VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CEREÁLIE - AKTIVNÍ SLOŽKY, BIOLOGICKÉ ÚČINKY A VYBRANÉ APLIKACE V POTRAVINÁŘSTVÍ

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE — Ing. ANDREA LICHNOVÁ
AUTHOR

BRNO 2013

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CEREÁLIE - AKTIVNÍ SLOŽKY, BIOLOGICKÉ ÚČINKY A VYBRANÉ APLIKACE V POTRAVINÁŘSTVÍ

CEREALS - ACTIVE SUBSTANCES, BIOLOGICAL EFFECTS AND SELECTED APPLICATIONS IN FOOD INDUSTRY

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR
Ing. ANDREA LICHNOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR
doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2013

Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	**FCH-DIZ0082/2013**	Akademický rok:	**2013/2014**
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Student(ka):	**Ing. Andrea Lichnová**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (P2901)		
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901V021)		
Vedoucí práce	**doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.**		
Konzultanti:			

Název dizertační práce:

Cereálie - aktivní složky, biologické účinky a vybrané aplikace v potravinářství

Zadání dizertační práce:

Cílem dizertační práce je:
1) zpracování aktuální literární rešerše zaměřené na - přehled aktivních látek v cereáliích a jejich biologických účinků
2) Vývoj a optimalizace metod zaměřených na izolaci, analýzu, charakterizaci a identifikaci vybraných aktivních látek v cereáliích a cereálních produktech a na hodnocení biologických účinků těchto látek
3) Aplikace zavedených metod na:
- stanovení aktivních složek v modelových cereálních potravinách s využitím tradičních i netradičních cereálií a směsí
- stanovení antioxidační a antimutagenní aktivity cereálních potravin, hodnocení vzájemného vztahu i vztahu k obsahu aktivních složek
- příprava a analýza složení a komplexních biologických účinků vybraných modelových cereálních potravin s aktivní ovocnou složkou
- charakterizace stability a účinků fortifikovaných cereálních potravin a jejich složek v umělém fyziologickém prostředí
- využití vybraných cereálií k produkci obohacené kvasinkové biomasy a mikrobiálních metabolitů.

Termín odevzdání dizertační práce: 20.12.2013

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

- -	- -	- -
Ing. Andrea Lichnová Student(ka)	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc. Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc. Ředitel ústavu

- -

V Brně, dne 1.6.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená dizertační práce je zaměřena na studium biologických účinků aktivních látek vyskytujících se v cereáliích, na vývoj metod k analýze těchto účinků a ke stanovení obsahu aktivních složek a charakterizaci vztahu složení a účinků cereálií a cereálních výrobků. Pro analýzu bylo vybráno několik druhů surových cereálních vzorků (vločky, mouky, klíčky, otruby), ochucené extrudované cereální výrobky a také vzorky loupané a neloupané rýže.

Mezi hlavní typy analyzovaných aktivních látek patří především fenolické látky, a to ve formě glykosidů i aglykonů, a dále sacharidy. Skupinové parametry - celkové polyfenoly, flavonoidy a flavanoly a celkové a redukující sacharidy byly stanoveny spektrofotometricky, individuální fenolické sloučeniny a sacharidy byly stanoveny pomocí kapalinové chromatografie. Ke stanovení antioxidační aktivity cereálií byly použity metody TEAC, DPPH a β-CLAMS, a dále nepřímé metody stanovení obsahu látek s antioxidačním účinkem. Výsledky antioxidační aktivity byly srovnány s hodnotami antimutagenní/genotoxické aktivity s využitím několika mikrobiálních testů. Antimutagenní efekt byl vyjádřen jako procento inhibice účinku standardního mutagenu a představuje potenciální preventivní účinek cereálie proti poškození DNA způsobenému primárně volnými radikály. Nejvyšší hodnoty skupinových i individuálních fenolických látek, antioxidační i antimutagenní aktivity byly nalezeny u klíčků, otrub a pohankových produktů a dále u barevné a neloupané rýže.

U ochucených cereálních výrobků bylo zjištěno, že přidaná složka – zejména čokoláda a ovoce pozitivně ovlivňuje obsah aktivních fenolických látek, sacharidů, antioxidační a antimutagenní aktivity. Na reprezentativním vzorku populace byla provedena dotazníková studie monitorující zájem o cereální výrobky a preference spotřebitelů. Většina spotřebitelů považuje cereálie s čokoládovou příchutí za méně zdravé než potrzují výsledky analýz.

V rámci vývoje nových výrobků bylo připraveno několik typů modelových cereálních směsí obsahujících rostlinné (ovocné, zeleninové) extrakty přidané v lyofilizované a enkapsulované formě. Nejvyšší pozitivní efekt vykazoval přídavek extraktu ze směsi tuzemského lesního ovoce. V rámci přípravy enkapsulovaných extraktů bylo rovněž vyzkoušeno několik metod přípravy částic lipidové nebo polysacharidické povahy. Analyzovaná byla enkapsulační účinnost metod a stabilita a velikost částic. Na základě získaných výsledků lze navrhnout optimální typ fortifikované cereální potraviny s popsaným biologickým účinkem.

Vybrané cereálie byly použity též jako alternativní upravené či surové substráty pro kultivaci mikroorganizmů za účelem produkce obohacené biomasy využitelné v krmivářství.

Závěrem lze konstatovat, že cereálie, ať už ve formě surové nebo technologicky zpracované, jsou všestrannou potravinou a bohatým zdrojem biologicky aktivních látek a poskytují celou řadu možností zpracování. Je možné je využít jak pro přímou konzumaci, jako součást nových výrobků a také nepřímo jako substrát pro krmivářské účely.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cereálie, fenolické sloučeniny, sacharidy, antioxidační a antimutagenní aktivita, fortifikace, nanočástice, obohacená mikrobní biomasa

ABSTRACT

The presented doctoral thesis is focused on the study of the biological effects of active compounds found in cereals, on the development of methods of analysis these effects, on the determination of the content of active substances and characterization of the relationship between composition and biological effects of cereals and cereal products. For the analysis several kinds of raw cereal samples (flakes, flour, germ, bran), flavored extruded cereal products and also samples of paddy and husked rice were chosen.

To major types of analysed active compounds belong mainly phenolic compounds in the form of glycosides and aglycones, and also saccharides. Group parameters such as total polyphenols, flavonoids and total and reducing saccharides were determined spectrophotometrically, individual phenolics and saccharides were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). TEAC, DPPH and β-CLAMS methods were used to determine the antioxidant activity. Indirect methods of determination of substances with antioxidant effect were used as well. Results of the total antioxidant activity were compared with values of antimutagenic/genotoxic activity obtained by several microbial test systems. Antimutagenic effect was expressed as a percentage of inhibition of effect of standard mutagen and could be considered as a potential preventive effect of cereals to DNA arising primarily by free radicals effect. The highest values of group and individual phenolics, antioxidant and antimutagenic activity were found in germs, bran, in buckwheat products and in coloured and raw rice.

In flavoured cereal products addition of chocolate or fruit positively influences content of active phenolic substances as well as sugars, antixidant and antimutagenic activity. In a representative sample of Czech population, questionnairy study was performed to monitor interest in cereals and consumer preferences. The most of consumers consider cereals with chocolate flavour as less healthy than confirmed results of laboratory analyses.

In this study some new food products were developed. Several types of model cereal products containing plant (fruit, vegetables) extracts were proposed. Extracts were added to cereals in freeze-dried and encapsulated form. The highest positive effect exhibited addition of local forrest fruit extract. Within preparation of encapsulated extracts several methods of preparing lipid or saccharides particles were also tested. The encapsulation efficiency of the methods and stability and size of particles were analysed. Optimal type of fortified cereal foods could be suggested based on the acquired results.

Selected cereals were used as alternative carbon substrates (processed or raw) for the cultivation of microorganisms to produce enriched biomass usable in the feed industry.

We can conclude that cereals in raw as well as processed form belong to universal foods and rich sources of biologically active substances. They can be processed by many ways. They can be used for direct consumption, as a part of new products and also undirectly as a substrate for feedstock.

KEYWORDS

Cereals, phenolic compounds, saccharides, antioxidant and antimutagenic activity, fortification, nanoparticles, enriched microbial biomass

LICHNOVÁ, A. *CEREÁLIE - AKTIVNÍ SLOŽKY, BIOLOGICKÉ ÚČINKY A VYBRANÉ APLIKACE V POTRAVINÁŘSTVÍ.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 181 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

....
podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé vedoucí doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. nejen za vědecký, ale také lidský přístup. Velmi si vážím možností a prostoru, který mi během celého studia poskytla.

Děkuji mým spolužákům a kolegům za vytváření příjemného pracovního a přátelského prostředí.

Veliký dík patří také mé rodině a blízkým přátelům za upřímnou podporu během mých studentských let.

Práce byla podpořena z prostředků projektu "Centrum materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně" registrovaného pod číslem CZ.1.05/2.1.00/01.0012/ERDF.

OBSAH

1 Úvod ... 12

2 Seznam použitých zkratek a symbolů ... 13

3 Teoretická část ... 15

3.1 Obiloviny a obilné výrobky ... 15
3.1.1 Obiloviny ... 15
3.1.2 Cereální výrobky ... 15
3.1.3 Složení běžných obilovin ... 16
3.1.4 Vybrané typy cereálních potravin ... 17
3.1.4.1 Funkční potraviny na bázi cereálií ... 17
3.1.4.2 Dětské cereálie ... 17
3.1.4.3 Snídaňové cereálie ... 18
3.1.4.4 Celozrnné výrobky ... 19

3.2 Aktivní látky obsažené v cereáliích ... 19
3.2.1 Aminokyseliny a bílkoviny ... 19
3.2.1.1 Aminokyseliny ... 19
3.2.1.2 Bílkoviny ... 19
3.2.2 Vitaminy a minerály ... 20
3.2.2.1 Vitamin E ... 20
3.2.2.2 Vitamin C ... 20
3.2.2.3 Vitaminy skupiny B ... 20
3.2.2.4 Minerály a stopové prvky ... 20
3.2.3 Fenolické látky ... 20
3.2.3.1 Polyfenoly ... 20
3.2.3.2 Flavonoidy ... 20
3.2.3.3 Fenolické kyseliny ... 23
3.2.3.4 Ligniny a lignany ... 23
3.2.3.5 Alkylresorcinoly ... 23
3.2.3.6 γ-Oryzanol ... 23
3.2.3.7 Betain, cholin ... 24
3.2.3.8 Kyselina fytová (inositolhexafosfát) ... 24
3.2.4 Další antioxidanty cereálií ... 24
3.2.4.1 Karotenoidy ... 24
3.2.4.2 Avenanthramidy ... 24
3.2.5 Sacharidy ... 24
3.2.5.1 Mono- a oligosacharidy ... 24
3.2.5.2 Polysacharidy ... 25
3.2.5.3 Vláknina ... 25
3.2.6 Metody stanovení aktivních látek v cereáliích – analýza obsahu různých typů sacharidů ... 25
3.2.6.1 Fyzikální metody ... 26
3.2.6.2 Fyzikálně-chemické metody ... 26
3.2.6.3 Chemické metody ... 26
3.2.6.4 Enzymatické metody ... 26

3.2.6.5 Chromatografická stanovení ... 26
3.2.7 Metody stanovení aktivních látek v cereáliích – analýza fenolických látek ... 27
3.2.8 Metody stanovení aktivních látek v cereáliích – analýza vitaminů a provitaminů ... 28
3.2.8.1 Stanovení vitaminu C ... 28
3.2.8.2 Stanovení vitaminu E ... 28
3.2.8.3 Stanovení karotenoidů ... 28
3.3 Oxidační stres a obrana organizmu proti jeho důsledkům ... 28
3.3.1 Biologické oxidace a antioxidační systém organizmu ... 28
3.3.1.1 Obrana buňky před účinky oxidačního stresu ... 29
3.3.2 Antioxidační aktivita cereálií ... 29
3.3.3 Metody stanovení antioxidační aktivity založené na eliminaci radikálů ... 30
3.3.3.1 Metoda využívající radikál $ABTS^{\bullet +}$ ... 30
3.3.3.2 Metoda používající radikál DPPH ... 30
3.3.3.3 EPR spektroskopie (elektronová paramagnetická rezonance) ... 30
3.3.3.4 Metoda používající galvinoxyl nebo Fremyho sůl ... 31
3.3.3.5 Metoda TRAP ... 31
3.3.3.6 Metody založené na vychytávání OH-radikálů ... 31
3.3.3.7 Metody založené na vychytávání superoxidového anion-radikálu ... 31
3.3.3.8 Metody hodnotící eliminaci peroxidace lipidů ... 31
3.3.4 Metody stanovení antioxidační aktivity založené na hodnocení redoxních vlastností látek ... 32
3.3.4.1 Metoda FRAP ... 32
3.3.4.2 Cyklická voltametrie ... 32
3.3.4.3 HPLC metoda s elektrochemickou detekcí ... 32
3.3.5 Stanovení specifických skupin antioxidantů ... 32
3.3.5.1 Stanovení individuálních polyfenolických látek ... 32
3.3.5.2 Stanovení celkových polyfenolů - Total Phenolic Content TPC ... 32
3.3.5.3 Stanovení celkových flavonoidů - Total Flavonoid Content TFC ... 33
3.4 Mutageny a metody pro stanovení genotoxické/antimutagenní aktivity ... 33
3.4.1 Mutageny a mutageneze ... 33
3.4.2 Antimutagenní aktivita cereálií ... 34
3.4.3 Testy genotoxicity ... 34
3.4.4 Mikrobiální testy genotoxicity ... 35
3.4.4.1 Amesův test ... 35
3.4.4.2 SOS chromotest ... 35
3.4.4.3 „Green Screen Assay“ ... 35
3.4.4.4 Testování na kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* D7 ... 35
3.4.4.5 Testování na organizmu *Euglena gracilis* ... 36
3.4.5 Testy na savčích buňkách ... 37
3.4.5.1 Test na myším lymfomu (Mouse Lymphoma Assay, MLA) ... 37
3.4.5.2 Comet Assay ... 37
3.4.5.3 Cytogenetická analýza aberací chromozómů lidských periferních lymfocytů ... 37
3.4.5.4 Výměna sesterských chromatid ... 37
3.4.5.5 Test tvorby mikrojader ... 37
3.4.5.6 DNA adukty ... 37
3.4.6 Testy na organizmech ... 38

3.4.6.1 Test na organizmu *Drosophilla melanogaster* ... 38

3.5 Některé možnosti aplikace cereálií v potravinářství a krmivářství ... 38
3.5.1 Fortifikace cereálních potravin ... 38
3.5.1.1 Přídavek volných aktivních látek ... 38
3.5.1.2 Přídavek enkapsulovaných složek ... 39
3.5.2 Využití cereálií jako substrátů pro fermentace (SSF) ... 41
3.5.2.1 Enzymatická hydrolýza cereálních substrátů ... 41
3.5.2.2 Celulázy ... 41
3.5.2.3 Amylázy ... 42
3.5.2.4 Xylanázy ... 42

4 Experimentální část ... 43

4.1 Použité chemikálie ... 43
4.1.1 Chemikálie ... 43
4.1.2 Standardy ... 44
4.1.3 Enzymy ... 44

4.2 Použité mikroorganizmy ... 45

4.3 Použité přístroje a pomůcky ... 45

4.4 Materiál ... 46
4.4.1 Surové cereálie ... 46
4.4.1.1 Vločky ... 46
4.4.1.2 Mouky ... 47
4.4.1.3 Otruby ... 47
4.4.1.4 Klíčky ... 48
4.4.2 Rýžové vzorky ... 48
4.4.3 Ochucené cereálie ... 49
4.4.3.1 Vzorky podrobené enzymatické hydrolýze ... 51
4.4.4 Příprava modelových cereálních kaší ... 51
4.4.4.1 Cereální složka ... 51
4.4.4.2 Ovocná/zeleninová složka ... 51

4.5 Příprava vzorků cereálií pro analýzu ... 51
4.5.1 Příprava vzorků pro spektrofotometrické stanovení fenolických látek a antioxidační aktivity ... 52
4.5.2 Příprava vzorků pro stanovení katechinů, fenolických kyselin a sacharidů metodou HPLC ... 52
4.5.3 Příprava vzorků pro stanovení individuálních flavonoidů metodou HPLC ... 52
4.5.4 Příprava vzorků pro stanovení sacharidů spektrofotometricky ... 52
4.5.5 Příprava vzorků pro stanovení anthokyanů ... 52
4.5.6 Příprava vzorků pro studium antimutagenity ... 53
4.5.7 Příprava vzorků pro enkapsulaci ... 53
4.5.8 Příprava vzorků pro stanovení enkapsulační účinnosti ... 53
4.5.9 Příprava vzorků pro stanovení velikosti a stability částic ... 53
4.5.10 Příprava vzorků pro vizualici elektronovým mikroskopem ... 53
4.5.11 Kyselá hydrolýza ... 53
4.5.12 Enzymatická hydrolýza ... 54
4.5.13 Hydrolýza v prostředí modelových tělních tekutin ... 54

4.5.13.1 Příprava žaludeční šťávy ... 54
4.5.13.2 Příprava pankreatické šťávy ... 54
4.5.13.3 Příprava žlučové šťávy ... 54
4.5.14 Příprava ovoce a zeleniny jako přídavné látky do cereálních přípravků ... 54
4.5.15 Určení vhodné koncentrace částic pro použití v potravinářství ... 54
4.6 Metody ... 55
4.6.1 Stanovení celkových polyfenolů ... 55
4.6.2 Stanovení celkových flavonoidů ... 55
4.6.3 Stanovení celkových flavonolů ... 56
4.6.4 Spektrofotometrické stanovení anthokyanů ... 56
4.6.5 Stanovení katechinů a fenolických kyselin metodou HPLC ... 56
4.6.6 Stanovení individuálních flavonoidů metodou HPLC ... 56
4.6.7 Stanovení celkových sacharidů podle Duboise ... 56
4.6.8 Stanovení redukujicích sacharidů podle Somogyiho - Nelsona ... 57
4.6.9 Stanovení mono a disacharidů metodou HPLC/RI ... 57
4.6.10 Analýza sacharidů ve vzorcích po enzymatické hydrolýze a kultivaci ... 58
4.6.11 Stanovení rozpustného podílu ... 58
4.6.12 Testování antimutagenity na kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* D7 ... 58
4.6.12.1 Kultivace a uchovávání kvasinky *S.cerevisiae* D7 ... 58
4.6.12.2 Příprava selektivních médií ... 58
4.6.12.3 Postup testování antimutagenních účinků ... 59
4.6.13 Studium antimutagenní aktivity s využitím prvoka *Euglena gracilis* ... 60
4.6.13.1 Složení média pro kultivaci ... 60
4.6.14 Studium antimutagenity s využitím bakteriálního kmene Escherichia coli ... 61
4.6.14.1 Příprava kultury pro testování ... 61
4.6.14.2 Příprava média ... 62
4.6.14.3 Příprava aktivačního systému S9 ... 62
4.6.14.4 Studium antimutagenních vlastností ... 62
4.6.15 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS ... 62
4.6.16 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH ... 63
4.6.17 Stanovení antioxidační aktivity metodou β-CLAMS ... 64
4.6.18 Titrační stanovení kyseliny askorbové ... 64
4.6.19 Stanovení kyseliny askorbové metodou HPLC ... 65
4.6.20 Spektrofotometrické stanovení β-karotenu ... 65
4.6.21 Kultivace kvasinky *Rhodotorula glutinis* ... 65
4.6.21.1 Složení médií ... 65
4.6.21.2 Varianty použitého zdroje uhlíku ... 66
4.6.21.3 Stanovení biomasy v produkčních médiích ... 66
4.6.21.4 Stanovení metabolitů v produkčních médiích ... 66
4.6.22 Stanovení enkapsulační účinnosti ... 67
4.6.23 Příprava lipidových částic metodou odpařování na tenké vrstvě (Thin Layer Evaporation, TLE) 67
4.6.24 Příprava lipidových částic metodou odpařování na reverzní vrstvě (Reverse Phase - Thin Layer Evaporation, RP-TLE) ... 67
4.6.25 Příprava lipidových částic metodou ethanolového vstřikování ... 67
4.6.25.1 Izolace lecitinu z vaječného žloutku ... 67

4.6.25.2 Příprava částic ... 67
4.6.26 Příprava polysacharidových částic - chitosanové částice ... 68
4.6.27 Příprava polysacharidových částic - chitosan-alginátové částice ... 68
4.6.28 Stanovení velikosti částic ... 68
4.6.29 Stanovení stability částic - určení zeta-potenciálu ... 68
4.6.30 Stanovení stability částic v modelových tělních tekutinách ... 68
4.6.31 Stanovení vlastností systému použitím analytické centrifugace ... 69

4.7 Senzorická analýza ... 69

5 Cíl ... 70

6 Výsledky a diskuze ... 71

6.1 Studium aktivních látek v cereáliích ... 72
6.1.1 Stanovení fenolických sloučenin ... 72
6.1.1.1 Celkové polyfenoly ... 72
6.1.1.2 Celkové flavonoidy ... 75
6.1.1.3 Celkové flavonoly ... 80
6.1.1.4 Katechiny ... 84
6.1.1.5 Fenolické kyseliny ... 89
6.1.1.6 Flavonoidy ... 94
6.1.2 Stanovení sacharidů v cereálních vzorcích ... 103
6.1.2.1 Celkové sacharidy ... 103
6.1.2.2 Redukujicí sacharidy ... 106
6.1.2.3 Stanovení mono a disacharidů metodou HPLC ... 111

6.2 Stanovení antioxidační aktivity cereálií ... 116
6.2.1 Testování antioxidační aktivity metodou ABTS ... 116
6.2.2 Testování antioxidační aktivity metodou DPPH ... 119
6.2.3 Testování antioxidační aktivity metodou β-CLAMS ... 121

6.3 Stanovení antimutagenních a genotoxických účinků cereálií ... 125
6.3.1 Sledování antimutagenity s využitím kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* D7 ... 125
6.3.2 Sledování antimutagenních vlastností na prvoku *Euglena gracilis* ... 128
6.3.2.1 Optimalizace koncentrace přidaného mutagenu ... 128
6.3.2.2 Testování antimutagenity na cereáliích ... 128
6.3.3 Studium antimutagenních vlastností s využitím bakterie *Escherichia coli* ... 129

6.4 Možnosti využití cereálií v potravinářství a krmivářství ... 129
6.4.1 Charakterizace ochucených cereálních výrobků ... 129
6.4.1.1 Stanovení fenolických látek ... 130
6.4.1.2 Stanovení látek sacharidové povahy ... 132
6.4.1.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS ... 134
6.4.1.4 Studium antimutagenních/genotoxických vlastností ... 135
6.4.1.5 Senzoricko-spotřebitelská analýza vybraných cereálních výrobků ... 135
6.4.2 Využití vybraných hydrolyzovaných cereálních substrátů k produkci obohacené krmné mikrobiální biomasy ... 137
6.4.2.1 Hydrolýza odpadních substrátů vybranými komerčními enzymy ... 137

6.4.2.2 Analýza vybraných mono- a disacharidů v hydrolyzovaných odpadech metodou HPLC/RI 138
6.4.2.3 Analýza redukujicích sacharidů v médiích s odpadními substráty hydrolyzovanými směsnými plísňovými enzymovými preparáty ... 139
6.4.2.4 Analýza růstových a produkčních vlastností kvasinky *R.glutis* na hydrolyzovaných odpadních substrátech ... 139
6.4.3 Možnosti fortifikace cereálií pro dětskou výživu ... 141
6.4.3.1 Stanovení vybraných aktivních látek fenolické povahy ... 142
6.4.3.2 Stanovení látek sacharidové povahy ... 147
6.4.3.3 Analýza mono a disacharidů ve vzorcích po kyselé hydrolýze ... 152
6.4.4 Enkapsulace ovocných extraktů ... 155
6.4.4.1 Stanovení enkapsulační účinnosti ... 155
6.4.4.2 Stanovení velikosti částic ... 156
6.4.4.3 Určení stability částic stanovením zeta-potenciálu ... 156
6.4.4.4 Stabilita částic v modelových tělních tekutinách ... 157
6.4.4.5 Analýza vlastností systému pomocí analytické centrifugace ... 157
6.4.4.6 Stanovení vhodné koncentrace částic pro použití v potravinářství ... 159
6.4.4.7 Vizualizace částic pod mikroskopem ... 159

7 Závěry ... 161

8 Literatura ... 164

9 Seznam příloh ... 174

10 Přílohy ... 175

11 Životopis ... 178

12 Publikační činnost ... 179

1 ÚVOD

Ve stále se zhoršujícím životním prostředí navíc ve spojení s „moderním“ životním stylem narůstá také počet stimulantů potenciálních rizik chronických onemocnění. Organizmus je oslaben a snáze podléhá vnějším i vnitřním atakům například volných radikálů. Jejich vlivem mohou vznikat různá civilizační onemocnění, z nichž některá jsou velmi závažná a významně ovlivňují kvalitu života. Jednou z preventivních možností před civilizačními chorobami je úprava životního stylu a stravovacích návyků spojená s konzumací čerstvého ovoce a zeleniny a také cereálií a celozrnných výrobků [1]. K tomu je však třeba mít objektivní podklady o skutečném účinku aktivních složek rostlinných potravin, které patří ke komplexním typům biologického materiálu.

Obiloviny (cereálie) jsou vyšlechtěné jednoleté trávy: pšenice, žito, žitovec (Triticale), ječmen, oves, proso, čirok, rýže, kukuřice a další. Mezi obiloviny řadíme, pro jejich význam v potravě a podle technologie pěstování, také pohanku, laskavec a merlíky. Jedná se také o jednoleté rostliny, ale patřící do třídy dvouděložných rostlin (*Dicotyledone*). Tyto rostliny vyčleňujeme do skupiny nazývané pseudocereálie [2].

Obilí a celozrnné potravinové výrobky představují důležitou součást lidské stravy. Poskytují vysoké podíly sacharidů, proteinů, tuků, potravní vlákniny, vitaminů skupiny B a minerálů. V mnoha zemích nalézáme vzrůstající využívání cereálií v dietních preparátech pro léčbu a prevenci diabetu, kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny tlustého střeva a snižování hladiny cholesterolu v krvi, které signalizují jejich potenciální léčebnou hodnotu pro lidi. Jsou esenciálními pro moderní potravinářský průmysl při výrobě funkčních potravinových přísad [3]. Funkční potraviny obsahují vedle základních živin některé další látky, které pozitivně ovlivňují specifické metabolické pochody živého organizmu a mají tak pozitivní vztah k jeho zdravotnímu stavu. Z tohoto hlediska je dnes pozornost věnovaná funkčním potravinám a látkám, které jim tuto „funkčnost“ zabezpečují. Předmětem vědeckého výzkumu jsou v současné době různé fenolické sloučeniny, flavonoidy, tokoferoly, karotenoidy, β-glukany, glukosinoláty, terpenoidy, katechiny, saponiny, fytoestrogeny, resveratrol, stilbeny, sulforafan, vitamin C, chlorofyl a další, z nichž řada je obsažena právě v cereáliích [4].

Obiloviny mohou být používány jako zdroje nestravitelných sacharidů, které ještě navíc podporují různé fyziologické účinky, mohou selektivně stimulovat růst laktobacilů a bifidobakterií přítomných v tlustém střevě a působit jako prebiotika. Cereálie také obsahují ve vodě rozpustnou vlákninu, např. β-glukan a arabinoxylan; oligosacharidy, např. galakto- a fruktooligosacharidy a nestravitelnou vlákninu, která je vhodná k naplnění prebiotického konceptu [5].

Podle epidemiologických studií lze snížit výskyt tzv. civilizačních onemocnění úpravou stravy a stravovacích návyků. Vysoká konzumace látek s antimutagenním a antioxidačním účinkem může působit preventivně či ochranně a snížit incidenci a důsledky onemocnění. Z tohoto důvodu je studium aktivních rostlinných látek stále aktuální a důležité [6].

2 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AAPH	2,2-azinobis(izobutyrimidamid)-dihydrochlorid
AAPM	4-aminoantipyrine method
ABAP	2,2-azobis(2-aminodinopropan)hydrochlorid
ABTS	2,2 azinobis-(3-ethyl-2,3-dihydrobenzo-thiazol-6-sulfonát)
ADB	Asian Development Bank
AK	Aminokyselina
β-CLAMS	β-Carotene Linoleic Acid Model System
CL	Chemiluminiscence
DAD	Diode Array Detector
DLS	Dynamic Light Scattering
DMPO	2,2-dimethyl-2H-pyrrol-1-oxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
DPPH-H	difenylpikrylhydrazin
E_A	Anodický oxidační pík
EPR	Elektronová paramagnetická rezonance
ESR	Elektronová spinová rezonance
EV	Ethanolové vstřikování
FAO	Food and Agriculture Organization (Organizace OSN pro výživu a zemědělství)
FRAP	Ferric Reducting Antioxidant Potential
GAE	Gallic Acid Equivalent
GAIN	Global Aliance for Improve Nutrition
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC/ECD	High Performance Liquid Chromatography/Electrochemical Detector
HPLC/RI	High Performance Liquid Chromatography/Refractometric Identicication
Ch	Chitosanové částice
Ch-A	Chitosan-alginátové částice
I_A	Anodický proud
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectometry
MDA	Malondialdehyd
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid fosfát
ND	Nedetekováno
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PBM	Price-Butler Method
PDA	Photo Diode Array
PVA	Polyvinyl Alcohol
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RP-HPLC	Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography
RP-TLE	Reverse Phase - Thin Layer Evaporation
RTE	Ready To Eat
SEM	Scanning Electron Microscopy

SSF	Solid State Fermentation
TAS	Total Antioxidant Status
TBA	Thiobarbituric Acid
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TK	Tymidinkináza
TLE	Thin Layer Evaporation
TPTZ	2,4,6tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin
TRAP	Total Radical-Trapping Potential
UNICEF	United Nations International Children's Emergency Fund (Dětský fond OSN)
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
USAID	United States Agency for International Development
UV/VIS	Ultraviolet/Visible
WST-1	1[2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Obiloviny a obilné výrobky

3.1.1 Obiloviny

Obiloviny jsou hlavními kulturními plodinami v mnoha zemích, kde slouží buď přímo jako lidská potrava nebo nepřímo jako krmivo pro zvířata. Mohou být hlavním zdrojem energie, zejména ve formě sacharidů, ale i nutričně důležitých proteinů. Nicméně cereálie neobsahují optimální zastoupení aminokyselin, poněvadž některých esenciálních aminokyselin, např. lysinu, neobsahují dostatečné množství [7].

Pro lidskou výživu se přímo používá z obilovin výhradně zrno. Obiloviny patří botanicky mezi traviny - lat. *Gramineae*. Téměř všechny známé obiloviny patří do čeledi lipnicovité, lat. *Poaceae*. Výjimku tvoří pohanka, patřící do čeledi rdesnovité (*Polygonaceae*). V posledních letech se také porůznu začala uplatňovat další semena, např. amarant, patřící do čeledi amarantovité (*Amaranthaceae*). Společný botanický původ obilovin čeledi lipnicovité předurčuje jejich značnou vzájemnou podobnost jak ve struktuře a tvorbě zrna, tak v jeho chemickém složení, v zastoupení jednotlivých aminokyselin v obilné bílkovině nebo mastných kyselin v tukových složkách. Vlivem různých klimatických podmínek a během staletí šlechtění a pěstování se však současně vytvořily odlišnosti mezi jednotlivými botanickými rody a druhy obilovin i mezi jednotlivými odrůdami téhož druhu. Možnosti a výsledky šlechtění posledních desetiletí rozčlenily v mnoha případech i odrůdy stejné obiloviny pro určitá speciální použití. Další teoretickou možnost ovlivnění specifických zpracovatelských vlastností poskytují genové manipulace [8].

3.1.2 Cereální výrobky

Cereální výrobky se řadí mezi potraviny s vysokým stupněm inovace, mnohem vyšším než v kterémkoliv jiném potravinářském odvětví. Vývoj nových výrobků reflektuje požadavky spotřebitelů, ale v současné době především názory odborníků na výživu a lékařů, a přispívá tak k řešení zdravotních problémů populace. Na druhé straně se ale zvyšuje zájem rovněž o výrobky luxusní, energeticky bohaté, bio- či organické a o celou řadu výrobků etnických. Mezi těmito trendy se v současné době prosazuje především výroba širokého sortimentu celozrnných potravin a hotových moučných směsí a premixů usnadňujících výrobu různých speciálních výrobků, dále fortifikace cereálních produktů (především mouky), zmrazování těst a hotových pekařských výrobků a extruzní výroba snídaňových cereálií a další [9].

Na trhu se objevují zejména následující výrobky:

- celozrnné,
- se sníženým energetickým obsahem a zvýšeným obsahem vlákniny,
- bez cholesterolu, s redukovaným obsahem tuku nebo zcela bez tuku,
- se sníženým obsahem soli, resp. sodíku,
- s časově nenáročnou přípravou, zejména s možností využití mikrovlnné energie, mražené nebo instantní,
- s prodlouženou trvanlivostí, bez chemických aditiv a konzervačních prostředků,
- ve vhodném obalu a přiměřených porcích,
- fortifikované vitaminy (kyselina listová, vitamin C), minerálními látkami, omega-3 mastnými kyselinami, β-glukany a dalšími látkami,
- s netradičními přísadami nebo z netradičních surovin,
- pro určité věkové kategorie populace a nejrůznější typy diet,

- výrobky deklarované jako zcela bez geneticky modifikovaných organizmů [9].

3.1.3 Složení běžných obilovin

Téměř všudypřítomná spotřeba cereálií po celém světě z nich činí velmi důležitou složku lidské výživy. Kromě vysokého obsahu škrobu jako zdroje energie obsahují cereálie také vlákninu, bílkoviny, sacharidy a tuky bohaté na esenciální mastné kyseliny [10].

Tab. 1 Rozmezí uváděných obsahů hlavních složek obilného zrna [11]

složka	pšenice	žito
bílkoviny	9,0 – 15,5	8,5 – 13,5
sacharidy	75 – 82	78 – 86
vláknina	1,9 – 3,2	1,9 – 3,2
lipidy	2,0 – 2,8	1,6 – 2,7
minerály	2,0 – 3,0	1,8 – 2,3

Hlavní složení živin (škrob, proteiny, popel a tuk) pšeničné mouky a celých obilných zrn je uvedeno v Tab. 1 . Rafinované mouky z tvrdé a měkké pšenice mají vyšší obsah škrobu, což je způsobeno odstraněním vláknitých vnějších obalových vrstev během mlecího procesu. Ječmen a žito obsahují v celých obilných zrnech relativně méně škrobu ve srovnání s prosem a čirokem. Škrob, hlavní zdroj energie v rostlinné stravě, je dále rozdělován na základě stravitelnosti na rychle stravitelný, pozvolna stravitelný a odolný škrob. Tyto výživné frakce jsou různé v obilných zrnech a závisí na odrůdě, přípravě mouky a výrobních podmínkách [12].

Tab. 2 Chemické složení (% suchého podílu) pšeničné mouky a celých obilných zrn [12]

cereálie	škrob	proteiny	celkový popel	hrubý tuk
tvrdá pšenice	77,4 ± 1,7	13,5 ± 0,3	0,56 ± 0,01	0,98 ± 0,03
měkká pšenice	77,9 ± 1,8	11,0 ± 0,2	0,71 ± 0,01	0,86 ± 0,03
ječmen	53,6 ± 1,0	19,4 ± 0,4	2,88 ± 0,04	2,31 ± 0,1
proso	67,4 ± 1,3	8,8 ± 0,1	1,82 ± 0,03	4,22 ± 0,2
žito	58,0 ±1,0	13,3 ± 0,2	1,96 ± 0,03	2,53 ± 0,1
čirok	67,7 ± 1,2	12,1 ± 0,1	1,87 ± 0,03	3,32 ± 0,1

Obsah proteinů v obilovinách je značně rozmanitý. Celozrnná strava má vysoký obsah celkového popelu i minerálů ve srovnání s rafinovanou pšeničnou moukou (Tab. 2). Hrubé tuky se pohybují v rozmezí od 0,9 % v měkké pšeničné mouce do 4,2 % v zrnu prosa. Vysoké koncentrace v celozrnných produktech jsou způsobeny přítomností zárodku, ve kterém je olej koncentrován [12].

Obsah lipidů v běžných obilovinách je poměrně nízký, nejvyšší podíl byl nalezen v prosu (Tab. 2). Hlavními složkami lipidů v prosu jsou triacylglyceroly, zbytek tvoří steroly, estery, uhlovodíky a volné mastné kyseliny. V oleji z prosa je přibližně 84 % nenasycených zbytků mastných kyselin. Lipidy v čiroku jsou též vysoce nenasycené, kyselina olejová a linolová tvoří nejméně 76 % z celkových mastných kyselin. Největší část lipidů v ječmenu tvoří triacylglyceroly, které jsou primárně zastoupeny palmitovou, olejovou, linolovou a linolenovou kyselinou [12].

Fytochemikálie a antioxidanty v celých zrnech bývají spojovány s redukcí rizika rozvoje chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, diabetes 2. typu a některé druhy rakoviny. Většina fenolů celých zrn je ve vázané formě, 85 % v kukuřici, 76 % v pšenici a 75 % v ovsu. Obvykle jsou fytochemikále přítomny ve frakci otruby/klíček. V celozrnné pšeničné mouce se ve frakci otruby/klíček vyskytuje 83 % z celkového obsahu fenolů, 79 % z obsahu flavonoidů, 78 % zeaxanthinu, 51% luteinu a 42 % *β*-kryptoxanthinu [13].

Cereálie obsahují širokou škálu fenolických a polyfenolických sloučenin, jako např. kyselinu benzoovou a skořicovou, anthokyany, chinony, flavonoly, chalkony, flavanony a aminofenoly, β-glukany (ovesné otruby a ječmen) a různé vitaminy [14]. Fenoly a polyfenoly nalezneme v mnoha potravinách z rostlinné říše, dosud je známo přes 8 000 přírodních sloučenin. Mohou být klasifikovány jako jednoduché fenoly, které obsahují jediný fenolový kruh; zahrnují také fenolické kyseliny a alkylresorcinoly. Polyfenoly obsahující dva fenolové kruhy zahrnují skupiny jako dehydrodimery kyselin, lignany, flavonoidy. Sloučeniny obsahující tři a více podjednotek jsou nazývané tanniny. V zrnech jsou fenolické sloučeniny volné nebo vázané jako glykosidy, estery nebo v komplexech se součástmi buňky jako například s polysacharidy nebo proteiny [15]. Množství polyfenolů se v cereáliích velmi liší a závisí na tom, zda je zohledněno celé zrno nebo jen jeho část (např. klíček, otruby), na druhu obiloviny a také na způsobu zpracování [14].

3.1.4 Vybrané typy cereálních potravin

3.1.4.1 Funkční potraviny na bázi cereálií

Pojem funkční potraviny v sobě zahrnuje potraviny nebo složky potravin, které přinášejí zdraví prospěšný účinek na organizmus konzumenta nebo snižují výskyt chronických onemocnění nad rámec základních výživových přínosů. Funkční potraviny pomáhají snižovat vysoký krevní tlak, cholesterol, krevní cukr a riziko osteoporózy. V poslední době výzkum zavádí další dva pojmy: probiotika a prebiotika. *Probiotika* jsou potraviny obsahující živé mikroorganizmy. *Prebiotika* jsou pro člověka nestravitelné části potravy, které však jako potrava slouží pro střevní mikroflóru. Oba typy potravin mohou ovlivnit složení střevní mikroflóry a aktivitu střev vůbec [5].

Cereálie jsou esenciálními surovinami pro moderní potravinářský průmysl při výrobě funkčních potravinových přísad [3]. Možné využití cereálií nebo složek cereálií pro funkční potraviny je následující:

a) fermentovatelné substráty pro růstu probiotických mikroorganizmů, především laktobacilů a bifidobakterií
b) zdroj vlákniny
c) jako prebiotika díky obsahu specifických nestravitelných polysacharidů
d) jako materiál pro enkapsulaci probiotik (za účelem zvýšení stability) [5].

3.1.4.2 Dětské cereálie

Dětské cereálie jsou nejběžnější potravinou podávanou dětem po ukončení kojení. Jak dítě roste, mateřské mléko brzy nestačí pokrývat veškeré výživové nároky. Dětské cereálie mají vysoký energetický obsah spočívající v obsahu sacharidů (78 %) a bílkovin (13 %). Obvykle je používána rýžová a kukuřičná mouka (bezlepková), ječná, pšeničná, žitná, ovesná (ostatní s lepkem). Nutriční hodnota takových cereálních výrobků je však velmi malá, proto musí být dále upraveny. Zpracování komerční cereální výživy představuje opékání, vaření,

enzymatickou hydrolýzu, fortifikaci funkčními faktory (železo, vitamin C a E, rostlinné oleje, smetana, syrovátkové bílkoviny), sušení pro zlepšení senzorických vlastností, lepší stravitelnost a snadnější skladovatelnost a zlepšení biodostupnosti funkčních faktorů po požití [16].

Strava s vysokou nutriční hodnotou je pro dítě v tomto období velmi důležitá, zejména pro správný vývoj a růst. Navíc vliv správné výživy v průběhu kojeneckého věku a dětství se neprojeví okamžitě, ale mnohdy má vliv až v pozdějším dospělém věku. Nedostatečný přísun minerálů v prvním roce věku může způsobovat nemoci jako je chudokrevnost z nedostatku železa, křivice, osteoporóza a imunologické nemoci. Úpravy dětských cereálních výrobků mohou zvyšovat stravitelnost bílkovin, přesto se často tyto potraviny kombinují s kravským nebo mateřským mlékem [16].

Kromě výživové hodnoty hraje důležitou roli také chuť a vůně, které stimulují dítě k jídlu a významně přispívají k jeho radosti z jídla [16].

3.1.4.3 Snídaňové cereálie

Výroba snídaňových cereálií je jednou z hlavních oblastí zpracování obilovin s perspektivou výrazného a nepřetržitého růstu, a to především v evropských zemích, kde se neustále rozšiřuje jejich sortiment, a to i pokud jde o luxus provedení. Vyrábějí se nejrůznější druhy s etnickým charakterem, s přídavky pseudocereálií, s tropickým ovocem aj. Nejvyšší spotřeba cereálních snídaní je ve Velké Británii (cca 8 kg osoba/rok). Druhým největším konzumentem jsou Australané, následují Američané a Kanaďané. Průměrná spotřeba v Evropě (kromě Velké Británie) se pohybuje kolem 1 kg osoba/rok [17].

Ve spotřebě dominují tzv. RTE („ready to eat“) cereální snídaně vyráběné obvykle na bázi kukuřice, pšenice, rýže nebo směsí cereálií. Patří sem široká škála výrobků typu müsli s přídavkem sušeného ovoce, čokolády, medu, ořechů, obilných klíčků, otrub, jader olejnin, amarantových semen atd. Snídaňové cereálie jsou významným zdrojem vitaminů a dalších nutrientů zejména pro děti a představují tak důležitou kategorii pro potravinářský vývoj a výrobu. Díky fortifikaci bývají cereální snídaně dobrým zdrojem vitaminu D a mohou tak pokrývat u dětí i více než 20 % průměrného příjmu tohoto vitaminu. Cereální snídaně rovněž mohou podle nejnovějších výzkumů napomáhat u školních dětí udržovat mnohem lépe pozornost a zvyšovat mentální výkony v porovnání s dětmi, které nesnídají, nebo pouze pijí glukózové nápoje. U dospělých zvyšuje konzumace cereálních snídaní s vysokým obsahem vlákniny a sacharidů pozornost a napomáhá soustředění během dne [17].

Při studiu frekvence konzumace snídaňových cereálií ve srovnání s dalšími typy potravin konzumovaných ke snídani, přísunem makro- a mikronutrientů, nápojů, ovoce a zeleniny a fyzické aktivity byly zjištěny následující skutečnosti:

- Cereálie konzumované ke snídani poskytují více vlákniny, železa, kyseliny listové a zinku a méně tuku, sodíku, cukru a cholesterolu ve srovnání s živinami v potravinách konzumovaných během jiných typů snídaní.
- Konzumace cereálií ke snídani usnadňuje konzumaci mléka (vedoucí ke zvýšení příjmu vápníku) a nahrazení tuků/sladkostí, pečiva, sody a masa/vajíček jako snídaňových potravin. Příjem cereálií ke snídani je spojen se vzrůstající konzumací vlákniny a sacharidů a snížením konzumace tuků během dne.
- S cereální snídaní bývá také spojována větší fyzická aktivita [18].

3.1.4.4 Celozrnné výrobky

Obilné zrno je obecně tvořeno třemi hlavními částmi, označovanými jako *otruby* (oplodí a osemení), *endosperm* (jádro obsahující škrob a bílkoviny) a *klíček*. U naší nejběžnější obiloviny – pšenice, je poměr zastoupení těchto částí zhruba 15 %, 82 % a 3 %. Jestliže se zrno rozemílá s cílem získat celozrnný produkt (mouku), musí ve finálním produktu zůstat zachovány všechny tři jmenované složky ve stejném poměru jako v původním zrnu [19].

Celozrnná pšeničná mouka tedy obsahuje rozemleté celé pšeničné zrno, tj. otruby, endosperm a klíček, zatímco běžná pšeničná mouka (hladká, polohrubá, hrubá) je v podstatě pouze endosperm. Celozrnná mouka má mnohem vyšší obsah důležité potravní vlákniny, některých vitaminů (zejména skupiny B, vitaminy D a E), enzymů, minerálních látek a stopových prvků. Doba údržnosti celozrnné mouky je ale podstatně kratší než u běžné pšeničné mouky, protože v celozrnné mouce dochází ke žluknutí tuků z obsažených rozemletých pšeničných klíčků [20].

Nejběžnějšími druhy celozrnných potravin jsou chléb a pečivo (běžné i jemné), mouky, hotové směsi, těstoviny a v menší míře i některé další jako dětská výživa či nápoje [19].

Univerzální, po všech stránkách vyhovující definice termínu „celozrnný“ dosud nebyla přijata. Jako poměrně dostačující lze považovat následující formulaci: „celozrnným chlebem nebo celozrnným pečivem je pekařský výrobek, jehož těsto musí obsahovat z celkové hmotnosti mlýnských obilných výrobků nejméně 80 % celozrnných mouk nebo jim odpovídající množství upravených obalových částic z obilky“ [19].

3.2 Aktivní látky obsažené v cereáliích

Kromě základních výživových složek obsahují celozrnné cereálie celou škálu sloučenin s potenciálním antioxidačním účinkem. Některé, jako např. vitamin E, jsou považovány za přímé lapače volných radikálů, zatímco jiné za kofaktory antioxidantů (selen, mangan, zinek) nebo za nepřímé antioxidanty (foláty, cholin, betain) [21,22].

3.2.1 Aminokyseliny a bílkoviny

3.2.1.1 Aminokyseliny

Cereálie obsahují esenciální (leucin, threonin, lysin, tryptofan) a neesenciální (alanin, asparagová kyselina, asparagin, glutamová kyselina, glutamin, prolin) aminokyseliny [23]. Jsou také dobrým zdrojem sirných aminokyselin - methioninu (esenciální) a cysteinu. Cystein z potravy přispívá k syntéze glutathionu, což je hlavní endogenní antioxidant [21].

3.2.1.2 Bílkoviny

Obiloviny, především pšenice, jsou z rostlinného materiálu pro člověka nejvýznamnějším zdrojem bílkovin. Obsah proteinů vnějších částí obilného zrna je výrazně vyšší než u vnitřních částí. Proto množství proteinů v mouce značně závisí na stupni vymletí, samozřejmě také na druhu, odrůdě a dalších faktorech. Tmavé celozrnné mouky mají vyšší obsah proteinů, rozdíl bývá až 4 %. Základními bílkovinami všech obilovin jsou albuminy, globuliny, gliadiny a gluteiny. Zásobní bílkoviny gliadin (prolamin) a glutenin s vodou vytvářejí lepek, který pozitivně ovlivňuje pekárenské vlastnosti pšenice, u zvířat však může způsobovat trávicí potíže a u citlivých lidí způsobuje alergickou reakci [23].

3.2.2 Vitaminy a minerály

3.2.2.1 Vitamin E

Chrání buněčné membrány před účinky oxidace nenasycených lipidů, vychytává lipidové peroxylové radikály $ROO^{\bullet}$ a reaguje se singletovým kyslíkem a dalšími reaktivními formami kyslíku a dusíku, případně je zháší [21,24]. Biodostupnost vitaminu E z potravy je velmi dobrá. Z cereálií se nejvíce vyskytuje v celém kukuřičném zrnu a žitě, zatímco ječmen, oves, proso, čirok a pšenice jej obsahují velmi málo [21].

3.2.2.2 Vitamin C

Tento vitamin je v cereáliích zastoupen jen ve stopovém množství, a to především v klíčcích [25].

3.2.2.3 Vitaminy skupiny B

V cereáliích se vyskytují kromě kobalaminu všechny vitaminy skupiny B. Obiloviny jsou obecně dobrým zdrojem vitaminů B, které se nachází především v povrchových vrstvách, takže zpracováním, především vymíláním, jejich obsah klesá [26]. Foláty (vitamin B9) patří mezi nepřímé, zato velmi významné antioxidanty. Cereálie jsou středně bohatý zdroj, ve větší míře jsou foláty zastoupeny v žitu a kukuřici [21].

3.2.2.4 Minerály a stopové prvky

Minerály, jako zinek a železo, a stopové prvky, jako selen, měď a mangan, jsou kofaktory několika enzymů s antioxidačními účinky, např. Zn, Cu a Mn u superoxiddismutázy, Se u glutathionperoxidázy a thioredoxinreduktázy, Fe u katalázy. Obsah těchto prvků se v závislosti na druhu rostliny a místu pěstování velmi liší, především to platí pro Se [21].

3.2.3 Fenolické látky

3.2.3.1 Polyfenoly

Z polyfenolických sloučenin bývají v cereálních zrnech obvykle přítomny fenolické kyseliny a flavonoidy. Běžně se vyskutují kyselina ferulová, vanilková, kávová, syringová a *p*-kumarová. Z flavonoidů jsou to flavonoly, flavan-3-oly (katechiny), flavony a flavanony [27] a anthokyany [28]. Přehled fenolických látek přítomných v cereáliích je uveden v Tab. 3

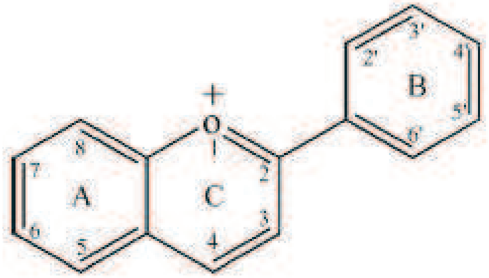
Nejvíce fenolických sloučenin je lokalizováno v nejokrajovějších aleuronových vrstvách, otrubách a klíčcích zrn. Většinou jsou kovalentně vázané na polymery buněčné stěny a musí být uvolněny alkalickou nebo kyselou hydrolýzou [29].

Antioxidační aktivita jednotlivých polyfenolů se liší v závislosti na jejich proton-donorové kapacitě [6]. K zásadním faktorům, které mohou ovlivňovat přítomnost a distribuci ostatních fenolických sloučenin a konečný antioxidační účinek cereálního výrobku patří odrůda, životní prostředí, podmínky pěstování a mlecí či rafinační postupy [28,29].

3.2.3.2 Flavonoidy

Flavonoidy představují největší třídu fenolických sloučenin. V rostlinách jsou běžnými a velmi rozšířenými sekundárními metabolity [27,30]. Většina flavonoidů je v buňkách přítomna jako glykosidy, které lze rozdělit na *C*-glykosidy a *O*-glykosidy podle vazby flavonoidu na sacharid [27]. Glykosidické formy fenolických sloučenin jsou méně reaktivní a mají obecně slabší protiradikálové vlastnosti než jejich aglykony [6,27].

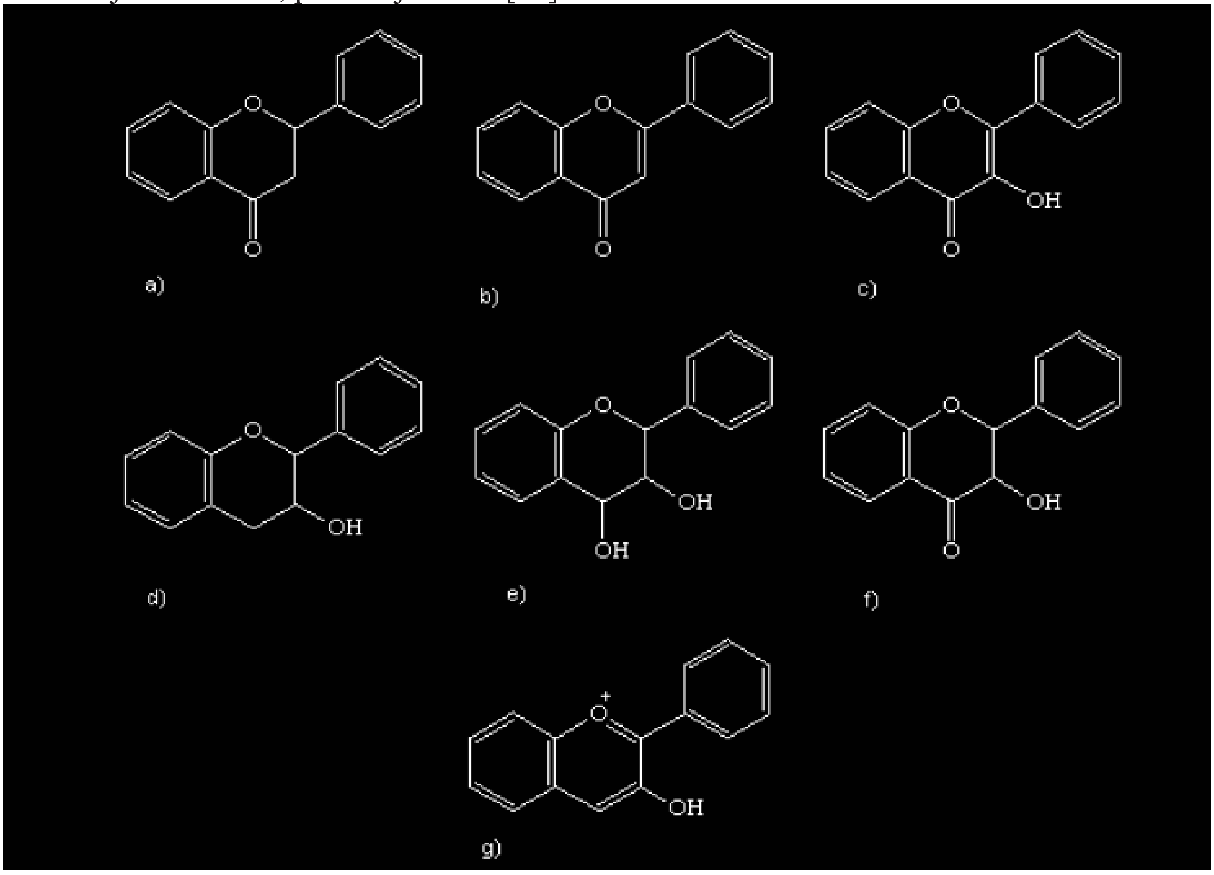
U flavonoidů je schopnost vychytávání volných radikálů závislá především na počtu hydroxylových skupin a jejich poloze v molekule. Hydroxylová skupina na B kruhu poskytuje vodík a elektron hydroxylovému, peroxylovému, peroxynitrilovému radikálu, stabilizuje je a dává vzniknout poměrně stabilnímu flavonoidnímu radikálu [6]. Antioxidační síla souvisí s delokalizací aromatického jádra s nepárovými elektrony [21,24].



Obr. 1 Molekula flavanu, od níž je odvozena základní struktura flavonoidů [31]

Mezi hlavní flavonoidy studované v cereáliích patří anthokyany. Jsou to ve vodě rozpustná barviva, která se podílí na modrém, fialovém a červeném zabarvení rostlin a nachází se v oplodí barevných variet ječmene, kukuřice, rýže, žita a pšenice [28].

Z polymerních flavanolových jednotek sestávají kondenzované tanniny neboli třísloviny. V porovnání s monomerními jednotkami mají mnohem vyšší *in vitro* antioxidační aktivitu. Nacházejí se v čiroku, prosu a ječmeni [28].



Obr. 2 Obecná struktura flavonoidnách látek: a) flavanony, b) flavony, c) flavonoly, d) katechiny, e) leukoanthokyanidiny, f) flavanonoly, g) anthokyanidiny [25]

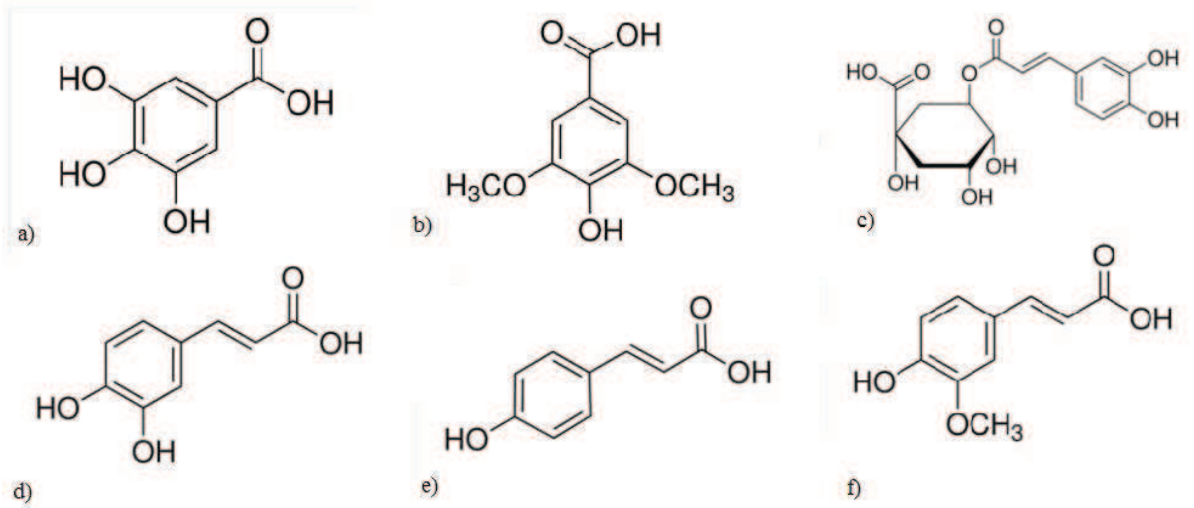
Tab. 3 Obsah fenolických kyselin v cereálních produktech (mg/kg čerstvé hmotnosti) [31]

vzorek	HS (%)	kyselina kávová	kyselina ferulová	kyselina sinapová	kyselina protokate-chuová	kyselina vanillová	kyselina p-kumarová	kyselina p-hydroxy-benzoová	kyselina syringová	dehydrodimer kyseliny ferulové	celkem
žitná mouka, celozrnná	90	10 ± 2,0	860 ± 71	120 ± 12	9,4 ± 1,6	22 ± 2,8	41 ± 2,8	6,8 ± 0,87	6,7 ± 0,33	290 ± 25	1366
žitná mouka, ekologicky pěstovaná, celozrnná	91,3	4,2 ± 0,49	860 ± 79	130 ± 13	nd[c]	30 ± 3,8	64 ± 4,4	9,7 ± 0,89	10 ± 1,2	254 ± 5,7	1362
žitné otruby	90	77 ± 12	2800 ± 150	480 ± 30	26 ± 0,08	46 ± 2,5	140 ± 16	24 ± 1,2	17 ± 0,42	580 ± 32	4190
žitný chléb, celozrnný	60,1	1,9 ± 0,15	540 ± 25	74 ± 5,1	nd	16 ± 2,2	28 ± 0,83	4,6 ± 0,39	7,3 ± 0,90	93 ± 16	765
celozrnná pšeničná mouka	89,7	37 ± 1,4	890 ± 40	63 ± 3,6	nd	15 ± 0,83	37 ± 1,2	7,4 ± 0,06	13 ± 0,007	280 ± 16	1342
bílá pšeničná mouka	88,2	nd	120 ± 12	8,0 ± 0,01	nd	4,0 ± 0,57	3,8 ± 0,32	2,1 ± 0,22	2,7 ± 0,32	26 ± 1,4	167
bílá pšeničná mouka, ekologicky pěstovaná	91,3	nd	100 ± 7,1	8,0 ± 0,75	nd	3,7 ± 0,14	5,3 ± 0,39	2,3 ± 0,12	2,2 ± 0,14	28 ± 5,4	150
pšeničné otruby	90,4	38 ± 4,0	3000 ± 180	200 ± 32	9,6 ± 0,62	35 ± 4,7	90 ± 9,8	22 ± 1,4	32 ± 3,7	1100 ± 78	4527
bílý pšeničný chléb	68,8	nd	82 ± 2,3	6,9 ± 0,88	4,7 ± 0,51	2,6 ± 0,07	2,8 ± 0,18	1,6 ± 0,25	nd	10 ± 0,03	111
těstoviny	90,3	nd	120 ± 7,3	17 ± 0,94	nd	nd	3,6 ± 0,10	2,4 ± 0,10	nd	13 ± 2,9	156
ječmenná mouka, celozrnná	90,3	1,7 ± 0,13	250 ± 32	11 ± 1,7	1,6 ± 0,15	7,1 ± 0,83	40 ± 4,9	3,1 ± 0,53	5,0 ± 0,33	130 ± 13	450
ovesné otruby	90,3	5,4 ± 0,15	330 ± 30	90 ± 18	nd	24 ± 2,4	12 ± 0,22	22 ± 2,3	28 ± 3,6	140 ± 21	651
pohankové krupky, celozrnné	90,9	85 ± 8,7	12 ± 0,69	21 ± 1,0	nd	5,3 ± 0,32	15 ± 0,89	110 ± 14	nd	nd	248
ovesné vločky, celozrnné	91,2	3,1 ± 0,18	250 ± 18	55 ± 2,4	nd	18 ± 1,5	nd	16 ± 1,8	20 ± 1,5	110 ± 0,71	472
ovesné vločky, předvařené, celozrnné	90,5	3,6 ± 0,32	250 ± 28	52 ± 6,8	nd	17 ± 0,81	nd	16 ± 0,83	20 ± 1,4	110 ± 4,9	469
krupky prosa	89,4	1,1 ± 0,11	260 ± 7,9	nd	nd	11 ± 1,8	18 ± 1,3	3,0 ± 0,15	2,1 ± 0,95	78 ± 9,2	373
kukuřičná mouka	88,9	26 ± 1,0	380 ± 14	57 ± 2,9	nd	4,6 ± 0,33	31 ± 1,5	5,7 ± 0,26	7,8 ± 0,14	89 ± 2,9	601
rýže, dlouhozrnná parboiled	89,6	nd	120 ± 5,9	17 ± 1,0	nd	nd	38 ± 2,3	13 ± 0,21	nd	8,8 ± 0,09	197
hnědá rýže, dlouhozrnná parboiled	89,1	nd	240 ± 26	20 ± 1,6	nd	7,8 ± 1,2	76 ± 4,6	15 ± 0,68	nd	17 ± 2,3	376
hnědá rýže, dlouhozrnná parboiled (vařená)	29,2	nd	92 ± 10	7,1 ± 0,01	nd	2,5 ± 0,30	29 ± 4,9	4,2 ± 0,45	nd	4,1 ± 0,40	139

nd - nedetekováno, hodnota pod limitem kvantifikování (1 mg/kg); HS – hmotnost sušiny

3.2.3.3 Fenolické kyseliny

Pro fenolické kyseliny a jejich deriváty platí, že antioxidační aktivita závisí na počtu hydroxylových skupin v molekule, které jsou navíc ovlivněny sférickým umístěním karboxylové skupiny [21,24].



Obr. 3 Struktura některých fenolických kyselin: a) kyselina gallová, b) kyselina syringová, c) kyselina chlorogenová, d) kyselina kávová, e) kyselina p-kumarová, f) kyselina ferulová [25]

3.2.3.4 Ligniny a lignany

Lignany jsou rostlinné fytoestrogeny. Do této skupiny patří sekoizolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, pinoresinol a syringaresinol. Všechny tyto sloučeniny mají polyfenolickou strukturu [21,32]. Lignany a jejich metabolity (savčí lignany, enterodiol a enterolakton, hydrolýza mikrobiálními enzymy) projevují antioxidační vlastnosti v různých lipidických i vodních *in vitro* modelových systémech [21,28]. Ligniny se nacházejí především ve lněném semínku, také v ječmeni, ovsu, žitu, pšenici [28].

3.2.3.5 Alkylresorcinoly

Jsou to deriváty resorcinolu (1,3-dihydroxybenzenu) s lichým počtem *n*-alkylových postranních řetězců v poloze C-5 na benzenovém kruhu. Jsou to fenolické lipidy přítomné ve významném množství v celozrnných cereáliích, především v pšenici, žitu, tritikale a ječmeni. Projevují *in vitro* antioxidační vlastnosti tím, že poskytují vodíkový atom a mají schopnost vychytávat volné radikály [21,28]. Dále také mají antioxidační, antibakteriální a protiplísňové účinky [28].

3.2.3.6 γ-Oryzanol

Je směs nejméně 10 fytosterylferulátů (methylsteroly esterifikované na kyselinu ferulovou). Vyskytují se v rýžových zrnech a jsou to silné inhibitory tvorby radikálů, jež je řízená železem [21].

3.2.3.7 Betain, cholin

Celozrnné cereálie jsou bohatým zdrojem betainu a cholinu. Betain je donor methylové skupiny homocysteinu, umožňuje tak jeho přeměnu na methionin. Vysoká koncentrace homocysteinu je rizikovým faktorem kardiovaskulárních nemocí a vede k oxidačnímu stresu. Betain, který je snadno dostupný ze zažívacího traktu, může spolu s foláty snižovat oxidační stres snižováním koncentrace homocysteinu. Cholin je prekurzor betainu a je rovněž považován za antioxidant [21].

3.2.3.8 Kyselina fytová (inositolhexafosfát)

Je hlavní zásobní sloučeninou fosforu ve většině semen a cereálních zrnech. Díky vysoké kapacitě chelátově vázat volné železo potlačuje oxidační reakce katalyzované železem (Fentonova reakce) a antioxidační potenciál tak spočívá v potlačování lipidové peroxidace. Hydroxylový radikál $OH^{\bullet}$ vzniklý interakcí železa s O_2^- způsobuje poškození DNA [21].

3.2.4 Další antioxidanty cereálií

3.2.4.1 Karotenoidy

Představují velkou skupinu fytosloučenin se schopností chránit rostliny před poškozením volnými radikály indukovanými světlem. Jsou to lipofilní barviva a poskytují například barvu celozrnné mouce [24]. Cereálie jsou obecně významným zdrojem karotenoidů, nejlepším zdrojem je kukuřice. Mezi cereální karotenoidy patří α- a β-karoten, β-kryptoxanthin, lutein a zeaxanthin. Ve srovnání s ostatními mikronutrienty, jako jsou minerály, stopové prvky a polyfenoly, jsou karotenoidy rovnoměrně rozmístěny v celém zrnu (nejvýznamněji v endospermu) [21].

3.2.4.2 Avenanthramidy

Jsou to specifické tepelně odolné ovesné antioxidanty silnější než některé z typických antioxidantů – př. kyselina ferulová, *p*-hydroxybenzoová, vanilková a fytová [21]. Avenanthramidy se skládají z derivátů kyseliny anthranilové a hydroxyskořicové. Mají protizánětlivé, protiaterogenní a antioxidační vlastnosti [28].

3.2.5 Sacharidy

3.2.5.1 Mono- a oligosacharidy

Zastávají v buňkách různé funkce. Především jsou zdrojem energie. Dále slouží jako základní stavební jednotky mnoha buněk, chrání buňky před působením různých vnějších vlivů a samotné nebo jejich složky jsou biologicky aktivní látky (glykoproteiny, koenzymy, hormony, vitaminy...). Obsah sacharidů v potravinách je značně proměnlivý, obecně však převládají ve formě polysacharidů [23].

Monosacharidy jediné mohou být přímo vstřebávány v tenkém střevě. Vyšší sacharidy (oligosacharidy, polysacharidy) musí být nejprve štěpeny (hydrolyzovány) na monosacharidy, teprve poté je možná jejich absorpce. Člověk je schopen trávit pouze sacharózu, laktózu, maltooligosacharidy/maltodextriny a škrob. Všechny jsou tráveny pomocí enzymů přítomných v tenkém střevě [23].

Mono-, di-, tri- a vyšší oligosacharidy vznikají v obilovinách degradací škrobu. V cereálních výrobcích je obsah monosacharidů závislý na stupni hydrolýzy škrobu nebo na přidaném množství sacharidů [23].

3.2.5.2 Polysacharidy

Z nutričního hlediska rozeznáváme polysacharidy využitelné a nevyužitelné. Využitelné jsou rostlinné škroby a živočišný glykogen. Mezi nevyužitelné patří celulóza, hemicelulózy, pektin a polysacharidy používané jako aditivní látky, lignin, chitin [23].

V poslední době se polysacharidy (např. pullulan, alginát, aj.) využívají jako materiál pro přípravu mikro- a nanočástic. Takové částice obsahují malé molekuly léčivých látek nebo makromolekuly bílkovin, peptidů nebo genů a jsou schopny je dopravit na požadované místo přímo v živém organizmu. Částice mohou proniknout hluboko do tkáně jemnými kapilárami, projít epitelem sliznice a dostat se až k požadovaným buňkám. To umožňuje efektivní transport terapeutických látek do cílových míst v těle [33].

3.2.5.3 Vláknina

Je souhrnné označení pro různé typy polysacharidů pocházející ze stěny rostlinné buňky, a které nejsou hydrolyzovatelné lidskými trávícími enzymy. Některé druhy vlákniny jsou snadno fermentovatelné specifickými bakteriemi tlustého střeva (druhy bifidobakteria a laktobacillus) za zvyšujícího se počtu bakteriální populace a tvorby mastných kyselin s krátkým řetězcem. Tyto kyseliny, především máselná, octová a propionová, poskytují metabolickou energii hostiteli a také okyselují střeva. Vláknina má pozitivní přínos při snižování hladiny cholesterolu v krvi, snižování hladiny krevního cukru, předpokládají se účinky proti rakovině, cukrovce II. typu, srdečním nemocem a obezitě [5].

Podle rozpustnosti ve vodě je vláknina rozdělena na rozpustnou a nerozpustnou; každá z nich vykazuje jiné biologické účinky [5].

V dalších kapitolách budou stručně shrnuty metody stanovení aktivních složek cereálií.

3.2.6 Metody stanovení aktivních látek v cereáliích – analýza obsahu různých typů sacharidů

Separace a stanovení sacharidů jsou poměrně náročné úkoly. Důvodem je existence mnoha podobných struktur, množství izomerů a schopnost zaujímat různé anomerní konfigurace. Oligosacharidy a polysacharidy se mohou vyskytovat v lineární, cyklické nebo větvené formě, kde navíc může být glykosidická vazba v konfiguraci α nebo β. K obtížnému stanovování sacharidů přispívají také jejich fyzikální a chemické vlastnosti. Jsou nestabilní v zásaditém prostředí, velmi polární, netěkavé, většina neabsorbuje v oblasti viditelného spektra [34].

Přesto pro jejich charakterizaci je vypracována řada technik založených na různých fyzikálních a chemických principech. Většina z nich poskytuje spolehlivé výsledky při charakterizaci čistých látek a jednoduchých směsí. Při analýze komplexních směsí je však účinnost některých metod nižší a tyto metody vyžadují předchozí separaci jednotlivých složek. Mezi nejvhodnější metody stanovení sacharidů patří nukleární magnetická rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrické metody, elektroforetické a chromatografické metody nebo enzymatické techniky [34].

Sacharidy se z potravinářských surovin a potravin většinou izolují extrakcí. K dokonalé extrakci musí být materiál velmi jemně rozemlet tak, aby velikost částic byla co nejmenší. Teplota extrakce by neměla překročit 40 – 50 °C [35].

Sacharidy jsou snadno rozpustné ve vodě [36]. Kromě vody mohou být extrahovány vodnými roztoky alkoholů. K extrakci monosacharidů lze použít 70–75% vodné roztoky

ethanolu, methanolu nebo 2-propanolu. Oligosacharidy jsou v alkoholu hůře rozpustné. Nejprve se tedy provede extrakce 50% roztokem alkoholu a pak se jeho koncentrace zvýší, aby došlo k vysrážení polysacharidů a bílkovin [36,37].

Extrakcí do roztoku přechází i další látky, které obvykle ruší stanovení a je potřeba je odstranit, to se provádí buď čířením nebo odbarvováním. Účelem čiření je odstranění opticky aktivních látek z roztoku a odbarvení roztoku [36]. Nejčastěji se k čiření používají chemická čiřidla, např. octan olovnatý nebo Carrezovy roztoky [34].

3.2.6.1 Fyzikální metody

K nejběžněji využívaným fyzikálním metodám stanovení sacharidů patří polarimetrie, refraktometrie a denzimetrické metody. Polarimetrické měření spočívá v měření úhlu stočení lineárně polarizovaného světla při průchodu vrstvou opticky aktivní látky [38]. Podstatou refraktometrických metod je měření indexu lomu [39]. Denzimetrické stanovení je založené na skutečnosti, že s rostoucí koncentrací roztoku sacharidů se zvyšuje hustota roztoku [38].

3.2.6.2 Fyzikálně-chemické metody

V potravinářské analytice se sacharidy stanovují často pomocí spektrálních metod ve viditelné oblasti světla. Buď je stanovován pouze obsah redukujicích cukrů, nebo jsou stanoveny celkové cukry. V obou případech následuje po oxidaci v alkalickém prostředí nebo po rozkladu v silně kyselém prostředí reakce, která se projeví zabarvením reakčního roztoku. Barevné reakce jsou více či méně selektivní, takže je možné stanovit určitý sacharid nebo skupinu příbuzných sacharidů [34].

3.2.6.3 Chemické metody

V praxi se nejčastěji používají metody, které spočívají v redukci měďnatých iontů na měďné v alkalickém prostředí. Tyto metody se dále dělí na *nepřímé*, kdy se titračně stanovuje přebytek Cu^{2+} iontů (Schoorlova a Luffova-Schoorlova) a na *přímé*, kdy se stanovují vzniklé Cu^{+} ionty neboli úbytek Cu^{2+} iontů (Offnerova metoda) [38].

3.2.6.4 Enzymatické metody

Tyto metody spočívají ve schopnosti enzymů katalyzovat specifické reakce. Výhodou enzymových metod je jejich rychlost, vysoká specifita a citlivost k nízkým koncentracím sacharidů ve vzorku. Enzymové metody se používají v analýze potravin ke stanovení především monosacharidů, oligosacharidů, škrobu, potravinové vlákniny, β-glukanů, alditolů aj. Dnes se k enzymovým metodám většinou používají komerčně dostupné enzymové soupravy [34].

