkáních a tělních tekutinách ve velmi malém množství. Z tohoto důvodu nemohou být přímo extrahovány z velkého množství dalších látek, které mohou interferovat při chemické analýze. Složitost stanovení činí také existence vitamérů, které o stejné nebo různé biologické aktivitě. Ačkoliv moderní analytické metody nabízejí preciznost a citlivost, v oblasti potravin dávají stále pouze přibližnou hodnotu příjmu vitaminů. Výběr metody záleží na povaze vzorku a předpokládané koncentraci analyzované látky [24].

Příprava vzorku je kritickým krokem, který velmi ovlivňuje následné části analýzy. Vzorkování je dáno legislativně a jakékoliv předběžné postupy jako je konzervace a následný transport do laboratoře je extrémně důležitou součástí analýzy, kdy je většina vitaminu labilních a mohou být snadno degradovány. Ideálně by tak měl být vzorek analyzován okamžitě po jeho odebrání. Pokud je vzorek homogenní a je potřeba zmenšit jeho objem, je důležité používat nerezovou ocel. U nehomogenních vzorků je důležité pomoc třepání a přidavku vody získat polotekutý vzorek. Dalším klíčovým krokem analýzy je samotná extrakce, kdy se setkáváme s mnoha obtížemi v průběhu stanovení. Jedná se hlavně o chemickou stabilitu vitaminů, a to odolnost vůči světlu, přítomnosti kyslíku, zahřívání a hodně vůči pH prostředí. Dále se jedná o různě nízké koncentrace ve vzorcích potravin, složitost matrice a v neposlední řadě interakce s jinými makrokomponenty potravin, jako jsou polysacharidy, proteiny nebo lipidy [24],[25].

1.4.2 Antioxidanty

Termín antioxidant je běžně využívaným termínem ve vědecké literatuře, ale může být definován mnoha způsoby podle použité metody ke stanovení antioxidační aktivitě. Fyziologická role těchto sloučenin je chránit buněčné komponenty před jejich poškozením v průběhu chemických reakcí zahrnující volné radikály [26].

Oxidační stres

Oxidační stres nastává při nerovnováze mezi produkcí antioxidantů a volných radikálů. Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) a reaktivní dusíkaté radikály (RNS) jsou vysoce reaktivními volnými radikály, nejreaktivnějším radikálem je radikál OH^\bullet . Většina těchto radikálů je vytvářena mitochondriemi jako vedlejší produkt tvorby energie a zahrnují hydroxylové radikály, radikály superoxidů, ale také peroxid vodíku a singletový kyslík. Ve zdravých, neporušených buňkách dochází k tvorbě ROS jako vedlejších produktů syntézy ATP, při přebytku elektronů a jejich úniku z elektronového transportního řetězce [27].

Oxidační stres bývá příčinou mnoha různých chronických chorob u lidí a je způsoben zvyšující se aktivitou reaktivních kyslíkových radikálů během oxidačních procesů. Oxidace je chemická reakce přenášející elektrony z látky na oxidační činidlo. Oxidační reakce tak může vytvářet volné radikály mající nepárové elektrony schopné vykonat rychlou řetězovou reakci, destabilizovat tak jiné molekuly a vytvářet další volné radikály. Volné radikály obsahující kyslík jsou biologicky nejvýznamnějšími volnými radikály. Během podmínek oxidačního stresu dochází k vyšší tvorbě těchto volných radikálů mitochondrií nežli enzymatických antioxidantů, jako je například superoxiddismutáza, glutathionperoxidáza, peroxidáza, kataláza, a neenzymatických antioxidantů jako je například kyselina askorbová, tokoferol, glutathion, karotenoidy, flavonoidy přítomné endogenně nebo dodané buňce [28].

Oxidační stres zprostředkovaný ROS radikály se podílí na vývoji chronických onemocnění. Nejčastěji se jedná o rakovinu, cukrovku, srdeční choroby, mrtvici, Alzheimerovu chorobu, revmatickou artritidu, šedý zákal a stárnutí ^[29]. Antioxidanty reagují s volnými radikály vytvořenými v buňce a ukončují tak řetězovou reakci předtím, než dojde k poškození zdravých buněk. K ukončení řetězové reakce dochází v momentě odstranění meziproductů volných radikálů a inhibicí dalších oxidačních reakcí neutralizací volných radikálů. Na druhou stranu ovšem dochází k oxidaci antioxidantů. Molekula antioxidantu může reagovat pouze s jedním volným radikálem a z tohoto důvodu je potřeba doplňovat zdroje antioxidantů ^[28].

Zdroje

Hlavními zdroji antioxidantů jsou rostlinné materiály, například česnek, brokolice, zelený čaj, rajčata, mrkev, květák, borůvky, švestky a citrusové plody. S rozšiřujícím se trhem funkčních potravin obsahující antioxidanty, dochází k velkému zájmu o najít dalších jiných zdrojů bohatých na antioxidanty, které by mohly být bezpečně použity ^[28].

Separace, identifikace a analýza celkových fenolických látek

I přes společný fenolický stavební základ mají polyfenoly díky strukturní diverzitě různorodé fyzikálně-chemické vlastnosti. Existuje ovšem obecný postup ke stanovení polyfenolů ^[30].

Před samotnou extrakcí polyfenolů dochází ke sběru vzorku obsahující tyto sloučeniny. Při samotné přípravě je důležité minimalizovat ztráty, ke kterým může docházet během transportu a uchovávání vzorků. Aby se předcházelo degradaci nativních polyfenolů před jejich extrakcí, bývají vzorky často sušeny, mraženy nebo lyofilizovány. Vzdušná vlhkost nebo voda obsažená přímo ve vzorcích podporuje aktivitu enzymů degradujících vzorky. Důležité je také vyvarovat se vysokým teplotám a oxidaci. Zvláště při sušení by mohlo být dosaženo velmi vysoké teploty. Oxidaci lze zabránit přidávkem antioxidantu butyl-hydroxytoluenu nebo kyseliny askorbové. V této přípravné fázi lze využívat také technik filtrace nebo centrifugace ^{[30],[31]}.

Existuje mnoho metod extrakce polyfenolů, například extrakce dle Soxhleta nebo mikrovlnná extrakce (MAE), přičemž nejčastěji se využívají extrakce rozpouštědlem, a to extrakce kapalina-kapalina (LLE) nebo tuhá fáze-kapalina (SLE). Polyfenoly jsou hydrofilní látky, k extrakci tak dochází polárními rozpouštědly, jako je voda, methanol, ethanol apod. Polyfenoly bývají navíc stabilnější při nižším pH, avšak k úpravě pH se nesmí využívat vysoká koncentrace silných kyselin, jelikož by mohlo docházet k hydrolýze glykosidů a acylglykosidů. Extrakce tradiční cestou bývá ovšem poměrně dlouhá. Z tohoto důvodu se začaly používat extrakce za vyššího tlaku a vyšší teploty ^{[30],[31],[32]}.

Nejčastěji využívané metody ke stanovení polyfenolů jsou spektrofotometrické metody. Slouží ke stanovení obsahu celkových fenolických látek, celkových flavonoidů a celkových anthokyaninů. Tyto metody jsou rychlé, ale nelze blíže určit jednotlivé sloučeniny. Interference nefenolických látek může také ovlivňovat výsledky analýzy. Mezi metody využívané k separaci polyfenolů patří chromatografické techniky. Ke kvantifikaci se využívá například vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s diodovým detektorem (DAD) nebo s detektorem hmotnostní spektrometrie (LC-MS). Isoflavony lze po derivatizaci na methylestery analyzovat pomocí plynové chromatografie (GC) ^[30].

1.5 ORGANISMY S VYSOKÝM OBSAHEM BIOAKTIVNÍCH LÁTEK

1.5.1 Makrořasy a mikrořasy

Mnoho druhů makrořas jsou po staletí využívány ve farmaceutickém průmyslu a jsou i přímo využívány ve výživě. Obsah makronutrientů je rozdílný nejen podle studovaných druhů, ale také podle původu a klimatických podmínek podle ročního období ^{[32],[33]}.

Makrořasy určené k výživě jsou bohatým zdrojem proteinů a vlákniny. Obsah bílkovin se liší podle druhů jedlých řas. V hnědých řasách jsou hodnoty bílkovin nízké, 3–15 % hmotnosti v sušině v porovnání se zelenými a červenými řasami, kdy obsah bílkovin může dosahovat až 47 % hmotnosti v sušině ^{[34],[35],[36]}.

Makrořasy nabízejí poměrně velký podíl nerozpustné vlákniny. Kromě ní obsahuje i rozpustnou vlákninu, která může být využita jako prebiotikum pro růst bifidobakterií v tlustém střevě. V makrořasách nalezneme i vitaminy a antioxidanty (fenolické látky, flavonoidy apod.). Jediným negativem konzumace makrořas je případný vysoký obsah toxických prvků jako je například kadmium ^{[37],[38],[39]}.

Mikrořasy se ve výživě vyskytují také poměrně dlouhou dobu a široce se využívají jako výživové doplňky stravy. V současné době se studie zaměřují hlavně na potenciální terapeutické výhody, a to díky vysokému obsahu antioxidantů ^[40].

1.5.2 Byliny a koření

Byliny a koření se využívají jako ochucovadla pokrmů, ale zastávají také roli přírodních potravinových konzervantů. Obecně jsou považovány za bezpečné (GRAS). Ve vysokých koncentracích mohou vykazovat inhibici růstu mikroorganismů skrze narušení syntézy mikrobiálních nukleotidů a zabraňovat oxidačnímu stresu. Antimikrobiální účinek koření je úzce spojen s obsahem rostlinných látek, jako jsou flavonoidy, flavony, isoflavony apod. Přítomnost vysokých koncentrací ovšem způsobují negativní organoleptické změny potravin ^{[41],[42]}.

1.5.3 Probiotické bakterie

Lidské střevo představuje velmi složitý ekosystém, který je kolonizován velkým množstvím mikroorganismů ovlivňující fyziologii, imunitní funkci a zdravotní stav hostitele. Mezi těmito mikroorganismy lze nalézt i takové, které vykazují probiotické působení, tedy mikroorganismy podporující zdraví hostitele. Probiotické bakterie izolované nejen ze střev, ale i z dalších prostředí, jsou komerčně využívány. I přes narůstající seznam zdravotních benefitů po konzumaci probiotik, jejich přesný mechanismus účinku není doteď zcela objasněn ^[43].

Obecná charakteristika

Probiotika jsou živé nepatogenní mikroorganismy podporující mikrobiální rovnováhu především gastrointestinálního traktu. Zvyšující se počet klinických testů podporuje tvrzení, že probiotika pozitivně ovlivňují zdraví hostitele, a to hlavně při léčení určitých průjemových onemocnění. Mohou tak ovlivňovat fyziologii, imunitu i výživu lidského hostitele. Probiotické vlastnosti mohou být specifické podle druhu probiotického kmene, zdravotní výhody jednoho kmene tak nemusí být stejné jako u kmene jiného ^{[44],[45]}.

Více než 500 různých bakteriálních druhů obývá gastrointestinální trakt dospělého jedince. Bakterie ve střevech představují majoritní zastoupení buněk lidského těla, kdy dosahují počtu až 10^{12} buněk na gram obsahu tlustého střeva. Střevní mikroflóra kojence je ovšem méně komplexní než u dospělého jedince. Různorodost střevní mikroflóry je také velmi ovlivňována mnoha faktory, a to individuálně podle jedince, kdy závisí na pH, žlučových kyselinách, době průchodu a na sliznici střeva – mukóze. Dále závisí na prostředí, v tomto případě na živinách a lécích a na mikrobiálních faktorech, kam řadíme schopnost adheze, produkci bakteriocinů, bakteriální enzymy a metabolické strategie [44],[45].

Probiotiky nazýváme bakterie a kvasinky, které se mohou na trhu vyskytovat jako doplňky stravy nebo mohou být přímo součástí potravy. Nalezneme je v podobě kapslí, tablet nebo prášku a mohou být obsaženy také v různých fermentovaných výrobcích, nejčastěji jogurtech nebo mléčných nápojích. V těchto výrobcích se mohou vyskytovat samostatně v rámci druhu nebo jako směs několika druhů. V současné době jsou hlavními probiotickými bakteriemi brány bakterie patřící do rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Oba tyto rody běžně osidlují prostředí lidského střeva [43].

K identifikaci několika druhů probiotik z potravin, ze střev zvířat a stolice se v současnosti využívá vysoce citlivá kvantitativní metoda polymerázová řetězová reakce (PCR). Důležitým krokem je výběr specifických primerů, které se specificky vážou na daný zkoumaný druh navzdory přítomnosti jiné velmi blízké příbuzné bakterie. Genová sekvence používaná pro důkaz laktobacilů a bifidobakterií je DNA kódující 16S rRNA, avšak rozlišení úzce příbuzných genů pouze na této sekvenci je velmi obtížné kvůli vysoké sekvenční homologii ve variabilních oblastech tohoto genu [46],[47].

Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* se řadí mezi běžné mikroby střevní sliznice lidí a zvířat. Tato skupina bakterií je důležitá pro udržování stability gastrointestinálního traktu, zabraňuje střevním infekcím a obecně podporuje zdraví střev. Mnoho druhů laktobacilů se obecně řadí mezi bezpečné druhy, některé mohou dokonce interagovat s epitelálními buňkami střev [48].

Tabulka 1 Druhy laktobacilů izolovaných ze vzorků stolice [43]

Rod <i>Lactobacillus</i>	
Dospělý jedinec	Kojenec
<i>acidophilus</i>	<i>acidophilus</i>
<i>crispatus</i>	<i>casei</i>
<i>gasseri</i>	<i>paracasei</i>
<i>plantarum</i>	<i>salivarius</i>
<i>ruminis</i>	
<i>casei</i>	
<i>paracasei</i>	
<i>reuteri</i>	

Laktobacily byly také v poměrně velkém množství detekovány u lidí v žaludku a v tenkém střevě, viz (Tabulka 1). Probiotické výhody vůči hostiteli záleží na optimální adaptaci bakterií ke střevnímu prostředí hostitele, kdy se jedná o přežití, adaptaci a kolonizaci bakterií v tomto prostředí. Nejprve jsou bakterie vystaveny nepříznivým podmínkám gastrointestinálního traktu,

jako je kyselé prostředí, žlučové soli, oxidace, osmóza a hladovění. Mechanismus stresové rezistence laktobacilů spočívá hlavně v integritě buněčné schránky, opravách, ochraně a exportu makromolekul z buňky a detekování přítomných stresorů. Mnoho studií je zaměřeno na studium adaptace laktobacilů na nutriční limitace, a to sacharidů, fosfátu a dusíku, které jsou důležité pro syntézu nukleových kyselin, aminokyselin a proteinů [43],[48].

Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* se řadí do kmene *Actinobacteria*, který reprezentuje největší bakteriální taxonomickou jednotku. Bifidobakterie jsou grampozitivní bakterie o vysokém obsahu G + C. Bifidobakterie byly poprvé izolovány ze stolice kojence Tissierem v roce 1899. Nejprve byly tyto bakterie pojmenovány *Bacillus bifidus*. Z důvodu jejich odlišné morfologické a fyziologické struktury, jež se podobala struktuře laktobacilů, byly klasifikovány do rodu *Lactobacillus*, a to převážnou část 20. století. Momentálně se tento rod skládá z 39 druhů, které se mohou shlukovat do 6 různých fylogenetických skupin, a to *B. adolescentis*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. longum*, *B. pullorum* a *B. pseudolongum* [49],[50],[51].

Bifidobakterie zastupují skupinu mikroorganismů, které často dominují v savčích střevech v době jejich kojení (Tabulka 2). Bifidobakterie se vyskytují na různých ekologických místech, které jsou přímo nebo nepřímo spojené s prostředím lidských nebo zvířecích střev [49],[52].

Tabulka 2 Druhy bifidobakterií vyskytující se u lidí [52]

Rod <i>Bifidobacterium</i>	
Dospělý jedinec	Kojenec
<i>adolescentis</i>	<i>pseudolongum</i>
<i>angulatum</i>	<i>thermophilum</i>
<i>bifidum</i>	
<i>breve</i>	
<i>catenulatum</i>	
<i>dentium</i>	
<i>longum</i>	
<i>pseudocatenulatum</i>	

1.5.4 Mikrobiom u dětí

V okamžiku narození je lidské střevo považováno za sterilní, avšak po porodu dochází velmi rychle k jeho osidlování mikroorganismy. Přírozenými zdroji střevní mikroflóry jsou zástupci vaginálního a fekálního mikrobiomu matky, stejně jako mikroby z prostředí. Různorodost střevní mikroflóry závisí nejen na jednotlivém kojenci, ale také na průběhu porodu, místním prostředí a typu krmení kojence, stupně vývoje kojence a ošetření antibiotiky. Při užívání antibiotik u novorozenců může dojít k pozdějšímu správnému vývoji střevní mikroflóry zastoupenou převážně bifidobakteriemi. Také se zvětšuje riziko kolonizace patogenních bakterií jako je *klebsella*, *enterobakter*, *citrobakter*, *pseudomonas* atd. [44]

Průběh porodu hraje důležitou roli při vytváření neonatální mikroflóry. Studie metagenomiky střevní sliznice a vzorků stolice odebraných od zdravých jedinců prokázaly přítomnost 8 dominantních fylogenetických kmenů patřících do *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes* a *Actinobacteria*. Při klasickém

porodu vaginální cestou dominují ve střevech kojence bakterie *Lactobacillus* spp. v porovnání s kojenci narozených pomocí císařského řezu. Například *L. plantarum*, *L. delbrueckii* a *L. reuteri* patří mezi nejčastěji se vyskytující mikroorganismy ve vzorcích stolice u švédských dětí během prvního roku života. Kromě laktobacilů obvykle dominují svým počtem u kojenců krmených mateřským mlékem bifidobakterie. Nedávné výzkumy poukázaly na určité oligosacharidy lidského mléka hrající roli ve vývoji střevní mikroflóry kojence. *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* a *Bifidobacterium bifidum* jsou totiž obdařeny genovou sadou, která kóduje enzymy specializované na metabolismus oligosacharidů lidského mléka. Bifidobakterie tak zastupují 60 až 91 % celkového zastoupení fekálních bakterií u kojených dětí a 28 až 75 % u dětí krmených umělou mléčnou stravou. Po ustálení komplexu střevní mikroflóry po druhém roce života dochází k poklesu zastoupení fekálních bifidobakterií na pouhé 1 až 3 %. U dětí krmených umělou mléčnou stravou navíc kolonizují střeva také bakteroidy, klostridie, enterobakterie a streptokoky ^{[53],[54]}.