3.2.6.5 Chromatografická stanovení

K základním metodám patří plynová a kapalinová chromatografie. Velkou nevýhodou plynové chromatografie oproti kapalinové je nutnost připravovat deriváty sacharidů, které jsou těkavější než původní sacharidy. Dalšími metodami jsou tenkovrstvá a papírová chromatografie. Pro stanovení vysokomolekulárních polysacharidů se často využívá gelová permeační chromatografie [34].

Při chromatografickém stanovení zejména monosacharidů a oligosacharidů se často uplatňuje dělení na katexech, kde jsou jako protionty vázány kationty kovů, nejčastěji vápenaté, stříbrné či olovnaté. Další využívanou náplní je silikagel modifikovaný

aminopropylovou skupinou. Sacharidy lze také stanovovat chromatografií na anexech, která používá k detekci elektrochemický detektor, je však poměrně finančně náročná [34]. Chromatografie s reverzní fází má při dělení sacharidů omezené možnosti, jelikož sacharidy jsou na hydrofobním povrchu zadržovány pouze málo [40].

V poslední době je na vzestupu hydrofilní interakční chromatografie - HILIC. Jedná se o chromatografii na normálních fázích s vodnou mobilní fází a aminovou stacionární fází (např. aminopropyl na silikagelu) [41].

Jako detektory se nejčastěji používají refraktometrické detektory pro mono- a oligosacharidy, a také hmotnostní detektory. Odezva nederivatizovaných sacharidů v UV/VIS oblasti je velmi nízká [42].

3.2.7 Metody stanovení aktivních látek v cereáliích – analýza fenolických látek

Fenolické sloučeniny nalezneme v obilovinách ve volné i vázané formě. Volné fenolické sloučeniny jsou většinou proanthokyanidiny nebo flavonoidy, zatímco vázané fenolické sloučeniny jsou glykosidy nebo polymery esterově vázané k buněčné stěně. Ferulová kyselina a její dehydrodimerní deriváty tvoří v cereáliích většinu přítomných fenolů [43].

Bylo publikováno mnoho přehledů o analýze polyfenolů. Výběr správné analytické strategie pro studování bioaktivních fenolů v rostlinném materiálu závisí na účelu studie, stejně jako na povaze vzorku a analytu. Vzorky používané k analýze fenolů mohou být tříděny buď na ty, u kterých se stanoví obsah celkových fenolů nebo na ty, v nichž se kvantifikuje specifická skupina nebo třída fenolických sloučenin. Kvantifikace fenolických sloučenin v rostlinném materiálu je ovlivňována jejich chemickou povahou, použitou metodou extrakce, velikostí částic vzorku, dobou a podmínkami skladování, stejně jako metodou analýzy, výběrem standardů a přítomností interferujících látek jako jsou vosky, tuky, terpeny a chlorofyly [44].

Rozpustnost fenolů je řízena jejich chemickou strukturou, v rostlinách se může měnit od jednoduchých k vysoce polymerizovaným látkám. Dále jsou možné interakce mezi fenoly a ostatními rostlinnými složkami, jako jsou sacharidy a proteiny. Tyto interakce mohou vést k utvoření komplexů, které mohou být nerozpustné. Rozpustnost fenolů je také ovlivněna polaritou použitého rozpouštědla nebo rozpouštědel [44]. Většina studií používá k extrakci volných fenolických sloučenin z cereálií různé vodné roztoky methanolu, ethanolu a acetonu. Nicméně univerzální metodika pro extrakci volných rozpustných fenolů z cereálií není ještě stanovena [43].

Většina prací popisuje stanovení vázaných fenolických sloučenin v cereálních moukách s využitím alkalické hydrolýzy rozdělené na tzv. rychlou hydrolýzu (od 1 do 4 - 6 h) a dlouhou hydrolýzu, kdy čas vyluhování je větší než 16 h [43]. Alkalická hydrolýza (např. 2 M NaOH) je široce používána k uvolnění esterové a etherové vazby hydroxyskořicových kyselin (*p*-kumarová a ferulová kyselina) z komplexu lignin-fenol-sacharid v buněčných stěnách plodin [45]. V menší míře jsou fenolické sloučeniny v cereáliích stanoveny použitím kyselé hydrolýzy [43]. Kyselá hydrolýza se obvykle provádí v koncentrovaném chlorovodíkovém médiu při teplotě varu a způsobuje roztržení heteroglykosidových vazeb a k uvolnění odpovídajících cukrů a aglykonů. Identifikace aglykonů může být uskutečněna pomocí HPLC a sacharidy mohou být identifikovány klasickou papírovou, tenkovrstvou nebo plynovou chromatografií [46].

Metody pro stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin a určení jejich antioxidační kapacity jsou většinou založeny na oxidoredukčních vlastnostech, schopnosti fenolických

sloučenin působit jako redukční činidlo a poskytnutí radikálu vodíku nebo elektronu. Folin–Ciocalteauova metoda je obvykle používána pro stanovení souhrnu fenolických sloučenin v rostlinných extraktech. Existují i další metody pro stanovení fenolických sloučenin, a to metoda využívající ferrikyanid nebo 4-aminoantipyrin [47].

Většina studií v literatuře stanovuje množství volných a vázaných fenolů v cereáliích pomocí kombinace spektrofotometrické analýzy a vysokoúčinné kapalinové chromatografie, případně plynové chromatografie nebo některou z tandemových technik ve spojení s hmotnostní spektrometrií [43].

3.2.8 Metody stanovení aktivních látek v cereáliích – analýza vitaminů a provitaminů

Obecně lze vitaminy i provitaminy obsažené v cereáliích stanovit metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích (pro vitaminy E, B, D a pro β-karoten) nebo na normálních fázích (vitamin C). Existují však také jiné metody, např. titrační stanovení vitaminu C [24,48].

3.2.8.1 Stanovení vitaminu C

Vitamin C je velmi nestabilní, rozkládá se za zvýšené teploty, přítomnosti kyslíku, rozklad katalyzují také přítomné kovy (zejména měď), a proto se při extrakci stabilizuje např. zajištěním nízkého pH (přídavek HCl), přítomností komplexotvorných (kyselina šťavelová) a redukujicích látek. Mezi nejběžnější stanovení patří titrace, kdy vzorek je rozpuštěn v kyselině chlorovodíkové a roztok je následně titrován 2,6-dichlorindofenolem do růžového zbarvení nebo stanovení metodou HPLC na reversní C18 fázi modifikované např. aminoskupinami a se spektrofotometrickou detekcí v UV oblasti [48].

3.2.8.2 Stanovení vitaminu E

Vitamin E je obvykle extrahován ze vzorku organickými rozpouštědly (diethylether) a následně analyzován metodou RP-HPLC se spektrofotometrickou detekcí v UV oblasti [24].

3.2.8.3 Stanovení karotenoidů

Extrakce karotenoidů ze vzorku se nejčastěji provádí acetonem a následně je vzorek analyzován kapalinovou chromatografií se spektrofotometrickou detekcí ve viditelné oblasti [24].

3.3 Oxidační stres a obrana organizmu proti jeho důsledkům

3.3.1 Biologické oxidace a antioxidační systém organizmu

Stres, fyzické poškození, virové infekce, cytotoxické a karcinogenní sloučeniny, to vše může způsobit poškození prakticky všech typů biomolekul - peroxidaci nenasycených mastných kyselin v buněčných membránách a uvolnění toxických sloučenin jako jsou volné radikály. Oxidační stres vyvolaný volnými radikály nebo poškození DNA způsobené spontánními hydrolytickými reakcemi, radiací nebo chemickou mutací může způsobit různá degenerativní onemocnění, rakovinu, oběhové nemoci, roztroušenou sklerózu, Parkinsonovu chorobu, autoimunitní onemocnění a stařeckou demenci [6,49].

Dlouhodobě vysoké hladiny ROS (Reactive Oxygen Species, reaktivní formy kyslíku) a RNS (Reactive Nitrogen Species, reaktivní formy dusíku) vyskytujících se při zánětech vedou k intenzivnějšímu oxidačnímu stresu a akumulaci poškození tkání [22]. ROS reagují

s buněčnými molekulami. V jejich účincích existují velké rozdíly, $HO^{\bullet}$ je vysoce reaktivní s téměř všemi biologickými molekulami, zatímco $O\bullet^{2-}$ je několikanásobně méně reaktivní. Superoxidový anion je první radikál v oxidačním procesu, jeho neutralizace může být důležitá pro předcházení dalších procesů a také pro zastavení výskytu dalších radikálů [50].

ROS vznikají i přirozeně v důsledku neúplné redukce kyslíku v elektrontransportním řetězci. ROS zahrnují různé formy kyslíku, např. singletový kyslík, ozón, peroxid vodíku, kyslíkové radikály (superoxid, hydroxylový radikál, peroxylový radikál). Mezi RNS patří: oxid dusnatý, nitroxyl, oxid dusičitý. Buňka volné radikály vlivem vnějších faktorů (kouření, radiace) hromadí stejně jako běžné produkty metabolizmu a následně vykazuje celou škálu reakcí způsobených vystavením ROS se [22].

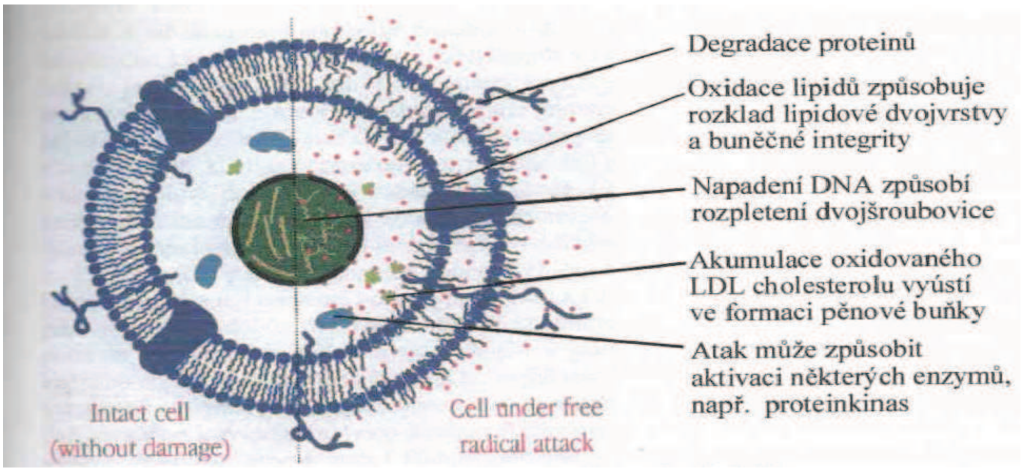
3.3.1.1 Obrana buňky před účinky oxidačního stresu

Během evolučního vývoje si organizmus vytvořil komplexní velmi účinný antioxidační systém. Obrana organizmu je tvořena několika úrovněmi [51]:

Primární antioxidanty - inhibují tvorbu ROS chelatací kovových iontů, redukcí hydroperoxidů a peroxidu vodíku a zhášením superoxidu a singletového kyslíku. Tuto funkci vykonávají např. transferin, laktoferin, albumin.

Sekundární antioxidanty - vychytávají z prostředí již vytvořené ROS a tím potlačují nebo přerušují řetězové reakce iniciace a propagace. Podle povahy se dělí na enzymové systémy (glutathionperoxidáza, kataláza, superoxiddismutáza atd.) a nízkomolekulární antioxidanty (kyselina askorbová, glutathion, tokoferol, karotenoidy, flavonoidy a další).

Terciární antioxidanty - opravují, obnovují a odstraňují oxidačně poškozené lipidy, proteiny a DNA. Zde patří různé enzymy jako lipázy, proteázy a opravné enzymy DNA [52].



Obr. 4 *Následek působení reaktivních forem kyslíku na buňku* [53]

3.3.2 Antioxidační aktivita cereálií

Antioxidační aktivita cereálií a cereálních výrobků, a to zejména ve vztahu k obsahu aktivních látek, je sledována v celé řadě studií zaměřených jak na běžné druhy cereálií jako je pšenice, rýže, oves, ječmen, tak i na méně obvyklé druhy rostlinných a cereálních materiálů jako je javorový sirup, snídaňové cereálie, čirok, triticale, mořské řasy a řada dalších cereálií.

Velmi často jsou charakterizovány individuální fenolické látky včetně specifických zástupců [6,28].

Ke stanovení antioxidační aktivity jsou nejčastěji využívány metody zaměřené na zhášení stabilních radikálů ABTS (2,2-azinobis-(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)) a DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) [54], méně prací využívá luminometrické metody, metody inhibující peroxidaci lipidů a sledování volných radikálů pomocí elektronové paramagnetické nebo spinové rezonance (EPR a ESR). Poměrně častá je i metoda FRAP (Ferric Reducting Antioxidant Potential), jejíž interpretace je však poznamenána značnou mírou nepřesnosti [27].

3.3.3 Metody stanovení antioxidační aktivity založené na eliminaci radikálů

K hodnocení potenciálního preventivního vlivu potravin, přírodních látek i farmak proti zvýšenému oxidačnímu stresu se nejčastěji využívá některá z vhodných metod stanovení antioxidační aktivity. Těchto metod je vyvinuta celá řada, přičemž největším problémem je velká rychlost probíhajících reakcí, nestabilita produktů a problémy spojené s interpretací nepřímých výsledků.

3.3.3.1 Metoda využívající radikál ABTS$^{\bullet+}$

Jedná se o základní a nejpoužívanější metodu stanovení schopnosti antioxidantu vychytávat volné radikály. Základem metody je generování kation-radikálu ABTS (2,2-azinobis-(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)), k tomu lze použít peroxodisíran draselný, oxid manganičitý, AAPH (2,2-azobis(2-amidinopropan)dichlorid) nebo systém H_2O_2/peroxidáza. Celková antioxidační aktivita TAS (Total Antioxidant Status) je měřena jako schopnost látky zhášet ABTS$^{\bullet+}$. Snížení koncentrace ABTS$^{\bullet+}$ známou koncentrací antioxidantu je vztaženo na aktivitu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) a v reálném vzorku udává schopnost analytu vychytávat volné radikály. Metoda je někdy označována jako TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) [27,54,55].

3.3.3.2 Metoda používající radikál DPPH

Metoda užívající radikál DPPH je velmi častá. Metoda je to jednoduchá, nezávislá na polaritě, velmi rychlá, levná, není potřeba speciálních přístrojů a poskytuje reprodukovatelné výsledky [27]. Jako standard se používá kyselina askorbová nebo Trolox, rovněž je možná detekce pomocí HPLC [27,55].

Princip spočívá v reakci sledované látky se stabilním radikálem DPPH (difenylpikrylhydrazyl, 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) za vzniku redukované formy radikálu DPPH-H (difenylpikrylhydrazin) [55].

Metody eliminace radikálů ABTS (TEAC) a DPPH patří k nejčastěji využívaným postupům ke stanovení celkové antioxidační aktivity.

3.3.3.3 EPR spektroskopie (elektronová paramagnetická rezonance)

EPR spektroskopie se spinovým značením („spin trapping“) pracuje na principu reakce primárního ROS s diamagnetickou nitro- a nitrozo- sloučeninou, což vede k produkci stabilnější a lépe detekovatelné radikálové adiční sloučeniny [55].

3.3.3.4 Metoda používající galvinoxyl nebo Fremyho sůl

Princip metody spočívá v redukci stabilního radikálu galvinoxylu (2,6-di-*terc*-butyl-4[(3,5-di-*terc*-butyl-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden)methyl]fenoxyl) látkami poskytujícími vodík. Průběh reakce se sleduje spektrofotometricky nebo na základě ESR (elektronové spinové rezonance) [55].

Pro určení schopnosti látek poskytovat vodíkový atom nebo elektron se používá syntetický radikál – tzv. Fremyho sůl (nitrozosulfonan draselný). Detekce a hodnocení se provádí pomocí ESR [55].

3.3.3.5 Metoda TRAP

Principem metody TRAP (Total Radical-Trapping Potential) je produkce peroxylového radikálu termální dekompozicí ABAP (2,2-azobis-(2-aminodinopropan)-hydrochlorid). Vzniklé radikály jsou detekovány luminolem (hydrazid kyseliny 3-aminoftalové) zesílenou chemiluminiscencí (CL) na kyvetovém luminometru. Smícháním s antioxidační sloučeninou dojde na určitou dobu k úplnému vymizení signálu chemiluminiscence, přičemž je tato doba přímo úměrná antioxidační kapacitě sledované látky. Jako standard je používán roztok Troloxu, který vychytává peroxylové radikály v poměru jedna molekula Troloxu neutralizuje dva peroxylové radikály [55].

3.3.3.6 Metody založené na vychytávání OH-radikálů

Radikály jsou zde generovány např. Fentonovou reakcí, UV fotolýzou peroxidu vodíku, fotolýzou synetických derivátů. Princip metody je založen na vychytávání radikálů látkami, jejichž produkty lze snadno stanovit. Využívá se např. vychytávání kyselinou salicylovou, kdy vznikají hydroxylované produkty salicylové kyseliny, které je možné detekovat a kvantifikovat metodou HPLC-UV [55].

Další možností je použití DMPO (2,2-dimethyl-2*H*-pyrrol-1-oxid). Produkt DMPO-OH je detekován pomocí ESR nebo HPLC-ECD [55].

3.3.3.7 Metody založené na vychytávání superoxidového anion-radikálu

Radikály jsou generovány např. neenzymovou reakcí 5-methylfenazinium-methylsulfátu s NADH nebo systémem xantin/xantinoxidáza. Radikál redukuje nitrotetrazolinovou modř nebo syntetické formazanové barvivo WST-1, detekce se provádí spektrofotometricky [55].

Dále je možná reakce superoxidového anion-radikálu s DMPO, detekce se provádí pomocí ESR nebo kombinace HPLC a chemiluminiscence [55].

3.3.3.8 Metody hodnotící eliminaci peroxidace lipidů

Patří zde např. metody založené na detekci produktů peroxidace kyseliny linolové. Jako iniciátor radikálové reakce je používán AAPH (2,2-azinobis(izobutyrimidamid)-dihydrochlorid), produkty peroxidace jsou sledovány spektrofotometricky [55]. Často se využívá spřažená oxidace β-karotenu a kyseliny linolové vzdušným kyslíkem (metoda β-CLAMS, β-Carotene Linoleic Acid Model System) a antioxidační účinek je hodnocen spektrofotometricky podle úbytku β-karotenu [56,57,58].

Nejpoužívanější metodou založenou na detekci látek schopných eliminovat lipidovou peroxidaci je metoda TBA-MDA. Sekundární produkt peroxidace malondialdehyd (MDA) reaguje s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) za vzniku barevného produktu. Adukty se stanovují spektrofotometricky nebo HPLC [59].

3.3.4 Metody stanovení antioxidační aktivity založené na hodnocení redoxních vlastností látek

U této skupiny metod se využívá skutečnosti, že neenzymové antioxidanty reagují s vybranými oxidanty, redukují je a tím je inaktivují, reakce se detekuje chemicky nebo elektrochemicky [60].

3.3.4.1 Metoda FRAP

Metoda FRAP (Ferric Reducting Antioxidant Potential) je jednoduchá, cenově efektivní, snadno interpretovatelná a využívá redukčního potenciálu antioxidantu a jeho schopnosti reagovat s železito-2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) komplexem (Fe^{III}-TPTZ) a produkovat barevnou železnato-tripyridyltriazinovou formu (Fe^{II}-TPTZ). Reakce probíhá při nízkých hodnotách pH [27,54].

3.3.4.2 Cyklická voltametrie

Redukční schopnost látek se vyhodnocuje ze dvou parametrů, z potenciálu anodického oxidačního píku E_A a anodického proudu I_A. Získaný záznam zachycuje křivka zvaná cyklický voltagram. Z hodnoty E_A se vyhodnocuje antioxidační účinek (čím je hodnota nižší, tím lépe látka odevzdává elektrony a může tedy být silnější antioxidant), z výšky píku I_A lze určit koncentraci látky. Již byla prokázána korelace mezi E_A a antioxidační aktivitou stanovenou jinými metodami [61,62].

3.3.4.3 HPLC metoda s elektrochemickou detekcí

Elektroaktivní látky lze velmi přesně stanovovat ampérometrickým či coulometrickým detektorem při analýze látky metodou HPLC. Pík látky se projeví pouze v případě, je-li látka při potenciálu vloženém na elektrodu oxidována. Touto metodou mohou být charakterizovány komplexní směsi a v nich identifikovány jednotlivé antioxidanty na základě rozdílné odezvy na aplikovaný potenciál [61].

3.3.5 Stanovení specifických skupin antioxidantů

3.3.5.1 Stanovení individuálních polyfenolických látek

Stanovení individuálních antioxidantů patří mezi skupinové metody a při interpretaci výsledků je třeba jisté obezřetnosti. Nejpoužívanější technikou pro kvantitativní i kvalitativní stanovení fenolických sloučenin je RP-HPLC. Detektory se používají např. UV-VIS, detektor diodového pole (PDA, Photo Diode Array), fluorescenční a hmotnostní [27]. Pro správnou identifikaci se používá technika hmotnostní spektrometrie. Pro předběžnou identifikaci je vhodná metoda HPLC/DAD [63].

3.3.5.2 Stanovení celkových polyfenolů - Total Phenolic Content TPC

Metody pro stanovení celkových polyfenolů a jejich antioxidační kapacity jsou obvykle založeny na oxidoredukčních vlastnostech, tedy na schopnosti fenolických sloučenin jako redukčních činidel poskytnout vodíkový radikál nebo elektron [27].

3.3.5.3 Stanovení celkových flavonoidů - Total Flavonoid Content TFC

Nejběžnější stanovení se provádí pomocí hlinité soli a dusitanu. Detekce se provádí kolorimetricky a jako standard se používá katechin [27]. Rovněž tato metoda může poskytovat zkreslené výsledky, rušivě působí řada faktorů.

3.4 Mutageny a metody pro stanovení genotoxické/antimutagenní aktivity

3.4.1 Mutageny a mutageneze

Mutagenita, též genotoxicita, je schopnost ovlivnit genetický materiál exponovaného organizmu [64]. Při působení vyšší koncentrace genotoxické látky dochází k přímému úhynu buněk, nižší koncentrace způsobují trvalé změny v genetické informaci, které se přenášejí do potomstva [65].

Mutagenita se může projevit několika způsoby:

a) ***mutageneze*** - vznik specifických změn na DNA [66]

b) ***karcinogeneze*** - nádorové bujení - nekontrolované množení buněk (předchází chyby na DNA anebo napadení virem)

c) ***teratogeneze*** - vznik vady na vyvíjejícím se plodu (mechanizmus nejasný, předpoklad chyby na DNA) [65]

Mutagenezí je označován proces vzniku specifických změn v dědičném materiálu organizmů [66]. Látka se schopností mutageneze, tzn. schopná vyvolávat mutace, se nazývá *mutagen* [64]. Změny, u nichž se podařilo objasnit příčinu vzniku, označujeme jako mutace *indukované*, zatímco ty, jejichž původ přesně neznáme, jsou považovány za mutace *spontánní*. Podle typu zasažené buňky dělíme mutace na *gametické* a *somatické*. Z hlediska ovlivnění životaschopnosti jedince jsou mutace rozdělovány na *vitální* a *letální* [66]. Obecně jsou mutace považovány za škodlivé a nežádoucí, jsou to však také změny zajišťující pestrost organizmů a představují schopnost přizpůsobovat se prostředí během evoluce [67]. Mutageny mohou být *fyzikální* (různé druhy záření), *chemické* (různé sloučeniny), *biologické* (některé viry nebo poruchy reparačních mechanizmů) [64,68].

V organizmech probíhá řada procesů, které snižují počet nově vznikajících mutací. Mutace při replikaci vznikají poměrně často. DNA-polymeráza však kontroluje nově vzniklé vlákno DNA a při objevení neshody v zařazení báze je chybná báze odstraněna a na její místo je zařazena správná. Poruchy tohoto a podobných reparačních procesů mohou vést ke zvýšenému výskytu mutací, což v důsledku vede ke vzniku řady onemocnění a nádorů [68].

Mutageny mohou mít za následek tvorbu nestandardních chemických vazeb, což znemožní polymeraci DNA podle matrice, dále nestandardní párování nukleotidů, přičemž změna pořadí nukleotidů v DNA sekvenci vede ke změně aminokyseliny v proteinu, případně fragmentaci DNA, což je ztráta nebo přestavba částí chromozomů s následnou změnou intenzity proteosyntézy [65].

Mezi nejznámější mutageny patří mykotoxiny, některé alkaloidy a různé další látky rostlinného původu, N-nitrozosloučeniny a halogennitrozosloučeniny, yperit, aldehydy, epoxidy, sloučeniny vznikající při tepelné úpravě potravin (polycyklické aromatické uhlovodíky, heterocyklické aminy a další sloučeniny), halogenderiváty alifatických uhlovodíků a další [65,66]. Za hlavní činitele v samotném poškozování DNA jsou považovány volné kyslíkové radikály a lipoperoxidace [69,70].

Na druhou stranu je mutageneze paradoxně považována za jednu z hnacích sil evolučních změn a identifikace a charakterizace mutantů jako klíčových prvků v genetickém přístupu pomůže objasnit komplexní biologické procesy. Mutageneze je také velmi důležitá z medicínského hlediska. Mutace jsou odpovědné za mnoho dědičných chorob, jsou také základem pro rozvoj nemocí souvisejících s věkem, a řídí komplexní reakce hostitel-patogen. Většina mutací vzniká během intracelulárních procesů (replikace, rekombinace a reparace DNA) buď jako chyby způsobené DNA-polymerázou při přepisu nepoškozeného DNA řetězce, nebo vznikají během přepisu poškozených bází [66,71]. Dále mohou mutace vznikat poškozením DNA vyvolaným účinkem produktů buněčného metabolizmu nebo poškozením environmentálními faktory s přímým nebo potenciálně mutagenním účinkem [66].

Látka se schopností snižovat výskyt spontánních nebo indukovaných mutací se nazývá *antimutagen*. Antimutageny se dělí do dvou skupin podle mechanismu jejich účinku: desmutageny a bioantimutageny. *Desmutagen* je látka, která brání interakci mutagenu s DNA. Mohou to být sloučeniny, které enzymaticky nebo chemicky inaktivují mutagen. Tato inaktivace se většinou odehrává mimo buňku. Naproti tomu *bioantimutageny* redukuji mutagenní efekt modulací změn indukovaných v buňce po poškození DNA mutagenem [69,70].

Z důvodu rostoucího počtu mutací a s tím souvisejícího nárůstu nádorových onemocnění je zkoumání účinků látek s antimutagenním a antikarcinogenním účinkem velmi důležité [6].

3.4.2 Antimutagenní aktivita cereálií

Zatímco antioxidační aktivita cereálií a cereálních výrobků byla sledována v celé řadě studií a v literatuře jsou k dispozici stovky odkazů, antimutagenní aktivita jakožto reálný podklad pro hodnocení preventivního biologického efektu byla studována jen v několika málo studiích; daleko častěji jsou studovány jiné typy rostlinného materiálu jako ovoce a zelenina. Důvodem může být právě komplexní charakter cereálního materiálu, který obsahuje poměrně málo vody a současně řadu biologicky aktivních (hlavně sekundárních) metabolitů, které mohou působit jak antioxidačně či antimutagenně, tak i prooxidačně nebo genotoxicky [72].

Pokud jde o studium antimutagenního efektu cereálií, je zejména popsáno využití Amesova testu v různém uspořádání k testování antimutagenního účinků některých cereálií (oves, otruby, vločky) a pseudocerálií (amarant, čirok) [49,73,74]. Některé testy byly provedeny pouze na vybraných aktivních látkách rostlin či cereálií, jako jsou alkylrezorcinoly nebo anthokyany testované pomocí cytogenetické analýzy periferních lidských lymfocytů [21,28].

3.4.3 Testy genotoxicity

Pro stanovení genotoxických účinků byla vyvinuta již celá řada testů. Lze je obecně rozdělit na *krátkodobé* – tj. testy na mikroorganizmech, jejichž výsledky nelze přímo aplikovat na člověka, avšak jsou rychlé a nenáročné a na *dlouhodobé* testy - na savcích, kde je možná interpretace výsledků přímo se vztahujících na člověka [75].

3.4.4 Mikrobiální testy genotoxicity

3.4.4.1 Amesův test

Amesův test patří k prvním zavedeným testům genotoxicity. Jako indikátor mutagenní aktivity je využívána bakterie *Salmonella typhimurium* His^{-}. Tento bakteriální kmen je auxotrofním mutantem v genech pro biosyntézu aminokyseliny histidinu. V kultivačním médiu je proto požadován její externí přísun. Vlivem testovaných mutagenů dochází ke zpětné mutaci (návrat na původní divoký typ), tím také ke změně fenotypu a nové kolonie revertantů jsou již schopny histidin syntetizovat [76,77].

Nevýhodou testování na prokaryotických organizmech je obecně nepřítomnost metabolických enzymů přítomných u eukaryotických buněk a zejména u savců. Metabolická přeměna chemických látek má přitom zásadní úlohu při identifikaci mutagenní aktivity sledované látky. Hlavní úlohu v metabolické přeměně látek u savců má systém mikrozomálních oxygenáz, který souvisí s aktivitou na cytochromu P 450 a oxidázy flavoproteinové povahy. Nejvyšší aktivitu monooxygenázy vykazují v játrech a proto se v běžných testech používá k metabolické aktivaci mikrozomální frakce jaterních buněk [76,77]. Použitím několika specifických indikátorových kmenů je možné určit, jaký typ genových mutací studovaná látka vyvolává [75].

Amesův test (i ostatní testy genotoxicity) lze ve vhodném uspořádání také využít ke stanovení antimutagenních vlastností. Při použití látek s antimutagenním účinkem nedochází ke zpětným mutacím [76,77].

3.4.4.2 SOS chromotest

Test využívá univerzální bakteriální detekční systém umožňující hodnotit mutagenitu chemických látek vyvolávajících taková poškození nebo inhibici replikace DNA, která v buňkách indukují SOS reparace. Jedná se o procesy, které vedou ke zvýšení životaschopnosti buňky, což je specifická odpověď na některé podněty z vnějšího prostředí, které způsobují zmíněná poškození. Metoda je založena na biochemické analýze indukované β-galaktozidázy. Množství vytvořených enzymů je hodnoceno kolorimetricky [72].

Test využívá specifického bakteriálního kmene *Escherichia coli* K 12 PQ 37, který byl odvozen od původního kmene *Escherichia coli* GC 4436. Mutagenní aktivita testovaných chemických látek je v SOS chromotestu hodnocena na základě schopností daných látek indukovat SOS reparační systém [75].

3.4.4.3 „Green Screen Assay“

Test využívá kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* nebo savčí buňky a reportérový gen na opravu DNA. Byl vyvinut pro rychlý screening genotoxických a současně toxických účinků ve farmaceutickém průmyslu a pro testování velkého množství látek. Výhodou je nízká spotřeba látek, citlivost k širokému spektru mutagenů a klastogenů [78].

3.4.4.4 Testování na kvasinkách Saccharomyces cerevisiae D7

Kvasinka *S.cerevisiae* je užívána jako referenční organizmus pro studium genotoxicity díky velmi jednoduchým růstovým podmínkám a nízké reprodukční době. Buňky *S.cerevisiae* mají kompletní eukaryotický buněčný cyklus a v závislosti na podmínkách mohou existovat v haploidním nebo diploidním stádiu [79].

V rámci testování se detekují hlavně dva typy mutací: mitotická genová konverze (GC) měřená na pozici trp5 a reverzní bodová mutace (PM) měřená na pozici ilv1-92. Obě mutace jsou posuzovány výskytem kolonií na selektivních médiích, které neobsahují určité aminokyseliny, tryptofan pro GC a izoleucin pro PM [75]. Další mutací, ke které dochází během testování, je mitotický crossing-over - překřížení [73,74].

Reverzní mutace:

Reverzní (zpětné) mutace mohou mít dva typy mechanizmů:

- reverze k původnímu volnému genotypu
- další mutace potlačující předešlou změnu

Detekce je založena na růstu mutovaných buněk na syntetickém médiu bez přítomnosti izoleucinu [73,74].

Genová konverze:

Přenos DNA sekvence mezi dvěma nesesterskými chromatidami během rekombinace.

Detekce genové konverze je obdobná jako u reverzní mutace, sleduje se růst buněk na syntetickém médiu bez přítomnosti tryptofanu [73,74].

U tohoto testovacího systému je možné využít také metabolické aktivace promutagenů jako u Amesova testu pomocí S9 frakce jaterního homogenátu, koenzymu NADPH a glukóza-6-fosfátu [73,74].

Mitotický crossing-over:

Crossing-over (překřížení) je proces, při kterém dochází ke genetické rekombinaci. Část chromatidy je zaměněna odpovídající částí homologní chromatidy, tj. chromatidy ze stejného chromozomového páru. Tato mutace se u testovaného kmene *S.cerevisiae* D7 projeví červeným zbarvením kolonií, protože dochází k akumulaci červeného pigmentu v buňkách, kde nastala blokace purinové syntézy. Buňky, u kterých k mutaci nedošlo, rostou na syntetickém médiu ve formě bílých kolonií s omezeným obsahem adeninu [73,74].

3.4.4.5 Testování na organizmu Euglena gracilis

Prvok *Euglena gracilis* je jednobuněčný fotosyntetizující organizmus obsahující multigenomický systém s jadernou, mitochondriální a chloroplastovou DNA. Detekční schopnost tohoto modelu je založena na selektivní citlivosti chloroplastového genomu ke xenobiotikům. To má za následek snížení funkčnosti chloroplastů v buňce. Tento jev je doprovázen snížením nebo úplnou ztrátou chloroplastové DNA. Aktivita mutagenů s protichloroplastovým účinkem se projeví tvorbou heterotrofních bezbarvých kolonií [73].

Model testu s použitím organizmu *E. gracilis* je vhodný pro testování mutagenů i antimutagenů [73]. Účinnou látkou s antichloroplastovým efektem v buňkách *E. gracilis* je nejčastěji ofloxacin, který patří do skupiny fluorochinolonů. Fluorochinolony produkují superoxidový anion ($O\bullet^{-2}$), který způsobuje poškození chloroplastů prostřednictvím oxidačního stresu vznikem nerovnováhy v elektronovém transportu. Genotoxický efekt těchto antimikrobiálních látek se uplatňuje vazbou na komplex DNA-gyrázy, jeho stabilizací a zamezením pohybu enzymu. Ofloxacin také způsobuje poškození mitochondrií, v tomto případě je však pouze krátkodobé [74].

Experimentální práci u kmene *Euglena gracilis* komplikují především značné růstové nároky a omezená schopnost růstu na syntetických médiích, především na agarových plotnách [80].

3.4.5 Testy na savčích buňkách

3.4.5.1 Test na myším lymfomu (Mouse Lymphoma Assay, MLA)

Tento test je schopen detekovat genetické poruchy včetně chromozomálních změn. K detekci poškození DNA využívá gen pro tymidinkinázu (TK). V testu se používají heterozygotní (nemutované) buňky *TK+/-*, které po přidání toxického trifluortymidinu do média hynou; v případě poškození alely divokého typu pro TK ztrácí buňky schopnost transportovat trifluortymidin do buňky a přežívají i na tomto médiu. Podle počtu žijících kolonií se určuje míra genotoxicity testované látky [81].

3.4.5.2 Comet Assay

Test je určen pro detekci jedno- a dvouřetezcových zlomů na DNA a pro detekci míst citlivých na alkalické prostředí (chyby DNA). Buňky s vyšším poškozením DNA mají zvýšenou migraci chromozomové DNA z jádra, která tvarem připomíná kometu - z analýzy obrazu je určena velikost a tvar komety a podle toho hodnocena míra poškození DNA [81].

3.4.5.3 Cytogenetická analýza aberací chromozomů lidských periferních lymfocytů

Při analýze se hodnotí dva typy aberací, *chromatidové*, kde je strukturálně modifikována jedna chromatida, a *chromozomové*, kde dochází k poškození obou chromatid. Metoda slouží jako ukazatel účinků genotoxických faktorů na lidský organizmus a používá se jako biologický skupinový expoziční test [82].

3.4.5.4 Výměna sesterských chromatid

Tato metoda sleduje frekvenci výměn úseků genů mezi chromatidami. Metoda využívá různé dělící se savčí buňky. Uplatňuje se při studiu mechanizmů účinků testované látky [72].

3.4.5.5 Test tvorby mikrojader

Test je založen na principu detekce jadérek v cytoplazmě interfázních buněk [83]. Test detekuje aktivitu klastogenních a aneugenních chemikálií v buňkách, které již prošly buněčným dělením po expozici testovanou látkou [84]. Aneugeny jsou látky vyvolávající aneuploidii, změny počtu jednotlivých chromozomů. Klastogeny způsobují klastogenezi, tvorbu zlomů na chromozomech [65].

3.4.5.6 DNA adukty

Metoda analyzuje tvorbu aduktů mutagenu a DNA. Detekce je prováděna pomocí metody HPLC, imunologických metod a „postlabeling“ metod, které využívají radiačně označené genotoxikanty tvořící DNA adukty [72].

3.4.6 Testy na organizmech

3.4.6.1 Test na organizmu Drosophilla melanogaster

Nejrozšířenějším testem na organizmu *Drosophilla melanogaster* (moucha octomilka) je analýza letálních mutací vázaných na pohlaví. Tyto mutace vedou v homozygotním stavu k úhynu organizmu. Test umožňuje hodnotit schopnost testované látky indukovat genové mutace na X chromozomu v pohlavních buňkách [72].

V posledních letech se testy in vivo provádějí pouze v odůvodněných případech a upřednostňuje se kombinace několika typů in vitro testů.

3.5 Některé možnosti aplikace cereálií v potravinářství a krmivářství

3.5.1 Fortifikace cereálních potravin

3.5.1.1 Přídavek volných aktivních látek

Obohacování (fortifikace) potravin je podle FAO definována jako: „přídavek jedné nebo více esenciálních živin do potraviny, ať už běžně se v ní vyskytující nebo ne, a to za účelem prevence popřípadě deficience dané látky u obyvatelstva nebo specifické skupiny obyvatel". Esenciální složkou je běžná součást potraviny, kterou není schopen lidský organizmus syntetizovat v potřebném množství. S přidáním mikroživin do potravy souvisejí i další pojmy jako suplementace, vitaminizace nebo restituce. *Restituce* představuje dodání mikroživin do potraviny v takovém množství, v jakém byly tyto látky obsaženy v surovině před jejím technologickým zpracováním. *Suplementace* je přidání živin, které nebyly původně v potravině obsaženy. Pokud se jedná o obohacení potraviny pouze vitaminy, byl pro tento účel zaveden pojem *vitaminizace*. Ve většině případů však nebývají vitaminy přidávány samotné, ale společně s dalšími mikroživinami, proto se obecně používá termínu *fortifikace* [85,86].

Ve spojení s cereálními výrobky se lze často setkat s pojmem „potraviny se speciálním popřípadě zdravotním tvrzením", což zahrnuje komplex výrobků s technologicky zvýšenou nutriční hodnotou a vědecky prokázaným pozitivním vlivem na lidské zdraví, fyzickou a psychickou výkonnost. Podmínky pro uvádění „výživových a zdravotních tvrzení" na obalech potravin upravuje Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin. Takto označené potraviny musí mít určité prospěšné výživové vlastnosti související s jejich energetickou hodnotou, obsahem živin či jiných látek, které ve snížené či zvýšené formě obsahují. U potravin se zdravotním tvrzením musí existovat prokazatelný mechanismus jakým je daná složka schopna pozitivně působit na zdraví člověka, popřípadě jeho fyzický stav. Cílem vývoje potravin tohoto typu je otevřít konzumentovi cestu ke zdravému životnímu stylu bez výrazných změn jeho stravovacích návyků a eliminovat výskyt alimentárních onemocnění v populaci [87-89].

Jedním z hlavních cílů odborníků na výživu je vyřešit problém aktuálního obsahu vitaminů a minerálních látek v obilninách, který je ovlivněn odstraněním vnějších obalových vrstev zrn, popřípadě jejich technologickým zpracováním. Vlivem těchto faktorů dochází ke snížení celkové nutriční hodnoty obilovin. Finální produkty jsou pak ochuzeny o celou řadu vitaminů a dalších biologicky aktivních složek, což může vést k výskytu onemocnění souvisejících s nedostatkem vitaminů. Fortifikace obilnin je proto důležitá hlavně pro země třetího světa, zejména za účelem zmírnění minerálního a vitaminového deficitu u obyvatelstva trpícího

podvýživou a anémií. Například pšeničné a kukuřičné mouky jsou fortifikovány vitaminem A, vitaminy řady B nebo železem. Fortifikace železem však představuje určitá zdravotní rizika, množství přídavku musí být pečlivě zváženo na základě míry deficitu a hlavně chemické formy přidávaného železa, která by mohla ovlivnit výslednou biologickou využitelnost dalších nutrientů [87,90-92].

Nedostatek kobalaminu (vitamin B12) a kyseliny listové (B9) vede k rozvoji makrocytální anémie, čímž dochází ke snížení přenosové kapacity krve pro kyslík. Některé státy v posledních letech nařídily fortifikaci mouk, snídaňových cereálií a těstovin kyselinou listovou jako ochranu proti rozvoji neurologických defektů hrozícího hlavně u dětské populace. Snídaňové cereálie fortifikované vitaminem E jsou hlavním zdrojem tokoferolů v potravě a poslední studie ukazují, že biologická dostupnost tokoferolů v cereáliích je přibližně 25x vyšší než při jeho příjmu ve formě kapslí jako potravinového doplňku [87,90].

Minerální látky a teplotně stabilní vitaminy (niacin, riboflavin) bývají přidávány do cereálních směsí ještě před jejich technologickým zpracováním, naproti tomu termolabilní látky (vitamin A, C nebo thiamin) jsou sprejovány na hotové výrobky po vysokoteplotních procesech, jako je extruze nebo pečení. Vzhledem k tomu, že hydrofobní vitaminy nemohou vytvářet vodné roztoky, bývají na cereální produkty nanášeny ve formě emulzí, jejichž složení ovlivňuje stabilitu vitaminů [85,93].

Z ekonomického hlediska není fortifikace nákladný proces a s výběrem vhodných metod fortifikačních technologií významně nezvyšuje cenu výsledného produktu. Fortifikace cereálií je také finančně podporována řadou světových organizací jako jsou UNICEF, USAID, ADB nebo GAIN, a to jak ze strany technologického výzkumu, tak i propagace fortifikovaných cereálních výrobků. Konzumace celozrnných potravin může být spojena s potenciálními zdravotními přínosy včetně snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění nebo některých typů rakoviny, a to napříč obyvatelstvem, protože cereálie jsou konzumovány všemi věkovými kategoriemi [90,92,94].

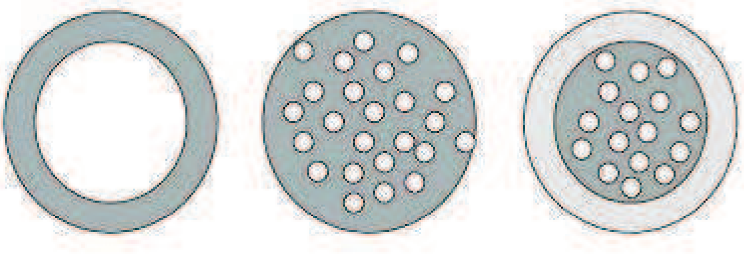
K fortifikaci obilovin se nejčastěji používají již komerčně připravené premixy nutrientů. Tento způsob je úspornější a přesnější než přídavek jednotlivých látek samostatně, hlavně pro jejich často kolísající náchylnosti k degradaci. Výjimkou je vápník, který je přidáván samostatně v souvislosti s jeho vyšším přidávaným množstvím oproti ostatním látkám [90]. Nejčastěji bývají fortifikovány mouky. Obvykle je do mouk přidáváno více vitaminů a minerálních látek [90,95].

Většina premixů pro fortifikaci je připravováno technologiemi „batch mixing“ nebo „two stage mixing“. Technologie „batch mixing“ je pomalejší a náročnější na práci. Mouka a premix se váží separovaně a poté se smíchají v nastaveném čase vzhledem k výkonnosti homogenizátoru a granulaci premixu. Technologie „two stage mixing“ je založená na dvoustupňovém míchání. Nejdříve je premix předmíchán s určitým podílem mouky a poté je tato frakce přidána ke zbylému množství mouky. Tento způsob zkracuje čas potřebný k homogenizaci mouky a premixu. V posledních letech je hojně využíváno kontinuálních systémů, a to jak pro jejich nenáročnou technologii, tak i pro rychlost celého procesu [90,95].

3.5.1.2 Přídavek enkapsulovaných složek

Enkapsulace je děj, při kterém dojde k zapouzdření jedné látky druhou látkou. Uvnitř pouzdra je aktivní látka a látka, která ji obklopuje, se nazývá povlak. Aktivní látkou může být kapalina, plyn či pevné těleso. Technologie byla vyvinuta v 60. letech pro biotechnologie, farmaceutický sektor podávání léků a očkování. Enkapsulace se hojně využívá

v potravinářství, především k přenosu bioaktivních molekul (minerály, antioxidanty, mastné kyseliny či vitaminy) nebo živé buňky do potravin. Obsah kapsle se postupně uvolňuje, a to za specifických podmínek. Velikost částic se pohybuje od několika nanometrů až po milimetry. V potravinách je cílem zachovat stabilitu látek při skladování a zpracování [96,97].



Obr. 5 Možnosti enkapsulace [98]

Pro výběr správné metody enkapsulace je důležité, jakým procesem hotový výrobek prochází, zda dojde k tepelné úpravě, změně pH či přidání jiných aditivních látek. Dále je potřeba uvážit podmínky skladovaní. Rozhodující vliv sehrává i délka skladování, poněvadž částice mají omezenou životnost. Pro finální výrobek je důležitá velikost a hustota částic a mechanizmus uvolnění aktivních látek z částic. Pokud se např. aktivní látky uvolňují při vyšší teplotě, produkt se nesmí tepelně zpracovávat [98].

V potravinářském průmyslu jsou pro enkapsulaci nejčastěji používány rostlinné (cereální) polysacharidy, zejména škrob, celulóza a jejich deriváty. Kromě těchto nejznámějších polysacharidů se pro tvorbu polysacharidových částic hojně využívají jiné rostlinné, mikrobiální a živočišné polysacharidy, extrakty mořských řas nebo sójové polysacharidy [106]. Bílkoviny používané pro enkapsulaci jsou především želatina, lepek či kasein. Z lipidů se používají fosfolipidy, vosky, mastné alkoholy, glyceridy a mastné kyseliny [96].

Mezi nejstarší a nejrozšířenější techniky zapouzdření patří sušení rozprašováním. Po ekonomické stránce patří k nejvýhodnějším [96]. Přidáním pomocné látky, např. sacharózy, laktózy, PVA nebo albuminu, se zabrání degradaci při atomizaci vzorku při sušení. Vzduch při sušení dosahuje vysoké teploty, ale teplota materiálu se výrazněji nemění. Technologie sprejového chlazení je obdobná s procesem sprejového sušení, ale při použití studeného vzduchu nedochází ke ztrátě vody ze vzorku. Metoda se používá na výrobu lipidových částic s vůní. Do lipidového roztoku se přidá aroma nebo jiná aktivní látka a atomizovaný roztok se vhání do vychlazené komory. Vůně se uvolní po dosáhnutí bodu tání [98].

Tvorba polyelektrolytů je nejjednodušší metoda pro vytvoření fyzické bariéry kolem živých buněk. Pro tento účel jsou používány jak přírodní, tak i syntetické polymery. Mezi často používané přírodní polymery patří alginát. Další možností enkapsulace je tvorba emulze. Existují dva základní druhy emulze, voda v oleji nebo olej ve vodě. Složitější částice jsou voda v oleji ve vodě, které se nejčastěji používají pro přípravu enkapsulovaných látek. Kapsle se vyznačují vysokou stabilitou, která se ještě umocní vysušením aktivní látky před zabalením. Dojde však ke ztrátě vody, která by mohla ovlivnit kvalitu výrobku [99].

Hydrogely jsou nerozpustné ve vodě. Tvoří síť vláken polymerů, kde je volný prostor pro uchování aktivních látek. Pro přípravu se používají kationtové a aniontové polymery – chitosan a karagenan. Chitosan nachází svoje využití při tvorbě gelu, naopak karagenan má

důležitou úlohu při uvolňování z gelu. Polysacharidy jsou obecně nejčastěji používaným enkapsulačním materiálem i v potravinářském průmyslu [100].

Pro výrobu lipozomů se používají fosfolipidy, zejména lecitin, a cholesterol. Jedná se o hydrofilní a hydrofobní interakci mezi molekulami vody a fosfolipidy. Aktivní látku lze umístit do vodní fáze uvnitř lipozomů (pro hydrofilní látky), nebo do membrány (pro lipofilní látky). Během skladování dochází k shlukování částic, tomuto ději se zabrání elektrostatickým odporem nebo sterickou stabilizací. V potravinách je použití lipozomů omezené, především kvůli fyzikální a chemické nestabilitě [101].

K analýze velikosti a stability částic se používá řada fyzikálně-chemických technik, jako je analytická centrifugace nebo dynamický rozptyl světla (Dynamic Light Scattering, DLS), kdy je pomocí osvětlování částic vzorku laserem měřena fluktuace intenzity rozptýleného světla [102].

3.5.2 Využití cereálií jako substrátů pro fermentace (SSF)

3.5.2.1 Enzymatická hydrolýza cereálních substrátů

Pro řadu účelů jak v potravinářství (příprava hydrolyzátů, doplňků na bázi funkčních potravin, úprava surovin…), tak i v biotechnologii (zpracování komplexních substrátů a odpadů z potravinářských výrob) se lze často setkat s potřebou enzymového zpracování (předzpracování) komplexní cereální suroviny. K tomuto účelu se používají technické enzymy na bázi glykosidáz, které specificky štěpí vybrané glykosidické vazby v polymerech. V dalším textu jsou uvedeny hlavní třídy glykosidáz. V průmyslovém měřítku se využívají zejména mikrobiální enzymy [103].

3.5.2.2 Celulázy

Mikrobiální degradace celulózy patří k významným přírodním procesům, které se podílejí na likvidaci rostlinných zbytků. Po chemické stránce je celulóza lineárním polymerem D-glukózy s β-(1-4) glykosidickými vazbami [103,104].

Enzym celuláza katalyzuje hydrolýzu celulózy na D-glukózu a je tvořen nejméně třemi enzymy: endo-β-1,4-glukanáza (EC 3.2.1.4); exo-β-1,4-glukanáza (EC 3.2.1.91) a β-glukosidáza (EC 3.2.1.22) [105]. Endocelulázy hydrolyzují celulózu náhodně za vzniku oligosacharidů, celobiózy a glukózy, exocelulázy hydrolyzují β-1,4-glykosidické vazby celulózy za uvolňování celobiózy z neredukujicího konce řetězce. β-glykosidázy hydrolyzují celobiózu na glukózu [103,106].

Ačkoli β-glykosidázy nemají žádný přímý účinek na celulózu, jsou považovány za součást systému celuláz, protože stimulují hydrolýzu celulózy [103,106]. Rychlost degradace celulózy je ovlivněna zejména obsahem vody v prostředí, hodnotou pH a teplotou. Všeobecně se uvádí, že celulázy vykazují optimální aktivitu při pH 5-6 a teplotě v rozmezí 30 – 50 °C [103].

Celulolytické enzymy produkuje velké množství mikroorganizmů. Mezi nejpoužívanější plísňové producenty patří rody *Trichoderma, Humicola, Penicillium, Aspergillus* a *Fusarium* [107,108]. Jeden z nejrozsáhleji prostudovaných celulolytických mikroorganizmů je houba *Trichoderma reesei* [107]. *Rhizopus chinensis, Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus niger*, *Achlya bisexualit* a *Orpinomyces sp.* jsou houby s nejvyšší specifickou aktivitou celuláz [109].

V současných průmyslových procesech mají celulolytické enzymy široké uplatnění. Jsou používány v potravinářském průmyslu při výrobě ovocných šťáv, požívají se jako přísada do detergentů, ke zlepšení nutriční kvality krmiva a předzpracování průmyslových odpadů

[104,106]. Celulázy se používají také v textilním průmyslu, průmyslu papíru a při výrobě bioethanolu [107].

3.5.2.3 Amylázy

Amylázy hydrolyzují škrob, glykogen a další polysacharidy, v nichž se vyskytují α-1,4-glykosidové vazby. Lze je rozdělit do 3 skupin:

1. α-Amylázy hydrolyzují 1,4-α-D-glykosidové vazby uvnitř polysacharidové molekuly. Štěpení vazeb není náhodné, ale do značné míry charakteristické pro α-amylázu určitého původu.
2. β-Amylázy odštěpují maltózové jednotky od neredukujícího konce polysacharidového řetězce. Na rozdíl od α-amyláz mají β-amylázy charakter exoenzymů.
3. Glukoamyláza, která je rovněž exoenzymem, hydrolyzuje postupně glukózové jednotky od neredukujícího konce. S nižší účinností štěpí i vazby 1,6-α-D ve větvených polysacharidech amylopektinu a glykogenu [110].

Většina průmyslově používaných amyláz produkovaných plísněmi vykazuje optimální aktivitu při pH 5-7 a teplotě v rozmezí 30 - 70 °C. Nejčastějšími producenty jsou rody *Aspergillus* a *Penicillium*. V průmyslu se nejčastěji používají *Aspergillus oryzae* a *Aspergillus niger,* z termofilních mikroorganizmů je to potom *Thermomyces lanuginosus* [111].

Amylázy představují třídu enzymů využívaných v řadě průmyslových procesů. Produkce amyláz tvoří přibližně 25 % světového trhu s enzymy. V potravinářském průmyslu se používají při výrobě ovocných šťáv, sójových omáček, při výrobě cukru. Nejrozšířenější aplikací je hydrolýza škrobu (využívá se termostabilních amyláz) pro výrobu alkoholu a v pivovarnictví. Další uplatnění amyláz je v textilním a papírenském průmyslu, při výrobě léčiv a jako přísady do pracích prostředků. Používají se v pekařství a pro zlepšení stravitelnosti krmiv [112].

3.5.2.4 Xylanázy

Vedle celulózy je xylan nejhojnějším strukturním polysacharidem v přírodě. Kompletní degradace xylanu vyžaduje spolupráci několika hydrolytických enzymů: endoxylanáz (EC 3.2.1.8), které náhodně štěpí β-1,4 vázané xylózy (hlavní řetězec xylanu), β-xylosidáz (EC 3.2.1.37) hydrolyzujících xylooligomery a enzymů štěpících postranní řetězce (např. α-glukuronidáza, α-arabinosidáza, acetylxylan esteráza a acetyl esteráza, která uvolňuje další sacharidy vázané jako větve na hlavním řetězci) [106]. Obvykle se jedná o induktivní enzym. Většina plísňových xylanáz je aktivní v širokém rozpětí pH a teploty. Většina však vykazuje optimální aktivitu při pH 4-6 a teplotě v rozmezí 30 – 60 °C [111].

Mezi hlavní producenty xylanáz patří rody *Aspergillus* a *Trichoderma* [112]. Plísně s nejvyšší celulázovou aktivitou jsou *Trichoderma longibrachiatum*, *Mortierella vinacea* a *Aspergillus niger* [109]. V posledních letech je snaha o produkci xylanáz s využitím termofilních mikroorganizmů. Mezi tyto plísně patří *Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Humico lagrisea, Melanocarpus albomyces, Paecylomyces variotii, Talaromyces byssochlamydoides, Talaromyces emersonii, Thermomyces lanuginosus* a *Thermoascus aurantiacus.* Xylanázy z těchto hub mají teplotní optimum mezi 60-80 °C a jsou velmi stabilní [111].

Nejčastěji se xylanázy užívají v pekařském průmyslu na zlepšení žádoucí textury a skladovatelnosti chleba. Xylanázy se dále uplatňují v papírnictví pro rozvolnění a bělení buničiny, v textilním průmyslu a při zpracování odpadů ze zemědělského a potravinářského průmyslu. Společně s celulázou a pektinázou jsou používány ve výrobě ovocných šťáv a k předúpravě krmiv [111,112].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie

Kyselina trichloroctová, p.a. - Serva (Německo)
Pepsin, z vepřové žaludeční sliznice - Sigma-Aldrich (Německo)
Pankreatin, z vepřové slinivky - Sigma-Aldrich (Německo)
Žlučové soli - Bile salts - směs kyseliny cholové a deoxycholové - Sigma-Aldrich (Německo)
Cholesterol - směs hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3β-olu - Serva Electrophoresis (Německo)
Lecithin ze sóje - Serva Electrophoresis (Německo)
Chitosan - Sigma-Aldrich (Německo)
Alginát sodný - Sigma-Aldrich (Německo)
Tripolyfosfát sodný - SigmaAldrich (Německo)
Baktopepton - HiMedia Laboratories Pvt. (Indie)
Sušený kvasničný autolyzát - HiMedia Laboratories Pvt. (Indie)
Agar - HiMedia Laboratories Pvt. (Indie)
Adenin - Serva Electrophoresis (Německo)
L-izoleucin - Serva Electrophoresis (Německo)
L-valin - Serva Electrophoresis (Německo)
L-tryptofan - Serva Electrophoresis (Německo)
Inozitol - HiMedia Laboratories Pvt. (Indie)
Riboflavin - Serva Electrophoresis (Německo)
Thiamin HCl- Serva Electrophoresis (Německo)
Pyridoxin - Serva Electrophoresis (Německo)
Kyselina nikotinová - Serva Electrophoresis (Německo)
Kyselina aminobenzoová - Serva Electrophoresis (Německo)
Pantotenát vápenatý - Serva Electrophoresis (Německo)
Biotin approx. - Sigma-Aldrich (Německo)
4-*N*-nitrochinolin *N*-oxid (4-NQO) - Sigma-Aldrich (Německo)
Ofloxacin - Sigma-Aldrich (Německo)
Ampicilin, sodná sůl - Serva (Německo)
Streptomycin - Sigma-Aldrich (Německo)
ABTS (2,2-azinobis-(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát), >99,0% - Sigma-Aldrich (Německo)
Peroxodisíran draselný, p.a. - Sigma-Aldrich (Německo)
Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) - Sigma-Aldrich (Německo)
DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) - Sigma-Aldrich (Německo)
Kyselina linolová - Sigma-Aldrich (Německo)
Tween 40 - Sigma-Aldrich (Německo)
β-karoten - Fluka, Sigma-Aldrich (Německo)
Folin-Ciocalteuovo činidlo - RNDr. Jan Kulich, Penta Hradec Králové, (ČR)
Hydrogenarzeničnan disodný, heptahydrát, 98% - Sigma-Aldrich (Indie)

Hovězí extrakt práškový - HiMedia Laboratories Pvt. (Indie)
Ethylacetát pro HPLC - LachNer (ČR)
Ethanol pro HPLC - LachNer (ČR)
Methanol pro HPLC - LachNer (ČR)
Acetonitril pro HPLC - LachNer (ČR)
2,6-dichlorindofenol, sodná sůl - Sigma-Aldrich (Německo)
Komerční set pro stanovení antimutagenních vlastností pomocí bakteriálního kmene *E.coli* – Bacterial mutagenesis assay complete *E.coli* test kit, Trinova Biochem (Německo)

Ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných distributorů.

4.1.2 Standardy

(-)-Katechin 98% - Sigma-Aldrich (Německo)
Katechin gallát - Sigma-Aldrich (Německo)
Epikatechin - Sigma-Aldrich (Německo)
Epikatechin gallát - Sigma-Aldrich (Německo)
Kyselina ferulová, p.a. - Fluka, Sigma-Aldrich (Německo)
Kyselina chlorogenová 95% - Sigma-Aldrich (Německo)
Kyselina gallová - Sigma-Aldrich (Německo)
Rutin, hydrát, 95% - Sigma-Aldrich (Německo)
Myricetin - Sigma-Aldrich (Německo)
Morin, hydrát - Sigma-Aldrich (Německo)
Luteolin - Sigma-Aldrich (Německo)
Kvercetin, dihydrát, 98%, HPLC - Sigma-Aldrich (Německo)
Apigenin approx. 95%, Sigma-Aldrich (Německo)
Kemferol, >96%, BioChemika (ČR)
(±)-Naringenin approx. - Sigma-Aldrich (Německo)
D-Glukóza, monohydrát, p.a. - LachNer (ČR)
D-Fruktóza, p.a. - LachNer (ČR)
L-(+)-Arabinóza, > 99% - Sigma-Aldrich (Německo)
Galaktóza, p.a. - HiMedia Lab. (Indie)
Sacharóza, p.a. - LachNer (ČR)
Maltóza, p.a. - LachNer (ČR)
D-(+)-Cellobióza - HiMedia Lab. (Indie)
Kyaninhydrochlorid, > 90%, Sigma-Aldrich (Německo)
Kyselina L-askorbová - Sigma-Aldrich (Německo)
Koenzym Q - Sigma-Aldrich (Německo)
Ergosterol - Sigma-Aldrich (Německo)

4.1.3 Enzymy

AMG - amyloglukosidáza Novo, exo-1,4-α-D-glukosidáza (glukoamyláza), vznik ze submerzní fermentace pomocí *Aspergillus niger*. Novozymes A/S (Dánsko).

Viscozyme - tekutý multienzymový komplex obsahující arabinázu, β-glukanázu, hemicelulázu, celulázu a xylanázu. Produkovaný *Aspergillus acetuleatus* s aktivitou 100 FBG (fungálních β-glukanázových jednotek) na gram. Novozymes A/S (Dánsko)

Novozym - Novozym 188 - enzymový preparát obsahující cellobiázu. Novozymes A/S (Dánsko)

Celluclast – enzymový preparát obsahující celulázu; Novozymes A/S (Dánsko)

4.2 Použité mikroorganizmy

Saccharomyces cerevisiae D7
Rhodotorula glutinis RG 20-2-33
Euglena gracilis
Escherichia coli WP2 a WP2 *uvrA*

4.3 Použité přístroje a pomůcky

UV/VIS spektrofotometr Helios Delta, Unicam (Velká Británie)
Ultrazvuková lázeň PS02000 ultrasonic compact cleaner 1,25 L, PowerSonic (Slovensko)
Mikrocentrifuga Mikro 200 Hettich Zentrifugen (Německo)
Analytické váhy BOECO (Německo)
Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Německo)
Centrifuga U-32R BOECO (Německo)
Vakuová odparka IKA Werke RV06-ML (Německo)
Vortex Genius 3, IKA Vortex (Německo)
Vortex TK3S, TecnoKartell (Německo)
Vodní lázeň Kavalier EL-20D (Česká republika)
Mikropipety BioHit Proline (Finsko)
Mikropipety Discovery (Německo)
pH-meter HI221 Calibration Check, Microprocessor pH meter, Hanna Instruments (USA)
Filtry MS® Nylon Syringe Filter, velikost pórů 0,45 μm
Laminární box Aura Mini - Bio Air Instruments (USA)
Termostat Raven 2 Incubator (USA)
Termostat Memmert GmbH Co. KG (Německo)
Mikroskop Intraci Micro (Česká republika)
Software Lucia Image, verze 5.03
Lyofilizátor - Bench Top 4K, Virtis
Membránový extrudér - Avestin-Liposo Fast (Německo)
Ultrazvukový homogenizátor - Bandelin Sonoplus - Sonorex Technik (Německo)
Analytická odstředivka - Dispersion Analyser - LUMiSizer (USA)
ZetaSizer Nano ZS - Malvern (Velká Británie)
Skenovací elektronový mikroskop - JEOL JSM-7600F

Sestava pro HPLC
- Sestava HPLC/UV-VIS (Ecom spol. s r.o.)
    - Termostat kolon - LCO 102 Long
    - Termostat - LCO 101, Column oven
    - Pumpa, programátor gradientu - Beta 10

- Gradient - Gradient Programmer GP 5, Ecom
    - Pumpa - LCP 4020, Ecom
    - Spektrofotometrický detektor - LCD 2084
    - Degaser - DG 3014
    - Refraktometrický detektor RIDK 102, Laboratorní přístroje Praha
- Sestava HPLC Thermo Finnigan (Thermo Fischer, USA)
    - Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR (Thermo, USA)
    - Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR (Thermo, USA)
- Vyhodnocovací systém Clarity (verze 2.5.6.99)
- Vyhodnocovací systém Xcalibur (Thermo, USA)

- Kolona - Zorbax Eclipse Plus XDB C18, 5 μm, 4,6 x 150 mm, Agilent (analýza fenolických látek)
- Kolona Kinetex C18, 2,6 μm, 4,6 x 150 mm, Phenomenex (fenolické látky, karotenoidy)
- Držák předkolony - KJO - 4282, Ecom
- Předkolony - C18, AJO - 4287, Phenomenex
- Kolona - Zorbax Eclipse, C18-NH2, 5 μm, 4,6 x 150 mm, Agilent (analýza sacharidů)
- Kolona - Supelcosil, LC-NH_2, 5 μm, 4,6 x 250 mm, Supelco (analýza sacharidů)
- Předkolony - NH2, AJO - 4302, Phenomenex

4.4 Materiál

4.4.1 Surové cereálie

Cereální vzorky, analyzované v této části práce, lze rozdělit do čtyř skupin - vločky, mouky, otruby, klíčky. Výrobky byly zakoupeny v běžné maloobchodní síti nebo v prodejnách se zdravou výživou. Ke každému výrobku jsou uvedeny informace uváděné na obalu. Nutriční hodnoty jsou vztaženy na 100 g materiálu.

4.4.1.1 Vločky

Vločky pšeničné (Bioharmonie, ČR; produkt ekologického zemědělství)
- nutriční hodnoty: energie 1 265 kJ/300 kcal; bílkoviny 11,7 g, sacharidy 59,6 g, tuk 1,8 g

Vločky ječné (Bioharmonie, Německo; produkt ekologického zemědělství)
- nutriční hodnoty: energie 1 381 kJ/313 kcal; bílkoviny 10,6 g; sacharidy 83,3 g; tuk 2,1 g

Vločky špaldové (Bioharmonie, ČR; produkt ekologického zemědělství)
- nutriční hodnoty: energie 1 480 kJ/352 kcal; bílkoviny 16 g; sacharidy 68 g; tuk 2,5 g

Vločky pohankové (Bioharmonie, Čína; produkt ekologického zemědělství)
- nutriční hodnoty: energie 1 354 kJ/317 kcal; bílkoviny 11,9 g; sacharidy 85 g; tuk 2,4 g

Vločky ovesné (Bioharmonie, ČR; produkt ekologického zemědělství)
- nutriční hodnoty: energie 1 470 kJ/348 kcal; bílkoviny 13,5 g; sacharidy 58,7 g; tuk 7,0 g

Vločky rýžové (Provita, Velká Británie)
- nutriční hodnoty neuvedeny

Vločky žitné (Bioharmonie, Německo; produkt ekologického zemědělství)
- nutriční hodnoty: energie 1 385 kJ/330 kcal; bílkoviny 10,5 g; sacharidy 70,2 g; tuk 2 g

4.4.1.2 Mouky

Mouka pšeničná celozrnná (Přírodní produkty, ČR)
- nutriční hodnoty: energie 1 457 kJ/345 kcal; bílkoviny 15,5 g; sacharidy 65,4 g; tuky 2,2 g

Mouka špaldová celozrnná (Přírodní produkty, ČR)
- nutriční hodnoty: energie 1 652 kJ/393 kcal; bílkoviny 12,1 g; sacharidy 75,0 g; tuk 1,7 g

Mouka žitná celozrnná (Přírodní produkty, ČR)
- nutriční hodnoty: energie 1 349 kJ/321 kcal; bílkoviny 9,3 g; sacharidy 75,2 g; tuk 1,4 g

Mouka z červené pšenice celozrnná (Country Life, ČR; produkt ekologického zemědělství)
- nutriční hodnoty neuvedeny

Mouka pohanková hladká (Harmonie, ČR; produkt ekologického zemědělství)
- nutriční hodnoty: energie 1 332 kJ/317 kcal; bílkoviny 11,9 g; sacharidy 65 g; tuk 2,4 g

Mouka pšeničná hladká (Penam, ČR)
- složení: potravinářská pšenice, pitná voda
- nutriční hodnoty neuvedeny

Mouka pšeničná hrubá (Penam, ČR)
- složení: potravinářská pšenice, pitná voda
- nutriční hodnoty neuvedeny

4.4.1.3 Otruby

Otruby pšeničné (Evit, ČR; termizované, bez čistírenského prachu)
- nutriční hodnoty neuvedeny

Otruby ovesné (Natural, Anglie)
- nutriční hodnoty neuvedeny

Otruby žitné (Přírodní produkty, ČR; s klíčky)
- nutriční hodnoty neuvedeny

Otruby kukuřičné (Natural, ČR)
- nutriční hodnoty neuvedeny

Otruby amarantové (Natural, země původu neuvedena)
- nutriční hodnoty neuvedeny

4.4.1.4 Klíčky

Klíčky pšeničné (Evit, ČR)
- nutriční hodnoty neuvedeny

Klíčky špaldové (Přírodní produkty, ČR)
- nutriční hodnoty neuvedeny

Klíčky žitné (Přírodní produkty, ČR)
- nutriční hodnoty neuvedeny

Klíčky kukuřičné (Přírodní produkty, ČR)
- nutriční hodnoty neuvedeny

4.4.2 Rýžové vzorky

Pro analýzu bylo vybráno celkem 17 vzorků rýže, různých značek, různých druhů. Všechny byly zakoupeny v běžné maloobchodní síti a v laboratoři uchovávány při stálé teplotě 20 °C.

Obr. 6 Ukázka některých rýží použitých k analýzám. Zleva nahoře: rýže Tří barev, Menu zlaté Parboiled; Zleva uprostřed: rýže Albert bio, rýže červená Natural, rýže Jasmínová; Zleva dole: rýže Indiánská, rýže Arborio.

Následující Tab. 4 uvádí seznam analyzovaných rýží a nutriční hodnoty tak, jak byly uvedeny na obale.

Tab. 4 Nutriční hodnoty analyzovaných rýží ve 100 g rýže

značka	země původu	energetická hodnota (kJ/kcal)	bílkoviny (g)	sacharidy (g)	tuky (g)
Long grain white rice	Polsko	1 465/345	6,5	77,0	0,2
Long grain white rice, VS	Polsko	1 450/345	6,5	77,0	0,3

Bask	Česko	-	-	-	-
SOS Clasic	Španělsko	1 397/328	7,0	79,2	0,3
SOS Long	Španělsko	1 504/354	7,1	79,9	0,7
Rýže dlouhozrnná loupaná	Polsko	1 510/360	6,7	76,8	0,7
Menu zlaté	Itálie	1 479/348	7,5	76,9	1,3
Menu zlaté parboiled	Itálie	1 495/352	7,5	76,9	1,2
Albert Bio	Itálie	1 580/376	7,4	72,0	2,2
Lagris, rýže dlouhozrnná	Česko	1 496/357	6,7	80,4	0,4
Lagris, rýže parboiled	Česko	1 580/378	7,0	77,0	0,3
Lagris, rýže Tří barev	Česko	1 553/371	6,3	81,8	1,5
Lagris, rýže Arborio	Česko	1 498/356	7,5	78,2	0,8
Lagris, rýže Indiánská	Česko	1 531/365	13,7	74,2	1,0
Rýže červená Natural	Thajsko	1 580/376	7,4	72,0	2,2
Basmati	Polsko	1 458/348	6,5	78,0	0,6
Jasmínová	Polsko	1 439/344	6,7	78,9	0,7

4.4.3 Ochucené cereálie

V této části práce bylo použito deset vzorků extrudovaných sladkých cereálií. Všechny vzorky byly pořízeny v maloobchodní síti.