1.6 ENKAPSULACE

Enkapsulace je moderní technologie nabízející jisté technologické výhody, a proto má uplatnění v různých odvětvích průmyslu, ať už farmaceutickém, chemickém, environmentálním či textilním. V technologickém průmyslu se nejčastěji využívá k uvolňování biologicky aktivních látek regulovanou rychlostí po delší časový úsek za specifických podmínek a také k prodloužení jejich skladovatelnosti. Mezi další uplatnění enkapsulace se řadí imobilizace buněk nebo enzymů při výrobě potravinových materiálů nebo produktů fermentace, dále zabraňuje průběh nežádoucích reakcí s dalšími složkami v roztoku, a to především s kyslíkem a vodou. Metoda enkapsulace je definována jako zachycení jedné látky látkou druhou. Enkapsulovaná látka bývá nazývána jako aktivní, jádro nebo také vnitřní fáze. Látka, která tuto aktivní látku enkapsuluje, ohraničuje ji, bývá nazývána nosným materiálem, kapslí nebo také vnější fází. Velikost připravených částic se pohybuje v rozmezí od nm až po mm ^[55].

1.6.1 Typy částic

Lze připravit tři typy částic. První typ částic, nazývaný kapsule, obsahuje vrstvu obklopující jádro, ve kterém se nachází enkapsulovaná aktivní látka. U druhého typu částic dochází k disperzi aktivní látky v celém objemu nosného materiálu a může být imobilizována i na povrchu částice. Třetí typ částic je kombinací první dvou typů. Kapsule s rozptýlenou aktivní složkou je obalena dodatečnou vrstvou. Biologicky aktivní sloučeniny se liší ve své molekulové hmotnosti, polaritě, rozpustnosti atd. Z tohoto důvodu je důležité vybrat správnou metodu enkapsulace, abychom dosáhli konkrétních fyzikálně-chemických a molekulových požadavků ^[56].

Lyofilizace

Lyofilizace neboli sušení mrazem je velmi vhodná metoda pro dehydrataci termolabilního materiálu a pro mikroenkapsulaci založené na sublimaci. Lyofilizace je široce používanou metodou k odstranění vody k prodloužení stability probiotických bakterií během doby skladování ^{[56],[57]}.

V průběhu lyofilizace dochází ke čtyřem hlavním bodům, a to k zmrazení, sublimaci, desorpci, a nakonec ke skladování. Díky lyofilizaci lze zachovat tvar, rozměry, vzhled, chuť, barvu, texturu a biologickou aktivitu. Během mražení jsou vytvářeny krystalky ledu, které

mohou poškodit probiotické buňky. Velikost a růst krystalu závisí na rychlosti mražení a teplotě. Velmi rychlé mražení je preferováno nežli pomalá rychlost mražení, jelikož při rychlém zmražení dochází k formování malých krystalků ledu. Formováním malých krystalků ledu se předchází rozsáhlému poškození buněk. Nejen tvorba krystalků ledu je zhoubná pro probiotika. Dále při krystalizaci vody dochází k zakoncentrování zbytkového nezmrzlého roztoku, což vede k chemickému a osmotickému poškození. Při primárním sušení je zmrzlá voda odstraněna pomocí sublimace v prostředí vakua. Při sekundárním sušení dochází k odstranění nezamrzlé vody pomocí desorpce. Nevýhodou této techniky je také její vysokoenergetická náročnost a delší doba trvání ^{[56],[57],[58]}.

Liposomy

Liposomy jsou uzavřené částice tvořeny lipidovým materiálem, jako jsou například fosfolipidy, rozptýlené ve vodném médiu. Během procesu vytváření dochází k tvorbě jedné nebo více vrstev, což je obdobná struktura jako u buněčných membrán. Liposomy vynikají svými vlastnostmi. Nejenže oddělují vnitřní prostředí od prostředí vnějšího, dále zlepšují stabilitu enkapsulované látky. Navíc dochází ke zlepšení biologické aktivity špatně rozpustných látek ve vodě, regulovanému uvolňování aktivní látky a biodegradabilitě liposomů ^{[59],[60]}.

V současnosti existuje mnoho dostupných metod přípravy liposomů, důležité je ovšem to, aby připravené liposomy vykazovaly dobrou stabilitu a vysokou enkapsulační účinnost. Mezi běžné metody přípravy liposomů řadíme odpařování na tenké vrstvě, metodu reverzních fází nebo metodu vstříkávání do rozpouštědla. K redukci velikosti částic jsou využívány metody sonikace, extruze za vysokého tlaku a mikrofluidizace. U těchto metod se setkáváme s problémy, například to, že částice bývají poměrně velké a jejich distribuce je poměrně široká. V tomto případě je potřebná následná granulace částic. Dalším problémem může být přítomnost organického rozpouštědla ve finálním produktu. Z tohoto důvodu se zařazují nové techniky přípravy liposomů, řadíme zde například superkritickou fluidní technologii nebo duální asymetrickou centrifugaci ^[60].

Tento typ částic se uplatňuje v mnoha oborech, ať už v biochemii, molekulární biologii, potravinové technologii, farmacii a lékařství ^[59].

Enkapsulátor

Enkapsulátor je poloautomatický přístroj sloužící k polymerní enkapsulaci chemických látek, biologických molekul, extraktů, buněk a mikroorganismů. Tento přístroj lze využívat za sterilních i nesterilních podmínek. Přístroj se skládá z regulační jednotky se stříkačkovým čerpadlem, elektrickým a pneumatickým systémem a reakční nádoby. Princip vzniku kapslí je založen na regulovaném laminárním kapalném proudu, kdy za pomoci vibrace s optimální frekvencí dochází k rozbití kapek na kapičky o stejné velikosti. Velikost kapiček závisí na několika parametrech, například na frekvenci vibrací, amplitudě, velikosti trysky atd. ^[61]

Aktivní látka se smíchá s nosným polymerem, jedná se převážně o polysacharidy, a směs se převede do stříkačky nebo tlakové láhve. Pomocí stříkačkového čerpadla nebo tlakového vzduchu je směs tlačena do pulzační komory. Kapalina je poté přetlačována přes provrtanou trysku a na jejím výstupu dochází k rozdělování na jednotlivé kapičky stejné velikosti. Tyto kapky procházejí elektrickým polem mezi tryskou a elektrodou, kde získávají povrchový náboj.

Dopadající kapičky kulovitěho tvaru padají do vytvrzovacího roztoku díky vzniklým elektrostatickým silám, Vytvrzovací roztok tak musí být elektricky uzemněn ^[61].

V závislosti na několika proměnných dochází ke vzniku 50 až 5 000 kapiček za sekundu. Vzniklé kapičky jsou ve vytvrzovacím roztoku kontinuálně míchány magnetickým míchadlem, aby nedošlo k jejich shlukování ^[61].

2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce je vývoj nových typů výrobků určených pro dětskou výživu obohacených o vybrané biologicky aktivní složky – probiotika a prebiotika a další složky obsahující zdraví prospěšné látky, a to ve formě volné i enkapsulované.

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. Literární rešerše zaměřená na různé typy přírodních zdraví prospěšných látek rostlinného, živočišného i mikrobiálního původu, jejich aktivní složky; specifika výživy dětského organismu v závislosti na věku
2. Vývoj a optimalizace metod pro izolaci a kvalitativní i kvantitativní stanovení vybraných aktivních látek obsažených v potravinách, přírodních materiálech a surovinách vhodných pro dětskou výživu
3. Kultivace probiotik, stanovení viability v různých fyziologických podmínkách pomocí kultivačních metod a průtokové cytometrie; vliv prebiotik
4. Enkapsulace ativních složek a směsí probiotik a prebiotik, charakterizace a stabilita enkapsulovaných forem v modelovém fyziologickém prostředí a v potravinách
5. Optimalizace postupů a testování biologického účinku a bezpečnosti přírodních látek a probiotik pomocí cytotoxických testů s využitím humánních buněčných kultur, dále testů antioxidační a antimikrobiální aktivity
6. Specializovaná studie možnosti příjmu endogenních antioxidantů (selenoprotein P) novorozeneckým organismem
7. Návrh doplňků stravy s pozitivním biologickým účinkem vhodných pro děti, senzorická analýza

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 POUŽITÉ BUNĚČNÉ LINIE

Pro testování cytotoxického účinku testovaných vzorků byly využity 2 buněčné kultury, Linie immortalizovaných keratinocytů HaCat byla získána z CLS (Cell Line Services GmbH, Eppelheim, Německo) a linie adenokarcinomálních epiteliálních buněk izolovaných z tkáně tlustého střeva z ATCC (American Type Culture Collection, USA).

3.2 POUŽITÉ MIKROORGANISMY

Kultury získané z České sbírky Masarykovy univerzity v Brně kultivované dle doporučení poskytovatele kultur *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Bifidobacterium breve* CCM 7825^T, *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762, *Bifidobacterium longum* CCM 4990, *Micrococcus luteus* CCM 1569, *Staphylococcus epidermidis* CCM 4417, *Escherichia coli* CCM 3954, *Serratia marcescens* CCM 8587.

3.3 MATERIÁL

3.3.1 Vzorky pro stanovení selenometabolitů a selenoproteinu P

V této práci byly analyzovány vzorky získané od 20 zdravých párů matka-dítě. Vzorky kolostra, pupečnickové krve a mateřského séra byly získány z nemocnice Rio tinto v průběhu roku 2015 a nemocnice Ramón Jiménez v průběhu roku 2018. Obě nemocnice se nachází ve městě Huelva ve Španělsku. Vzorky kolostra byly odebrány od zúčastněných žen do 48 hodin od porodu. Zbylé krevní vzorky byly odebrány venepunkcí, tedy odběrem krve ze žíly v čase narození dítěte. Pro následné stanovení byly vzorky uchovávány v hlubokomrazícím boxe při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.2 Rostlinné materiály

- | | | |
|-----------------------------------|------------------------|--------------------|
| – Inulin, CZE | – Matcha, CHN | – Ananas, THA |
| – Chia vláknina, GBR | – Sezamové semínka, IN | – Pomeranč, ESP |
| – Bambusová vláknina, DEU | – Lněná semínka, RUS | – Pomelo, CHN |
| – Jakon sirup, PER | – Konopná semínka, EU | – Hruška, CZE |
| – Směs chlorelly a spirulliny, EU | – Dýňová semínka, CZE | – Zelná šťáva, CZE |
| – Chlorella, CHN | – Římský kmín, AUT | |
| – Spirulina, CHN | – Heřmánek, CZE | |
| – Arame, JPN | – Chmel, CZE | |
| – Wakame, JPN | – Hřebíček, AUT | |
| – Hijiki, JPN | – Skořice, CZE | |
| – Kombu, JPN | – Malinový čaj, CZE | |
| – Mladý ječmen, EU | – Jeřabinový čaj, CZE | |
| – Mladá pšenice, EU | – Fenyklový čaj, CZE | |
| – Moringa, IN | – Lesní plody, DEU | |
| | – Bezinka, DEU | |

3.3.3 Komerční probiotické produkty

- Bipron Junior, Valsun
- APO-LAKTÍK, Apotex

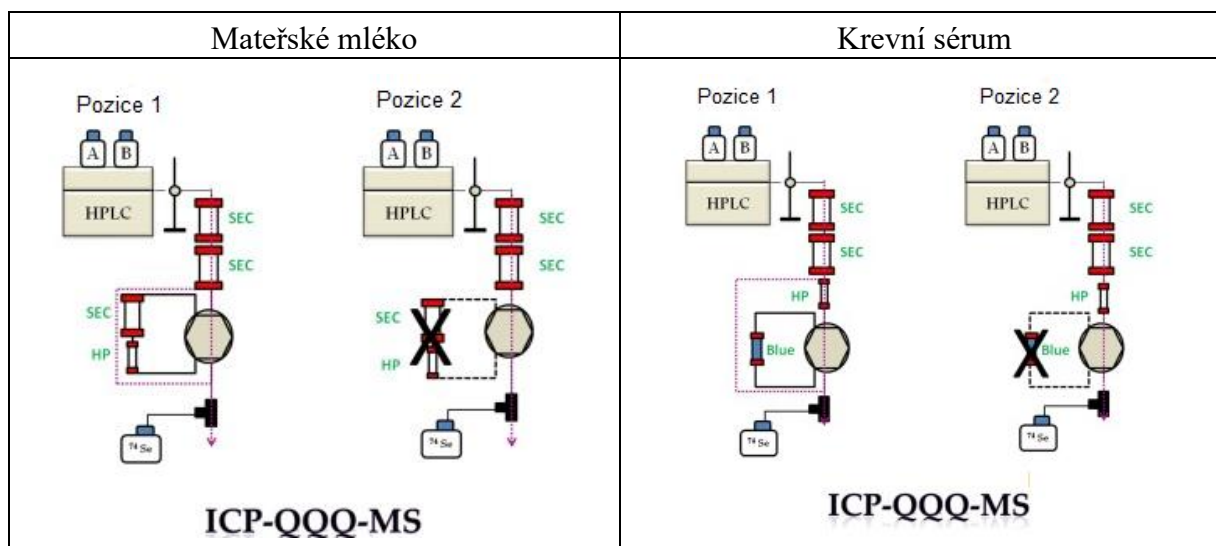
3.4 METODY PRO STANOVENÍ ZÁKLADNÍCH CHARAKTERISTIK

3.4.1 Stanovení selenu v reálných vzorcích kolostra a krevního séra

Pro kvantitativní stanovení selenometabolitů byla využita technika 2D-SEC-SECxSEC-AF-ICP-MS (Tabulka 3) [62],[63]. Separace selenometabolitů a selenoproteinů byla provedena u vzorků krevního séra podobně jako u kolostra s tou výjimkou, že byly použity pouze dvě separační kolony (SEC-SEC) a byla přidána jedna afinitní kolona pro retenci SeAlb ve stacionární fázi Blue-Sepharose kolony (BLUE-HP). Jako referenční standard bylo použito lidské sérum BCR-637. Jako mobilní fáze byly využity roztoky $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (MF A) a $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (MF B) roztok octanu amonného o průtokové rychlosti $1,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Selenoprotein byl ve všech vzorcích také stanoven pomocí ELISA kitu (Elabscience, USA) podle pokynů výrobce.

Tabulka 3 Schéma separace měření pro reálné vzorky



3.4.2 Metody pro stanovení biologicky aktivních látek

Ke stanovení sacharidů v extraktech vzorků byla využita kolorimetrická metoda dle Duboise^[64], metoda dle Somogyi-Nelsona^[65] a vážková metoda pro stanovení nerozpustné vlákniny dle Henneberga a Stohmanna^[67]. Stanovení celkového dusíku bylo provedeno podle modifikované Kjeldahlovy metody^[68]. Zastoupení mastných kyselin bylo stanoveno po transesterifikaci pomocí GC-FID na koloně Zebron ZB-FAME s vodíkem jako nosným plynem o průtoku $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Celkový obsah fenolických látek byl stanoven spektrofotometrickou metodou s využitím Folin-Ciocalteuova činidla^[69], flavonoidy pomocí reakce s chloridem hlinitým^[70], celková antioxidační aktivita pomocí zhášení radikálového kationtu ABTS^{•+}^[71]. Pro kvantitativní stanovení fruktanů^[72] a β -glukanů^[73] byl využit komerční kit dle postupu uvedeného výrobcem. Obsah vybraných přírodních barviv byl stanoven pomocí absorpčních spekter látky v daném rozpouštědle^[74].

Dále byly využity metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení individuálních fenolických látek (RP-HPLC/DAD, $\lambda = 260$ a 280 nm, Kinetex F5, gradientová eluce mobilní fáze 0,1% TFA:ACN o průtoku $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a teploty separace $35 \text{ }^\circ\text{C}$), vybraných převážně lipofilních pigmentů a vitaminů (RP-HPLC/DAD, $\lambda = 435$ nm, Kinetex EVO C18, gradientová eluce mobilní fáze A – ACN:TrisHCl pH 8:Methanol:B – Methanol:Ethylacetát o průtoku $1,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a teploty separace $25 \text{ }^\circ\text{C}$) a cukrů a kyselin (HPLC/ RI, $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 Hz; PDA, $\lambda = 210$ nm, RezexTM ROA-organic Acid H⁺ (8%), izokratická eluce mobilní fáze 5 mmol H₂SO₄ o průtoku $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a teploty separace $30 \text{ }^\circ\text{C}$).

Pomocí ICP-MS s kvadrupólovým analyzátozem byly stanoveny vybrané izotopy prvků po extraci vzorků pomocí MARS^[75].

Antimikrobiální účinek extraktů vůči testovacím mikroorganismům byl stanoven sérií standardních dilučních testů^[76]. Potenciální cytotoxický účinek na humánních buněčných liniích HaCat a Caco-2 byl stanoven pomocí MTT testu^[77] a LDH testu^[78].