CigiCagi se skořicí (Bonavita, mušličky se skořicí)

- nutriční hodnoty neuvedeny
- složení: cereálie 60,7 % (pšeničná mouka hladká a celozrnná, pš. vláknina, rýžová mouka), cukr, glukóza, sladový výtažek, glukózový sirup, rostlinný tuk a olej, maltodextrin, skořice 0,8 %, emulgátor lecitin, sůl jodovaná, regulátor kyselosti fosforečnan sodný, aroma jablko-skořice, karamel, antioxidant, vitaminy a minerály

Cookie Crisp s čokoládou (Nestlé, křupavé cereální koláčky s kousky čokolády)

- nutriční hodnoty: energie 1 627 kJ/389 kcal; bílkoviny 6,4 g; sacharidy 80,2 g; tuky 3,1 g
- složení: cereálie 58% (celozrnná pšeničná mouka, kukuřičná krupice), cukr, pšeničný škrob, glukózový sirup, kakaový prášek se sníženým obsahem tuku, rostlinný olej, čokoláda (cukr, kakaový prášek se sníženým obsahem tuku, kakaová hmota), hnědý cukr, aroma, jedlá sůl, kypřící látky (dihydrogenfosforečnan vápenatý, uhličitan sodný), regulátor kyselosti (fosforečnan sodný), vitaminy a minerální látky

Čoky s kakaem (Emco, pšeničné mušličky s kakaem)

- nutriční hodnoty: energie 1 591 kJ/380 kcal; bílkoviny 9,0 g; sacharidy 74,7 g; tuky 3,9 g
- složení: pšeničná mouka 46,5 %, cukr, glukózový sirup, kakaový prášek se sníženým obsahem tuku 5 %, rostlinný olej, ječmenný sladový extrakt, sůl, skořice, sójový lecitin, přírodní aroma - vanilin, vitaminy

Honey Cheerios (Nestlé, celozrnné cereální kroužky s medem)

- nutriční hodnoty: energie 1 607 kJ/380 kcal; bílkoviny 8,0 g; sacharidy 76,2 g, tuky 3,2 g

- složení: celozrnné mouky 64 % (ovesná, pšeničná, ječmenná, rýžová, kukuřičná), cukr, med 4 %, pšeničný škrob, sirup z invertního cukru, jedlá sůl, rostlinný olej, regulátor kyselosti (fosforečnany sodné), antioxidant (přírodní extrakt s vysokým obsahem tokoferolů), aromata, vitaminy a minerální látky

Ferda čokoládový (Emco, obilné kuličky)
- nutriční hodnoty: energie 1 591 kJ/381 kcal; bílkoviny 7,7 g; sacharidy 79,1 g; tuky 3,3 g
- složení: kukuřičná mouka, cukr, pšeničná mouka, 6% kakaového prášku se sníženým obsahem tuku, ztužený rostlinný tuk, ječmenný slad, sůl, emulgátor: sójový lecitin, přírodně identická aromatická látka: vanilin, vitaminy

Strawberry Minis (Nestlé, jahodová příchuť)
- nutriční hodnoty: energie 1 738 kJ/416 kcal; bílkoviny 5,5 g;sacharidy 75,8 g;tuky 10,2 g
- složení: cereálie 50 % (celozrnná pšeničná mouka, rýžová mouka), cukr, rostlinný olej, kukuřičný škrob, dextróza, glukózový sirup, maltodextrin, jedlá sůl, jahodový prášek 0,3 % (jahody, maltodextrin, regulátor kyselosti: kyselina citrónová), regulátor kyselosti (fosforečnan sodný), emulgátor (sójový lecitin), rostlinné koncentráty [černá mrkev, černý rybíz), invertní cukr, kyselina citrónová], aroma, antioxidant (přírodní extrakt s vysokým obsahem tokoferolů), aromata, vitaminy a minerální látky

Chocapic s kakaem (Nestlé, pšeničné lupínky s kakaem)
- nutriční hodnoty: energie 1 633 kJ/390 kcal; bílkoviny 8,1 g; sacharidy 76,7 g; tuky 5,2 g
- složení: cereálie (celozrnná pšeničná mouka 31,5 %, pšeničná mouka 24,9 %), cukr, kakaový prášek (8,6 %), dextróza, sladový výtažek z ječmene, rostlinný olej, emulgátor (sójový lecitin), jedlá sůl, aromata, vitaminy a minerální látky

Teddy s medem (Emco, obilná zrnka s medem)
- nutriční hodnoty: energie 1 639 kJ/392 kcal; bílkoviny 7,8 g; sacharidy 81,0 g; tuky 3,6 g
- složení: pšeničná zrna cukr, glukózový sirup, med (2 %), rostlinný tuk, karamel, emulgátor: sójový lecitin, vitaminy

Cini Minis se skořicí (Nestlé, skořicová příchuť)
- nutriční hodnoty: energie 1 736 kJ/413 kcal; bílkoviny 4,9 g; sacharidy 75,0 g, tuky 9,9 g
- složení: cereálie (celozrnná pšeničná mouka 31,1 %, rýžová mouka 17,7 %), cukr, rostlinný olej, kukuřičný škrob, dextróza, glukózový sirup, maltodextrin, jedlá sůl, skořice (3 %), skořicové aroma, regulátor kyselosti (fosforečnan sodný), emulgátor (sójový lecitin), barviva (amoniakový karamel, annato), skořicové aroma, antioxidant (přírodní extrakt s vysokým obsahem tokoferolů), aromata, vitaminy a minerální látky

Čokoflek s čokoládou (Bonavita, lupínky s čokoládou)
- nutričná hodnoty: energie 1 654 kJ/396 kcal; bílkoviny 6,5 g; sacharidy 81,0 g;tuky 3,6 g
- složení: cereálie 60,4 % (pšeničná mouka hladká a celozrnná, pš. vláknina, rýžová mouka), cukr, kakaový prášek 4,4 %, kakaové máslo 0,9 %, emulgátor lecitin, sladový výtažek, glukóza, glukózový sirup, sušené mléko odtučněné, dextrín, rostlinný tuk a olej, skořice, přírodní identické aroma čokoládové, přírodní barvivo couler, sůl jodovaná, vitaminy a minerály

4.4.3.1 Vzorky podrobené enzymatické hydrolýze

Rýže dlouhozrnná loupaná (Noe Riso long, Itálie)
Těstoviny vaječné (Ideal, Slovakia, Bratislava (SR)
Jablečná vláknina (Natural, ČR)
Otruby pšeničné (Evit, ČR; termizované, bez čistírenského prachu)

4.4.4 Příprava modelových cereálních kaší

4.4.4.1 Cereální složka

Pro přípravu cereálních směsí bylo vybráno následujících šest vzorků. Všechny byly pořízeny v běžné maloobchodní síti. Ke každému výrobku jsou uvedeny informace uvedené na spotřebitelském balení.

Klíčky kukuřičné, otruby amarantové, mouka pšeničná celozrnná a žitná celozrnná - viz kap. 4.4.1.

Mouka pohanková celozrnná (Mlýn Šmajstrla, ČR)
- nutriční hodnoty: energie neuvedena; bílkoviny 11 g; sacharidy 60 g; tuky 3 g

Mouka ječná celozrnná (Bioharmonie, ČR)
- nutriční hodnoty: energie neuvedena; bílkoviny 11,5 g; sacharidy 79 g; tuky 2,5 g

4.4.4.2 Ovocná/zeleninová složka

Jako přídatná ovocná složka bylo pro práci vybráno několik druhů místního ovoce zakoupeného v běžné síti supermarketů bez informací o předchozím způsobu skladování (doba, podmínky). Ovoce bylo zakoupeno v čerstvé nebo mražené formě a před použitím bylo zpracováno do formy homogenizátu a lyofilizováno.

Lesní směs (mražené ovoce) – směs v hmotnostním poměru 1:1:1
- maliny, značka Ardo Mochov
- borůvky, značka Ardo Mochov
- jahody, značka Nowaco

Jablka (čerstvá)
- odrůda Gala, původem z České republiky

Mrkev (čerstvá)
- původem z České republiky, bližší informace nezjištěny

4.5 Příprava vzorků cereálií pro analýzu

Podle povahy vzorků a rovněž požadavků metody bylo potřeba vzorky upravit na správnou konzistenci, se kterou bylo možno dále pracovat.

4.5.1 Příprava vzorků pro spektrofotometrické stanovení fenolických látek a antioxidační aktivity

Pro jednotnou konzistenci byly vzorky rozetřeny pomocí tloučku v třecí misce (vločky), rozmixovány v kuchyňském mixéru (rýže, ochucené cereálie) nebo ponechány bez úprav (klíčky, otruby, mouka). Dále byla přidána destilovaná voda a směs byla extrahována 5 min (cereálie), popř. 1 hodinu (rýže) při laboratorní teplotě 25 °C. Po skončení extrakce byl roztok centrifugován (10 000 ot/min, 5 min, 25 °C), aby bylo zabráněno přechodu drobných částic vzorku do analyzovaných roztoků a nedošlo tak k rušení stanovení. Některé roztoky, především vzorků s vyšším množstvím bílkovin, byly čířeny přídavkem 10% kyseliny trichloroctové (v/v) a teprve poté byly centrifugovány a připraveny k analýze.

4.5.2 Příprava vzorků pro stanovení katechinů, fenolických kyselin a sacharidů metodou HPLC

Vzorek byl homogenizován podle kap. 4.5.1 a následně extrahován 50% vodným roztokem methanolu (v/v), pro cereálie 5 min, pro vzorky rýže 1 hod, v případě stanovení sacharidů byla doba extrakce 3 hodiny pro všechny vzorky, etrakce probíhala vždy při teplotě 25 °C. Po extrakci byl roztok centrifugován (10 000 ot/min, 5 min, 25 °C), supernatant byl použit k přímé analýze.

4.5.3 Příprava vzorků pro stanovení individuálních flavonoidů metodou HPLC

Vzorek byl homogenizován (kap. 4.5.1) a extrahován ve vodě, pro cereálie 10 minut, pro rýži 1 hodinu při laboratorní teplotě 25 °C. Poté byl centrifugován (10 000 ot/min, 5 min, 25 °C) a následovala extrakce ethylacetátem při teplotě 25 °C. Organická fáze byla odebrána a odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v mobilní fázi viz kap. 4.6.6 a podle potřeby centrifugován (10 000 ot/min, 5 min, 25 °C) a/nebo filtrován přes mikrofiltr (pórovitost 45 µm).

4.5.4 Příprava vzorků pro stanovení sacharidů spektrofotometricky

Vzorky byly homogenizovány podle kap. 4.5.1, doba extrakce ve vodě však trvala 3 hodiny při teplotě 25 °C. Po uplynutí doby extrakce byly roztoky čířeny Carrezovými roztoky za účelem odstranění látek rušících stanovení.

Carrezovo činidlo I - 15% roztok $K_4(Fe[CN]_6)$

Carrezovo činidlo II - 30% $ZnSO_4$ [36]

Činidla byla přidávána postupně v množství 5 % původního objemu přidané vody ke vzorku pro každé činidlo, nejprve činidlo I a za stálého míchání činidlo II. V roztoku se vytvořila oranžová sraženina, která byla odstraněna centrifugací (10 000 ot/min, 5 min, 25 °C). Nyní byl roztok připraven k analýze.

4.5.5 Příprava vzorků pro stanovení anthokyanů

Analyzovaný vzorek byl homogenizován (podle kap. 4.5.1) a poté důkladně rozmíchán ve 20 ml 1% kyseliny chlorovodíkové v methanolu (v/v). Směs se ponechala 15 min extrahovat na třepačce při teplotě 25 °C, poté byl centrifugací (5 min, 10 000 ot/min, 25 °C) roztok oddělen od pevné části, která byla opakovaně extrahována kyselinou chlorovodíkovou

v methanolu při teplotě 25 °C. Supernatanty byly spojeny a v odměrné baňce doplněny na 150 ml.

4.5.6 Příprava vzorků pro studium antimutagenity

Vzorky byly homogenizovány, viz kap. 4.5.1. Ke vzorku byla přidána sterilní destilovaná voda a směs byla 10 min extrahována při teplotě 25 °C. Po skončení extrakce byla směs centrifugována (10 000 ot/min, 5 min, 25 °C) ve sterilních centrifugačních kyvetách a k analýze byl použit pouze roztok.

4.5.7 Příprava vzorků pro enkapsulaci

Pro enkapsulaci byla použita čerstvě vymačkaná šťáva ze zkoumaných vzorků a roztok získaný extrakcí lyofilizovaných plodů (10 minut, 25 °C) 5% kyselinou citronovou.

4.5.8 Příprava vzorků pro stanovení enkapsulační účinnosti

Vzorek byl po enkapsulaci centrifugován (40 min, 12 000 ot/min, 25 °C). V získaném supernatantu byly stanoveny požadované parametry.

4.5.9 Příprava vzorků pro stanovení velikosti a stability částic

Pro tato stanovení byl roztok enkapsulovaných částic přefiltrován před membránový extrudér a velikost částic tak byla sjednocena dle velikosti pórů membrány na 100 a 200 nm pro lipidové částice a na velikost 200 nm pro sachridové částice.

4.5.10 Příprava vzorků pro vizualici elektronovým mikroskopem

Pro vizualizaci elektronovým mikroskopem bylo potřeba převést vzorek na pevnou fázi, roztok enkapsulovaných částic byl proto nejprve lyofilizován a poté použit pro vizualizaci.

4.5.11 Kyselá hydrolýza

V prostředí 50% methanolu a 1,2M kyseliny chlorovodíkové za varu dochází ke štěpení glykosidických vazeb glykosidů za uvolnění příslušného sacharidu a nesacharidové části molekuly, tzv. aglykonu. Po skončení hydrolýzy je roztok neutralizován nasyceným roztokem $NaHCO_3$, aby nedocházelo v prostředí silné kyseliny k dehydrataci sacharidů na furfural v případě pentóz nebo hydroxymethylfurfural v případě hexóz. Ani jedna ze zmíněných sloučenin neposkytuje odezvu na refraktometrickém detektoru a takto dehydratované sacharidy by tedy nebyly v podmínkách metody stanovení sacharidů (kap. 4.6.9) měřitelné [113].

Do baňky s kulatým dnem byl odvážen vzorek, k němu bylo přidáno 50 ml 50% vodného roztoku methanolu (v/v) a 30 ml 1,2M kyseliny chlorovodíkové. Takto připravená směs byla hydrolyzována na vodní lázni a teplotě 100 °C po dobu 2 hodin. Po skončení hydrolýzy bylo pomocí nasyceného roztoku $NaHCO_3$ upraveno pH na hodnotu 3. Vzorek byl poté centrifugován (10 000 ot/min, 5 min, 25 °C), zfiltrován přes mikrofiltr (pórovitost 0,45 μm) a použit k analýze [114].

Pokud byl hydrolyzovaný vzorek dále používán jako substrát k přípravě produkčního média, bylo pH upravováno přidáváním pevného hydroxidu sodného až na hodnotu pH = 6.

4.5.12 Enzymatická hydrolýza

Princip hydrolýzy je stejný jako u hydrolýzy kyselé (kap. 4.5.11), zde je však přihlédnuto ke skutečnosti, že hydrolyzovaný substrát je dále použit ke kultivaci mikroorganizmů.

Pro enzymatickou hydrolýzu byly použity plísňové enzymy, resp. extracelulární enzymové preparáty produkovány plísněmi *Fusarium solani* a *Phanerochateae chrysosporium*. Dále byly použity komerční enzymové preparáty AMG, Viscozyme L, Novozym 188 a Celluclast (vše Novozyme, Dánsko). Přídavek jednotlivých enzymů byl 2,7 ml 100x ředěného preparátu ke 125 ml média s odpadním substrátem o koncentraci 30 g/l.

Enzymy byly přidány do kultivačního média, kde část nutričního zdroje uhlíku byla nahrazena odpadním cereálním materiálem. Byla sledována schopnost enzymů štěpit substrát a zároveň využitelnost takto naštěpeného substrátu mikroorganizmy určenými pro utilizaci hydrolyzovaného substrátu.

Navážka vzorku byla přidána ke kultivačnímu médiu a směs byla sterilována. Po vychladnutí byl přidán enzymový preparát. Hydrolýza probíhala 24 hod při laboratorní teplotě, ukončena byla opětovnou sterilací, při které došlo k inaktivaci enzymů.

4.5.13 Hydrolýza v prostředí modelových tělních tekutin

Použitím připravených tělních tekutin k hydrolýze vzorku je simulován proces probíhající během trávení. Vzorek byl v případě potřeby homogenizován (kap. 4.5.1), poté byla přidána připravená umělá šťáva. Hydrolýza probíhala příslušnou dobu při teplotě 37 °C za občasného míchání. Po hydrolýze byl vzorek centrifugován (10 000 ot/min, 5 min, 25 °C) a roztok byl připraven k analýze.

4.5.13.1 Příprava žaludeční šťávy

Do kádinky bylo naváženo 250 mg pepsinu, přidáno 100 ml destilované vody a 840 μl 35% HCl. Hodnota pH byla upravena na 0,9 ± 0,2 [115].

4.5.13.2 Příprava pankreatické šťávy

Do kádinky bylo naváženo 250 mg pankreatinu a 1,5 g hydrogenuhličitanu sodného, přidáno bylo 100 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena na 8,9 ± 0,2 [115].

4.5.13.3 Příprava žlučové šťávy

K navážce 800 mg komerčně dodávané směsi žlučových šťáv bylo přidáno 200 ml destilované vody [115].

4.5.14 Příprava ovoce a zeleniny jako přídavné látky do cereálních přípravků

Očištěné ovoce a zelenina bylo homogenizováno kuchyňským mixérem a ponecháno 24 hodin v mrazicím boxu při teplotě -18 °C. Poté bylo vše lyofilizováno a použito pro přípravu modelových cereálních kaší.

4.5.15 Určení vhodné koncentrace částic pro použití v potravinářství

Smícháním enkapsulovaného a neenkapsulovaného vzorku (šťáva, extrakt) byly připraveny směsi o koncentraci 0 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 % a 100 % enkapsulovaného

vzorku. Zákal roztoků a koncentrace vhodná pro použití v potravinářství byly hodnoceny vizuálně.

4.6 Metody

4.6.1 Stanovení celkových polyfenolů

Ke stanovení se používá Folin-Ciocalteuovo činidlo. Fenoly jsou oxidovány v zásaditém prostředí a v činidle přítomné molybdenany a wolframany jsou redukovány na směs modrých oxidů wolframu a molybdenanu. Vzniklé modré zabarvení je úměrné celkovému množství původně přítomných fenolických sloučenin a stanoví se spektrofotometricky při 750 nm. Získané výsledky lze interpretovat jako množství celkových polyfenolů ve vzorku, popř. jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE, Gallic Acid Equivalent), protože kyselina gallová je zde použita jako standard [116].

Obsah celkových polyfenolů stanovený touto metodou bývá někdy vyšší než součet individuálních fenolických látek metodou HPLC (UPLC). Tato skutečnost může mít dva důvody. Možnou příčinou může být skutečnost, že Folin-Ciocalteuova metoda je založena na nespecifické redoxní reakci, takže výsledky mohou být ovlivněny nefenolickými redukčními látkami přítomnými ve vzorku. U metody Folin-Ciocalteu je proto třeba počítat s mírným nadhodnocením výsledků. Dalšími metodami stanovení celkových polyfenolů jsou např. Price-Butlerova metoda s ferrikyanidem (PBM) nebo metoda používající 4-aminoantipyrin (AAPM) [27].

K připravenému extraktu vzorku v daném objemu byl připipetován 1 ml destilované vody a 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, směs byla promíchána a ponechána 5 min v klidu stát. Poté byl přidán 1 ml roztoku Na_2CO_3 (7,5 g do 95 ml destilované H_2O), směs byla opět promíchána a ponechána stát 15 min. Vzniklé zabarvení roztoku bylo změřeno spektrofotometricky při λ = 750 nm. Pro přípravu slepého vzorku byla místo vzorku použita destilovaná voda.

Obsah celkových polyfenolů byl spočítán z regresní rovnice kalibrační křivky sestavené pro standard kyseliny gallové, která byla rozpuštěna v destilované vodě v koncentračním rozmezí 0,05-0,5 mg/ml.

4.6.2 Stanovení celkových flavonoidů

Chlorid hlinitý tvoří stabilní kyselé komplexy s C_4 ketoskupinou a s C_3 nebo C_5 hydroxylovou skupinou flavonoidů, roztok tak získává oranžové zabarvení, které je měřeno spektrofotometricky [117].

Do zkumavky bylo k objemu vzorku připipetováno 1,5 ml destilované H_2O a 0,2 ml roztoku $NaNO_2$ (5%, w/v), po promíchání byly zkumavky ponechány 5 min stát. Následně bylo přidáno 0,2 ml roztoku $AlCl_3$ (10%, w/v), opět bylo promícháno a necháno 5 min stát. Pak bylo přidáno 1,5 ml 1M NaOH a 1 ml destilované H_2O, po promíchání a inkubaci 15 min při laboratorní teplotě bylo spektrofotometricky změřeno zabarvení roztoku při λ = 510 nm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná H_2O.

Pro sestrojení kalibrační křivky byl použit roztok katechinu rozpuštěného v absolutním ethanolu v rozmezí koncentrací 0,3-3 mg/ml.

4.6.3 Stanovení celkových flavonolů

K roztoku vzorku byly přidány 2 ml ethanolického roztoku $AlCl_3$ (2%, w/v) a 3 ml octanu sodného (5 g/100 ml). Směs byla řádně promíchána a inkubována při laboratorní teplotě po dobu 30 min, poté byla změřena absorbance roztoku při vlnové délce 440 nm. Pro přípravu slepého vzorku byla místo roztoku vzorku použita destilovaná voda.

Množství celkových flavonolů ve vzorku bylo spočítáno z regresní rovnice kalibrační křivky sestrojené pro standard kvercetinu rozpuštěného v absolutním ethanolu v koncentračním rozmezí 1 - 50 μg/ml.

4.6.4 Spektrofotometrické stanovení anthokyanů

Roztok vzorku připravený podle kap. 4.5.5 byl proměřen spektrofotometricky při vlnové délce 528 nm. Jako slepý vzorek byl použit okyselený methanol. Kyselina zde byla použita z důvodu závislosti zbarvení anthokyanů na pH prostředí.

Kalibrační křivka byla sestrojena pro standard kyaninhydrochloridu v rozpětí hodnot 1 - 20 μg/ml.

4.6.5 Stanovení katechinů a fenolických kyselin metodou HPLC

Analýza obsahu katechinů a fenolických kyselin byla provedena metodou RP-HPLC. Analýza probíhala na koloně Agilent Eclipse (C18, 5 μm, 4,6 x 150 mm) nebo Agilent Zorbax Eclipse Plus XDB (C18, 5 μm, 4,6 x 150 mm). Eluce probíhala izokraticky. Jako mobilní fáze byla použita směs methanol - 1% kyselina octová ve vodě (v/v) v poměru 25 : 75. Objem dávkovací smyčky byl 20 μl, průtok mobilní fáze 0,75 ml/min a teplota separace 30 °C. Detekce byla provedena spektrofotometricky při $\lambda = 280$ nm.

Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno s použitím externí kalibrace pomocí příslušných standardů. Všechny použité standardy (katechin, katechin gallát, epikatechin, epikatechin gallát, kyselina ferulová, gallová a chlorogenová) byly rozpuštěny v absolutním ethanolu. Ze zásobních roztoků byly připraveny koncentrační řady a analyzovány za stejných podmínek jako vzorky.

4.6.6 Stanovení individuálních flavonoidů metodou HPLC

Stanovení obsahu individuálních flavonoidů bylo provedeno metodou RP-HPLC na koloně Agilent Eclipse (C18, 5 μm, 4,6 x 150 mm) nebo Agilent Zorbax Eclipse Plus XDB (C18, 5 μm, 4,6 x 150 mm). Eluce probíhala izokraticky. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril - methanol - destilovaná H_2O - kyselina fosforečná v poměru 30 : 20 : 49,5 : 0,5. Teplota separace byla 30 °C, objem dávkovací smyčky 20 μl, průtok mobilní fáze 0,75 ml/min. Detekce byla provedena spektrofotometricky při vlnové délce 370 nm.

Obsah jednotlivých flavonoidů byl spočítán s použitím externí kalibrace pomocí příslušných standardů. Standardy (rutin, morin, kvercetin, kemferol, apigenin, myricetin, naringenin, luteolin) byly rozpuštěny v absolutním ethanolu (rutin rozpuštěn v methanolu) a byly připraveny koncentrační řady, a ty pak analyzovány za stejných podmínek jako vzorky.

4.6.7 Stanovení celkových sacharidů podle Duboise

Pro stanovení celkového množství sacharidů se využívá jejich rozkladu v silně kyselém prostředí. Většina metod je založena na dehydrataci sacharidů koncentrovanou kyselinou

sírovou a následné kondenzaci vzniklých derivátů s reakčním činidlem (fenol, anthron, orcinol) za vzniku barevných kondenzačních produktů, které lze stanovit spektrofotometricky [34].

K roztoku vzorku byl pipetován 1 ml roztoku fenolu (5%, w/v) a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Směs byla řádně promíchána a ponechána stát v digestoři 30 min při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance při 490 nm proti slepému vzorku (místo roztoku vzorku byla použita destilovaná voda).

Pro výpočet obsahu celkových sacharidů ve vzorku byla použita regresní rovnice kalibrační křivky standardního roztoku glukózy rozpuštěné v destilované H_2O v koncetraci 10 - 100 μg/ml.

4.6.8 Stanovení redukujicích sacharidů podle Somogyiho - Nelsona

K nejrozšířenějším metodám stanovení redukujicích sacharidů patří metoda *Somogyiho - Nelsona*. Využívá schopnosti redukujicích sacharidů vyredukovat z alkalického prostředí měďnatých solí oxid měďný, který s arzenomolybdenanovým činidlem poskytuje barevný komplex, jehož zabarvení se proměří spektrofotometricky [34].

K roztoku vzorku bylo přidáno 0,5 ml roztoku I a roztoku II. Zkumavky byly umístěny na 10 min na vroucí vodní lázeň. Poté byly zkumavky ochlazeny a bylo přidáno 0,5 ml roztoku III. Obsah byl promíchán a doplněn destilovanou vodou na celkový objem 10 ml. Směs byla změřena spektrofotometricky při λ = 720 nm proti slepému vzorku, kdy místo analyzovaného roztoku byla použita destilovaná voda [118,119].

Množství redukujicích sacharidů bylo spočítáno z regresní rovnice kalibrační křivky sestrojené pro standardní roztok glukózy rozpuštěné v destilované H_2O v rozmezí koncentrací 5 - 50 μg/ml.

Roztok I - 3 g bezvodého Na_2CO_3, 2 g $NaHCO_3$, 18 g bezvodého Na_2SO_4, 1,5 g tetrahydrátu vinanu draselno-sodného (Seignettova sůl), vše rozpuštěno ve 100 ml destilované H_2O.

Roztok II - 2 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, 12 g bezvodého Na_2SO_4, rozpuštěno ve 100 ml destilované H_2O.

Roztok III - 5,33 g $(NH_4)_2MoO_4$ rozpuštěno ve 100 ml destilované H_2O, k tomu pipetováno 4,67 ml H_2SO_4, nakonec bylo přidáno 0,667 g $Na_2HAsO_4 \cdot 7\ H_2O$ rozpuštěného v 5,56 ml destilované H_2O. Tento roztok byl ponechán stát ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 48 hodin [118,119].

4.6.9 Stanovení mono a disacharidů metodou HPLC/RI

Analýza vzorků probíhala metodou HPLC. Separace probíhala na koloně Agilent Zorbax Eclipse C18-NH2 (5 μm, 4,6 x 150 mm), popř. Supelcosil, LC-NH_2, 5 μm, 4,6 x 250 mm, Supelco. Eluce probíhala izokraticky. Jako mobilní fáze byla zvolena směs acetonitrilu a destilované vody v poměru 75 : 25, průtok byl nastaven na 1,0 ml/min, teplota separace na 25 °C, objem dávkovací smyčky na 20 μl. Detekce byla provedena pomocí refraktometrického detektoru.

Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí externí kalibrace s využitím příslušných standardů rozpuštěných v mobilní fázi a analyzovaných za stejných podmínek jako vzorky.

4.6.10 Analýza sacharidů ve vzorcích po enzymatické hydrolýze a kultivaci

Navážka vzorku (30 g) byla rozpuštěna ve sterilním kultivačním médiu (1 000 ml), k tomu bylo přidáno po 2,7 ml od každého 100krát zředěného enzymatického preparátu - AMG, Viscozyme, Celluclast, Novozyme a vše bylo ponecháno stát 24 hodin při laboratorní teplotě. Poté bylo médium znova sterilováno, po vychladnutí zaočkováno kvasinkou *Rhodotorula glutinis*. Kultivace probíhala podle kap. 4.6.21. V médiích byly stanoveny sacharidy před a po hydrolýze a dále byla média použita pro kultivaci kvasinek.

4.6.11 Stanovení rozpustného podílu

Pro přesnější výpočet obsahu celkových a redukujicích sacharidů byla získaná koncentrace sacharidů přepočtena nejen na 100 g výrobku, ale také na 100 g jeho rozpustného podílu.

Rozpustný podíl byl stanoven jako rozdíl navážky vzorku před jakoukoli úpravou a hmotností vysušeného zbytku po 3 hodinové extrakci. Sušení probíhalo při 60 °C.

4.6.12 Testování antimutagenity na kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* D7

4.6.12.1 Kultivace a uchovávání kvasinky S.cerevisiae D7

Buňky byly uchovávány a/nebo kultivovány v médiu o složení:

Tab. 5 YPD médium (Yeast extract Peptone Dextrose)

baktopepton	1,0 g
sušený kvasničný autolyzát	1,0 g
glukóza	1,0 g
agar (pro pevné médium)	2,0 g
destilovaná voda	100 ml

Tekuté médium bylo sterilováno 30 min a po vychlazení zaočkováno 3 kličkami zásobní kultury kvasinky. Takto připravená buněčná suspenze byla po 16 - 18 hodinách kultivace při 28 °C, tzn. v exponenciální fázi růstu buněk, určena pro test antimutagenity. Kolonie buněk na pevném médiu byly použity pro dlouhodobé uchovávání při teplotě 2 - 8 °C.

4.6.12.2 Příprava selektivních médií

Pro testování antimutagenních/genotoxických vlastností vzorků byla použita dvě selektivní média se společným základem:

Tab. 6 Pevné minimální médium

$(NH_4)_2SO_4$	0,71 g
KH_2PO_4	1,41 g
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,71 g
glukóza	14,14 g
agar	14,14 g
destilovaná voda	660 ml

Tab. 7 Selektivní médium pro sledování mitotické genové konverze (Trp-konverze)

adenin	18,86 mg

L-izoleucin	56,57 mg
L-valin	56,57 mg
vitaminový roztok	3,80 ml
pevné minimální médium	660 ml

Tab. 8 Selektivní médium pro sledování reverzní mutace (Ile-reverze)

adenin	37,72 mg
L-tryptofan	37,72 mg
vitaminový roztok	7,60 ml
minimální pevné médium	660 ml

Aminokyseliny byly naváženy zvlášť a rozpuštěny v 50 ml sterilní destilované vody, do média byly spolu s vitaminovým roztokem přidány až po jeho částečném ochlazení.

Tab. 9 Vitaminový roztok

inozitol	250 mg	kyselina nikotinová	15 mg
riboflavin	75 mg	kyselina aminobenzoová	15 mg
thiamin	25 mg	pantotenát vápenatý	15 mg
pyridoxin	15 mg	biotin	0,25 mg
destilovaná voda	100 ml		

4.6.12.3 Postup testování antimutagenních účinků

Buněčná suspenze kvasinek byla po 16 - 18 hod kultivace rozdělena po 10 ml do plastových uzavíratelných centrifugačních zkumavek. Buňky byly centrifugovány (4 500 ot/min, 5 min, 20 °C). Buněčný sediment byl 3krát promyt fosfátovým pufrem o pH 7. Při posledním promývání byl u příslušných zkumavek objem pufru upraven tak, aby po doplnění vzorku byl výsledný objem 10 ml.

Tab. 10 Složení Sörensenova fosfátového pufru

$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	1,427 g
KH_2PO_4	0,363 g
destilovaná H_2O	100 ml

Pro vyvolání mutace byl použit standardní roztok mutagenu 4-NQO (4-nitrochinolin *N*-oxid) o koncentraci 6 mg/100 ml 99,5% acetonu.

Pro každé testování byly připraveny následující směsi:
Pozitivní kontrola = buňky ovlivněné pouze 0,1 ml roztokem mutagenu
Negativní kontrola = buňky ovlivněné rozpouštědlem mutagenu - 0,1 ml 99,5% acetonu
Antimutagenní aktivita = buňky ovlivněné 0,1 ml mutagenu a příslušným objemem roztoku vzorku
Letální kontrola = buňky ovlivněné pouze roztokem vzorku
Spontánní reverze = ničím neovlivněné buňky

Do všech zkumavek bylo na závěr napipetováno 5 μl roztoku antibiotika ampicilinu připraveného v koncentraci 0,2 g/ml destilované H_2O.

Po 20 hodinách působení mutagenu při teplotě 28 °C byly zkumavky opět centrifugovány a 3krát promyty fosfátovým pufrem.

Na selektivní médium pro sledování mitotické genové konverze bylo naneseno 0,1 ml buněčné suspenze o obsahu 10^6 buněk v 1 ml suspenze. Stejný objem suspenze o koncentraci 10^7 buněk v 1 ml suspenze byl nanesen na selektivní médium pro sledování reverzní mutace.

Počet konvertantů byl hodnocen po 5 dnech, počet revertantů po 10 dnech kultivace při 28 °C.

Procenta inhibice antimutagenních/genotoxických účinků vzorku byly spočítány podle rovnice:

$$\% \text{ inhibice} = 100 - [(VZ/PK) * 100] \qquad (1)$$

VZ... počet kolonií na Petriho misce vyrostlých v přítomnosti mutagenu i vzorku
PK... počet kolonií vyrostlých na Petriho misce pouze v přítomnosti mutagenu

4.6.13 Studium antimutagenní aktivity s využitím prvoka *Euglena gracilis*

4.6.13.1 Složení média pro kultivaci

Pro sledování antimutagenních/genotoxických vlastností vzorků byl testovací organizmus kultivován ve směsi dvou médií (Euglena gracilis médium a Jaworského médium), která byla smíchána v poměru 1:1 (v/v). Po několika provedených testech bylo zjištěno, že pro přípravu média je vhodnější použít místo deionizované vody výluh z hlíny, čímž se charakter média více blíží přirozenému prostředí, ve kterém se ve volné přírodě prvok vyskytuje [120,121].

Příprava půdního výluhu

Směs hlíny (100 g) a deionizované vody (1 000 ml) byla sterilována a po vychladnutí byl roztok sterilně filtrován přes gázu a následně přes filtrační papír. Poté byl roztok opět sterilován a následně použit pro přípravu média.

Tab. 11 Euglena gracilis médium

$CaCl_2$	0,01 g
$CH_3COONa \cdot 3\ H_2O$	1,0 g
Lab-Lemco Powder	1,0 g
trypton	2,0 g
kvasničný extrakt	2,0 g
agar (pro pevné médium)	15,0 g
půdní výluh	1 000 ml

Tab. 12 Jaworského médium (navážky uvedeny v gamech)

1) $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$	4,0
2) KH_2PO_4	2,48
3) $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	10,0
4) $NaHCO_3$	3,18
5) EDTAFeNa	0,45

$EDTANa_2$	0,45
6) H_3BO_3	0,496
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	0,278
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$	0,20
7) kyanokobalamin	0,008
thiamin HCl	0,008
biotin	0,008
8) $NaNO_3$	16,0
9) $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	7,2

Roztoky 1) - 9) byly připraveny zvlášť a to rozpuštěním uvedených navážek ve 200 ml deionizované vody, na konečnou přípravu média byl použit 1 ml z každého roztoku a deionizovanou vodou byla směs doplněna na 1 000 ml a sterilována. Po sterilaci byl pouze přidán roztok 7), aby nedošlo k degradaci rozpuštěných vitaminů, dále bylo přidáno antibiotikum streptomycin v množství 50 μg/ml média. Do připravených sterilních baněk bylo rozlito po 100 ml média a ze zásobní misky byla každá baňka zaočkována třemi kličkami kultury. Organizmus se ponechal 72 hodin růst, poté bylo odebráno 5 ml média a převedeno do sterilních uzavíratelných centrifugačních kyvet.

Pro testování byly použity následující směsi:
Pozitivní kontrola = buňky prvoka ovlivněné roztokem mutagenu
Negativní kontrola = buňky v přítomnosti rozpouštědla mutagenu
Antimutagenní aktivita = buňky ovlivněné roztokem mutagenu v přítomnosti roztoku vzorku
Letální kontrola = suspenze buněk v přítomnosti roztoku vzorku
Spontánní reverze = pouze suspenze buněk

Kultivace probíhala v termostatu při konstatní teplotě 25 °C za stálého osvětlení. Po 12 dnech byl test ukončen centrifugací buněčných suspenzí (4 500 ot/min, 5 min, 25 °C). Supernatant byl odlit a pro extrakci chlorofylových barviv byly buňky doplněny acetonem na původní objem a ponechány při teplotě 25 °C ve tmě stát. Poté byly buňky opět centrifugovány (4 500 ot/min, 5 min, 25 °C) a spektrofotometricky byla proměřena absorbance supernatantu při vlnové délce 663 nm pro chlorofyl a a 645 nm pro chlorofyl b.

výpočet pro chlorofyl a: $c_a = 12{,}70 \, . \, A_{663} - 2{,}69 \, . \, A_{645}$ (mg/ml) (2)
výpočet pro chlorofyl b: $c_b = 22{,}90 \, . \, A_{645} - 4{,}68 \, . \, A_{663}$ (mg/ml) (3)

4.6.14 Studium antimutagenity s využitím bakteriálního kmene *Escherichia coli*

4.6.14.1 Příprava kultury pro testování

Do Erlenmeyerovy baňky bylo přelito 20 - 25 ml média Oxoid#2 nutrient broth ze zásobní láhve a zaočkováno kulturou (bločky ECDiscs^{TM}), na daný objem média postačoval jeden bloček. Médium bylo kultivováno na třepačce při teplotě 37 °C, 150 ot/min po dobu 12 - 16 hodin. Vhodná absorbance kultury před začátkem testování je 1 - 1,4 při λ = 660 nm, tj. množství buněk 1 - 2 $\cdot$ 10^9/ml.

4.6.14.2 Příprava média

Obsah láhve označené jako Trp-agar byl rozpuštěn na vroucí vodní lázni. Po úplném rozpuštění byla láhev umístěna na vodní lázeň temperovanou na 45 °C na dobu minimálně 45 minut.

4.6.14.3 Příprava aktivačního systému S9

Potřebné množství vialek obsažených v testovací sadě bylo rehydratováno 2,1 ml ledové destilované vody a mícháno až do úplného rozpuštění obsahu. Reagencie NADPH REGENSYS byla použita s obsahem různé koncentrace systému jaterního homogenátu S9. Pro 5% koncentraci byly do lahvičky s roztokem připipetovány 2 ml rehydratovaného roztoku S9 a 2 ml sterilní H_2O. V případě 10% koncentrace byly připipetovány 4 ml roztoku S9. Do použití byly roztoky uchovávány v chladu, těsně před použitím byl přidán obsah lahvičky s NADP a vše bylo řádně promícháno.

4.6.14.4 Studium antimutagenních vlastností

Stojánek se zkumavkami byl temperován ve vodní lázni na 45 °C, do každé zkumavky byly pipetovány 2 ml rozpuštěného agaru a 100 µl příslušné kultury, dále bylo do zkumavek pipetováno:

Bez aktivace pomocí S9
Kontrola rozpouštědla = 100 µl rozpouštědla vzorku
Test antimutagenity = 100 µl vzorku, ve třech vzestupných koncentracích
Pozitivní kontrola = 100 µl mutagenu (methyl methansulfonát, MMS)

S aktivací pomocí S9
Kontrola rozpouštědla = 100 µl rozpouštědla vzorku a 500 µl připravené směsi S9
Test antimutagenity = 100 µl vzorku, ve třech vzestupných koncentracích a 500 µl připravené směsi S9
Pozitivní kontrola = 100 µl mutagenu (2-aminoanthracen, 2-AA)

Stejný postup (bez aktivace i s aktivací) zopakovat pro druhý kmen.

Zkumavky byly ihned promíchány a obsah byl přelit na připravené misky Minimal Glucose Agar a rozetřen hokejkou. Po zatuhnutí byly misky uloženy do termostatu na 48 hodin při teplotě 37 °C. Odečet kolonií byl proveden po dvou a šesti dnech.

Antimutagenní účinek byl spočítán jako procenta inhibice účinku mutagenu podle rovnice (1), viz kap. 4.6.12.3.

4.6.15 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Tato metoda je jednou ze základních pro stanovení antioxidační kapacity. Kation-radikál ABTS byl generován peroxodisíranem draselným, který reaguje s ABTS ve stechiometrickém poměru 1:2 ($K_2S_2O_8$: ABTS). Nadbytek ABTS je potřebný pro zachování stability reakční směsi. Pokud je poměr [ABTS]/[$ABTS^{\bullet+}$] roven 50, pak se absorbance samotné reakční směsi

s časem nemění, pokud je však tento poměr blízký nule, je reakční směs nestabilní a dochází ke znatelnému poklesu absorbance v závislosti na čase [122].

Sloučenina ABTS byla rozpuštěna v destilované vodě na koncentraci 7 mM. Radikálový kation $ABTS^{\bullet+}$ byl získán reakcí s peroxodisíranem draselným (2,45 mM, konečná koncentrace). Roztok byl ponechán stát ve tmě při laboratorní teplotě nejméně 12 hodin. Před použitím byl roztok $ABTS^{\bullet+}$ zředěn UV-VIS ethanolem na absorbanci 0,700 ± 0,02 při vlnové délce 734 nm [123].

Spektrofotometr byl vynulován na UV-VIS ethanol. Do zúžené kyvety byl napipetován 1 ml $ABTS^{\bullet+}$ a příslušný objem roztoku vzorku. Hodnota absorbance byla odečtena v 10. minutě (hodnota A_1). Jako výchozí hodnota pro odečet absorbance byl použit 1 ml $ABTS^{\bullet+}$ a příslušný objem destilované H_2O, absorbance byla odečtena rovněž v 10. minutě (A_0).

Do regresní rovnice byla dosazována hodnota ΔA (A_0 - A_1). Kalibrační křivka byla sestavena pro standardní roztok Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) rozpuštěného v 60% ethanolu. Rozmezí koncentrací bylo 50 - 400 µg/ml.

Hodnota antioxidační aktivity byla vyjádřena jako hodnota TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), což představuje antioxidační aktivitu vzorku ve stejné míře, jakoby vzorek obsahoval vypočítané množství Troloxu [124].

4.6.16 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Metoda využívá schopnosti antioxidantů zhášet radikál DPPH. Jedná se o stabilní organický volný radikál tmavě fialové barvy, který je akceptorem atomu vodíku. Při reakci dojde ke ztrátě chromoforu za vzniku stabilní žluté diamagnetické molekuly. Radikál DPPH je citlivý na přítomnost vodíkového atomu, metoda proto funguje při velmi nízkých koncentracích [125,126].

Roztok vzorku byl doplněn methanolem na objem 2 ml, k tomu byly přidány 2 ml 0,16 M roztoku DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) v methanolu. Směs byla promíchána a zkumavky byly 30 min inkubovány ve tmě při teplotě 37 °C. Poté byla směs opět promíchána a zabarvení roztoku bylo změřeno spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm [127].

Pro výpočet antioxidační aktivity bylo potřeba připravit si kromě reakční směsi obsahující radikál DPPH také blank bez roztoku radikálu, aby bylo eliminováno zbarvení způsobeno samotným vzorkem. Rovněž byla připravena kontrola, která obsahovala pouze 2 ml methanolu a 2 ml DPPH. Spektrofotometr byl nulován na čistý methanol.

Schopnost vzorku vychytávat volné radikály byla vypočítána dosazením naměřených hodnot do rovnice:

$$\% \text{ vychytávání} = \{1 - [(A_{vz} - A_{vz\text{-}bl}) / A_{ko}]\} * 100 \qquad (4)$$

A_{vz}........vzorek (x ml) + MeOH (2-x ml) + DPPH v MeOH (2 ml)
$A_{vz\text{-}bl}$.....vzorek (x ml) + MeOH (2-x ml + 2 ml) (0 ml DPPH)
A_{ko}....... MeOH (2 ml) + DPPH (2 ml)
Sestavením kalibrační křivky pro standardní roztok Troloxu (rozmezí koncentrací 0,05 - 10 µg/ml, rozpuštěno v 60% ethanolu) bylo rovněž možno vyjádřit antioxidační aktivitu v jednotkách TEAC (viz kap. 4.6.15) [123].

4.6.17 Stanovení antioxidační aktivity metodou β-CLAMS

V tomto systému je odebrán jeden atom vodíku z dialylové methylenové skupiny kyseliny linolové, tím vznikne volný radikál kyseliny, který napadá vysoce nenasycenou molekulu β-karotenu [128]. β-karoten ztratí dvojné vazby a dojde k odbarvení charakteristické oranžové barvy. Tato oxidativní destrukce je měřena spektrofotometricky při 470 nm.

Rychlost degradace β-karotenu záleží na antioxidační kapacitě extraktu. Schopnost extraktu zpomalit/zastavit oxidaci β-karotenu může být popsána jako reakce volného radikálu a primárního antioxidantu [126]. Srovnávací antioxidační aktivita je hodnocena podle schopnosti antioxidantů v roztoku zabránit oxidaci emulze β-karoten - kyselina linolová [129]. Testování lipidové peroxidace je v mnohých pracích upřednostňováno před DPPH a ABTS testy [130].

Do baňky s kulatým dnem bylo naváženo 40 mg kyseliny linolové a 400 mg Tweenu 40, k tomu bylo přidáno 1,2 ml roztoku β-karotenu v chloroformu (1 mg/ml). Chloroform byl odstraněn na rotační vakuové odparce a k odparku bylo postupně za stálého míchání přidáváno 100 ml vody Mili Q do vytvoření čiré emulze.

Do zkumavky bylo pipetováno 5 ml emulze a 0,5 ml roztoku vzorku. Směs byla ihned promíchána a zabarvení roztoku bylo změřeno spektrofotometricky při 470 nm. Poté byla směs inkubována 30 min ve vodní lázni o teplotě 50 °C a opět byla změřena absorbance. Pro získání kontrolních hodnot byl vzorek nahrazen 0,5 ml destilované vody [129,131,132].

Rychlost degrace byla spočítána podle rovnice [129]:

$$RD = \ln (A_0/A_{30})*t \qquad (5)$$

RD.... rychlost degradace
A_0......počáteční absorbance
A_{30}....absorbance po 30 min
t........ doba trvání inkubace v min

Antioxidační aktivita pak byla spočítána podle rovnice:

$$AoA = [(RD_{ko} - RD_{vz}) / RD_{ko}] * 100 \qquad (6)$$

AoA... antioxidační aktivita
RD_{ko}... rychlost degradace kontroly
RD_{vz}... rychlost degradace vzorku

4.6.18 Titrační stanovení kyseliny askorbové

Navážka vzorku byla homogenizována a poté rozpuštěna v malém množství 2% HCl. Roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 25 ml a po rysku doplněn 2% HCl. Takto připravený roztok byl převeden do titrační baňky a titrován odměrným roztokem 2,6-dichlorindofenolu o koncentraci 0,5 mM do lososově růžového zbarvení stálého minimálně 15 sekund. Standardizace byla provedena pro roztok kyselina L-askorbové.

4.6.19 Stanovení kyseliny askorbové metodou HPLC

Navážka vzorku byla homogenizována a ihned převedena do 2% roztoku kyseliny metafosforečné. Směs byla centrifugována (10 000 ot/min, 5 min, 5 °C) a použita pro přímý nástřik.

Separace probíhala na koloně Zorbax Eclipse C18-NH_2 (4,6 x 150 mm, 5 µm, Agilent). Eluce probíhala izokraticky. Jako mobilní fáze byla použita směs 0,05 M octan sodný - acetonitril v poměru 95 : 5. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,6 ml/min, objem dávkovací smyčky 20 µm, teplota separace 30 °C. Detekce byla provedena spektrofotometricky při 254 nm.

Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí externí kalibrace s použitím standardu kyseliny L-askorbové.

4.6.20 Spektrofotometrické stanovení β-karotenu

Intenzita zbarvení roztoku vzorku je přímo úměrná koncentraci karotenů v roztoku.

Karoteny byly ze vzorku extrahovány methanolem (10 min, 25 °C). Absorbance byla změřena proti methanolu jako blanku při 450 nm. Jako standard byl použit β-karoten.

4.6.21 Kultivace kvasinky *Rhodotorula glutinis*

Kvasinka *Rhodotorula glutinis* patří mezi mezofilní aerobní mikroorganizmy. Kultivace probíhala souhrnně 128 hodin při teplotě 25 °C za neustálého třepání (90 ot/min) a osvětlení za účelem produkce karotenoidů.

4.6.21.1 Složení médií

Inokulační média byla připravena tak, aby poměr INO I a INO II byl 1 : 5. Vysterilované médium INO I bylo zaočkováno třemi kličkami kultury ze zásobní Petriho misky. Kultivace probíhala 24 hodin. Po ukončení bylo médium sterilně přelito do média INO II, kultivace probíhala opět 24 hodin.

Tab. 13 Složení inokula I a II pro kultivaci kvasinky R. glutinis

KH_2PO_4	5 g
$(NH_4)_2SO_4$	5 g
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,696 g
glukóza	40 g
kvasničný autolyzát	7 g
vodovodní voda	1 000 ml

Složení produkčního média je uvedeno v Tab. 14 . Varianty použitého zdroje uhlíku uvádí Tab. 15 . Do produkčního média bylo přilito tolik INO II, aby byl zachován poměr INO II : produkční médium → 1 : 5.

Tab. 14 Složení produkčního média

KH_2PO_4	4 g
$(NH_4)_2SO_4$	4 g
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,696 g

vodovodní voda	1 000 ml

4.6.21.2 *Varianty použitého zdroje uhlíku*

Náhradní zdroj uhlíku (loupaná a neloupaná rýže) byl upraven dvěma způsoby, extrahován do vody (resp. pouze homogenizován), případně enzymaticky (kap. 4.5.12) hydrolyzován.

Tab. 15 Přehled použitých zdrojů uhlíku a jejich úprava

	zdroj uhlíku	množství
kontrola	glukóza	30 g/l
přírodní	vaječné těstoviny	30 g/l
	loupaná rýže	30 g/l
	jablečná vláknina	30 g/l
	pšeničné otruby	30 g/l
enzymatická hydrolýza	substráty + AMG	30 g/l + 2,7 ml
	substráty + Novozyme	30 g/l + 2,7 ml
	substráty + Celluclast	30 g/l + 2,7 ml
	substráty + Viscozyme	30 g/l + 2,7 ml

4.6.21.3 *Stanovení biomasy v produkčních médiích*

V jednotlivých produkčních médiích bylo spektrofotometricky změřeno množství biomasy. 1 ml média byl naředěn na měřitelnou absorbanci a při vlnové délce 630 nm byl roztok proměřen. Pomocí regresní rovnice byla absorbance přepočtena na množství biomasy v g/litr média.

Regresní rovnice pro kmen *Rhodotorula glutinis* 20-2-33: $y = 0{,}1974 \cdot x - 0{,}0234$

4.6.21.4 *Stanovení metabolitů v produkčních médiích*

V extraktu z odstředěné biomasy byly stanoveny koncentrace karotenoidů. Karotenoidy, ergosterol i koenzym Q jsou součástí lipidické frakce. Lze je izolovat současně několikastupňovou extrakcí spojenou se zmýdelněním. Buňky ze 100 ml média byly centrifugovány, rozetřeny s 50 ml acetonu. Přídavkem 50 ml 10 % alkoholického roztoku KOH bylo zahájeno zmýdelnění na vodní lázni při 90 °C po dobu 30 minut. Nezmýdelnitelný podíl byl po ochlazení 3-krát extrahovaný diethyleterem. Spojené etherové frakce byly odpařeny na vakuové odparce.

Směs karotenoidů byla poté separována a analyzována metodou RP-HPLC/PDA. Spojené etherové extrakty byly rozpuštěny v 1 ml ethanolu pro UV, přefiltrovány přes mikrofiltr (porozita 0,45 μm) a krátce centrifugovány. Analýza probíhala izokraticky za průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, teplotě 45 ºC, na koloně Kinetex C18 (150 x 4,6 mm; 2,6 μm; Phenomenex) s předkolonou C18 a s detekcí při 450 nm pro karotenoidy, 285 nm pro ergosterol a 250 nm pro koenzym Q. Vzorek (10 - 20 μl) byl eluován methanolem pro HPLC (Gradient Grade). Data byla zpracována chromatografickým software Xcalibur. Identifikace a kvantifikace byla provedena s využitím externích standardů.

4.6.22 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla vypočítána z hodnot získaných proměřením daného parametru ve šťávě nebo extraktu před enkapsulací a po enkapsulaci.

4.6.23 Příprava lipidových částic metodou odpařování na tenké vrstvě (Thin Layer Evaporation, TLE)

Navážka 80 mg lecithinu a 10 mg cholesterolu byla rozpuštěna v 10 ml směsi rozpouštědla (chloroform:methanol - 4:1). Získaný roztok byl přelit do odpařovací baňky a za teploty 25 °C do sucha odpařen na rotační vakuové odparce. K odparku bylo přidáno 5 ml roztoku vzorku a směs byla střídavě míchána na vortexu a ultrazvukována, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění lipidového filmu na stěnách baňky. Po rozpuštění byl roztok centrifugován, supernatant byl použit pro stanovení enkapsulační účinnosti a velikosti a stability částic. Pro přípravu částic bez enkapsulovaného roztoku byl místo roztoku vzorku použit fosfátový pufr o pH = 8 [133].

4.6.24 Příprava lipidových částic metodou odpařování na reverzní vrstvě (Reverse Phase - Thin Layer Evaporation, RP-TLE)

Navážka 62,5 mg cholesterolu a 250 mg lecithinu byla rozpuštěna v 50 ml směsi rozpouštědla (cholesterol:methanol - 4:1). Roztok byl přelit do odpařovací baňky a do sucha odpařen na rotační vakuové odparce při teplotě 25 °C. Odparek byl rozpuštěn ve 40 ml etheru, k roztoku bylo přidáno 10 ml roztoku vzorku a směs byla ultrazvukována přibližně 1 minutu do vytvoření stabilní emulze. Ether byl odpařen za laboratorní teploty na rotační vakuové odparce a zbylá směs přešla na vodnou suspenzi. Ta byla následně doplněna na objem 50 ml v případě šťávy destilovanou vodou, v případě extraktů lyofilizátů 5% kyselinou citrónovou [134]. Připravené roztoky byly centrifugovány a supernatanty byly použity pro stanovení enkapsulační účinnosti. Pro přípravu prázdných částic byl místo roztoku vzorku použit fosfátový pufr o pH = 8.

4.6.25 Příprava lipidových částic metodou ethanolového vstřikování

4.6.25.1 Izolace lecitinu z vaječného žloutku

Žloutek byl smíchán s 25 ml acetonu a za občasného míchání ponechán stát 10 minut při laboratorní teplotě 25 °C. Poté byla směs filtrována a s filtračním koláčem byl postup zopakován. Zbylá sraženina na filtru byla rozpuštěna v 10 ml ethanolu, směs byla přefiltrována, se sraženinou na filtru byl postup zopakován. Ethanolové filtráty byly spojeny a odpařeny do sucha. Vzniklý odparek - vyizolovaný lecithin - byl rozpuštěn v 15 ml ethanolu [119].

4.6.25.2 Příprava částic

Roztok lecithinu byl pomocí injekční stříkačky s tenkou jehlou velmi pomalu vstřikován do roztoků vzorků v poměru 1:1 [133]. Připravené roztoky částic byly centrifugovány a supernatant byl použit pro stanovení enkapsulační účinnosti a stability a velikosti částic. Pro přípravu částic bez roztoku vzorku byl lecithin vstřikován do fosfátového pufru o pH = 8.

4.6.26 Příprava polysacharidových částic - chitosanové částice

250 mg chitosanu bylo rozpuštěno v 25 ml 5% kyseliny octové smíchané s 25 ml roztoku vzorku. Vzniklá směs byla ultrazvukována a po malých dávkách do ní byly přidávány 4 ml 2% tripolyfosfátu sodného [135]. Roztok připravených částic byl centrifugován, supernatant byl použit ke stanovení enkapsulační účinnosti, stability a velikosti částic.

Pro přípravu prázdných částic byl roztok vzorku nahrazen pufrem.

4.6.27 Příprava polysacharidových částic - chitosan-alginátové částice

25 ml alginátu o koncentraci 6 mg/ml bylo smícháno s 25 ml roztoku vzorku. Pomocí HCl bylo pH upraveno na hodnotu 5. Poté bylo do roztoku za stálého ultrazvukování přidáváno 10 ml $CaCl_2$ o koncentraci 3,35 mg/ml a hodnotě pH = 5 (upraveno pomocí HCl) a následně bylo pomalu přidáváno 20 ml roztoku chitosanu (0,8 mg/ml 1% kyseliny octové, pH upraveno na hodnotu 5 pomocí NaOH) [136]. Roztok připravených částic byl centrifugován, supernatant byl použit ke stanovení enkapsulační účinnosti, stability a velikosti částic.

Pro přípravu prázdných částic byl roztok vzorku nahrazen pufrem.

4.6.28 Stanovení velikosti částic

Velikost částic byla stanovena metodou dynamického rozptylu světla (Dynamic Light Scattering, DLS), která pracuje na principu osvětlování částic vzorku laserem a měření fluktuace intenzity rozptýleného světla [137].

Před samotným měřením byla upravena velikost částic podle kap. 4.5.9. Vzorek byl pak zředěn na koncentraci vhodnou pro stanovení.

4.6.29 Stanovení stability částic - určení zeta-potenciálu

Pro stabilitu lipozomů a jiných částic je důležitá nenulová hodnota elektrokinetického potenciálu (ζ-potenciálu), jehož velikost udává stabilitu koloidního systému. Absolutní hodnota náboje větší než ± 60 mV představuje vynikající stabilitu. Dobrá stabilita platí pro interval ± 40 - 60 mV, náboj v rozmezí ± 30 - 40 mV udává střední stabilitu. Stabilita již poněkud klesá při intervalu ± 10 - 30 mV. Náboj v rozmezí hodnot 0 až ± 5 mV vykazuje velkou nestabilitu částic, které mají tendenci shlukovat se a fluktuovat. Částice s nulovým zeta-potenciálem vykazují vysokou nestabilitu a nacházejí se v izoelektrickém bodě [138].

Zeta-potenciál závisí na pH, pokud je k částicím se záporným nábojem přidána kyselina, částice dosáhnou bodu neutralizace nebo získají kladný náboj [138].

Stabilita částic byla stanovena metodou dynamického rozptylu světla za použití Zeta Dipp cely. Roztoky vzorků byly před měřením upraveny podle kap. 4.5.9.

4.6.30 Stanovení stability částic v modelových tělních tekutinách

Stabilita částic byla sledována v žaludeční, pankreatické a žlučové šťávě [115]. Objem vzorku byl pipetován do příslušné šťávy a inkubován při teplotě 37 °C, pro žaludeční a pankreatickou šťávu po dobu 15 minut, pro žlučovou 60 minut. Po uplynutí inkubační doby byly ve vzorcích změřeny sledované parametry a z výsledků byla vyhodnocena stabilita případně rozpad částic v simulovaném trávicím traktu.

4.6.31 Stanovení vlastností systému použitím analytické centrifugace

Vlivem gravitačního zrychlení dochází v systému k oddělování dispergovaných částic. Částice s hustotou nižší než okolní prostředí směřují proti gravitačnímu zrychlení, částice s větší hustotou putují se zrychlením. Měřící zařízení v podobě temperované odstředivky zaznamenává změny koncentrace dispergovaných látek vlivem působení odstředivé síly. Sedimentace částic se projeví vyčeřením části vzorku (zvýšení transmitance) a tvorbou sedimentu (snížení transmitance). Výsledkem měření je profil transmitance vyjadřující závislost této veličiny na vzdálenosti od středu rotace [139].

Pro analytickou centrifugaci byl použit roztok vzorku bez jakékoliv předešlé úpravy. V průběhu měření byla snímána měnící se transmitance vzorku v kyvetě.

4.7 Senzorická analýza

Studie se zúčastnilo celkem 161 osob, 79 žen a 82 mužů. Spotřebitelský dotazník (viz Příloha č. 1) obsahoval 21 otázek, první čtyři otázky zjišťovaly základní informace o spotřebiteli, další tři otázky poskytovaly prostor pro dotazovaného, aby uvedl dle uvážení cereální výrobky, které zná, popřípadě kupuje. Následovaly otázky s výběrem jedné odpovědi z více nabízených, kde byly sledovány marketingové a ekonomické možnosti dotazovaných. V poslední části byly otázky zaměřeny na znalosti složení cereálních výrobků a životní styl dotazovaných.

Podle věku byli spotřebitelé rozděleni do skupin odstupňovaných po pěti letech (s výjimkou skupiny 0 až 10 a 61 až 70 let). Spotřebitelé byli rozděleni také podle dosaženého vzdělání, 5 % dosáhlo základního vzdělání, 12 % vyučení bez maturity, 4 % vyučení s maturitou, 45 % středoškolského vzdělání s maturitou, 34 % dosáhlo vysokoškolského vzdělání.

5 CÍL

1) Zpracování literární rešerše na téma:
   - aktivní látky v cereáliích a jejich biologické účinky (sacharidy, glykosidy; látky fenolické povahy - volné i vázané v glykosidech; vitaminy, provitaminy; další látky s potenciálním antioxidačním a antimutagenním účinkem)
   - moderní metody analýzy a identifikace aktivních látek
   - metody stanovení antioxidační a antimutagenní/genotoxické aktivity
   - postup přípravy fortifikovaných a funkčních potravin, analýza jejich nutriční hodnoty

2) Vývoj a optimalizace metod zaměřených na:
   - izolaci, analýzu, charakterizaci a identifikaci vybraných aktivních látek v cereáliích a cereálních produktech (HPLC/UV-VIS, HPLC/RI, HPLC/DAD)
   - optimalizace a zavedení metod stanovení antioxidační a antimutagenní/genotoxické aktivity (mikrobiální testy na *Saccharomyces cerevisiae* D7*, Escherichia coli, Euglena gracilis*)
   - vývoj postupů přípravy fortifikovaných cereálních potravin s aktivní složkou ve volné i enkapsulované formě včetně přípravy a charakterizace částic (DLS, SEM)
   - charakterizace průběhu enzymatické hydrolýzy cereálií a využití cereálních substrátů ke kultivaci vybraných mikroorganizmů

3) Aplikace zavedených metod na:
   - stanovení aktivních složek v cereáliích a modelových cereálních potravinách
   - stanovení antioxidační a antimutagenní aktivity cereálních potravin, hodnocení vzájemného vztahu i vztahu k obsahu dalších aktivních složek
   - příprava a analýza složení a komplexních biologických účinků vybraných modelových cereálních potravin s aktivní složkou
   - charakterizace stability a účinků fortifikovaných cereálních potravin a jejich složek v umělém fyziologickém prostředí
   - produkce obohacené mikrobiální biomasy

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předložená dizertační práce je zaměřena na studium biologických účinků aktivních látek vyskytujících se v cereáliích, na vývoj metod k analýze těchto účinků a ke stanovení obsahu aktivních složek a vyhodnocení vztahu složení a účinků cereálií a cereálních výrobků.

Analyzovány byly výrobky, které jsou z větší či menší části zastoupeny v lidské výživě. Jednalo se především o několik skupin surových cereálií (vločky, mouky, otruby, klíčky), ale také o různé druhy rýže či ochucených cereálií používaných především pro výživu dětí.

Výsledky byly rozděleny do tří hlavních částí.

V první části jsou analyzovány aktivní látky v surových cereáliích. Látky fenolické povahy a sacharidy byly analyzovány nepřímo jako skupinové parametry (celkové polyfenoly, flavonoidy, flavonoly, celkové a redukujicí sacharidy) a také přímo, tzn. byly analyzovány individuální flavonoidy a fenolické kyseliny, mono a disacharidy metodou kapalinové chromatografie.

V druhé části byla sledována antimutagenní aktivita a antioxidační kapacita u surových cereálních výrobků za účelem zhodnocení potenciálního biologického účinku a možného pozitivního působení na zdraví konzumenta.

Ve třetí části je uvedeno možné technologické využití a zpracování cereálií. Je zde uveden přehled výsledků studia aktivních látek v již upravených cereáliích, jedná se především o extrudované cereálie s různými příchutěmi (čokoláda, ovoce, med, aj.), tzv. snídaňové cereálie, které jsou určeny především pro dětskou část populace. Pro další použití cereálií je zde aplikovaná enzymatická hydrolýza vybraných substrátů za účelem přípravy materiálu pro kultivaci mikroorganizmů. Jako další možné využití cereálií byly připraveny modelové cereální směsi obohacené lyofilizovanou ovocnou složkou, přičemž byly sledovány možné interakce mezi ovocnou a cereální matricí připravených modelových obilných kaší. Nakonec byly připraveny a charakterizovány částice s enkapsulovanou ovocnou nebo zeleninovou složkou jako další možnost obohacování cereálních výrobků.

6.1 Studium aktivních látek v cereáliích

6.1.1 Stanovení fenolických sloučenin

Pro stanovení fenolických látek byly vzorky připravovány dvěma způsoby, extrakcí do vody, viz kap. 4.5.1 nebo hydrolyzovány, viz kap. 4.5.11. První způsob extrakce odpovídá formě cereálie obvykle přijímané do organizmu, druhý způsob do jisté míry odpovídá cereálii zpracované v trávicím traktu. Podmínky použité kyselé hydrolýzy jsou však agresivnější a předpokládá se, že se uvolní většina aktivních látek z vázaných forem a je tak detekováno jejich skutečné množství.

6.1.1.1 Celkové polyfenoly

Stanovení celkových polyfenolů ve vzorcích bylo provedeno spektrofotometricky podle kap. 4.6.1. Každý vzorek byl proměřen třikrát a jako výsledek je uvedena půměrná hodnota těchto měření. Rovněž směrodatná odchylka byla vypočítaná ze tří získaných hodnot.

Tab. 16 Kalibrační závislost kyseliny gallové

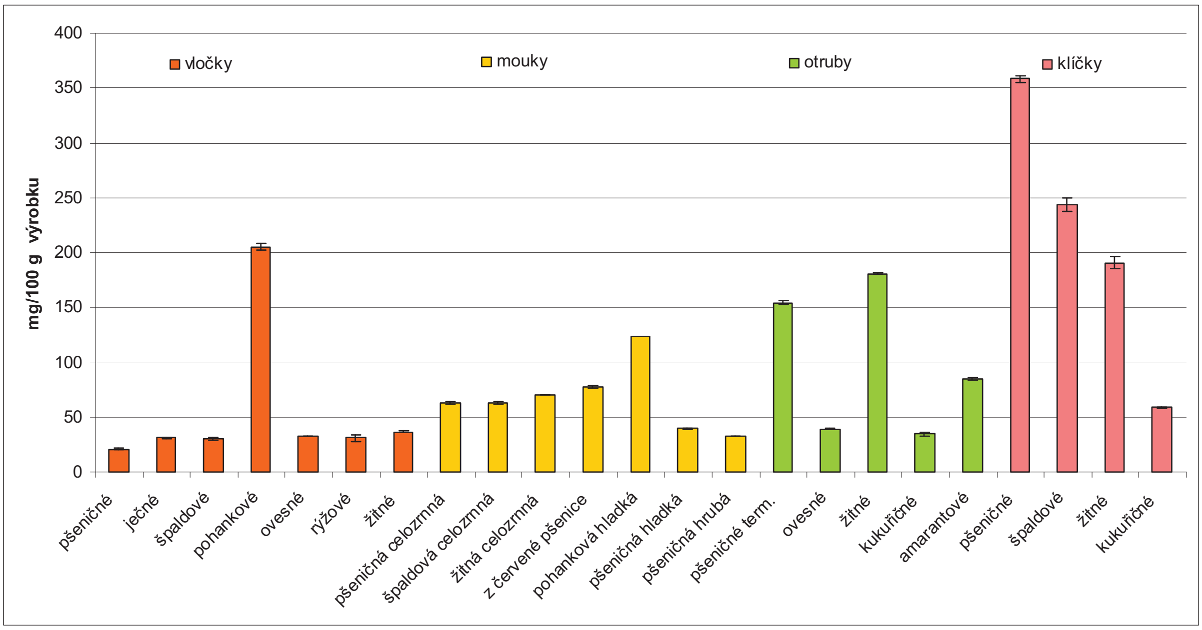
typ vzorku	regresní rovnice	koeficient determinace
cereálie	$A = 1{,}599 \cdot c$ (mg/ml)	$R^2 = 0{,}999$
rýže	$A = 1{,}495 \cdot c$ (mg/ml)	$R^2 = 0{,}998$

Tab. 17 Obsah celkových polyfenolů v cereálních vzorcích (mg/100 g výrobku)

	před hydrolýzou	po hydrolýze
VLOČKY		
pšeničné	21,14 ± 0,68	281,39 ± 7,96
ječné	31,20 ± 0,93	333,17 ± 1,96
špaldové	30,46 ± 1,58	331,17 ± 10,23
pohankové	205,40 ± 3,41	430,92 ± 3,19
ovesné	32,47 ± 0,07	362,75 ± 2,07
rýžové	31,14 ± 2,67	326,17 ± 5,03
žitné	36,63 ± 0,80	345,30 ± 3,28
MOUKY		
pšeničná celozrnná	63,31 ± 1,41	310,44 ± 5,11
špaldová celozrnná	63,42 ± 1,28	331,89 ± 4,15
žitná celozrnná	70,76 ± 0,07	396,96 ± 3,44
z červené pšenice	77,30 ± 1,32	273,40 ± 4,61
pohanková hladká	123,82 ± 0,31	300,58 ± 16,98
pšeničná hladká	39,46 ± 0,65	222,87 ± 1,20
pšeničná hrubá	33,03 ± 0,27	201,21±16,32
OTRUBY		
pšeničné term.	154,04 ± 1,87	535,82 ± 3,19
ovesné	39,14 ± 0,36	492,30 ± 1,46
žitné	181,12 ± 0,23	605,54 ± 4,67
kukuřičné	34,64 ± 1,44	697,78 ± 3,92
amarantové	84,88 ± 1,07	385,38 ± 7,00

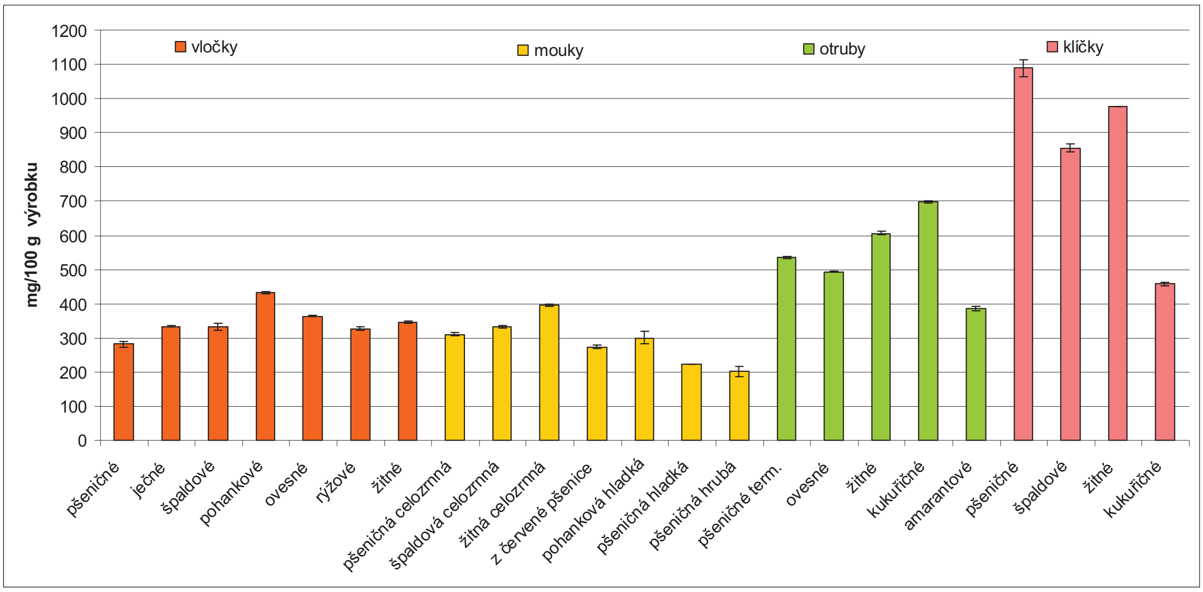
KLÍČKY		
pšeničné	358,40 ± 2,83	1 089,06 ± 24,36
špaldové	243,81 ± 6,10	855,47 ± 12,46
žitné	190,56 ± 5,26	976,64 ± 0,00
kukuřičné	58,98 ± 0,49	457,46 ± 4,94

Jak ukazuje Tab. 17 a Graf 1 obsah celkových polyfenolů se ve vzorcích pohyboval od 21,14 do 358,40 mg/100 g. Průměrný obsah podle jednotlivých skupin byl u vloček 30,51 mg/100 g, mouk 67,3 mg/100 g, klíčků 264,26 mg/100 g, a u otrub, vzhledem k velkému rozpětí hodnot, v rozsahu 34,64 - 181,12 mg/100 g. Z uvedených průměrných hodnot se vymykají vločky pohankové (205,04 mg/100 g) a mouka pohanková hladká, které vykazují mnohem vyšší obsah celkových polyfenolů než ostatní zástupci dané skupiny, což může být způsobeno vysokým obsahem rutinu v pohance [140]. Ostatní vločky vykazovaly velmi podobné výsledky, naopak klíčky kukuřičné vykazují podstatně menší hodnotu (58,98 mg/100 g), než je uvedený průměr. Obecně vykazují nejvyšší zjištěné hodnoty klíčky a otruby, kde se rovněž podle literatury předpokládá nejvyšší koncentrace fenolických sloučenin [29]. Stejně tak odpovídá skutečnost, že pšeničná mouka hladká a hrubá mají ze skupiny analyzovaných mouk nejnižší naměřené hodnoty oproti ostatním - celozrnným moukám, a to z důvodu vysokého stupně vymletí zrna.



Graf 1 Obsah celkových polyfenolů ve vzorcích (mg/100 g výrobku) - extrakce do vody

Pro stanovení celkových polyfenolů byly všechny vzorky nejprve extrahovány do vody. Takto byly získány výsledky o využitelnosti/dostupnosti těchto látek při běžné konzumaci. Fenolické látky se však často vyskytují v cereáliích ve vázané formě jako aglykonová část v glykosidech. Pro zjištění skutečného obsahu látek proto byla použita kyselá hydrolýza, během které došlo k narušení glykosidických vazeb a uvolnění polyfenolů do roztoku [14,15].



Graf 2 Obsah celkových polyfenolů ve vzorcích po kyselé hydrolýze (mg/100 g)

Z porovnání hodnot v Tab. 17 a v Grafu 1 a 2 je patrné, že kyselá hydrolýza (resp. agresivní kyselé prostředí) skutečně uvolnila mnohonásobně vyšší množství polyfenolů, než bylo možno detekovat ve vzorcích extrahovaných do vody. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u otrub kukuřičných, kde se obsah zvýšil 20krát na 697,78 mg/100 g, naopak u vloček pohankových se obsah zvýšil nejméně, pouze dvakrát, přesto však hodnota 430,92 mg/100 g patří k těm vyšším výsledkům měřených po kyselé hydrolýze a mezi vločkami je to nejvyšší zjištěná hodnota. Celkově nejvyšší obsah byl zjištěn u klíčků, kde průměrná hodnota představovala 844,66 mg/100 g. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u pšeničné mouky hladké (222,87 mg/100 g) a pšeničné mouky hrubé (201,21 mg/100 g), oba tyto vzorky vykazovaly nízké hodnoty již před hydrolýzou.

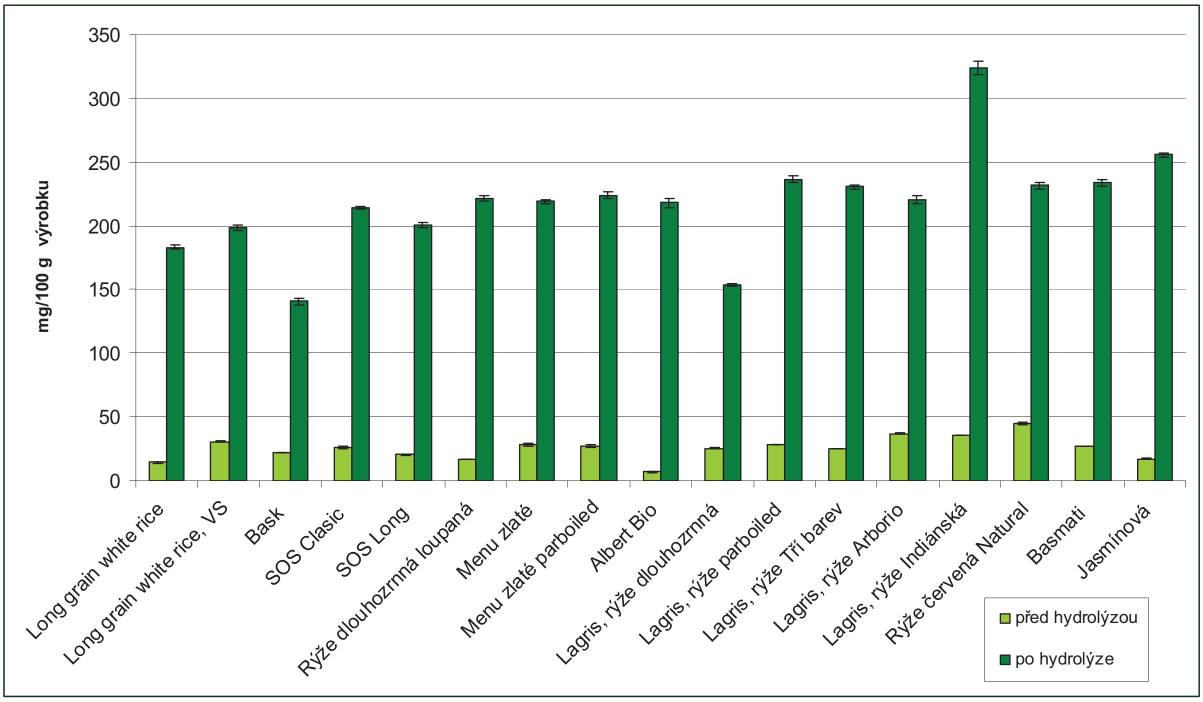
Výsledky tak odpovídají skutečnosti, že nejvíce aktivních látek je obsaženo především v klíčcích a obalových vrstvách zrna (otruby), naopak nejméně aktivních látek je ve vnitřní části zrna (endospermu), které je tvořeno především škrobem [10].

Tab. 18 Obsah celkových polyfenolů ve vzorcích rýže (mg/100 g)

	před hydrolýzou	po hydrolýze
Long grain white rice	14,14 ± 0,42	183,03 ± 1,42
Long grain white rice, VS	30,46 ± 0,40	198,33 ± 2,02
Bask	21,76 ± 0,28	140,83 ± 2,76
SOS Clasic	26,26 ± 0,76	214,27 ± 1,05
SOS Long	20,46 ± 0,36	200,35 ± 2,34
Rýže dlouhozrnná loupaná	16,66 ± 0,22	221,16 ± 2,07
Menu zlaté	28,10 ± 0,78	219,09 ± 1,27
Menu zlaté parboiled	26,82 ± 1,02	223,97 ± 2,64
Albert Bio	6,80 ± 0,16	217,89 ± 3,98
Lagris, rýže dlouhozrnná	25,36 ± 0,28	153,75 ± 1,24
Lagris, rýže parboiled	28,30 ± 0,24	236,60 ± 2,75
Lagris, rýže Tří barev	25,06 ± 0,40	230,46 ± 1,70
Lagris, rýže Arborio	36,66 ± 0,54	220,29 ± 3,38

Lagris, rýže Indiánská	35,58 ± 0,28	324,05 ± 5,47
Rýže červená Natural	44,98 ± 0,62	231,58 ± 2,31
Basmati	27,08 ± 0,28	233,62 ± 2,58
Jasmínová	17,12 ± 0,26	255,45 ± 1,95

Obsah celkových polyfenolů ve vzorcích rýže se pohyboval v rozmezí 6,80 - 44,98 mg/100 g. Nejnižší hodnota byla změřena u rýže Albert Bio, nejvyšší u rýže červené Natural a dále u Lagris Arborio (36,66 mg/100 g) a Lagris Indiánské (35,58 mg/100 g). U ostatních vzorků byl průměrný obsah 23,66 mg/100 g. Po hydrolýze se hladina celkových polyfenolů zvýšila několikanásobně, jak ukazuje Tab. 18 a Graf 3 . Nejvýrazněji se zvýšilo množství u rýže Albert Bio, a to 32krát na 217,89 mg/100 g, čímž se přiblížila k průměrné hodnotě, která činila 220,44 mg/100 g. Nejnižší množství bylo zjištěno u rýže Bask 140,83 mg/100 g, nejvyšší u rýže Lagris Indiánské, stejně jako u stanovení bez hydrolýzy.



Graf 3 Obsah celkových polyfenolů v rýžích (mg/100 g výrobku)

Obecně však množství celkových polyfenolů bylo podobné pro většinu vzorků (s výjimkou rýže Indiánské) a rozdíly v obsahu například mezi loupanými a neloupanými rýžemi nebyly nijak výrazné.

Srovnáním cereálních a rýžových vzorků (Tab. 17 a Tab. 18) lze říci, že rýžové vzorky obsahovaly spíše nižší množství celkových polyfenolů. Množství polyfenolů extrahované do vody je srovnatelné s obsahem v cereálních vločkách, po kyselé hydrolýze je až na rýži Indiánskou obsah celkových polyfenolů v rýžích nižší než u cereálních vzorků.

6.1.1.2 Celkové flavonoidy

Obsah celkových flavonoidů byl změřen spektrofotometricky podle kap. 4.6.2. Měření vždy probíhala třikrát, ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

Tab. 19 Kalibrační závislost katechinu

typ vzorku	regresní rovnice	koeficient determinace
cereálie	A = 3,475 · c (mg/ml)	R^2 = 0,998
rýže	A = 3,154 · c (mg/ml)	R^2 = 0,999

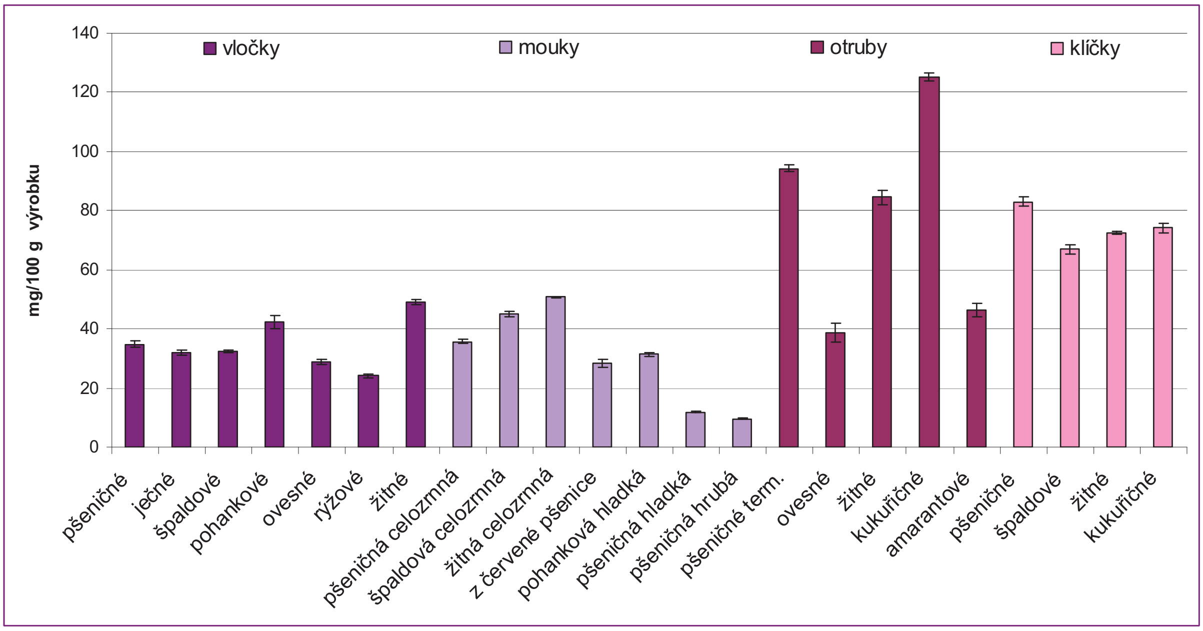
Tab. 20 Obsah celkových flavonoidů v cereáliích (mg/100 g výrobku)

	před hydrolýzou	po hydrolýze
VLOČKY		
pšeničné	3,07 ± 0,03	34,88 ± 1,30
ječné	8,06 ± 0,31	31,92 ± 0,93
špaldové	2,77 ± 0,06	32,34 ± 0,41
pohankové	39,27 ± 0,98	42,36 ± 2,17
ovesné	8,00 ± 0,21	28,79 ± 0,97
rýžové	9,81 ± 0,24	24,12 ± 0,75
žitné	7,85 ± 0,12	48,95 ± 0,90
MOUKY		
pšeničná celozrnná	3,89 ± 0,07	35,74 ± 0,77
špaldová celozrnná	4,15 ± 0,03	45,04 ± 1,03
žitná celozrnná	7,05 ± 0,19	50,73 ± 0,18
z červené pšenice	6,83 ± 0,09	28,52 ± 1,30
pohanková hladká	30,50 ± 0,61	31,32 ± 0,49
pšeničná hladká	1,94 ± 0,12	11,74 ± 0,21
pšeničná hrubá	1,20 ± 0,03	9,55 ± 0,19
OTRUBY		
pšeničné term.	10,47 ± 0,06	94,19 ± 1,17
ovesné	11,02 ± 1,04	38,78 ± 3,19
žitné	16,78 ± 0,18	84,43 ± 2,35
kukuřičné	3,61 ± 0,09	125,32 ± 1,33
amarantové	4,79 ± 0,16	46,37 ± 2,16
KLÍČKY		
pšeničné	71,82 ± 1,07	83,03 ± 1,71
špaldové	50,48 ± 0,21	66,92 ± 1,53
žitné	32,27 ± 0,64	72,49 ± 0,39
kukuřičné	10,91 ± 0,09	74,18 ± 1,64

Obsah celkových flavonoidů se ve vzorcích pohyboval v rozmezí 1,20 mg/100 g u mouky pšeničné hrubé až do 71,82 mg/100 g u klíčků pšeničných. Nízká hodnota byla také stanovena u mouky pšeničné hladké (1,94 mg/100 g). V rámci rozdělení vzorků do skupin se obsah flavonoidů pohyboval v průměru 6,59 mg/100 g u vloček, 4,18 mg/100 g u mouk, 9,33 mg/100 g u otrub a 41,37 mg/100 g. Jak je vidět z Tab. 20 , nejvyšší obsah se vyskytoval u klíčků. Průměrnou hodnotu u vloček a mouk však velmi výrazně přesahují pohankové produkty, kdy u vloček pohankových byl změřen obsah flavonoidů na 39,27 mg/100 g a mouky pohankové na 30,50 mg/100 g. Také zde má patrně vliv na takto vysoké hodnoty

obsah rutinu v pohance [140]. I výsledky flavonoidů odpovídají předpokladu, že nejvyšší obsah fenolických látek se nachází v otrubách a především klíčcích [29].

Po kyselé hydrolýze se opět zvýšilo množství analyzovaných flavonoidů, nejvýrazněji u otrub kukuřičných, a to 35krát. Při stanovení vzorků pouze extrahovaných vodou měl tento vzorek třetí nejnižší hladinu flavonoidů z analyzovaných vzorků (3,61 mg/100 g), po kyselé hydrolýze byla změřená hodnota 125,32 mg/100 g nejvyšší hodnotou napříč všemi vzorky. Výsledky ukazují Tab. 20 a Graf 4 .



Graf 4 Obsah celkových flavonoidů po kyselé hydrolýze (mg/100 g výrobku)

Průměrný obsah u ostatních vzorků byl u vloček 34,77 mg/100 g, mouk 38,27 mg/100 g, otrub 77,82 mg/100 g a klíčků 74,16 mg/100 g. Od průměrné hodnoty se výrazně liší mouka pšeničná hladká (11,74 mg/100 g) a pšeničná hrubá (9,55 mg/100 g). Kromě otrub byly u ostatních skupin výsledky v rámci jednoho typu produktu podobné, dále byla zaznamenána podobnost výsledků pro vločky a mouky a pro otruby a klíčky. U pohankových výrobků již není patrná vyšší hladina celkových flavonoidů, vlivem kyselé hydrolýzy patrně došlo ke štěpení rutinu na kvercetin a sacharid rutinózu ((β-L-rhamnozyl-(1→6)-β-D-glukóza) [52].

Tab. 21 Procentuální zastoupení celkových flavonoidů v celkových polyfenolech (%)

	před hydrolýzou	po hydrolýze	pokles/nárůst - / +
VLOČKY			
pšeničné	14,54	12,40	-
ječné	25,83	9,58	-
špaldové	9,11	9,77	+
pohankové	19,12	9,83	-
ovesné	24,64	7,94	-
rýžové	31,52	7,40	-
žitné	25,20	14,18	-

MOUKY			
pšeničná celozrnná	6,14	11,51	+
špaldová celozrnná	6,54	13,57	+
žitná celozrnná	9,97	12,78	+
z červené pšenice	8,83	10,43	+
pohanková hladká	39,49	10,42	-
pšeničná hladká	2,51	5,27	+
pšeničná hrubá	1,56	4,75	+
OTRUBY			
pšeničné term.	6,93	17,58	+
ovesné	7,30	7,88	+
žitné	11,11	13,94	+
kukuřičné	2,39	17,96	+
amarantové	3,18	12,03	+
KLÍČKY			
pšeničné	47,57	7,62	-
špaldové	33,44	7,82	-
žitné	21,37	7,42	-
kukuřičné	7,23	16,22	+

Procentuální zastoupení celkových flavonoidů v celkových polyfenolech, které shrnuje Tab. 21 , se pohybovalo od 1,56 % v mouce pšeničné hrubé do 47,57 % v klíčcích pšeničných. S výjimkou mouky pohankové (kde byl podíl druhý nejvyšší mezi analyzovanými vzorky, 39,49 %) bylo v moukách obecně nízké zastoupení flavonoidů v polyfenolech. Vysoký podíl flavonoidů byl změřen u všech klíčků kromě kukuřičných.

Po kyselé hydrolýze se uvolnilo značné množství flavonoidů, ale také polyfenolů a procentuální zastoupení se tak zvýšilo jen málo nebo dokonce kleslo. K nejvýraznějšímu poklesu došlo u klíčků pšeničných, ze 47,87 % na 7,62 %. K nejvýraznějšímu nárůstu podílu flavonoidů došlo u otrub kukuřičných, kde z 2,39 % před hydrolýzou stoupl obsah na 17,96 %.

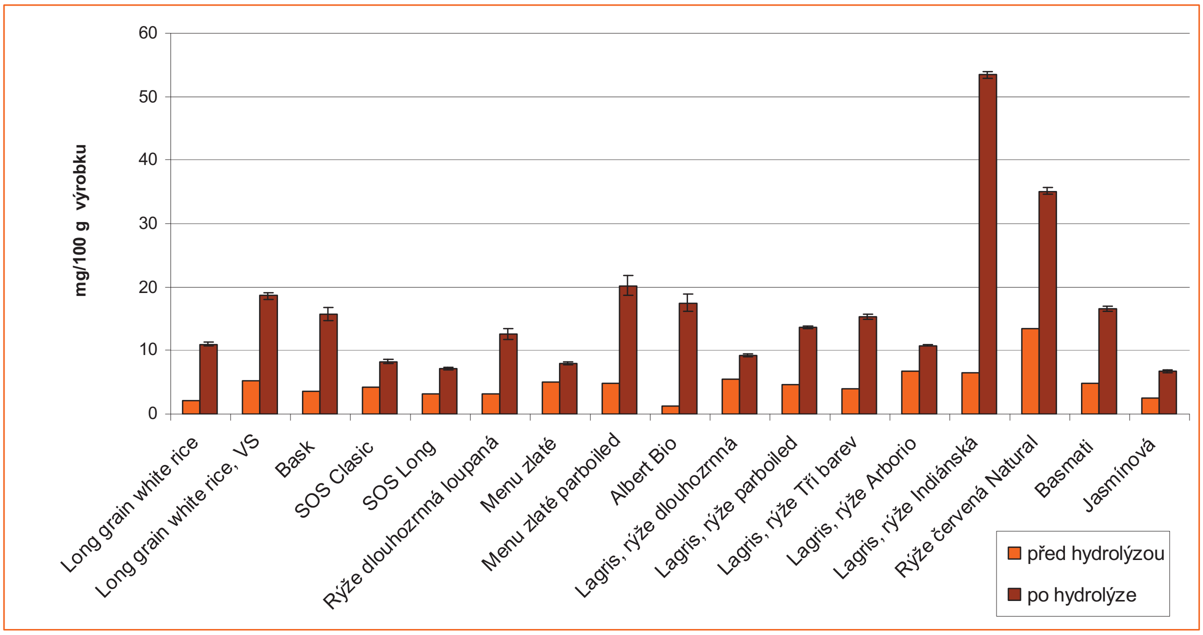
Tab. 22 Obsah celkových flavonoidů ve vzorcích rýže (mg/100 g)

	před hydrolýzou	po hydrolýze
Long grain white rice	2,20 ± 0,05	10,99 ± 0,29
Long grain white rice, VS	5,14 ± 0,05	18,58 ± 0,51
Bask	3,53 ± 0,04	15,72 ± 1,08
SOS Clasic	4,24 ± 0,03	8,27 ± 0,24
SOS Long	3,20 ± 0,03	7,22 ± 0,21
Rýže dlouhozrnná loupaná	3,14 ± 0,03	12,58 ± 0,78
Menu zlaté	4,95 ± 0,09	7,97 ± 0,23
Menu zlaté parboiled	4,75 ± 0,05	20,23 ± 1,53
Albert Bio	1,16 ± 0,04	17,49 ± 1,30
Lagris, rýže dlouhozrnná	5,51 ± 0,22	9,31 ± 0,21
Lagris, rýže parboiled	4,64 ± 0,03	13,56 ± 0,22

Lagris, rýže Tří barev	3,93 ± 0,06	15,32 ± 0,43
Lagris, rýže Arborio	6,76 ± 0,08	10,77 ± 0,16
Lagris, rýže Indiánská	6,57 ± 0,12	53,43 ± 0,48
Rýže červená Natural	13,33 ± 0,05	35,08 ± 0,55
Basmati	4,86 ± 0,14	16,53 ± 0,45
Jasmínová	2,56 ± 0,13	6,72 ± 0,18

Obsah celkových flavonoidů ve vzorcích rýže se pohyboval v rozmezí 1,16 mg/100 g (Albert Bio) - 13,33 mg/100 g (rýže červená Natural), přičemž tato hodnota byla dvojnásobná oproti druhé nejvyšší hodnotě 6,76 mg/100 g u rýže Lagris Arborio. Průměrně se množství celkových flavonoidů pohybovalo kolem hodnoty 4,20 mg/100 g.

Po kyselé hydrolýze se obsah celkových flavonoidů zvýšil několikrát. Nejvyšší množství bylo změřeno u rýže Lagris Indiánské (53,43 mg/100 g), nejnižší u rýže jasmínové (6,72 mg/100 g). Barevné rýže a obecně přírodní, tj. neloupané typy rýží obsahují podstatně vyšší množství fenolických látek i flavonoidů ve srovnání s rýží loupanou. Srovnáním hodnot flavonoidů v rýžích a ostatních cereáliích lze konstatovat, že podobně jako u celkových polyfenolů je obsah flavonoidů v rýžích o něco nižší, avšak nejedná se o podstatný rozdíl, spíše o menší rozdíly v rámci téhož řádu. Výsledky shrnuje Tab. 22 a Graf 5 .



Graf 5 Obsah celkových flavonoidů ve vzorích rýže (mg/100 g výrobku)

V porovnání s celkovými polyfenoly se již obsah celkových flavonoidů mezi vzorky lišil, především po kyselé hydrolýze. Nejvyšší obsah byl u rýže Indiánské a červené, třetí barevná rýže už však vysoký obsah nevykazovala, resp. obsah byl nižší než u některých loupaných rýží. Z výsledků lze usoudit, že i přes některé drobné rozdíly mají barevné neloupané rýže několikanásobně vyšší obsah flavonoidů než ostatní analyzované vzorky.

Obsah celkových flavonoidů extrahovaných do vody byl pro cereální i rýžové vzorky velmi podobný (s výjimkou cereálních klíčků, kde byl obsah výrazně vyšší), aplikací kyselé hydrolýzy množství celkových flavonoidů vzrostlo u cereálních i rýžových vzorků, avšak

pouze rýže Indiánská a červená dosahovala srovnatelných hodnot s cereáliemi, u ostatních rýží byl obsah flavonoidů nižší než u cereálních vzorků.

Tab. 23 Procentuální zastoupení celkových flavonoidů v celkových polyfenolech ve vzorcích rýže (%)

	před hydrolýzou	po hydrolýze	pokles/nárůst - / +
Long grain white rice	15,56	6,00	-
Long grain white rice, VS	16,87	9,37	-
Bask	16,22	11,16	-
SOS Clasic	16,15	3,86	-
SOS Long	15,64	3,60	-
Rýže dlouhozrnná loupaná	18,85	5,69	-
Menu zlaté	17,62	3,64	-
Menu zlaté parboiled	17,71	9,03	-
Albert Bio	17,06	8,03	-
Lagris, rýže dlouhozrnná	21,73	6,06	-
Lagris, rýže parboiled	16,40	5,73	-
Lagris, rýže Tří barev	15,68	6,65	-
Lagris, rýže Arborio	18,44	4,89	-
Lagris, rýže Indiánská	18,47	16,49	-
Rýže červená Natural	29,64	15,15	-
Basmati	17,95	7,08	-
Jasmínová	14,95	2,63	-

Procentuální zastoupení celkových flavonoidů v celkových polyfenolech bylo pro vzorky rýží velmi podobné (viz Tab. 23). Kromě rýže červené Natural s 29,64 % bylo průměrné zastoupení flavonoidů 17,21 %. Nejmenší podíl zaujímaly flavonoidy v rýži jasmínové, 14,95 %.

Po kyselé hydrolýze došlo k poklesu podílu flavonoidů na obsahu polyfenolů u všech vzorků. K nejmenšímu poklesu došlo u rýže Indiánské (-1,98 %); znamená to tedy, že významná část látek uvolněných kyselou hydrolýzou nespadá do skupiny flavonoidů.

6.1.1.3 Celkové flavonoly

Množství celkových flavonolů ve vzorcích bylo změřeno podle postupu uvedeného v kap. 4.6.3. Měření byla provedena třikrát, ze získaných hodnot byl spočítán průměr a směrodatná odchylka.

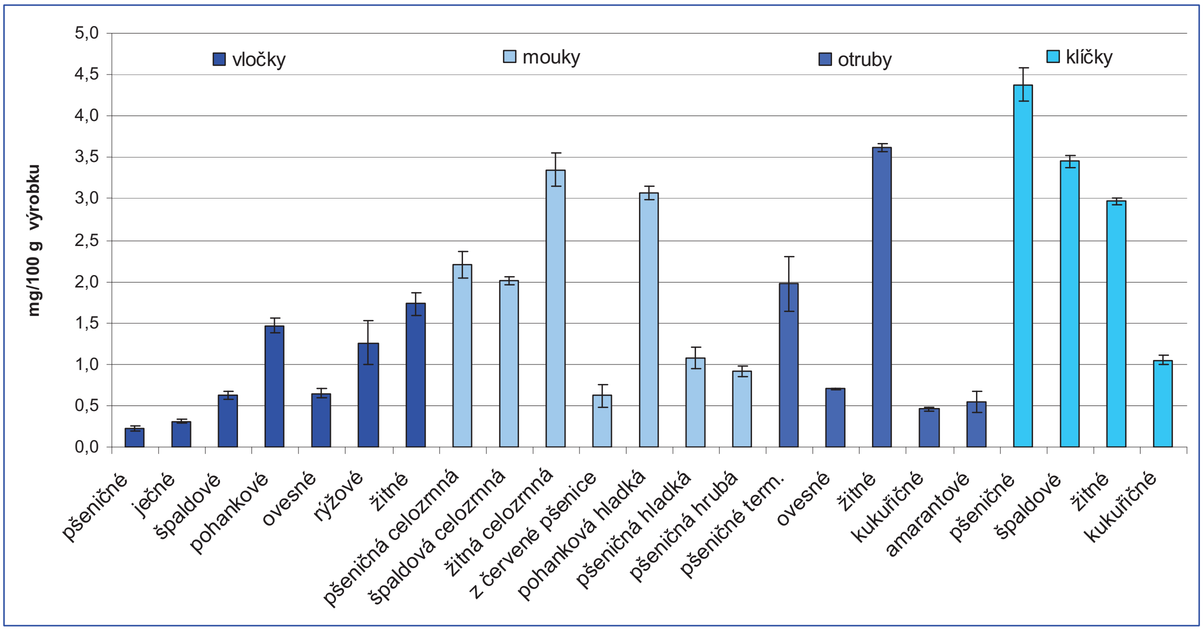
Tab. 24 Kalibrační rovnice pro výpočet celkových flavonolů

typ vzorku	regresní rovnice	koeficient determinace
cereálie, rýže	$A = 27{,}564 \cdot c$ (mg/ml)	$R^2 = 0{,}998$

Tab. 25 Obsah celkových flavonolů v cereáliích

	(mg/100 g)	podíl celk. flavonolů v celk. flavonoidech (%)
VLOČKY		
pšeničné	0,23 ± 0,03	7,61
ječné	0,31 ± 0,02	3,81
špaldové	0,63 ± 0,05	22,72
pohankové	1,47 ± 0,09	3,73
ovesné	0,65 ± 0,05	8,10
rýžové	1,26 ± 0,27	12,86
žitné	1,73 ± 0,14	22,06
MOUKY		
pšeničná celozrnná	2,20 ± 0,16	56,60
špaldová celozrnná	2,01 ± 0,05	48,53
žitná celozrnná	3,35 ± 0,20	47,53
z červené pšenice	0,62 ± 0,14	9,05
pohanková hladká	3,07 ± 0,08	10,06
pšeničná hladká	1,08 ± 0,13	55,92
pšeničná hrubá	0,92 ± 0,06	76,83
OTRUBY		
pšeničné term.	1,97 ± 0,33	18,77
ovesné	0,70 ± 0,01	6,35
žitné	3,62 ± 0,05	21,58
kukuřičné	0,46 ± 0,02	12,79
amarantové	0,54 ± 0,13	11,20
KLÍČKY		
pšeničné	4,38 ± 0,20	6,09
špaldové	3,45 ± 0,07	4,68
žitné	2,97 ± 0,04	10,68
kukuřičné	1,05 ± 0,06	27,20

Obsah celkových flavonolů v cereáliích (uvádí Tab. 25 a Graf 6) byl změřen v rozmezí 0,23 až 4,38 mg/100 g. Nejméně bylo naměřeno ve vločkách ovesných a obecně skupina vloček obsahovala nejméně celkových flavonolů mezi ostatními skupinami výrobků. Naopak nejbohatší výrobky byly klíčky, z nichž nejvíce klíčky pšeničné. Podle druhu obiloviny je možno říci, že bohatým zdrojem jsou výrobky z žita. Rovněž pohankové produkty jsou bohatým zdrojem celkových flavonolů; na vysokém obsahu se zřejmě značným dílem podílí rutin, který patří do skupiny flavonolů, a kterého je pohanka bohatým zdrojem [139].



Graf 6 Obsah celkových flavonolů v cereálních vzorích (mg/100 g výrobku)

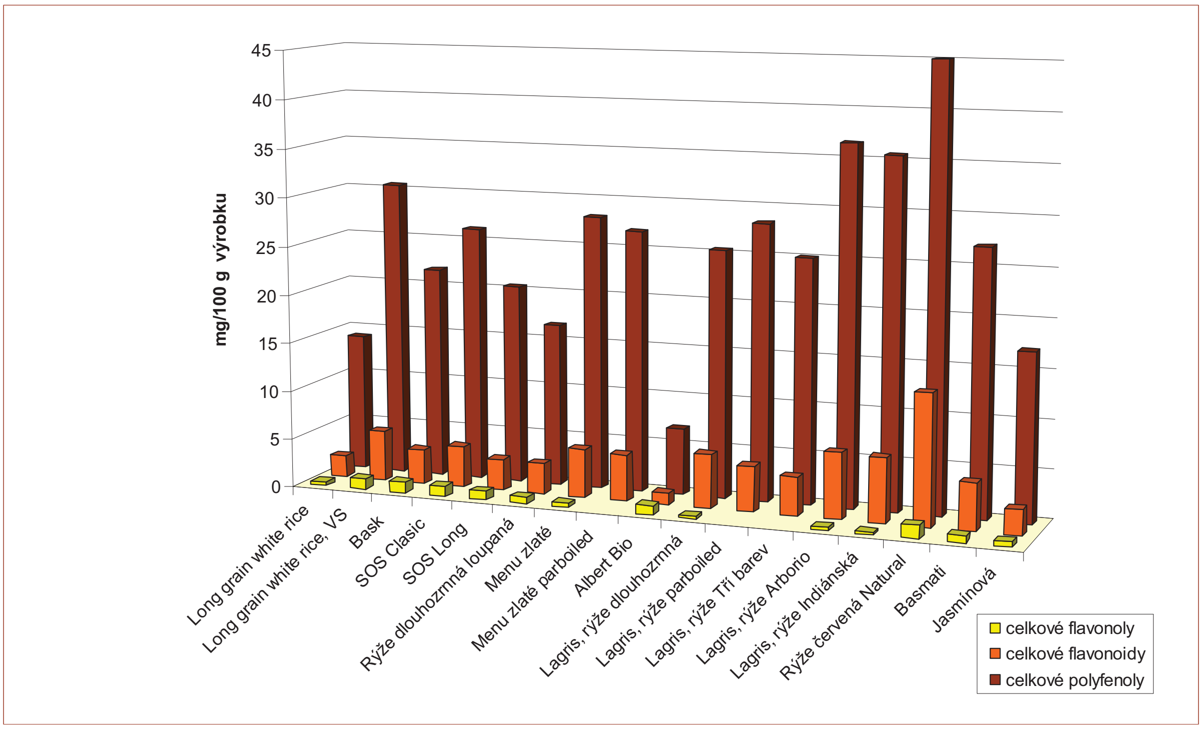
Při porovnání obsahu celkových flavonolů a flavonoidů bylo zjištěno, že flavonoly zaujímaly podíl ve flavonoidech v rozmezí od 3,73 do 76,83 %. Nejnižší podíl byl překvapivě u vloček pohankových, přičemž rutin, který je v pohance obsažen ve velkém množství, patří právě do podskupiny flavonolů. Nejvyšší zastoupení flavonolů měla mouka pšeničná hrubá a mouky obecně (s výjimkou mouky pohankové a z červené pšenice).

Tab. 26 Obsah celkových flavonolů v rýži

	mg/100 g	podíl celk. flavonolů v celk. flavonoidech (%)
Long grain white rice	0,42 ± 0,04	18,89
Long grain white rice, VS	1,10 ± 0,20	21,46
Bask	1,12 ± 0,16	31,82
SOS Clasic	1,06 ± 0,18	24,93
SOS Long	0,92 ± 0,14	28,75
Rýže dlouhozrnná loupaná	0,70 ± 0,11	22,37
Menu zlaté	0,44 ± 0,03	8,86
Menu zlaté parboiled	nd	-
Albert Bio	0,95 ± 0,09	81,90
Lagris, rýže dlouhozrnná	0,29 ± 0,19	5,26
Lagris, rýže parboiled	nd	-
Lagris, rýže Tří barev	nd	-
Lagris, rýže Arborio	0,32 ± 0,01	4,79
Lagris, rýže Indiánská	0,27 ± 0,07	4,11
Rýže červená Natural	1,33 ± 0,37	10,01
Basmati	0,72 ± 0,26	14,83
Jasmínová	0,54 ± 0,14	21,29

nd = nedekováno

Ve vzorcích rýže bylo množství celkových flavonolů stanoveno v rozmezí 0,24 mg/100 g v rýži Lagris Indiánské až 1,33 mg/100 g v červené rýži Natural. Mezi rýže s vyšším obsahem celkových flavonolů se řadí také rýže Albert bio (0,95 mg/100 g), která při analýzách celkových polyfenolů a flavonoidů vykazovala vždy nejnižší hodnoty; znamená to tedy, že podskupina flavonolů je v této rýži zastoupena v porovnání s ostatními vzorky ve vysoké míře. Naopak ve třech vzorcích (Menu zlaté parboiled, Lagris rýže parboiled a Lagris tří barev) nebyly celkové flavonoly detekovány vůbec, přičemž při analýze celkových polyfenolů a flavonoidů tyto rýže vykazovaly průměrné až vysoké hodnoty. Výsledky uvádí Graf 7 .



Graf 7   Zastoupení skupinových parametrů ve vzorcích rýže (mg/100 g výrobku)

Z obsahu celkových flavonolů bylo také spočítáno procentuální zastoupení flavonolů v celkových flavonoidech. Rozsah byl od 4,11 % u rýže Indiánské až po 31,82 % u rýže Bask. Z tohoto rozpětí se vymykala rýže Albert bio s 81,90 %. Výsledky uvádí Tab. 26 .

Obsah celkových flavonolů byl v rýžových a cereálních vzorcích až na několik výjimek srovnatelný.

V literatuře jsou fenolické látky uváděny především jako sloučeniny s pozitivním biologickým účinkem na lidský organizmus [141]. Zmiňovány jsou zejména flavonoidy pro antioxidační (jsou řazeny mezi sekundární antioxidanty) a antimutagenní účinky [6,28,52]. Uváděna je také spojitost mezi snížením výskytu civilizačních onemocnění (kardiovaskulární nemoci, diabetes II. typu aj.) a zvýšenou konzumací cereálních výrobků právě z hlediska obsahu fytochemikálií, mezi něž jsou fenolické látky řazeny [141]. Obsah skupinových parametrů typu polyfenolických látek však ještě nemusí mít dostatečnou výpovědní hodnotu ohledně zdravotních účinků, poněvadž se jedná o heterogenní skupinu různorodých látek, které mohou vykazovat jak antioxidační a antimutagení vlastnosti, tak také prooxidační a genotoxické [72]. Hodnoty celkových flavonoidů i flavonolů jsou obvykle ukazatelem přítomnosti zdraví prospěšných látek [142]. Poměrně vysoké zastoupení celkových flavo-

noidů a flavonolů v polyfenolech uvedené v Tab. 21 , Tab. 23 Tab. 25 a Tab. 26 ukazuje na potenciálně vysoký zdravotní přínos vyplývající z konzumace cereálií.

6.1.1.4 Katechiny

Katechiny jsou individuální flavonoidy odvozené od molekuly flavanu, viz Obr. 2 [25]. Analýza katechinů ve vzorcích byla provedena podle kap. 4.6.5. Vzorky byly změřeny třikrát, ze získaných hodnot byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

Tab. 27 Rovnice kalibračních závislostí pro výpočet obsahu katechinů v cereáliích

standard	regresní rovnice	koeficient determinace
katechin	y (mV·s) = 29,031 · x (µg/ml)	R^2 = 0,992
katechin gallát	y (mV·s) = 28,692 · x (µg/ml)	R^2 = 0,996
epikatechin	y (mV·s) = 23,938 · x (µg/ml)	R^2 = 0,999
epikatechin gallát	y (mV·s) = 80,433 · x (µg/ml)	R^2 = 0,992

Tab. 28 Obsah katechinů v cereálních vzorcích (mg/100 g výrobku)

	katechin	katechin gallát	epikatechin	epikatechin gallát
VLOČKY				
pšeničné	17,64 ± 0,27	6,20 ± 0,09	23,79 ± 0,75	1,51 ± 0,04
ječné	22,47 ± 0,09	nd	69,45 ± 0,72	2,18 ± 0,05
špaldové	19,83 ± 0,10	6,04 ± 0,05	42,34 ± 0,55	1,04 ± 0,02
pohankové	87,86 ± 0,30	61,45 ± 0,17	33,17 ± 0,37	48,46 ± 0,19
ovesné	41,22 ± 0,26	10,12 ± 0,01	47,74 ± 0,53	3,41 ± 0,15
rýžové	12,79 ± 0,19	5,65 ± 0,06	25,29 ± 0,10	1,20 ± 0,04
žitné	28,16 ± 0,15	6,86 ± 0,10	51,97 ± 0,74	1,77 ± 0,05
MOUKY				
pšeničná celozrnná	25,27 ± 0,21	11,05 ± 0,15	45,22 ± 0,88	1,06 ± 0,04
špaldová celozrnná	32,64 ± 0,31	13,11 ± 0,26	41,71 ± 0,36	nd
žitná celozrnná	47,56 ± 0,24	9,36 ± 0,20	37,71 ± 0,33	3,28 ± 0,10
z červené pšenice	46,78 ± 0,18	19,06 ± 0,12	46,44 ± 0,59	1,05 ± 0,02
pohanková hladká	67,43 ± 0,16	33,95 ± 0,48	46,12 ± 0,99	31,35 ± 0,24
pšeničná hladká	19,73 ± 0,25	5,74 ± 0,08	30,07 ± 0,32	1,05 ± 0,12
pšeničná hrubá	11,21 ± 0,16	1,50 ± 0,09	19,02 ± 0,17	0,29 ± 0,07
OTRUBY				
pšeničné term.	100,92 ± 1,96	63,41 ± 1,15	146,80 ± 1,24	3,06 ± 0,05
ovesné	38,86 ± 0,18	11,26 ± 0,03	38,96 ± 0,17	0,90 ± 0,07
žitné	113,98 ± 1,87	27,08 ± 0,53	118,97 ± 0,93	3,92 ± 0,15
kukuřičné	42,40 ± 0,51	6,99 ± 0,08	65,41 ± 0,28	2,12 ± 0,16
amarantové	91,38 ± 1,30	11,71 ± 0,19	73,56 ± 0,76	4,50 ± 0,14
KLÍČKY				
pšeničné	431,81 ± 6,77	102,45 ± 1,25	761,08 ± 0,51	23,10 ± 0,23
špaldové	316,76 ± 4,80	96,57 ± 0,66	496,38 ± 2,79	16,92 ± 0,12
žitné	472,06 ± 7,22	87,67 ± 0,47	764,89 ± 2,94	nd

kukuřičné	43,26 ± 0,41	18,50 ± 0,11	70,36 ± 0,63	1,55 ± 0,06

nd = non detected, nedetekováno

Metodou HPLC byl ve vzorcích analyzován katechin, katechin gallát, epikatechin a epikatechin gallát, přičemž katechin a epikatechin byl detekován ve všech vzorcích, katechin gallát nebyl změřen ve vločkách ječných a epikatechin gallát v mouce špaldové celozrnné a klíčcích žitných. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 28 .

Obsah katechinu ve vzorcích se pohyboval v rozmezí od 11,21 mg/100 g v mouce pšeničné hrubé po 472,06 mg/100 g v klíčcích žitných. V klíčcích obecně bylo zjištěno nejvyšší množství katechinu ze všech měřených cereálií s výjimkou klíčků kukuřičných, kde bylo množství o jeden řád nižší oproti ostatním klíčkům. Pohankové výrobky obsahem katechinu vždy převyšovaly ostatní výrobky dané skupiny. Ve vločkách byl průměrný obsah katechinu 20,18 mg/100 g, kdežto u vloček pohankových bylo změřeno množství 87,86 mg/100 g. V této skupině byla ještě zjištěna vysoká hladina katechinu u vloček ovesných (41,22 mg/100 g). Podobně je tomu u skupiny mouk, kde mouka pohanková má nejvyšší obsah katechinu (67,43 mg/100 g) mezi ostatními druhy.

Stejně jako katechin, také epikatechin byl detekován u všech vzorků. Jeho obsah se pohyboval od 19,02 mg/100 g v mouce pšeničné hrubé do 764,89 mg/100 g v klíčcích žitných, oba zástupci jsou stejní jako u katechinu. Nejvyšší obsah epikatechinu byl opět zjištěn u skupiny klíčků, kromě klíčků žitných (viz výše) dále u pšeničných (761,08 mg/100 g) a špaldových (496,38 mg/100 g). Také zde obsahovaly klíčky kukuřičné o řád nižší množství epikatechinu. U ostatních skupin již byl obsah epikatechinu podobný a žádný cereální produkt významně nepřevyšoval průměrné množství v rámci skupiny.

Obsah katechin gallátu byl stanoven v rozmezí 1,50 mg/100 g (mouka pšeničná hrubá) - 102,45 mg/100 g (klíčky pšeničné), u vloček ječných nebyl detekován vůbec. Pohankové výrobky vykazovaly vyšší obsah oproti ostatním výrobkům, u vloček byl obsah desetinásobný než byla průměrná hodnota, u mouk byla hodnota dvoj- až trojnásobná oproti ostatním moukám. S výjimkou klíčků kukuřičných obsahovala nejvyšší množství katechin gallátu skupina klíčků. U otrub byla hladina proměnlivá, od 63,41 mg/100 g u otrub pšeničných po 6,99 mg/100 g u otrub kukuřičných.

Epikatechin gallát nebyl detekován u mouky špaldové celozrnné a klíčků žitných, pro ostatní produkty byl obsah změřen v rozsahu 0,29 mg/100 g - 48,46 mg/100 g. Nejmenší množství bylo změřeno u mouky pšeničné hrubé. Nejvyšší u vloček pohankových, přičemž průměrná hodnota obsahu epikatechin gallátu (1,85 mg/100 g) byla převýšena téměř 26krát. Podobně také mouka pohanková (31,35 mg/100 g) významně převyšovala stanovené množství oproti ostatním moukám (průměrně 1,34 mg/100 g). Vysoké množství bylo dále změřeno u klíčků pšeničných a špaldových. Skupina otrub nevykazovala vyšší množství oproti ostatním skupinám.

Obecně lze říci, že nejvyšší množství katechinů vykazovaly klíčky (s výjimkou kukuřičných), vyšší obsah byl také zaznemanán u otrub, zde již však množství nebylo významně vyšší než u dalších výrobků, vloček a mouk. Stejně tak pohankové výrobky vykazovaly nejvyšší nebo téměř nejvyšší množstí analyzovaných katechinů, naproti tomu nejnižší hodnoty vykazovaly pšeničné mouky s vysokým stupněm vymletí.

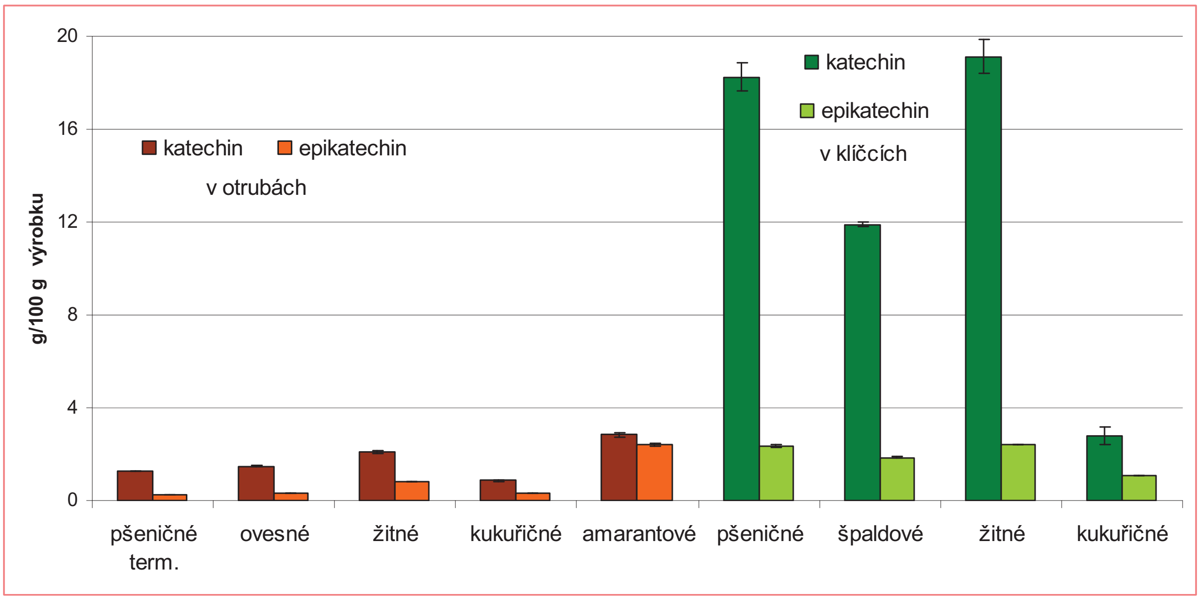
Tab. 29 Množství katechinů ve vzorcích po kyselé hydrolýze (g/100 g)

	katechin	epikatechin
VLOČKY		
pšeničné	1,35 ± 0,08	1,7 ± 0,78
ječné	1,03 ± 0,03	0,90 ± 0,00
špaldové	0,84 ± 0,01	1,05 ± 0,01
pohankové	2,06 ± 0,09	0,43 ± 0,01
ovesné	1,45 ± 0,02	0,56 ± 0,00
rýžové	0,87 ± 0,03	0,52 ± 0,01
žitné	1,42 ± 0,03	2,79 ± 0,10
MOUKY		
pšeničná celozrnná	1,30 ± 0,04	1,49 ± 0,04
špaldová celozrnná	1,34 ± 0,05	1,52 ± 0,05
žitná celozrnná	1,56 ± 0,06	2,85 ± 0,09
z červené pšenice	1,32 ± 0,09	1,20 ± 0,07
pohanková hladká	1,21 ± 0,01	0,73 ± 0,00
pšeničná hladká	0,54 ± 0,01	0,76 ± 0,00
pšeničná hrubá	0,36 ± 0,01	0,70 ± 0,00
OTRUBY		
pšeničné term.	1,28 ± 0,02	0,27 ± 0,01
ovesné	1,48 ± 0,02	0,33 ± 0,00
žitné	2,11 ± 0,07	0,84 ± 0,01
kukuřičné	0,86 ± 0,02	0,34 ± 0,00
amarantové	2,84 ± 0,10	2,42 ± 0,04
KLÍČKY		
pšeničné	18,25 ± 0,63	2,35 ± 0,04
špaldové	11,89 ± 0,09	1,86 ± 0,02
žitné	19,14 ± 0,72	2,42 ± 0,02
kukuřičné	2,78 ± 0,37	1,06 ± 0,01

Po kyselé hydrolýze byly ve vzorcích detekovány již pouze katechin a epikatechin, katechin gallát a epikatechin gallát byly vlivem kyselé hydrolýzy rozštěpeny na katechin, resp. epikatechin a kyselinu gallovou. Obsah jednotlivých katechinů se po kyselé hydrolýze vždy několikanásobně zvýšil, což mohlo být způsobeno právě uvolněním katechinu/epikatechinu z gallátů (viz Tab. 29).

Obsah katechinu po hydrolýze se pohyboval v rozmezí 0,36 g/100 g (mouka pšeničná hrubá) - 19,14 g/100 g, přičemž nejvyšší hodnota u klíčků žitných, spolu s klíčky pšeničnými (18,25 g/100 g) a špaldovými (11,89 g/100 g) výrazně převyšovala průměrný obsah katechinu u ostatních vzorků, který byl 1,40 g/100 g. Klíčky tak lze považovat za dobrý zdroj katechinu (viz Graf 8).

Množství epikatechinu ve vzorcích bylo stanoveno v rozmezí 0,27 g/100 g - 2,85 g/100 g. Nejnižší obsah byl změřen v otrubách pšeničných, naopak nejvyšší u mouky žitné celozrnné. Žitné produkty vykazovaly vždy vyšší obsah katechinu při porovnání stejných produktů z jiných obilovin. Vyšší množství bylo změřeno také u otrub amarantových (2,42 g/100 g).



Graf 8 Obsah katechinu a epikatechinu v otrubách a klíčcích po kyselé hydrolýze (g/100 g výrobku)

Tab. 30 Rovnice kalibračních závislostí pro výpočet obsahu katechinů v rýžích

standard	kalibrační rovnice	koeficient determinace
katechin	y (mV·s) = 23,142 · x (µg/ml)	$R^2 = 0{,}999$
katechin gallát	y (mV·s) = 25,308 · x (µg/ml)	$R^2 = 0{,}986$
epikatechin	y (mV·s) = 19,523 · x (µg/ml)	$R^2 = 0{,}984$
epikatechin gallát	y (mV·s) = 85,187 · x (µg/ml)	$R^2 = 0{,}996$

Tab. 31 Obsah katechinů v rýžích (mg/100 g)

	katechin	katechin gallát	epikatechin	epikatechin gallát
Long grain white rice	1,25 ± 0,03	2,12 ± 0,01	1,00 ± 0,02	0,55 ± 0,00
Long grain white rice, VS	5,28 ± 0,05	3,19 ± 0,02	1,16 ± 0,00	0,56 ± 0,01
Bask	1,65 ± 0,01	2,77 ± 0,04	1,17 ± 0,02	0,74 ± 0,01
SOS Clasic	1,59 ± 0,05	3,18 ± 0,01	0,91 ± 0,00	0,65 ± 0,02
SOS Long	2,18 ± 0,03	3,03 ± 0,01	0,78 ± 0,02	0,74 ± 0,01
Rýže dlouhozrnná loupaná	1,04 ± 0,02	3,23 ± 0,02	0,89 ± 0,00	0,48 ± 0,00
Menu zlaté	2,37 ± 0,01	4,06 ± 0,05	1,39 ± 0,04	0,93 ± 0,01
Menu zlaté parboiled	22,44 ± 0,05	43,96 ± 0,48	4,71 ± 0,03	1,00 ± 0,04
Albert Bio	0,80 ± 0,04	1,95 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Lagris, rýže dlouhozrnná	1,75 ± 0,06	2,36 ± 0,01	2,45 ± 0,05	0,75 ± 0,00
Lagris, rýže parboiled	16,79 ± 0,13	23,92 ± 0,60	2,44 ± 0,01	0,43 ± 0,00
Lagris, rýže Tří barev	27,60 ± 0,29	41,10 ± 1,41	3,25 ± 0,00	0,63 ± 0,00
Lagris, rýže Arborio	2,45 ± 0,01	5,13 ± 0,10	0,85 ± 0,03	0,82 ± 0,02
Lagris, rýže Indiánská	19,20 ± 0,17	26,15 ± 0,04	4,62 ± 0,03	5,92 ± 0,07
Rýže červená Natural	5,64 ± 0,16	1,52 ± 0,04	1,36 ± 0,01	0,27 ± 0,01
Basmati	2,83 ± 0,02	3,47 ± 0,08	1,11 ± 0,05	0,82 ± 0,00
Jasmínová	2,69 ± 0,07	4,37 ± 0,06	1,07 ± 0,02	0,85 ± 0,03

Na rozdíl od cereálních vzorků byly všechny katechiny detekovány ve všech vzorcích rýže, i když obsah většiny derivátů byl v rýži nižší. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 31 .

Množství katechinu bylo změřeno v rozmezí 0,80 až 27,60 mg/100 g. Nejméně katechinu bylo zjištěno u rýže Albert Bio, nejvíce u rýže Tří barev značky Lagris. Vysoké hodnoty byly dále zaznamenány u rýže Menu zlaté Parboiled a rýže Indiánské a Parboiled, obě značky Lagris.

Průměrné množství epikatechinu ve vzorcích bylo 1,68 mg/100 g, nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u rýže Menu zlaté parboiled (4,71 mg/100 g) a rýže Indiánské Lagris (4,62 mg/100 g), nejnižší u rýže Albert Bio, stejně jako u katechinu.

Obsah katechin gallátu byl v průměru 3,11 mg/100 g. Tuto hodnotu však převyšovalo několi vzorků. Vůbec nejvyšší obsah byl stanoven v rýži Menu zlaté parboiled, a to 43,96 mg/100 g, dále pak v rýži Tří barev (41,10 mg/100 g), rýži Indiánské (26,15 mg/100 g) a rýži parboiled (23,92 mg/100 g), vše značky Lagris. Nejméně katechin gallátu bylo zjištěno u rýže červené Natural, 1,52 mg/100 g.

Obsah epikatechin gallátu byl ve všech vzorcích velmi nízký, kromě rýže Indiánské (5,92 mg/100 g) a Menu zlaté parboiled (1,00 mg/100 g) se obsah u ostatních vzorků pohyboval pod hranicí 1 mg na 100 g rýže. Nejmenší množství obsahovala rýže Albert Bio (0,17 mg/100 g).

U všech čtyř analyzovaných katechinů byly nejvyšší hodnoty změřeny u rýže Menu zlaté parboiled a rýže Indiánské, naopak velmi nízké hodnoty vykazovala rýže Albert bio. Vysoké hladiny analyzovaných látek v rýži parboiled jsou patrně způsobeny použitou technologií, která zakoncentrovává biologicky aktivní látky uvnitř zrna a chrání je před ztrátami během dalšího zpracování nebo během kulinářské úpravy [143]. U rýže Indiánské je vysoký obsah patrně způsoben přítomností povrchových vrstev zrna. Výsledky analýzy katechinů jsou podobné výsledkům kolorimetrického stanovení celkových polyfenolů i flavonoidů, výrazněji však vystupují rozdíly mezi jednotlivými druhy rýže.

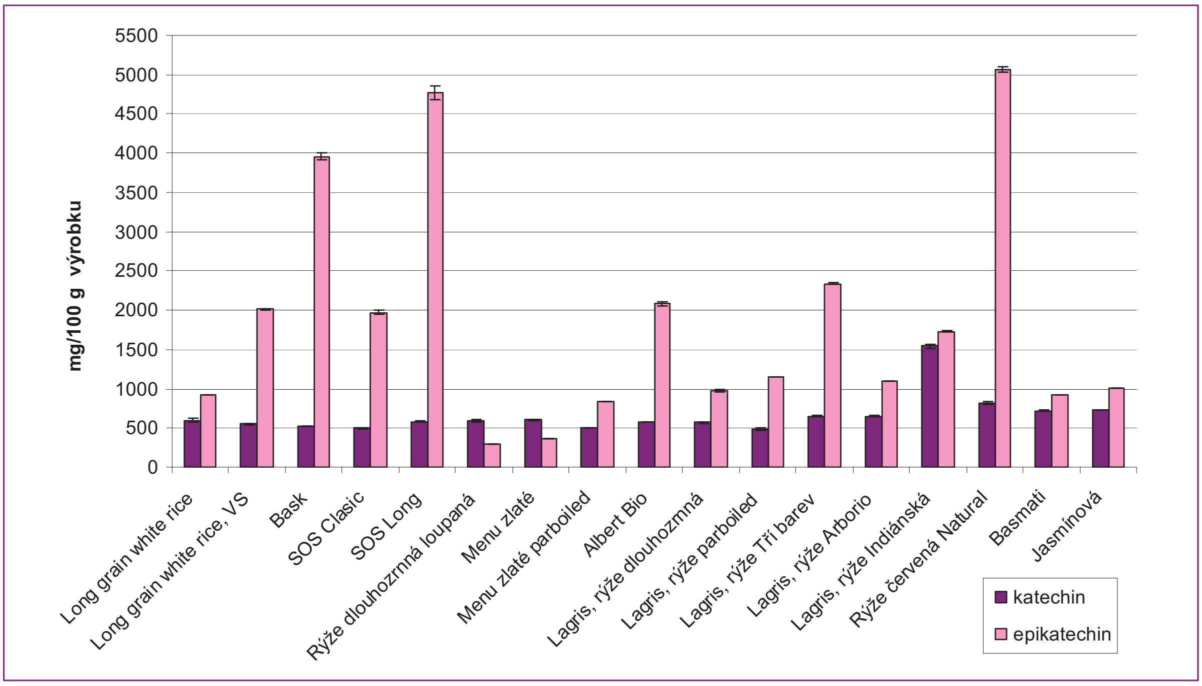
Tab. 32 Obsah katechinů v rýžích po kyselé hydrolýze (mg/100 g rýže)

	katechin	epikatechin
Long grain white rice	595,57 ± 28,71	918,49 ± 4,31
Long grain white rice, VS	553,10 ± 6,22	2 014,16 ± 13,90
Bask	521,94 ± 2,73	3 957,55 ± 38,78
SOS Clasic	496,23 ± 4,37	1 974,93 ± 29,43
SOS Long	581,73 ± 4,74	4 769,09 ± 86,34
Rýže dlouhozrnná loupaná	586,15 ± 14,71	298,97 ± 3,04
Menu zlaté	601,73 ± 7,98	368,95 ± 1,36
Menu zlaté parboiled	504,14 ± 7,79	837,88 ± 2,04
Albert Bio	575,38 ± 2,73	2 087,02 ± 25,49
Lagris, rýže dlouhozrnná	571,57 ± 6,55	975,07 ± 9,64
Lagris, rýže parboiled	487,87 ± 10,04	1 153,83 ± 10,92
Lagris, rýže Tří barev	646,41 ± 10,26	2 336,79 ± 10,87
Lagris, rýže Arborio	647,76 ± 6,99	1 100,65 ± 4,14
Lagris, rýže Indiánská	1 544,01 ± 28,40	1 727,77 ± 10,50
Rýže červená Natural	816,19 ± 12,14	5 066,04 ± 28,09

Basmati	714,57 ± 8,46	927,24 ± 10,44
Jasmínová	733,64 ± 4,02	1 009,34 ± 6,70

Stejně jako u cereálií byl také u rýže po kyselé hydrolýze detekován pouze katechin a epikatechin (viz Tab. 32). Nárůst obsahu oproti analýze před hydrolýzou byl v řádech stovek až tisíců, např. obsah katechinu v rýži Albert bio byl po kyselé hydrolýze 719krát vyšší než před hydrolýzou a obsah epikatechinu u stejného vzorku byl 5 218krát vyšší.

Průměrný obsah katechinu ve vzorcích byl 602,12 mg/100 g. Tuto hodnotu výrazně přesahovala rýže Indiánská, kde byl obsah 1 544,01 mg/100 g, oproti analýze před hydrolýzou se obsah zvýšil 80krát. Nejnižší množství bylo změřeno u rýže parboiled značky Lagris, 487,87 mg/100 g.



Graf 9 Obsah katechinu a epikatechinu v rýži po kyselé hydrolýze (mg/100 g výrobku)

Množství epikatechinu ve vzorcích se pohybovalo v množství 298,97 mg/100 g v rýži dlouhozrnné loupané až 5 066,04 mg/100 g v rýži červené Natural. Obsah epikatechinu oproti stanovení před hydrolýzou se zvýšilo v několika případech až tisícinásobně. Obsah katechinu a epikatechinu ve vzorcích rýže rovněž ilustruje Graf 9 .

6.1.1.5 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny patří mezi deriváty s jedním fenolovým kruhem (viz Obr. 3) [21]. Obsah individuálních fenolických kyselin byl stanoven podle metody, viz kap. 4.6.5. Měření každého vzorku bylo provedeno třikrát, ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a stanovena směrodatná odchylka.

Tab. 33 Kalibrační křivky pro stanovení fenolických kyselin v cereáliích

standard	regresní rovnice	koeficient determinace
kyselina ferulová	y (mV·s) = 264,539 · x (µg/ml)	R^2 = 0,990
kyselina chlorogenová	y (mV·s) = 151,939 · x (µg/ml)	R^2 = 0,987

kyselina gallová	y (mV·s) = 211,633 · x (μg/ml)	R^2 = 0,991

Tab. 34 Obsah fenolických kyselin v cereáliích před hydrolýzou (mg/100 g výrobku)

	kyselina ferulová	kyselina chlorogenová	kyselina gallová
VLOČKY			
pšeničné	0,20 ± 0,02	0,61 ± 0,10	0,92 ± 0,07
ječné	0,36 ± 0,01	0,47 ± 0,03	2,60 ± 0,02
špaldové	0,22 ± 0,02	0,65 ± 0,04	0,83 ± 0,03
pohankové	4,97 ± 0,15	6,53 ± 0,29	11,62 ± 0,43
ovesné	0,56 ± 0,01	1,19 ± 0,42	0,65 ± 0,02
rýžové	0,33 ± 0,07	0,45 ± 0,08	1,05 ± 0,06
žitné	0,51 ± 0,04	0,75 ± 0,06	2,56 ± 0,06
MOUKY			
pšeničná celozrnná	0,53 ± 0,01	0,41 ± 0,04	0,52 ± 0,02
špaldová celozrnná	0,31 ± 0,01	0,53 ± 0,07	0,63 ± 0,02
žitná celozrnná	0,48 ± 0,01	2,16 ± 0,09	1,92 ± 0,08
z červené pšenice	0,76 ± 0,02	1,54 ± 0,02	1,13 ± 0,02
pohanková hladká	4,36 ± 0,17	11,91 ± 0,44	11,76 ± 0,20
pšeničná hladká	0,14 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,70 ± 0,06
pšeničná hrubá	nd	1,81 ± 0,07	0,45 ± 0,10
OTRUBY			
pšeničné term.	4,87 ± 0,14	5,97 ± 0,16	4,19 ± 0,17
ovesné	0,41 ± 0,01	0,38 ± 0,07	0,59 ± 0,03
žitné	1,53 ± 0,06	4,01 ± 0,69	2,33 ± 0,27
kukuřičné	1,08 ± 0,07	2,01 ± 0,10	1,68 ± 0,00
amarantové	0,70 ± 0,02	2,70 ± 0,04	7,15 ± 0,23
KLÍČKY			
pšeničné	22,17 ± 0,36	11,61 ± 0,29	4,78 ± 0,31
špaldové	0,68 ± 0,04	8,79 ± 0,52	3,99 ± 0,59
žitné	5,08 ± 0,31	12,84 ± 0,81	11,91 ± 0,44
kukuřičné	0,79 ± 0,04	3,95 ± 0,13	2,15 ± 0,04

Množství ferulové kyseliny ve vzorcích se pohybovalo v rozmezí 0,14 - 22,17 mg/100 g. Nejméně bylo stanoveno v mouce pšeničné hladké, v mouce pšeničné hrubé nebyla kyselina ferulová stanovena vůbec. Výrazně nejvyšší obsah byl stanoven v klíčcích pšeničných. Oba analyzované pohankové produkty výrazně převyšovaly stanovenou průměrnou hodnotu pro danou skupinu výrobků. Vločky pohankové obsahovaly 4,97 mg/100 g, průměr pro ostatní vločky byl 0,36 mg/100 g, v mouce pohankové byl obsah kyseliny ferulové 4,36 mg/100 g, průměrná hodnota pro ostatní mouky byla 0,44 mg/100 g. Podle dostupné literatury může kyselina gallová představovat až 90 % z celkových polyfenolů obilného zrna [144]. Skutečnost, že v mnoha vzorcích byla detekovaná pouze v malém množství, lze vysvětlit výskytem fenolických kyselin převážně ve formě dimerů nebo jejich vazbou na mastné kyseliny, sacharidy, lignin nebo složky buněčné stěny [145].

Kyselina chlorogenová byla detekována ve všech vzorcích, nejvyšší obsah byl změřen v klíčcích žitných (12,84 mg/100 g), naopak nejméně v mouce pšeničné hladké (0,29 mg/100 g). Velmi vysoký obsah byl stanoven v mouce pohankové hladké (11,91 mg/100 g) a klíčcích pšeničných (11,61 mg/100 g). Také vločky pohankové vykazovaly v porovnání s ostatními vločkami vysoký obsah kyseliny chlorogenové.

Kyselina gallová byla ve vzorcích zastoupena v množství od 0,45 mg/100 g v mouce pšeničné hrubé do 11,91 mg/100 g v klíčcích žitných. Velmi vysoký obsah byl změřen v pohankových výrobcích, ve vločkách 11,62 mg/100 g (průměr 1,43 mg/100 g) a v mouce 11,76 mg/100 g (průměr 0,89 mg/100 g). Výsledky jsou přehledně shrnuty v Tab. 34 .

Z hlediska rozdělení produktů do skupin lze říct, že nejvyšší obsah fenolických kyselin byl změřen v klíčcích a dále v otrubách. Kromě mouky a vloček z pohanky, které vždy vykazovaly vysoký obsah těchto látek, měly ostatní výrobky nízké hladiny.

Tab. 35 Obsah fenolických kyselin v cereáliích po kyselé hydrolýze

	kyselina ferulová (mg/100 g)	kyselina chlorogenová (mg/100 g)	kyselina gallová (g/100 g)
VLOČKY			
pšeničné	120,94 ± 3,69	460,40 ± 27,66	2,12 ± 0,05
ječné	53,03 ± 0,77	194,59 ± 7,56	1,02 ± 0,00
špaldové	72,53 ± 1,91	249,33 ± 1,42	1,24 ± 0,01
pohankové	13,52 ± 1,70	44,81 ± 2,02	0,42 ± 0,00
ovesné	40,54 ± 0,54	82,88 ± 6,78	0,61 ± 0,01
rýžové	38,32 ± 5,48	91,99 ± 7,37	0,57 ± 0,02
žitné	279,83 ± 27,02	436,86 ± 48,90	3,91 ± 0,03
MOUKY			
pšeničná celozrnná	116,63 ± 0,74	448,82 ± 20,66	1,79 ± 0,02
špaldová celozrnná	120,45 ± 11,17	430,55 ± 26,91	1,75 ± 0,03
žitná celozrnná	324,15 ± 5,38	714,24 ± 43,82	3,63 ± 0,02
z červené pšenice	88,04 ± 2,98	311,65 ± 14,75	1,43 ± 0,05
pohanková hladká	65,50 ± 5,34	84,51 ± 7,58	0,80 ± 0,02
pšeničná hladká	79,89 ± 6,14	116,96 ± 11,87	0,97 ± 0,03
pšeničná hrubá	69,28 ± 1,41	91,71 ± 5,73	0,89 ± 0,00
OTRUBY			
pšeničné term.	35,93 ± 2,86	56,32 ± 2,17	0,42 ± 0,05
ovesné	53,26 ± 4,50	271,75 ± 48,22	0,78 ± 0,00
žitné	92,37 ± 5,23	317,91 ± 15,71	0,85 ± 0,02
kukuřičné	52,73 ± 1,99	1 248,35 ± 24,30	0,53 ± 0,01
amarantové	203,79 ± 3,22	1 240,95 ± 35,69	4,26 ± 0,00
KLÍČKY			
pšeničné	298,54 ± 17,09	453,09 ± 19,63	4,84 ± 0,06
špaldové	275,19 ± 11,84	451,00 ± 20,32	3,70 ± 0,05
žitné	278,89 ± 20,39	555,17 ± 22,06	5,29 ± 0,02
kukuřičné	112,79 ± 5,06	381,22 ± 11,45	1,51 ± 0,08

Také fenolických kyselin bylo vlivem kyselé hydrolýzy analyzováno několikanásobně vyšší množství než ve vzorcích bez hydrolýzy, viz Tab. 35 .

Obsah kyseliny ferulové se pohyboval v množství 13,52 mg/100 g ve vločkách pohankových až 298,54 mg/100 g v klíčcích pšeničných. Vločky pohankové bez hydrolýzy vykazovaly druhou nejvyšší hladinu kyseliny ferulové mezi všemi ostatními vzorky, působením hydrolýzy došlo však pouze k trojnásobnému nárůstu obsahu, podobně mouka pohanková bez hydrolýzy měla třetí nejvyšší množství kyseliny ferulové, hydrolýzou došlo k nárůstu množství 15krát. Z toho lze vyvodit, že kyselina ferulová v pohance není vázána v takové míře jako u ostatních vzorků. Naopak největší nárůst byl zaznamenán u vloček pšeničných, obsah se zvedl 600krát.

Rovněž obsah kyseliny chlorogenové se mnohonásobně zvýšil, nejvýrazněji u mouky pšeničné celozrnné (1 105krát), která však měla nízkou výchozí hodnotu. Nejvyšší obsah byl analyzován u otrub kukuřičných (1 248,35 mg/100 g) a amarantových (1 240,98 mg/100 g). Nejméně kyseliny chlorogenové bylo naměřeno u vloček pohankových (44,81 mg/100 g) a velmi málo v porovnání s ostatními vzorky také v mouce pohankové hladké. Také zde patrně platí, že kyselina chlorogenová není v pohankových výrobcích intenzivně vázána a kyselou hydrolýzou proto nedochází k jejímu výraznějšímu uvolnění.

Nejvíce z fenolických kyselin byla uvolněna kyselina gallová, patrně zde v největší míře docházelo ke štěpení z glykosidických vazeb gallátů. Právě v těchto formách se kyselina gallová vyskytuje nejčastěji [146]. Nejvyšší množství bylo naměřeno (stejně jako bez hydrolýzy) v klíčcích žitných, 5,29 g/100 g, množství bylo vyšší 444krát. Nejmenší množství bylo u vloček pohankových a otrub pšeničných, obojí 0,42 g/100 g. Poměrně malé množství bylo změřeno i v mouce pohankové, podobně jako u předešlých dvou kyselin.

Tab. 36 Kalibrační závislost standardů fenolických kyselin pro výpočet jejich obsahu ve vzorcích rýží

standard	kalibrační rovnice	koeficient determinace
kyselina ferulová	y (mV·s) = 266,311 · x (µg/ml)	R^2 = 0,991
kyselina chlorogenová	y (mV·s) = 116,376 · x (µg/ml)	R^2 = 0,998
kyselina gallová	y (mV·s) = 269,308 · x (µg/ml)	R^2 = 0,999

Tab. 37 Obsah fenolických kyselin v rýžových vzorcích bez hydrolýzy (µg/100g rýže)

	kyselina ferulová	kyselina chlorogenová
Long grain white rice	61,12 ± 0,91	157,73 ± 1,14
Long grain white rice, VS	46,73 ± 0,23	176,36 ± 3,85
Bask	114,89 ± 1,33	140,05 ± 6,73
SOS Clasic	202,20 ± 0,44	136,37 ± 0,46
SOS Long	109,73 ± 3,70	269,03 ± 9,74
Rýže dlouhozrnná loupaná	84,56 ± 2,94	101,45 ± 3,93
Menu zlaté	213,58 ± 6,91	175,38 ± 1,48
Menu zlaté parboiled	153,00 ± 9,84	207,38 ± 1,17
Albert Bio	44,83 ± 0,11	46,64 ± 0,53
Lagris, rýže dlouhozrnná	111,40 ± 1,15	165,16 ± 3,77
Lagris, rýže parboiled	104,79 ± 0,51	158,80 ± 2,34
Lagris, rýže Tří barev	191,89 ± 0,33	175,56 ± 1,97

Lagris, rýže Arborio	175,80 ± 0,66	437,71 ± 1,32
Lagris, rýže Indiánská	556,09 ± 4,74	860,01 ± 0,99
Rýže červená Natural	82,81 ± 1,28	122,12 ± 0,36
Basmati	98,34 ± 0,35	209,42 ± 0,67
Jasmínová	54,27 ± 1,60	210,33 ± 2,10

V rýžových vzorcích, jak uvádí Tab. 37 , byla stanovena kyselina ferulová a chlorogenová, kyselina gallová nebyla detekována u žádného vzorku extrahovaného vodou.

Nejnižší obsah kyseliny ferulové byl změřen u vzorku rýže Albert bio (44,83 µg/100 g) a Long grain white rice (46,73 µg/100 g), nejvyšší u rýže Indiánské Lagris (556,09 µg/100 g).

Rovněž u kyseliny chlorogenové bylo nejnižší množství detekováno u rýže Albert bio (46,64 µg/100 g) a nejvyšší u rýže Indiánské Lagris (860,01 µg/100 g). Dále bylo vysoké množství stanoveno v rýži Lagris Arborio (437,71 µg/100 g).

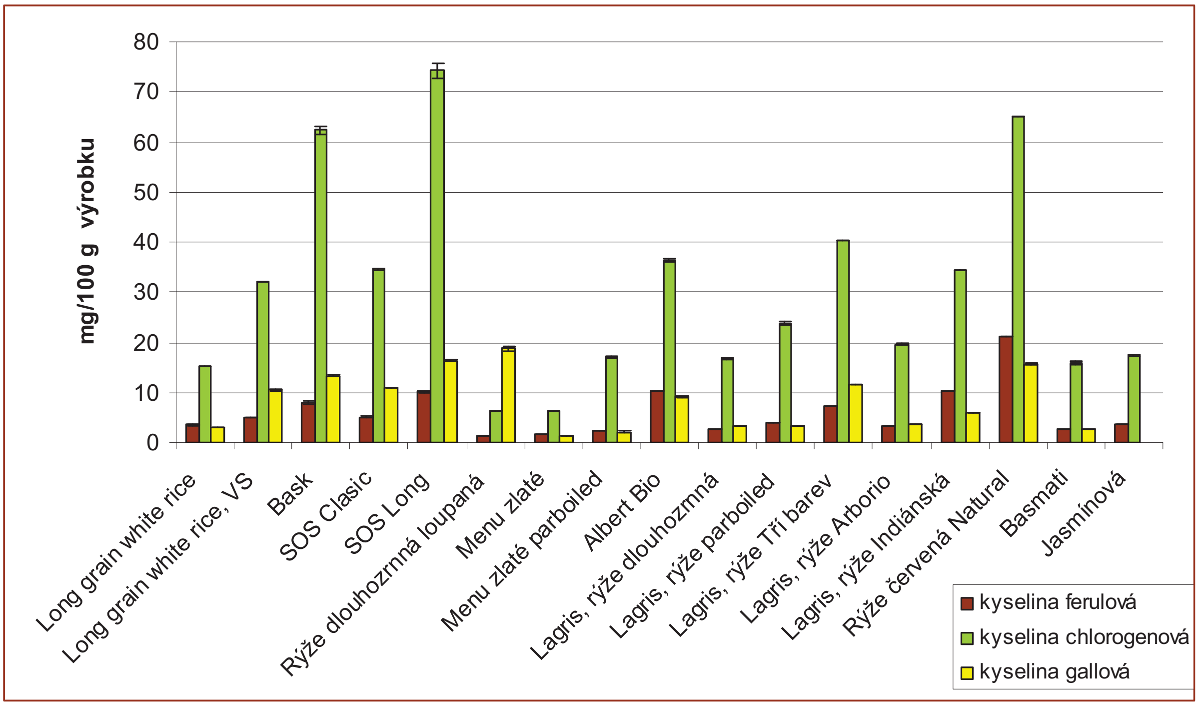
Tab. 38 Obsah fenolických kyselin v rýžích po kyselé hydrolýze (mg/100 g)

	kyselina ferulová	kyselina chlorogenová	kyselina gallová
Long grain white rice	3,48 ± 0,02	15,22 ± 0,00	3,09 ± 0,00
Long grain white rice, VS	4,86 ± 0,00	32,16 ± 0,05	10,42 ± 0,02
Bask	7,92 ± 0,22	62,32 ± 0,86	13,38 ± 0,14
SOS Clasic	5,04 ± 0,09	34,67 ± 0,13	10,88 ± 0,08
SOS Long	10,11 ± 0,17	74,22 ± 1,41	16,36 ± 0,12
Rýže dlouhozrnná loupaná	1,35 ± 0,05	6,30 ± 0,02	18,81 ± 0,49
Menu zlaté	1,59 ± 0,02	6,27 ± 0,01	1,19 ± 0,03
Menu zlaté parboiled	2,28 ± 0,01	17,06 ± 0,11	2,14 ± 0,03
Albert Bio	10,18 ± 0,02	36,34 ± 0,33	9,14 ± 0,07
Lagris, rýže dlouhozrnná	2,65 ± 0,03	16,77 ± 0,14	3,20 ± 0,02
Lagris, rýže parboiled	4,07 ± 0,00	23,79 ± 0,27	3,21 ± 0,00
Lagris, rýže Tří barev	7,19 ± 0,01	40,30 ± 0,02	11,61 ± 0,03
Lagris, rýže Arborio	3,18 ± 0,00	19,66 ± 0,05	3,57 ± 0,03
Lagris, rýže Indiánská	10,29 ± 0,02	34,35 ± 0,13	5,94 ± 0,02
Rýže červená Natural	21,26 ± 0,03	65,14 ± 0,11	15,66 ± 0,05
Basmati	2,56 ± 0,04	15,91 ± 0,24	2,74 ± 0,04
Jasmínová	3,57 ± 0,05	17,40 ± 0,09	3,14 ± 0,03

Po kyselé hydrolýze byly v rýžových vzorcích detekovány všechny tři analyzované fenolické kyseliny - kyselina ferulová, chlorogenová i gallová (viz Tab. 38).