3.4.3 Příprava částic s enkapsulovanou aktivní složkou a charakterizace

V práci byly připraveny liposomové a alginátové částice. Liposomové částice s lecithinem různého původu byly připraveny pomocí ultrazvukového homogenizátoru^[79] a alginátové částice pomocí enkapsulátoru BÜCHI zesílením v chloridu vápenatém^[80].

Analýza částic velikosti částic, polydispersity a elektrokinetické stability pomocí DLS

Distribuce velikostí částic, polydispersita a následně hodnota zeta potenciálu v suspenzních roztocích byla analyzována s využitím dynamického rozptylu světla^[79]. Účinnost enkapsulace aktivních látek byla stanovena spektrofotometricky podle stanovení fenolických sloučenin a antioxidačního účinku.

3.4.4 Probiotické bakterie

Nárůst buněčné kultury byl sledován změnou optické hustoty při 630 nm. Viabilita buněk byla ověřena kultivační metodou a zároveň pomocí průtokové cytometrie, kdy k vhodně naředěné suspenzi probiotických buněk bylo přidáno $5 \mu\text{l}$ roztoku propidiumjodidu o koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ při emisi o vlnové délce 615 nm.

3.4.5 Sledování změn viability a uvolňování aktivních látek v průběhu modelového trávení

Buněčné suspenze samotné nebo v kombinaci s extrakty s využitím technik enkapsulace byly podrobeny sledování stability v prostředí modelového trávení (30 minut, žaludeční šťáva^[81], pH $0,9$; 60 minut, směs pankreatické šťávy a žlučových kyselin^[81], pH $8-9$) a reálné potraviny o nízkém pH. Pro sledování vlivu na růst bakterií byla využita optická hustota při 630 nm, kultivační metody nebo průtoková cytometrie s propidiumjodidem.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 STANOVENÍ SELENENOMETABOLITŮ V REÁLNÝCH VZORCÍCH

Cílem úvodní části práce bylo stanovení koncentrace biogenního selenu vázaného v makrosloučeninách v reálných vzorcích získaných od 20 párů matka-dítě. Byly zkoumány 3 typy reálných vzorků, a to vzorek mateřského mléka odebraný do 48 hodin po porodu, žilní krevní vzorek od matky a dítěte odebraný ihned po jeho narození. Hlavním zkoumaným metabolitem byl tzv. selenoprotein P. Stanovení bylo provedeno pomocí optimalizované metody na sestavě 2D-SEC-SECxSEC-AF-ICP-MS a pro porovnání byla provedena enzymatická metoda pomocí ELISA kitu. Sledovanými sloučeninami byly především glutathionperoxidáza, selenoproteiny a selenoalbumin.

Relativní zastoupení selenu ve sledovaných sloučeninách v mateřském mléce bylo stanoveno v sestupném pořadí – nejvyšší zastoupení má glutathionperoxidáza ($25,6 \pm 6,3 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$), dále selenoprotein P ($18,8 \pm 5,1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$), selenocystamin ($10,1 \pm 3,2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$) a selenometabolity ($4,4 \pm 3,4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$). V krevním séru matky (MS) a dítěte (CS) byla relativní koncentrace selenu stanovena v následujícím sestupném pořadí – nejvyšší obsah vykazovaly selenoproteiny P (MS: $57,1 \pm 8,8 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, CS: $33,6 \pm 4,2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$), dále glutathionperoxidáza (MS: $12,6 \pm 1,5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, CS: $9,8 \pm 1,3 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$) spolu se selenoalbuminem (MS: $13,4 \pm 1,3 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, CS: $18,9 \pm 2,2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$) a nakonec selenometabolity (MS: $6,5 \pm 1,3 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, CS: $5,4 \pm 0,8 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$). Z výsledků lze říct, že zastoupení selenoproteinu P bylo v krevním séru matky nejvyšší, v porovnání s krevním sérem dítěte a mateřským mlékem. V mateřském krevním séru tak selenoprotein P představoval 64 % celkového zastoupení selenu, v pupečnickovém séru 50 % a v mateřském mléce pouze 32 %. Mateřské krevní sérum obecně vykazovalo vyšší koncentrace selenoproteinu P i glutathionperoxidázy nežli ve vzorcích pupečnickového séra.

Z výsledků tedy vyplývá, že mateřské mléko obsahuje vysoké koncentrace glutathionperoxidázy, které je dítětem v podobě stravy přijímáno v prvních dnech života. Naopak selenoprotein P byl ve vyšších koncentracích zastoupen v pupečnickovém krevním séru, a tudíž je jeho transfer pomocí kolostra nižší. Pomocí ELISA metody byla v mateřském mléce stanovena průměrná hodnota selenoproteinů na $405,3 \pm 129,6 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ a po přepočtení na množství selenu $5,61 \pm 1,80 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. Tato hodnota je třikrát menší, nežli hodnota získaná pomocí detektoru ICP-MS. Ve všech zkoumaných vzorcích se toto schéma potvrdilo a můžeme tvrdit, že pomocí ICP-MS došlo k získání přesnějších výsledků.

4.2 CHARAKTERIZACE ROSTLINNÉHO MATERIÁLU Z HLEDISKA OBSAHOVÝCH LÁTEK

V této části práce byly vybrány rostlinné vzorky pro návrh vlastního doplňku stravy s pozitivním vlivem na lidský organismus v kombinaci s dalšími látkami nebo případně na viabilitu probiotických bakterií.

4.2.1 Charakterizace z hlediska makronutrientů

V práci byly na základě screeningu trendů v oblasti výživy vybrány skupiny rostlinných materiálů nejprve k analýzám důležitých makronutrientů (3.3.2). Vzorky byly charakterizovány z hlediska obsahu sacharidů, hrubé bílkoviny a zastoupení mastných kyselin.

Z naměřených hodnot stanovení celkových sacharidů, redukujících sacharidů a nerozpustné vlákniny bylo zřejmé, že vzorky chia vlákniny a jakon sirupu obsahují největší množství ve vodě

rozpuštěných sacharidů s hodnotami nad 400 mg·g⁻¹. U vzorku jakon sirupu byl také stanoven vysoký obsah redukujících cukrů, a to 232,6 ± 0,14 mg·g⁻¹. Vzorek arame obsahoval nejvíce celkových sacharidů (319,3 ± 15,4 mg·g⁻¹), redukujících sacharidů (245,80 ± 7,80 mg·g⁻¹) a zároveň i nerozpustné vlákniny (640,0 ± 25,3 mg·g⁻¹). Pomocí metody HPLC bylo u vzorky arame stanoveno i největší množství glukózy a fruktózy (21,03 mg·g⁻¹) v porovnání s inulinem (26,48 mg·g⁻¹). Ve vzorku wakame bylo naopak stanoveno největší množství sacharózy (97,02 mg·g⁻¹). Celkově lze říci, že vzorky mořských makrořas obsahují velké množství nerozpustné vlákniny významné pro organismus. Podobné výsledky byly pozorovány i u rostlinných prášků. U všech se hodnoty nerozpustné vlákniny pohybovaly kolem 200 mg·g⁻¹. Vysoká hodnota je dána nejspíše zdrojem samotného prášku, který je získán mletím zelených listů rostlin. Z této skupiny nejvyšší hodnoty všech sledovaných sacharidů vykazovala matcha a mladý ječmen, ve kterých bylo pomocí HPLC stanoveno i větší množství sacharózy kolem 30 mg·g⁻¹, ve vzorcích rostlinných prášků se vyskytla i arabinóza, která je součástí hemicelulóz. Význam analýzy zastoupení sacharidů a nerozpustné vlákniny je v této práci ten, že slouží jako zdroj energie nejen pro konzumenta, ale zvláště pro mikrobiom tlustého střeva.

Z výsledků stanovení celkového dusíku vyplývalo, že z každé skupiny testovaných vzorků lze vybrat minimálně dva vzorky s dostatečným obsahem bílkovin (hmotnostní koncentrace hrubé bílkoviny kolem 13 %), jehož množství je porovnatelné s množstvím nacházející se například v mouce nebo rýži [82], [83].

Tabulka 4 Srovnání zastoupení mastných kyselin olejů získaných pomocí extrakce a lisování za studena

Vzorky		Mastné kyseliny	SFA	MUFA	PUFA
		c [mg·g ⁻¹]	w [%]	w [%]	w [%]
extrakce Soxthermem	konopné semínko	720,04 ± 21,80	8,46 ± 1,45	9,62 ± 1,98	81,92 ± 8,14
	lněné semínko	713,82 ± 12,15	10,47 ± 0,36	15,05 ± 0,10	74,48 ± 6,15
	vlašský ořech	819,30 ± 14,04	9,04 ± 0,18	12,45 ± 0,25	78,51 ± 5,92
	dýňová semínka	280,59 ± 11,91	18,35 ± 2,25	36,79 ± 3,32	44,86 ± 2,45
	sezamová semínka	23,89 ± 8,70	22,22 ± 2,27	33,76 ± 3,42	44,03 ± 3,07
	kmín římský	12,60 ± 2,55	24,88 ± 1,82	0,00 ± 0,12	75,12 ± 10,14
lisování za studena	konopné semínko	291,04 ± 2,80	9,23 ± 0,47	14,01 ± 0,30	76,76 ± 4,21
	lněné semínko	587,50 ± 8,16	9,79 ± 0,25	19,92 ± 0,10	70,30 ± 6,23
	vlašský ořech	326,91 ± 14,04	9,61 ± 1,01	12,75 ± 0,25	77,64 ± 3,02
	dýňová semínka	–	–	–	–
	sezamová semínka	837,98 ± 3,79	16,13 ± 1,27	41,19 ± 3,02	42,69 ± 2,12
	kmín římský	572,19 ± 0,55	6,77 ± 1,40	54,73 ± 0,12	38,51 ± 5,70

Pomocí přístroje Soxtherm a GRAS rozpouštědla, hexanu, bylo z chlorelly a spiruliny ze skupiny řas a sinic extrahováno nejvíce mastných kyselin. V oleji chlorelly bylo stanoveno až 158,65 ± 7,54 mg·g⁻¹. Z tohoto množství mastných kyselin měly polynenasycené mastné kyseliny největší zastoupení, a to až 56,69 ± 3,88 %. Za zmínku stojí, že z této skupiny mastných kyselin byla detekována například esenciální kyselina linolová (41,0 μg·ml⁻¹) a α-linolenová (55,6 μg·ml⁻¹). Kromě polynenasycených mastných kyselin se ve velkém množství stanovily i nasycené a

mononenasyčené mastné kyseliny, kyselina palmitová, stearová a olejová ($51,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $23,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $5,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). U vzorku spiruliny byla navíc stanovena α -linolenová i γ -linolenová kyselina ($7,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $49,7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). I u vzorku matcha měly polynenasycené mastné kyseliny největší zastoupení, a to až $70,97 \pm 7,64 \%$. Koncentrace kyseliny linolové ($13,95 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a α -linolenové ($54,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byly opět nejvyšší.

Získané oleje izolované ze semínek a ořechů pomocí extrakce hexanem a lisováním za studena byly porovnány v rámci zastoupení mastných kyselin (Tabulka 4). Významný rozdíl byl pozorován u stanovených polynenasycených mastných kyselin u vylisovaných olejů z konopného, lněného semínka a ořechů, kdy bylo stanoveno i malé množství kyseliny arachidonové (ARA) a eikosapentaenové (EPA), které se účastní mnoha biochemických mechanismů v těle, jako je genová exprese nebo mediátor syntézy lipidů. Obecně hrají polynenasycené mastné kyseliny důležitou roli v lidské výživě, kdy podporují biologickou, fyziologickou aktivitu jedince a přináší mnoho dalších zdravotních výhod ^{[84],[85]}.

4.2.2 Charakterizace z hlediska obsahu biologicky významných látek

V této části práce byla pozornost zaměřena na stanovení obsahu vybraných biologicky aktivních látek, jako jsou například celkové fruktany, β -glukany, rostlinná barviva, antioxidační a antimikrobiální aktivita. Skupiny vzorků řas a sinice a rostlinných prášku, které byly analyzovány z nutričního hlediska, byly analyzovány i v této části.

4.2.3 Stanovení vybraných sacharidových skupin

Vzorek inulinu, který je zástupcem rozpustné vlákniny složený z jednotek fruktooligosacharidů vykazovala nejvyšší obsah fruktanů, a to $749,938 \pm 3,071 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Tento vzorek můžeme v našem případě brát jako referenční vůči ostatním zkoumaným vzorkům. U vzorků mladého ječmenu a matcha byl naměřen vysoký obsah, a to nad $100 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Tyto látky tak mají potenciál zastoupit inulin, který se běžně využívá jako prebiotikum. V kombinaci s probiotiky slouží jako substrát a dostupný zdroj živit pro růst probiotických bakterií, které je jsou schopny fermentovat v tlustém střevě za vzniku kyselin s krátkým řetězcem ^{[86],[87]}.

U vzorků byl navíc stanoven obsah β -glukanů, u kterých byl rovněž potvrzen pozitivní vliv na lidské zdraví ^[88]. Nejvyšší obsah byl stanoven u vzorku arame ($245,80 \pm 7,80 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) a poté u hijiki a kombu, kde se hodnota pohybuje kolem $12\text{--}16 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Přítomnost β -glukanů ve výživě je výhodná v mnoha směrech. Tyto látky ovlivňují hodnotu cholesterolu a hodnotu glukózy v krvi po jídle. Pro snížení hodnoty cholesterolu v krvi se doporučuje denní dávka příjmu β -glukanů až 3 g. Detailnější mechanismus účinku ovšem nebyl objasněn ^[88].

4.2.4 Stanovení celkových fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivity

Pro využití rostlinných extraktů s obsahem biologicky aktivních látek v dětské výživě byla pozornost věnována extrakcím pomocí GRAS rozpouštědel, konkrétně destilovanou vodou, ethanolovým roztokem a hexanem. V rámci ethanolových extrakcí byl sledován obsah sledovaných látek v rámci koncentrační řady ethanolu, kdy byl roztoku 20% ethanolu zvolen jako nejúčinnější, a proto byl v rámci disertační práce využit. Vzorky vybrané na základě potenciálních antioxidačních a antimikrobiálních účinků. Jednalo se o vzorky řas a sinic, rostlinných prášků a semínek a ořechů (3.3).

Polární extrakty – Vodné a ethanolové extrakty

Z hlediska obsahu celkových fenolických látek byly vzorky rostlinných prášků extrahované destilovanou vodou vyhodnoceny jako nejbohatší (Tabulka 5). Nejvyšší hodnoty fenolických látek vykazovala spirulina $64,01 \pm 6,07 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ a matcha $54,50 \pm 2,50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Vysoký obsah fenolických látek měl vliv i na hodnoty antioxidační aktivity, kdy v případě vzorku matcha byla stanovena až na hodnotu $100,52 \pm 1,32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

Tabulka 5 Charakterizace rostlinných extraktů z hlediska obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity

Rostlinný extrakt		Fenolické látky	Flavonoidy	Antioxidační aktivita	
		c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]	
H ₂ O	řasy a sinice	chlorella	$17,86 \pm 0,36$	$7,82 \pm 0,03$	$44,19 \pm 0,91$
		spirulina	$64,01 \pm 6,07$	$23,30 \pm 0,87$	$56,69 \pm 1,52$
		arame	$22,90 \pm 0,50$	$6,29 \pm 0,03$	$27,06 \pm 0,80$
		wakame	$2,17 \pm 0,00$	$3,81 \pm 0,83$	$17,86 \pm 2,72$
		hijiki	$4,32 \pm 0,86$	$2,95 \pm 0,65$	$25,97 \pm 3,66$
		kombu	$7,37 \pm 0,09$	$3,08 \pm 1,06$	$0,84 \pm 0,04$
EtOH	řasy a sinice	chlorella	$10,18 \pm 0,10$	$6,64 \pm 0,20$	$2,97 \pm 1,52$
		spirulina	$41,77 \pm 1,43$	$18,26 \pm 0,55$	$52,12 \pm 1,52$
		arame	$34,77 \pm 0,50$	$8,96 \pm 0,46$	$36,39 \pm 4,02$
		wakame	$0,68 \pm 0,10$	$3,97 \pm 0,10$	$28,55 \pm 2,96$
		hijiki	$2,70 \pm 0,64$	$2,06 \pm 0,43$	$29,20 \pm 1,16$
		kombu	$7,25 \pm 0,04$	$0,93 \pm 0,15$	$2,00 \pm 0,56$
H ₂ O	rostlinné prášky	matcha	$54,50 \pm 2,50$	$3,87 \pm 0,14$	$99,71 \pm 0,17$
		moringa	$20,64 \pm 1,02$	$0,97 \pm 0,03$	$22,57 \pm 0,87$
		mladá pšenice	$6,46 \pm 0,65$	$1,17 \pm 0,03$	$14,05 \pm 2,15$
		mladý ječmen	$5,41 \pm 0,21$	$0,47 \pm 0,07$	$12,84 \pm 1,30$
EtOH	rostlinné prášky	matcha	$24,05 \pm 0,68$	$14,53 \pm 0,10$	$100,52 \pm 1,32$
		moringa	$25,30 \pm 0,61$	$2,99 \pm 0,61$	$52,12 \pm 0,71$
		mladá pšenice	$5,39 \pm 1,50$	$1,34 \pm 0,08$	$36,39 \pm 0,18$
		mladý ječmen	$5,92 \pm 0,10$	$0,92 \pm 0,06$	$28,55 \pm 1,55$

V rámci extrakce byly zvoleny pouze GRAS rozpouštědla, jelikož použití jiných (potenciálně toxických) organických rozpouštědel nevyhovuje legislativním stanovám^[89], a proto nedocházelo k vyšší extrakční účinnosti fenolických látek polárními rozpouštědly. Připravené extrakty tak mohou být po lyofilizaci ve formě prášku využity do doplňků stravy určených dětem, a to bez dalších úprav.

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV-VIS detektorem byla u vybraných vzorků sledována přítomnost některých individuálních fenolických látek. Kyselina gallová byla identifikována ve všech extraktech, nejvyšší koncentrace byla stanovena u vzorků chlorelly ($5,9 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ve vodném extraktu a $5,0 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ u ethanolových extraktů). Dále byla u řas a sinic identifikována kyselina chlorogenová s obsahem kolem $0,5 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Ve vzorcích mladé pšenice a matcha bylo identifikováno nejvíce druhů i nejvyšší množství sledovaných

fenolických látek. Obecně výsledky korespondovaly se spektrofotometrickou metodou, kdy největší koncentrace fenolických látek byly naměřeny ve vodných extraktech. Kromě kyseliny gallové byl identifikován i rutin, saponarin nebo kyselina sinapová a ferulová. U vzorku matcha jako jediného vzorku byla stanovena i hodnota kofeinu, a to $5,8 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Denní příjem kofeinu do $2,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ u dětí zvyšuje jejich pozornost a kognitivní vnímání. Vyšší hodnoty by ovšem vykazovaly spíše negativní účinky v podobě hyperaktivity^[90].

Ve vzorcích olejů byly obecně stanoveny nízké koncentrace fenolických látek a zároveň i vykazovaly poměrně nízkou antioxidační aktivitu. Nejvyšší obsah fenolických látek ze skupiny řas a sinice byl stanoven u oleje z chlorelly ($10,21 \pm 0,33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), ze skupiny rostlinných prášků u vzorků matcha a pšenice (kolem $14 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) a ze skupiny semínek u lněného semínka ($14,15 \pm 0,65 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$).

4.2.5 Stanovení vybraných rostlinných barviv

V téměř všech testovaných vzorcích převládá zastoupení chlorofylu a nad chlorofylem *b*, kdy nejvyšší hodnoty byly stanoveny u chlorelly ($1\,876 \pm 60 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) a spiruliny ($1\,180 \pm 18 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). U těchto vzorků bylo vypočteno i vysoké množství celkových karotenoidů, a to nad $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. U vzorků rostlinných prášků byl nejvyšší obsah chlorofylů stanoven u vzorku matcha. Hodnoty celkových karotenoidů u všech vzorků rostlinných prášků se od sebe výrazně nelišily.

Pomocí metody HPLC byly provedeny extrakce pomocí 3 druhů rozpouštědel. Extrakce dle Folche byla zvolena jako nejúčinnější, jelikož využívá organických rozpouštědel, a to chloroformu a methanolu, které jsou vůči rostlinným membránám efektivnější. Proto byly zjištěné koncentrace barviv vyšší nežli při stanovení spektrofotometrickou metodou. Nejvyšší obsah chlorofylů byl naměřen u chlorelly ($29,53 \pm 1,32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) a spiruliny ($7,02 \pm 0,97 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Obsah samotného β -karotenu byl i u těchto vzorků nejvyšší, a to $9,21 \pm 1,70 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ u chlorelly a $3,52 \pm 0,99 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ u spiruliny. U všech vzorků řas byl navíc identifikován i lutein pohybující se převážně do $30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, jen u vzorku chlorelly se pohybovala hodnota až nad $900 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. U vzorků rostlinných prášků bylo pomocí extrakce dle Folche extrahováno a stanoveno nejvíce celkových karotenoidů u vzorku moringy ($3,49 \pm 0,87 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) a vzorku matcha ($1,60 \pm 1,07 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). V těchto vzorcích se navíc identifikoval i lykopen o podobné koncentraci. Dále se ve vzorcích stanovil i v malém množství lutein a ubichinon ($20\text{--}300 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$).

U vzorků rostlinného prášku byla barviva extrahována také pomocí hexanu a ethanolu, jakožto GRAS rozpouštědly, a obsah byl stanoven pomocí HPLC dle stejných podmínek analýzy. Extrakce barviv nebyla tak účinná jako v případě extrakce podle Folche. Extrakcí hexanem se ale povedla extrakce stejných látek – β -karotenu, luteinu a ubichinonu. Koncentrace všech látek ale byla 2krát až 10krát nižší. Extrakce ethanolom byla účinná ve větší míře jen v rámci chlorofylu a celkových karotenoidů, kdy převládajícím karotenoidem byl i v tomto případě β -karoten.

4.2.6 Prvková analýza řas a sinic

U vzorků řas a sinic, u kterých se potenciálně mohou kumulovat potravinové kontaminanty^{[91],[92]}, byla provedena prvková analýza. Ve volné přírodě dochází k samovolné kumulaci těchto kovů v rostlinném materiálu, jako například kadmia, hliníku nebo olova, která patří mezi potravinové kontaminanty s potenciální toxicitou již při malých koncentracích. Regulace Evropské komise v rámci legislativy (č. 629/2008, č.488/2014) nastavila pouze maximální hodnoty koncentrace kadmia ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) v různých potravinových doplňcích obsahujících mořské řasy. Pro hliník a olovo nebyly evropskou legislativou nastaveny limitní koncentrace, ale průměrné hodnoty olova v analyzovaných

vzorcích mořských řas doposud nepřekročily hodnoty $0,05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [91],[92]. Naměřené hodnoty vzorků zahrnuté v této kapitole nevykazovaly překročení hranice $0,05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, s výjimkou železa u vzorku chlorelly, a to $1\,421,05 \pm 17,32 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. Obecně u všech vzorků vykazovalo množství železa nejvyšší obsah.

4.2.7 Antimikrobiální vlastnosti vybraných extraktů

Pomocí diluční bujónové metody byla ověřována antimikrobiální aktivita vybraných rostlinných vzorků. Většina extraktů řas a sinice vykazovaly téměř nulovou inhibici růstu u všech testovaných zástupců grampozitivních a gramnegativních mikroorganismů. Výjimku tvořily ethanolové extrakty kombu, wakame a arame, které vykazovaly antimikrobiální účinek vůči *S. epidermidis*, ale pouze do 20 % inhibice. Výrazný antimikrobiální účinek u všech testovaných kmenů vykazovaly extrakty vodné i ethanolové vzorku spiruliny. Ethanolové extrakty spiruliny (o koncentraci $25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), vykazovaly navíc u kmenů *E. coli* a *S. epidermidis* vykazovaly i minimální inhibiční koncentraci, kdy z 99 % nedošlo k nárůstu buněk po dobu 24hodinové inkubace. Jednou z možností, jak zvýšit antimikrobiální účinek testovaných extraktů, by bylo jejich zakoncentrování, například sušením pomocí lyofilizace.

4.2.8 Testy cytotoxicity

V rámci této kapitoly byly vybrané vodné extrakty rostlinných prášků a řas a sinic s ohledem na obsah fenolických látek analyzovány z hlediska jejich vlivu na metabolickou aktivitu lidských buněčných linií. Byly vybrány dva typy buněčných linií, a to lidské keratinocyty HaCat a buňky adenokarcinomu tlustého střeva Caco-2.

Porovnání cytotoxicity vzorků řas a sinice

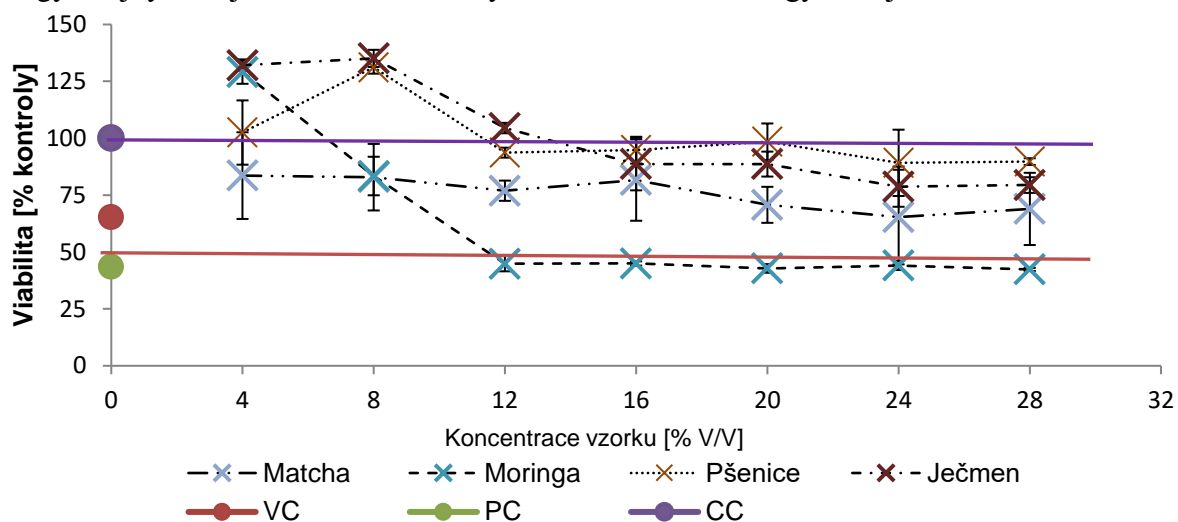
U obou buněčných linií nedošlo po expozici extraktů řas a sinic k významnému vlivu na metabolickou aktivitu v porovnání s kontrolou. U nižších objemových koncentrací testovaných extraktů, a to především u chlorelly, spiruliny a wakame v médiu, byla navíc pozorována podpora metabolické aktivity buněk. Nejvýrazněji u extraktů spiruliny od objemové koncentrace 4 % do 16 %. S rostoucí koncentrací extraktů ovšem viabilita buněk klesala v porovnání s buněčnou kontrolou. U buněčné linie HaCaT bylo pozorováno snížení viability k hranici 60 % u nejvyšších objemových koncentrací extraktů chlorelly, spiruliny a wakame. I přes snížení viability buněk nedošlo k překročení hranice 50 %, která odpovídá cytotoxickému účinku. U buněčné linie Caco-2 došlo ke snížení viability buněk, avšak ne tak výrazně jako tomu bylo u linie HaCat. Viabilita se držela nad hranicí 70 %, přičemž v celé koncentrační řadě se hodnoty viability pohybovaly v podobných hodnotách jako kontrola buněk. V obou případech se kontrola rozpouštědla pohybovala okolo 65 %. Lze tedy konstatovat, že ovlivnění viability mohlo být způsobeno především zvyšujícím se množstvím rozpouštědla v médiu, které bylo v kontaktu s buňkami za kultivačních podmínek po dobu 24 hodin. Všechny testované vzorky lze pomocí MTT testu na dvou buněčných liniích považovat za bezpečné a lze je tedy považovat za vhodné jak do kosmetických přípravků, tak do potravinových doplňků.

Porovnání cytotoxicity vzorků rostlinných prášků

Připravené extrakty byly opět testovány na buněčných liniích HaCaT a Caco-2. Testování na buněčné linii HaCat prokázalo, že vzorky nepůsobily toxicky až na výjimku vzorku moringy, který od objemové koncentrace 12 % překročil a pohyboval se na hranici 50 % viability buněk v

porovnání s kontrolou (Obrázek 2). Ve více studiích byl potvrzen vliv extraktů moringy na metabolickou aktivitu lidských buněk, a to i u jiných typů buněk. Navíc podporuje i jejich apoptózu [93], [94]. Vzorky ječmene a pšenice nesnižovaly viabilitu buněk v celé koncentrační zkoumané řadě, naopak ji v koncentracích 4 a 8 % podporovaly a zvyšovaly.

Podobný trend byl pozorován po expozici vzorků na buněčné linii Caco-2 byla pozorována snižující se viabilita buněk se zvyšující se objemovou koncentrací vzorků u ječmene, matcha a moringy. Nejvýraznější vliv na aktivitu vykazoval extrakt moringy, a to již od koncentrace 16 %.



Obrázek 2 Viabilita HaCaT buněk po expozici vodnými sterilními rostlinnými prášky na pasáží 17 stanovení pomocí MTT

Pro doplnění a srovnání toxického účinku vodných extraktů rostlinných prášků matcha, moringa a ječmen na buněčnou linii Caco-2, u kterých byl pozorován toxický účinek od koncentrace 12 % a výše pomocí MTT testu, byl využit další typ testu, tzv. LDH test (laktátdehydrogenázový test). Tento test se také využívá pro kontrolu toxického účinku zkoumaných extraktů. LDH test mohl být proveden pouze pro testování na buněčné linii HaCat, u které tak byla sledována intaktnost plazmatické membrány. Z výsledků LDH testu vyplývá, že výsledné hodnoty aktivity enzymu u žádného ze vzorků nepřekročily hodnoty kontroly rozpouštědla ani pozitivní kontroly. Z toho lze usoudit, že negativní vliv na intaktnost membrány nevykazoval ani jeden zkoumaný vzorek. Zvolené objemové koncentrace testovaných extraktů tak lze považovat za bezpečné.

4.3 ENKAPSULACE VYBRANÝCH EXTRAKTŮ DO LIPOSOMŮ

Pro zvýšení stability a cílený transport látek byla vybrána technika enkapsulace v podobě liposomů připravených pomocí ultrazvukové homogenizace. V této kapitole byly sledovány fyzikálně-chemické vlastnosti připravených liposomů.

Extrakt obsahující fenolické látky a antioxidanty, které mohou potenciálně ovlivňovat nejen lidský organismus, ale i střevní mikroflóru, byly enkapsulovány do liposomů z lecithinu různého původu, a to kromě sójového, tak slunečnicového a vaječného. Toto srovnání bylo cíleno na porovnání těchto liposomů z hlediska fyzikálně-chemických vlastností a využití liposomů pro cílený transport aktivních látek do tlustého střeva.

4.3.1 Enkapsulace vodných extraktů rostlinných prášků do liposomů s různým lecithinem

Vodné extrakty obsahující biologicky aktivní látky rostlinných prášků byly enkapsulovány do liposomů za účelem stabilizace a prodloužení účinku.

Průměrná velikost částic se pohybovala převážně v rozmezí 207–310 nm, s výjimkou moringy a zeleného ječmene enkapsulovaných do liposomů s vaječným lecithinem. Obecně lze konstatovat, že liposomy složené ze sójového a slunečnicového lecithinu vykazovaly nižší distribuci velikosti částic nežli liposomy obsahující vaječný lecithin. U obou vzorků moringy a ječmene enkapsulovaných do liposomů z vaječného liposomu byla naměřena také vyšší polydisperzita, ale stále pod hranicí 0,7. Pravděpodobně mohlo docházet k agregaci částic, které ale mohou být stále brány jako relativně uniformní.

Kromě velikosti a polydisperzity byla u částic zkoumána i dlouhodobá stabilita měřením zetapotenciálu a enkapsulační účinnost. Nejstabilnějšími částicemi v čase 0 byly vyhodnoceny liposomy ze slunečnicového lecithinu, jelikož jako jediné překročily hranici nestability -30 mV, a to na hodnotu $-37,2 \pm 4,3$ mV. Hodnotu nestability nepřekročila ani po prvním týdnu skladování s hodnotou zeta potenciálu $-31,8 \pm 0,9$ mV. Z výsledků lze však vyvodit, že přídavek aktivních látek má na liposomy stabilizační vliv. Enkapsulováním extraktů s aktivními látkami došlo ke stabilizaci částic nejen v čase 0, ale i v rámci celého časového úseku skladování. Extrakty ječmene, pšenice a matcha nejvíce podpořily stabilitu připravených liposomů obsahujících slunečnicový nebo sójový lecithin. Všechny tyto zmíněné liposomy vykazovaly zeta potenciál nižší jak -35 mV, liposomy s enkapsulovaným extraktem ječmene dokonce po třech měsících dosáhly hodnoty zeta potenciálu $-44,7 \pm 0,79$ mV.

Výsledky enkapsulační účinnosti jednotlivých liposomů s enkapsulovanými vodnými extrakty potvrzují průběh stabilizace liposomů, kdy došlo ke zvýšení enkapsulační účinnosti fenolických sloučenin, která se po celou dobu držela nad hodnotami 75 %. Vzorek matcha vykazoval nejvyšší enkapsulační účinnost, a to u všech liposomů různých typů s hodnotou nad 93 %.

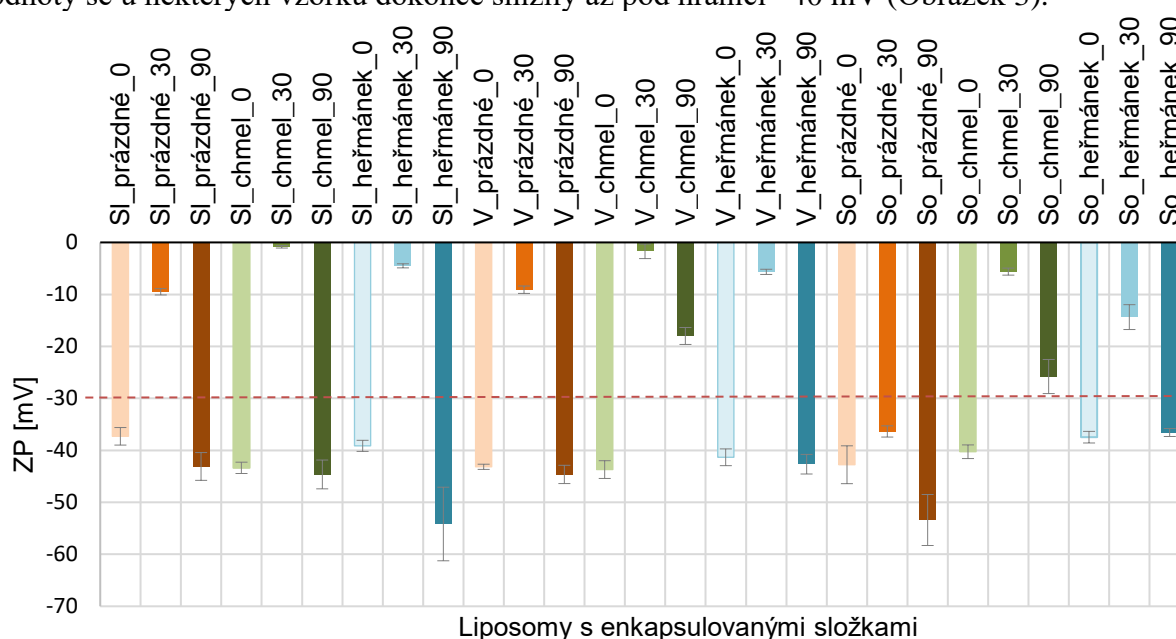
Z výsledků dlouhodobé stability liposomů skládající se z tří různých typů lecithinu lze vyvodit, že liposomy z vaječného lecithinu v kombinaci s enkapsulovanými vodnými extrakty rostlinných prášků nevykazovaly tak vysokou stabilitu a uniformnost částic jako u lecithinu ze sóje nebo slunečnice. Významnou roli hraje přesná struktura a čistota lecithinu, který byl extrahován z příslušných zdrojů. Nevýhodou vaječného lecithinu je také jeho živočišný původ a produkty obsahující právě vaječný lecithin by tak nemohly dostat označení „vegan“^{[95],[96]}. Sójový a slunečnicový lecithin je tedy vhodnou složkou pro přípravu liposomů vykazující dobrou stabilitu a uniformnost.