Kyseliny ferulové bylo nejméně nalezeno v rýži dlouhozrnné loupané (1,35 mg/100 g), nejvíce v rýži červené natural (21,26 mg/100 g), kde byl zaznamenán vůbec nejvyšší nárůst této kyseliny (257krát) u analyzovaných vzorků. Nejmenší nárůst byl zaznamenán u rýže Menu zlaté, pouze 7krát.

Vyšší nárůst po hydrolýze byl změřen u kyseliny chlorogenové, nejvíce u rýže Albert bio, 779krát, a rýže červené natural, 533krát. Největší množství však bylo změřeno u rýže SOS long (74,22 mg/100 g), kde se množství zvýšilo 276krát. Nejmenší množství bylo změřeno u rýže Menu zlaté, 6,27 mg/100 g, zde byl zaznamenán také nejmenší nárůst, 36krát.



Graf 10 Obsah fenolických kyseliny v rýžích po kyselé hydrolýze

Po kyselé hydrolýze bylo možné ve všech vzorcích detekovat také kyselinu gallovou, což bylo zřejmě způsobeno uvolněním kyseliny gallové z glykosidických vazeb. Nejmenší množství bylo nalezeno u rýže Menu zlaté, 1,19 mg/100 g, největší u rýže dlouhozrnné loupané, 18,81 mg/100 g.

Fenolické kyseliny jsou považovány za silné antioxidanty. Pro tyto dobré antioxidační vlastnosti mohou být částečně zodpovědné za prospěšné účinky spojené s konzumací cereálií. Kyselina ferulová a její oxidační deriváty jsou nejhojněji zastoupenými deriváty hydroxyskořicové kyseliny v cereáliích [29].

6.1.1.6 Flavonoidy

Výběr analyzovaných individuálních flavonoidů sledovaných u cereálií byl limitován dostupností příslušných standardů. Obsah individuálních flavonoidů byl změřen podle postupu uvedeného v kap. 4.6.6. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát, ze získaných hodnot byl spočítán průměr a směrodatná odchylka.

Tab. 39 Kalibrační rovnice pro výpočet obsahu flavonoidů ve vzorcích cereálií

standard	regresní rovnice	koeficient determinace
rutin	y (mV·s) = 124,802 · x (µg/ml)	R^2 = 0,999
myricetin	y (mV·s) = 427,643 · x (µg/ml)	R^2 = 0,999
morin	y (mV·s) = 150,651 · x (µg/ml)	R^2 = 0,999
luteolin	y (mV·s) = 267,327 · x (µg/ml)	R^2 = 0,998
kvercetin	y (mV·s) = 358,101 · x (µg/ml)	R^2 = 0,999
naringenin	y (mV·s) = 4,249 · x (µg/ml)	R^2 = 0,987
apigenin	y (mV·s) = 176,832 · x (µg/ml)	R^2 = 0,999
kemferol	y (mV·s) = 383,548 · x (µg/ml)	R^2 = 0,999

Všechny analyzované látky patří do skupiny flavonoidů, v rámci této skupiny je dále možné je rozdělit na flavonoly (kemferol, myricetin, morin, kvercetin a rutin, který je ze zde analyzovaných flavonoidů jediný glykosid), flavony (apigenin, luteolin) a flavanony (naringenin) [25]. Obsah individuálních flavonoidů extrahovaných vodou shrnuje Tab. 40 a Tab. 41 .

Tab. 40 Obsah individuálních flavonoidů v cereáliích (μg/100 g výrobku)

	rutin	myricetin	morin	luteolin
VLOČKY				
pšeničné	59,63 ± 0,65	10,82 ± 0,09	7,68 ± 0,03	1,36 ± 0,16
ječné	404,75 ± 4,22	39,07 ± 0,31	35,30 ± 0,92	10,86 ± 1,61
špaldové	43,36 ± 0,21	7,96 ± 0,04	8,13 ± 0,07	1,47 ± 0,07
pohankové	682,75 ± 3,76	50,45 ± 0,21	16,42 ± 0,09	2,21 ± 0,04
ovesné	27,37 ± 0,27	12,50 ±0,01	39,72 ± 0,76	2,91 ± 0,16
rýžové	17,45 ± 0,15	3,96 ± 0,08	6,15 ± 0,06	1,67 ± 0,06
žitné	109,86 ± 0,95	22,51 ±0,21	13,54 ± 0,15	10,46 ± 1,09
MOUKY				
pšeničná celozrnná	290,90 ± 2,40	17,60 ± 0,15	40,07 ± 0,25	15,95 ± 0,21
špaldová celozrnná	163,94 ± 0,73	16,19 ± 0,13	27,89 ± 0,16	11,42 ± 0,14
žitná celozrnná	60,87 ± 0,13	27,78 ± 0,18	36,27 ± 0,59	5,81 ± 0,16
z červené pšenice	190,14 ± 1,64	26,22 ± 0,22	36,55 ± 0,48	7,06 ± 0,18
pohanková hladká	731,54 ± 2,76	4,15 ± 0,01	6,28 ± 0,09	37,71 ± 0,09
pšeničná hladká	29,06 ± 0,19	1,41 ± 0,03	2,52 ± 0,12	2,51 ± 0,18
pšeničná hrubá	10,29 ± 0,18	2,49 ± 0,04	1,24 ± 0,09	1,61 ± 0,27
OTRUBY				
pšeničné term.	103,12 ± 0,85	22,09 ± 0,20	20,87 ± 0,25	13,93 ± 0,08
ovesné	22,65 ± 0,12	3,93 ± 0,02	28,71 ± 0,21	1,74 ± 0,35
žitné	111,24 ± 0,42	12,18 ± 0,11	8,18 ± 0,07	5,31 ± 0,12
kukuřičné	93,74 ± 0,87	8,37 ± 0,05	12,03 ± 0,12	4,77 ± 0,18
amarantové	33,68 ± 0,39	4,70 ± 0,04	6,27 ± 0,02	1,69 ± 0,04
KLÍČKY				
pšeničné	3 835,23 ± 23,53	62,92 ± 0,70	34,42 ± 0,14	5,58 ± 0,14
špaldové	808,35 ± 3,55	5,47 ± 0,07	4,02 ± 0,02	1,92 ± 0,04
žitné	646,81 ± 0,32	21,12 ± 0,14	20,42 ± 0,69	6,80 ± 0,61
kukuřičné	238,64 ± 1,80	12,73 ± 0,17	14,25 ± 0,28	5,68 ± 0,62

Obsah rutinu se pohyboval v rozsahu 10,29 - 3 835,23 μg/100 g. Nejnižší množství bylo změřeno v mouce pšeničné hrubé a také ve vločkách rýžových (17,45 g/100 g). Naproti tomu bylo velmi vysoké množství změřeno u klíčků pšeničných, 3,84 μg/100 g, tato hodnota byla dokonce vyšší než u analyzovaných pohankových vzorků, u kterých je vysoký obsah rutinu očekáván. Přesto byl obsah rutinu v pohankových vločkách i mouce velmi vysoký, 682,75 μg/100 g a 731,54 μg/100 g. Velké množství bylo analyzováno ještě v klíčcích špaldových (808,35 μg/100 g) a žitných (646,81 μg/100 g), lze tedy říci, že obilné klíčky jsou velmi bohatým zdrojem rutinu.

Množství myricetinu bylo stanoveno v rozmezí 1,41 µg/100 g u mouky pšeničné hladké až 62,92 µg/100 g u klíčků pšeničných. Vysoké hodnoty byly zaznamenány také u některých druhů vloček, např. pohankových (50,45 µg/100 g) a ječných (39,07 µg/100 g). U mouk byl zaznamenán vysoký obsah u mouky žitné celozrnné (27,78 µg/100 g) a mouky z červené pšenice (26,22 µg/100 g). Kromě klíčků pšeničných bylo v ostatních klíčcích změřeno spíše průměrné nebo malé množství myricetinu, a také otruby nevykazovaly významnější hladinu této látky, z toho lze usoudit, že myricetin je spíše rozmístěn po celém zrnu, nikoli jen ve vnějších vrstvách [27].

Obsah morinu byl analyzován od 1,24 µg/100 g (mouka pšeničná hrubá) do 40,07 µg/100 g (mouka pšeničná celozrnná). Dále byl vysoký obsah stanoven v mouce z červené pšenice (36,55 µg/100 g) a žitné celozrnné (36,27 µg/100 g). Celozrnné mouky jsou tedy dobrým zdrojem morinu, s výjimkou vloček ovesných obsahem převyšují ostatní analyzované cereálie.

Obsah luteolinu ve vzorcích se pohyboval od 1,61 do 37,71 µg/100 g. Nejmenší množství bylo zjištěno u mouky pšeničné hrubé, druhá nejnižší hodnota u mouky pšeničné hladké. Naopak nejvyšší množství bylo nalezeno v mouce pohankové. Některé vločky (ječné a žitné) a také celozrnné mouky vykazovaly vyšší hodnoty luteolinu než otruby (s výjimkou pšeničných) a klíčky.

Tab. 41 Obsah individuálních flavonoidů v cereáliích (µg/100 g výrobku)

	kvercetin	naringenin	apigenin	kemferol
VLOČKY				
pšeničné	1,74 ± 0,02	141,59 ± 3,58	1,78 ± 0,05	1,43 ± 0,03
ječné	95,95 ± 0,86	804,05 ± 29,23	12,18 ± 0,35	14,03 ± 0,23
špaldové	1,50 ± 0,04	78,63 ± 2,13	1,74 ± 0,04	1,25 ± 0,14
pohankové	3,24 ± 0,05	381,10 ± 14,96	1,52 ± 0,04	0,51 ± 0,15
ovesné	4,48 ± 0,03	1 610,22 ± 39,33	93,04 ± 0,37	220,52 ± 7,95
rýžové	1,15 ± 0,05	227,51 ± 13,18	11,01 ± 0,04	1,85 ± 0,41
žitné	5,94 ± 0,01	222,55 ± 10,75	3,63 ± 0,02	14,21 ± 0,10
MOUKY				
pšeničná celozrnná	13,01 ± 0,01	784,76 ± 14,26	13,85 ± 0,04	10,12 ± 0,80
špaldová celozrnná	7,06 ± 0,01	717,46 ± 13,56	9,43 ± 0,03	5,23 ± 0,41
žitná celozrnná	5,70 ± 0,09	1 138,61 ± 34,69	11,89 ± 0,07	11,74 ± 0,60
z červené pšenice	10,03 ± 0,01	627,46 ± 6,46	9,36 ± 0,05	11,57 ± 0,40
pohanková hladká	2,10 ± 0,08	86,75 ± 5,09	1,36 ± 0,03	2,49 ± 0,55
pšeničná hladká	0,72 ± 0,01	38,45 ± 4,30	0,79 ± 0,06	4,17 ± 0,26
pšeničná hrubá	0,36 ± 0,01	49,92 ± 2,32	1,15 ± 0,09	7,59 ± 0,58
OTRUBY				
pšeničné term.	11,11 ± 0,01	423,72 ± 14,07	10,74 ± 0,14	15,73 ± 0,24
ovesné	2,84 ± 0,03	91,44 ± 2,18	5,95 ± 0,07	2,46 ± 0,78
žitné	4,28 ± 0,03	102,68 ± 5,08	5,29 ± 0,06	2,25 ± 0,29
kukuřičné	6,82 ± 0,04	162,21 ± 7,77	3,62 ± 0,03	4,10 ± 0,23
amarantové	1,76 ± 0,01	68,97 ± 1,65	2,02 ± 0,05	5,91 ± 0,24
KLÍČKY				
pšeničné	5,55 ± 0,05	185,21 ± 6,79	7,56 ± 0,08	7,22 ± 0,11

špaldové	1,57 ± 0,08	146,54 ± 3,35	3,47 ± 0,04	4,89 ± 0,42
žitné	10,64 ± 0,13	398,24 ± 4,97	9,33 ± 0,02	3,39 ± 0,39
kukuřičné	3,31 ± 0,06	74,81 ± 2,71	1,77 ± 0,01	2,50 ± 0,22

Množství kvercetinu ve vzorcích se pohybovalo v rozsahu 0,36 µg/100 g (mouka pšeničná hrubá) - 13,01 µg/100 g (mouka pšeničná celozrnná). Z tohoto intervalu se zcela vymykají vločky ječné s obsahem kvercetinu 95,95 µg/100 g. Žádný jiný vzorek již vysokým obsahem kvercetinu nevynikal.

Množství naringeninu v cereálních vzorcích bylo o řád až o dva vyšší než obsah jiných individuálních flavonoidů. Nejvíce naringeninu bylo nalezeno ve vločkách ovesných (1 610,22 µg/100 g) a dále v mouce žitné celozrnné (1 138,91 µg/100 g). Obecně lze říci, že obsah ve vločkách a moukách byl vyšší než u klíčků a otrub. Nejméně naringeninu obsahovala mouka pšeničná hladká (38,45 µg/100 g) a hrubá (49,92 µg/100 g).

Množství apigeninu bylo stanoveno v rozmezí 0,79 µg/100 g (u mouky pšeničné hladké) - 13,85 µg/100 g (mouka pšeničná celozrnná). Vysoká hodnota byla změřena také u vloček ječných, 12,18 µg/100 g. Zcela nejvyšší hladinu apigeninu oproti ostatním změřeným vzorkům měly vločky ovesné a to 93,04 µg/100 g.

Množství kemferolu se pohybovalo od hodnoty 0,79 µg/100 g u mouky pšeničné hladké po 15,73 µg/100 g u otrub pšeničných. Vysoká hladina byla také změřena u vloček žitných a ječných, 14,21 µg/100 g a 14,03 µg/100 g. Mezi poměrně nízkými hodnotami kemferolu ve vločkách vynikají vločky ovesné se 220,52 µg/100 g. V rámci rozdělení vzorků do skupin, byl nejnižší obsah kemferolu zaznamenán u klíčků.

Tab. 42 Obsah individuálních flavonoidů v cereáliích po kyselé hydrolýze (mg/100 g výrobku)

	rutin	myricetin	morin	luteolin
VLOČKY				
pšeničné	35,20 ± 0,10	1,23 ± 0,04	1,55 ± 0,02	0,73 ± 0,06
ječné	50,87 ± 0,67	0,82 ± 0,05	0,81 ± 0,00	0,46 ± 0,03
špaldové	70,22 ± 0,24	1,38 ± 0,05	1,35 ± 0,03	0,69 ± 0,01
pohankové	36,36 ± 0,29	0,51 ± 0,05	0,63 ± 0,02	0,13 ± 0,00
ovesné	33,76 ± 0,51	1,30 ± 0,08	0,59 ± 0,03	0,17 ± 0,00
rýžové	32,35 ± 0,31	1,11 ± 0,08	0,52 ± 0,01	0,14 ± 0,01
žitné	28,71 ± 0,48	3,16 ± 0,25	2,14 ± 0,12	0,91 ± 0,14
MOUKY				
pšeničná celozrnná	82,70 ± 0,95	1,20 ± 0,08	1,90 ± 0,03	0,78 ± 0,01
špaldová celozrnná	71,29 ± 0,41	1,00 ± 0,07	1,48 ± 0,03	0,56 ± 0,02
žitná celozrnná	74,13 ± 0,84	1,90 ± 0,12	3,95 ± 0,02	1,79 ± 0,09
z červené pšenice	44,36 ± 0,28	0,93 ± 0,05	1,45 ± 0,01	0,60 ± 0,02
pohanková hladká	36,91 ± 0,05	0,54 ± 0,00	0,66 ± 0,05	0,26 ± 0,01
pšeničná hladká	30,48 ± 0,78	0,65 ± 0,04	1,03 ± 0,07	0,15 ± 0,08
pšeničná hrubá	27,06 ± 0,39	0,61 ± 0,01	0,99 ± 0,01	0,24 ± 0,00
OTRUBY				
pšeničné term.	118,68 ± 1,42	3,36 ± 0,14	4,84 ± 0,04	0,78 ± 0,02
ovesné	23,14 ± 0,35	0,61 ± 0,07	0,88 ± 0,04	0,29 ± 0,00
žitné	83,46 ± 0,74	2,62 ± 0,10	4,17 ± 0,09	0,98 ± 0,01

kukuřičné	306,80 ± 2,22	3,18 ± 0,03	5,23 ± 0,02	1,83 ± 0,16
amarantové	28,40 ± 0,08	0,59 ± 0,01	1,07 ± 0,01	0,33 ± 0,02
KLÍČKY				
pšeničné	288,74 ± 2,72	6,44 ± 0,19	11,80 ± 0,10	1,13 ± 0,02
špaldové	238,96 ± 3,70	5,89 ± 0,55	6,98 ± 0,06	1,11 ± 0,10
žitné	129,99 ± 1,08	1,87 ± 0,04	3,85 ± 0,13	1,20 ± 0,08
kukuřičné	76,38 ± 0,53	1,71 ± 0,07	2,04 ± 0,08	0,47 ± 0,04

Obsah rutinu ve vzorcích se pohyboval v rozmezí 23,14 až 306,80 mg/100 g. Nejméně rutinu bylo nalezeno v otrubách ovesných, u kterých byl obsah před hydrolýzou třetí nejmenší mezi ostatními analyzovanými vzorky, i tak však došlo k nárůstu 1 022krát. Nejvyšší množství bylo změřeno u otrub kukuřičných, u kterých rovněž došlo k nejvyššímu nárůstu, 3 273krát vyšší obsah než před hydrolýzou.

Pohankové produkty nevykazovaly významné množství rutinu oproti ostatním vzorkům, také z hlediska násobku nárůstu byl zde zaznamenán nejmenší přírůstek. Z toho lze vyvodit, že v pohankových produktech je lépe dostupný volný rutin ve srovnání s výrobky jiných obilovin, kde se ve větší míře vyskytuje ve vázané formě a k jeho uvolnění dochází např. vlivem kyselé hydrolýzy. Rutin je jako jediný z analyzovaných flavonoidů glykosid, mohlo tedy dojít ke štěpení glykosidické vazby rutinu a tím rozpadu na aglykon kvercetin a glykosidickou část - disacharid rutinózu [140].

Množství myricetinu bylo u většiny vzorků velmi podobné, v průměru 1,44 mg/100 g, tuto hodnotu výrazně přesahoval vzorek klíčků pšeničných, 6,44 mg/100 g, a špaldových, 5,89 mg/100 g, u pšeničných to znamenalo nárůst téměř stonásobný, u špaldových dokonce tisícinásobný. Nejnižší obsah byl změřen u obou pohankových výrobků, u vloček 0,51 mg/100 g a mouky 0,54 mg/100 g.

Také množství morinu bylo u vzorků podobné, průměrně 1,19 mg/100 g, nad tento průměr obsahovaly myricetin nejvíce klíčky špaldové (11,80 mg/100 g). Nejméně myricetinu obsahovaly vločky rýžové (0,52 mg/100 g) a ovesné (0,59 mg/100 g).

Množství luteolinu ve vzorcích bylo nižší než u výše zmiňovaných flavonoidů, pohybovalo se v rozsahu 0,13 mg/100 g u vloček pohankových až 1,83 mg/100 g u otrub kukuřičných.

Tab. 43 Obsah flavonoidů v cereáliích po kyselé hydrolýze

	kvercetin (µg/100 g)	naringenin (mg/100 g)	apigenin (µg/100 g)	kemferol (µg/100 g)
VLOČKY				
pšeničné	246,92 ± 18,57	26,24 ± 0,73	155,58 ± 0,88	93,15 ± 1,90
ječné	134,63 ± 6,73	11,27 ± 0,68	111,13 ± 16,72	78,21 ± 2,51
špaldové	206,56 ±10,70	27,29 ± 0,15	225,50 ± 1,88	211,22 ± 3,47
pohankové	113,17 ± 4,20	19,21 ± 0,41	120,56 ± 0,46	105,62 ± 8,79
ovesné	149,47 ± 3,66	13,04 ± 0,12	212,78 ± 5,89	157,17 ± 12,80
rýžové	127,00 ± 11,76	10,12 ± 0,53	113,17 ± 8,39	151,04 ± 8,31
žitné	1 521,32 ±91,60	85,24 ± 0,29	765,58 ± 33,74	1 625,89 ± 58,77
MOUKY				
pšeničná celozrnná	1 032,49 ±70,13	27,45 ± 0,27	814,89 ± 71,66	319,35 ± 32,69
špaldová celozrnná	287,77 ± 21,79	14,80 ± 0,02	518,28 ± 56,14	96,36 ± 5,43

žitná celozrnná	937,02 ± 63,44	46,41 ± 0,12	1 685,74 ± 108,25	528,64 ± 61,23
z červené pšenice	370,25 ± 15,82	20,66 ± 0,54	585,56 ± 5,67	221,31 ± 11,10
pohanková hladká	125,98 ± 2,97	5,89 ± 0,06	168,79 ± 14,22	111,74 ± 5,82
pšeničná hladká	158,59 ± 9,24	11,11 ± 0,57	109,69 ± 7,63	69,59 ± 3,62
pšeničná hrubá	184,55 ± 1,97	9,69 ± 0,35	113,85 ± 9,51	65,69 ± 5,95
OTRUBY				
pšeničné term.	787,19 ± 69,51	112,32 ± 3,70	911,04 ± 52,19	699,41 ± 83,95
ovesné	204,98 ± 31,01	22,42 ± 0,23	113,08 ± 24,10	101,77 ± 2,95
žitné	1 373,99 ±57,81	15,09 ± 0,17	260,17 ± 16,56	236,09 ± 12,56
kukuřičné	1 781,70±114,52	292,73 ± 2,28	4345,83 ± 69,83	1 394,00 ± 65,58
amarantové	146,20 ± 17,61	20,46 ± 0,22	230,86 ± 16,12	155,47 ± 5,79
KLÍČKY				
pšeničné	890,02 ± 34,42	48,84 ± 0,52	696,00 ± 65,51	4 686,84 ± 112,45
špaldové	587,95 ± 12,55	40,64 ± 0,92	747,82 ± 39,95	1 229,73 ± 107,90
žitné	834,20 ± 53,09	49,43 ± 0,59	621,83 ± 45,86	992,93 ± 66,95
kukuřičné	449,04 ± 20,43	54,18 ± 0,78	515,61 ± 4,75	428,32 ± 11,13

Obsah kvercetinu se pohyboval od 113,17 do 1 781,70 μg/100 g. Nejmenší obsah byl ve vločkách pohankových a dále mouce pohankové. Nepotvrdilo se tak, že nízký obsah rutinu u pohankových výrobků po kyselé hydrolýze (viz Tab. 42) je způsoben jeho rozpadem na aglykon kvercetin.

Nejvyšší obsah kvercetinu byl naměřen u otrub kukuřičných a dále u vloček žitných (1 521,32 μg/100 g) a otrub žitných (1 373,99 μg/100 g). Zatímco před hydrolýzou měly pouze klíčky vyšší obsah kvercetinu, po hydrolýze také ostatní žitné produkty vykazovaly vysoký obsah a lze je tedy považovat za bohatý zdroj kvercetinu.

Obsah naringeninu se pohyboval od 5,89 do 292,73 mg/100 g. Zatímco nejméně obsahovala mouka pohanková, nejvíce bylo změřeno v otrubách kukuřičných. Pro skupinu klíčků byl obsah naringeninu velmi podobný, také tady byl nejvyšší u klíčků kukuřičných, zatímco např. u otrub se obsah značně odlišoval.

Množství apigeninu bylo změřeno od 109,69 μg/100 g pro mouku pšeničnou hladkou do 4 345,83 μg/100 g pro otruby kukuřičné. Tento obsah je v porovnání s ostatními hodnotami velmi vysoký a oproti množství před hydrolýzou došlo k nárůstu 1 200krát. Kompletní výsledky obsahů individuálních flavonoidů po kyselé hydrolýze obsahuje Tab. 42 a Tab. 43 .

Aplikací kyselé hydrolýzy na cereální vzorky došlo k výraznému nárůstu obsahu individuálních flavonoidů. To bylo způsobeno především uvolňováním těchto látek z vázaných forem, ve kterých se v cereáliích ve velké míře nacházejí [15].

Sloučeniny patřící do skupiny flavonoidů jsou obecně považovány za zdraví prospěšné [27,30]. Různé výzkumy ukazují, že např. rutin vykazuje velmi vysokou antioxidační kapacitu ve vychytávání volných radikálů [125]. Dále zlepšuje průtok krve a chrání srdce před nemocemi [23]. Rovněž aglykonová část rutinu - kvercetin - pomáhá udržovat průchodnost cév a předcházet tak krevním sraženinám. Vysoká koncentrace myricetinu pomáhá snižovat hladinu LDL cholesterolu a snižuje riziko rakoviny prostaty [147]. Spolupůsobení myricetinu, kemferolu a kvercetinu snižuje riziko rakoviny slinivky břišní [148]. Z hlediska obsahu zde zmíněných flavonoidů lze vyzvednout například vločky pohankové, ovesné a ječné, mouku

žitnou celozrnnou a klíčky všech analyzovaných cereálií, které jsou na fenolické látky nejbohatší částí zrna [29].

Tab. 44 Kalibrační závislosti pro stanovení individuálních flavonoidů v rýžích

standard	kalibrační rovnice	koeficient determinace
rutin	y (mV·s) = 116,343 · x (µg/ml)	R^2 = 0,997
morin	y (mV·s) = 162,121 · x (µg/ml)	R^2 = 0,996
luteolin	y (mV·s) = 323,345 · x (µg/ml)	R^2 = 0,992
kvercetin	y (mV·s) = 347,842 · x (µg/ml)	R^2 = 0,998
naringenin	y (mV·s) = 4,203 · x (µg/ml)	R^2 = 0,998
apigenin	y (mV·s) = 164,842 · x (µg/ml)	R^2 = 0,999
kemferol	y (mV·s) = 332,189 · x (µg/ml)	R^2 = 0,999

Tab. 45 Obsah individuálních flavonoidů v rýžích (µg/100 g rýže)

	rutin	morin	naringenin
Long grain white rice	5,22 ± 0,01	0,21 ± 0,02	1,49 ± 0,01
Long grain white rice, VS	21,27 ± 0,03	1,96 ± 0,08	1,36 ± 0,06
Bask	10,38 ± 0,05	0,35 ± 0,01	2,17 ± 0,17
SOS Clasic	14,56 ± 0,14	2,11 ± 0,07	1,66 ± 0,01
SOS Long	12,90 ± 0,04	1,72 ± 0,02	6,21 ± 0,13
Rýže dlouhozrnná loupaná	4,70 ± 0,07	0,91 ± 0,04	2,14 ± 0,01
Menu zlaté	14,86 ± 0,01	1,49 ± 0,05	1,93 ± 0,02
Menu zlaté parboiled	21,15 ± 0,05	37,69 ± 0,63	9,55 ± 0,27
Albert Bio	8,12 ± 0,04	5,85 ± 0,01	7,77 ± 0,03
Lagris, rýže dlouhozrnná	4,90 ± 0,04	0,44 ± 0,02	2,07 ± 0,03
Lagris, rýže parboiled	31,70 ± 0,09	31,58 ± 0,29	1,41 ± 0,01
Lagris, rýže Tří barev	24,93 ± 0,35	21,42 ± 0,26	6,84 ± 0,30
Lagris, rýže Arborio	10,05 ± 0,04	1,25 ± 0,04	2,19 ± 0,05
Lagris, rýže Indiánská	178,28 ± 1,91	42,17 ± 0,57	325,80 ± 7,06
Rýže červená Natural	25,04 ± 0,32	3,42 ± 0,04	8,30 ± 0,11
Basmati	11,02 ± 0,06	2,25 ± 0,02	1,34 ± 0,04
Jasmínová	8,96 ± 0,02	1,19 ± 0,01	1,82 ± 0,01

Individuální flavonoidy byly analyzovány též ve vzorcích rýže (viz kap. 4.6.6). Před kyselou hydrolýzou byly ve vzorcích detekovány pouze rutin, morin a naringenin, viz Tab. 45 .

Obsah rutinu se pohyboval v rozmezí 4,70 - 178,28 µg/100 g. Nejmenší obsah byl zjištěn u rýže dlouhozrnné loupané, nejvyšší hodnota, která několikanásobně převyšovala druhou nejvyšší zjištěnou hodnotu, byla změřena u rýže Indiánské. Druhý nejvyšší obsah byl stanoven u rýže parboiled Lagris, 31,70 µg/100 g.

Obsah morinu byl v průměru 1,78 µg/100 g. Významně nadprůměrné hodnoty byly zjištěny opět u rýže Indiánské (42,17 µg/100 g), Menu zlaté parboiled (37,69 µg/100 g), rýže parboiled Lagris (31,58 µg/100 g) a rýže Tří barev značky Lagris (21,42 µg/100 g). Nejmenší obsah morinu byl stanoven u rýže Long grain white rice, 0,12 µg/100 g.

Obsah naringeninu ve vzorcích se pohyboval s rozmezí od 1,34 μg/100 g v rýži Basmati do 9,55 μg/100 g u rýže Menu zlaté parboiled. Z tohoto intervalu se však vymyká obsah naringeninu v rýži Indiánské, který je přibližně 35krát vyšší než uvedená horní hranice rozpětí a jeho hladina byla tedy 325,80 μg/100 g.

Po kyselé hydrolýze byly v rýžích detekovány kromě rutinu, morinu a naringeninu také další flavonoidy, a to luteolin, kvercetin, apigenin a kemferol (uvádí Tab. 46 a Tab. 47).

Tab. 46 Množství flavonoidů v rýži po kyselé hydrolýze

	rutin (mg/100 g)	morin (μg/100g)	naringenin (mg/100 g)
Long grain white rice	1,34 ± 0,00	39,75 ± 1,75	0,29 ± 0,00
Long grain white rice, VS	5,57 ± 0,18	326,74 ± 1,61	2,31± 0,02
Bask	2,60 ± 0,03	74,23 ± 4,23	1,81 ± 0,04
SOS Clasic	3,86 ± 0,02	56,55 ± 0,21	1,07 ± 0,00
SOS Long	3,08 ± 0,03	72,97 ± 0,14	0,95 ± 0,07
Rýže dlouhozrnná loupaná	3,68 ± 0,02	223,87 ± 4,62	1,06 ± 0,03
Menu zlaté	4,65 ± 0,21	222,64 ± 1,29	2,33 ± 0,01
Menu zlaté parboiled	10,65 ± 0,34	318,20 ± 3,20	4,16 ± 0,08
Albert Bio	10,42 ± 0,15	193,62 ± 0,46	0,55 ± 0,03
Lagris, rýže dlouhozrnná	3,98 ± 0,00	125,62 ± 4,42	0,88 ± 0,01
Lagris, rýže parboiled	11,75 ± 0,60	268,86 ± 3,04	0,85 ± 0,08
Lagris, rýže Tří barev	8,46 ± 0,19	264,73 ± 0,69	1,28 ± 0,02
Lagris, rýže Arborio	7,35 ± 0,19	372,07 ± 2,48	1,75 ± 0,02
Lagris, rýže Indiánská	11,10 ± 0,17	1 286,17 ± 3,46	3,79 ± 0,09
Rýže červená Natural	5,57 ± 0,06	93,45 ± 0,23	1,62 ± 0,04
Basmati	3,93 ± 0,04	129,89 ± 2,17	0,72 ± 0,01
Jasmínová	2,19 ± 0,01	181,85 ± 0,88	2,47 ± 0,03

Množství rutinu se oproti stanovení před hydrolýzou zvýšilo dvěstě až třistanásobně a u rýže Albert bio byl nárůst dokonce tisícinásobný. Rutin se tak vyskytoval ve vzorcích v rozmezí 1,34 mg/100 g - 11,75 mg/100 g. Nejméně bylo stanoveno v rýži Long grain white rice, nejvíce bylo nalezeno v rýži Lagris parboiled a také rýži Indiánské (11,10 mg/100 g), Menu zlaté parboiled (10,65 mg/100 g) a také Albert bio (10,42 mg/100 g), přičemž tato rýže má obvykle v porovnání s ostatními vzorky spíše nízké hodnoty analyzovaných látek.

Nárůst obsahu morinu nebyl tak vysoký jako u rutinu. Jeho obsah byl po hydrolýze stanoven v rozmezí 39,75 μg/100 g - 1 286,17 μg/100 g. Nejméně bylo stanoveno, stejně jako u rutinu, u rýže Long grain white rice, nejvíce u rýže Lagris Indiánské, kde obsah morinu významně převyšoval množství stanovené u ostatních vzorků, např. druhá nejvyšší hodnota byla 372,02 μg/100 g, a to u Lagris rýže Arborio.

Množství naringeninu po kyselé hydrolýze se pohybovalo od 0,29 μg/100 g po 4,16 μg/100 g. Nejméně bylo opět zaznamenáno u Long grain white rice, nejvíce u rýže Menu zlaté parboiled. Množství po kyselé hydrolýze se zvýšilo u některých vzorků jen málo, např. u Lagris Indiánské 12krát, naopak u Long grain white rice VS to bylo 1 699krát. Zajímavé je, že obě rýže Long grain white rice se dle obalu liší jen způsobem manipulace při přípravě, jedna je běžná sypaná, druhá je balená ve varných sáčcích, ovšem v množství aktivních látek

byly nalezeny rozdíly, především právě při stanovení flavonoidů před a po hydrolýze, kdy sypaná rýže vykazovala vždy nejnižší hodnoty analyzovaných látek a varianta ve varných sáčcích měla v porovnání s ostatními vzorky jedny z nejvyšších hodnot.

Tab. 47 Stanovení individuálních flavonoidů v rýži po kyselé hydrolýze (μg/100 g rýže)

	luteolin	kvercetin	apigenin	kaemferol
Long grain white rice	nd	nd	nd	nd
Long grain white rice, VS	nd	nd	nd	nd
Bask	nd	nd	4,63 ± 0,19	1,42 ± 0,05
SOS Clasic	32,37 ± 1,94	17,15 ± 0,55	4,58 ± 0,51	nd
SOS Long	124,68 ± 1,33	85,96 ± 0,20	5,05 ± 0,12	nd
Rýže dlouhozrnná loupaná	nd	nd	nd	nd
Menu zlaté	nd	nd	3,79 ± 0,08	nd
Menu zlaté parboiled	nd	nd	4,00 ± 0,05	2,15 ± 0,00
Albert Bio	nd	nd	nd	nd
Lagris, rýže dlouhozrnná	nd	nd	3,09 ± 0,16	nd
Lagris, rýže parboiled	nd	nd	nd	nd
Lagris, rýže Tří barev	nd	nd	nd	nd
Lagris, rýže Arborio	nd	nd	nd	nd
Lagris, rýže Indiánská	nd	nd	48,31 ± 1,42	nd
Rýže červená Natural	nd	nd	5,66 ± 0,45	1,10 ± 0,02
Basmati	nd	nd	10,03 ± 0,04	2,04 ± 0,07
Jasmínová	nd	nd	15,75 ± 0,29	nd

Po kyselé hydrolýze byly v některých vzorcích detekovány také další flavonoidy. Luteolin a kvercetin ve dvou vzorcích stejného výrobce, SOS Clasic a SOS Long; apigenin v deseti vzorcích, nejvíce byl zastoupen v rýži Indiánské značky Lagris, 48,31 μg/100 g a kemferol ve čtyřech vzorcích, nejvíce v Menu zlaté parboiled.

Po kyselé hydrolýze došlo nejen k několikanásobnému navýšení obsahu již detekovaných flavonoidů, ale také k detekci flavonoidů, k jejichž uvolnění došlo až za podmínek kyselé hydrolýzy. Množství těchto látek uvádí Tab. 47 .

Srovnáním obsahu celkových a individuálních flavonolů vychází množství flavonolů stanoveného spektrofotometricky ve většině případů vyšší než u stanovení individuálních flavonolů metodou HPLC. To je obecně problém stanovení skupinových parametrů, protože může docházet rovněž k detekci látek, které do sledované skupiny nepatří, přesto však reagují s použitými činidly a nadhodnocují tak výsledná množství [27]. Dalším důvodem také může být skutečnost, že souhrnné množství individuálních flavonolů bylo získáno součtem obsahu pouze těch sloučenin, pro které byly dostupné standardy.

V cereálních vzorcích bylo identifikováno více zástupců skupiny flavonoidů než v rýžových vzorcích a množství flavonoidů nacházejících se v obou typech analyzovaných vzorků bylo v naprosté většině vyšší v cereáliích než ve vzorcích rýže, srovnatelné hodnoty s cereálními vzorky měla jen rýže Indiánská. Vzhledem ke skutečnosti, že sloučeniny ze skupiny flavonoidů jsou obecně považovány za biologicky aktivní, lze považovat cereálie za zdravější potraviny než různé druhy rýže [141,142].

6.1.2 Stanovení sacharidů v cereálních vzorcích

Sacharidy jsou další nutričně významnou složkou cereálních produktů, významně přispívají nejen k energetické hodnotě, ale mohou se podílet i na antioxidačních a dalších biologických účincích. Ve vzorcích cereálií byly stanoveny jak celkové a redukující sacharidy, tak i některé jednoduché cukry (mono- a oligosacharidy) uvolněné hydrolýzou podobně jako v trávicím traktu.

Příprava vzorků pro stanovení sacharidů probíhala dvěma způsoby, podle kap. 4.5.1 nebo kap. 4.5.11.

6.1.2.1 Celkové sacharidy

Stanovení celkových sacharidů bylo provedeno podle kap. 4.6.7. Měření každého vzorku proběhlo třikrát, ze získaných dat byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka. V rámci analýzy bylo testováno několik typů extrakce.

V první fázi byly cereálie podrobeny pouze extrakci do vody dle postupu uvedeného v kap. 4.5.4.

Tab. 48 Kalibrační závislost glukózy pro výpočet obsahu celkových sacharidů v cereáliích

vzorek	regresní rovnice	koeficient determinace
cereálie	$A = 8{,}162 \cdot c$ (mg/ml)	$R^2 = 0{,}997$
rýže	$A = 8{,}991 \cdot c$ (mg/ml)	$R^2 = 0{,}997$

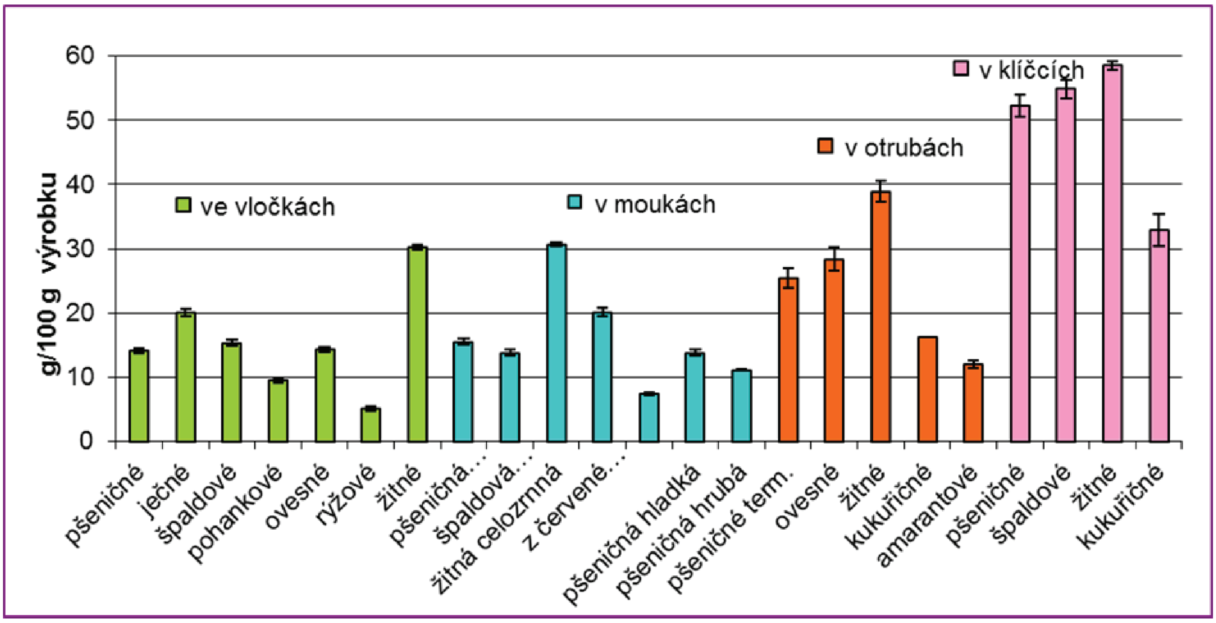
Tab. 49 Obsah celkových sacharidů v cereáliích (g/100 výrobku)

	v navážce (g/100 výrobku)	v rozpust. podílu (g/100 výrobku)	rozpustný podíl (%)
VLOČKY			
pšeničné	3,53 ± 0,08	14,15 ± 0,42	24,95
ječné	4,02 ± 0,10	20,09 ± 0,51	19,99
špaldové	3,68 ± 0,11	15,31 ± 0,48	24,02
pohankové	2,57 ± 0,08	9,45 ± 0,29	27,19
ovesné	3,13 ± 0,09	14,36 ± 0,41	21,81
rýžové	1,02 ± 0,08	5,13 ± 0,38	19,92
žitné vločky	8,13 ± 0,11	30,16 ± 0,42	26,97
MOUKY			
pšeničná celozrnná	3,94 ± 0,11	15,49 ± 0,45	25,43
špaldová celozrnná	3,43 ± 0,11	13,80 ± 0,44	24,84
žitná celozrnná	7,88 ± 0,07	30,68 ± 0,26	25,70
z červené pšenice	4,44 ± 0,16	20,13 ± 0,74	22,05
pohanková hladká	1,43 ± 0,05	7,41 ± 0,26	19,34
pšeničná hladká	2,98 ± 0,11	13,81 ± 0,51	21,55
pšeničná hrubá	2,26 ± 0,01	11,12 ± 0,05	20,32
OTRUBY			
pšeničné term.	7,98 ± 0,49	25,41 ± 1,56	31,42
ovesné	2,94 ± 0,19	28,37 ± 1,86	10,35
žitné	12,88 ± 0,77	38,87 ± 1,64	33,14
kukuřičné	1,81 ± 0,03	16,23 ± 0,06	11,29

amarantové	4,08 ± 0,30	11,96 ± 0,53	32,49
KLÍČKY			
pšeničné	20,44 ± 0,67	52,31 ± 1,71	39,07
špaldové	17,09 ± 0,43	54,87 ± 1,37	31,14
žitné	22,70 ± 0,25	58,50 ± 0,64	38,80
kukuřičné	3,94 ± 0,30	32,86 ± 2,48	11,98

Obsah celkových sacharidů ve vodném extraktu (uvádí Tab. 49) se pohyboval v rozmezí 1,02 až 22,70 g/100 g. Nejméně bylo naměřeno ve vločkách rýžových a dále v mouce pohankové hladké (1,43 g/100 g), obecně skupina vloček a mouk obsahovala méně celkových sacharidů než další dvě skupiny, klíčky a otruby. Nejvíce celkových sacharidů obsahovaly klíčky žitné a pšeničné (20,44 g/100 g). Žitné produkty měly v rámci skupiny vždy největší obsah celkových sacharidů v porovnání se stejnými výrobky z jiných obilovin. Výsledky rovněž zobrazuje Graf 11 .

Obsah celkových sacharidů byl vyhodnocen podle literatury [149] pouze z rovnice kalibrační křivky, a to v rozpustném podílu extraktu cereálií (viz kap. 4.6.11). Získané hodnoty však byly příliš nízké a neodpovídaly hodnotám deklarovaným na obale. Proto byl gravimetricky určen rozpustný a nerozpustný podíl vzorků a získané údaje byly přepočteny. Takovýto postup přinesl hodnoty vyšší a tím také bližší deklarovaným údajům. Obsah celkových sacharidů se pak pohyboval v rozmezí 5,13 - 58,50 g/100 g. Procentuální obsah rozpustného podílů byl pro vzorky (až na několik výjimek) přibližně stejný, takže nejméně bylo celkových sacharidů opět ve vločkách rýžových (5,13 g/100 g rozpustného podílu výrobku) a nejvíce klíčcích žitných (58,50 g/100 g rozpustného podílu výrobku).



Graf 11 Obsah celkových sacharidů v cereáliích po přepočtu na rozpustný podíl (g/100 g)

Další typ extrakce sacharidů zahrnoval kyselou hydrolýzu (výsledky uvedeny v Tab. 50), podobně jako u stanovení fenolických látek (viz kap. 4.5.11).

Tab. 50 Obsah celkových sacharidů v cereáliích po kyselé hydrolýze

	po hydrolýze (g/100 g výrobku)	po hydr. (g/100 g rozp. podílu)	rozpustný podíl po hydr. (%)
VLOČKY			
pšeničné	78,35 ± 3,86	101,10 ± 5,02	77,51
ječné	76,49 ± 6,38	91,77 ± 7,65	83,35
špaldové	76,49 ± 12,06	104,42 ± 16,46	73,25
pohankové	69,43 ± 0,32	96,01 ± 0,45	72,31
ovesné	62,39 ± 2,14	74,92 ± 2,57	83,28
rýžové	80,78 ± 5,22	94,02 ± 6,08	85,92
žitné vločky	81,55 ± 2,41	97,84 ± 2,89	83,35
MOUKY			
pšeničná celozrnná	66,82 ± 1,26	83,32 ± 1,57	80,20
špaldová celozrnná	64,83 ± 5,65	76,91 ± 6,71	84,30
žitná celozrnná	68,10 ± 1,58	82,56 ± 1,92	82,49
z červené pšenice	69,09 ± 3,45	83,95 ± 4,19	82,29
pohanková hladká	59,80 ± 1,47	75,71 ± 1,86	78,99
pšeničná hladká	72,90 ± 3,50	83,76 ± 4,03	87,04
pšeničná hrubá	76,82 ± 4,27	89,89 ± 4,99	85,46
OTRUBY			
pšeničné term.	38,88 ± 0,34	92,67 ± 0,81	41,95
ovesné	53,84 ± 0,32	83,08 ± 4,96	67,65
žitné	46,22 ± 2,36	69,91 ± 3,57	66,11
kukuřičné	49,13 ± 0,51	101,43 ± 10,54	52,27
amarantové	49,60 ± 3,66	109,67 ± 8,10	45,22
KLÍČKY			
pšeničné	32,41 ± 2,20	75,94 ± 5,15	42,68
špaldové	38,58 ± 4,32	68,01 ± 7,62	56,72
žitné	22,15 ± 2,57	39,46 ± 4,59	56,12
kukuřičné	68,89 ± 0,96	101,19 ± 10,12	63,62

Po kyselé hydrolýze byl obsah celkových sacharidů u vloček a mouk desetkrát až dvacetkrát vyšší, u klíčků a otrub byl nárůst podstatně menší, u klíčků žitných zůstala hodnota téměř stejná, výjimku představují klíčky kukuřičné, kde se množství zvýšilo přibližně 17krát. V porovnání se skupinou vloček a mouk obsahují klíčky a otruby méně celkových sacharidů. Obsah celkových sacharidů u vloček byl průměrně 74,52 g/100 g, u vloček špaldových byl dokonce obsah změřen vyšší než 100 g celkových sacharidů na 100 g materiálu, tato chyba mohla být způsobena nepřesností metody nebo uvolněním látek, které zkreslovaly měření.

Také po kyselé hydrolýze byl vypočítán rozpustný podíl, který byl vyšší než před kyselou hydrolýzou, protože vlivem poměrně agresivních podmínek kyselé hydrolýzy došlo k většímu rozkladu analyzovaného materiálu. V porovnání s vločkami a moukami byl u otrub a klíčků menší rozpustný podíl, proto po přepočtu došlo k navýšení množství sacharidů. Velmi nízký obsah celkových sacharidů byl i po přepočtu v klíčcích žitných, 39,46 g/100 g rozpustného podílu. Z výsledků uvedených v Tab. 49 a Tab. 50 je patrné, že pro dosažení reprodu-

kovatelných výsledků celkových sacharidů je nutné vzorek cereálií hydrolyzovat, v opačném případě jsou získané hodnoty významně podhodnoceny.

Dále byly celkové sacharidy sledovány též ve vzorcích rýže, a to jak ve vodném extraktu, tak i po kyselé hydrolýze. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 51 .

Tab. 51 Obsah celkových sacharidů ve vzorcích rýže (g/100 g)

	před hydrolýzou	po hydrolýze
Long grain white rice	2,02 ± 0,02	81,76 ± 3,00
Long grain white rice, VS	3,08 ± 0,02	85,43 ± 3,15
Bask	1,80 ± 0,05	78,09 ± 1,22
SOS Clasic	1,94 ± 0,08	80,87 ± 0,17
SOS Long	1,52 ± 0,08	77,28 ± 1,77
Rýže dlouhozrnná loupaná	1,45 ± 0,02	84,71 ± 1,70
Menu zlaté	2,98 ± 0,02	82,55 ± 0,85
Menu zlaté parboiled	7,09 ± 0,06	94,12 ± 0,80
Albert Bio	3,80 ± 0,04	75,98 ± 0,75
Lagris, rýže dlouhozrnná	2,52 ± 0,04	93,22 ± 2,23
Lagris, rýže parboiled	6,53 ± 0,03	78,92 ± 0,62
Lagris, rýže Tří barev	14,88 ± 0,06	93,79 ± 1,63
Lagris, rýže Arborio	4,90 ± 0,08	86,29 ± 1,54
Lagris, rýže Indiánská	24,55 ± 0,05	96,37 ± 1,89
Rýže červená Natural	6,90 ± 0,08	60,96 ± 0,65
Basmati	2,12 ± 0,04	81,29 ± 2,86
Jasmínová	1,66 ± 0,04	87,47 ± 0,30

Obsah celkových sacharidů v rýži extrahované pouze do vody byl průměrně 3,35 g/100 g. Nejmenší obsah byl 1,45 g/100 g v rýži dlouhozrnné loupané, velmi vysoké hodnoty vymykající se průměrným hodnotám byly změřeny v rýži Indiánské, 24,55 g/100 g a rýži Tří barev, 14,88 g/100 g, obě od značky Lagris.

Po kyselé hydrolýze se zvýšil obsah měřitelných sacharidů na průměrnou hodnotu 83,47 g/100 g, což představuje nárůst téměř 25násobný. Značně pod tímto průměrem se nachází rýže červená Natural, která obsahovala 60,96 g celkových sacharidů na 100 g rýže. Nejvíce celkových sacharidů stejně jako před hydrolýzou obsahovala rýže Indiánská, 96,37 g/100 g.

Získané hodnoty celkových sacharidů byly srovnány s údaji uvedenými na obalech výrobků. V laboratoři získaná data byla pro cereálie i rýži zpravidla vyšší než uváděné údaje. To mohlo být způsobeno především nepřesností při meření a následném přepočtu na rozpustný podíl.

6.1.2.2 Redukující sacharidy

Do skupiny redukujících sacharidů patří veškeré sacharidy, které mají volnou anomerní hydroxylovou skupinu. K celkové hodnotě redukujících cukrů budou přispívat zejména mono- a oligosacharidy, méně vyšší polymery. Většina redukujících sacharidů představuje

více stravitelný podíl cereálních výrobků než celkové sacharidy, kde se stanoví celkový obsah sacharidů včetně vlákniny.

Redukující sacharidy byly stanoveny postupem podle kap. 4.6.8. Měření byla provedena třikrát, ze získaných dat byla spočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

Tab. 52 Kalibrační rovnice glukózy pro výpočet obsahu redukujících sacharidů v cereáliích

standard	regresní rovnice	koeficient determinace
cereálie	A = 19,460 · c (mg/ml)	R^2 = 0,998
rýže	A = 20,179 · c (mg/ml)	R^2 = 0,999

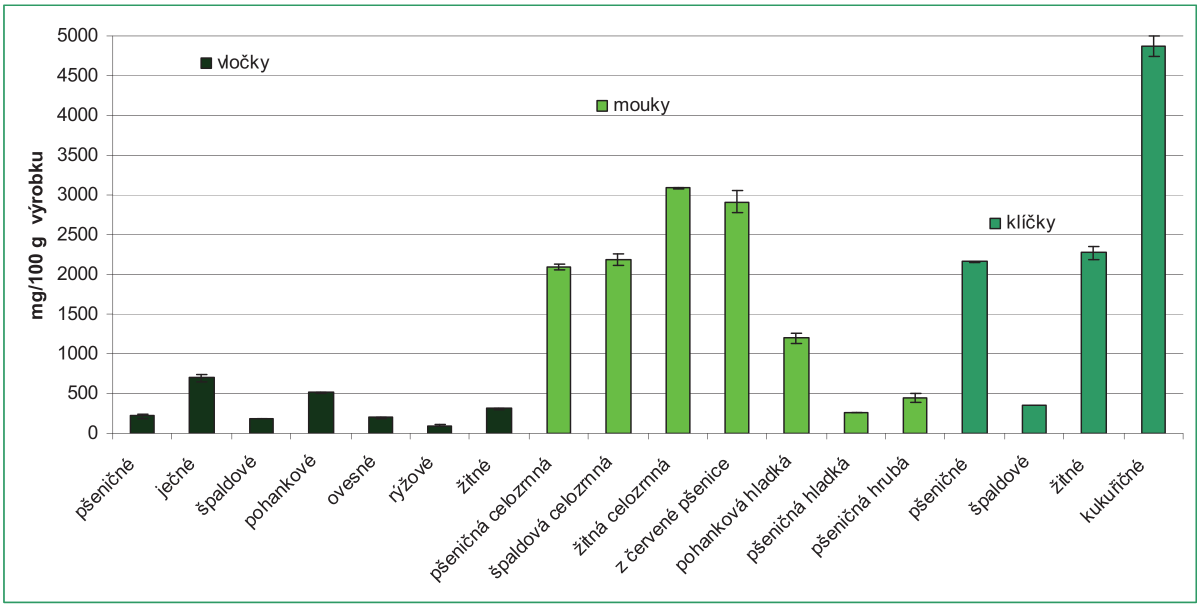
Tab. 53 Obsah redukujících sacharidů v cereáliích

	před hydrolýzou (mg/100 g)	před hydrolýzou (mg/100 g rozp. podílu)	% redukujících s. v celkových s.
VLOČKY			
pšeničné	54,18 ± 6,22	217,15 ± 24,91	1,53
ječné	139,60 ± 9,06	698,30 ± 45,33	3,48
špaldové	45,18 ± 0,19	188,10 ± 0,79	1,23
pohankové	138,93 ± 3,11	511,04 ± 5,41	5,41
ovesné	43,40 ± 2,05	198,97 ± 9,41	1,39
rýžové	20,05 ± 0,32	100,61 ± 1,59	1,96
žitné vločky	82,83 ± 2,22	307,09 ± 8,23	1,02
MOUKY			
pšeničná celozrnná	532,28 ± 8,84	2 093,46 ± 34,77	13,52
špaldová celozrnná	543,81 ± 17,84	2 189,07 ± 71,81	15,86
žitná celozrnná	792,52 ± 2,25	3 084,04 ± 8,74	10,05
z červené pšenice	642,55 ± 30,68	2 913,73 ± 139,11	14,48
pohanková hladká	231,43 ± 13,55	1 196,60 ± 70,07	16,50
pšeničná hladká	55,39 ± 0,39	257,07 ± 1,80	1,86
pšeničná hrubá	90,78 ± 10,68	446,88 ± 52,57	4,02
OTRUBY			
pšeničné term.	3 027,62 ± 86,42	9 634,96 ± 275,01	37,92
ovesné	53,00 ± 1,98	511,85 ± 19,15	1,80
žitné	2 098,46 ± 155,72	6 331,36 ± 469,82	16,29
kukuřičné	1 661,86 ±120,71	14,72 ± 1,07 *	90,71
amarantové	2 509,84 ± 187,74	7 724,72 ± 577,83	61,60
KLÍČKY			
pšeničné	845,69 ± 3,95	2 164,45 ± 10,12	4,14
špaldové	109,25 ± 2,46	350,81 ± 7,91	0,64
žitné	880,97 ± 32,88	2 270,66 ± 84,75	3,88
kukuřičné	583,77 ± 15,05	4 874,48 ± 125,70	14,83

* mg/100 g, rozp. = rozpustný, s. = sacharidy

Obsah redukujících sacharidů ve vzorcích se velmi lišil, nejmenší obsah byl změřen u vloček rýžových (20,05 mg/100 g) a ve vločkách obecně. Nejvíce redukujících sacharidů obsahovaly otruby, nejvíce ze všech vzorků otruby pšeničné, 3 027,62 mg/100 g, výjimku zde

představují otruby ovesné, které naopak obsahují velmi nízké množství redukujicích sacharidů, jen 53,00 mg/100 g.



Graf 12 Obsah redukujicích sacharidů ve vzorcích po přepočtu na rozpustný podíl po extrakci do vody (mg/100 g)

Také redukujicí sacharidy byly přepočteny na obsah v rozpustném podílu (rozpustný podíl viz Tab. 49 a Graf 12). Po tomto přepočtu byl nejvyšší obsah stanoven u otrub kukuřičných (14,72 g/100 g rozpustného podílu), nejméně opět u vloček rýžových (100,61 mg/100 g rozpustného podílu).

Dále také bylo ze získaných údajů vypočteno zastoupení redukujicích sacharidů v celkových sacharidech. Velmi nízké zastoupení redukujicích sacharidů bylo zjištěno u vloček, zde se obsah pohyboval od 1,02 % u vloček žitných do 5,41 % u vloček pohankových. Další skupina se spíše nižšími hodnotami byly klíčky, nejméně redukujicích sacharidů bylo zastoupeno u klíčku špaldových, pouze 0,64 %, nejvíce u klíčku kukuřičných, 14,83 %. Nejvyšší zastoupení redukujicích sacharidů mezi celkovými sacharidy bylo u otrub, u kukuřičných byl obsah dokonce 90,71 %, na druhou stranu u otrub ovesných to bylo jen 1,80 %. Výsledky shrnuje Tab. 53 .

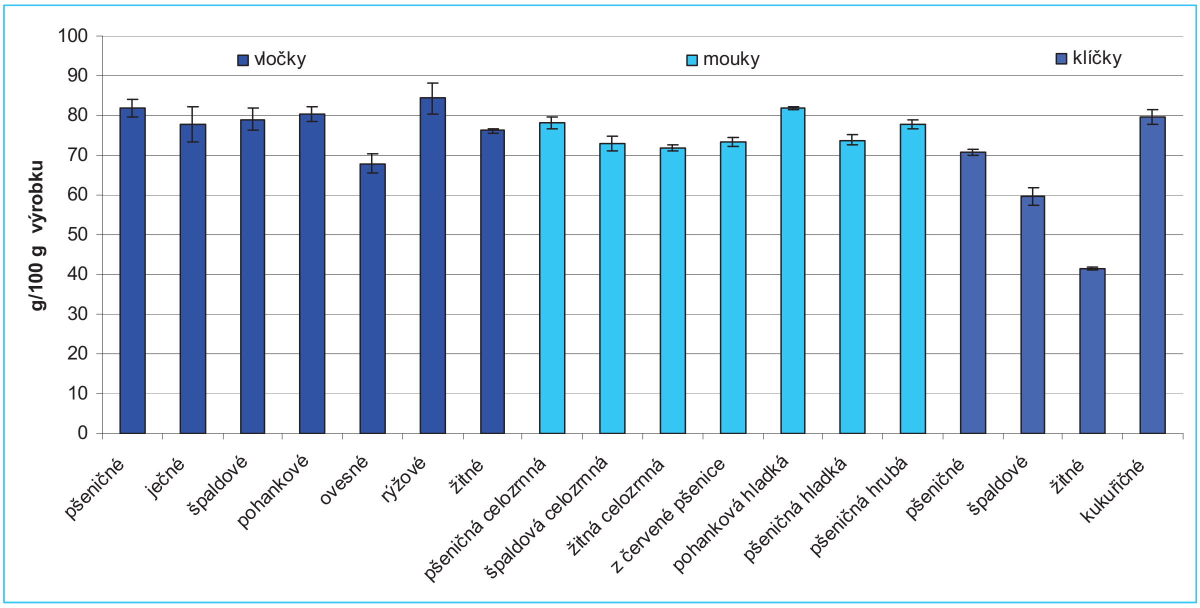
Tab. 54 Obsah redukujicích sacharidů ve vzorcích po hydrolýze

	po hydrolýze (g/100 g)	po hydrolýze (g/100 g rozp. podílu)	% redukujicích s. v celkových. s.
VLOČKY			
pšeničné	63,20 ± 1,67	81,88 ± 2,16	80,66
ječné	64,70 ± 3,71	77,63 ± 4,45	84,59
špaldové	57,86 ± 1,97	78,99 ± 2,70	75,64
pohankové	58,22 ± 1,32	80,51 ± 1,83	83,86
ovesné	56,52 ± 1,98	67,86 ± 2,37	90,58
rýžové	72,44 ± 3,37	84,31 ± 3,92	89,68
žitné vločky	63,46 ± 0,44	76,14 ± 0,52	77,81

MOUKY			
pšeničná celozrnná	62,65 ± 1,14	78,11 ± 1,42	93,76
špaldová celozrnná	61,56 ± 1,61	73,03 ± 1,91	94,96
žitná celozrnná	59,20 ± 0,55	71,77 ± 0,67	86,92
z červené pšenice	60,26 ± 0,84	73,26 ± 1,02	87,23
pohanková hladká	64,57 ± 0,30	81,75 ± 0,38	107,97
pšeničná hladká	64,29 ± 1,16	73,86 ± 1,33	88,18
pšeničná hrubá	66,41 ± 0,93	77,71 ± 1,09	86,45
OTRUBY			
pšeničné term.	33,68 ± 2,08	80,28 ± 4,97	86,64
ovesné	51,76 ± 0,54	76,51 ± 0,80	96,14
žitné	46,97 ± 1,91	71,05 ± 2,89	101,63
kukuřičné	41,67 ± 1,49	79,73 ± 2,85	84,82
amarantové	39,68 ± 1,93	87,73 ± 4,27	80,00
KLÍČKY			
pšeničné	30,21 ± 0,28	70,79 ± 0,66	93,21
špaldové	33,91 ± 1,26	59,79 ± 2,22	87,91
žitné	23,25 ± 0,23	41,42 ± 0,40	104,97
kukuřičné	50,65 ± 1,15	79,62 ± 1,81	73,52

rozp. = rozpustný, s. = sacharidy

Po kyselé hydrolýze došlo k významnému nárůstu obsahu redukujicích sacharidů. S výjimkou otrub pšeničných a kukuřičných byl nárůst v řádu tisíců až desetitisíců. Nejvyšší koncentrace byla změřena ve vločkách rýžových (72,44 g/100 g), kde před hydrolýzou byl naopak nejnižší obsah ze všech vzorků. Ve vločkách a moukách byl obsah redukujicích sacharidů velmi podobný a v porovnání s dalšími vzorky klíčků a otrub vyšší. Klíčky žitné obsahovaly nejnižší množství redukujicích sacharidů mezi ostatními vzorky, 23,25 g/100 g.



Graf 13 Obsah redukujicích sacharidů po kyselé hydrolýze bez přepočtu na rozpustný podíl

Po přepočtu na rozpustný podíl (viz Graf 13) se koncentrace dále zvýšily a množství v otrubách a klíčcích se přiblížilo obsahu ve vločkách a moukách, kromě klíčků žitných a špaldových, kde byl obsah stále nízký, u ostatních vzorků byl obsah 67,86 - 87,73 g/100 g.

Také zastoupení redukujicích sacharidů v celkových bylo po hydrolýze velmi vysoké a pohybovalo se v rozmezí 73,52 % u klíčků pšeničných až 96,14 % u otrub ovesných. U dvou vzorků byl obsah více než stoprocentní, což bylo patrně způsobeno uvolněnými látkami zkreslujícími stanovení.

Jak již bylo zmíněno, k redukujicím sacharidům patří spíše mono- a oligosacharidy, jejichž koncentrace podstatně stoupla po kyselé hydrolýze, kterou se rozkládají glykosidické vazby mezi monomery. Malé molekuly cukrů jsou dostupnější pro stanovení, a také v zažívacím traktu je lze využít jako zdroj energie [23].

Tab. 55 Obsah redukujicích sacharidů v rýži (g/100 g výrobku)

	před hydrolýzou	% redukujicích s. v celkových s.	po hydrolýze	% redukujicích s. v celkových s.
Long grain white rice	0,42 ± 0,09	20,79	78,83 ± 0,72	96,42
Long grain white rice, VS	0,31 ± 0,04	10,06	81,90 ± 1,69	95,87
Bask	0,32 ± 0,03	17,78	77,63 ± 1,85	99,41
SOS Clasic	0,36 ± 0,03	18,56	61,93 ± 0,58	76,58
SOS Long	0,25 ± 0,05	16,45	44,70 ± 0,30	57,84
Rýže dlouhozrnná loupaná	0,42 ± 0,06	28,97	66,69 ± 1,14	78,73
Menu zlaté	0,29 ± 0,03	9,73	74,22 ± 0,68	89,91
Menu zlaté parboiled	2,15 ± 0,17	30,32	69,18 ± 0,78	73,50
Albert Bio	0,32 ± 0,06	8,42	49,24 ± 0,33	64,81
Lagris, rýže dlouhozrnná	0,42 ± 0,03	16,67	75,74 ± 0,65	81,25
Lagris, rýže parboiled	1,36 ± 0,17	20,83	78,02 ± 0,35	98,86
Lagris, rýže Tří barev	2,00 ± 0,11	13,44	58,88 ± 0,24	62,78
Lagris, rýže Arborio	1,03 ± 0,07	21,02	79,86 ± 1,31	92,55
Lagris, rýže Indiánská	2,65 ± 0,15	10,79	34,35 ± 0,98	35,64
Rýže červená Natural	0,85 ± 0,12	12,32	68,31 ± 1,26	112,06
Basmati	0,41 ± 0,03	19,34	31,57 ± 2,08	38,84
Jasmínová	0,35 ± 0,05	21,08	75,75 ± 1,41	86,60

s. = sacharidy

Obsah redukujicích sacharidů v rýži byl změřen v rozsahu 0,25 g/100 g v rýži SOS Long až 2,65 g/100 g v rýži Indiánské. Vyšší obsah byl změřen také v rýži Menu zlaté parboiled, 2,15 g/100 g a rýži Tří barev, 2,00 g/100 g.

Zastoupení redukujicích sacharidů v celkových se u vodných extraktů pohybovalo od 8,42 % do 30,32 %. Nejvíce byly redukujicí sacharidy zastoupeny u rýže Menu zlaté parboiled a také rýže dlouhozrnné loupané (28,97 %), nejmenší podíl redukujicích sacharidů byl zjištěn u rýže Albert bio. Získaná data shrnuje Tab. 55 .

Po kyselé hydrolýze vzrostl obsah redukujicích sacharidů o tři až čtyři řády ve srovnání se stanovením bez kyselé hydrolýzy. Nejvíce se zvýšil obsah u rýže Long grain white rice z původních 0,31 g/100 g na 81,90 g/100 g, což představovalo nejvíce redukujicích sacharidů mezi vzorky rýže. Nejmenší nárůst byl zaznamenán u rýže Indiánské, která tak po rýži

Basmati byla druhá s nejnižším obsahem redukujicích sacharidů (31,57 g/100 g, resp. 34,35 g/100 g).

Po hydrolýze měla nejnižší podíl redukujicích sacharidů v celkových rýže Indiánská, 35,64 % a dále Basmati, což souvisí s nízkým obsahem uvolněných redukujicích sacharidů po hydrolýze. Nejvíce byly redukujicí sacharidy zastoupeny v celkových sacharidech u rýže Bask (99,41 %) a rýže Lagris parboiled (98,86 %).

6.1.2.3 Stanovení mono a disacharidů metodou HPLC

Ve vodných extraktech i hydrolyzátech cereálií byly analyzovány individuální sacharidy, a to metodou HPLC s refraktometrickou detekcí. Analýza vzorků pro stanovení individuálních sacharidů byla provedena podle kap. 4.6.9. Měření byla prvedena třikrát, výsledná hodnota byla získána jako průměr těchto tří měření. Dále byla spočítána směrodatná odchylka.

Vzorky byly připraveny podle kap. 4.5.1 (extrakce do vody) a kap. 4.5.11 (kyselá hydrolýza).

Tab. 56 Kalibrační rovnice standardů pro výpočet obsahu sacharidů v cereáliích

standard	regresní rovnice	koeficient determinace
fruktóza	y (mV·s) = 908,620 x (mg/ml)	R^2 = 0,948
glukóza	y (mV·s) = 765,859 x (mg/ml)	R^2 = 0,988
galaktóza	y (mV·s) = 423,133 x (mg/ml)	R^2 = 0,910
sacharóza	y (mV·s) = 1 359,202 x (mg/ml)	R^2 = 0,999
maltóza	y (mV·s) = 721,154 x (mg/ml)	R^2 = 0,936

Tab. 57 Obsah mono a disacharidů v cereáliích (mg/100 g výrobku)

	fruktóza	glukóza	galaktóza	sacharóza	maltóza
VLOČKY					
pšeničné	nd	102,15 ± 12,58	nd	464,14 ± 18,83	nd
ječné	nd	134,44 ± 16,53	nd	530,01 ± 4,22	nd
špaldové	nd	97,67 ± 7,65	nd	491,02 ± 3,38	nd
pohankové	52,30 ± 0,70	190,89 ± 3,06	nd	908,60 ± 10,80	151,80 ± 13,60
ovesné	5,32 ± 0,19	370,62 ± 9,44	nd	526,99 ± 7,81	59,82 ± 9,68
rýžové	nd	15,48 ± 4,39	nd	237,72 ± 5,95	32,34 ± 9,46
žitné vločky	nd	152,15 ± 8,92	nd	420,57 ± 2,52	29,26 ± 3,51
MOUKY					
pšeničná celozrnná	4,75 ± 0,18	138,57 ± 12,13	nd	519,31 ± 2,65	nd
špaldová celozrnná	3,11 ± 0,30	80,92 ± 9,87	nd	489,66 ± 9,33	nd
žitná celozrnná	14,94 ± 0,20	85,28 ± 10,21	150,46 ± 6,72	619,92 ± 9,82	101,58 ± 9,32
z červené pšenice	4,59 ± 0,14	122,36 ± 12,60	nd	567,83 ± 11,10	nd
pohanková hladká	31,45 ± 1,31	103,62 ± 1,18	nd	624,14 ± 4,98	80,91 ± 4,19
pšeničná hladká	nd	41,52 ± 0,06	nd	256,94 ± 3,65	nd
pšeničná hrubá	nd	42,14 ± 3,25	nd	127,58 ± 5,19	nd
OTRUBY					

pšeničné term.	nd	286,74 ± 5,28	nd	963,73 ± 12,10	nd
ovesné	nd	61,58 ± 6,33	nd	403,36 ± 10,44	nd
žitné	nd	83,82 ± 3,21	222,7 ± 12,0	1 699,15 ± 28,72	nd
kukuřičné	nd	423,38 ± 3,44	nd	340,02 ± 4,12	nd
amarantové	211,42 ± 7,81	164,16 ± 10,37	707,48 ± 2,54	876,45 ± 9,30	88,06 ± 6,13
KLÍČKY					
pšeničné	nd	1 409,06 ± 48,56	nd	9 553,52 ± 34,82	nd
špaldové	nd	365,60 ± 15,00	nd	5 354,34 ± 87,71	nd
žitné	244,98 ± 6,04	179,24 ± 20,81	1 417,36±82,63	9 063,03 ± 73,41	457,82 ± 29,01
kukuřičné	49,04 ± 0,20	299,38 ± 16,57	296,35 ± 7,27	1 995,87 ± 41,94	145,81 ± 8,68

Metodou kapalinové chromatografie byly v cereálních vzorcích stanoveny monosacharidy fruktóza, glukóza a galaktóza a disacharidy sacharóza a maltóza. Výsledky uvádí Tab. 57 .

Glukóza byla detekována u všech vzorků a její obsah se pohyboval od 15,48 mg/100 g u vloček rýžových až po 1 409,06 mg/100 g u klíčků pšeničných. Fruktóza byla detekována u deseti vzorků a galaktóza pouze u pěti. Nejvyšší obsah obou monosacharidů byl u klíčků žitných a otrub amarantových. Sacharóza byla přítomna v množství od 127,58 mg/100 g v mouce pšeničné hrubé do 9 553,52 mg/100 g v klíčcích pšeničných. Maltóza byla detekována pouze u devíti vzorků, nejvíce byla zastoupena v klíčcích žitných (457,82 mg/100g) a v obou produktech pohankových.

Kyselou hydrolýzou byly uvolněny individuální mono- a oligosacharidy a jejich množství ve vzorcích několikanásobně vzrostlo ve srovnání s vodnými extrakty.

Tab. 58 Obsah mono a disacharidů ve vzorcích po kyselé hydrolýze (g/100 g výrobku)

	fruktóza	glukóza	galaktóza	sacharóza	maltóza
VLOČKY					
pšeničné	9,78 ± 0,56	72,70 ± 2,19	5,16 ± 0,49	1,10 ± 0,04	6,89 ± 0,14
ječné	3,88 ± 0,19	63,59 ± 2,92	nd	11,97 ± 0,47	5,59 ± 0,17
špaldové	8,87 ± 0,51	63,21 ± 0,65	28,99 ± 0,55	1,30 ± 0,03	6,39 ± 0,27
pohankové	7,23 ± 0,44	75,27 ± 0,58	17,84 ± 0,97	2,77 ± 0,03	9,07 ± 0,21
ovesné	3,18 ± 0,33	60,15 ± 0,86	26,17 ± 0,13	2,24 ± 0,02	5,31 ± 0,20
rýžové	6,77 ± 0,32	68,74 ± 2,77	15,82 ± 0,94	1,84 ± 0,02	7,89 ± 0,59
žitné vločky	12,53 ± 0,04	76,62 ± 2,28	3,46 ± 0,52	2,17 ± 0,08	5,64 ± 0,60
MOUKY					
pšeničná celozrnná	6,83 ± 0,11	62,88 ± 0,83	23,65 ± 0,58	1,45 ± 0,04	6,87 ± 0,08
špaldová celozrnná	8,76 ± 0,16	75,39 ± 2,61	4,04 ± 0,06	0,88 ± 0,02	5,68 ± 0,18
žitná celozrnná	8,50 ± 0,07	78,03 ± 2,16	6,35 ± 0,15	1,29 ± 0,00	7,85 ± 0,18
z červené pšenice	7,01 ± 0,09	65,44 ± 2,13	24,87 ± 0,48	1,69 ± 0,07	6,88 ± 0,18
pohanková hladká	10,74 ± 0,15	76,45 ± 2,67	5,77 ± 0,32	0,92 ± 0,04	7,60 ± 0,43
pšeničná hladká	8,46 ± 0,08	82,47 ± 0,10	nd	1,58 ± 0,05	7,53 ± 0,16
pšeničná hrubá	11,51 ± 0,02	74,88 ± 0,11	7,15 ± 0,15	1,74 ± 0,01	7,48 ± 0,25
OTRUBY					
pšeničné term.	10,42 ± 0,15	27,90 ± 1,82	nd	1,86 ± 0,09	0,98 ± 0,31
ovesné	2,46 ± 0,19	29,28 ± 0,01	nd	nd	32,91 ± 1,79

žitné	14,04 ± 0,43	52,10 ± 0,68	nd	0,82 ± 0,05	1,59 ± 0,24
kukuřičné	30,39 ± 0,63	25,99 ± 2,78	16,18 ± 0,50	1,46 ± 0,05	2,13 ± 0,20
amarantové	3,40 ± 0,14	33,98 ± 0,23	3,18 ± 0,26	11,16 ± 0,91	2,82 ± 0,10
KLÍČKY					
pšeničné	5,52 ± 0,57	42,62 ± 1,23	nd	1,03 ± 0,026	21,77 ± 0,96
špaldové	11,16 ± 0,57	43,23 ± 2,52	nd	2,26 ± 0,06	2,68 ± 0,25
žitné	8,52 ± 0,25	36,68 ± 0,12	1,77 ± 0,06	0,58 ± 0,01	1,85 ± 0,02
kukuřičné	16,25 ± 0,07	65,94 ± 3,51	nd	1,80 ± 0,02	6,00 ± 0,21

Po kyselé hydrolýze již byla fruktóza detekována ve všech vzorcích. Koncentrace se pohybovala v rozmezí 2,46 g/100 g v otrubách ovesných - 30,39 g/100 g v otrubách kukuřičných. Maximální i minimální hodnota tak spadá to stejné skupiny produktů. Výsledky jsou uspořádány do Tab. 58 .