4.3.2 Stabilita liposomů připravených z lecithinu různého původu v průběhu modelového trávení

Vliv působení trávicích šťáv na fyzikálně-chemické vlastnosti připravených liposomů s extrakty s antimikrobiálním účinkem pro cílené působení v tlustém střevě proti nežádoucím bakteriím byly studovány v této části práce. Extrakty heřmánku a chmele byly nejprve enkapsulovány do liposomů složených z lecithinu různého původu a cholesterolu. Kromě základních charakteristik částic a dlouhodobé stability ve vodném prostředí byla sledována jejich stabilita v průběhu modelového trávení.

I u těchto vzorků extraktů bylo u liposomů z vaječného lecithinu naměřená nejvyšší velikost, u vzorku heřmánku až $852,00 \pm 12,14$ nm. Tyto poměrně velké částice ale vykazovaly uniformitu, jelikož polydisperzita nepřekročila hodnotu 0,7. Připravené liposomy ze sójového a slunečnicového lecithinu byly v rámci těchto sledovaných fyzikálních charakteristik velmi podobné.

Všechny liposomy po přípravě byly stabilní a s velmi nízkými hodnotami zeta potenciálu kolem -40 mV. Po inkubaci v žaludeční šťávě došlo k destabilizaci liposomů, jejich zeta potenciál se zvýšil k nulovým hodnotám. Destabilizace je dána interním pH-gradientem liposomů, který se odvíjí od pH prostředí. S nižší hodnotou pH dochází zároveň k rychlejší hydrolyze lipidů obsažených v membránové dvojvrstvě liposomů [97],[98]. Nejméně stabilními liposomy v prostředí pH 0,9 se jevíly částice s enkapsulovanými chmelem, konkrétně slunečnicové. Po inkubaci a ukončeném modelovém trávení, kdy se pH pohybovalo v rozmezí 7,5–8 (jako ve střevní šťávě), došlo k opětovné stabilizaci částic a snížení hodnoty zeta potenciálu opět pod hranici nestability -30 mV. Hodnoty se u některých vzorků dokonce snížily až pod hranici -40 mV (Obrázek 3).



Obrázek 3 Stabilita připravených liposomů s lecithinem z různých zdrojů a enkapsulovaným rostlinným vodným extraktem za modelových podmínek enzymového trávení

Z výsledků enkapsulační účinnosti vyplývá, že i přes opětovnou stabilizaci liposomů po přidání směsi pankreatické šťávy se žlučovými kyselinami a zvýšení pH, nedošlo k opětovné enkapsulaci aktivních látek. V nízkém pH došlo k částečné difúzi aktivních látek do prostředí modelových šťáv, které se projevilo na snížení enkapsulační účinnosti ve všech případech o více než 50 %. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla pozorována u liposomů ze slunečnicového lecithinu u obou testovaných extraktů (kolem 50 % v rámci fenolických látek i antioxidační aktivity).

4.4 PROBIOTICKÉ BAKTERIE

V této kapitole byla sledována viabilita vybraných probiotických bakterií v prostředí o různém pH anebo s vybranými rostlinnými extrakty. Zároveň byly testovány i možnosti enkapsulace probiotik. Povaha rostlinných vzorků může přímo pozitivně ovlivňovat organismus dítěte, ale také nepřímo právě prostřednictvím probiotických bakterií vyskytujících se přirozeně v tlustém střevě.

Nakultivované buňky bakterií byly ve své exponenciální fázi podrobeny modelovému trávení (Tabulka 6). Z výsledků je patrné, že viabilita těchto vybraných kmenů byla před začátkem trávení velmi vysoká, pohybující se nad koncentrací buněk $1 \cdot 10^9$ CFU·ml⁻¹. Největší vliv modelového trávení, a tedy vliv pH a enzymů, byla zaznamenána u *L. delbrueckii* a celkově u rodu *Bifidobacterium*. Pozitivním výsledkem ovšem bylo snížení viability maximálně do 45 %. U těchto kmenů tak byla potvrzena schopnost překonat do určité míry nepříznivé podmínky prostředí, zejména žaludečních šťáv. Dalším záměrem této části práce bylo nalézt vhodný zdroj prebiotika a techniky enkapsulace k podpoře viability po modelovém trávení.

Tabulka 6 Sledování viability probiotických bakterií před a po modelovém trávení

Kmen		t ₀ min [CFU·ml ⁻¹]	t ₉₀ min [CFU·ml ⁻¹]	Rozdíl [%]
L.	<i>casei</i>	$4,25 \cdot 10^9 \pm 2,28 \cdot 10^8$	$4,04 \cdot 10^9 \pm 2,38 \cdot 10^8$	4,84
	<i>acidophilus</i>	$4,05 \cdot 10^9 \pm 1,14 \cdot 10^8$	$3,83 \cdot 10^9 \pm 2,49 \cdot 10^8$	5,44
	<i>plantarum</i>	$5,20 \cdot 10^9 \pm 2,13 \cdot 10^8$	$2,87 \cdot 10^9 \pm 1,38 \cdot 10^8$	44,79
	<i>delbrueckii</i>	$3,21 \cdot 10^9 \pm 2,02 \cdot 10^8$	$2,86 \cdot 10^9 \pm 1,67 \cdot 10^8$	10,89
B.	<i>breve</i>	$4,61 \cdot 10^9 \pm 2,13 \cdot 10^8$	$3,08 \cdot 10^9 \pm 1,86 \cdot 10^8$	33,07
	<i>bifidum</i>	$5,22 \cdot 10^9 \pm 2,04 \cdot 10^8$	$2,80 \cdot 10^9 \pm 1,40 \cdot 10^8$	34,47
	<i>longum</i>	$3,94 \cdot 10^9 \pm 2,27 \cdot 10^8$	$1,30 \cdot 10^9 \pm 2,04 \cdot 10^8$	20,04

U kmenů rodu *Lactobacillus* byl také proveden pokus schopnosti přežití v reálné potravíně o nízkém pH. Jako modelová potravina byla vybrána šťáva z kysaného zelí o pH 3,47. Zelná šťáva byla před zaočkováním podrobena pasteraci při teplotě 90 °C po dobu 30 sekund. Tento pasterační krok měl poměrně malý vliv na aktivní látky obsažené v zelné šťávě a je v souladu s vyhláškou č. 397/2021 Sb., která označuje zeleninový výrobek s nálevem v neprodyšně uzavřeném obale s pH nižším jak 4 za pasterovaný po prohřátí obsahu na 80 až 90 °C [99].

Do vzorku zelné šťávy byla zaočkována koncentrace buněk $1 \cdot 10^5$ CFU·ml⁻¹ vybraných druhů laktobacilů. Nejprve byl růst buněk sledován pomocí optické hustoty po dobu 24 hodin v časovém rozmezí 30 minut, kdy buňky jednotlivých kmenů nepřekročily svou lag fázi a experiment byl prodloužen na 2 týdny s odběry po 1. a 2. týdnu. Na konci 2. týdne byl proveden odběr a pomocí průtokové cytometrie byl zjištěn počet buněk a viabilita.

Tabulka 7 Buněčná viabilní koncentrace v zelné šťávě v průběhu 2 týdnů

Kmen		1. týden [CFU·ml ⁻¹]	2. týden [CFU·ml ⁻¹]
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i> (LC)	$6,68 \cdot 10^6 \pm 3,23 \cdot 10^5$	$3,75 \cdot 10^5 \pm 1,19 \cdot 10^4$
	<i>acidophilus</i> (LA)	$3,05 \cdot 10^7 \pm 1,47 \cdot 10^6$	$3,28 \cdot 10^6 \pm 3,23 \cdot 10^5$
	<i>plantarum</i> (LP)	$1,68 \cdot 10^7 \pm 1,05 \cdot 10^6$	$8,47 \cdot 10^6 \pm 2,51 \cdot 10^5$
	<i>delbrueckii</i> (LD)	$3,05 \cdot 10^7 \pm 1,19 \cdot 10^6$	$7,55 \cdot 10^6 \pm 4,25 \cdot 10^5$

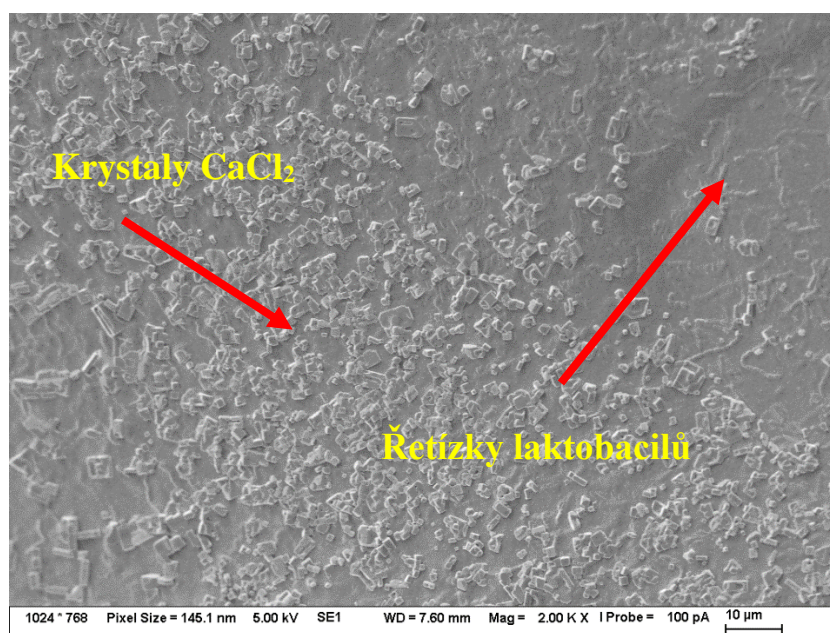
Většina vybraných druhů rodu *Lactobacillus* byla schopna přežít v reálném vzorku zelné šťávy o velmi nízké hodnotě pH, avšak s nízkou viabilitou (Tabulka 7). Viability jednotlivých kmenů nepřekročily hodnotu 15 %, ale svým počtem se životaschopné bakterie pohybovaly nad hodnotu

$1 \cdot 10^6$ CFU·ml⁻¹, s výjimkou *L. casei*, jehož viabilita klesla pod 1 % po dvou týdnech od zaočkování. Produkty, ve kterých jsou obsaženy zdravé prospěšné bakterie, musí obsahovat 10^6 – 10^8 CFU·ml⁻¹ těchto bakterií do konce expirační doby [100]. Tento fakt nebyl pozorován pouze u *L. casei* po dvou týdnech v zelné šťávě. U *L. plantarum* byla stanovena nejvyšší viabilita po 2 týdnech, a to 16,87 %. U tohoto vzorku bylo navíc zaznamenáno zajímavé zvýšení redukujících cukrů. Zvýšení koncentrace mohla nastat štěpením větších sacharidových jednotek v rámci fermentace touto bakterií. Zároveň došlo i ke zvýšení množství kyseliny mléčné a kyseliny octové (obě o necelých 10 mg·ml⁻¹), čímž se pH vzorku pohybovalo kolem 3,37. I pomocí těchto výsledků byla potvrzena nízká životaschopnost *L. casei* a jeho nízká schopnost přežít v kyselém prostředí s hodnotou pH pod 4.

4.4.1 Enkapsulace probiotických bakterií do alginátových částic

L. acidophilus byl vybrán pro enkapsulaci do alginátových částic připravených enkapsulátorem s tryskou o průměru 400 μm. Po zesíťování alginátových částic byl ve vytvrzovacím roztoku stanoven zbylý neenkapsulovaný počet bakteriálních buněk. Díky disperzi buněk v celém alginátovém roztoku a následnému zesíťování ve vytvrzovacím roztoku došlo k 100% enkapsulaci probiotických buněk. Následně byly připravené částice lyofilizovány (Obrázek 4).

U vzorků nakultivovaných probiotických buněk s přídavkem potenciálního prebiotika, a následné použité technice enkapsulace, bylo provedeno modelové trávení. Hodinová inkubace vlákniny s nakultivovanými buňkami *L. acidophilus* napomohla ke zvýšení jejich viability, a to až o jeden logaritmický řád. Po provedeném modelovém trávení došlo opět ke snížení, ale již ne k tak vysokému jako u komerčních produktů.



Obrázek 4 Lyofilizovaná částice vyhodnocena pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM, Zeiss EVO LS 10, Německo) po minutovém coatingu zlatem; zvětšení 2 000x

U lyofilizovaných buněk a částic nedošlo k úplné rehydrataci po hodinové inkubaci se vzorky vlákniny, což lze pozorovat na množství viabilních buněk před začátkem modelového trávení ($1 \cdot 10^6$ – $1,7 \cdot 10^7$ CFU·ml⁻¹). Díky enkapsulaci nedošlo k velkému snížení počtu viabilních buněk, ale počet buněk je o logaritmický řád nižší nežli u nelyofilizovaných buněk. Je nutné ovšem podotknout,

že k rozpadu částic a rehydrataci může v tlustém střevě dojít i po delším časovém úseku, nežli po 90 minutách trávení. Kombinace enkapsulace do alginátových částic a následná lyofilizace tak napomáhá zachovat viabilitu probiotických bakterií v průběhu modelového trávení. Lze také předpokládat, že přídavek lyofilizovaných částic s enkapsulovanými probiotiky by mohl sloužit jako přídavek i do kyselých šťáv, kde by nedocházelo k tak rapidnímu snížení viability vlivem nízkého pH prostředí.

4.4.2 MTT test biopolymerního materiálu použitého pro enkapsulaci

Liposomy připravené ze sójového nebo slunečnicového lecithinu byly ověřeny jako uniformní a stabilní částice vhodné pro enkapsulaci aktivních látek. Jejich bezpečnost, respektive potenciální vliv na metabolickou aktivitu střevního epitelu byl zkoumán pomocí MTT testu na buněčné linii Caco-2. Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že se zvyšující se objemovou koncentrací suspenze částic v médiu dochází ke snižování viability buněk ve srovnání s kontrolou. Nejvyšší testovaná koncentrace liposomů 14 % se blížila k hranici viability 50 %, ale tuto hodnotu ani jeden vzorek nepřekročil. Lze ovšem doporučit, aby přídavek liposomů nepřekročil maximální hodnotu objemové koncentrace 12 %.

I u polysacharidových částic byl testován vliv na metabolickou aktivitu buněčné linie Caco-2. Byly připraveny dvě hmotnostní koncentrace alginátu 0,5% a 1% a zesíťování pomocí 1,5% roztoku chloridu vápenatého po dobu 0,5 hodiny. Pro testování byly odváženy dvě různé hmotnosti zesíťovaných částic. Alginátové částice připravené ze dvou různých koncentrací alginátu a o rozdílné hmotnosti (0,5 hm. % a 1 hm. %) vykazovaly netoxický účinek, kdy viabilita neklesla ani pod hranici 80 % ve srovnání s kontrolou (Tabulka 8). Tento materiál je tedy vhodný pro enkapsulaci probiotik a použití do výrobků určených ke konzumaci.

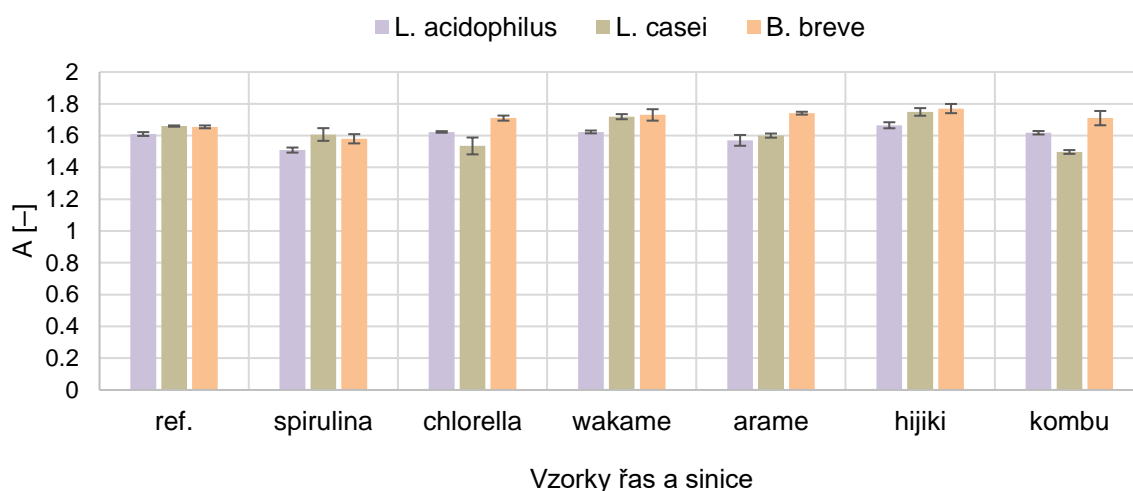
Tabulka 8 MTT test polysacharidových částic

Hmotnostní koncentrace alginátu	m [g]	Viabilita [% kontroly]
0,5%	94,48	84,02 ± 5,55
	54,30	80,24 ± 5,70
1%	102,65	91,17 ± 5,55
	53,03	87,92 ± 7,93
CC	–	100
VC	–	60,97 ± 4,77
PC	–	43,12 ± 8,80

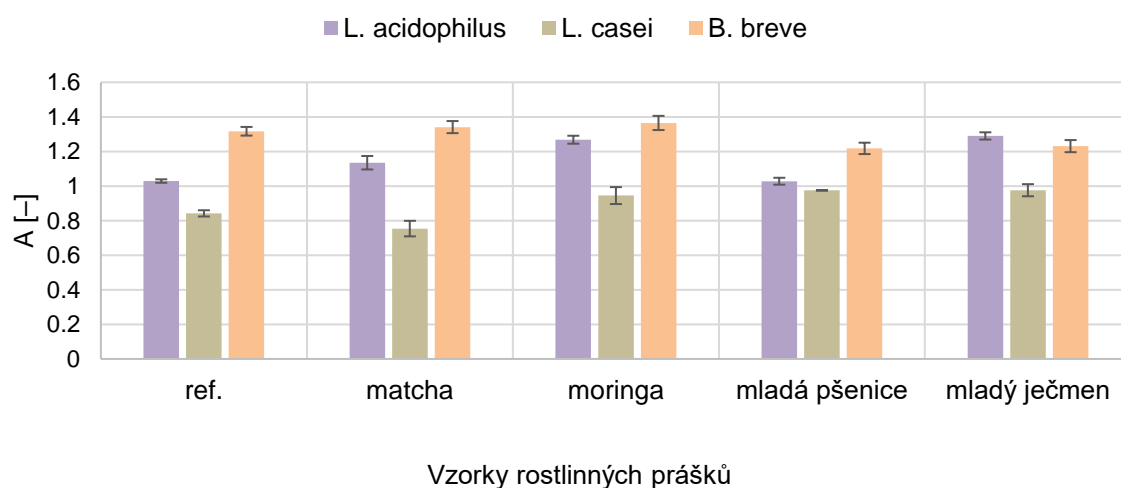
4.4.3 Interakce probiotických buněk s vybranými extrakty

Připravené vzorky byly zaočkovány suspenzí probiotických buněk a byla sledována změna optické hustoty po 24hodinové inkubaci. Pro zjištění viability buněk v suspenzi byla na konci kultivačního měření pomocí optické hustoty provedena i průtoková cytometrie.

Z výsledků naměřené optické hustoty bylo zjištěno, že po 24hodinové kultivaci s extrakty řas a sinice nedocházelo k rapidnímu nárůstu nebo poklesu buněk v suspenzi (Obrázek 5). U rostlinných prášků byl pozorován viditelný nárůst optické hustoty u *L. acidophilus* a *L. casei*, které byly inkubovány s mladým ječmenem, moringou a s matcha (Obrázek 6). Fenolické látky nacházející se v rostlinách mohou vykazovat inhibiční účinek vůči grampozitivním bakteriím. Mohou tedy inhibovat růst převážně probiotických kmenů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*^[101]. Z tohoto důvodu byla viabilita přezkoumána i pomocí průtokové cytometrie.



Obrázek 5 Změna optické hustoty probiotických buněk po 24hodinové kultivaci s testovanými extrakty řas a sinice



Obrázek 6 Změna optické hustoty probiotických buněk po 24hodinové kultivaci s testovanými extrakty rostlinných prášků

V tabulce (Tabulka 9) je zobrazeno zastoupení viabilních buněk vyjádřených v procentech vybraných probiotických kmenů po 24hodinové interakci se vzorky. U obou testovaných skupin lze pozorovat vyšší procento viability nežli u reference dané kultury. Ze vzorků řas a sinice byla nejvyšší viabilita pozorována u spiruliny a chlorelly, nejmenší u kombu a arame. U vzorku rostlinných prášků byla pozorována vysoká viabilita u všech testovaných směsí probiotického kmene s extraktem rostlinného prášků. Z výsledků lze tedy vyvodit, že extrakty neměly inhibující účinek na růst probiotických bakterií, naopak byly schopny udržet jejich životaschopnost.

Tabulka 9 Viabilita probiotik stanovená průtokovou cytometrií

Vzorek	<i>L. acidophilus</i>		<i>L. casei</i>		<i>B. breve</i>	
	Čas [h]	Viabilita [%]				
ref. matcha moringa mladá pšenice mladý ječmen	0	73	77	74		
	24	80	97	95		
		77	100	97		
		96	100	97		
		89	100	98		
	94	97	98			
ref. spirulina chlorella wakame arame hijiki kombu	0	69	67	70		
	24	71	73	72		
		84	90	83		
		82	98	81		
		70	84	74		
		52	73	52		
		82	83	86		
64	59	63				

Nárůst probiotických buněk v přítomnosti vybraných přírodních extraktů byla sledována pomocí optické hustoty zaočkováním do MRS média v mikrotitrační destičce. V jamkách s nárůstem absorbance po 90 minutách trávení, byla změřena viabilita buněk pomocí průtokového cytometru. Viabilita byla také potvrzena zaočkováním směsi po trávení do čerstvého MRS média a po kultivaci byla opět změřena viabilita pomocí průtokového cytometru.

U všech zkoumaných extraktů vzorků, které byly v interakci s jednotlivými druhy probiotických bakterií, došlo v průběhu inkubace se žaludeční šťávou k vysoké inhibici viability bakterií. Po 90 minutách modelového trávení ovšem došlo k mírnému nárůstu optické hustoty. U těchto vzorků byla změřena viabilita pomocí průtokového cytometru (Tabulka 10). Z tabulky je tak zřejmé, že viabilita buněk byla velmi nízká a pouze u vzorků mladého ječmene a spiruliny docházelo k udržení viability okolo 28 %. Po zaočkování do optimálního kultivačního média byly tyto bakteriální buňky schopné růst a zachovat svou viabilitu v porovnání s referencí, kdy k buňkám nebyl přidán žádný extrakt.

Tabulka 10 Výsledky viability probiotických bakterií po modelovém trávení v kombinaci s extrakty

t_0 min	Před trávením		Po trávení			Po 24h kultivaci v MRS médiu	
	Viabilita [CFU·ml ⁻¹]	Viabilita [%]	t_{90} min	Viabilita [CFU·ml ⁻¹]	Viabilita [%]	Viabilita [CFU·ml ⁻¹]	Viabilita [%]
LA	$2,76 \cdot 10^8$	95	ref.	$7,71 \cdot 10^9$	1	$6,92 \cdot 10^6$	8
			ml. ječmen	$8,57 \cdot 10^8$	22	$2,25 \cdot 10^8$	89
			spirulina	$8,71 \cdot 10^8$	28	$3,38 \cdot 10^9$	86
			arame	$1,45 \cdot 10^8$	2	$1,74 \cdot 10^7$	4
LC	$2,79 \cdot 10^8$	95	ref.	$4,38 \cdot 10^8$	2	$5,37 \cdot 10^6$	10
			moringa	$3,31 \cdot 10^8$	7	$3,07 \cdot 10^8$	63
			mladá pšenice	0	0	$3,77 \cdot 10^8$	70
			ml. ječmen	0	0	$1,19 \cdot 10^8$	82
			spirulina	$6,58 \cdot 10^8$	11	$2,17 \cdot 10^8$	86
			arame	$2,18 \cdot 10^8$	4	$3,04 \cdot 10^7$	8
BB	$3,15 \cdot 10^8$	93	ref.	$8,38 \cdot 10^8$	1	$1,59 \cdot 10^7$	7
			ml. ječmen	$8,48 \cdot 10^8$	15	$4,30 \cdot 10^8$	85
			spirulina	$1,13 \cdot 10^9$	25	$3,12 \cdot 10^8$	80
			arame	$2,01 \cdot 10^8$	4	$4,11 \cdot 10^7$	11

5 ZÁVĚR

Předložená disertační práce je zaměřena na vývoj a testování přírodních složek potravin pro dětskou výživu. V rámci dětské výživy bylo zkoumáno mateřské mléko, kolostrum. Práce se tedy zabývá významnými nutričními aspekty složek potravin a významných biologicky aktivních látek jako jsou antioxidanty, vitaminy, β -glukany, antimikrobiální látky apod. Zároveň zkoumá biologický vliv nejen na mikroorganismy, ale i na buňky lidské linie. Tyto zkoumané a testované aktivní látky byly enkapsulovány do nano- nebo mikročástic podle povahy dané enkapsulované složky. U připravených částic byla následně testována stabilita v modelovém prostředí simulovaných fyziologických podmínek. Závěrem byly navrženy vhodné kombinace aktivních látek a biopolymerních částic pro aplikace ve funkčních potravinách vhodné pro dětskou výživu.

První část práce byla zaměřena na porozumění transferu specií selenu z matky na dítě v průběhu 48 hodin od porodu prostřednictvím významných selenometabolitů se zvláštním zaměřením na selenoprotein P. Selenoprotein P je významný antioxidant, který byl stanoven pomocí dvou vybraných metod stanovení jak v mateřském mléce, tak v krevním séru matky a dítěte. Jeho relativní procentuální zastoupení v mateřském krevním séru bylo nejvyšší, a to ze 64 % stanovených selenometabolitů, v pupečnickovém krevním séru 50 %. V mateřském mléce se jednalo pouze o 32 %. Lze tedy potvrdit, že po porodu, a tedy ukončení přívodu živin skrze pupeční šňůru, dochází k přenosu selenometabolitů pomocí krmení kolostrem, avšak ne již v tak velké míře. Kromě selenoproteinu P byla pomocí vylučovací chromatografie (SEC) a detekci pomocí ICP-MS stanoveno i množství dalšího významného enzymu, a to glutathionperoxidázy. Podmínky měření byly nastaveny tak, že došlo k viditelné separaci a následnému stanovení těchto složek a dalších selenometabolitů. Mateřské mléko je tedy významným zdrojem selenometabolitů, které hrají významnou roli v těle dítěte již od jeho narození. Na závěr této části byly porovnány citlivosti stanovení vybraných dvou metod stanovení. Jednalo se o vylučovací chromatografii s detekcí pomocí ICP-MS a ELISA metodu, kdy byl použit kit pro stanovení selenoproteinu P. Bylo zjištěno, že získané hodnoty pomocí ELISA metody byly třikrát menší, než hodnoty získané pomocí SEC-ICP-MS, ale tento rozdíl byl u všech vzorků zachován. ELISA metoda tedy slouží k rychlému stanovení tohoto proteinu v těle, avšak optimalizovaná metoda SEC-ICP-MS podává přesnější a detailnější výsledky.

Další část práce byla zaměřena na výběr testovaných vzorků z řad tzv. "superpotravin" a jejich testování za účelem zjištění obsahu významných nutrientů (sacharidy, hrubá bílkovina a mastné kyseliny). Byly vybrány tři skupiny testovaných látek, a to různé druhy vlákniny, vybrané řasy a sinice a různé rostlinné prášky. Ve skupině vláknin bylo u vzorku chia vlákniny a jakon sirupu naměřeno nejvyšší množství celkových sacharidů, u jakon sirupu dokonce vyšší množství redukcujících sacharidů ($232,6 \pm 0,14 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), nežli ve vzorku inulinu. Bambusová vláknina a chia vláknina obsahovaly nejvyšší množství nerozpustné vlákniny ($175,8 \pm 4,2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; $97,9 \pm 2,4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), která je důležitá také v rámci výživy pro správné fungování střev. Vzorek chia vlákniny navíc obsahoval vysoké procento celkového dusíku ($2,09 \pm 0,15 \%$), a tedy i hrubé bílkoviny ($11,91 \pm 0,87 \%$). Ve skupině řas a sinice vykazoval vzorek arame až několikanásobně vyšší množství jak celkových a redukcujících sacharidů, tak i nerozpustné vlákniny oproti zbylým vzorkům. Hodnoty hrubé bílkoviny se pohybovaly do 10 % s výjimkou vzorku wakame, u kterého byla naměřena hodnota celkového dusíku $2,16 \pm 0,03 \%$, a tedy přepočtená hodnota hrubé bílkoviny činila 13,50 %. Ve skupině rostlinných prášků byly naměřeny poměrně vysoké hodnoty celkových sacharidů u vzorku matcha $131,6 \pm 2,9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, tedy dvojnásobné množství oproti mladé pšenici a

ječmeni. Obsah nerozpustné vlákniny byl u těchto vzorků srovnatelný. Množství hrubé bílkoviny byl u vzorků matcha, moringa a mladé pšenice opět srovnatelný, pouze u mladého ječmene byla stanovena na 9,97 %.

Ze vzorků řas a sinice a rostlinných prášků, byly za pomoci přístroje Soxtherm extrahovány hexanem lipidické extrakty. Nejvyšší výtěžnost byla pozorována u vzorku moringy (14 %), jejíž listy jsou bohaté na množství lipidů. Celkově z rostlinných prášků bylo extrahováno poměrně vysoké procento lipidů, a to až 6 %. Získané lipidické extrakty byly testovány pro zastoupení mastných kyselin, a to nasycených, nenasycených a polynenasycených. Nejvyšší množství mastných kyselin bylo stanoveno ve vzorcích chlorelly a spiruliny, kdy kolem 50 hm. % této koncentrace představovaly polynenasycené mastné kyseliny. Pomocí GC-FID byly stanoveny například kyselina linolová a γ -linolenová. U rostlinných prášků nebyla stanovena příliš vysoká koncentrace mastných kyselin. Nejmenší procentuální zastoupení v těchto vzorcích měly mononenasyčené mastné kyseliny.

U skupiny lipidických extraktů byla do analyzované skupiny přidána skupina semínek a ořechů, které jsou bohatým zdrojem lipidů. Z těchto vzorků byl olej získán lisováním za studena nebo hexanovou extrakcí přístrojem Soxtherm. Vyšší koncentrace mastných kyselin byla pozorována u extrakce hexanem. Zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin se ovšem výrazně nelišilo. Výhradně převažovaly polynenasycené mastné kyseliny. V olejích lisovaných za studena z vlašského ořechu a lněného a konopného semínka bylo navíc stanoveno i malé množství kyseliny arachidonové a eikosapentaenové.

Po stanovení základních významných nutrientů byla pozornost zaměřena na biologicky významné látky. Výše zmíněné rostlinné vzorky byly testovány pro obsah fruktanů a β -glukanů. Nebylo překvapením, že nejvyšší množství fruktanů bylo stanoveno ve vzorku inulinu. Ve zbylých vzorcích rostlinných prášků a řas a sinice bylo množství o něco nižší, až na mladý ječmen a matcha vzorek, u kterých byla hodnota stanovena nad 100 mg·g⁻¹. Naopak nejvyšší množství β -glukanů bylo stanoveno ve vzorku arame.

Pomocí GRAS rozpouštědel byly extrahovány fenolické látky, flavonoidy a v připravených extraktech pak byla stanovena antioxidační aktivita. Porovnáním složení vodného a ethanolového extraktu bylo ověřeno, že se rozdíl v extrakci nejevil jako významný. Nejvyšší množství fenolických látek bylo stanoveno u vodného extraktu spiruliny a vzorku matcha. Tyto vzorky navíc vykazovaly i vysokou antioxidační aktivitu. V těchto extraktech byly identifikovány i jednotlivé fenolické látky jako je kyselina gallová, rutin, kyselina sinapová nebo ferulová. Extrakt matcha navíc obsahoval i kofein, a to v koncentraci 5 mg·g⁻¹. Ve vzorcích chlorelly, spiruliny, arame a matcha bylo stanoveno i nejvyšší množství chlorofylu, celkové karotenoidy byly v největším množství pozorovány i spiruliny a chlorelly.

Dalším sledovaným parametrem byl antimikrobiální účinek. Extrakty spiruliny vykazovaly účinek vůči gramnegativním i grampozitivním mikroorganismům. Zbytek testovaných vzorků je dle výše zmíněných stanovení poměrně bohatým zdrojem živin, proto byly vybrány jiné zdroje s potenciálním antimikrobiálním účinkem z řad bylin, čajů a koření. Bylo pozorováno, že extrakty koření mají významný vliv na růst grampozitivních bakterií, v ostatních případech buďto velmi malý nebo nulový.

U testovaných extraktů vzorek řas a sinice a rostlinných prášků byl stanoven a porovnán cytotoxický účinek na dvě různé lidské buněčné linie. Tyto linie byly vybrány pro stanovení

bezpečnosti v potravinách a případně i v kosmetice. Pro testování cytotoxicity byly vybrány linie Caco-2 (střevní epitel) a HaCat linie (keratinocyty). Nebyl zjištěn výrazný rozdíl v cytotoxickém účinku při vlivu expozice extraktů na obě vybrané buněčné linie, pouze u vyšších koncentrací moringy a matcha. Pro kontrolu byla u těchto vzorků sledována i intaktnost buněčné membrány HaCat buněk. Bylo ovšem zjištěno, že i přes snížení mitochondriální aktivity nedošlo k narušení buněčné membrány buněk. Obecně lze tedy extrakty považovat za bezpečné i pro využití v kosmetice.