Obsah glukózy po hydrolýze se pohyboval v rozmezí 25,99 g/100 g (otruby kukuřičné) - 88,27 g/100 g (mouka pohanková). Nejméně byla glukóza obsažena v otrubách, průměrně 29,29 g/100 g a také v klíčcích, v průměru 47,12 g/100 g. Ve vzorcích vloček a mouk bylo naměřeno dvojnásobné až trojnásobné množství. Vysoký obsah glukózy právě v těchto vzorcích lze vysvětlit vysokým obsahem škrobu v endospermu, kdy mouky s vysokým stupněm vymletí jsou tvořeny převážně jen z endospermu. Za podmínek hydrolýzy dochází ke štěpení škrobu na glukózu a další mono a oligosacharidové frakce [140].

Obsah galaktózy po hydrolýze byl změřen v rozmezí 1,77 až 28,99 g/100 g. Nejméně bylo detekováno v klíčcích žitných, nejvíce ve vločkách špaldových. V osmi vzorcích nebyla galaktóza detekována vůbec.

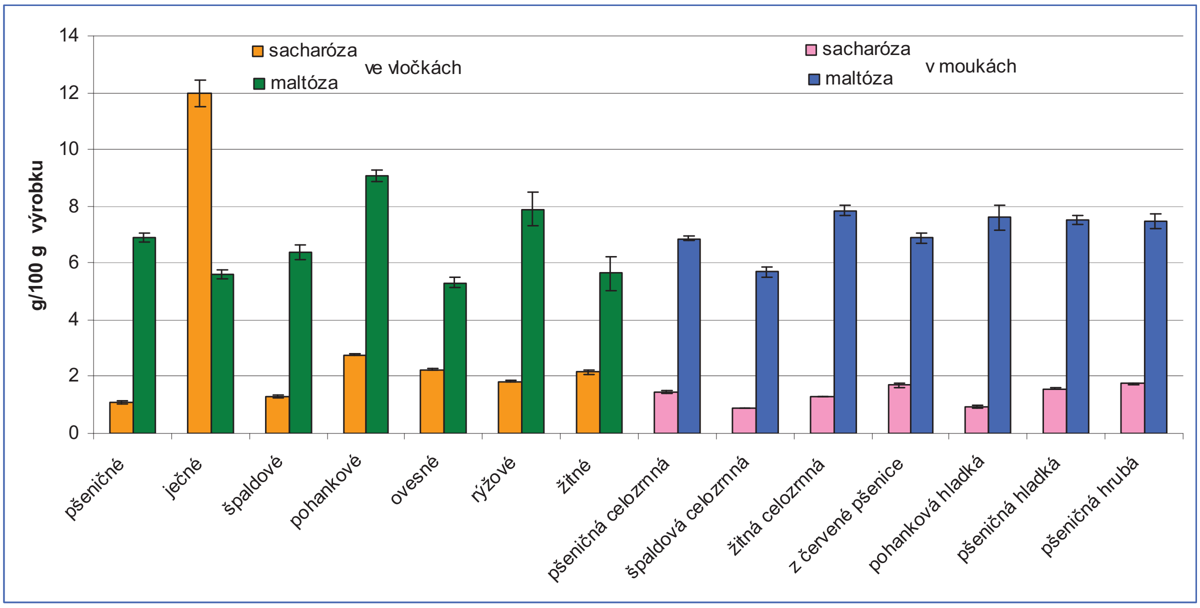
Po kyselé hydrolýze byla sacharóza detekována ve všech vzorcích kromě otrub ovesných. Před hydrolýzou zde byla sacharóza stanovena v množství 403,36 mg/100 g, vlivem podmínek hydrolýzy patrně došlo ke štěpení glykosidických vazeb a štěpení sacharózy na monomerní jednotky glukózu a fruktózu. Před hydrolýzou nebyla v těchto otrubách fruktóza vůbec detekována, po hydrolýze již bylo množství 2,46 g/100 g.

V ostatních vzorcích se obsah sacharózy po hydrolýze pohyboval v množství od 0,58 g/100 g v klíčcích žitných do 11,97 g/100 g ve vločkách ječných. Vysoký obsah sacharózy byl ještě stanoven v otrubách amarantových (11,16 g/100 g), u ostatních vzorků byl obsah v průměru 1,47 g/100 g.

Maltóza byla po hydrolýze detekována ve všech vzorcích, nejvíce u otrub ovesných, 32,91 g/100 g, na rozdíl od sacharózy, která nebyla detekována právě u těchto otrub. V porovnání s ostatními vzorky bylo vysoké množství maltózy stanoveno ještě v klíčcích pšeničných, 21,77 g/100 g. U ostatních vzorků byl obsah v průměru 5,37 g/100 g. Výskyt maltózy ve všech vzorcích po hydrolýze je možno vysvětlit jejím uvolňováním během hydrolýzy škrobu [144]. Obsah disacharidů po hydrolýze znázorňuje také Graf 14 .

V zrnech obilovin se vyskytují různé druhy sacharidů až polysacharidů. Pro lidskou výživu je velmi důležitý škrob, který je lehce stravitelný a v rámci lidské výživy představuje hlavní zdroj energie. Významnou úlohu představuje také obsah vlákniny nebo naopak jednoduchých sacharidů, které mohou posloužit jako rychlý zdroj energie [140].

Cereálie analyzované v této práci, ve formě, v jaké je přijímáme v potravě, obsahovaly nízké množství jednoduchých sacharidů. Stanovením souhrnného obsahu sacharidů však byly zjištěny vyšší hodnoty. Vlivem agresivních podmínek metody patrně došlo k uvolnění sacharidů vázaných v polysacharidech.



Graf 14 Obsah disacharidů ve vločkách a moukách po kyselé hydrolýze (g/100 g)

K ještě většímu nárůstu došlo při aplikaci kyselé hydrolýzy, která byla přímo použita za účelem uvolnění všech dostupných sacharidů. U vzorků, u kterých byl zaznamenán nejvyšší nárůst sacharidů po hydrolýze, lze tedy předpokládat, že tyto sacharidy byly uvolněny z vlákniny a ve fyziologickém prostředí trávicího traktu budou tyto vzorky štěpeny delší dobu (v případě stravitelné vlákniny) nebo vůbec (v případě nestravitelné vlákniny). Přítomnost obou typů vlákniny je pro organizmus přínosem pro jejich pozitivní účinky na lidský organizmus [5].

Frakcí zrna nejbohatší na sacharidy extrahovatelné pouze do vody, byly klíčky, které jsou považovány za nevýživnější část zrna. Po kyselé hydrolýze se uvolnilo značné množství jednoduchých sacharidů ze všech částí zrna. Bez přepočtu na rozpustný podíl vzorku byl nejmenší obsah sacharidů v otrubách, po přepočtu již byl obsah sacharidů srovnatelný s ostatními vzorky. To potvrzuje domněnku, že otruby jsou pro člověka nejméně využitelnou částí zrna a jsou tvořeny z velké části nerozpustnými nestravitelnými sacharidy [140].

Analýza mono- a disacharidů byla provedena také ve vzorcích rýže.

Tab. 59 Kalibrační závislosti standardů sacharidů analyzovaných v rýži

standard	kalibrační rovnice	koeficient determinace
arabinóza	y (mV·s) = 579,648 x (mg/ml)	R^2 = 0,999
glukóza	y (mV·s) = 695,481 x (mg/ml)	R^2 = 0,985
galaktóza	y (mV·s) = 695,103 x (mg/ml)	R^2 = 0,999
sacharóza	y (mV·s) = 740,287 x (mg/ml)	R^2 = 0,997
maltóza	y (mV·s) = 596,932 x (mg/ml)	R^2 = 0,993
cellobióza	y (mV·s) = 776,359 x (mg/ml)	R^2 = 0,999

Tab. 60 Obsah monosacharidů v rýži (mg/100 g rýže)

	arabinóza	glukóza	galaktóza	sacharóza	maltóza	cellobióza
Long grain white rice	30,60 ± 0,10	21,03 ± 0,60	nd	114,60 ± 3,16	24,93 ± 0,43	nd

Long grain white rice, VS	64,53 ± 1,30	181,57 ± 4,00	nd	121,32 ± 9,69	117,47 ± 0,34	nd
Bask	8,00 ± 1,35	84,37 ± 1,08	nd	85,24 ± 2,55	76,23 ± 3,87	nd
SOS Clasic	44,25 ± 0,90	111,84 ± 3,47	nd	69,28 ± 2,25	113,91 ±0,65	nd
SOS Long	40,55 ± 0,29	184,54 ± 1,30	nd	50,22 ± 1,56	99,23 ± 9,06	nd
Rýže dlouhozrnná loupaná	24,50 ± 1,07	99,36 ± 6,82	10,71 ±0,21	18,16 ± 0,57	50,20 ± 2,24	nd
Menu zlaté	23,34 ± 1,29	92,68 ± 7,23	nd	133,65±3,46	26,02 ± 1,47	nd
Menu zlaté parboiled	16,05 ± 0,65	291,04 ± 2,20	nd	187,77±4,00	371,50 ±4,92	nd
Albert Bio	38,88 ± 0,90	173,00 ± 2,58	88,92 ±1,28	261,06±5,99	304,18 ±3,50	43,72±0,38
Lagris, rýže dlouhozrnná	27,78 ± 1,37	137,08 ± 1,86	16,29 ±0,56	60,02 ± 0,10	97,70 ± 1,66	nd
Lagris, rýže parboiled	98,48 ± 1,30	240,90 ± 1,85	nd	331,66 ± 5,10	117,32 ±0,20	nd
Lagris, rýže Tří barev	28,50 ± 1,63	332,41 ± 0,84	nd	215,88 ± 1,45	377,72 ±3,59	61,13±1,43
Lagris, rýže Arborio	18,04 ± 0,75	192,03 ± 1,74	10,49 ±0,12	109,46 ± 0,65	181,30 ±1,02	nd
Lagris, rýže Indiánská	247,14 ± 2,91	405,73 ± 1,08	nd	300,25 ± 3,56	627,46 ±1,52	148,26 ±3,33
Rýže červená Natural	87,31 ± 0,73	100,08 ± 0,79	30,39 ±0,10	217,53 ± 2,31	296,17 ±1,77	14,26±0,84
Basmati	27,35 ± 0,16	142,72 ± 2,37	nd	124,64 ± 0,44	144,90 ±1,37	nd
Jasmínová	21,81 ± 0,81	113,56 ± 0,84	17,93 ±0,16	52,21 ± 0,11	76,64 ± 0,65	nd

Metodou HPLC byly ve vzorcích stanoveny tři monosacharidy, aldopentóza arabinóza a hexózy glukóza a galaktóza (viz Tab. 60). Koncentrace arabinózy byla změřena v rozsahu 8,00 mg/100 g v rýži značky Bask až 247,14 mg/100 g v rýži Indiánské značky Lagris. Glukóza byla obsažena v koncentraci 21,03 mg/100 g u rýže Long grain white rice až 405,73 mg/100 g u rýže Indiánské. Galaktóza byla detekována jen u šesti vzorků ze sedmnácti. Nejvíce v rýži Albert bio, 88,92 mg/100 g. V rýži Indiánské, která měla nejvyšší obsah arabinózy a glukózy, nebyla galaktóza detekována vůbec.

Z disacharidů byla ve vzorcích detekována sacharóza, maltóza a cellobióza. Obsah sacharózy byl změřen od 18,16 mg/100 g u rýže dlouhozrnné loupané až po 331,66 g/100 g u rýže parboiled značky Lagris. Maltózy bylo změřeno nejméně u rýže Long grain white rice, 24,93 mg/100 g a nejvíce u rýže Indiánské, 627,46 mg/100 g. Disacharid cellobióza byla detekována pouze u čtyř vzorků ze sedmnácti a to v rýži Albert bio a dále v rýžích Tří barev, červené Natural a Indiánské, kde byl obsah nejvyšší, 148,26 mg/100 g. Z přítomnosti cellobiózy v těchto rýžích a také z vysokého obsahu maltózy a sacharózy je možné odvodit, že barevné rýže jsou bohatší na obsah disacharidů.

Tab. 61 Obsah sacharidů v rýžích po kyselé hydrolýze (g/100 g rýže)

	arabinóza	glukóza
Long grain white rice	12,27 ± 0,12	32,48 ± 0,16
Long grain white rice, VS	20,95 ± 0,89	69,52 ± 0,12
Bask	30,46 ± 0,58	68,84 ± 0,59
SOS Clasic	49,00 ± 0,94	50,32 ± 2,60
SOS Long	51,83 ± 0,68	51,52 ± 0,02
Rýže dlouhozrnná loupaná	27,15 ± 0,31	71,45 ± 0,64

Menu zlaté	14,24 ± 0,46	26,57 ± 0,26
Menu zlaté parboiled	40,53 ± 0,16	58,70 ± 1,24
Albert Bio	42,61 ± 0,53	39,71 ± 0,00
Lagris, rýže dlouhozrnná	14,47 ± 0,26	76,12 ± 0,77
Lagris, rýže parboiled	38,22 ± 0,27	39,78 ± 1,14
Lagris, rýže Tří barev	20,60 ± 0,40	48,81 ± 0,04
Lagris, rýže Arborio	27,32 ± 0,08	74,99 ± 0,67
Lagris, rýže Indiánská	39,51 ± 0,01	62,40 ± 0,45
Rýže červená Natural	25,20 ± 0,16	67,32 ± 0,61
Basmati	17,16 ± 0,34	49,63 ± 0,59
Jasmínová	15,94 ± 0,50	64,62 ± 0,43

Po kyselé hydrolýze byly ve vzorcích identifikovány pouze dva monosacharidy, a to arabinóza a glukóza (uvedeno v Tab. 61). Jejich obsah byl však několikanásobně vyšší než před hydrolýzou.

Obsah arabinózy byl v rozmezí 12,27 g/100 g - 51,83 g/100 g. Nejvíce bylo arabinózy v rýži SOS Long. Glukóza byla ve vzorcích obsažena ve větší míře, nejvíce v rýži Lagris dlouhozrnné (71,45 g/100 g), kde byl naopak nejnižší obsah arabinózy. Dále byl vysoký obsah glukózy zaznamenán v rýži dlouhozrnné loupané a rýži Long grain white rice ve varných sáčcích. Nejméně glukózy bylo v Menu zlaté (26,57 g/100 g) a Long grain white rice sypané rýži (32,48 g/100 g).

Další sacharidy již ve vzorcích po kyselé hydrolýze detekovány nebyly. Vlivem agresivních podmínek došlo ke štěpení disacharidů na monosacharidy a také monosacharidy dále přecházely na furfural (pentózy) a hydroxymethylfurfural (hexózy). Tyto sloučeniny analyzovány nebyly [113].

Vlivem kyselé hydrolýzy bylo uvolněno z cereálií všech typů velké množství sacharidů. Při analýze celkových sacharidů po extrakci do vody se jejich množství pohybovalo v gramech, výjimečně nad deset gramů, po kyselé hydrolýze však obsah uvolněných sacharidů značně narostl a pohyboval se v průměru kolem sedmdesáti gramů na sto gramů analyzovaného vzorku. Kyselou hydrolýzou tak bylo uvolněno značné množství celkových sacharidů, což potvrzuje nutriční hodnotu cereálií jako zdroje energie. Metodou HPLC byly uvolněné sacharidy analyzovány jak kvalitativně, tak také kvantitativně, a byl získán ucelenější přehled o složení jednotlivých vzorků. Tyto experimenty byly provedeny s cílem otestovat možnosti uvolňování a štěpení glykosidů a jejich zpřístupnění mikroorganizmům v případě použití tohoto materiálu jako nutriční složky pro kultivace.

6.2 Stanovení antioxidační aktivity cereálií

V následujcí kapitole byly testovány antioxidační účinky analyzovaných cereálií pomocí několika různých testů a výsledky byly navzájem porovnány.

6.2.1 Testování antioxidační aktivity metodou ABTS

Sledování antioxidační aktivity s využitím radikálu ABTS bylo provedeno podle postupu v kap. 4.6.15. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát, z hodnot byl spočítán průměr a směrodatná odchylka.

Tab. 62 Kalibrační rovnice pro výpočet antioxidační aktivity

standard	kalibrační rovnice	koeficient determinace
Trolox	$A = 1{,}389 \cdot c$ (mg/ml)	$R^2 = 0{,}989$

Tab. 63 Stanovení antioxidační aktivity v cereálních vzorcích

	TEAC (mg/100 g)
VLOČKY	
pšeničné	36,08 ± 0,35
ječné	62,60 ± 0,18
špaldové	59,63 ± 1,22
pohankové	323,68 ± 12,36
ovesné	60,46 ± 6,79
rýžové	36,69 ± 5,44
žitné	54,42 ± 1,91
MOUKY	
pšeničná celozrnná	54,88 ± 3,36
špaldová celozrnná	48,62 ± 7,91
žitná celozrnná	57,75 ± 4,00
z červené pšenice	69,03 ± 6,84
pohanková hladká	166,31 ± 4,12
pšeničná hladká	14,53 ± 4,02
pšeničná hrubá	7,63 ± 1,06
OTRUBY	
pšeničné term.	132,43 ± 4,33
ovesné	45,43 ± 2,23
žitné	170,39 ± 12,91
kukuřičné	43,61 ± 1,47
amarantové	56,65 ± 4,77
KLÍČKY	
pšeničné	590,85 ± 10,88
špaldové	312,81 ± 24,65
žitné	328,05 ± 56,70
kukuřičné	89,49 ± 1,72

Antioxidační aktivita ve vločkách uvedena v Tab. 63 byla v průměru 51,65 mg/100 g. Více než šestkrát tuto hodnotu převyšují vločky pohankové s hodnotou TEAC 323,68 mg/100 g, což je třetí nejvyšší hladina mezi všemi ostatními vzorky. Tyto vločky rovněž vykazovaly třetí nejvyšší hladinu celkových polyfenolů a celkových flavonoidů. Nejmenší antioxidační aktivitu vykazovaly vločky pšeničné, 36,08 mg/100 g, zde byl zjištěn nejmenší obsah celkových polyfenolů mezi ostatními vzorky a nízká hladina celkových flavonoidů.

Také mezi moukami měla nejvyšší hodnotu TEAC mouka pohanková, 166,31 mg/100 g, a také zde byly naměřeny vysoké hodnoty celkových polyfenolů, flavonoidů a flavonolů. Naopak mouky pšeničná hrubá a hladká (7,63 resp. 14,53 mg/100 g) měly nejnižší hladinu

mezi moukami a ostatními vzorky. Další mouky dosahovaly hodnot v průměru 57,57 mg/100 g.

U otrub se hladina TEAC pohybovala v rozmezí 43,61 - 170,39 mg/100 g. Nejmenší aktivita byla naměřena u otrub kukuřičných, největší u žitných.

Klíčky vykazovaly nejvyšší antioxidační aktivitu mezi všemi ostatními vzorky, klíčky pšeničné dosahovaly hodnot 590,85 mg/100 g, dále měly vysokou hodnotu také klíčky žitné a špaldové. Klíčky kukuřičné měly nejnižší antioxidační aktivitu, v porovnání s ostatními vzorky se však stále jedná o vysokou hodnotu.

Hodnota antioxidační aktivity kopíruje rovněž hodnoty celkových polyfenolů i flavonoidů.

Podle trendu - vysoká hladina celkových polyfenolů/flavonoidů - vysoká hodnota antioxidační aktivity stanovené metodou ABTS (nízká hladina - nízká aktivita), je možno říci, že mezi těmito veličinami existuje spojitost a fenolické látky, zahrnuté do těchto skupinových parametrů, vykazují antioxidační vlastnosti.

Tab. 64 Stanovení antioxidační aktivity v rýžích

	TEAC (mg/100 g)
Long grain white rice	10,95 ± 1,63
Long grain white rice, VS	23,92 ± 1,61
Bask	16,78 ± 1,05
SOS Clasic	19,85 ± 1,44
SOS Long	15,83 ± 1,54
Rýže dlouhozrnná loupaná	13,97 ± 0,67
Menu zlaté	22,14 ± 1,38
Menu zlaté parboiled	26,54 ± 0,86
Albert Bio	6,24 ± 0,39
Lagris, rýže dlouhozrnná	15,88 ± 1,82
Lagris, rýže parboiled	20,50 ± 2,13
Lagris, rýže Tří barev	29,49 ± 1,60
Lagris, rýže Arborio	24,76 ± 1,48
Lagris, rýže Indiánská	27,33 ± 1,02
Rýže červená Natural	75,72 ± 0,15
Basmati	22,07 ± 0,72
Jasmínová	11,09 ± 0,29

Průměrná hodnota TEAC pro vzorky rýží byla 20,07 mg/100 g (viz Tab. 64). Do toho intervalu nebyla zařazena rýže s nejnižší antioxidační aktivitou, tj. Albert bio, 6,24 mg/100 g a na druhé straně rýže s antioxidační aktivitou nejvyšší, rýže červená Natural, 75,72 mg/100 g. Vyšší hladina TEAC byla změřena rovněž u rýže Tří barev, Indiánské, Menu zlaté parboiled. U rýže červené Natural byla zjištěna také nejvyšší hladina celkových polyfenolů, flavonoidů a flavonolů mezi ostatními rýžemi. Ale například obsah katechinů a individuálních fenolických látek obecně u této rýže byl spíše průměrný oproti ostatním rýžím. Vysokou antioxidační aktivitu tak patrně způsobuje celý souhrn fenolických látek v rýžích obsažený, protože například rýže Indiánská vynikala mezi ostatními rýžemi vysokým obsahem individuálních fenolických látek, její antioxidační aktivita však byl třikrát nižší než u červené rýže Natural. Tato skutečnost rovněž odpovídá již publikované literatuře [150].

Vysoká antioxidační aktivita byla zaznamenána především u barevných rýží. Barevnost má vliv na hladinu celkových polyfenolů a tím také na hodnotu antioxidační aktivity, jak bylo dokázáno také v dalších studiích [151].

Porovnáním antioxidační aktivity cereálních a rýžových vzorků vyplývá, že s výjimkou mouky pšeničné hladké a hrubé, byla hodnota antioxidační aktivity vyšší u cereálií než u rýží, kde výjimku představuje rýže Indiánská, jejíž hodnota antioxidační aktivity je srovnatelná s průměrnou aktivitou u cereálií.

6.2.2 Testování antioxidační aktivity metodou DPPH

Měření antioxidační aktivity s radikálem DPPH byla provedena podle postupu uvedeném v kap. 4.6.15. Měření každého vzorku bylo provedeno třikrát, z hodnot byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

Tab. 65 Kalibrační rovnice pro výpočet koncentrace Troloxu ve vzorcích

standard	kalibrační rovnice	koeficient determinace
Trolox	$y = 9{,}794 \cdot c$ (μg/ml)	$R^2 = 0{,}996$

Tab. 66 Antioxidační aktivita cereálních vzorků

	schopnost zhášet radikály (%)	přepočet na Trolox (mg/100 g)
VLOČKY		
pšeničné	49,55 ± 0,98	5,04 ± 0,10
ječné	94,71 ± 0,67	9,61 ± 0,07
špaldové	43,51 ± 0,51	4,39 ± 0,05
pohankové	89,74 ± 0,63	9,12 ± 0,06
ovesné	61,61 ± 0,64	6,22 ± 0,07
rýžové	51,85 ± 0,67	5,24 ± 0,07
žitné	52,36 ± 0,58	5,31 ± 0,06
MOUKY		
pšeničná celozrnná	60,14 ± 0,49	5,99 ± 0,05
špaldová celozrnná	68,37 ± 0,30	6,90 ± 0,03
žitná celozrnná	86,11 ± 1,00	8,46 ± 0,10
z červené pšenice	91,92 ± 0,26	9,31 ± 0,03
pohanková hladká	90,97 ± 0,41	9,29 ± 0,04
pšeničná hladká	32,25 ± 1,97	3,22 ± 0,20
pšeničná hrubá	19,93 ± 1,2	1,98 ± 0,12
OTRUBY		
pšeničné term.	86,05 ± 0,20	8,74 ± 0,02
ovesné	73,15 ± 0,50	7,42 ± 0,05
žitné	80,75 ± 1,04	8,20 ± 0,11
kukuřičné	92,44 ± 0,36	9,43 ± 0,04
amarantové	73,95 ± 0,94	7,48 ± 0,10
KLÍČKY		
pšeničné	86,58 ± 2,57	8,78 ± 0,26
špaldové	85,97 ± 0,81	8,78 ± 0,08

žitné	88,47 ± 0,71	8,93 ± 0,07
kukuřičné	89,04 ± 0,45	9,02 ± 0,05

Touto metodou s využitím radikálu DPPH je možno antioxidační aktivitu vyjádřit dvěma způsoby (viz Tab. 66). První způsob vyjadřuje procento radikálů DPPH, které je vzorek v použité koncentraci schopen vychytat. Druhý způsob je možnost přepočítat procenta na ekvivalent Troloxu.

Podle naměřených dat se schopnost zhášet radikály DPPH pohybovala u vzorků v rozpětí 19,93 % radikálů u mouky pšeničné hrubé až 94,71 % u vloček ječných. Hodnota nad devadesát procent byla ještě změřena u otrub kukuřičných a mouky z červené pšenice a pohankové hladké.

Přepočítaný ekvivalent Troloxu kopíroval hodnoty vyjádřené procentuálně. Nejvíce Troloxu bylo stanoveno u vloček ječných, nejméně u mouk pšeničných s vysokým stupněm vymletí, hrubé a hladké (1,98 mg/100 g, resp. 3,22 mg/100 g).

Vločky ječné, které zde měly nejvyšší schopnost vychytávat radikály DPPH, vykazovaly nízké hodnoty u stanovení celkových polyfenolů, flavonoidů a flavonolů. Také u stanovení katechinů nebyly hodnoty nijak významné, dokonce katechin gallát nebyl u těchto vloček jako u jediných vůbec detekován. Obsah fenolických kyselin byl také nízký. Významný obsah byl však zaznamenán u individuálních flavonoidů, především u rutinu a naringeninu, kvercetinu byl obsah nejvyšší ze všech analyzovaných vzorků. Podobně je tomu také u dalších vzorků s vysokou antioxidační aktivitou. Vyhodnocením schopnosti zhášet radikály DPPH se tak patrně vyjadřuje spíše efekt vybraných individuálních flavonoidů, na rozdíl od metody ABTS (viz kap. 6.2.1), kde hodnoty antioxidační aktivity odpovídají aktivitě celé skupiny fenolických látek svým synergickým účinkem.

Tab. 67 Antioxidační aktivita ve vzorcích rýže

	schopnost zhášet radikály (%)	přepočet na Trolox (mg/100 g)
Long grain white rice	15,23 ± 1,51	1,55 ± 0,15
Long grain white rice, VS	35,66 ± 0,84	3,57 ± 0,08
Bask	19,69 ± 0,19	1,98 ± 0,02
SOS Clasic	28,49 ± 0,34	2,89 ± 0,03
SOS Long	30,56 ± 0,52	3,07 ± 0,03
Rýže dlouhozrnná loupaná	19,02 ± 1,26	1,92 ± 0,13
Menu zlaté	33,53 ±0,93	3,37 ± 0,09
Menu zlaté parboiled	37,08 ± 2,84	3,76 ± 0,29
Albert Bio	71,48 ± 1,99	7,26 ± 0,20
Lagris, rýže dlouhozrnná	31,83 ± 1,51	3,23 ± 0,09
Lagris, rýže parboiled	67,40 ± 1,99	6,85 ± 0,20
Lagris, rýže Tří barev	76,22 ± 0,85	7,73 ± 0,09
Lagris, rýže Arborio	51,74 ± 2,77	5,27 ± 0,28
Lagris, rýže Indiánská	91,83 ± 0,57	9,26 ± 0,06
Rýže červená Natural	87,78 ± 0,48	8,91 ± 0,05
Basmati	32,35 ± 2,28	3,30 ± 0,23
Jasmínová	27,95 ± 1,00	2,85 ± 0,10

Schopnost vzorků rýže zhášet radikály DPPH se procentuálně pohybovala od 15,23 % do 91,83 %. Nejméně bylo zaznamenáno u rýže Long grain white rice a nejvíce u rýže Indiánské. Další vysoké hodnoty byly zjištěny u rýže červené Natural, rýže Tří barev a také Albert bio. Podrobné výsledky uvádí Tab. 67 .

Podobně tomu je při přepočtu na ekvivalent Troloxu. Nejvyšší antioxidační aktivita u Indiánské rýže je 9,26 mg/100 g, nejmenší u rýže Long grain white rice 1,55 mg/100 g.

Rýže Indiánská, která měla nejvyšší schopnost zhášet radikály DPPH, měla také vysokou hladinu celkových polyfenolů a flavonoidů, nejvíce epikatechinu a epikatechin gallátu, fenolických kyselin a z individuálních flavonoidů nejvíce rutinu, morinu a naringeninu. K významným antioxidačním účinkům tak přispěly všechny tyto skutečnosti. Druhou nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovala rýže červená Natural, u které byla změřena nejvyšší hladina celkových polyfenolů, flavonoidů i flavonolů.

U většiny rýžových vzorků byla schopnost zhášet radikály nižší než u cereálních vzorků. Konzumace cereálií se tak jeví z tohoto hlediska jako zdraví přínosnější. Srovnatelné hodnoty byly pozorovány například u rýže Tří barev, Indiánské a Natural, tedy především barevných rýží, a u rýže Albert Bio. Vysoká antioxidační aktivita barevných rýží potvrzuje informace také z jiných studií uvádějících, že barevnost má vliv na hladinu celkových polyfenolů a tím také na hodnotu antioxidační aktivity [151].

6.2.3 Testování antioxidační aktivity metodou β-CLAMS

Studium antioxidační aktivity metodou β-CLAMS bylo provedeno podle postupu viz kap. 4.6.17. Měření byla provedena třikrát, v tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty a směrodatná odchylka.

Tab. 68 Kalibrační závislost Troloxu

standard	kalibrační rovnice	koeficient determinace
Trolox	$y = 0,655 \cdot c + 19,361$ (μg/ml)	$R^2 = 0,827$

Tab. 69 Antioxidační aktivita cereálních vzorků

	schopnost zabránit oxidaci β-karotenu (%)	přepočteno na Trolox (mg/ml)
VLOČKY		
pšeničné	67,90 ± 5,58	36,94 ± 4,25
ječné	69,24 ± 5,34	38,07 ± 4,07
špaldové	69,84 ± 2,56	38,27 ± 1,94
pohankové	82,45 ± 0,53	48,02 ± 0,40
ovesné	79,22 ± 3,50	45,25 ± 2,65
rýžové	87,48 ± 1,59	51,98 ±1,22
žitné	92,48 ± 0,41	55,16 ± 0,31
MOUKY		
pšeničná celozrnná	34,35 ± 2,34	11,42 ± 1,78
špaldová celozrnná	41,04 ± 2,47	16,52 ± 1,88
žitná celozrnná	85,12 ± 2,31	49,91 ± 1,75
z červené pšenice	39,96 ± 7,89	19,78 ± 1,23

pohanková hladká	90,46 ± 4,09	53,99 ± 3,10
pšeničná hladká	35,41 ± 3,33	17,78 ± 3,73
pšeničná hrubá	30,41 ± 8,26	12,85 ± 0,40
OTRUBY		
pšeničné term.	70,10 ± 4,03	49,98 ± 3,97
ovesné	88,49 ± 1,50	52,56 ± 1,14
žitné	85,45 ± 0,64	49,90 ± 0,48
kukuřičné	66,58 ± 1,27	50,38 ± 1,36
amarantové	71,68 ± 1,26	39,58 ± 0,95
KLÍČKY		
pšeničné	86,21 ± 2,21	50,70 ± 1,61
špaldové	92,99 ± 0,39	55,71 ± 0,29
žitné	91,66 ± 0,27	54,70 ± 0,20
kukuřičné	36,83 ± 2,00	13,30 ± 1,52

Antioxidační aktivita vyjádřena jako schopnost zabránit radikálům napadat molekulu β-karotenu, resp. procenta nedegradovaného β-karotenu je shrnuta v Tab. 69 a byla nejnižší u mouky pšeničné hrubé (30,41 %), nejvyšší u klíčků špaldových (92,99 %), vloček žitných (92,48 %), klíčků žitných a mouky pohankové.

Po přepočtu na potenciální obsah Troloxu byly získány hodnoty od 11,42 mg/100 g do 55,71 mg/100 g. Nejméně obsahovala mouka pšeničná celozrnná a hrubá (12,85 mg/100 g), nízký obsah byl také vypočítán u klíčků kukuřičných, pouze 13,30 mg/100 g. Nejvyšší obsah byl pak spočítán pro klíčky špaldové, vločky žitné (55,16 mg/100 g) a klíčky žitné (54,70 mg/100 g).

U některých výrobků se může lišit pořadí při seřazení podle procentuální antioxidační aktivity a při obsahu Troloxu. Procenta vyjadřují schopnost zabránit degradaci β-karotenu v roztoku při použité navážce, která byla pro všechny vzorky podobná nikoliv naprosto stejná, do výpočtu nebylo přesné číslo zahrnuto. Do vzorce pro přepočet na ekvivalent Troloxu je již zahrnuta přesná navážka.

Klíčky měly jako skupina nejvyšší antioxidační aktivitu mezi ostatními vzorky, naopak nejnižší byla u mouk, především mouky pšeničné všech typů vykazovaly nízkou aktivitu. Také vločky a klíčky pšeničné měly v rámci skupiny nejnižší hodnoty. Výrobky z žita je možno považovat za dobrý zdroj antioxidační aktivity.

Srovnáním předešlých výsledků se změřenou antioxidační aktivitou bylo zjištěno, že klíčky špaldové (zde nejvyšší antioxidační aktivita) měly druhou nejvyšší hladinu celkových polyfenolů, flavonoidů a flavonolů, vysoký obsah katechinů a z individuálních flavonoidů druhý nejvyšší obsah rutinu.

Vločky žitné sice nevykazovaly vysoké hodnoty některé z analyzovaných látek, ale jejich hladina se vždy pohybovala spíše ve vyšších úrovních. Podobně u klíčků žitných a mouky pohankové, kde byl druhý nejvyšší obsah epikatechin gallátu, kyseliny chlorogenové, vysoký obsah rutinu a vůbec nejvyšší obsah luteolinu.

Je tedy možno říct, že metoda β-CLAMS podobně jako ABTS respektuje spíše skupinové parametry, jako celkové polyfenoly aj., i individuální fenolické látky, i když by měla odpovídat obsahu spíše méně polárních látek fungujících jako membránové antioxidanty. Polarita fenolických látek je rozmanitá a vyskytují se mezi nimi zástupci vysoce polárních

i málo polárních látek [130], mohou se tedy významně podílet i na antioxidační aktivitě detekované v nepolárním testovacím systému.

Tab. 70 Antioxidační aktivita rýží stanovená metodou β-CLAMS

	schopnost zabránit oxidaci β-karotenu (%)	přepočteno na Trolox (mg/100 g)
Long grain white rice	88,01 ± 1,34	31,37 ± 0,61
Long grain white rice, VS	79,86 ± 0,51	27,10 ± 0,23
Bask	86,94 ± 0,19	30,52 ± 0,09
SOS Clasic	88,63 ± 0,63	31,49 ± 0,29
SOS Long	89,76 ± 0,43	32,01 ± 0,20
Rýže dlouhozrnná loupaná	89,86 ± 0,22	32,12 ± 0,10
Menu zlaté	84,66 ± 0,61	29,62 ± 0,28
Menu zlaté parboiled	85,45 ± 0,08	30,23 ± 0,04
Albert Bio	84,32 ± 2,91	29,58 ± 1,32
Lagris, rýže dlouhozrnná	82,11 ± 1,14	28,46 ± 0,52
Lagris, rýže parboiled	84,31 ± 0,78	29,47 ± 0,35
Lagris, rýže Tří barev	90,74 ± 2,74	32,61 ± 1,25
Lagris, rýže Arborio	92,25 ± 0,49	33,29 ± 0,22
Lagris, rýže Indiánská	89,89 ± 1,27	29,51 ± 2,98
Rýže červená Natural	95,82 ± 0,22	34,81 ± 0,10
Basmati	90,62 ± 0,17	32,16 ± 0,08
Jasmínová	90,31 ± 0,38	32,10 ± 0,17

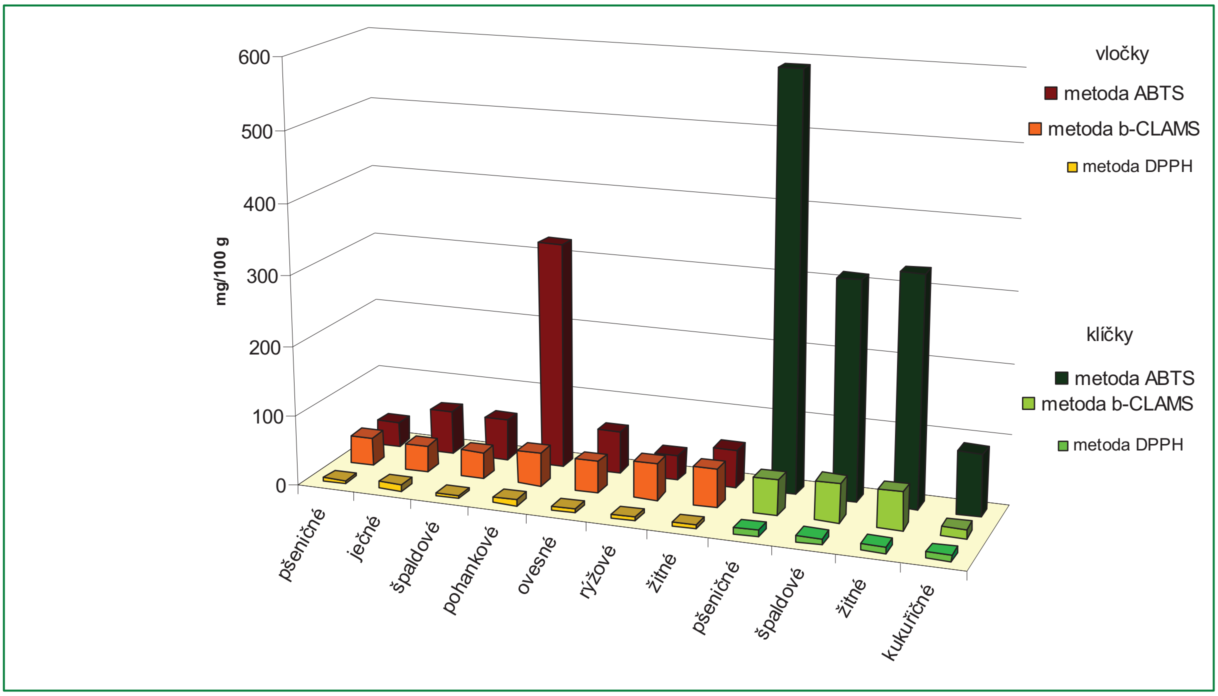
Hodnota antioxidační aktivity rýží zjištěná metodou β-CLAMS byla pro všechny vzorky velmi podobná a pohybovala se v rozmezí 79,86 % až 95,82 %, viz Tab. 70 . Nejmenší aktivita byla naměřena u rýže Long grain white rice ve varných sáčcích, největší u rýže červené Natural a pak rýži Arborio (92,25 %), rýži Tří barev (90,74 %), Basmati, Jasmínové a Indiánské. Barevné rýže opět vykazovaly vysokou aktivitu.

Antioxidační aktivita byla také přepočtena na ekvivalent Troloxu. Nejméně byl obsažen v rýži Long grain white rice ve varných sáčcích, 27,10 mg/100 g, nejvíce v rýži červené Natural, 34,81 mg/100 g, rýži Arborio, 33,29 mg/100 g, Tří barev, 32,61 mg/100 g.

U rýže červené Natural byla stanovena nejvyšší hladina celkových polyfenolů, flavonoidů a flavonolů (viz kap. 6.1.1.1, 6.1.1.2, 6.1.1.3), tyto skupinové parametry se zřejmě podílejí významnou měrou na intenzitě antioxidační aktivity. U rýže Arborio byl stanoven druhý nejvyšší obsah celkových polyfenolů, flavonoidů a také kyseliny chlorogenové a vysoký obsah kyseliny ferulové.

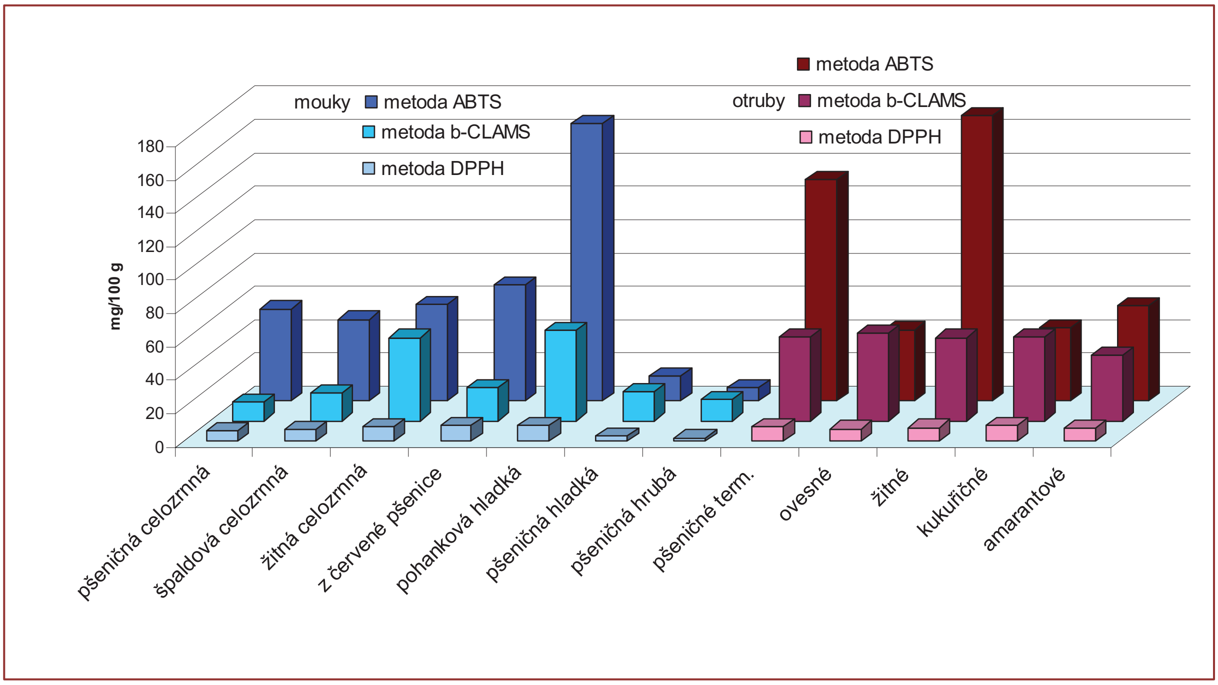
Porovnáním výsledků antioxidační aktivity získaných třemi metodami (uvádí Graf 15 a Graf 16) je vidět značné rozdíly mezi metodami ABTS a β-CLAMS a metodou DPPH. Metoda DPPH je citlivější pro nízké koncentrace látek s antioxidačním účinkem, proto také výsledky po přepočtu na ekvivalent Troloxu jsou nižší [125,126].

Především metoda ABTS odpovídá obsahu aktivních látek ve vzorcích, zejména pak obsahu flavonoidů, kdy vysoký obsah rutinu u pohankových vzorků a otrub pšeničných se projevil zvýšenou hladinou ekvivalentního Troloxu.



Graf 15 Porovnání hodnot antioxidační aktivity stanovené třemi různými metodami pro vzorky vloček a klíčků (mg/100 g)

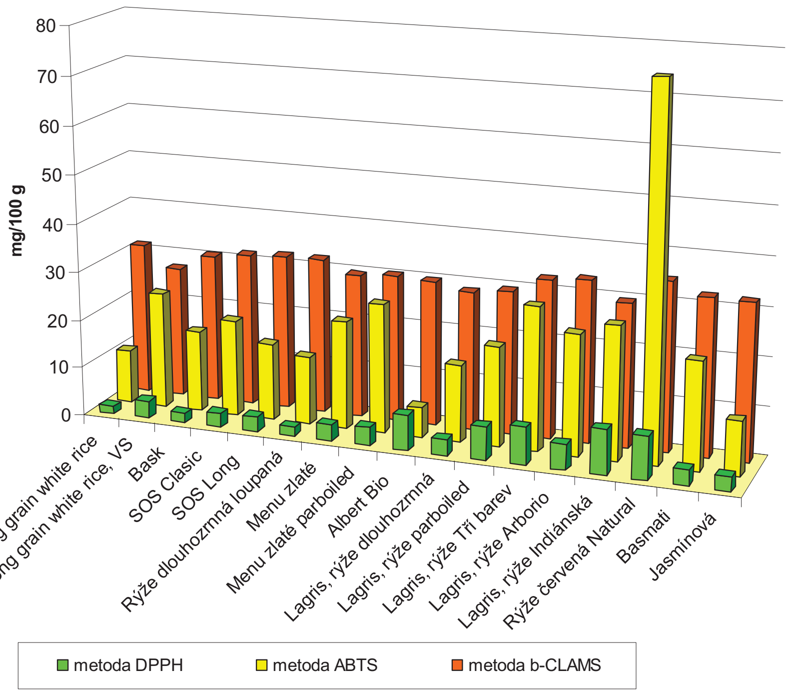
Přestože každá metoda vyjadřuje mírně odlišný způsob projevu antioxidační aktivity a hodnoty vyjádřené množstvím Troloxu ve vzorku se liší, je možné říci, že pro většinu vzorků všechny tři metody vyjadřují shodný trend míry antioxidační aktivity.



Graf 16 Srovnání antioxidační aktivity stanovené třemi metodami pro vzorky mouk a otrub (mg/100 g)

Napříč všemi metodami stanovení antioxidační aktivity vyšly nejvyšší hodnoty pro vločky pohankové a klíčky pšeničné, špaldové a žitné.

U vzorků rýže byla nejvyšší antioxidační aktivita zaznamenána u rýže červené Natural. Pro ostatní vzorky byly hodnoty velmi podobné. U čtyř vzorků byla také stanovena kyselina askorbová. Jednalo se o rýži parboiled, Tří barev a Indiánskou, všechny tři značky Lagris a dále Menu zlaté parboiled. Stanovení proběhlo titračně (kap. 4.6.18) a metodou HPLC (kap. 4.6.19). Výsledky získané oběmi metodami si byly velmi podobné. Obsah kyseliny askorbové se na výsledné hodnotě antioxidační aktivity patrně podílel jen malou měrou, protože žádná z rýži se stanovenou kyselinou askorbovou nevykazovala v porovnání s dalšími vzorky vyšší antioxidační aktivitu a naopak, u rýže s nejvyšší mírou antioxidační aktivity (rýže červená Natural) nebyla kyselina askrobová vůbec detekována. Porovnání antioxidační aktivity stanovené třemi metodami uvádí Graf 17 .



Graf 17 Antioxidační aktivita rýžových vzorků stanovená třemi metodami (mg/100 g)

6.3 Stanovení antimutagenních a genotoxických účinků cereálií

Biologické účinky cereálií byly sledovány pomocí několika testovacích systémů genotoxicity/antimutagenity. Cílem bylo vyhodnotit potenciální ochranný účinek aktivních látek obsažených v cereáliích na integritu buněk a jejich genetické informace. Předpokládá se, že hlavní podíl na antimutagenním efektu budou mít látky s antioxidačním účinkem, zejména zástupci ze skupiny fenolických látek [6].

6.3.1 Sledování antimutagenity s využitím kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* D7

Pro stanovení antimutagenních/genotoxických vlastností vzorků byl použit kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* D7. Testování probíhalo podle návodu viz kap. 4.6.12.

Antimutagenní účinek byl hodnocen jako schopnost antimutagenu (zde cereálního vzorku) inhibovat tvorbu mutantních kolonií kvasinek *S.cerevisiae* D7. Inhibice byla vyjádřena jako procenta úbytku kolonií rostoucích v přítomnosti antimutagenu s počtem kolonií rostoucích pod vlivem standardního mutagenu.

Vzorky pro studium byly připraveny podle kap. 4.5.6.

Pro testování cereálních vzorků byly použity dvě koncentrace, přičemž konečná koncentrace v buněčné suspenzi byla 0,02 g vzorku/ml a 0,1 g/ml. Antimutagenní účinky cereálií uvádí Tab. 71 .

Tab. 71 Antimutagenní účinky cereálních vzorků (% inhibice)

	inhibice účinku mutagenu testovaným vzorkem v procentech			
	trp-konverze		ile-reverze	
	0,02 g/ml	0,1 g/ml	0,02 g/ml	0,1 g/ml
VLOČKY				
pšeničné	57,99 ± 2,33	20,48 ± 1,11	63,28 ± 3,69	22,19 ± 1,34
ječné	38,15 ± 1,42	22,13 ± 0,98	44,02 ± 1,58	24,18 ± 1,38
špaldové	49,16 ± 1,18	33,81 ± 1,26	54,18 ± 2,64	21,62 ± 2,02
pohankové	39,76 ± 2,41	10,81 ± 0,06	32,43 ± 2,21	7,21 ± 0,05
ovesné	31,33 ± 1,08	28,11 ± 1,29	24,32 ± 1,13	36,93 ± 2,21
rýžové	32,20 ± 1,12	14,86 ± 1,31	40,56 ± 2,20	14,04 ± 1,02
žitné	27,11 ± 1,06	17,27 ± 0,87	16,22 ± 1,03	5,41 ± 0,26
MOUKY				
pšeničná celozrnná	30,14 ± 1,21	38,55 ± 3,66	42,09 ± 2,27	74,26 ± 2,25
špaldová celozrnná	51,01 ± 2,18	34,64 ± 3,01	75,34 ± 4,33	90,62 ± 3,87
žitná celozrnná	42,90 ± 3,32	11,30 ± 0,26	65,50 ± 3,94	74,08 ± 3,46
z červené pšenice	35,36 ± 3,01	41,45 ± 2,87	65,86 ± 3,55	77,30 ± 3,52
pohanková hladká	12,17 ± 1,02	24,71 ± 1,99	52,46 ± 2,89	74,80 ± 2,59
pšeničná hladká	18,97 ± 1,62	28,70 ± 2,46	14,20 ± 1,01	42,27 ± 2,07
pšeničná hrubá	23,33 ± 1,82	40,72 ± 3,01	12,88 ± 0,85	31,05 ± 1,64
OTRUBY				
pšeničné term.	34,86 ± 2,21	11,62 ± 0,81	84,61 ± 4,88	84,91 ± 4,75
ovesné	43,99 ± 2,86	56,16 ± 3,54	77,97 ± 4,28	77,36 ± 5,51
žitné	72,60 ± 3,55	31,05 ± 1,34	31,79 ± 2,64	63,98 ± 3,64
kukuřičné	32,72 ± 1,82	50,15 ± 2,09	88,13 ± 5,56	84,00 ± 5,63
amarantové	42,81 ± 2,86	22,32 ± 1,12	84,91 ± 4,99	87,63 ± 5,16
KLÍČKY				
pšeničné	29,57 ± 2,05	72,45 ± 4,81	47,62 ± 2,58	91,21 ± 5,69
špaldové	27,32 ± 1,47	14,69 ± 0,24	26,13 ± 2,11	34,44 ± 2,02
žitné	21,46 ± 1,03	44,29 ± 1,39	30,52 ± 2,95	82,42 ± 5,94
kukuřičné	11,73 ± 1,01	22,51 ± 1,46	37,77 ± 3,51	68,41 ± 4,21

Antimutagenní aktivita byla detekována u všech vzorků, u žádného však nebyla prokázána výrazně vyšší aktivita v porovnání s ostatními vzorky, s výjimkou preparátů klíčků o vyšší koncentraci. Příčin může být několik, například komplexnost testovaného materiálu. Vysoký obsah některých aktivních látek mohl být pro testovací kmen kvasinky spíše negativní faktor, což je také možno vidět z tabulky, kdy použití vyšší koncentrace roztoku způsobilo pokles aktivity (u trp-konverze v 57 % a u ile-reverze v 35 % případů). Nežádoucí vliv také mohla

mít osmolarita některých vzorků po rozpuštění ve vodě, kdy především mouky tvořily velmi viskózní roztoky.

Porovnáním výsledků a podle rozdělení vzorků do skupin byla vyšší aktivita nalezena u vloček pšeničných a špaldových, u mouk v mouce špaldové celozrnné, ve skupině otrub vykazovaly všechny vzorky vyšší aktivitu, a u klíčků to byly především klíčky pšeničné a žitné.

Nízká hodnota antimutagenní aktivity byla zjištěna u obou pohankových produktů, přestože hladina celkových polyfenolů i flavonoidů zde byla nejvyšší a také u nich byl stanoven vysoký obsah individuálních fenolických látek, zejména fenolických kyselin a individuálních flavonoidů rutinu a myricetinu. Právě příliš vysoký obsah fenolických látek zde mohl působit negativně, v komplexu jsou obsaženy látky jak s antimutagenním, tak i s potenciálním genotoxickým efektem a metoda hodnotí komplexní účinek směsi přírodnch látek. Příliš vysoké množství aktivních látek nemusí tedy znamenat vysokou antimutagenní aktivitu.

Tab. 72 Antimutagenní aktivita rýží (%)

	inhibice účinku mutagenu testovaným vzorkem v procentech			
	trp-konverze		ile-reverze	
	0,05 g/ml	0,2 g/ml	0,05 g/ml	0,2 g/ml
Long grain white rice	1,51 ± 0,02	21,69 ± 0,25	29,56 ± 2,61	59,75 ± 1,25
Long grain white rice, VS	43,51 ± 1,20	12,92 ± 0,13	47,32 ± 2,27	54,42 ± 2,04
Menu zlaté parboiled	29,52 ± 0,88	18,67 ± 0,54	62,68 ± 3,02	36,27 ± 0,66
Lagris, rýže Tří barev	63,83 ± 3,12	83,69 ± 2,65	82,03 ± 3,49	94,01 ± 4,06
Lagris, rýže Arborio	70,92 ± 3,05	73,05 ± 3,94	81,57 ± 4,02	83,87 ± 6,00
Lagris, rýže Indiánská	45,74 ± 1,27	70,21 ± 2,49	80,65 ± 3,49	86,64 ± 2,03
Rýže červená Natural	29,08 ± 0,84	52,48 ± 4,06	71,66 ± 4,55	58,99 ± 3,26
Jasmínová	56,63 ± 1,99	71,08 ± 1,95	73,17 ± 4,12	90,36 ± 4,12

V rámci testování antimutagenních vlastností některých rýží byly použity dvě koncentrace vzorku, a to 0,05 g a 0,2 g na 1 ml buněčné suspenze, viz Tab. 72 .

Antimutagenní/genotoxická aktivita byla sledována u vybraných osmi druhů rýže z celkových sedmnácti. Byly vybrány např. barevné rýže, které vykazovaly vysoký obsah aktivních látek a také vysokou antioxidační aktivitu, rýže parboiled nebo rýže lišící se pouze spotřebitelským balením (sypaná a ve varných sáčcích).

Také u rýží byl zaznamenán pokles aktivity při použití vyšší koncentrace vzorku, u trp-konverze u tří vzorků, u ile-reverze u dvou. Nejvyšší antimutagenní aktivita byla zjištěna u vzorků rýže Tří barev a Arborio, obě značky Lagris, a u rýže Jasmínové. Nejnižší aktivita byla stanovena u rýže Long grain white rice v sypané formě. Varianta ve varných sáčcích ve většině stanovení vykazovala vyšší hladinu aktivních látek nebo vyšší antioxidační aktivitu (výjimka β-CLAMS, kap. 6.2.3).

Všechny rýže s vysokou antimutagenní aktivitou vykazovaly rovněž vysokou antioxidační aktivitu a to u všech výše uvedených metod (kap. 6.2.1, 6.2.2, 6.2.3) a dále vysoké hladiny skupinových parametrů i fenolických látek, i když přímá korelace z žádným z uvedených parametrů prokázána nebyla. Biologicky aktivní látky obsažené v analyzovaných vzorcích tak přispívají k antimutagennímu účinku rýže.

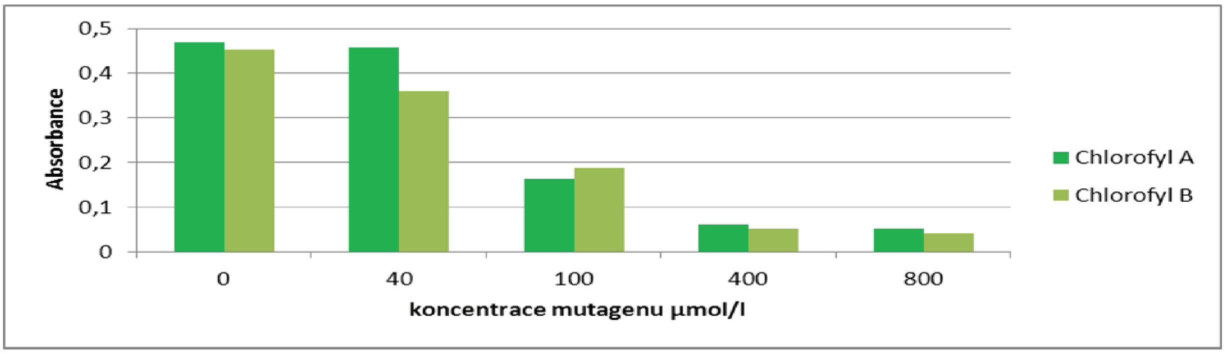
6.3.2 Sledování antimutagenních vlastností na prvoku *Euglena gracilis*

Testovací systém využívající prvoka *Euglena gracilis* byl v předložené práci zaveden a využit k optimalizaci podmínek kultivace, koncentrace mutagenu a koncentrace cereálních extraktů. Byla provedena řada optimalizačních testů, z nichž vyplynuly první poznatky o podmínkách vhodných pro testování cereálií.

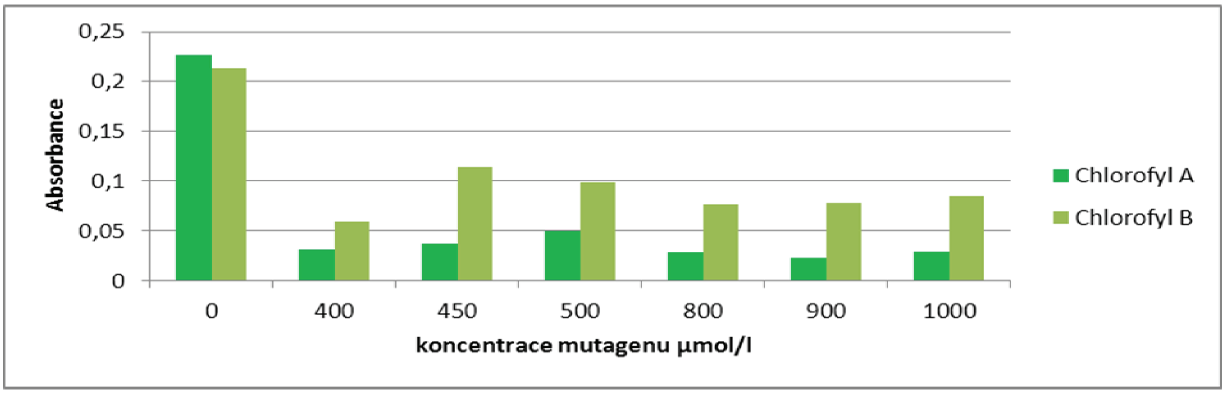
6.3.2.1 Optimalizace koncentrace přidaného mutagenu

V první fázi testů na prvoku bylo třeba stanovit optimální koncentraci mutagenu pro testování antimutagenního účinku cereálií. Kultivace byla provedena dle postupu uvedeného v kap. 4.6.13, třídenní inokulum bylo přeočkováno do Jaworskeho média s půdním výluhem a přídavkem streptomycinu (50 µg/ml). Graf 18 a Graf 19 uvádějí výsledky testů, na jejichž základě byla zvolena pro první testování koncentrace ofloxacinu 400 µmol/l.

Graf 18 Vliv různé koncentrace ofloxacinu na obsah chlorofylu a v testu s E.gracilis



Graf 19 Vliv různé koncentrace ofloxacinu na obsah chlorofylu b v testu s E.gracilis



6.3.2.2 Testování antimutagenity na cereáliích

V další fázi experimentů byly provedeny pilotní testy s vybranými vzorky cereálií. Byly připraveny extrakty mouky žitné a pohankové a otrub amarantových (2 g cereálie do 10 ml vody). Kultivace byla provedena dle postupu uvedeného v kap. 4.6.13, třídenní inokulum bylo přeočkováno do Jaworskeho média s půdním výluhem a přídavkem streptomycinu (50 µg/ml). V následující Tab. 73 jsou uvedeny průměrné výsledky dvou testů s použitím koncentrace mutagenu (ofloxacin) 400 µmol/l a 0,5 ml extraktu a 0,1 ml extraktu cereálie.

Tab. 73 Změny procentuálního obsahu chlorofylů v testu s E.gracilis (%)

	A 663 nm	A 645 nm
chlorofyl A		
bez mutagenu	100,00	100,00
ofloxacin (400 µmol/l)	54,59	56,92
mouka žitná (0,5 ml)	78,10	82,38
mouka pohanková (0,5 ml)	93,12	94,00
otruby amarantové (0,5 ml)	86,51	89,52
chlorofyl B		
bez mutagenu	100,00	100,00
ofloxacin (400 µmol/l)	2,72	3,36
mouka žitná (0,1 ml)	11,01	12,45
mouka pohanková (0,1 ml)	9,46	11,44
otruby amarantové (0,1 ml)	11,92	13,32

Z výsledků testů na kvasinkách *S.cerevisiae* D7 a na prvoku *E.gracilis* vyplývá, že i když nelze hodnoty antimutagenní aktivity srovnávat přímo, jsou účinky testovaných cereálií v obou systémech podobné a tedy oba testovací systémy po příslušné optimalizaci mohou být využity jako *in vitro* testovací modely antimutagenní aktivity komplexních přírodních látek.

6.3.3 Studium antimutagenních vlastností s využitím bakterie *Escherichia coli*

Ke sledování antimutagenních/genotoxických vlastností byly použity dva mutantní bakteriální kmeny, a to *E.coli* WP2 *trp* a *E.coli* WP2 *trp uvrA*, které ve formě lyofilizovaných bločků byly součástí balení celé testovací soupravy. Testování bylo provedeno podle návodu viz kap. 4.6.14. Jako testovaný materiál byly použity pšeničné klíčky, které byly připraveny podle kap. 4.5.6.

Antimutagenní účinek zde byl hodnocen jako schopnost antimutagenu (cereálního vzorku) zabránit růstu mutantních kolonií na médiu s limitním obsahem aminokyseliny tryptofanu. Inhibice byla vyjádřena jako procenta úbytku kolonií rostoucích v přítomnosti mutagenu i antimutagenu s počtem kolonií rostoucích pod vlivem standardního mutagenu.

Vyhodnocením prvotních výsledků je možno říci, že také v tomto systému byla pozorována inhibice antimutagenního účinku při zvýšení koncentrace použitého vzorku.

Použitý kmen *E.coli* WP2 *trp uvrA* má kromě poškozeného tryptofanového operonu také porušen gen pro opravu kódování [152]. To by se mělo projevit zvýšenou citlivostí na účinky mutagenu, což bylo také potvrzeno.

Sledování antimutagenních účinků za použití tohoto testovacího systému bude optimalizováno v navazujících pracích.

6.4 Možnosti využití cereálií v potravinářství a krmivářství

6.4.1 Charakterizace ochucených cereálních výrobků

V předchozích kapitolách byly charakterizovány přírodní cereálie a jejich složky nebo cereální produky. V následující podkapitole jsou charakterizovány některé ochucené výrobky používané v populaci jako snídaňové cereálie nebo cereálie pro dětskou výživu. Cílem bylo charakterizovat obsah aktivních složek a potenciální účinky těchto typů cereálních výrobků na lidské zdraví.

6.4.1.1 Stanovení fenolických látek

Obsah celkových polyfenolů ve vzorcích extrudovaných cereálií byl změřen podle postupu uvedeného v kap. 4.6.1., obsah celkových flavonoidů podle kap. 4.6.2, katechinů a fenolických kyselin podle kap. 4.6.5 a individuálních flavonoidů podle kap. 4.6.6. Veškerá měření byla provedena třikrát, ze získaných dat byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Kalibrační rovnice je uvedena v Tab. 16 .

Tab. 74 Obsah celkových polyfenolů a celkových flavonoidů v různých druzích ochucených cereálií (mg/100 g)

	obsah celkových polyfenolů	obsah celkových flavonoidů	podíl celkových flavonoidů v celkových polyfenolech (%)
CigiCagi se skořicí	40,70 ± 1,54	10,79 ± 0,49	7,15
Cookie Crisp s čokoládou	76,95 ± 0,33	15,65 ± 0,58	10,37
Čoky s kakaem	100,87 ± 1,57	45,59 ± 0,47	19,53
Honey Cheerios	46,83 ± 1,41	3,24 ± 0,54	17,18
Ferda čokoládový	59,52 ± 2,51	4,99 ± 0,27	20,34
Strawberry Minis	43,71 ± 2,41	25,94 ± 1,81	3,30
Chocapic s kakaem	38,96 ± 1,98	29,48 ± 1,04	30,20
Teddy s medem	56,82 ± 0,08	30,72 ± 1,62	4,30
Cini Minis se skořicí	46,17 ± 1,09	6,49 ± 0,42	2,15
Čokoflek s čokoládou	73,22 ± 1,80	62,85 ± 1,07	41,63

V ochucených cereáliích se obsah celkových polyfenolů pohyboval v rozmezí 38,96 až 100,87 mg/100 g (viz Tab. 74). S výjimkou výrobku Chocapic s kakaem měly produkty s přídavkem čokolády nebo kakaa vyšší obsah celkových polyfenolů než ostatní vzorky. V porovnání se surovými cereálními výrobky se hodnoty pohybují ve střední části rozmezí hodnot.

Množství celkových flavonoidů se pohybovalo od 3,24 do 62,85 mg/100 g. Nejvíce celkových flavonoidů obsahoval výrobek Čoky s kakaem.

Srovnáním se surovými cereáliemi bylo zjištěno, že ochucené cereálie mají poměrně vysoký obsah celkových flavonoidů, podle rozdělení do skupin je lze zařadit v obsahu hned za klíčky, kde byl obsah flavonoidů ještě vyšší. Na vysokých hodnotách se patrně podílí také přídavná látka (kakao, čokoláda, ovoce, med, aj.).

Procentuální zastoupení flavonoidů v polyfenolech se pohybovalo v rozmezí 2,15 - 30,20 %. Nejmenší čast tvořily flavonoidy v Cini Minis a také Strawberry Minis (3,30 %). Nejvíce se flavonoidy na obsahu polyfenolů podílely ve výrobku Chocapis s kakaem.

Tab. 75 Obsah katechinů v ochucených cereáliích (mg/100 g výrobku)

	katechin	katechin gallát	epikatechin	epikatechin gallát
CigiCagi se skořicí	53,69 ± 0,31	25,96 ± 0,48	45,08 ± 0,32	1,03 ± 0,09
Cookie Crisp s čokoládou	103,68 ± 1,50	487,65 ± 4,45	81,70 ± 0,64	nd
Čoky s kakaem	63,52 ± 0,57	869,89 ± 8,12	152,35 ± 0,44	3,80 ± 0,07

Honey Cheerios	104,99 ± 1,12	nd	115,22 ± 1,00	5,21 ± 0,02
Ferda čokoládový	65,80 ± 0,86	1 080,97 ± 14,15	164,34 ± 0,66	5,35 ± 0,07
Strawberry Minis	69,02 ± 0,54	62,05 ± 0,20	198,05 ± 0,71	2,98 ± 0,01
Chocapic s kakaem	101,55 ± 0,83	1 328,03 ± 2,49	294,30 ± 0,09	7,86 ± 0,42
Teddy s medem	205,80 ± 2,68	nd	372,03 ± 0,42	nd
Cini Minis se skořicí	214,22 ± 2,29	11,24 ± 0,02	100,46 ± 0,89	2,51 ± 0,02
Čokoflek s čokoládou	74,29 ± 0,61	190,87 ± 2,81	21,15 ± 0,06	1,28 ± 0,00

Výrobky Chocapic s kakaem a Ferda čokoládový byly velmi bohatý zdroj katechin gallátu, obsahovaly dokonce více než desetinásobné množství této látky v porovnání s klíčky pšeničnými, které byly nejbohatší zdroj v rámci surových cereálií.

Obsah epikatechinu ve vzorcích je různý a nelze jednoznačně říct, zda-li se některá přídavná složka podílí na obsahu epikatechinu. V porovnání se surovými cereáliemi byl však obsah vysoký, více bylo nalezeno jen v klíčcích. Obsah katechinů v ochucených cereáliích shrnuje Tab. 75 .

Srovnáním obsahu katechinů v ochucených cereálních výrobcích a surových cereáliích bylo zjištěno, že ochucené cereální výrobky jsou rovněž dobrým zdrojem aktivních látek tohoto typu, na dosažené hodnotě se podílí také přídavná látka, např. čokoládové výrobky vykazovaly většinou vyšší hladiny katechinů než ostatní produkty.

Tab. 76 Obsah fenolických kyselin v ochucených cereáliích (mg/100 g výrobku)

	kyselina ferulová	kyselina chlorogenová	kyselina gallová
CigiCagi se skořicí	0,17 ± 0,05	0,68 ± 0,09	3,93 ± 0,03
Cookie Crisp s čokoládou	1,17 ± 0,00	12,20 ± 0,13	2,91 ± 0,06
Čoky s kakaem	1,19 ± 0,08	12,17 ± 0,45	3,83 ± 0,28
Honey Cheerios	1,29 ± 0,03	2,86 ± 0,12	11,49 ± 0,27
Ferda čokoládový	1,98 ± 0,02	14,82 ± 0,36	4,57 ± 0,02
Strawberry Minis	0,34 ± 0,03	0,94 ± 0,00	4,87 ± 0,07
Chocapic s kakaem	1,93 ± 0,06	19,87 ± 0,09	7,19 ± 0,11
Teddy s medem	0,89 ± 0,01	2,24 ± 0,24	102,28 ± 4,33
Cini Minis se skořicí	0,31 ± 0,01	1,04 ± 0,06	14,21 ± 0,53
Čokoflek s čokoládou	0,20 ± 0,02	2,82 ± 0,09	2,03 ± 0,08

Srovnáním obsahu fenolických kyselin v ochucených (Tab. 76) a surových cereálních (Tab. 28) vzorcích je možno říct, že ochucené cereálie jsou mnohdy bohatším zdrojem těchto látek. Na vyšším obsahu se podílí přídavná látka, např. u kyseliny ferulové a chlorogenové to byla čokoláda a kakao, u gallové přídavek medu. U surových cereálií jsou bohatým zdrojem fenolických kyselin zejména klíčky, otruby pšeničné a pohankové výrobky, u ostatních vzorků je obsah nízký.

Tab. 77 Obsah individuálních flavonoidů v ochucených cereáliích (μg/100 g výrobku)

	rutin	myricetin	morin	luteolin
CigiCagi se skořicí	26,63 ± 0,27	3,68 ± 0,04	3,08 ± 0,01	1,17 ± 0,16
Cookie Crisp s čokoládou	74,58 ± 0,09	15,56 ± 0,19	7,88 ± 0,07	5,09 ± 0,16

Čoky s kakaem	36,65 ± 0,42	4,88 ± 0,03	4,83 ± 0,03	1,49 ± 0,05
Honey Cheerios	170,35 ± 0,05	8,61 ± 0,08	7,60 ± 0,02	1,85 ± 0,15
Ferda čokoládový	51,78 ± 0,41	4,40 ± 0,03	5,06 ± 0,02	1,21 ± 0,14
Strawberry Minis	74,27 ± 0,84	3,30 ± 0,01	3,82 ± 0,03	1,88 ± 0,13
Chocapic s kakaem	48,17 ± 1,50	7,59 ± 0,04	8,49 ± 0,06	3,14 ± 0,59
Teddy s medem	840,99 ± 6,29	32,85 ± 0,15	43,30 ± 0,39	16,38 ± 0,41
Cini Minis se skořicí	51,21 ± 0,04	8,71 ± 0,08	2,59 ± 0,02	0,91 ± 0,06
Čokoflek s čokoládou	84,74 ± 1,23	9,04 ± 0,06	10,38 ± 0,13	2,54 ± 0,28

Množství flavonoidů uvedených v Tab. 77 bylo nejvyšší ve vzorku Teddy s medem. Obsah rutinu dokonce představoval druhou nejvyšší hodnotu ze všech cereálních výrobků.

Tab. 78 Obsah individuálních flavonoidů v ochucených cereáliích (μg/100 g výrobku)

	kvercetin	naringenin	apigenin	kemferol
CigiCagi se skořicí	2,41 ± 0,01	66,92 ± 6,92	1,17 ± 0,02	0,85 ± 0,17
Cookie Crisp s čokoládou	4,41 ± 0,07	152,86 ± 4,10	3,14 ± 0,03	2,57 ± 0,01
Čoky s kakaem	1,48 ± 0,06	66,04 ± 2,56	0,96 ± 0,03	0,79 ± 0,18
Honey Cheerios	2,24 ± 0,02	68,36 ± 0,84	1,62 ± 0,02	1,55 ± 0,39
Ferda čokoládový	1,80 ± 0,02	66,82 ± 9,24	1,40 ± 0,03	1,26 ± 0,01
Strawberry Minis	1,26 ± 0,06	46,67 ± 2,43	1,04 ± 0,08	1,41 ± 0,01
Chocapic s kakaem	2,86 ± 0,07	105,78 ± 0,70	2,98 ± 0,02	1,54 ± 0,21
Teddy s medem	23,33 ± 0,03	457,48 ± 39,26	14,32 ± 0,68	8,89 ± 0,63
Cini Minis se skořicí	2,68 ± 0,06	69,12 ± 3,48	1,34 ± 0,09	4,85 ± 0,04
Čokoflek s čokoládou	3,35 ± 0,07	163,07 ± 12,14	5,59 ± 0,03	1,38 ± 0,06

Obsah rutinu, luteolinu a kvercetinu v ochucených vzorcích, jak uvádí Tab. 78 byl srovnatelný se surovými cereáliemi, obsah ostatních flavonoidů byl menší. Mezi ochucenými vzorky vynikal obsahem aktivních látek výrobek Teddy s medem, u kterého bylo vždy změřeno několikanásobně vyšší množství dané látky než v ostatních výrobcích. Obecně však vyšší hodnoty vykazovaly výrobky s příchutí čokolády nebo kakaa, naopak skořicové výrobky obsahovaly menší množství aktivních látek.

6.4.1.2 Stanovení látek sacharidové povahy

V ochucených cereáliích byly dále stanoveny sacharidy, skupinové i individuální, a to za účelem posoudit nutriční a energetickou hodnotu výrobků. Kolorimetricky byly stanoveny celkové a redukující sacharidy (kap. 4.6.7 a 4.6.8) a individuální sacharidy metodou HPLC/RI (kap. 4.6.9). Měření byla provedena třikrát, ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

Koncentrace celkových sacharidů (kap. 4.6.7) byla nejprve analyzována pouze ve vzorcích připravených extrakcí ve vodě (kap. 4.5.4). Získané hodnoty však byly nízké a příliš neodpovídaly údajům na spotřebitelském balení. Pro přesnější výsledky byly hodnoty přepočteny na rozpustný podíl každého výrobku (kap. 4.6.11). Výsledky uvádí Tab. 79 .

Tab. 79 Obsah celkových sacharidů v ochucených cereáliích

	bez přepočtu (g/100 g výrobku)	po přepočtu (g/100 g rozp. podílu)	rozpustný podíl (%)
CigiCagi se skořicí	55,63 ± 1,18	93,79 ± 1,98	59,31
Cookie Crisp s čokoládou	60,42 ± 3,92	84,94 ± 5,51	71,14
Čoky s kakaem	51,67 ± 5,17	63,22 ± 6,01	65,10
Honey Cheerios	69,76 ± 1,16	79,62 ± 5,01	53,59
Ferda čokoládový	33,52 ± 1,74	86,15 ± 6,50	67,95
Strawberry Minis	42,67 ± 2,69	58,27 ± 3,03	57,53
Chocapic s kakaem	41,16 ± 3,91	71,35 ± 7,14	72,42
Teddy s medem	58,54 ± 4,41	94,35 ± 3,20	52,56
Cini Minis se skořicí	49,59 ± 1,68	98,45 ± 1,63	70,86
Čokoflek s čokoládou	42,89 ± 4,27	67,85 ± 6,75	63,22

Po přepočtu na rozpustný podíl se obsah celkových sacharidů pohyboval v rozmezí 58,27 - 98,45 g/100 g rozpustného podílu výrobku.

Porovnáním množství celkových sacharidů v ochucených cereáliích s cereáliemi v surovém stavu byl zjištěn výrazně vyšší obsah sacharidů v ochucených cereáliích. Zatímco mezi surovými cereáliemi byl nejvyšší obsah sacharidů stanoven u klíčků žitných 58,50 g/100 g rozpustného podílu (pro ostatní výrobky byl obsah zpravidla mezi 20 - 30 g/100 g rozp. podílu), u ochucených výrobků byla hodnota 58,27 g/100 g rozp. podílu nejnižší a průměrný obsah se pohyboval kolem 80 g sacharidů na 100 g rozpustného podílu.

Redukující sacharidy byly ve vzorcích stanoveny podle postupu uvedeného v kap. 4.6.8. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 80 .

Tab. 80 Obsah redukujících sacharidů v ochucených cereáliích

	bez přepočtu (g/100 g)	po přepočtu (g/100 g rozp. podílu)	podíl redukujících s. v celkových s. (%)
CigiCagi se skořicí	4,10 ± 0,12	6,91 ± 0,20	7,4
Cookie Crisp s čokoládou	0,23 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,4
Čoky s kakaem	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,0
Honey Cheerios	3,83 ± 0,12	7,15 ± 0,22	9,0
Ferda čokoládový	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,1
Strawberry Minis	3,28 ± 0,17	5,71 ± 0,29	9,8
Chocapic s kakaem	1,93 ± 0,02	2,67 ± 0,02	3,7
Teddy s medem	4,9 ± 0,07	9,29 ± 0,14	9,8
Cini Minis se skořicí	3,84 ± 0,12	5,43 ± 0,17	5,5
Čokoflek s čokoládou	3,83 ± 0,09	6,06 ± 0,14	8,9

s. = sacharidy

Obsah redukujících sacharidů se po přepočtu na rozpustný podíl pohyboval v rozmezí 0,03 - 9,29 g/100 g rozpustného podílu. Procentuální zastoupení redukujících sacharidů v celkových sacharidech se pohybovalo v rozmezí 0,01 - 9,8 %. V porovnání s cereáliemi v surovém stavu obsahují ochucené cereálie podobné množství redukujících sacharidů, procentuální zastoupení je však poněkud menší.

Tab. 81 Obsah sacharidů v ochucených cereáliích

	glukóza (g/100 g)	sacharóza (g/100 g)	maltóza (mg/100 g)
CigiCagi se skořicí	6,73 ± 0,02	10,49 ± 0,08	818,73 ± 8,69
Cookie Crisp s čokoládou	0,79 ± 0,01	21,74 ± 0,09	368,45 ± 52,04
Čoky s kakaem	0,34 ± 0,01	13,08 ± 0,05	745,39 ± 6,32
Honey Cheerios	3,48 ± 0,01	19,13 ± 0,01	213,35 ± 4,21
Ferda čokoládový	0,29 ± 0,00	15,41 ± 0,09	1 397,07 ± 0,52
Strawberry Minis	5,99 ± 0,04	14,25 ± 0,03	nd
Chocapic s kakaem	3,04 ± 0,08	16,84 ± 0,05	827,45 ± 39,90
Teddy s medem	10,94 ± 0,05	13,79 ± 0,08	1 723,22 ± 94,01
Cini Minis se skořicí	6,24 ± 0,03	12,34 ± 0,02	1 936,08 ± 66,20
Čokoflek s čokoládou	8,17 ± 0,04	13,06 ± 0,03	687,33 ± 30,14

Metodou kapalinové chromatografie byla ve vzorcích ochucených cereálií identifikována jako zástupce monosacharidů pouze glukóza, z disacharidů to byla sacharóza a maltóza (množství všech tří sacharidů uvádí Tab. 81). Obsah glukózy se pohyboval od 0,29 - 10,94 g/100 g výrobku, což představovalo většinou vyšší množství než v surových cereáliích.

Obsah sacharózy se pohyboval v rozsahu od 10,49 do 21,74 g/100 g a maltózy od 368,45 do 1 936,08 mg/100 g. Velmi vysoký obsah obou sacharidů v porovnání se surovými vzorky byl patrně způsoben doslazováním výrobků řepným cukrem. Na zvýšeném obsahu sacharidů obecně se mohou podílet také přidané látky jako čokoláda, med nebo ovocná složka.

6.4.1.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Antioxidační aktivita byla stanovena podle postupu v kap. 4.6.15. Jako konečná hodnota je uveden průměr ze tří stanovení a vypočítaná směrodatná odchylka. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 82 .

Tab. 82 Antioxidační aktivita ochucených cereálií

	TEAC (mg/100 g)
CigiCagi se skořicí	-
Cookie Crisp s čokoládou	-
Čoky s kakaem	-
Honey Cheerios	96,14 ± 5,86
Ferda čokoládový	4,06 ± 2,05
Strawberry Minis	71,99 ± 1,38
Chocapic s kakaem	50,60 ± 2,94
Teddy s medem	34,11 ± 3,20
Cini Minis se skořicí	102,02 ± 15,83
Čokoflek s čokoládou	74,77 ± 0,88

Ve třech vzorcích nebyla kvůli zákalu znemožňujicím měření antioxidační aktivita stanovena. U ostatních vzorků se pohybovala od 4,06 do 102,02 mg/100 g. Mírou antioxidační aktivity se ochucené cereálie podobají surovým cereáliím. Podle druhu přidané látky nelze odvodit případnou antioxidační aktivitu.

6.4.1.4 Studium antimutagenních/genotoxických vlastností

Antimutagenní aktivita byla testována na kvasinkách *S.cerevisiae* D7 podle kap. 4.6.12. Pro testování cereálních vzorků byly použity dvě koncentrace, přičemž konečná koncentrace v buněčné suspenzi byla 0,02 g vzorku/ml a 0,1 g/ml.

Tab. 83 Antimutagenní aktivita ochucených cereálií

	inhibice účinku mutagenu testovaným vzorkem v procentech			
	trp-konverze		ile-reverze	
	0,02 g/ml	0,1 g/ml	0,02 g/ml	0,1 g/ml
CigiCagi se skořicí	25,90 ± 1,28	46,03 ± 2,48	57,58 ± 3,26	67,46 ± 3,67
Cookie Crisp s čokoládou	32,20 ± 1,74	39,19 ± 2,19	17,51 ± 1,13	33,56 ± 1,19
Čoky s kakaem	30,00 ± 1,02	52,06 ± 3,67	82,53 ± 4,88	85,59 ± 4,64
Honey Cheerios	40,56 ± 3,21	61,30 ± 4,33	51,71 ± 2,67	48,15 ± 3,24
Ferda čokoládový	34,46 ± 2,22	18,43 ± 0,84	88,86 ± 3,99	33,62 ± 1,36
Strawberry Minis	57,89 ± 3,56	52,94 ± 3,27	54,18 ± 4,16	57,48 ± 4,13
Chocapic s kakaem	58,82 ± 2,37	45,67 ± 2,94	66,53 ± 3,05	45,27 ± 1,97
Teddy s medem	59,18 ± 4,01	68,54 ± 4,21	79,91 ± 5,22	75,98 ± 4,77
Cini Minis se skořicí	43,03 ± 2,59	18,27 ± 0,57	46,50 ± 1,68	37,72 ± 2,10
Čokoflek s čokoládou	53,06 ± 2,08	39,57 ± 2,13	71,56 ± 5,50	64,69 ± 2,49

Antimutagenní aktivita byla stanovena pro všechny vzorky ochucených cereálií a získaná data jsou uvedena v Tab. 83 . Žádný ze vzorků nevykazoval výrazně vysokou nebo nízkou antimutagenní aktivitu oproti ostatním. Podle uvedených příchutí nelze jednoznačně potvrdit příspěvek ochucující složky k vyšší antimutagenní aktivitě. Do souvislosti je však možno dát obsah fenolických látek. Výrobek Teddy měl nejvyšší obsah u všech měřených individuálních flavonoidů, epikatechinu a kyseliny gallové. Chocapic měl nejvyšší obsah katechinu a epikatechin gallátu a kyseliny chlorogenové, tyto vzorky rovněž vykazovaly zvýšenou antimutagenní účinnost.

V závislosti na použité koncentraci vzorku došlo u poloviny vzorků s nárůstem koncentrace k poklesu antimutagenní aktivity. To mohlo být způsobeno vyšší viskozitou roztoků nebo již příliš vysokým obsahem aktivních látek, který působil na testovací kvasinkový kmen negativně.

Ochucené cereální výrobky analyzované v této části práce vykazovaly vysoký obsah fenolických látek i vysokou antioxidační a antimutagenní aktivitu. Všechny parametry byly srovnatelné, případně dokonce vyšší než u surových cereálií (z důvodu přídatné složky). Souhrnně lze extrudované cereální výrobky s příchutí i přes vysoký obsah sacharidů označit za zdraví prospěšné.

6.4.1.5 Senzoricko-spotřebitelská analýza vybraných cereálních výrobků

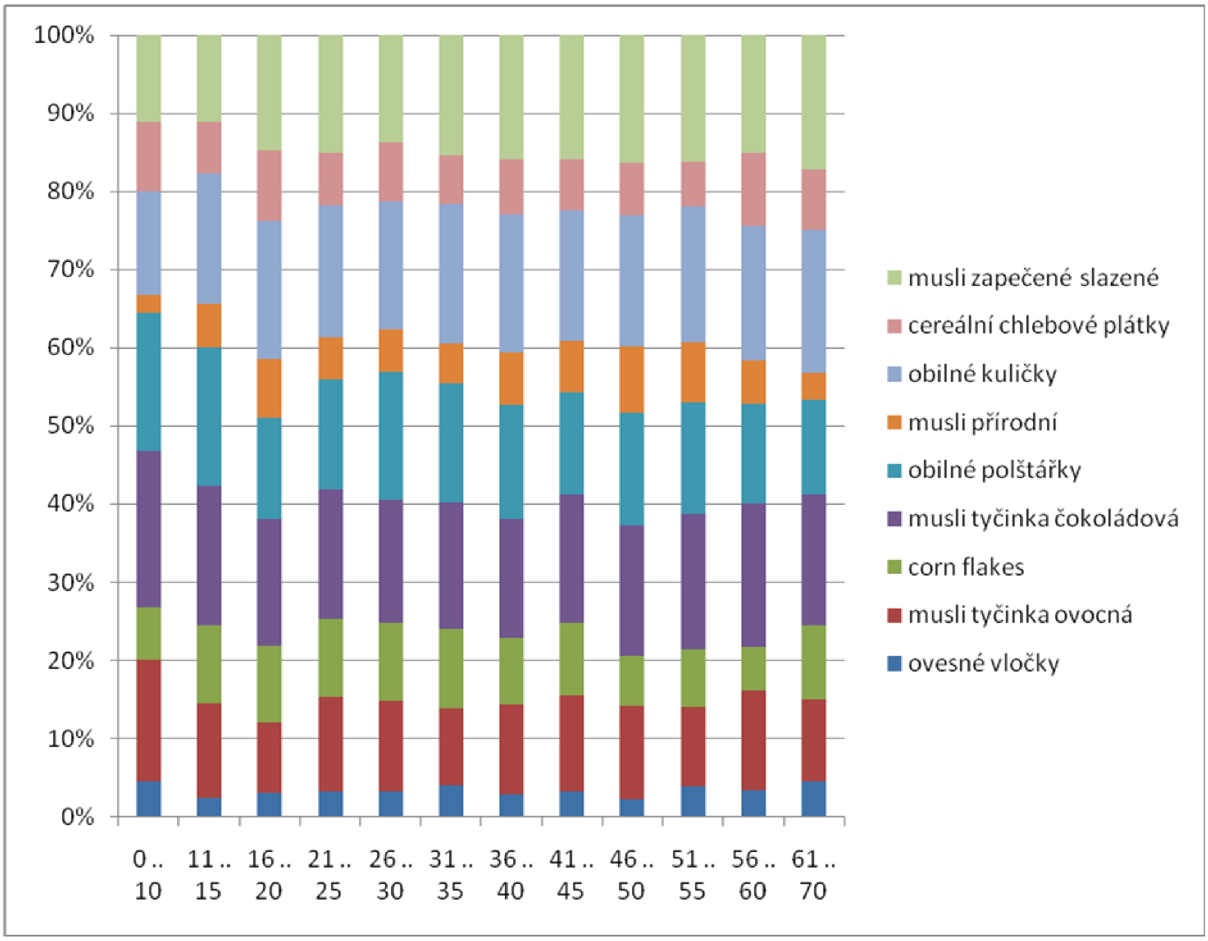
V rámci analýzy ochucených cereálií byla provedena také dotazníková spotřebitelská studie zaměřující se na konzumaci cereálních výrobků částí české populace. Byly sledovány zvyklosti konzumace a také znalosti složení a případných přínosů zařazení cereálních výrobků do jídelníčku. Výstupy studie byly porovnány s experimentálními daty.

Pod pojmem „obilný (cereální) výrobek“ si spotřebitelé obvykle přestavují výrobek z obilí, zrní, zdravou výživu nebo dietní jídlo. Jako „cereální výrobek“ nejčastěji kupují tmavé či

celozrnné pečivo, celozrnné/rýžové chlebíčky, müsli tyčinky, ovesnou kaši a vločky, čokokuličky, skořicové polštářky, obilné lupínky. Výše uvedené výrobky dotazovaní kupují především proto, že jim chutnají, dále protože jsou zdravé, podporují zažívání, dodávají energii nebo pro potřebu redukce hmotnosti. Složení výrobku uvedené na obale zajímá vždy nebo skoro vždy především dotazované ve věku 26 - 55 let, mezi stupněm vzdělání a zájmem o složení výrobku nebyla nalezena spojitost. Rovněž se nepotvrdil předpoklad, že čím více jsou spotřebitelé vzdělaní, tím více budou kritičtí k údajům o složení uvedeným na obale.

Většina věkových skupin konzumuje cereálie především ke snídani, dotazovaní ve věku do 15 let dokonce pouze ke snídani. Cereálie snídají častěji ženy než muži. Bez ohledu na věk, stupeň vzdělání či pohlaví považovali spotřebitelé konzumaci cereálií za prospěšnou nebo spíše prospěšnou a jako nejvíce zastoupenou a také nejvíce zdraví prospěšnou složku považovali vlákninu. Dotazovaní preferují obilné výrobky s příchutí, a to bez ohledu na věk či pohlaví.

Graf 20 Seřazení výrobků podle zdraví prospěšnosti dle názorů respondentů rozdělených do skupin podle věku



V dotazníku bylo uvedeno devět typů cereálních výrobků a respondenti je měli seřadit podle vlastního názoru od nejvíce zdravého po nejméně. Všichni spotřebitelé bez ohledu na věk, vzdělání či pohlaví zvolili jako nejzdravější vločky ovesné a müsli přírodní nedoslazované. Pro ilustraci je uveden Graf 20 uvádějící seřazené cereální výrobky dle názorů respondentů. Jako nejméně zdravé byly hodnoceny výrobky s obsahem čokolády

(obilné čokokuličky a müsli tyčinka čokoládová), což je v rozporu s daty získanými analýzou ochucených cereálií (kap. 6.4.1). Cereální výrobky s různými příchutěmi (čokoláda, ovoce, med aj.) obsahují vysoké množství biologicky aktivních látek a v porovnání se surovými cereáliemi jsou hladiny mnohdy vyšší právě v důsledku přídaných ochucujicích složek.

6.4.2 Využití vybraných hydrolyzovaných cereálních substrátů k produkci obohacené krmné mikrobiální biomasy

V této části práce byla kvasinka *Rhodotorula glutinis* kultivovaná na médiích s použitím alternativního zdroje uhlíku – rýže, těstovin, jablečné vlákniny a otrub pšeničných. Všechny cereální substráty byly hydrolyzovány několika enzymovými preparáty. Jako kontrola byla použita glukóza. Hodnocena byla produkce biomasy a pigmentů na hydrolyzovaných cereáliích.

Schopnost mikroorganizmů utilizovat daný substrát je obvykle sledována analýzou změn obsahu redukujicíh sacharidů, případně individuálních sacharidů uvolněných hydrolýzou. Za tímto účelem bylo množství redukujicích sacharidů stanoveno v připraveném médiu obsahujícím rozpuštěný substrát a poté po sterilaci. Do vychladlého média byly přidány enzymové preparáty a 24 hodin probíhala enzymatická hydrolýza. Po skončení hydrolýzy bylo médium podruhé vysterilováno, sterilně byl odebrán vzorek pro analýzu a do média byl zaočkován příslušný mikroorganizmus. Po 80 hodinách byla kultivace ukončena a opět byl odebrán vzorek pro stanovení sacharidů.

6.4.2.1 Hydrolýza odpadních substrátů vybranými komerčními enzymy

Koncentrace uvolněných redukujicích sacharidů po enzymatické hydrolýze provedené dle kap. 4.5.12 byla stanovena metodou dle Somogyi-Nelsona (kap. 4.6.8). Výsledky jsou uvedeny v Tab. 84 .

Nejvyšší koncentrace redukujicích sacharidů byla detekována v médiu s hydrolyzovanou rýží za katalýzy enzymem AMG. Přídavek tohoto enzymu do média s vaječnými těstovinami vedl rovněž k uvolnění vysokého množství - 27,84 g/l redukujicích sacharidů. Přídavek AMG k jablečné vláknině a otrubám pšeničným nezpůsobil tak výraznou hydrolýzu, což bylo způsobeno zřejmě odlišnou substrátovou specifitou enzymu. V médiích s enzymem Novozym 188 a se substráty obsahujícími těstoviny či rýži bylo též uvolněno značné množství redukujicích sacharidů, avšak působení tohoto enzymového komplexu na ostatní dva substráty bylo minimální. Přídavek preparátů Celluclast a Viscozyme L (obsahují celulázy) do médií s testovanými odpadními substráty nevykázal ve srovnání s AMG a Novozym 188 významnou hydrolytickou aktivitu a tím nedošlo k uvolnění většího množství redukujicích sacharidů.

Tab. 84 Koncentrace redukujicích sacharidů před a po enzymatické hydrolýze v různých odpadních substrátech (g/l média)

	vaječné těstoviny	rýže	jablečná vláknina	otruby pšeničné
před hydrolýzou	0,04 ± 0,00	0,01 ± 0,00	2,63 ± 0,27	0,04 ± 0,00
AMG	27,84 ± 1,28	31,86 ± 1,37	2,48 ± 0,12	4,45 ± 0,06
Celluclast	0,71 ± 0,02	0,04 ± 0,00	nd	0,75 ± 0,02
Novozym	22,78 ± 0,64	28,69 ± 0,99	0,33 ± 0,00	0,01 ± 0,00

Viscozyme L	5,58 ± 0,03	8,14 ± 0,09	0,51 ± 0,01	0,33 ± 0,02
AMG + Viscozyme L	19,79 ± 0,98	28,69 ± 2,01	3,39 ± 0,13	4,34 ± 0,06
Celluclast + Viscozyme L	3,26 ± 0,22	3,61 ± 0,23	0,59 ± 0,01	2,59 ± 0,07
Novozym + Viscozyme L	18,75 ± 0,78	26,8 ± 1,36	2,78 ± 0,14	4,34 ± 0,11

Z Tab. 84 je patrné, že k hydrolýze testovaných odpadů byly použity rovněž kombinované preparáty obsahující dvojici různých enzymů. Z výsledků je zřejmé, že nebylo dosaženo očekávaného vyššího hydrolytického účinku, výsledné hodnoty redukujicích cukrů byly srovnatelné s hodnotami cukrů uvolněných jednotlivými enzymy. Na základě výše uvedených testů byly pro další experimenty zaměřené na produkci obohacené kvasinkové biomasy na hydrolyzovaných odpadních cereáliích vybrány těstoviny a rýže, u nichž bylo díky intenzivní hydrolýze možné očekávat dostatečné růstové a produkční vlastnosti mikroorganizmů.

6.4.2.2 Analýza vybraných mono- a disacharidů v hydrolyzovaných odpadech metodou HPLC/RI

Ve vzorcích produkčních médií odebraných po 24hodinové hydrolýze (kap. 4.5.12) byly metodou HPLC/RI (kap. 4.6.9) stanoveny též individuální sacharidy. Výsledky hydrolýzy těstovin a rýže jsou uvedeny v následujících Tab. 85 a Tab. 86 . Kalibrační rovnice pro výpočet obsahu sacharidů jsou uvedeny v Tab. 56 .

Získané výsledky korespondují s výsledky stanovení redukujicích sacharidů. Nejvyšší množství individuálních sacharidů bylo uvolněno během hydrolýzy těstovin a rýže inkubovaných s enzymy AMG a Novozym 188. Zajímavé je, že kvasinky byly schopny růstu v těchto médiích, i když koncentrace uvolněné glukózy zdaleka nedosahovala hodnoty kontrolního média, tedy 30 g/l.

Tab. 85 Koncentrace a zastoupení jednotlivých sacharidů před a po hydrolýze vaječných těstovin vybranými enzymovými preparáty (g/l média)

	glukóza	maltóza	sacharóza
před hydrolýzou	0,10 ± 0,00	0,13 ± 0,01	1,69 ± 0,21
AMG	18,39 ± 0,56	0,05 ± 0,00	nd
Celluclast	0,62 ± 0,02	1,76 ± 0,02	nd
Novozym 188	13,05 ± 0,76	0,73 ± 0,04	nd
Viscozyme L	12,87 ± 0,54	0,32 ± 0,02	nd
AMG + Viscozyme L	14,18 ± 0,56	nd	nd
CELL + Viscozyme L	1,94 ± 0,11	1,91 ± 0,06	nd
Novozym + Viscozyme L	11,21 ± 0,32	0,72 ± 0,01	nd

Tab. 86 Koncentrace a zastoupení jednotlivých sacharidů před a po hydrolýze rýže vybranými enzymovými preparáty (g/l média)

	glukóza	maltóza
před hydrolýzou	nd	nd
AMG	17,64 ± 0,17	0,18 ± 0,02
Celluclast	0,86 ± 0,05	0,10 ± 0,00

Novozym 188	19,02 ± 0,22	0,20 ± 0,01
Viscozyme L	3,72 ± 0,08	nd
AMG+ Viscozym L	16,54 ± 0,04	0,52 ± 0,02
Celluclast+Viscozyme	1,64 ± 0,02	0,23 ± 0,01
Novozym+Viscozyme	15,38 ± 0,11	nd

Hydrolyzovaná rýže a těstoviny obsahují několikanásobně vyšší koncentrace dostupných jednotlivých sacharidů než jablečná vláknina (kolem 2 g/l) a otruby pšeničné (méně než 1 g/l).

6.4.2.3 Analýza redukujicích sacharidů v médiích s odpadními substráty hydrolyzovanými směsnými plísňovými enzymovými preparáty

Kromě komerčních enzymových preparátů byly používány rovněž izolované směsné enzymové preparáty získané zahuštěním média plísní *Phanerochateae chrysosporium* (PCH) a *Fusarium solani* (FS). V produkčních médiích s obsahem odpadního substrátu byly stanoveny redukujicí cukry metodou Somogyiho-Nelsona (kap. 4.6.8), a to jak ve vzorku před sterilací, po sterilaci a po enzymatické hydrolýze. V Tab. 87 jsou uvedeny výsledky hodnot redukujicích cukrů v těchto vzorcích.

Tab. 87 Analýza obsahu redukujicích sacharidů v médiích s těstovinami po enzymatické hydrolýze (g/l média)

	před sterilací	po sterilaci	hydrolýza enzymy *F.solani*	hydrolýza enzymy *P. chrysosporium*
těstoviny	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,01	4,58 ± 0,10	6,71 ± 0,23

Z výsledků je patrné, že oba plísňové preparáty zásadně zvýšily hodnotu redukujicích sacharidů dostupných pro mikroorganizmy. Samotná sterilace výrazný efekt na rozklad cereálií nevykazovala. Na základě ověření obsahu redukujicích sacharidů v preparátech získaných z plísní bylo potvrzeno, že příspěvek samotných preparátů k hodnotě redukujicích sacharidů je zanedbatelný (cca 0,05 g/ml).

6.4.2.4 Analýza růstových a produkčních vlastností kvasinky R.glutis na hydrolyzovaných odpadních substrátech

K produkci obohacené kvasinkové biomasy, případně metabolitů byla vybrána kvasinka *Rhodotorula glutinis*, což je průmyslová kvasinka používaná k výrobě pigmentů. Druh *R.glutinis* je zřejmě nejrozšírenejším druhem kvasinek rodu *Rhodotorula* v přírodě. Vyznačuje se schopností růstu i v prostředí relativně chudém na živiny. Je schopna utilizovat hexózy i pentózy, cukerné alkoholy a další jednoduché substráty, jakož i řadu odpadních látek ze zemědělsko-potravinářského komplexu včetně cereálních substrátů. Kvasinka byla schopna růst a metabolizovat na obou typech testovaných odpadů – rýži i těstovinách, a to jak na substrátu neupraveném, tak na substrátu hydrolyzovaném komerčními enzymy nebo směsnými přírodním izoláty z plísní.

Analýza metabolitů probíhala podle kap. 4.6.21.4. Všechny vzorky byly analyzovány třikrát, ze získaných dat byl spočítán průměr a směrodatná odchylka.

Tab. 88 Kalibrační rovnice pro výpočet obsahu metabolitů v médiích

standard	kalibrační rovnice	koeficient determinace
β-karoten	y (mV·s) = 17,480 x (mg/ml)	R^2 = 0,976
ergosterol	y (mV·s) = 76,993 x (mg/ml)	R^2 = 0,987
koenzym Q	y (mV·s) = 33,313 x (mg/ml)	R^2 = 0,993

Z poměru hodnoty β-karotenu a celkových karotenoidů je patrné, že u kvasinky *R.glutinis* jsou produkovány i jiné typy pigmentů – zejména oxidované deriváty torulenu a torularhodinu.

V médiu s obsahem těstovin byla produkována biomasa do výše cca 75 % biomasy získané v kontrolní kultivaci na glukóze. Nejvyšší růst byl pozorován na médiu s těstovinami upravenými enzymovým komplexem plísně *P.chrysosporium*. Produkce pigmentů byla významně nižší na médiu hydrolyzovaném průmyslovými enzymy ve srovnání s těstovinami hydrolyzovanými směsnými preparáty z plísní i s nehydrolyzovanými těstovinami. Výsledky uvedené v Tab. 89 potvrzují, že upravené těstoviny (odpad z potravinářské výroby) mohou být s výhodou využity k produkci obohacené kvasinkové biomasy.

Tab. 89 Produkční vlastnosti R.glutinis v médiu obsahujícím upravené těstoviny (μg/g sušiny)

	sušina (g/l)	β-karoten	celkové karotenoidy	ergosterol	koenzym Q
A kontrola glukóza	8,11 ± 0,25	172,54 ± 2,64	326,80 ± 4,64	613,33 ± 6,19	44,47 ± 0,95
A těstoviny nehydrolyzované	6,09 ± 0,04	103,55 ± 3,25	228,88 ± 2,26	209,86 ± 2,95	21,24 ± 0,39
B kontrola glukóza	5,59 ± 0,08	105,66 ± 2,09	544,51 ± 4,86	350,06 ± 4,68	47,61 ± 0,52
B těstoviny + AMG	3,11 ± 0,06	16,58 ± 0,38	70,53 ± 1,23	359,40 ± 4,25	2,69 ± 0,19
B těstoviny + Novozym	4,15 ± 0,07	12,03 ± 0,41	41,80 ± 1,20	548,46 ± 3,88	5,92 ± 0,08
C kontrola glukóza	8,19 ± 0,09	147,32 ± 3,26	311,55 ± 2,95	602,57 ± 5,91	45,63 ± 0,44
C hydrolyzované těstoviny FS	7,07 ± 0,11	149,30 ± 3,08	305,02 ± 1,78	313,74 ± 2,11	13,56 ± 0,37
C hydrolyzované těstoviny PCH	6,11 ± 0,46	117,61 ± 1,55	381,261 ± 3,95	237,03 ± 4,10	25,57 ± 0,46

Tab. 90 Produkční vlastnosti R.glutinis v médiu obsahujícím upravenou rýži (μg/g sušiny)

	sušina (g/l)	β-karoten	celkové karotenoidy	ergosterol	koenzym Q
A kontrola glukóza	8,11 ± 0,25	172,54 ± 2,64	326,80 ± 4,64	613,33 ± 6,19	44,47 ± 0,95
A rýže nehydrolyzovaná	6,65 ± 0,21	133,50 ± 1,69	289,88 ± 3,11	418,16 ± 4,67	30,11 ± 0,56

B kontrola glukóza	10,05 ± 0,16	108,99 ± 1,55	349,48 ± 5,64	215,09 ± 3,79	43,80 ± 0,50
B hydrolyzovaná rýže AMG	7,49 ± 0,11	31,30 ± 0,59	125,96 ± 2,67	113,91 ± 2,00	11,18 ± 0,06
B hydrolyzovaná rýže Novozym	8,83 ± 0,09	58,94 ± 0,87	179,56 ± 4,79	275,97 ± 3,16	24,90 ± 0,99
C kontrola glukóza	8,87 ± 0,12	247,32 ± 3,56	381,55 ± 5,13	582,57 ± 5,46	39,63 ± 0,85
C hydrolyzovaná rýže FS	8,07 ± 0,08	220,30 ± 2,95	340,01 ± 3,65	443,74 ± 4,39	33,56 ± 0,74
C hydrolyzovaná rýže PCH	7,51 ± 0,06	198,20 ± 2,44	399,21 ± 2,33	543,03 ± 5,64	35,57 ± 0,81

Přestože nejvyšší produkce biomasy byla opět získána na kontrolním glukózovém médiu (10,05 g/l), i rýžové substráty se ukázaly být vhodnými pro kultivaci *R.glutinis* a produkci metabolitů. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 90 Opět bylo nízké množství produkováno na substrátu upraveném průmyslovými enzymy, ale u rýžových odpadů hydrolyzovaných plísňovým preparátem z *P.chrysosporium* bylo dosaženo vyšší produkce biomasy než v případě těstovinového média (Tab. 89). Produkce pigmentů byla zde rovněž poměrně vysoká, i rýže je tedy vhodným substrátem pro produkci obohacené kvasinkové biomasy *R.glutinis* využitelné v krmivářství.

6.4.3 Možnosti fortifikace cereálií pro dětskou výživu

V této části práce byly připraveny modelové cereální výrobky pro dětskou výživu s přídavkem lyofilizované ovocné/zeleninové složky. Jako přídatná složka byly vybrány tři typy lokálního ovoce a zeleniny - jablka, směs lesního ovoce (jahody, borůvky, maliny v poměru 1:1:1) a mrkev.

V připravených směsích byly sledovány možné interakce mezi cereální a přídatnou látkou, a to z hlediska biologické využitelnosti modelových směsí lidským organizmem a jejich dostupnosti v simulovaném fyziologickém prostředí žaludeční šťávy. Vzorky proto byly připravovány několika způsoby, extrakcí do vody (kap. 4.5.1), inkubací cereálií v připraveném fyziologickém prostředí žaludeční šťávy (kap. 4.5.13) a kyselou hydrolýzou (kap. 4.5.11).

Kvůli zachování požadovaných vlastností, tedy vysokého obsahu vitaminů a nutričně významných látek byla použitá zelenina a ovoce lyofilizováno. U lyofilizovaného materiálu rovněž nedochází k degradaci aromatických a jiných jakostně důležitých látek [153].

Samotné přípravě cereálních kaší s ovocnou/zeleninovou složkou předcházela příprava kaší s různým obsahem přidávané složky za účelem najít mezi potenciálními spotřebiteli optimální senzoricky přijatelný poměr cereálie - přídatná látka. Přídatné látky byly k cereálnímu základu přidávány tak, aby jejich hmotnostní podíl představoval 5, 10 a 20 %. Konečná úprava spočívala v zalití kaše horkou vodou nebo polotučným mlékem. Množství tekutiny se odvíjelo od použité cereálie, zpravidla na 50 g suché směsi bylo použito 150 ml vody/mléka.

Jako nejpřijatelnější zvolili hodnotitelé (soubor 30 laických hodnotitelů, 18 žen a 12 mužů, průměrný věk 28 +/- 8,2) kaše s 10% podílem přídatné složky, především pak pro výraznou

vůni a chuť se směsí lesního ovoce. Zároveň by však kvůli zvýšené kyselosti ovoce bylo potřeba produkty přislazovat nebo lesní plody kombinovat s jinými druhy ovoce, které by zmírnilo kyselou chuť výsledné směsi. Jako cereální základ byly nejlépe hodnoceny směsi z mouky ječné a otrub amarantových. Jako zálivka bylo lépe hodnoceno polotučné mléko.

6.4.3.1 Stanovení vybraných aktivních látek fenolické povahy

Stanovení celkových polyfenolů proběhlo podle návodu viz kap. 4.6.1., celkových flavonoidů kap. 4.6.2, anthokyanů kap. 4.6.4 a individuálních flavonoidů kap. 4.6.6.

Konečná hodnota pro každé měření byla získána z průměru tří získaných hodnot, spočítána byla rovněž směrodatná odchylka.

Tab. 91 Stanovení celkových polyfenolů pro jednotlivé složky a připravené směsi (mg/100 g)

	obsah v jednotlivých složkách	směs s 10% podílem lesní směsi	směs s 10% podílem jablek	směs s 10% podílem mrkve
klíčky kukuřičné	58,98 ± 0,49	201,78 ± 4,72	107,19 ± 5,11	72,99 ± 4,00
otruby amarantové	84,88 ± 1,07	145,81 ± 1,75	93,37 ± 2,72	95,67 ± 3,28
mouka pohanková celozrnná	455,99 ± 4,02	345,93 ± 1,65	199,58 ± 3,27	264,59 ± 1,66
mouka pšeničná celozrnná	63,31 ± 1,41	139,23 ± 3,92	89,90 ± 2,56	83,82 ± 1,11
mouka žitná celozrnná	70,76 ± 0,07	200,58 ± 1,53	80,32 ± 3,42	95,24 ± 2,36
mouka ječná celozrnná	62,01 ± 4,93	211,13 ± 4,13	77,35 ± 2,78	67,84 ± 3,06
lyofilizovaná lesní směs	1 531,56 ± 7,69	-	-	-
lyofilizovaná jablka	130,15 ± 2,55	-	-	-
lyofilizovaná mrkev	223,13 ± 4,49	-	-	-

Obsah celkových polyfenolů v analyzovaných cereálních vzorcích se pohyboval od 62,01 do 455,99 mg/100 g výrobku. Po přídavku lyofilizovaného ovoce/zeleniny, který tvořil 10 hm. % podílu modelových výrobků, se obsah polyfenolických látek v některých cereáliích zvýšil až dvojnásobně oproti původnímu obsahu (viz Tab. 91). Z připravených směsí měla nejvyšší obsah celkových polyfenolů mouka pohanková celozrnná s lesním ovocem (345,93 mg/100 g).

Velmi vysoký obsah polyfenolů byl stanoven v samotné mouce pohankové (455,99 mg/100 g). Po přidání lyofilizované složky však došlo k poklesu obsahu těchto látek. To mohlo být způsobeno oxidačními změnami a degradací fenolických antioxidantů, ať už v průběhu skladování výrobků nebo možnými interakcemi vázaných polyfenolických látek se složkami cereální matrice [140].

Nejvyšší obsah polyfenolů byl zaznamenán ve směsích s lyofilizovaným lesním ovocem.

Tab. 92 Obsah celkových polyfenolů ve vzorcích a připravených směsích po hydrolýze v simulovaném žaludečním prostředí (mg/100 g)

	obsah v jednotlivých složkách	směs s 10% podílem lesní směsi	směs s 10% podílem jablek	směs s 10% podílem mrkve
klíčky kukuřičné	356,28 ± 4,19	303,53 ± 4,80	221,45 ± 5,83	282,34 ± 3,87
otruby amarantové	223,94 ± 3,29	306,80 ± 8,94	299,93 ± 8,59	256,73 ±5,35
mouka pohanková celozrnná	876,19 ± 5,77	532,63 ± 6,00	302,34 ± 2,40	266,33 ± 3,79
mouka pšeničná celozrnná	225,81 ± 2,99	394,85 ± 1,28	310,64 ± 2,19	225,34 ± 6,68
mouka žitná celozrnná	326,48 ± 3,74	302,25 ± 2,33	145,66 ± 8,34	219,40 ± 5,30
mouka ječná celozrnná	210,55 ± 2,03	244,80 ± 8,79	150,70 ± 8,48	205,49 ± 5,02
lyofilizovaná lesní směs	3149,46 ± 13,73	-	-	-
lyofilizovaná jablka	856,54 ± 4,66	-	-	-
lyofilizovaná mrkev	1090,38 ± 5,98	-	-	-

Po hydrolýze v simulovaném žaludečním prostředí se obsah celkových polyfenolů v porovnání s extrakcí do vody několikanásobně zvýšil jak v samotných cereáliích, tak také lyofilizovaných vzorcích a připravených směsích. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 92 .

V cereáliích po hydrolýze se obsah polyfenolů pohyboval od 210,55 do 876,19 mg/100 g. Po přidání lyofilizované složky došlo u přibližně poloviny vzorků k nárůstu obsahu celkových polyfenolů.

Nejvíce polyfenolů obsahovaly směsi s přídavkem lyofilizovaných lesních plodů, vůbec nejbohatší směs byla s moukou pohankovou. S přídavkem lyofilizovaných jablek měla nejvyšší obsah polyfenolů směs s moukou pšeničnou, a s přídavkem mrkve směs s klíčky kukuřičnými.

Měřením bylo prokázáno, že lyofilizované ovoce je významným zdrojem látek polyfenolického charakteru, což zvyšovalo nutriční hodnotu připravených směsí a rovněž pozdější biologickou využitelnost lidským organizmem.

Tab. 93 Obsah celkových flavonoidů ve vzorcích a připravených směsích (mg/100 g)

	obsah v jednotlivých složkách	směs s 10% podílem lesní směsi	směs s 10% podílem jablek	směs s 10% podílem mrkve
klíčky kukuřičné	10,91 ± 0,15	35,36 ± 0,75	18,93 ± 0,71	14,11 ± 1,23
otruby amarantové	4,79 ± 0,24	34,65 ± 0,79	13,70 ± 0,96	15,95 ± 0,64
mouka pohanková	81,88 ± 5,17	97,27 ± 1,54	68,40 ± 1,05	73,58 ± 2,77

celozrnná				
mouka pšeničná celozrnná	3,89 ± 1,27	31,15 ± 0,56	10,35 ± 0,97	8,80 ± 0,22
mouka žitná celozrnná	7,05 ± 0,33	25,64 ± 0,32	22,75 ± 0,86	13,80 ± 0,25
mouka ječná celozrnná	11,51 ± 0,38	30,88 ± 1,50	18,16 ± 0,41	13,95 ± 0,32
lyofilizovaná lesní směs	347,47 ± 6,08	-	-	-
lyofilizovaná jablka	41,76 ± 0,98	-	-	-
lyofilizovaná mrkev	85,87 ± 5,81	-	-	-

Nejvyšší obsah celkových flavonoidů, shrnuto v Tab. 93 , byl jak v samotné mouce pohankové (81,88 mg/100 g), tak i ve všech směsích připravených s touto cereální složkou, nejvíce s přídavkem lesní směsi (97,27 mg/100 g). U směsi s lyofilizovanými jablky i mrkví došlo (stejně jako u celkových polyfenolů) k poklesu obsahu flavonoidů z hlediska samotného ovoce/zeleniny. To mohlo být způsobeno rozložením obsahu flavonoidů do většího množství směsné matrice. Tuto skutečnost potvrzuje fakt, že u všech směsí s obsahem lyofilizovaného lesního ovoce došlo k mnohonásobnému navýšení obsahu celkových flavonoidů oproti množství v samotném cereálním vzorku. Dalším důvodem výrazného poklesu obsahu flavonoidů mohou být interakce vysokého množství volných flavonoidů pohanky se složkami lyofilizovaného ovoce, které obsahuje velké množství vlákniny, na kterou jsou, podle literatury, flavonoidy velmi často vázány [140].

Porovnáním obsahu celkových flavonoidů v celkových polyfenolech byl největší podíl zjištěn u všech pohankových směsí a z přídatných složek u lyofilizované mrkve (38,48 %).

Tab. 94 Obsah celkových flavonoidů ve vzorcích po inkubaci v žaludeční šťávě (mg/100 g)

	obsah v jednotlivých složkách	směs s 10% podílem lesní směsi	směs s 10% podílem jablek	směs s 10% podílem mrkve
klíčky kukuřičné	30,56 ± 1,13	47,35 ± 0,55	31,49 ± 0,15	17,79 ± 0,54
otruby amarantové	8,49 ± 2,28	67,18 ± 1,81	20,74 ± 1,49	18,96 ± 0,51
mouka pohanková celozrnná	83,21 ± 3,22	91,78 ± 0,98	43,43 ± 2,27	57,02 ± 0,85
mouka pšeničná celozrnná	20,82 ± 1,16	44,79 ± 0,57	34,02 ± 0,61	17,81 ± 1,78
mouka žitná celozrnná	35,91 ± 2,72	50,57 ± 2,37	42,01 ± 2,64	32,52 ± 1,67
mouka ječná celozrnná	38,46 ± 1,99	53,73 ± 1,71	47,80 ± 2,29	28,15 ± 0,49
lyofilizovaná	529,51 ± 4,12	-	-	-

lesní směs				
lyofilizovaná jablka	286,55 ± 3,19	-	-	-
lyofilizovaná mrkev	318,92 ± 3,84	-	-	-

Množství celkových flavonoidů po inkubaci v žaludeční šťávě (uvedeno v Tab. 94) se v porovnání se vzorky extrahovanými pouze do vody zvýšilo několikrát.

Po přídavku lyofilizovaných směsí k cereálnímu základu došlo u většiny směsí k nárůstu obsahu celkových flavonoidů, nejvýrazněji u směsí s otrubami amarantovými. Z hlediska druhu lyofilizované složky došlo k nárůstu flavonoidů především po přídavku lesního ovoce. Z hlediska použité obiloviny byly nejbohatší takové kaše, pro jejichž přípravu byla použita mouka pohanková.

Tab. 95 Kalibrační závislost pro výpočet obsahu anthokyanů

standard	kalibrační rovnice	koeficient determinace
kyaninhydrochlorid	$A = 60{,}337 \cdot c$ (µg/ml)	$R^2 = 0{,}998$

Tab. 96 Obsah anthokyanů ve vzorcích (mg/100 g)

	obsah v jednotlivých složkách	směs s 10% podílem lesní směsi	směs s 10% podílem jablek	směs s 10% podílem mrkve
klíčky kukuřičné	0,37 ± 0,04	51,76 ± 0,40	1,25 ± 0,25	2,59 ± 0,21
otruby amarantové	1,30 ± 0,13	45,78 ± 0,77	2,54 ± 0,33	2,93 ± 0,23
mouka pohanková celozrnná	1,80 ± 0,08	53,40 ± 0,46	5,68 ± 0,04	5,60 ± 0,05
mouka pšeničná celozrnná	0,45 ± 0,07	40,74 ± 0,47	1,85 ± 0,07	1,61 ± 0,09
mouka žitná celozrnná	0,99 ± 0,14	41,26 ± 0,35	2,39 ± 0,11	2,04 ± 0,33
mouka ječná celozrnná	0,55 ± 0,02	29,07 ± 0,35	2,13 ± 0,04	1,21 ± 0,31
lyofilizovaná lesní směs	1 144,48 ± 45,63	-	-	-
lyofilizovaná jablka	5,78 ± 0,11	-	-	-
lyofilizovaná mrkev	5,53 ± 0,23	-	-	-

Jak uvádí Tab. 96 , v samotných cereáliích se obsah anthokyanů (přestože se jedná o barviva především ovoce a zeleniny) pohyboval v rozmezí od 0,37 do 1,80 mg/100 g. V lyofilizované složce byl obsah vyšší než v cereální a pro jablka i mrkev byl téměř stejný (5,78, resp. 5,53 mg/100 g), ovšem v lyofilizované lesní směsi byl obsah ještě 200krát vyšší, a

to 1 144,48 mg/100 g. Z tohoto důvodu byl rovněž v modelových kaších s obsahem lyofilizované lesní směsi několikanásobně vyšší obsah anthokyanů než v ostatních připravených směsích. Podle zhodnocení obsahu anthokyanů podle použité cereální matrice byl nejvyšší obsah v kaši se základem z mouky pohankové.

V cereálních kaších byly dále analyzovány individuální flavonoidy, a to metodou HPLC.

V lyofilizovaném ovoci a zelenině byly detekovány tři flavonoidy, rutin, morin a myricetin. Všechny tři látky v několikanásobně vyšším množství než v cereáliích, ve kterých byl dále identifikován apigenin a luteolin. Porovnáním všech tří typů připravených směsí je možno říci, že nejvíce se obsah flavonoidů zvýšil po přidání lyofilizované mrkve. Jednoznačně nejbohatším zdrojem flavonoidů byla modelová kaše připravená z mouky pohankové.

Po kyselé hydrolýze došlo k významnému nárůstu obsahu flavonoidů z důvodu jejich uvolnění z vázaných forem. Stanoveny byly také flavonoidy kvercetin a kemferol, které před hydrolýzou ve vzorcích nebyly detekovány. Oba zmíněné flavonoidy jsou podle literatury v cereáliích běžně zastoupné. Vyskytují se však především ve vázané formě, protože byly detekovány právě až po kyselé hydrolýze, kdy došlo k jejich uvolnění z glykosidů vlivem agresivních podmínek metody [146]. Výskyt kvercetinu až po kyselé hydrolýze mohl být způsoben jeho uvolněním z glykosidu rutinu, kde kvercetin představuje aglykonovou část molekuly [140].

Ze souboru dat získaných analýzou cereálních kaší s přidanou lyofilizovanou složkou jsou zde pro ilustraci uvedeny výsledky některých individuálních flavonoidů - viz Tab. 97 a Tab. 98 .

Tab. 97 Stanovení obsahu flavonoidů v kaších s 10% obsahem lyofilizované lesní směsi po kyselé hydrolýze (mg/100 g)

	rutin	myricetin	morin	luteolin
klíčky kukuřičné	246,29 ± 2,91	2,08 ± 0,21	10,36 ± 0,95	0,44 ± 0,01
otruby amarantové	130,15 ± 3,94	0,87 ± 0,16	7,02 ± 0,33	0,87 ± 0,03
mouka pohanková celozrnná	802,19 ± 12,95	2,26 ± 0,43	11,13 ± 0,42	3,56 ± 0,13
mouka pšeničná celozrnná	221,67 ± 3,73	1,54 ± 0,17	4,14 ± 0,23	2,28 ± 0,14
mouka žitná celozrnná	238,06 ± 6,18	1,99 ± 0,11	4,26 ± 0,03	1,99 ± 0,33
mouka ječná celozrnná	206,21 ± 3,49	2,31 ± 0,08	1,53 ± 0,02	1,68 ± 0,26

Ve směsi s 10 % obsahem lyofilizované lesní směsi došlo k několikanásobnému nárůstu obsahu rutinu a morinu, u ostatních flavonoidů došlo k nárůstu spíše v řádu procent. Podmínky kyselé hydrolýzy zřejmě rozštěpí také případné nově vzniklé vazby v důsledku interakce cereálie - ovocná složka. Směs z otrub amarantových obsahovala nejnižší množství téměř všech analyzovaných látek.

Tab. 98 Stanovení obsahu flavonoidů v kaších s 10% přídavkem lyofilizované lesní směsi po kyselé hydrolýze (μg/100 g)

	kvercetin	apigenin	kemferol
klíčky kukuřičné	614,64 ± 6,98	476,31 ± 3,21	856,27 ± 9,66
otruby amarantové	285,71 ± 5,22	228,86 ± 4,91	176,95 ± 2,37
mouka pohanková celozrnná	1 879,36 ± 13,16	231,30 ± 7,20	1 108,93 ± 4,69

mouka pšeničná celozrnná	1 382,67 ± 11,20	713,22 ± 2,67	335,26 ± 2,65
mouka žitná celozrnná	973,16 ± 9,15	1 471,13 ± 5,89	612,57 ± 6,64
mouka ječná celozrnná	1 685,74 ± 15,01	386,46 ± 5,02	456,14 ± 3,19

Analýzou a porovnáním obsahu flavonoidů ve všech připravených kaších je možno říci, že nejbohatším zdrojem flavonoidů jsou kaše, kde jako přídatná látka byla použita směs lesního ovoce. Tato směs byla velmi bohatým zdrojem flavonoidů a významnou měrou tak obohatila cereální základ připravených kaší. Především obsah rutinu byl nejvyšší ve všech připravených směsí tohoto typu. Dále byl ve velké míře zastoupen morin a myricetin. Cereální kaše s přídavkem lyofilizované mrkve byly vynikajícím zdrojem kemferolu. Směsi s jablečnou složkou obsahovaly až na výjimky vždy nejméně analyzovaných látek. Jako kaši s nejvyšším obsahem flavonoidů je možno považovat směs mouky pohankové a lyofilizovaného lesního ovoce.

6.4.3.2 Stanovení látek sacharidové povahy

Sacharidy byly stanoveny podle postupů v příslušných kapitolách, kap. 4.6.7 pro celkové sacharidy, kap. 4.6.8 pro redukující a 4.6.9 pro sacharidy individuální.

Množství celkových i redukujicích sacharidů bylo přepočteno jak na 100 g analyzovaného vzorku, tak také na rozpustný podíl (viz kap. 4.6.11).

Tab. 99 Stanovení obsahu celkových sacharidů v samotných vzorcích i kaších (g/100 g výrobku)

	obsah v samotných cereáliích		směs s 10% podílem lesní směsi	
	g/100 g navážky	g/100 g rozpustného podílu	g/100 g navážky	g/100 g rozpustného podílu
klíčky kukuřičné	3,94 ± 0,30	32,86 ± 2,48	8,45 ± 0,13	65,59 ± 0,99
otruby amarantové	4,08 ± 0,30	11,96 ± 0,53	8,39 ± 0,41	21,44 ± 1,05
mouka pohanková celozrnná	3,37 ± 0,11	20,77 ± 1,67	7,58 ± 0,21	32,88 ± 0,89
mouka pšeničná celozrnná	3,94 ± 0,11	15,49 ± 0,45	8,01 ± 0,24	25,06 ± 0,75
mouka žitná celozrnná	7,88 ± 0,07	30,69 ± 0,26	13,83 ± 0,17	45,48 ± 0,56
mouka ječná celozrnná	6,04 ± 0,01	26,33 ± 0,35	6,36 ± 0,05	21,95 ± 0,25

Obsah celkových sacharidů (shrnuto v Tab. 99 a Tab. 100) byl poměrně nízký a pohyboval se v cereálních vzorcích od 3,37 g/100 g do 7,88 g/100 g, v případě směsi s lyofilizovaným lesním ovocem od 6,36 g/100 g v mouce ječné do 13,83 g/100 g v mouce žitné, ve směsi s lyofilizovanými jablky od 6,12 g/100 g v klíčcích kukuřičných do 10,65 g/100 g v mouce žitné, a pro směs s obsahem lyofilizované mrkve od 7,7 g/100 g v mouce pohankové do 12,95 g/100 g v amarantových otrubách.

Jak bylo zjištěno v kap. 6.1.2, skutečnému obsahu celkových sacharidů lépe odpovídají výsledky přepočtené na rozpustný podíl analyzované látky.

Tab. 100 Stanovení obsahu celkových sacharidů v kaších (g/100 g výrobku)

	směs s 10% podílem jablek		směs s 10% podílem mrkve	
	g/100 g navážky	g/100 g rozpustného podílu	g/100 g navážky	g/ 100 g rozpustného podílu
klíčky kukuřičné	6,12 ± 0,02	47,50 ± 0,17	10,41 ± 0,12	80,74 ± 0,94
otruby amarantové	8,97 ± 0,14	28,33 ± 0,45	12,79 ± 0,41	40,94 ± 1,31
mouka pohanková celozrnná	7,22 ± 0,19	53,04 ± 1,36	7,70 ± 0,19	49,67 ± 1,2
mouka pšeničná celozrnná	8,86 ± 0,18	32,59 ± 0,67	11,32 ± 0,34	45,81 ± 1,37
mouka žitná celozrnná	10,65 ± 0,32	50,73 ± 1,52	12,95 ± 0,50	50,17 ± 1,94
mouka ječná celozrnná	8,36 ± 0,13	44,30 ± 0,68	8,56 ± 0,65	38,49 ± 2,90

Po přepočtu se obsah sacharidů pohyboval pro cereální vzorky v rozsahu 11,96 - 32,86 g/100 g. Po přídavku lyofilizované směsi se obsah sacharidů zvýšil u všech vzorků, což bylo způsobeno vysokým podílem sacharidů rozpustných ve vodě obsažených v ovoci/zelenině (viz Tab. 101). Ve vzorcích s přídavkem lesní směsi se obsah sacharidů pohyboval od 21,44 do 65,59 g/100 g. V cereální směsi s přídavkem lyofilizovaných jablek byl obsah sacharidů od 28,33 do 53,04 g/100 g. K nejvyššímu přírůstku sacharidů došlo po přidání lyofilizované mrkve. Rozsah se pohyboval od 38,49 do 80,74 g/100 g.

Tab. 101 Obsah celkových sacharidů v lyofilizovaných vzorcích (g/100 g)

	g/100 g výrobku
lyofilizovaná lesní směs	70,47 ± 0,49
lyofilizovaná jablka	85,35 ± 0,43
lyofilizovaná mrkev	63,60 ± 0,53

K nejmenšímu nárůstu celkových sacharidů po přidání lyofilizované složky docházelo u amarantových otrub, nejvíce se obsah sacharidů zvyšoval u klíčků kukuřičných. Z hlediska přídatné složky hladinu sacharidů v cereáliích nejvíce zvyšoval přídavek lyofilizované mrkve, přestože v samotné lyofilizované zelenině byl obsah sacharidů nejmenší.

Tab. 102 Obsah redukujicích sacharidů v cereáliích a kaších

	obsah v samotných cereáliích		směs s 10% podílem lesní směsi	
	mg/100 g navážky	mg/100 g rozpustného podílu	g/100 g navážky	g/100 g rozpustného podílu
klíčky kukuřičné	583,77 ± 15,05	4 874,48 ± 125,70	7,81 ± 0,59	60,61 ± 4,59
otruby amarantové	2 509,84 ± 187,74	7 724,72 ± 577,83	7,46 ± 0,77	20,38 ± 2,10
mouka pohanková	182,57 ± 10,55	1 026,94 ± 26,81	7,25 ± 0,18	33,71 ± 0,81

celozrnná				
mouka pšeničná celozrnná	532,28 ± 8,84	2 093,46 ± 34,77	7,80 ± 0,25	27,06 ± 0,88
mouka žitná celozrnná	792,52 ± 2,25	3 084,04 ± 8,74	9,14 ± 0,58	31,12 ± 1,97
mouka ječná celozrnná	122,85 ± 6,71	594,28 ± 12,64	5,27 ± 0,12	19,13 ± 0,45

Přepočtem obsahu sacharidů na rozpustný podíl stoupl obsah redukujicích sacharidů nekolikanásobně (přehledně shrnuto v Tab. 102 Tab. 103).

Tab. 103 Obsah redukujicích sacharidů v cereálních kaších

	směs s 10% podílem jablek		směs s 10% podílem mrkve	
	g/100 g navážky	g/100 g rozpustného podílu	g/100 g navážky	g/100 g rozpustného podílu
klíčky kukuřičné	3,21 ± 0,30	24,90 ± 2,33	5,45 ± 0,13	42,29 ± 1,02
otruby amarantové	5,19 ± 0,11	19,84 ± 0,43	5,15 ± 0,25	22,91 ± 1,09
mouka pohanková celozrnná	7,01 ± 0,42	42,28 ± 2,56	6,25 ± 0,27	43,66 ± 1,91
mouka pšeničná celozrnná	2,98 ± 0,20	12,83 ± 0,86	5,78 ± 0,44	30,93 ± 2,36
mouka žitná celozrnná	9,52 ± 0,13	52,17 ± 0,70	9,38 ± 0,47	39,13 ± 1,96
mouka ječná celozrnná	3,38 ± 0,27	16,40 ± 1,32	4,82 ± 0,42	26,38 ± 2,31

V samotných cereáliích se obsah redukujicích sacharidů pohyboval v rozsahu 594,28 - 7 724,72 g/100 g.

Přídavkem lesního ovoce k cereáliím stoupl obsah na 19,13 - 60,61 g/100 g. Po přidání lyofilizovaných jablek se obsah redukujicích sacharidů v kaších pohyboval od 12,83 do 52,17 g/100 g. Nejméně sacharidů obsahovala mouka pšeničná, nejvíce mouka žitná. Po přídavku lyofilizované mrkve se množství pohybovalo od 22,91 do 43,66 g/100 g. Nejméně sacharidů bylo analyzováno v otrubách amarantových, nejvíce v mouce pohankové.

Tab. 104 Obsah redukujicích sacharidů v lyofilizovaných vzorcích

	g/100 g navážky	podíl redukujicích sacharidů v celkových sacharidech (%)
lyofilizovaná lesní směs	70,04 ± 0,08	99,40
lyofilizovaná jablka	75,17 ± 2,33	88,06
lyofilizovaná mrkev	62,59 ± 2,17	98,41

Obsah redukujicích sacharidů v lyofilizovaných vzorcích byl velmi vysoký a především pro lesní směs a mrkev se blížil ke 100 %. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 104 .

Srovnáním obsahu redukujicích sacharidů ve všech připravených cereálních kaších nelze jednoznačně říct, u které cereální matrice docházelo k nejnižšímu/nejvyššímu nárůstu obsahu redukujicích sacharidů. Lépe se již dá určit, že obsah redukujicích sacharidů největší měrou zvyšovala přidaná lyofilizovaná mrkev, přestože stejně jako u celkových sacharidů, byl obsah redukujicích sacharidů právě v této složce nejmenší.

Tab. 105 Regresní rovnice pro výpočet obsahu sacharidů

standard	regresní rovnice	koeficient determinace
fruktóza	y (mV·s) = 906,880 · x (mg/ml)	R^2 = 0,987
glukóza	y (mV·s) = 839,369 · x (mg/ml)	R^2 = 0,965
galaktóza	y (mV·s) = 736,292 · x (mg/ml)	R^2 = 0,992
sacharóza	y (mV·s) = 540,857 · x (mg/ml)	R^2 = 0,969
maltóza	y (mV·s) = 859,044 · x (mg/ml)	R^2 = 0,974

Obsah mono a disacharidů je shrnut pro všechny vzorky v Tab. 107 .

V analyzovaných vzorcích bylo detekováno všech pět vybraných mono a disacharidů, pouze u mouky pšeničné nebyla detekována galaktóza a maltóza. Jednoznačně nejvíce byla v cereáliích zastoupena sacharóza. Obsah tohoto disacharidu se pohyboval od 500,62 do 2 121,24 mg/100 g. Nejbohatším cereálním zdrojem sacharidů byla mouka pohanková, nejnižší množství bylo stanoveno v mouce pšeničné.

Tab. 106 Obsah mono a disacharidů v lyofilizovaném ovoci a zelenině (g/100 g)

	fruktóza	glukóza	galaktóza	sacharóza	maltóza
lyofilizovaná lesní směs	44,98 ± 0,37	19,13 ± 0,42	nd	14,96 ± 0,45	nd
lyofilizovaná jablka	38,78 ± 0,32	10,24 ± 0,07	nd	2,41 ± 0,04	nd
lyofilizovaná mrkev	33,24 ± 0,02	24,56 ± 0,03	nd	5,99 ±0,07	nd

V lyofilizovaných směsích byly detekovány pouze fruktóza, glukóza a sacharóza, jejich množství se však pohybovalo v gramech na 100 g vzorku. Nejvíce byla zastoupena fruktóza, nejbohatším zdrojem sacharidů byla lyofilizovaná lesní směs.

Tab. 107 Obsah mono a disacharidů v cereáliích a cereálních směsích (mg/100 g)

cereální základ					
	fruktóza	glukóza	galaktóza	sacharóza	maltóza
klíčky kukuřičné	49,04 ± 0,20	299,38 ± 16,57	296,35 ± 7,27	1 995,87 ± 41,94	145,81 ± 8,68
otruby amarantové	211,41 ± 7,81	164,16 ± 10,37	707,48 ± 2,54	876,45 ± 9,30	88,06 ± 6,13
mouka pohanková celozrnná	82,27 ± 2,88	81,96 ± 4,90	853,20 ± 8,95	2 121,24 ± 13,66	168,26 ± 6,52
mouka pšeničná celozrnná	4,75 ± 0,18	138,57 ± 12,13	nd	519,31 ± 2,65	nd
mouka žitná celozrnná	14,94 ± 0,20	85,28 ± 10,21	150,46 ± 6,72	619,92 ± 9,82	101,58 ± 9,32
mouka ječná celozrnná	62,10 ± 3,46	95,88 ± 3,60	258,21 ± 13,24	500,62 ± 11,81	72,30 ± 2,40

přídavek lyofilizovaného lesního ovoce					
	fruktóza	glukóza	galaktóza	sacharóza	maltóza
klíčky kukuřičné	2 834,04 ± 35,47	827,26 ± 21,23	nd	214,47 ± 0,24	315,96 ± 2,70
otruby amarantové	2 640,04 ± 24,10	1 569,64 ± 27,52	nd	291,53 ± 3,226	437,52 ± 7,27
mouka pohanková celozrnná	2 283,84 ± 22,54	998,66 ± 25,66	nd	138,27 ± 8,17	161,47 ± 3,81
mouka pšeničná celozrnná	866,28 ± 4,20	580,29 ± 17,77	nd	51,47 ± 4,93	nd
mouka žitná celozrnná	1 335,36 ± 22,75	626,19 ± 1,82	nd	133,30 ± 9,17	158,68 ± 7,55
mouka ječná celozrnná	2 549,20 ± 9,37	1 120,77 ± 30,51	nd	389,30 ± 6,21	104,82 ± 2,94

přídavek lyofilizovaných jablek					
	fruktóza	glukóza	galaktóza	sacharóza	maltóza
klíčky kukuřičné	5 320,47 ± 16,59	3 396,08 ± 13,56	nd	567,04 ± 14,04	206,96 ± 12,89
otruby amarantové	6 472,46 ± 77,70	4 030,39 ± 48,43	nd	444,34 ± 31,08	360,43 ± 15,14
mouka pohanková celozrnná	5 594,57 ± 46,52	4 998,84 ± 63,04	nd	655,86 ± 23,56	810,63 ± 11,45
mouka pšeničná celozrnná	5 647,27 ± 21,51	3 104,41 ± 87,56	597,47 ± 23,93	539,29 ± 9,93	299,65 ± 5,31
mouka žitná celozrnná	3 457,28 ± 41,70	2 332,58 ± 25,36	366,76 ± 21,10	578,17 ± 36,56	542,75 ± 12,61
mouka ječná celozrnná	3 099,25 ± 49,08	1 339,06 ± 41,91	nd	131,67 ± 2,52	483,71 ± 0,59

přídavek lyofilizované mrkve					
	fruktóza	glukóza	galaktóza	sacharóza	maltóza
klíčky kukuřičné	3 433,32 ± 30,14	2 197,65 ± 56,27	237,85 ± 15,20	291,45 ± 9,58	181,99 ± 3,87
otruby amarantové	3 605,84 ± 35,77	2 199,74 ± 66,32	173,84 ± 9,82	262,43 ± 35,73	145,87 ± 22,98
mouka pohanková celozrnná	3 521,79 ± 22,44	2 834,59 ± 7,92	250,88 ± 9,99	395,79 ± 19,11	340,34 ± 31,82
mouka pšeničná celozrnná	2 655,77 ± 17,56	1 759,10 ± 35,27	101,32 ± 5,38	294,49 ± 25,80	185,41 ± 16,24
mouka žitná celozrnná	4 064,88 ± 67,95	2 725,17 ± 46,64	167,43 ± 5,99	335,40 v 48,46	338,23 ± 21,66
mouka ječná celozrnná	2 847,78 ± 53,55	1 806,36 ± 39,63	101,73 ± 7,58	425,97 ± 9,85	167,04 ± 3,60

Po přídavku směsi lesního ovoce k cereálnímu základu došlo k významnému nárůstu obsahu fruktózy a glukózy, méně pak maltózy. Na vysokém nárůstu obou monosacharidů se podílelo právě lyofilizované ovoce, které je bohatým zdrojem jednoduchých redukujicích sacharidů. U všech analyzovaných vzorků došlo k výraznému poklesu hladiny sacharózy. Pokles mohl být způsoben interakcemi sacharidové složky cereálie s fenolickými látkami obsaženými v ovocné složce [140]. Galaktóza nebyla detekována u žádné cereální směsi, přestože v samotných cereáliích detekována byla dokonce více než fruktóza a glukóza. To mohlo být způsobeno jejím častým výskytem ve vázané formě v glykosidech a tedy její reakcí s polyfenolickými látkami, které byly v lyofilizované lesní směsi hojně zastoupeny [153]. Jako nejvydatnější zdroj sacharidů byla porovnáním kaší s přídavkem lyofilizovaného ovoce vybrána směs z otrub amarantových.

Po přídavku lyofilizovaných jablek k cereáliím došlo k ještě většímu nárůstu obsahu sacharidů, než po přídavku lyofilizovaného lesního ovoce. Trend výskytu sacharidů byl podobný. Nejbohatším zdrojem mono a disacharidů byla směs z mouky pohankové.

U kaší připravených s 10% podílem lyofilizované mrkve byly stanoveny všechny sacharidy ve všech připravených směsích. U sacharózy byl zjištěn pokles ve všech vzorcích, nejvýrazněji patrně u klíčků kukuřičných z 1 995,87 na 291,45 mg/100 g.

V kombinaci lyofilizovaná mrkev - cereálie byla na sacharidy nejbohatší směs z mouky pohankové.

Porovnáním obsahu sacharidů ve všech připravených cereálních kaších bylo zjištěno, že až na pár výjimek byl nejvyšší obsah sacharidů ve směsích s přídatnou látkou v podobě lyofilizovaných jablek, přestože např. glukózy a sacharózy obsahovala tato směs nejméně ze všech tří připravených směsí.

6.4.3.3 Analýza mono a disacharidů ve vzorcích po kyselé hydrolýze

Postup analýzy sacharidů byl shodný jako v předešlé kapitole, tzn. podle návodu viz kap. 4.6.9, lišil se postup přípravy vzorku, v této kapitole byla použita kyselá hydrolýza, viz kap. 4.5.11.

Měření proběhla třikrát, byla spočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Regresní rovnice pro výpočet obsahu sacharidů jsou uvedeny v Tab. 105 , obsah mono a disacharidů ve vzorcích je uveden v Tab. 109 .

Vlivem účinků kyselé hydrolýzy došlo ke značnému navýšení množství sacharidů, a to především z důvodu jejich uvolnění z různých vázaných forem, ve kterých se sacharidy v obilných zrnech nejčastěji vyskytují. Mohou být vázané v glykosidech, polysacharidech nebo na složky buněčné stěny a působením hydrolytických podmínek dochází nejen k uvolnění vázaných sacharidů, ale také k hydrolýze některých ve vodě nerozpustných sacharidů, které tvoří podstatnou část endospermu obilného zrna [140]. Obsah mono-, di- a trisacharidů v cereáliích je rovněž závislý na stupni hydrolýzy škrobu [141].

Nejvíce zastoupeným sacharidem po kyselé hydrolýze byla glukóza, což souvisí právě s hydrolýzou škrobu. Její množství se pohybovalo od 33,53 až po 78,03 g/100 g. Obsah ostatních sacharidů již byl podstatně nižší. Obsah sacharózy se ve vzorcích zvýšil jen velmi málo. Sacharóza přítomná ve vzorích po hydrolýze nebo během hydrolýzy uvolňovaná patrně dále podléhala hydrolýze za štěpení na monomerní jednotky glukózu a fruktózu. Zvýšený obsahu maltózy lze vysvětlit uvolňováním maltózových jednotek v průběhu hydrolýzy škrobu [140].

Tab. 108 Obsah mono a disacharidů v lyofilizovaném ovoci a zelenině po kyselé hydrolýze (g/100 g)

	fruktóza	glukóza	sacharóza
lyofilizovaná lesní směs	52,29 ± 0,05	30,76 ± 0,75	11,77 ± 0,38
lyofilizovaná jablka	31,45 ± 0,59	30,66 ± 0,21	nd
lyofilizovaná mrkev	37,97 ± 0,56	31,35 ± 0,14	11,98 ± 0,04

V lyofilizovaném ovoci se zvýšil obsah především glukózy a pro všechny tři vzorky byl velmi podobný. U všech tří vzorků se snížil obsah sacharózy, u lyofilizovaných jablek již nebyla sacharóza po hydrolýze detekována. Vlivem podmínek hydrolýzy patrně docházelo k další degradaci sacharidů a rovněž štěpení sacharózy na glukózu a fruktózu.

Ve všech třech typech cereálních směsí byly po hydrolýze detekovány pouze tři sacharidy, monosacharidy glukóza a fruktóza a neredukujicí disacharid sacharóza.

Po přídavku lyofilizované lesní směsi byl u fruktózy a glukózy častěji pozorován jejich pokles. Naopak u sacharózy došlo ve všech případech k navýšení obsahu.

Ve směsi s přídavkem lyofilizovaných jablek došlo především u glukózy k poklesu u všech směsí, nejvýrazněji u mouky žitné. Nárůst sacharózy byl jen velmi malý a u fruktózy došlo k nárůstu jen u poloviny vzorků. U mouky ječné došlo jako jediné k poklesu hladiny všech analyzovaných sacharidů.

Lyofilizovaná mrkev jako jediná vykazovala po hydrolýze nárůst všech analyzovaných sacharidů; po přídavku k cereálnímu základu však byl pokles obsahu sacharidů v některých případech zaznamenán také zde.

Analýzou připravených směsí po kyselé hydrolýze bylo zjištěno, že nejvíce sacharidů je obsaženo ve směsi kukuřičných klíčků s podílem lesního ovoce. Obecně kaše s lesním ovocem byly bohaté na sacharózu, kaše s přídavkem mrkve obsahovaly nejvíce glukózy, ale nejméně sacharózy a fruktózy. Ta byla ve vyšší míře obsažena v kaších s přídavkem lyofilizovaných jablek.

Analýzou různých parametrů v surových cereáliích, které sloužily jako základ pro přípravu kaší a porovnáním těchto výsledků s výsledky směsí obohacených o lyofilizovanou složku ovoce či zeleniny, je možno říci, že již samotný cereální základ je matricí bohatou na fenolické látky i sacharidy, přídavkem ovocné/zeleninové složky je však možné nutriční hodnotu ještě dále zvyšovat. S rostoucí oblibou konzumace cereálních výrobků představují takto připravené cereální směsi možnost, jak významným způsobem obohatit skladbu jídelníčku o významné biologicky aktivní látky.