Součástí práce byla i příprava liposomů s enkapsulovanou složkou. Aktivní látky byly enkapsulované do liposomů, jelikož při enkapsulaci do polysacharidových částic byla enkapsulační účinnost velmi nízká a docházelo k rychlé difuzi. Vodné a ethanolové extrakty řas a sinic se povedlo enkapsulovat do liposomů tvořených sójovým lecithinem s poměrně malou velikostí částic, uniformností, stabilitou (-40 mV) a vysokou enkapsulační účinností, která se pohybovala ve většině případů nad 90 %. Po třech měsících skladování ovšem došlo k poklesu antioxidační aktivity, ale hodnoty se stále pohybovaly nad 50 %. Liposomy s lipidickými extrakty vykazovaly ještě menší velikost, ale s nižším zeta potenciálem a vyšší agregací částic. V této části byly také porovnávány liposomy skládající se z lecithinu různého původu, a to slunečnicového, vaječného a sójového. V rámci dlouhodobé stability a modelového trávení bylo pozorováno, že inkorporace aktivní složky napomáhá zvýšení stability částic v rámci snížení zeta potenciálu a částečného uvolňování. Zároveň byly jako nejstabilnější nověrey liposomy ze sójového a slunečnicového lecithinu. MTT test navíc potvrdil jejich bezpečnost do 12 % objemové koncentrace na buněčné linii Caco-2.

Nakonec byl zkoumán vliv vybraných extraktů na viabilita probiotických bakterií. Vybrané extrakty nevykazovaly viditelnou změnu v počtu optické hustoty, a tedy počtu bakterií. Avšak pomocí průtokové cytometrie bylo potvrzeno, že složení extraktů napomohlo zčásti viabilitu i podpořit.

Výsledným návrhem doplňků stravy tak může být na základě charakterizace nutrientů a biologicky významných látek jako jsou fenolické látky, barviva, fruktany apod. směs mladého ječmene, pšenice nebo spiruliny v kombinaci s *L. acidophilus*, *L. casei* nebo *B. breve*, které mohou být enkapsulovány zvlášť nebo dohromady v alginátové částici s následnou lyofilizací a využity do suchých potravin jako je ovesná kaše nebo do nápojů. V případě přírodní cesty úpravy střevní mikrobioty lze využít enkapsulované extrakty bylinek nebo koření, konkrétně heřmánku nebo skořice, u nichž byl pozorován inhibiční vliv na růst gramnegativních bakterií s následným doplněním efektu navrhovaného doplňku stravy.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VINCENTOVÁ, Dana. Výživa novorozence, kojence a batolete. *Pediatric pro praxi*, 2006, roč. 7, č. 4, s. 224-226, ISSN: 1213-0494
- [2] NEVORAL, Jiří a Magdalena PAULOVÁ. *Výživa kojenců*, 2, vyd. Praha: Státní zdravotní ústav, 2007, ISBN 978-80-7071-286-3
- [3] HORTENSIUS, Lisa M. a Ruurd M. VAN ELBURG a kol. Postnatal Nutrition to Improve Brain Development in the Preterm Infant: A Systematic Review From Bench to Bedside. *Frontiers in Physiology* [online]. 2019, **10** [cit. 2021-09-24]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2019.00961
- [4] ADÁMKOVÁ, Věra, Realita dodržování stravovacích doporučení v praxi: Strava jako prevence civilizačních chorob. *Interní medicína* [online], 2011, 13(11), 427-430 [cit. 2019-01-12]. Dostupné z: www.internimedicina.cz
- [5] HOU, Lei a Anna H. KONGSTED a kol. Pre- and Early-Postnatal Nutrition Modify Gene and Protein Expressions of Muscle Energy Metabolism Markers and Phospholipid Fatty Acid Composition in a Muscle Type Specific Manner in Sheep. *PLoS ONE* [online]. 2013, 8(6) [cit. 2021-09-24]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0065452
- [6] SOSNOVCOVÁ, Jitka. Legislativa pro výrobky pro děti do 3 let. *Právní požadavky SZÚ* [online]. ČR, 2008 [cit. 2019-12-20].
- [7] Vyhláška 54/2004 Sb.: *Vyhláška o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití*. MVČR, 2014. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/>
- [8] World Health Organization. *Infant and Young Child Feeding: Model Chapter for Textbooks for Medical Students and Allied Health Professionals*. [online] 1, vyd. Ženeva, 2009. ISBN 978-92-4-159749-4. [cit. 2019-12-21]. Dostupné z: www.who.int/
- [9] ROZTOČIL, Aleš. *Moderní porodnictví*. Praha: Grada. 2008, ISBN 978-802-4719-412.
- [10] SANI, Mahsa a Sepideh EBRAHIMI a kol. Differentiation Potential of Breast Milk-Derived Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. 2017, 14(5), 587-593 [cit. 2022-09-24]. ISSN 1738-2696. Dostupné z: doi:10.1007/s13770-017-0066-x
- [11] World Health Organization (WHO), 2018. *Infant and Young Child Feeding*, pp. 66–67. https://doi.org/10.1787/health_glance_ap-2018-22-en.
- [12] ANDREAS, Nicholas J., Beate KAMPMANN a Kirsty MEHRING LE-DOARE. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development* [online]. 2015, 91(11), 629-635 [cit. 2021-03-19]. ISSN 03783782. Dostupné z: doi:10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013
- [13] WALSH, Clodagh a Jonathan A. LANE a kol. Human milk oligosaccharides: Shaping the infant gut microbiota and supporting health. *Journal of Functional Foods* [online]. 2020, 72 [cit. 2022-09-24]. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2020.104074
- [14] GARWOLIŃSKA, Dorota, Jacek NAMIEŚNIK a kol. Chemistry of Human Breast Milk—A Comprehensive Review of the Composition and Role of Milk Metabolites in Child Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2018, **66**(45), 11881-11896 [cit. 2021-03-19]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.8b04031

- [15] DOREA, Jose G. Selenium and breast-feeding. *British Journal of Nutrition* [online]. 2002, **88**(5), 443-461 [cit. 2021-09-24]. ISSN 0007-1145.
Dostupné z: doi:10.1079/BJN2002692
- [16] KÖHRLE, Josef. *Selenium and the thyroid* [online]. 2013, **20**(5), 441-448 [cit. 2022-09-24]. ISSN 1752-296X. Dostupné z: doi:10.1097/01.med.0000433066.24541.88
- [17] BURK, Raymond F. a Kristina E. HILL. Selenoprotein P—Expression, functions, and roles in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2009, **1790**(11), 1441-1447 [cit. 2021-09-24]. ISSN 03044165.
Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.026
- [18] FOX, P. F. a P. L. H. MCSWEENEY. *Dairy chemistry and biochemistry*. New York: Blackie Academic. 1998, ISBN 04-127-2000-0.
- [19] FRÜHAUF, Pavel. Nemléčná výživa kojenců a batolat: Příkrmy. [online], 2006, 5, 271-274 [cit. 2019-01-12]. Dostupné z: www.pediatriepropraxi.cz.
- [20] AJALA, Lawrence Olusegun a Onaheed Babiker DAFALLAH a kol. Mineral compositions of infant complementary foods in relation to dietary daily intake and synergistic/antagonistic interrelationships. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* [online]. 2020, **71**(7), 804-814 [cit. 2021-09-24]. ISSN 0963-7486.
Dostupné z: doi:10.1080/09637486.2020.1738353
- [21] FRÜHAUF, Pavel a Peter Szitányi. *Výživa v pediatrii* [online] Praha: Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví [online]. 2013, [cit. 2019-01-22]. ISBN 978-80-87023-26-6.
- [22] VAN DEN DRIESSCHE, José J., Jogchum PLAT a Ronald P, MENSINK. Effects of superfoods on risk factors of metabolic syndrome: a systematic review of human intervention trials. *Food & Function* [online]. 2018, 9(4), 1944-1966 [cit. 2019-01-04], DOI: 10.1039/C7FO01792H, ISSN 2042-6496.
Dostupné z: http://xlink.rsc.org/?DOI=C7FO01792H
- [23] KARASAWA, Marines Marli Gniech a Chakravarthi MOHAN. Fruits as Prospective Reserves of bioactive Compounds: A Review, Natural Products and Bioprospecting [online]. 2018, 8(5), 335-346 [cit. 2019-01-12]. DOI: 10.1007/s13659-018-0186-6, ISSN 2192-2195.
Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s13659-018-0186-6
- [24] BRUBACHER, G. B. a kol. *Methods for the determination of vitamins in food, recommended by COST 91*. New York: Elsevier Applied Science Publishers. c1985, ISBN 08-533-4339-X.
- [25] FANALI, Chiara a ko. Advanced analytical techniques for fat-soluble vitamin analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2017, **87**, 82-97 [cit. 2019-01-28], DOI: 10.1016/j.trac.2016.12.001. ISSN 01659936.
Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993616303375
- [26] PROCHÁZKOVÁ, D. a kol. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia* [online]. 2011, 82(4), 513-523 [cit. 2019-01-09]. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.01.018. ISSN 0367326X. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com.

- [27] VENEGONI, Whitney a kol. The use of antioxidants in the treatment of traumatic brain injury. *Journal of Advanced Nursing* [online]. 2017, 73(6), 1331-1338 [cit. 2019-01-09]. DOI: 10.1111/jan.13259. ISSN 03092402. Dostupné z: <http://doi.wiley.com>.
- [28] MISHRA, Vijendra a kol. Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* [online]. 2015, 63(14), 3615-3626 [cit. 2019-01-10]. DOI: 10.1021/jf506326t. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org>.
- [29] VALKO, Marian a Dieter LEIBFRITZ a kol. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* [online]. 2007, 39(1), 44-84 [cit. 2019-1-09]. ISSN 13572725. Dostupné z: [doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001)
- [30] TSAO, Rong. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* [online]. 2010, 2(12), 1231-1246 [cit. 2019-01-30]. DOI: 10.3390/nu2121231. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/>
- [31] MONRAD, Jeana K. a kol. Design and Optimization of a Semicontinuous Hot–Cold Extraction of Polyphenols from Grape Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, 60(22), 5571-5582 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1021/jf300569w. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf300569w>
- [32] MOREIRA, Manuela M, a kol. A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, 403(4), 1019-1029 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1007/s00216-011-5703-y. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/>
- [33] Cardozo, K. H. M., et al. (2007). Metabolites from algae with economical impact. Comparative biochemistry and physiology. Part C. *Toxicology and Pharmacology*, 146, 60–78.
- [34] MAMATHA, B.S. a K.K. NAMITHA a kol. Studies on use of Enteromorpha in snack food. *Food chemistry* [online]. OXFORD: Elsevier, 2007, 101(4), 1707-1713 [cit. 2022-09-24]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2006.04.032](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.032)
- [35] PATARRA, Rita Ferreira a Lisete PAIVA. Nutritional value of selected macroalgae. *Journal of Applied Phycology* [online]. 2011, 23(2), 205-208 [cit. 2021-09-24]. ISSN 0921-8971. Dostupné z: [doi:10.1007/s10811-010-9556-0](https://doi.org/10.1007/s10811-010-9556-0)
- [36] MARSHAM, Sara, Graham W. SCOTT a Michelle L. TOBIN. Comparison of nutritive chemistry of a range of temperate seaweeds. *Food chemistry* [online]. OXFORD: Elsevier, 2007, 100(4), 1331-1336 [cit. 2021-09-24]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.029](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.029)
- [37] HOEBLER, Christine a Fabienne GUILLON. Supplementation of pig diet with algal fibre changes the chemical and physicochemical characteristics of digesta. *Journal of the science of food and agriculture* [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2000, 80(9), 1357-1364 [cit. 2021-09-24]. ISSN 0022-5142. Dostupné z: [doi:10.1002/1097-0010\(200007\)80:91357::AID-JSFA6573.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200007)80:91357::AID-JSFA6573.0.CO;2-B)
- [38] SINGH, Sawraj, Bhushan N. KATE a U. C. BANERJEE. Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. *Critical reviews in*

- biotechnology* [online]. ABINGDON: Informa UK, 2005, **25**(3), 73-95 [cit. 2022-09-24]. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.1080/07388550500248498
- [39] KUMAR, Yogesh a Somya SINGHAL. Ultrasound assisted extraction of selected edible macroalgae: Effect on antioxidant activity and quantitative assessment of polyphenols by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Algal Research* [online]. 2020, **52** [cit. 2021-09-24]. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2020.102114
- [40] DENG, Ruitang a Te-Jin CHOW. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics* [online]. 2010, **28**(4), e33-e45 [cit. 2021-09-24]. ISSN 17555914. Dostupné z: doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x
- [41] BAG, Anwesa a kol. Evaluation of Synergistic Antibacterial and Antioxidant Efficacy of Essential Oils of Spices and Herbs in Combination. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(7) [cit. 2022-09-24]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0131321
- [42] AKHTAR, Saeed a Azhari SIDDEEG. Polyphenol-Rich Extracts of Traditional Culinary Spices and Herbs and Their Antibacterial Activity in Minced Beef. *Journal of Food Quality* [online]. 2019, **2019**, 1-9 [cit. 2022-09-24]. ISSN 0146-9428. Dostupné z: doi:10.1155/2019/1702086
- [43] TURRONI, Francesca a Marco VENTURA. Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective, *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2014, **71**(2), 183-203 [cit. 2019-01-02]. DOI: 10.1007/s00018-013-1318-0. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-013-1318-0>
- [44] SARKAR, Amrita a Santanu MANDAL. *Bifidobacteria*—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. *Microbiological Research* [online]. 2016, **192**, 159-171 [cit. 2019-01-05]. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.001. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501316304323>.
- [45] WILLIAMS, N. T. Probiotics, *American Journal of Health-System Pharmacy* [online]. 2010, **67**(6), 449-458 [cit. 2018-12-05], DOI: 10.2146/ajhp090168. ISSN 1079-2082. Dostupné z: <http://www.ajhp.org/cgi/doi/10.2146/ajhp090168>
- [46] SATTLER, Verity Ann a kol. Development of a Strain-Specific Real-Time PCR Assay for Enumeration of a Probiotic *Lactobacillus reuteri* in Chicken Feed and Intestine, *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(2) [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1371/journal.pone.0090208. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0090208>
- [47] SHEU, Sen-Je a kol. Use of *Tuf* Gene-Based Primers for the PCR Detection of Probiotic *Bifidobacterium* Species and Enumeration of *Bifidobacteria* in Fermented Milk by Cultural and Quantitative Real-Time PCR Methods. *Journal of Food Science* [online]. 2010, **75**(8), M521-M527 [cit. 2019-01-28], DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01816.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/>
- [48] SALVETTI, Elisa, Sandra TORRIANI a Giovanna E, FELIS. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update, Probiotics and Antimicrobial Proteins [online]. 2012, **4**(4), 217-226 [cit. 2018-12-06], DOI: 10.1007/s12602-012-9117-8. ISSN 1867-1306.

- Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12602-012-9117-8KEREK>
- [49] TURRONI, Francesca. Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2011, **149**(1), 37-44 [cit. 2019-01-05], DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.010. ISSN 01681605.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510007002>
- [50] HUQ, Tanzina, a kol. Encapsulation of Probiotic Bacteria in Biopolymeric System, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2013, 53(9), 909-916 [cit. 2019-01-25], DOI: 10.1080/10408398.2011.573152. ISSN 1040- 8398.
Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/>
- [51] WOHLGEMUTH, Steffen a kol. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. 2010, **300**(1), 3-10 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.08.003. ISSN 14384221. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/>
- [52] LUGLI, Gabriele Andrea a Christian MILANI. Investigation of the Evolutionary Development of the Genus *Bifidobacterium* by Comparative Genomics. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2014, 80(20), 6383-6394 [cit. 2019-01-03], DOI: 10.1128/AEM.02004-14. ISSN 0099-2240.
Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM,02004-14>
- [53] PRABHURAJESHWAR, Chidre a R. K. CHANDRAKANTH. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical Journal* [online]. 2017, 40(5), 270-283 [cit. 2018-12-05], DOI: 10.1016/j.bj.2017.06.008. ISSN 23194170.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2319417017300094>
- [54] JUNICK, Jana a Michael BLAUT. Quantification of Human Fecal *Bifidobacterium* Species by Use of Quantitative Real-Time PCR Analysis Targeting the *groEL* Gene, *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2012, 78(8), 2613-2622 [cit. 2019-01-03], DOI: 10.1128/AEM.07749-11. ISSN 0099-2240.
Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM,07749-11>
- [55] NEDOVIC, V. a kol. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. 2011, vol. 1, s, 1806-1815 [cit. 2018-12- 26], DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.26. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/>
- [56] RAY, Sohini a kol. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience* [online]. 2016, 13, 76-83 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1016/j.fbio.2015.12.009. ISSN 22124292.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/>
- [57] BROECKX, Géraldine a kol. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, 505(1-2). 303-318 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.002. ISSN 03785173.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/>

- [58] WANNING, Stefan a kol. Pharmaceutical spray freeze drying. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, s. 136 – 153 [cit. 2018-07-06]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.053. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/>
- [59] SILVA, Raquel a Helena FERREIRA. Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2010, 17(3), 628-632 [cit. 2019-01-16]. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2009.10.010. ISSN 13504177. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417709001746>
- [60] HUANG, Zhenjun a kol. Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2014, 9(4), 176-182 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1016/j.ajps.2014.06.001. ISSN 18180876. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1818087614000336>
- [61] BÜCHI, Enkapsulátor B-395 Pro:Manuál
- [62] ARIAS-BORREGO, A. a B. CALLEJÓN-LEBLIC a kol. A novel HPLC column switching method coupled to ICP-MS/QTOF for the first determination of selenoprotein P (SELENOP) in human breast milk. *Food Chemistry* [online]. 2020, **321** [cit. 2021-09-25]. ISSN 03088146. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2020.126692](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126692)
- [63] CALLEJÓN-LEBLIC, Belén a Gema RODRÍGUEZ-MORO a kol. Absolute quantification of selenoproteins and selenometabolites in lung cancer human serum by column switching coupled to triple quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2020, **1619** [cit. 2021-09-25]. ISSN 00219673. Dostupné z: [doi:10.1016/j.chroma.2020.460919](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460919)
- [64] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356
- [65] SHAO, Yijing a Amy Hui-Mei LIN. Improvement in the quantification of reducing sugars by miniaturizing the Somogyi-Nelson assay using a microtiter plate. *Food Chemistry* [online]. 2018, 240, 898-903 [cit. 2022-09-25]. ISSN 03088146. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.083](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.083)
- [66] Estimation of reducing sugar by Nelson-Somogyi method. *Researchgate.com* [online]. [cit. 2022-09-06]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/>
- [67] GIDENNE, T. Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science* [online]. 2003, **81**(2-3), 105-117 [cit. 2022-09-25]. ISSN 03016226. Dostupné z: [doi:10.1016/S0301-6226\(02\)00301-9](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00301-9)
- [68] Czech Standards Institute (2003) CSN 46 1011-18: testing of cereals, pulses, and oilseeds-Part 18: testing of cereals-determination of nitrogen matter content. Czech Office for Standards, Metrology and Testing, Prague
- [69] SINGLETON, V. L., Jr J. A. ROSSI. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents*. *American Journal of Enology and Viticulture* 1965, 16 (3): 144-158
- [70] CHANG C. Y. M., WEN H., CHERN J.. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 2002; 10(3): 178- 182

- [71] RE R., PELLEGRINI N. a kol. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, 26(9-10): 1231-1237. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3. ISSN 08915849.
- [72] Fructan assay procedure. In: *Megazyme* [online]. IRL, 2020 [cit. 2022-09-06]. Dostupné z: https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-FRUC_DATA.pdf
- [73] Mixed-Linkage Beta-Glucan. In: *Megazyme* [online]. IRL, 2020 [cit. 2022-09-06]. Dostupné z: https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-BGLU_DATA.pdf
- [74] LICHTENTHALER, Hartmut K. a Claus BUSCHMANN. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* [online]. 2001, 1(1), F4.3.1-F4.3.8 [cit. 2021-09-25]. ISSN 25725599. Dostupné z: doi:10.1002/0471142913.faf0403s01
- [75] CALLEJÓN-LEBLIC, Belén, José Luis GÓMEZ-ARIZA, Antonio PEREIRA-VEGA a Tamara GARCÍA-BARRERA. Metal dyshomeostasis based biomarkers of lung cancer using human biofluids. *Metallomics*. 2018, 10(10), 1444-1451. ISSN 1756-5901.
- [76] WIEGAND I., HILPERT K., HANCOCK R.E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*. 2008, 3(2): 163-175.
- [77] LI, X., et al. Hydrophobic tail length, degree of fluorination and headgroup stereochemistry are determinants of the biocompatibility of (fluorinated) carbohydrate surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009, 73(1), 65-74
- [78] BROWN, D., et al. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology And Applied Pharmacology*. 2001, 175, 191-199.
- [79] Particle size distribution. In: Malvern [online]. © 2013 [cit. 2013-03-16].
- [80] BÜCHI LABORTECHNIK AG. Návod k použití: Enkapsulátor B-395 Pro. 2011.
- [81] Československý lékopis. Praha: Avicenum – Zdravotnické nakladatelství, 1987
- [82] FUJIHARA, S. a kol. Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Some Cereal Products in Japan. *Journal of Food Science* [online]. 2008, 73(3), C204-C209 [cit. 2022-09-25]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00665.x
- [83] DAY, Li. Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security. *Trends in food science & technology* [online]. LONDON: Elsevier, 2013, 32(1), 25-42 [cit. 2022-09-25]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2013.05.005
- [84] ALAGAWANY, Mahmoud, Shaaban S. ELNESR a kol. Omega-3 and omega-6 fatty acids in poultry nutrition: Effect on production performance and health. *Animals (Basel)* [online]. BASEL: Mdpi, 2019, 9(8), 573 [cit. 2022-09-25]. ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani9080573
- [85] TROESCH, Barbara, Manfred EGGERSDORFER a kol. Expert Opinion on Benefits of Long-Chain Omega-3 Fatty Acids (DHA and EPA) in Aging and Clinical Nutrition. *Nutrients* [online]. Switzerland: MDPI, 2020, 12(9), 1-25 [cit. 2022-09-25]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12092555

- [86] CAETANO, Brunno F. R., Nelci A. DE MOURA, Ana P. S. ALMEIDA, Marcos C. DIAS, Katia SIVIERI a Luis F. BARBISAN. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a Food Supplement: Health-Promoting Benefits of Fructooligosaccharides. *Nutrients* [online]. BASEL: Mdpi, 2016, **8**(7), 436 [cit. 2022-09-25]. ISSN 2072-6643.
Dostupné z: doi:10.3390/nu8070436
- [87] OLIVEIRA, Ricardo Pinheiro de Souza. Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. *Journal of Food Engineering* [online]. 2011, **107**(1), 36-40 [cit. 2022-09-06]. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.06.005
- [88] RIEDER, Anne, Svein Halvor KNUTSEN a Simon BALLANCE. In vitro digestion of beta-glucan rich cereal products results in extracts with physicochemical and rheological behavior like pure beta-glucan solutions – A basis for increased understanding of in vivo effects. *Food hydrocolloids* [online]. OXFORD: Elsevier, 2017, **67**, 74-84 [cit. 2022-09-25]. ISSN 0268-005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2016.12.033
- [89] Vyhláška o požadavcích na extrakční rozpouštědla používaná při výrobě potravin: Vyhláška č. 253/2018 Sb. In: Praha, 2018, ročník 2018. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-253>
- [90] SEIFERT, Sara M. akol. Health Effects of Energy Drinks on Children, Adolescents, and Young Adults. *Pediatrics* [online]. 2011, **127**(3), 511-528 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0031-4005. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2009-3592
- [91] RUBIO, C. Metals in edible seaweed. *Chemosphere* [online]. 2017, **173**, 572-579 [cit. 2022-09-26]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.01.064
- [92] Singh, S., Kate, B. N., Banerjee, U. C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25 (3), 73-95.)
- [93] POTEŠT, Marina a MONTESANO a kol. Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of *Moringa oleifera* Lam on lymphoid and monocytoid cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* [online]. 2019 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1792-0981.
Dostupné z: doi:10.3892/etm.2019.7544
- [94] ARÉVALO-HÍJAR, Lucía. Antibacterial and Cytotoxic Effects of *Moringa oleifera* (*Moringa*) and *Azadirachta indica* (*Neem*) Methanolic Extracts against Strains of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Dentistry* [online]. 2018, **2018**, 1-5 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1687-8728. Dostupné z: doi:10.1155/2018/1071676
- [95] Smith MC, Crist RM, Clogston JD. (2017) Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem.* 409: 5779-5787
- [96] MIGUEL-JIMENEZ, Sara, Maria Montserrat RIVERA DEL ALAMO a kol. In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Animal reproduction science* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2020, **215**, 106315 [cit. 2022-09-28]. ISSN 0378-4320. Dostupné z: doi:10.1016/j.anireprosci.2020.106315
- [97] SHAO, Xiao-ru, Xue-qin WEI a kol. Effects of Micro-environmental pH of Liposome on Chemical Stability of Loaded Drug. *Nanoscale research letters* [online]. New York:

- Springer US, 2017, **12**(1), 504-504 [cit. 2022-09-28]. ISSN 1931-7573. Dostupné z: doi:10.1186/s11671-017-2256-9
- [98] ALLEN ZHANG, Jia-ai a John PAWELCHAK. Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions. Part 1: Lipid hydrolysis. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* [online]. AMSTERDAM: Elsevier, 2000, **50**(3), 357-364 [cit. 2022-09-28]. ISSN 0939-6411. Dostupné z: doi:10.1016/S0939-6411(00)00127-2
- [99] 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
- [100] ERTEM, Hatice a Songül ÇAKMAKÇI. *Shelf life and quality of probiotic yogurt produced with Lactobacillus acidophilus and Gobdin* [online]. 2018, **53**(3), 776-783 [cit. 2022-09-30]. ISSN 09505423. Dostupné z: doi:10.1111/ijfs.13653
- [101] KASPRZAK-DROZD, Kamila, a kol.. Beneficial effects of phenolic compounds on gut microbiota and metabolic syndrome. *International journal of molecular sciences* [online]. Switzerland: MDPI, 2021, **22**(7), 3715 [cit. 2022-10-06]. ISSN 1661-6596. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22073715

7 ŽIVOTOPIS A PUBLIKAČNÍ ČINNOST



Životopis

Osobní informace

Jméno: Julie Hoová
Trvalé bydliště: Skotnice 15, Skotnice 742 58, Skotnice, Česká republika
Datum narození: 1. 11. 1992
Kontakt: xchoova@fch.vut.cz, +420 733 677 477

Vzdělání

2017–současnost Doktorské studium
Fakulta chemická, Chemie a technologie potravin – obor: Potravinářská chemie,
Vysoké učení technické v Brně
Disertační práce: Vývoj a testování přírodních složek potravin pro dětskou výživu.

2020–2021 Vzdělávací kurz Veterinářství (Maturitní vysvědčení)

2015–2017 Navazující magisterské studium
Fakulta chemická, Chemie a technologie potravin – obor: Potravinářská chemie a
biotechnologie, Vysoké učení technické v Brně
Diplomová práce: Využití technik enkapsulace k přípravě výrobků určených pro dětskou
výživu.

2012–2015 Bakalářské studium
Fakulta chemická, Chemie a technologie potravin – obor: Potravinářská chemie,
Vysoké učení technické v Brně
Bakalářská práce: Příprava a využití vybraných typů nanočástic v kosmetice.

2008–2012 Masarykovo gymnázium Příbor, p.o.
maturitní zkouška: český jazyk, matematika (státní), matematika, chemie, angličtina (školní)

Pracovní zkušenosti

1/2019–současnost Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ph.D. student – ÚCHPBT

10/2017–12/2018 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, CMV, Ph.D. student –
laboratoř biotechnologií

Zahraniční stáže

3/2019–5/2019 Universidad de Huelva, Facultad de Ciencias Experimentales, Huelva, Španělsko
Projekt a náplň práce: Stanovení selenia v lidském mléce za pomoci
SEC-AF-ICP-QQQ-MS, stanovení kovů v sušených mořských řasách

Pedagogická činnost

2022/2023 – zimní semestr Praktikum z biochemie

2021/2022 – letní semestr Praktikum z kosmetologie, Praktikum z fyziologie a klinických metod

2018/2019 – zimní semestr Praktikum z biochemie (náslechy)

2017/2018 – zimní semestr Praktikum z biochemie (náslechy)

Publikační činnost:

Články v časopisech s IF:

SKOUMALOVÁ, P.; **HOOVÁ, J.**; RYŠÁVKA, P.; MÁROVÁ, I. Stress Effect of Food Matrices on Viability of Probiotic Cells during Model Digestion. *Microorganisms*, 2021, roč. 9, č. 8, s. 1-17. ISSN: 2076-2607.

Hoová, J.; López, I.V.; Soblechero, E.G.; Arias-Borrego, A.; García-Barrera, T. Digging deeper into the mother-offspring transfer of selenium through human breast milk. *JOURNAL OF FOOD COMPOSITION AND ANALYSIS*, 2021, roč. 99, č. 103870, s. 1-8. ISSN: 0889-1575.

PAVELKOVÁ, R.; MATOUŠKOVÁ, P.; **HOOVÁ, J.**; POŘÍZKA, J.; MÁROVÁ, I. Preparation and characterisation of organic UV filters based on combined PHB/liposomes with natural phenolic compounds. *Journal of Biotechnology*, 2020, roč. 324, č. 1, s. 1-10. ISSN: 0168-1656.

Články ve sbornících s plným uvedením textu:

DZURICKÁ, L.; **HOOVÁ, J.**; SKOUMALOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Preparation and characterization of combined nanostructured materials*. The EuroBiotech Journal. Sciendo, 2021. s. S78 -79. ISSN: 2564-615X.

HOOVÁ, J.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *THE INFLUENCE OF SELECTED ENCAPSULATION TECHNIQUES ON THE VIABILITY OF PROBIOTICS*. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2021. s. S62 -63. ISSN: 1314-3530.

HOOVÁ, J.; VYSOKÁ, M.; DZURICKÁ, L.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. THE USE OF BIOACTIVE COMPOUNDS AND THEIR ENCAPSULATION INTO LIPOSOMES TO INCREASE THE EFFECTIVENESS AND CONTROL RELEASE. In *NANOCON 2018, 10TH ANNIVERSARY INTERNATIONAL CONFERENCE ON NANOMATERIALS - RESEARCH & APPLICATION*. Ostrava, Czech republic: TANGER, 2019. s. 386-391. ISBN: 978-80-87294-89-5.

BOKROVÁ, J.; RUČKOVÁ, M.; MATOUŠKOVÁ, P.; PAVELKOVÁ, R.; **HOOVÁ, J.**; MÁROVÁ, I. CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF LIPOSOME PARTICLES WITH ENCAPSULATED NATURAL EXTRACTS. In *Proceedings Paper, 10TH ANNIVERSARY INTERNATIONAL CONFERENCE ON NANOMATERIALS - RESEARCH & APPLICATION (NANOCON 2018 (R))*. 1. Tanger, a.s., 2018. s. 739-744. ISBN: 978-80-87294-89-5.

Abstrakty:

HOOVÁ, J.; STREČANSKÁ, P.; SKOUMALOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Probiotic viability and content of phytochemicals in fermented white cabbage juice. Sborník abstraktů Eurobiotech 2022. eISSN 2564-615X

HOOVÁ, J.; SKOUMALOVÁ, P.; STREČANSKÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Saccharide profile of green powders and its influence on probiotic growth*. Sborník abstraktů ICCT 2022. p. 1 (1 s.).

HOOVÁ, J.; SKOUMALOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Influence of potential modern prebiotics on probiotic growth*. Sborník abstraktů Eurobiotech 2021. s. 75-75. eISSN 2564-615X

HOOVÁ, J.; HORŇÁKOVÁ, N.; SKOUMALOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Nanoencapsulation of Matricaria Chamomilla*. NANOCON 2021- Abstracts. 1. 2021. s. 114-114. ISBN: 978-80-88365-00-6.

DZURICKÁ, L.; BENDOVÁ, A.; **HOOVÁ, J.**; SKOUMALOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *CHARACTERIZATION OF NANOFIBER AND HYDROGEL WOUND DRESSINGS*. Nanocon 2021. First. Brno: Tanger Ltd., 2021. s. 119-119. ISBN: 978-80-88365-00-6.

DZURICKÁ, L.; BENDOVÁ, A.; **HOOVÁ, J.**; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Preparation and characterisation of functionalized wound dressings*. Studentská odborná konference CHEMIE JE ŽIVOT 2020 Sborník abstraktů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2020. s. 59-60. ISBN: 978-80-214-5920-0.

HOOVÁ, J.; MALČÍKOVÁ, H.; POKORNÁ, M.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *The Efficiency of Plant Compounds on the Viability of Probiotic Bacteria.* Sborník abstraktů. 2019. s. 49-49. ISBN: 978-80-214-5807-9.

HOOVÁ, J.; ŠNAJDAROVÁ, K.; POKORNÁ, M.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *The Effectiveness of Prebiotics on the Viability of Probiotics and its Encapsulation into Alginate Particles.* 19th International Nutrition & Diagnostics Conference. 2019. s. 108-108. ISBN: 978-80-7560-245-9.

MATOUŠKOVÁ, P.; HOOVÁ, J.; POKORNÁ, M.; MALČÍKOVÁ, H.; MÁROVÁ, I. *Effect of phenolic compounds on the growth of probiotic bacteria.* 13th World congress on Polyphenols Applications - Abstracts Book. Malta: International Society of Antioxidants, 2019. s. 101-101.

HOOVÁ, J.; KUBÁČKOVÁ, E.; ŽÁČKOVÁ, K.; HÁRONIKOVÁ, A.; MÁROVÁ, I. *Use of yeast strain Malassezia furfur to testing antimicrobial activity of technical cannabis extracts.* 34th Annual Conference on Yeasts, Book of abstracts. 2018. s. 51-51. ISSN: 1336-4839.

HOOVÁ, J.; VYSOKÁ, M.; DZURICKÁ, L.; MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *The Use of Bioactive Compounds and Their Encapsulation into Liposomes to Increase the Effectiveness and Control Release.* Nanocon - Abstracts. 1. Ostrava: TANGER Ltd., 2018. s. 103-103. ISBN: 978-80-87294-85-7.

Projekty:

2022–současnost	Příspěvek k rozvoji moderních potravinářských věd, zahájení: 01. 03. 2022, ukončení: 28. 02. 2023
2021	Vývoj a využití progresivních postupů při zpracování, analýze a hodnocení potravin, potravinářských surovin a odpadů., zahájení: 01. 03. 2021, ukončení: 28. 02. 2022
2020	Aplikace progresivních metod a postupů v rámci moderních potravinářských věd, zahájení: 01. 03. 2020, ukončení: 28. 02. 2021
2019	Využití pokročilých metod a postupů v rámci moderních potravinářských věd, zahájení: 01. 03. 2019, ukončení: 28. 02. 2020
2019	Especiación química, metabolómica y microbiota para el estudio de la transferencia materno-infantil a través de la leche materna y otras muestras biológicas, UHU-1256905, FEDER Andalusian operative program; 2014–2020; výzkumný pracovník v rámci skupiny
2018	Aplikace moderních postupů při výrobě, zpracování a analýze potravin, jejich složek a surovin a při valorizaci odpadů, zahájení: 01. 03. 2018, ukončení: 28. 02. 2019
2014–2018	„Materials Research Centre – udržitelnost a rozvoj“, LO1212; MŠMT; 2014–2018; výzkumný pracovník v rámci skupiny Biotechnologie a biomateriály