Tab. 109 Obsah mono a disacharidů v cereáliích a cereálních kaších po kyselé hydrolýze (g/100 g)

cereální základ					
	fruktóza	glukóza	galaktóza	sacharóza	maltóza
klíčky kukuřičné	16,25 ± 0,07	65,94 ± 3,51	nd	1,80 ± 0,02	6,00 ± 0,21
otruby amarantové	3,40 ± 0,14	33,98 ± 0,23	3,18 ± 0,26	11,16 ± 0,91	2,82 ± 0,10
mouka pohanková celozrnná	6,42 ± 0,07	33,53 ± 0,42	2,56 ± 0,28	2,25 ± 0,65	1,81 ± 0,13
mouka pšeničná celozrnná	6,83 ± 0,11	62,88 ± 0,83	23,65 ± 0,58	1,45 ± 0,04	6,87 ± 0,08
mouka žitná celozrnná	8,50 ± 0,07	78,03 ± 2,16	6,35 ± 0,15	1,29 ± 0,00	7,85 ± 0,18
mouka ječná celozrnná	8,81 ± 0,17	43,12 ± 0,14	25,93 ± 1,19	3,82 ± 0,59	6,23 ± 0,84

přídavek lyofilizovaného lesního ovoce			
	fruktóza	glukóza	sacharóza
klíčky kukuřičné	9,84 ± 0,33	67,48 ± 2,40	18,15 ± 0,30
otruby amarantové	6,83 ± 0,43	68,28 ± 3,15	15,09 ± 0,36
mouka pohanková celozrnná	5,08 ± 0,22	56,88 ± 1,45	10,73 ± 0,67
mouka pšeničná celozrnná	6,93 ± 0,29	54,23 ± 1,14	12,31 ± 0,84
mouka žitná celozrnná	8,45 ± 0,04	34,52 ± 1,26	20,00 ± 0,66
mouka ječná celozrnná	7,16 ± 0,24	31,80 ± 0,36	7,43 ± 0,58

přídavek lyofilizovaných jablek			
	fruktóza	glukóza	sacharóza
klíčky kukuřičné	4,67 ± 0,10	63,30 ± 2,18	13,45 ± 0,29
otruby amarantové	33,46 ± 1,22	26,61 ± 0,20	12,57 ± 0,14
mouka pohanková celozrnná	27,15 ± 0,43	21,19 ± 0,43	12,65 ± 0,56
mouka pšeničná celozrnná	18,16 ± 1,24	23,99 ± 0,59	15,30 ± 0,56
mouka žitná celozrnná	3,06 ± 0,21	19,42 ± 0,12	6,72 ± 0,18
mouka ječná celozrnná	1,56 ± 0,10	16,43 ± 0,19	2,40 ± 0,12

přídavek lyofilizované mrkve			
	fruktóza	glukóza	sacharóza
klíčky kukuřičné	5,27 ± 0,38	63,54 ± 2,85	1,76 ± 0,20
otruby amarantové	5,62 ± 0,24	75,32 ± 3,20	0,15 ± 0,01
mouka pohanková celozrnná	3,27 ± 0,31	58,01 ± 1,05	4,68 ± 0,69
mouka pšeničná celozrnná	4,23 ± 0,23	64,57 ± 1,15	4,26 ± 0,25
mouka žitná celozrnná	4,98 ± 0,15	54,20 ± 2,05	1,88 ± 0,04
mouka ječná celozrnná	3,52 ± 0,90	57,20 ± 1,13	3,35 ± 0,33

6.4.4 Enkapsulace ovocných extraktů

V této části práce byly enkapsulovány extrakty ovoce a zeleniny, které byly použity v předešlé kapitole (6.4.3) jako lyofilizovaná složka cereálních směsí. Extrakty byly enkapsulovány za účelem zachování vysokého obsahu biologicky aktivních látek jako jsou vitaminy a fenolické sloučeniny. V kapitole 6.4.3 bylo jako ochucující a zároveň obohacující složka použito lyofilizované ovoce nebo zelenina. Optimalizací enkapsulace ovocných/zeleninových extraktů se naskytuje další možnost fortifikace potravin při zachování chuti původní fortifikované potraviny a zároveň zachování biologického účinku enkapsulovaných látek.

6.4.4.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Pro přípravu částic bylo vyzkoušeno pět enkapsulačních postupů, viz kap. 4.6.23 až 4.6.27. Enkapsulační účinnost každé metody byla stanovena pro každý jeden sledovaný parametr porovnáním hodnoty parametru v původním extraktu a v supernatantu získaném po enkapsulaci a centrifugaci připravených částic. Jako výchozí extrakt byla použita šťáva z vymačkaného ovoce nebo roztok získaný extrakcí lyofilizovaného ovoce/zeleniny 5% kyselinou citrónovou (kap. 4.5.8).

Mezi sledované parametry byly například zařazeny celkové polyfenoly stanovené podle kap. 4.6.1. Ze získaných dat vyplynulo, že zcela nejvyšší enkapsulační účinnosti bylo dosaženo u jablečného extraktu použitím metody tenké vrstvy na reverzních fázích. U ostatních vzorků byla nejvyšší účinnost při použití ethanolového vstřikování. U chitosanových a většiny chitosan-alginátových částic nebylo možné enkapsulační účinnost stanovit z důvodu vzniku zákalu způsobeného tvorbou gelovitého roztoku vzniklých částic.

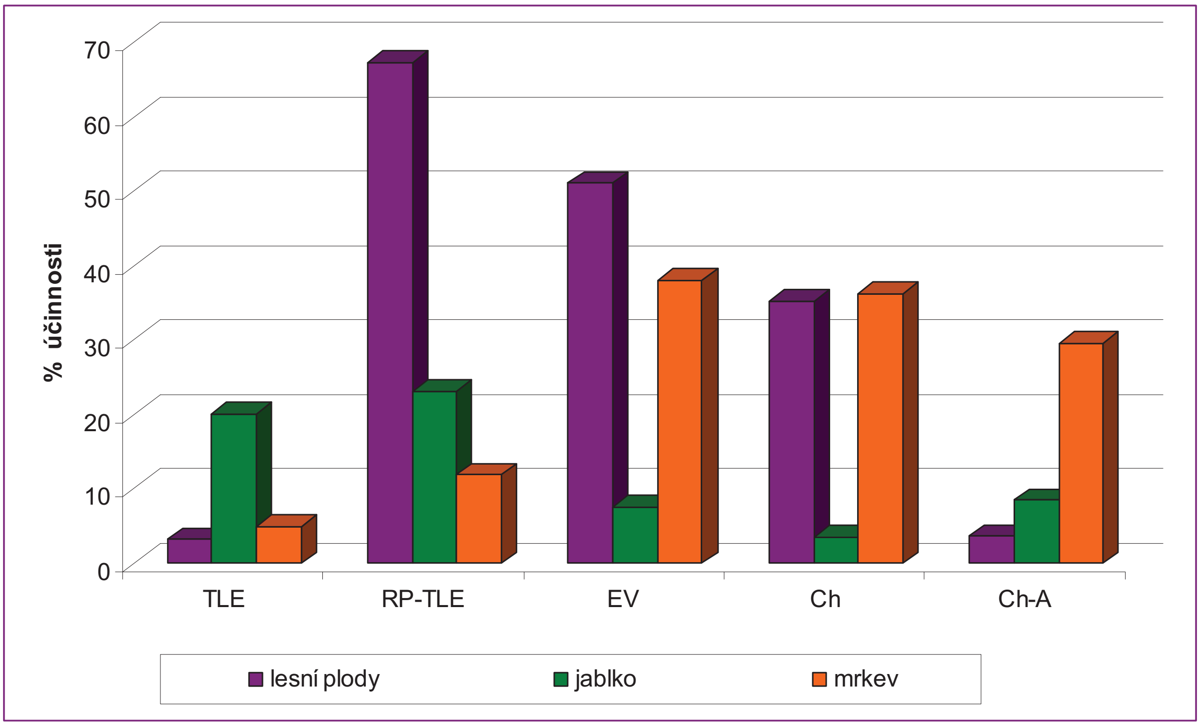
Tab. 110 Enkapsulační účinnost stanovená pro celkové polyfenoly (%)

	TLE	RP-TLE	EV	Ch	Ch-A
lesní plody - šťáva	25,30 ± 1,37	0,16 ± 0,01	32,73 ± 0,73	z	z
lesní plody - extrakt	37,43 ± 1,09	12,11 ± 0,03	34,11 ± 0,56	z	z
jablko - šťáva	3,61 ± 0,11	10,80 ± 0,26	13,62 ± 0,19	z	z
jablko - extrakt	28,67 ± 0,53	75,61 ± 2,23	5,21 ± 0,11	z	8,57 ± 0,28
mrkev - šťáva	4,25 ± 0,07	21,73 ± 0,37	32,85 ± 0,64	z	7,25 ± 0,31
mrkev - extrakt	z	16,67 ± 0,63	z	z	21,95 ± 0,85

z = zákal

Celkové flavonoidy byly stanoveny podle postupu v kap. 4.6.2. Nejvyšší enkapsulační účinnosti bylo dosaženo použitím metody ethanolového vstřikování a také použitím obou metod přípravy polysacharidových částic. Velmi nízká nebo dokonce žádná účinnost byla zjištěna u zbylých dvou metod.

Dalším sledovaným parametrem byla kyselina askorbová stanovená podle návodu v kap. 4.6.19. Pro mrkev a lesní plody se jako nejúčinnější metody jevily ethanolové vstřikování a příprava chitosanových částic, metoda reverzní fáze byla vhodná pro lesní plody a jablko.



Graf 21 Enkapsulační účinost pro kyselinu askorbovou obsaženou ve šťávě

Pro šťávu a extrakt z mrkve byla sledována účinnost enkapsulačních technik také z hlediska obsahu β-karotenu (kap. 4.6.20). Nejúčinnější metoda byla příprava chitosan-alginátových částic, naopak účinnost chitosanových částic byla téměř nulová.

V extraktu a šťávě z lesního ovoce byla stanovena účinnost enkapsulace pro anthokyanová barviva (kap. 4.6.4). Zde se jako nejefektivnější metoda jevilo ethanolové vstřikování.

Ze všech uvedených enkapsulačních technik se jako nejúčinnější jeví metoda ethanolového vstřikování.

6.4.4.2 Stanovení velikosti částic

Velikost částic byla stanovena podle postupu v kap. 4.6.28. Před samotným měřením byla velikost částic sjednocena pomocí membránového extrudéru. Analýza velikosti částic sloužila především jako kontrola, zda došlo ke sjednocení velikosti částic v dostatečné míře a systém je možno považovat za homogenní. V případě použití částic do potravin by byly velké částice viditelné pouhým okem a narušovaly by senzorickou kvalitu výrobku.

Vyhodnocením dat bylo zjištěno, že ve většině případů došlo k úpravě velikosti částic v dostatečné míře. Procentuální zastoupení částic s vyhovující velikostí se pohybovalo od 80 do 98 %. Jako nejlepší způsob pro přípravu homogenních částic byla vyhodnocena metoda ethanolového vstřikování.

6.4.4.3 Určení stability částic stanovením zeta-potenciálu

Zeta-potenciál byl stanoven podle návodu v kap. 4.6.29.

Pro částice připravené metodou tenké vrstvy byl zjištěn pokles zeta-potenciálu po enkapsulaci ovocné/zeleninové složky, stále však bylo možné považovat je za stabilní. Náboj částic byl záporný.

Metodou reverzní fáze byly připraveny stabilní záporně nabité částice. Enkapsulací ovocné/zeleninové složky došlo jen k minimálnímu poklesu stability.

Enkapsulací šťávy nebo extraktu docházelo ke značné destabilizaci částic připravených ethanolovým vstřikováním. Zeta-potenciál byl v mnoha případech téměř nulový a nebylo možné přesně stanovit jeho náboj. Částice s nábojem blížícím se nule se v roztoku téměř neodpuzují a mají proto vysokou tendenci ke shlukování. Částice bez uzavřené složky měly záporný náboj a vykazovaly spíše nízkou stabilitu.

Chitosanové částice měly jako jediné kladný náboj a enkapsulací přírodní složky došlo ve většině případů k nárůstu zeta-potenciálu.

Chitosan-alginátové částice měly náboj záporný a enkapsulací roztoků došlo ve všech případech k poklesu stability částic.

Jako nejstabilnější částice i po enkapsulaci ovocné/zeleninové složky byly vyhodnoceny částice připravené metodou reverzní fáze a chitosanové částice. Za nejhůře enkapsulovatelné lze považovat šťávu a extrakt z lesních plodů, které snižovaly stabilitu částic připravených tenkou vrstvou a reverzní fází a chitosan-alginátových částic.

Tab. 111 Zeta-potenciál částic o velikosti 200 nm připravených různými metodami (mV)

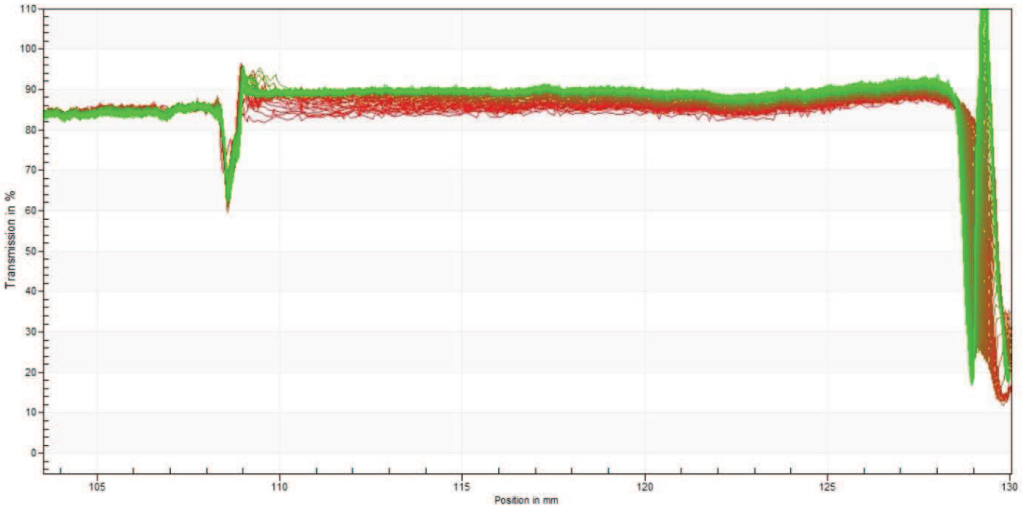
	RP-TLE	EV	Ch
prázdné částice	-56,10	-22,93	33,77
lesní plody - šťáva	-29,60	-3,00	25,74
lesní plody - extrakt	-33,43	-8,16	36,97
jablko - šťáva	-42,40	-3,95	34,97
jablko - extrakt	-38,70	2,38	37,60
mrkev - šťáva	-34,93	-6,53	35,53
mrkev - extrakt	-37,83	3,73	30,67

6.4.4.4 Stabilita částic v modelových tělních tekutinách

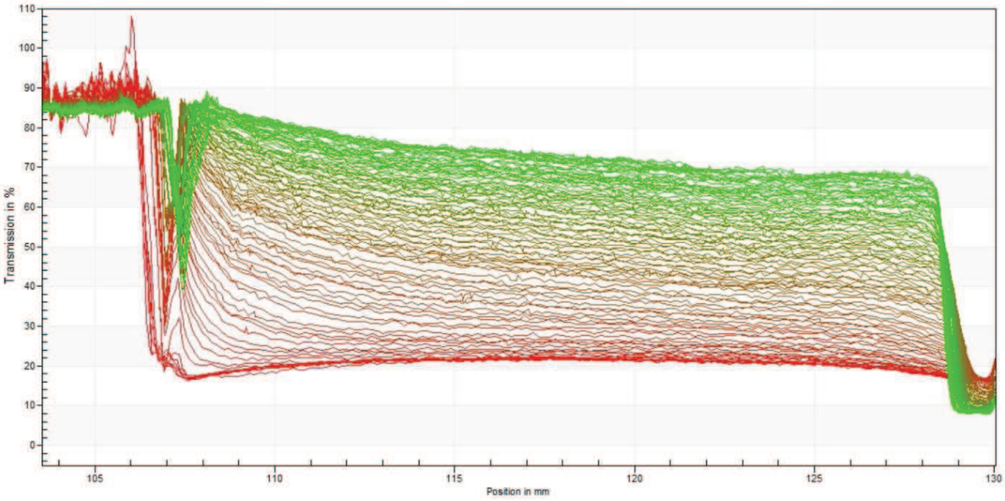
Stanovení bylo provedeno podle návodu v kap. 4.6.30. Sledovaným parametrem pro posouzení stability částic byl obsah fenolických látek. Vyhodnocením výsledků bylo zjištěno, že působením každé šťávy zvlášť nedochází k výraznějšímu rozkladu částic. Pouze působením žlučové šťávy docházelo ke zmenšování velikosti částic, patrně vlivem emulgačních vlastností této šťávy složené především z cholové a deoxycholové kyseliny.

6.4.4.5 Analýza vlastností systému pomocí analytické centrifugace

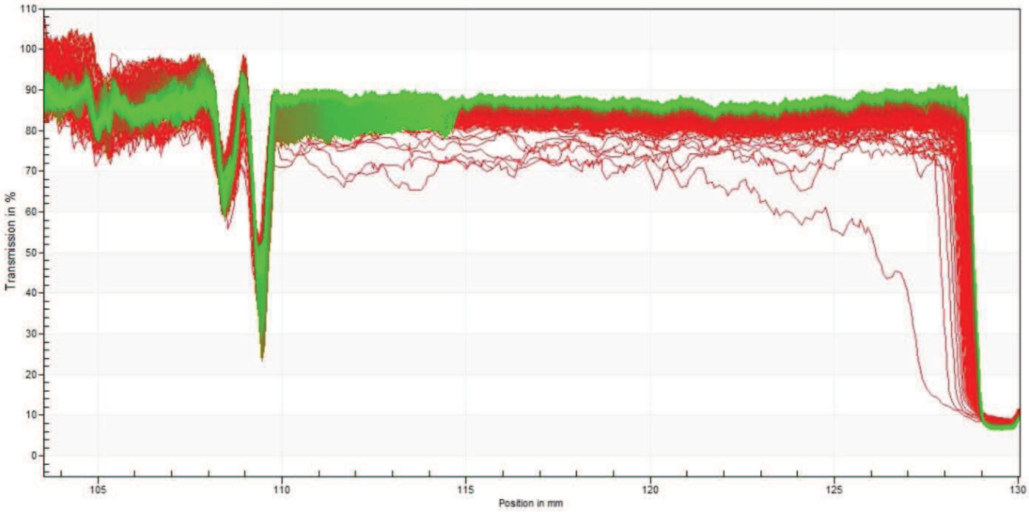
Analýza byla provedena podle postupu viz kap. 4.6.31. Vyhodnocením dat bylo zjištěno, že nejstabilnější jsou oba druhy polysacharidových částic, nejméně stabilní jsou částice připravené ethanolovým vstřikováním, což odpovídá zjištěním v kapitole 6.4.4.3.



Obr. 7 Sedimentační stabilita chitosanových částic



Obr. 8 Sedimentační stabilita lipozomů připravených metodou TLE



Obr. 9 Sedimentační stabilita lipozomů připravených metodou ethanolového vstřikování

6.4.4.6 Stanovení vhodné koncentrace částic pro použití v potravinářství

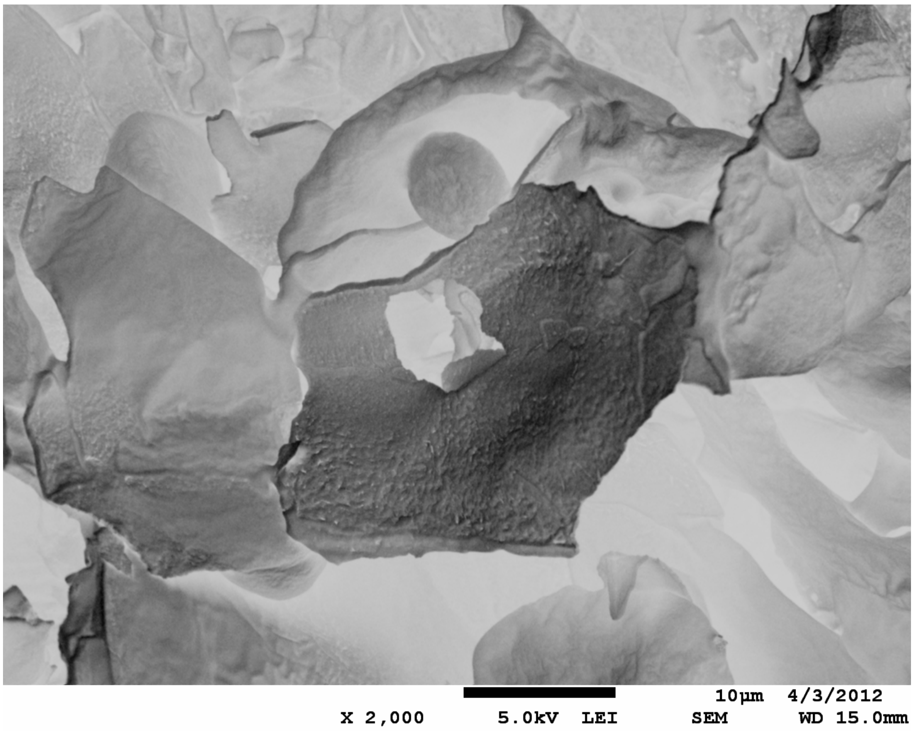
V této kapitole bylo sledováno množství enkapsulované látky, které bylo ještě možné přidat k potravinářským výrobkům bez výraznějších změn senzorických vlastností.

Při použití lipozomů byl u mrkvové a jablečné šťávy i extraktů pozorován zákal již při přípravě 20% roztoku, u lesních plodů by bylo možné připravit roztok až do koncentrace 40 %. Při přípravě chitosanových částic nevzniká okem viditelný zákal, což umožňuje použití až 100% roztoku těchto částic. V roztoku se spíše tvoří gelovitá struktura, která však senzorické vlastnosti nijak nesnižuje. Chitosan-alginátové částice vytvářely v roztoku jen mírný zákal, který umožňoval jejich použití bez znatelných změn až do výše 40 % pro všechny extrakty, pro jablečnou šťávu bylo možné použití 60% roztoku, u šťávy z mrkve a lesních plodů až 100% roztoku.

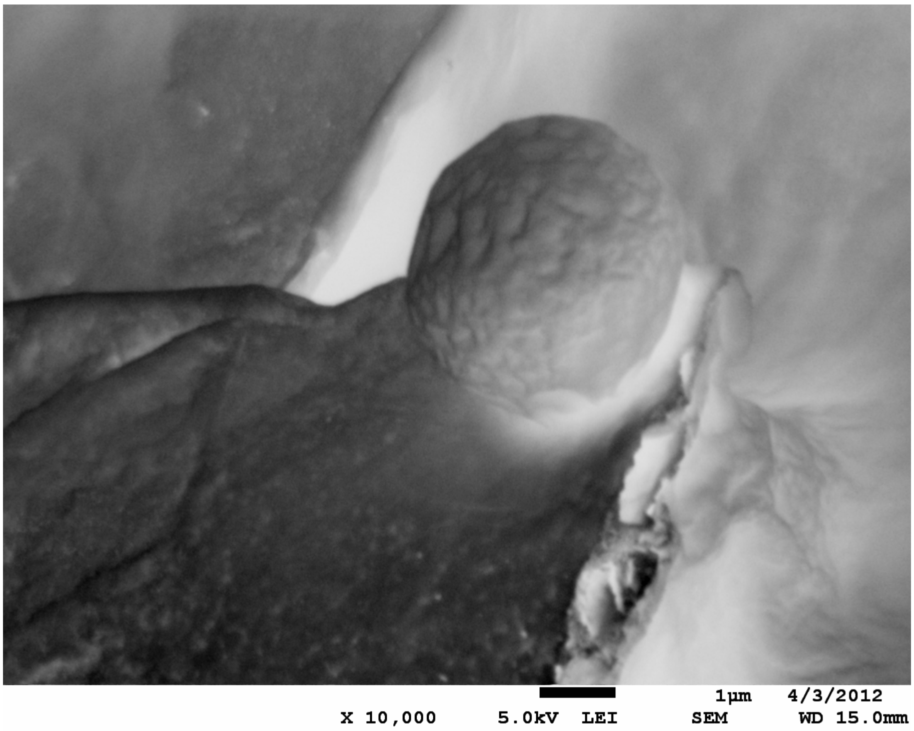
6.4.4.7 Vizualizace částic pod mikroskopem

Všechny typy připravených částic byly zobrazeny pod optickým mikroskopem, částice připravené metodou TLE byly zachyceny také pod elektronovým mikroskopem. Na snímcích je možno pozorovat dobře viditelné kompaktní částice, ale také porušené struktury, které vznikly patrně při přípravě preparátu, suspenze bylo před pozorováním nutno lyofilizovat.

Závěrem lze shrnout, že pro přípravu částic bylo použito pět způsobů enkapsulace, u všech byly získány částice, avšak s odlišnou mírou účinnosti i stability. Pro většinu kombinací ovocný extrakt - metoda přípravy částic byly stanoveny parametry vypovídající o stabilitě částic a enkapsulační účinnosti způsobu jejich přípravy. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla zjištěna u částic připravených ethanolovým vstřikováním, tyto částice však vykazovaly nejmenší stabilitu. Také je diskutabilní využití této techniky pro potravinářské účely. Poměrně dobrou enkapsulační účinnost a také stabilitu vykazovaly chitosanové částice. Optimalizace přípravy částic za účelem dosažení co nejlepšího poměru enkapsulační účinnosti a stability bude řešena v navazujících pracích. Možnosti enkapsulace přírodních složek nabízejí možnost obohacení různých potravinářských matric o biologicky aktivní látky.



Obr. 10 Lipozomy připravené metodou TLE, zvětšeno 2 000krát



Obr. 11 Lipozom připravený metodou TLE, zvětšeno 10 000krát

7 ZÁVĚRY

Předložená dizertační práce je zaměřena na analýzu různých cereálních materiálů, ať už surových cereálií či technologicky zpracovaných a dále ochucených, nebo různých druhů rýže. Ve vybraných vzorcích byly analyzovány biologicky aktivní látky, jejich běžná dostupnost z potravy a také jejich skutečný obsah po uvolnění z vázaných forem kyselou či enzymatickou hydrolýzou. Dále byl sledován také antioxidační a antimutagenní účinek. Vybrané cereální výrobky byly použity pro přípravu modelových cereálních směsí obohacených o lyofilizované ovoce nebo zeleninu. Extrakty získané z tohoto ovoce/zeleniny byly také použity pro přípravu částic s enkapsulovanou přírodní složkou. Dále byly vybrané vzorky použity jako substráty pro kultivaci mikroorganizmů za účelem získání obohacené biomasy použitelné například v krmivářství. Součástí práce je také senzoricko-spotřebitelská analýza monitorující vztah spotřebitelů ke konzumaci cereálií a jejich povědomí o zdravotních přínosech.

- Spektrofotometricky byly stanoveny celkové polyfenoly. Nejvyšší obsah byl zaznamenán u klíčků. Vysokým obsahem vynikaly také pohankové vzorky. Po kyselé hydrolýze se obsah polyfenolů několikanásobně zvýšil z důvodu jejich uvolnění z vázaných forem. Vysoký obsah polyfenolů byl opět zaznamenán v klíčcích, ale také v otrubách. Obsah polyfenolů v rýži se po kyselé hydrolýze rovněž zvýšil. Při porovnání měly různé druhy rýží podobné hladiny polyfenolů, vyšší množství bylo zaznamenáno u rýže Indiánské a červené rýže Natural. Srovnáním cereálních a rýžových vzorků obsahovaly rýžové vzorky spíše nižší množství celkových polyfenolů.
- Celkové flavonoidy byly rovněž stanoveny spektrofotometricky. Jejich množství extrahované do vody bylo nízké pro všechny vzorky s výjimkou klíčků a pohankových vzorků, a také pro vzorky rýže. Aplikací kyselé hydrolýzy množství celkových flavonoidů vzrostlo u cereálních i rýžových vzorků, avšak pouze rýže Indiánská a červená Natural dosahovala srovnatelných hodnot s cereáliemi.
- Obsah celkových flavonolů byl v rýžových a cereálních vzorcích až na několik výjimek srovnatelný, bohatým zdrojem flavonolů jsou výrobky z žita a pohanky. Obsah flavonoidů a flavonolů v potravinách je obvykle ukazatelem biologické aktivity potraviny, vysoké zastoupení těchto skupin látek v cereáliích i rýžových vzorcích signalizuje potenciální zdravotní přínos při konzumaci těchto druhů potravin.
- Metodou kapalinové chromatografie na reverzní fázi (HPLC/PDA) byly ve všech cereálních i rýžových vzorcích stanoveny individuální fenolické látky, z katechinů to byly katechin, epikatechin a příslušné galláty, z fenolických kyselin kyselina ferulová, chlorogenová a gallová, zástupců třídy flavonoidů bylo identifikováno celkem osm. Ve všech vzorcích došlo k nárůstu obsahu po kyselé hydrolýze. Nejbohatším zdrojem analyzovaných fenolických látek byly opět klíčky, z rýžových vzorků to byly barevné rýže a rýže upravené technikou parboiled.
- Celkové a redukující sacharidy byly rovněž stanoveny spektrofotometricky. Skutečné hodnotě deklarované na obalu lépe odpovídaly výsledky přepočítané na rozpustný podíl. Dostupnost sacharidů pouhou extrakcí do vody byla nízká, také zde byla použita

kyselá hydrolýza, která uvolnila vázané sacharidy. Po extrakci do vody byl nejvyšší obsah v klíčcích a otrubách, po hydrolýze byl obsah srovnatelný pro všechny vzorky včetně rýžových.

- Metodou HPLC/RI byly stanoveny individuální sacharidy, v cereáliích fruktóza, glukóza, galaktóza, sacharóza a maltóza, nejvyšší obsah sacharidů byl v klíčcích. V rýžích se vyskytuje též arabinóza, dále glukóza, galaktóza, sacharóza, maltóza a cellobióza, bohatší na obsah sacharidů jsou obecně barevné rýže. Po aplikaci kyselé hydrolýzy se u cereálií změnilo pouze množství, nikoli zastoupení sacharidů. Došlo k navýšení o několik řádů, především u klíčků a otrub. U hydrolyzované rýže se změnilo také zastoupení sacharidů, po hydrolýze byla detekována pouze arabinóza a glukóza.
- Ve všech vzorcích cereálií a rýže byla stanovena celková antioxidační aktivita spektrofotometricky s využitím tří různých metod. Metodou využívající ke stanovení radikál ABTS byla nejvyšší antioxidační aktivita změřena u klíčků a také vloček pohankových. U rýží byla porovnáním s ostatními druhy vysoká hodnota stanovena u rýže Indiánské. Metodou využívající radikál DPPH byla nejvyšší antioxidační aktivita změřena opět u klíčků a srovnatelná hodnota byla stanovena i u rýže Indiánské. Vyhodnocením schopnosti zhášet radikály DPPH se tak patrně vyjadřuje spíše efekt vybraných individuálních flavonoidů, na rozdíl od metody ABTS, kde hodnoty antioxidační aktivity odpovídají aktivitě celé skupiny fenolických látek svým synergickým účinkem. Třetí použitou metodou β-CLAMS byla nejvyšší antioxidační aktivita opět stanovena u klíčků a otrub, u rýží vykazovaly vysokou antioxidační aktivitu barevné rýže. U všech použitých metod stanovení antioxidační aktivity byly získány nejvyšší hodnoty pro vločky pohankové a klíčky pšeničné, špaldové a žitné.
- U testovaných vzorků cereálií byla stanovena též antimutagenní aktivita. Kompletní sada výsledků byla získána na testovacím systému *S.cerevisiae* D7, další dva použité testy (*E.gracilis* a SOS Chromotest) byly zavedeny, optimalizovány a použity k analýze části vzorků. Cereální vzorky vykazovaly poměrně vysokou antimutagenní aktivitu, u žádného vzorku nebyly prokázány výrazně vyšší hodnoty. Mírně zvýšené hodnoty byly nalezeny u vloček pšeničných a špaldových a také u klíčků. U rýžových vzorků byla zaznamenána zvýšená antimutagenita u rýže Tří barev a rýže Arborio. Výsledky odpovídají hodnotám antioxidační aktivity, přímá korelace však nebyla zjištěna.
- Analýzou biologicky aktivních látek ochucených cereálních produktů bylo zjištěno, že přídatná složka ovlivňuje také výsledné množství těchto látek, zejména čokoládová a též ovocná složka. Ochucené cereálie mají také vlivem přidaných látek vyšší obsah sacharidů. Hodnota antioxidační aktivity stanovená metodou ABTS je srovnatelná s výsledky surových cereálií. Ani u ochucených cereálií nevykazovaly žádné vzorky významně vyšší antimutagenitu, hodnoty byly rovněž podobné jako u surových cereálií. V rámci dotazníkové studie byl zjištěn rozpor mezi názorem konzumentů a získanými experimentálními daty, kdy spotřebitelé považují cereální výrobky s přídavkem čokolády za nejméně zdravé, ovšem analýzou ochucených výrobků bylo zjištěno, že právě čokoládové výrobky jsou nejbohatší na obsah biologicky aktivních látek.

- Pro přípravu modelových cereálních kaší bylo vybráno šest druhů surových cereálií, ke kterým bylo přidáváno lyofilizované ovoce nebo zelenina. Kombinací cereální a ovocné/zeleninové složky docházelo ve většině případů k nárůstu obsahu biologicky aktivních látek a příprava takto ochucených cereálií se jeví jako vhodná možnost fortifikace cereálií, přičemž lyofilizací přídatné složky zůstanou zachovány aktivní látky.
- Vybranými postupy enkapsulace byly též připraveny částice, do kterých byla enkapsulována šťáva nebo extrakt získaný po rehydrataci lyofilizovaného ovoce nebo zeleniny, a to za účelem fortifikace cereálií s možností vyšší stability a postupného uvolňování aktivních látek. Pro všechny postupy byla stanovena enkapsulační účinnost a také velikost a stabilita připravených částic. Dobrou enkapsulační účinnost a zároveň stabilitu vykazovaly chitosanové částice. V tomto směru však bude potřeba nadále techniky enkapsulace přírodních látek optimalizovat.
- Vybrané odpadní cereálie – surové i enzymaticky hydrolyzované byly použity též jako substráty pro kultivaci mikroorganizmů – kvasinky *Rhodotorula glutinis*. Kombinací cereálie a vhodného enzymového preparátu aplikovaného za optimálních podmínek bylo možné získat i na odpadním substrátu významé výtěžky biomasy i průmyslově významných metabolitů – provitaminu A a D a ubichinonu. Produkovaná obohacená biomasa může být spolu se zbytky cereálního média přímo použita v krmivářství, čímž dojde k významnému zhodnocení odpadní suroviny a produkci výrobků s vysokou přidanou hodnotou.
- Závěrem lze konstatovat, že cereálie, ať už ve formě surové nebo technologicky zpracované, jsou bohatým zdrojem biologicky aktivních látek a poskytují celou řadu možností zpracování. Je možné je využít jak pro přímou konzumaci, nejlépe v rámci zdravého životního stylu populace, tak také nepřímo jako substrát pro přípravu krmiv hospodářských zvířat.

8 LITERATURA

[1] Mejía, E.G. de, Tostado, E.C., Piňa, G.L.: Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1999. vol. 441, p. 1-9.

[2] Benda, V., Babůrek, I., Žďárský, J.: *Biologie II, Nauka o potravinářských surovinách*. Praha: Vysoká škole chemicko-technologická. 2000. 195 s. [online]. [cit. 2009-11-07]. Dostupné z www: http://biomikro.vscht.cz/trp/documents/baburek/BII.pdf

[3] Lebiedzińska, A., Szefer, P.: Vitamins B in grain and cereal-grain food, soy-products and seeds. *Food Chemistry.* 2006. vol. 95, p. 116-122.

[4] Hauptvogel, P., Čičová, I., Mendel, L., Bielková, S., Magulová, M., Bieliková, M., Kraic, J., Antalíková, G., Schmidtová, L., Múčková, M., Maliar, T., Kochan, J., Bačová, H., Hozová, R.: Obilniny a pseudoobilniny – nové zdroje pre výrobu funkčných potravín (funkčné múky). Kvalita, bezpečnosť a funkčnosť primárnych potravinových zdrojov. Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany. 2005. 64 s. ISBN 80-88790-41-7.

[5] Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S. S., Webb, C.: Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2002. vol. 79, p. 131-141.

[6] Theriault, M., Caillet, S., Kermasha, S., Lacroix, M.: Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. *Food Chemistry*. 2006. vol. 98, p. 490-501.

[7] Castro-Rubio, A., García, M.C., Marina, M.L.: Rapid separation of soybean and cereal (wheat, corn, and rice) proteins in complex mixtures: Application to the selective determination of the soybean protein content in commercial cereal-based products. *Analytica Chimica Acta*. 2006. vol. 558, p. 28-34.

[8] Příhoda, J., Skřivan, P., Hrušková M.: Cereální chemie a technologie I. Cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 2003. 157 s.

[9] Kopáčová, O.: Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům (II. část). Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací. 2007. 46 s. ISBN 978 80-7271-184-0. [online]. [cit. 2013-08-07]. Dostupné z www: http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Agronavigator/Kopacova/CER%20II_web.pdf

[10] Duarte, S.C., Pena, A., Lino, C.M.: A review on ochratoxin A occurence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*. 2010. vol. 27, p. 187-198.

[11] Čepička, J., a kol.: Obecná potravinářská technologie. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 1995. 246 s.

[12] Ragaee, S., Abdel-Aal, E-S. M., Noaman, M.: Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry*. 2006. vol. 98, p. 32-38.

[13] Liu, R. H.: Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 2007. vol. 46, p. 207-219.

[14] Arranz, S., Calixto, F.S.: Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat flour and wheat bran and cereals of the diet. *Journal of Cereal Science*. 2010. vol. 51, p. 313-318.

[15] Gibson, G.R.: Food Science and Technology Bulletin - Functional Foods. *International Food Information Service*. 2008. 101 p.

[16] Li, W., Friel, J., Beta, T.: An evaluation of the antioxidant properties and aroma quality of infant cereals. *Food Chemistry*. 2010. vol. 121, p. 1095 - 1102.

[17] Kopáčová, O.: Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací. 2006. 56 s. ISBN 978 80-7271-184-0. [online]. [cit. 2013-08-07]. Dostupné z www: http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/Kopov_Cerelie%20web.pdf

[18] Albertson, A.M., Thompson, D., Franko, D.L., Kleinman, R.E., Barton, B.A., Crockett, S.J.: Consumption of breakfast cereal is associated with positive health outcomes: evidence from the National Heart, Lung, and Blood Institute Growth and Health Study. *Nutrition Research*. 2008. vol. 28, p. 744-752.

[19] Doležal, V.: Procesní a zpracovatelská technika. Funkční potraviny z alternativních cereálií. 2002. [online]. [cit. 2009-11-07]. Dostupné z www:

http://www.fs.cvut.cz/cz/U218/confer/pzt2002/netcd02/konfer/texty/oral/u009.pdf

[20] Celozrnný výrobek. [online]. [cit. 2010-02-22]. Dostupné z www:

http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76546

[21] Fardet, A., Edmond, R., Rémésy, Ch.: Is the *in vitro* antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected *in vivo*? *Journal of Cereal Science*. 2008. vol. 48, p. 258-276.

[22] Ferguson, L.R.: Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutation Research*. 2010. vol. 690, p. 3-11.

[23] Velíšek, J., Hajšlová, J.: Chemie potravin 1. 3. uprav. a rozšiř. vyd. Tábor : OSSIS. 2009. 602 s. ISBN 978-80-86659-15-2.

[24] Žilič, S., Šukalovič, V.H.-T., Dodig, D., Maksimovič, V., Maksimovič, M., Basič, Z.: Antioxidant activity of small grain cereals caused by phenolics and lipid soluble antioxidants. *Journal of Cereal Science*. 2011. vol. 54, p. 417-424.

[25] Velíšek, J.: Chemie potravin 2. 3. uprav. a rozšiř. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. 644 s. ISBN 978-80-86659-16-9

[26] Rodriguez, R.S.J., Fernandéz-Ruiz, V., Cámara, M., Sánchez-Mata, M.C.: Simultaneous determination of vitamin B1 and B2 in complex cereal foods, by reverse phase isocratic HPLC-UV. *Journal of Cereal Science*. 2012. vol. 55, p. 293-299.

[27] Vichapong, J., Sookserm, M., Srijesdaruk, V., Swatsitang, P., Srijaranai, S.: High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varietes. *LWT - Food Science and Technology*. 2010. vol. 43, p. 1325 - 1330.

[28] Dykes, L., Rooney, L.W.: Phenolic Compounds in Cereals Grains and Their Health Benefits. Texas A&M University, College Station. 2007.

[29] Gallardo, C., Jiménez, L., García-Conesa, M.-T.: Hydroxycinnamic acid composition and *in vitro* antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2006. vol. 99, p. 455-465.

[30] Lu, M., Yuan, B., Zeng, M., Chen, J.: Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Research International*. 2011. vol. 44, p. 530-536.

[31] Mattila, P., Pihlava, J., Hellström, J.: Contents of Phenolic Acids, Alkyl- and Alkenylresorcinols, and Avenanthramides in Commercial Grain Products. *J. Agric. Food Chem*. 2005. vol. 53, p. 8290-8295.

[32] Fuss, E.: Lignans in plant cell and organ cultures: An Overview. *Phytochemistry Reviews*. 2003. vol. 2, p. 307-320.

[33] Hui-zhu, Z., Fu-ping, G., Ling-rong, L., Xue-min, L., Zhi-min, Z., Xin-du, Y., Qi-qing, Z.: Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*. 2009. vol. 71, p. 19-26.

[34] Čopíková, J.: Chemie a analytika sacharidů, Praha, VŠCHT, 1997

[35] Nielsen, S. Suzanne: Food Analysis, Purdue University, 4th edition, 2009. e-ISBN 978-1-4419-1478-1.

[36] Hálková, J., Rumíšková, M., Riedlová, J.: Analýza potravin, Újezd u Brna, Ivan Straka, 2001.

[37] Davídek, J., a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravin, Praha, SNTL, 1977.

[38] Sacharidy [online]. 2009 [cit. 2009-02-12]. Dostupné z www: http://www-unix.oit.umass.edu/~mcclemen/581Carbohydrates.html

[39] Klouda P.: Moderní analytické metody. 1. vyd. Ostrava: nakladatelství Pavel Klouda, 1996

[40] Verzele, M., Simoens, G., Van Damme, F.: A critical review of some liquid chromatography systems for the separation of sugars. *Chromatographia*. 1987. vol. 23, p. 292-300.

[41] Alpert A.J.: Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*. 1990. vol. 499, s. 177.

[42] Sommer L. a kolektiv: Základy analytické chemie II. 1. vyd. VUT v Brně: nakladatelství VUTIUM, 2000

[43] Bonoli, M., Marconi, E., Caboni, M.F.: Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours: Evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. *Journal of Chromatography A*. 2004, vol. 1057, p. 1-12.

[44] Naczk, M., Shahidi, F.: Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006. vol. 41, p. 1523–1542

[45] Hosseinian, F.S., Mazza, G.: Triticale bran and straw: Potential new sources of phenolic acids, proanthocyanidins, and lignans. *Journal of Functional Foods*. 2009. vol. 1,p. 57-64.

[46] Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C.: Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*. 2004. vol. 1054, p. 129-141.

[47] Sommer, L., a kol.: Základy analytické chemie II. 1. vyd. Brno: VUTIUM. 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0

[48] Kivelä, R., Sontag-Tsrohm, T.: Degradation of cereal beta-glucan by ascorbic acid induced oxygen radicals. *Journal of Cereal Science*. 2009. vol. 49, p. 1-3.

[49] Weng, H., Morimoto, K.: Differential responses to mutagens among human lymphocyte subpopulations. Minireview. *Mutation Research*. 2009. vol. 672, p. 1-9.

[50] Figueirinha, A., Paranhos, A., Peréz-Alonso, J.J., Santos-Buelga, C., Batista, M.T.: Cymbopogon citratus leaves: Characterization of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chemistry*. 2008. vol. 110, p. 178-728.

[51] Bao, H., Ren, H., Endo, H., Takagi, Y., Hayashi, T.: Effects of heating and the addition of seasonings on the anti-mutagenic and anti-oxidative activities of polyphenols. *Mut. Research*. 2004. vol. 86, p. 517-524.

[52] Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M.: Antioxidant in Food - Practical Applications, Woodhead Publishing 380, 2001.

[53] Wand, D., Kreutzer, D.A., Essigmann, J.M.: Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies usind defined lessions. *Mut. Research*. 1998. vol. 400.

[54] Arts, M.J.T.J., Dallinga, J.S., Voss, H.P., Haenen, G.R.M.M, Bast, A.: A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry*. 2004. vol. 88, p. 567-570.

[55] Griffin, S.P., Bhagooli, R.: Measuring antioxidant potential in coral using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2004. vol. 302, p. 211.

[56] Pratt, D.E., Miller, E.E.: A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts (*Arachia hypogoea*). *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1984. vol. 61, p. 1064.

[57] Miller, H.E.: A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1971. vol. 48, p. 91.

[58] Fukumoto, L.R., Mazza, G.: Assessing and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2000. vol. 48, p. 3597.

[59] Hassimoto N.M.A., Genovese M.I., Lajolo F.M.: Antioxidant activity of dietary fruits, Vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005. vol. 53, p. 2928-2935.

[60] Pedersen, C.B., Kyle, J., Jenkinson, A., Gardner, P.T., McPhail, D.B., Duthie, G.G.: Effects of blueberry and cranberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of healthy female volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2000. vol. 54, p. 405-408.

[61] Rapta, P., Mišík, V., Staško, A., Vrábel, I.: Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: An EPR spectroscopy and cyclic voltametry. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995. vol. 18, p. 901-908.

[62] Peyrat-Maillard, M.N., Bonnely, S., Berset, C.: Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta*. 2000. vol. 51, p. 709.

[63] Escarpa, A., Morales, M.D., González, M.C.: Analytical performance of commercially available and unavailable phenolic compounds using real samples by high-performance liquid chromatography-diode-array detection. *Analytica Chimica Acta*. 2002. vol. 450, p. 61-72.

[64] Vymětalová, V.: Biologie pro biomedicínské inženýrství. 1. vyd. Praha : České vysoké učení technické v Praze, 2008. 79 s. ISBN 978-80-01-04013-3.

[65] Mocová, K.A.. Genotoxicita. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. 2011. 10 s. [online]. [cit. 2012-06-12]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/studijni_materialy/Ekotox/09_Genotoxicita_web.pdf

[66] Bronzetti G., Della Croce C.: The role of short time test in antimutagenic investigations. *J. Environ. Path. Toxicol. Oncol.* 1993.

[67] Creighton, T.E.: Encyclopedia of Molecular Biology. 1st edition. New York: John Wiley and Sons, 1999. 620 s. ISBN 0471166618.

[68] Soukupová, M., Soukup, F.: Kapitoly z lékařské biologie a genetiky II. 1. vyd. Praha: Karolinum - nakladatelství Univerzity Karlovy, 1997. 100 s. ISBN 382-228-97.

[69] Li A.P., Heflich R.H.: Genetic toxicology, *CRC press* 1991.

[70] Bronzetti G.: Antimutagens in food, *Trends in Food Science and Technology.* 1994. vol. 5, 390-395.

[71] Abdulovic, A., Kim, N., Jinks-Robertson, S.: Mutagenesis and the three R´s in yeast. *DNA Repair*. 2006. vol. 5, p. 409-421.

[72] Villa, P., Markaki, P.: Aflatoxin B_1 and ochratoxin A in breakfast cereals from athens market: Occurence and risk assessment. *Food Control*. 2009. vol. 20, p. 455-461.

[73] Selecký, R., Šmogrovičová, D.: Mutačné šĺachtenie pivovarských kvasinek pre produkciu nealkoholického piva. *Chemické Listy*, 2004, roč. 98, č. 8, p. 693.

[74] Zimmermann, F.K., et.al.: Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*. 1984. vol. 133., p. 199-244.

[75] Malachová, K.: Mutagenita a karcinogenita kontaminant životního prostředí: Spisy přírodovědecké fakulty ostravské univerzity. 1. vyd. Ostrava : OFTIS, 1993. 110 s. ISBN 80-7042-707-8.

[76] Abdillahi, H.S., Verschaeve, L., Finnie, J.F., Staden, J.V.: Mutagenicity, antimutagenicity and cytotoxicity evaluation of South African *Podocarpus* Species. Journal of Enthopharmacology. 2012. vol. 139, p. 728-738.

[77] Dobiáš, L.: Úvod do buněčné a molekulární biologie, učební texty k přednáškám, Ostrava, 1996.

[78] Norman, A., Hansen, L.H., Sörensen, S.J.: A flow cytometry-optimized assay using an SOS-green fluorescent protein (SOS-GFP) whole-cell biosensor for the detection of genotoxins in complex environments. *Mutation Research*. 2006. vol. 603, p. 164-172.

[79] Frassinetti, S., Barberion, C., Caltavuturo, L., Fava, F., Gioia, D.D.: Genotoxicity of 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate mixtures by the use of *Saccharomyces cerevisiae* D7 mutation assay and use of this text to evaluate the efficiency of biodegradation treatments. *Ecotoxicology nad Environmental Safety*. 2001. vol. 74, p. 253-258.

[80] Křížová, L. a kol.: Protective effect of sodium selenite on ofloxacin-induces loss of chloroplast DNA in *Euglena gracilis*. *Folia Microbiol*. 1996. vol. 41, p. 329-332.

[81] Lah, B., Žinko, B., Tišler, T., Marinšek-Logar, R.: Genotoxicity detection in Drinking Water by Ames Test, Zimmermann Test and Comet Assay. *Acta Chim. Slov*. 2005. vol. 52, p. 341-348.

[82] Pohlová, H., Rössner, P.:Indirect mutagen assay in human lymphocyte in presence of a metabolic activation system. *J. Hyg. Epid. Micro. Immun.* 1986. vol. 30, p. 371-376.

[83] Countryman, P.I., Heddle, J.A.: Production of micronuclei from chromosome-aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*. 1976. vol. 41, p. 321-331.

[84] Kirsch-Volder, M.: Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1997. vol. 392, p. 1-4.

[85] Food Fortification: Technology and Quality Control. Food and Agriculture Organization of The United Nations [online]. Italy, 1995 [cit. 2011-12-13]. Dostupné z: <http://www.fao.org/>.

[86] Kopáčová, O.: Zdravotní aspekty fortifikace potravin kyselinou listovou. Agronavigátor [online]. 2003 [cit. 2012-03-24]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/attachments/Fortifikace_potravin.pdf>.

[87] Hamaker, E., Bruce, R.: Technology of functional cereal products. Cambridge: *Woodhead Publ.*, 2008. ISBN 978-184-5691-776

[88] Budoucnost funkčních potravin. Budoucnost funkčních potravin [online]. 2004 [cit. 2011-12-06]. <Dostupné z: http://www.agronavigator.cz/>.

[89] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin. Úřední věstník Evropské Unie [online]. 2006 [cit. 2011-12-04]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/cs/index.htm>.

[90] Wesley, A., Ranum, P.: Vitamin and mineral fortification of wheat flour and maize meal. *Food and Nutrition Bulletin* [online]. 2010, roč. 31, č. 1 [cit. 2012-03-20]. ISSN 0379-5721. Dostupné z: <http://www.sph.emory.edu/wheatflour/KEYDOCS/MI_Fort_handbook.pdf>.

[91] Hill, G.M.: The impact of breakfast especially ready-to-eat cereals on nutrient intake and health of children. *Nutrition Research* [online]. 1995, roč. 15, č. 4 [cit. 2012-01-03]. ISSN 0271-5317. DOI: 10.1016/S0271-5317(95)80003-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0271531795800034>.

[92] Reilly, C.: Too much of a good thing? The problem of trace element fortification of foods. *Trends in Food Science* [online]. 1996, roč. 7, č. 4, p. 139-142 [cit. 2011-11-24]. ISSN 09242244. DOI: 10.1016/0924-2244(96)20002-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0924224496200020>.

[93] Schwartz, M.B., Vartanin, L.R., Wharton, C.M., Brownell, K.D.: Examining the Nutritional Quality of Breakfast Cereals Marketed to Children. *Journal of the American Dietetic Association* [online]. 2008, roč. 108, č. 4 [cit. 2011-10-25]. ISSN 0002-8223. DOI: 10.1016/j.jada.2008.01.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002822308000047>.

[94] Yu, L.: *Wheat Antioxidants*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2008, 276 s. ISBN 04-700-4259-1.

[95] Flours and cornmeal fortification. *World Food Programme* [online]. 2009 [cit. 2012-03-15]. Dostupné z: <http://foodquality.wfp.org/FoodProcessing/Cerealmilling/Fortification/tabid/337/Default.aspx >.

[96] Nedovic, V., Kalusevic, A., Manoljovic, V., Levic, S., Bugarski, B.: An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*. 2011. vol. 1, p. 1806-1815.

[97] Zuidam, N.J., Nedovič, V.A.: Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. *Springer Science*. 2010. 400 s. ISBN 978-1-4419-1007-3.

[98] Webster, T.J.: Safety of Nanoparticles From Manufacturing to Medical Applications [online]. *Springer Science*. 2009. 239 s. ISBN 978-0-387-78607-0.

[99] Uludag, H., Vos, P.D., Tresco, P.A.: Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2000. vol. 42, p. 29-64.

[100] Sowasod, N., Nakagawa, K., Tanthapanichakoon, W., Charipanitkul, T.: Development of encapsulation technique for curcumin loaded O/W emulsion using chitosan based cryotropic gelation. *Materials Science and Engineering*: C. 2012., vol. 32, p. 790-798.

[101] Crabielle-Madelmont, C., Lesieur, S., Ollivon, M.: Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2003. vol. 56, p. 189-217.

[102] Králová, B., Fukal, L., Rauch, P.: Bioanalytické metody. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.

[103] Horáková, D., Němec M., Szostková M.: Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií. Brno, Masarykova univerzita, 2007, Dostupné z: <http://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3074288/Labor.cv.z_fyziol.bakterii_upravene.pdf>.

[104] Haki, G.D., Rakshit, S.K.: Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 2003. vol. 89, p. 17-34.

[105] Viniegra-González, G., et al.: Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 2003, vol. 13, p. 157-167

[106] Maheshwari, R. et al.: Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000. vol. 64, p. 461-488.

[107] Rajeev, K Sukumaran; Reeta, Rani Singhania; Ashok, Pandey. Microbial cellulases - Production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2005. vol. 64, p. 832-844.

[108] Rao,M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V: Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 1998. vol. 62, p. 597–635.

[109] Howard R.L. et al.: Review Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*. 2003. vol. 2, p. 602-619.

[110] Vodrážka, Z.; Káš, J.; Rauch, P.: Enzymologie. 3. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1998. 171 s. ISBN 80-708-0330-4.

[111] Souza, P.S., Magalhães, P.O.: Application of microbial amylase in industry - a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010. vol. 41, p. 850-861.

[112] Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S.: Microbiol xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2001, vol. 56, p. 326–338.

[113] Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C.: Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*, 2004. vol. 1054, s. 129-141.

[114] Dadáková, E, Procházková, E., Křížek, M.: The method of quantitative analysis of quercetin in plant material, *Electrophoresis*. 2001. vol. 22, s. 573 - 578.

[115] *Český lékopis 2009*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 1176 s. ISBN 978-802-4729-947.

[116] Dvorakova, M., Moreira, M.M., Dostalek, P., Skulilova, Z., Guido, L. F., Barros, A.A.: Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barley and malt by liquid chromatography–ultraviolet detection–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008.vol. 1189, s. 398-405.

[117] Chang, Ch.Ch., Ming-Hua, Y., Hwei-Mei, W., Jiing-Chuan, Ch.: Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002. vol. 10, s. 178-182.

[118] Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O.: *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006. 258 s. ISBN 80-7080-586-2.

[119] Márová I., Vránová D.: *Praktikum z biochemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2002.

[120] Euglena gracilis medium, Jaworského médium: www.ccap.ac.uk/media/EG_JM.pdf, [cit. 25.09.2013].

[121] Chae, S.R, Hwang, E.J., Shin, H.S.: Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. *Bioresource Technology*. 2006. vol. 97, s. 322-329.

[122] Sowmya, R., Sachindra, N.M.: Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing by products by in vitro assays and in membrane model system. *Journal of Food Chemistry*. 2012. vol. 134, s. 308-314.

[123] Blanda, G., Cerretani, L., Bendini, A., Cardinali, A., Lercker, G.: Phenolic content and antioxidant capacity versus consumer acceptance of soaked and vacuum impregnated frozen nectarines. *European Food Research and Technology*. 2009, vol. 42, s. 30-36.

[124] Almajano, M.P., Delgado, M.E., Gordon, M.H.: Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate. Food Chemistry. 2007. vol. 101, p. 126-130.

[125] Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické listy*. 2004. vol. 98, s. 147-149.

[126] Mohdaly, A.A.A., Smetanska, I., Ramadan, M.F., Sarhan, M.A.,, Mahmoud, A.: Antioxidant potential of sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. *Industrial Crops and Products*. 2011. vol. 34, p. 952-959.

[127] Sowmya, R., Sachindra, N.M.: Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing by products by in vitro assays and in membrane model system. *Food Chemistry*. 2012. vol. 134, p. 308-314.

[128] Godevac, D., Vujisic, L., Mojovic, M., Ignjatovic, A., Spasojevic, I., Vajs, V.: Evaluation of antioxidant capacity of *Allium ursinum* L. volatile oil and its effect on membrane fluidity. *Food Chemistry*. 2008. vol. 107, p. 1692-1700.

[129] Bandyopadhyay M., Chakraborty, R., Raychaudhuri, U.: Antioxidant activity of natural plant sources in dairy dessert (Sandesh) under thermal treatment. *LWT - Food Science and Technology*. 2008. vol. 41, p. 816-825.

[130] Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., Valdivia-López, M.A.: Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*. 2008. vol. 107, p. 656-663.

[131] Zhong, Y., Shahidi, F.: Lipophilised epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives and their antioxidant potential in food and biological system. *Food Chemistry*. vol. 131, p. 22-30.

[132] Reddy, V., Urooj, A., Kumar, A.: Evaluation of antioxidant activity of some plant extract and their application in biscuit. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*. 2005. vol. 90, p. 317-321.

[133] Puglia, C., Bonina, F., Rizza, L., Merloti, E., Mariani, P., Ravani, L.: Evaluation of percutaneous absorption of naproxen from different liposomal formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010, vol. 99, s. 2819–2829. ISSN 00223549.

[134] Szoka, F., Papahadjopoulos, D.: Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 1978. vol. 9, p. 4194-4198.

[135] Dustgani, A., Farahani Vasheghani, E., Imani, M.: Preparation of chitosan nanoparticles loaded by Dexamethose sodium phosphate. *Iranian Journal of Pharmaceutical Science*. 2008. vol. 4, p. 111-114.

[136] Li, P., Dai, Y.-N., Zhang, J.P., Wang, A-Q, Wei, Q.: Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. *International Journal of Biomedical Science*. 2008. vol. 4, s. 221-228.

[137] Králová, B., Fukal, L., Rauch, P.: Bioanalytické metody. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.

[138] Zeta potential [online] [cit. 2013-08-23]. Dostupné z:
http://www.tappi.org/content/events/11BIMSPR/papers/Yu.pdf

[139] Detloff, T., Sobisch, T., Lerche, D.: Particle size distribution by space or time dependent extinction obtained by analytical centrifugation (concentrated system). *Powder Technology*. 2007. vol. 174, p. 50-55.

[140] Hung, P.V., Morita, N.: Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities. *Food Chemistry.* 2008. vol. 109, s. 325-331.

[141] Liu, R. H.: Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science.* 2007. vol. 46, s. 207-219.

[142] Gibson, G.R.: *Food Science and Technology Bulletin – Functional Foods*. International Food Information Service. 2008. 101 s. ISBN 978-0-86014-175-4.

[143] Kadlec P., a kolektiv: *Technologie sacharidů*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, fakulta potravinářské a biochemické technologie. 2000. 138s. ISBN 80-7080-400-9.

[144] Hamaker, B.R.: *Technology of functional cereal products*. Cambridge: Woodhead Publ., 2008. ISBN 978-184-5691-776.

[145] Yu, L.: *Wheat antioxidants*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2008, 276 s. ISBN 04-700-4259-1.

[146] Manach, C., Scalbert, A., Morand Ch., Rémésy, Ch., Jiménez, L.: Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, vol. 74, ISSN 1938-3207.

[147] Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A.: Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2002. vol. 76, s. 560-568.

[148] Nöthlings, U., Murphy, S.P., Wilkens, L.R., Henderson, B.E., Kolonel, L.N.: Flavonols and pancreatic cancer risk - The multiethnic cohort study. American Journal of Epidemiology. 2007. vol. 166, s. 924-931.

[149] Kong, S., Lee, J.: Antioxidants in milling fractions of black rice cultivars. Food Chemistry. 2010. vol. 120, s. 278-781.

[150] Iswaldi, I., Goméz-Caravaca, A.M., Lozano-Sanchéz, J., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A.: Profiling of phenolic and other polar compounds in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Research International*. 2013. vol. 50, s. 77-8.

[151] Tokusoglu, O., Hall, C.: *Fruit and cereal bioactives*: *sources, chemistry, and applications*. Boca Raton: CRC Press, 2011, 459 s. ISBN 978-143-9806-654.

[152] Mortelmans, K., Riccio, E.S.: The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis*. 2000. vol. 455, s. 61-69.

[153] Dobiáš, J.: Technologie zpracování ovoce a zeleniny I. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 2004. [online]. [cit. 2013-07-02]. Dostupné z:

http://www.vscht.cz/ktk/www_324/studium/OZ/zelenina_1.pdf.

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Senzoricko-spotřebitelský dotazník

10 PŘÍLOHY

Příloha č. 1 Senzoricko-spotřebitelský dotazník

Spotřebitelský dotazník – cereální výrobky

1. pohlaví: □ muž □ žena

2. věk:

3. Dosažené vzdělání:
   - □ □ základní
   - □ □ vyučený/á bez maturity
   - □ □ vyučený/á s maturitou
   - □ □ střední, s maturitou
   - □ □vysokoškolské

4. Ve svém jídelníčku preferuji stravu:
   - □ smíšenou, bez omezení
   - □ vegetariánskou/veganskou
   - □ bezlepkovou
   - □ jinou *(prosím doplňte)*:

5. Co si představujete pod pojmem „obilné (cereální) výrobky“:

6. Které cereální výrobky kupujete *(uveďte prosím aspoň 3, na které si vzpomenete – neuvádějte prosím chléb a bílé pečivo)*:

7. Proč kupujete právě tyto výrobky:

8. Obilné (cereální) výrobky nakupuji nejvíce v:
   - □ supermarketech/hypermarketech
   - □ menších obchodech
   - □ specializovaných prodejnách (zdravá výživa)

9. Rozhodujete se při výběru výrobku v obchodě podle vzhledu obalu:
   - □ ano, pokud mě obal zaujme, výrobek koupím
   - □ spíše ano
   - □ spíše ne
   - □ ne, kupuji přece obsah

10. Souhlasíte s tvrzením, že čím hezčí/zajímavější obal, tím kvalitnější výrobek:
    - □ ano, souhlasím
    - □ spíše ano
    - □ spíše ne
    - □ ne, nesouhlasím

11. Čtete si složení výrobku na obalu, který se chystáte koupit poprvé:
    - □ ano, vždy
    - □ skoro vždy
    - □ spíše náhodně
    - □ nikdy

12. Věříte údajům o jednotlivých složkách, ze kterých se výrobek skládá
    - □ ano, výrobce má povinnost je řádně uvádět
    - □ spíše ano
    - □ spíše ne
    - □ ne, nevěřím

13. Je pro Vás rozhodující cena konkrétního výrobku:
    - □ ano
    - □ spíše ano
    - □ spíše ne
    - □ ne

14. Rozhodnutí koupit konkrétní výrobek poprvé je u Vás ovlivněno hlavně:
    - □ reklamou v televizi, rádiu, na internetu
    - □ nabídkou v „akčních/slevových letácích“ jednotlivých společností
    - □ reklamou přímo v obchodě (ochutnávky, obrázkové cedule,…)
    - □ doporučením od známých, příbuzných, přátel
    - □ jiné *(prosím uveďte)*:

15. Kolik utratíte pro sebe **měsíčně** za obilné výrobky:
    - □ 0,- Kč, obilné výrobky nekupuji, stravuji se jinak
    - □ 10-100,- Kč
    - □ 101-200,- Kč
    - □ 201-300,- Kč

- □ 301-400,- Kč
- □ nad 401,- Kč

16. Ke kterému jídlu jíte obilné výrobky nejčastěji:
- □ snídaně
- □ oběd
- □ večeře
- □ svačina
- □ jindy *(prosím uveďte)*:

17. Myslíte si, že jsou obilné výrobky zdravé:
- □ ano
- □ spíše ano
- □ spíše ne
- □ ne

18. Která složka je dle Vás nejvíce zastoupena v obilných výrobcích:
- □ cukry
- □ tuky
- □ bílkoviny
- □ vláknina
- □ jiné *(prosím uveďte)*:

19. Označte složku, která podle Vás nejvíce přispívá ke zdraví prospěšným účinkům obilných výrobků:
- □ cukry
- □ vláknina
- □ přirozené složky cereálií (vitaminy skupiny B, antioxidanty)
- □ přidané složky v některých typech (oříšky, čokoláda, kokos, med)
- □ přídavek sušeného ovoce, rozinek

20. Prosím seřaďte výrobky dle škály 1 – 9 (nejzdravější – nejméně zdravé):
- □ ovesné vločky
- □ müsli tyčinka, ovocná
- □ corn flakes (cereální lupínky)
- □ müsli tyčinka, čokoládová
- □ obilné polštářky, skořicové
- □ müsli přírodní, nedoslazované
- □ obilné kuličky, čokoládové
- □ cereální chlebové plátky
- □ müsli zapečené, slazené

21. Preferujete obilné výrobky:
- □ bez příchutě (např. ovesné vločky)
- □ s příchutí (např. müsli tyčinky)

11 ŽIVOTOPIS

Jméno a příjmení: Andrea Lichnová
Datum narození: 13.6.1985
Adresa: Janovice - Bystré 380, 739 11, Frýdlant nad Ostravicí

Vzdělání

1991 - 2000 Základní škola Janovice

2000 - 2004 Gymnázium a Střední odborná škola T.G.Masaryka, Frýdek - Místek
obor: gymnázium

2004 - 2007 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická
bakalářské studium zakončeno státní zkouškou, titul Bc., téma bakalářské práce: Studium antimutagenních/genotoxických vlastností ovocných a bylinných čajů

2007 - 2009 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická
magisterské studium zakončeno státní zkouškou, titul Ing., téma diplomové práce: Studium aktivních látek ve vybraných druzích medu

2009 - 2013 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická
doktorské studium, státní doktorská zkouška složena dne 20.9.2012, téma dizertační práce: Cereálie - aktivní složky, biologické účinky a vybrané aplikace v potravinářství

Zahraniční stáž
Místo: Lund University, Department of Food Technology, Engineering and Nutrition, Sweden
Doba: 13.2.2012 - 4.7.2012
Projekt: Treatment of plant tissues with nanosecond pulsed electric fields

Absolvované kurzy
20. - 24.9.2010 11. ročník Školy hmotnostní spektrometrie
22. - 26.11.2010 Kurz základů vědecké práce - AV ČR Brno

Pedagogická činnost
2009/2010, 2013/2014, zimní semestr - Praktikum z biochemie
2010/2011, 2011/2012, 2012/2013 zimní semestr - Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy

Granty:
Grant 2B08057 -NPV II: Vývoj moderních metod pro hodnocení autenticity "českého piva", MŠMT, 2008 – 2011; člen řešitelského týmu

FRVŠ/G4: Produkce směsných plísňových enzymových preparátů k úpravě odpadních substrátů (datum zahájení 1.1.2011, datum ukončení 31.12.2011, hlavní řešitelka)

CMV - Centrum materiálového výzkumu, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně (člen řešitelského týmu)

12 PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Časopisy s IF

- Lichnová A., Márová I., Valentová R., Matoušková P.: **Antimutagenic properties of several kinds of rice as tested upon yeast strain *S.cerevisiae* D7**. *Acta Alimentaria*, accepted 6.12.2012. IF 0,600

- Lichnová A., Márová I., Hurtová J., Matoušková P.: **Antimutagenic and antioxidant properties of raw cereals and cereal products**. *Plant Food for Human Nutrition*, v recenzním řízení.

- Obruča S., Márová I., Matoušková P., Hároniková A., Lichnová A.: **Production of lignocellulose-degrading enzymes employing *Fusarium solani* F-552.** *Folia Microbiologica* 2012, Volume: 57 Issue: 3 Pages: 221-227 DOI: 10.1007/s12223-012-0098-5. IF 0,930

- Obruča S., Matoušková P., Márová I., Lichnová A., Pospíšilová A., Čertík M.: **Production of enzyme cocktails for hydrolysis of complex waste substrates**. *Chemické Listy* 105, 2011, p.1021 -1022. ISSN 0009-2770.

Užitný vzor

- Márová I., Obruča S., Lichnová A.: **Příprava částic na bázi mikrobiálních polymerů s enkapsulovanými látkami s funkcí přírodního UV filtru**. Užitný vzor, přihláška č. 1090231 – 08211 VUT v Brně, zapsáno 2012.

Příspěvky ve sbornících s plným uvedením textu:

- Matoušková P., Lichnová A., Patočková K., Benešová P., Hurtová J., Obruča S., Márová I.: **Use of physical-chemical methods to analysis of organic micro- and nanoparticles with encapsulated caffeine**. Proceedings, CECE 2012 (9th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis), pp.295-299, 2012. ISBN: 978-80-904959-1-3.

- Duroňová K, Lichnová A., Márová I., Čertík M.: **Study of molecular changes in surface layers of apples stored in different conditions**. 62. sjezd asociací českých a slovenských chemických společností, Pardubice, 28.-30.6.2010. *Chemické Listy* 104(6): p.573-574, 2010.

- Lichnová A., Vondráčková H., Márová I.: **Determination of phenolic compounds in cereal products**: 62. sjezd asociací českých a slovenských chemických společností, Pardubice, 28.-30.6.2010. *Chemické Listy* 104(6): p.574-575, 2010.

- Lichnová A., Vondráčková H., Márová I.: **Determination of phenolic glycosides and aglycons in cereal products**. XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů: 1.-2.4.2010, Brno. Sborník příspěvků, str.62-64. ISBN 978-80-210-5164-5.

- Lichnová A., Hurtová J., Márová I.: **Analysis of antioxidant and antimutagenic properties of selected kinds of cereals.** Hygiena a technologie potravin - XLIII. Lenfeldovy a Höklovy dny, Brno 2013. Přijato k prezentaci, 2.-3.10. 2013, 4 str.

Mezinárodní konference –abstrakty:

- Márová I., Matoušková P., Lichnová A., Milotová J.: **Influence of sample processing on values of lipoxygenase activity in barley grain**. 7th CRF (International Conference on Chemical reaction in Foods), November 14-16, 2012, Praha. Book of abstracts, p.176, 2012. ISBN 978-80-7080-836-8.
- Lichnová A., Obruča S., Márová I., Pařilová K.: **Encapsulation of selected polyphenols into micro- and nanoparticles**. 5th International Conference on Polyphenols, 17.-20.10.2011, Sitges-Barcelona, Španělsko, Proceedings, p.164-165.
- Pařilová K., Márová I., Benešová P., Lichnová A.: **Analysis of polyphenols in lager beers of different origin: a contribution to beer authenticity determination**. 5th International Conference on Polyphenols, 17.-20.10.2011, Sitges-Barcelona, Španělsko. Proceedings, p.139.
- Lichnová A., Valentová R., Márová I.: **Determination of phenolic glycosides and aglycons in selected kinds of rice.** 5th Chemistry and Life, 14-16.9.2011, Brno. Chemické Listy 105, 2011, p.1016. ISSN 0009-2770.
- Lichnová A., Jašková M., Márová I.: **Determination of active compounds in instant baby teas**. 5th Chemistry and Life, 14-16.9.2011, Brno. Chemické Listy 105, 2011, p.1016 -1017. ISSN 0009-2770.
- Márová I., Obruča S., Lichnová A., Cihlářová Z., Pařilová K., Pekař M.: **Nanoencapsulation of beer phenolics**. 5th Chemistry and Life, 14-16.9.2011, Brno. Chemické Listy 105, 2011, p.1020. ISSN 0009-2770.
- Márová I., Matoušková P., Hároniková A., Pospíšilová A., Čertík M., Obruča S., Lichnová A., Duroňová K.: **Use of *A.pullulans* exoenzyme complex to waste substrate processing for carotenoid production by red yeasts.** 39th Annual Conference on Yeasts, May 3-6, 2011, Smolenice, SR. Book of abstracts, p.83, 2011. ISSN 1336-4839.
- Márová I., Matějková M., Duroňová K., Lichnová A., Pařilová K.: **Influence of long-term freezing on polyphenols content in some local berries.** 11th International Nutrition and Diagnostics Conference INDC 2011, 28.8.-1.9., Brno. Book of Proceedings, p. 108. ISBN 978-80-7395-378-2.
- Pařilová K., Márová I., Jašková M., Duroňová K., Lichnová A.: **Analysis of biologically active substances in some baby beverages**. 11th International Nutrition and Diagnostics Conference INDC 2011, 28.8.-1.9., Brno. Book of Proceedings, p. 109. ISBN 978-80-7395-378-2.
- Márová I., Obruča S., Lichnová A., Pekař M.: **Study of micro- and nanoencapsulation of beer phenolics**. Nanocon 2011, Brno, 21.-23.9.2011. Conference proceedings, p.78. ISBN 978-80-87294-23-9.

- Matoušková P., Obruča S., Márová I., Lichnová A.: **Production and characterization of lignocellulose degrading enzyme cocktail from selected fungal strains**. Proceedings, XIII. Meeting of Biochemists and Molecular Biologists, Brno, 2011. p.84.
- Márová I., Gojkovič Ž., Lichnová A., Vondráčková H., Petrik S., Dvořáková T.: **Analysis of phenolic content and antimutagenic properties in selected cereal products**. 10th International Nutrition and Diagnostics Conference. 2010, Proceedings, p. 86. ISBN 978-80-7395-257-0.
- Duroňová K., Lichnová A., Pařilová K., Márová I.: **Study of antimutagenic effect of „Czech beer" using test system *Saccharomyces cerevisiae* D7**. 38th Annual Conference on Yeasts. May 11-14, 2010, Smolenice (Slovakia). Proceedings, p.91-91. ISSN 1336-4839.
- Lichnová A., Vondráčková H., Obruča S., Matoušková P., Hároniková A., Márová I.: **Comparison of hydrolytic aktivity of some yeast and fungal extracellular enzymes to cereal waste substrates: a preliminary study**. 38th Annual Conference on Yeasts. May 11-14, 2010, Smolenice (Slovakia). Proceedings, p.92-92. ISSN 1336-4839.
- Lichnová A., Márová I., Vondráčková H., Obruča S.: **Analysis of Phenolic Compounds in Cereals by LC/MS**. 16th International Symposium on Separation Science, September 6-10, 2010, Rome (Italy). Book of Abstracts (Proceedings), P91, p.166, 2010.
- Duroňová K., Márová I., Lichnová A.: **Analysis of flavonoids in honey of different origin by LC/MS/ESI.** 8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th ISSS Symposium, September 2-4, 2010, Siofok (Hungary). Book OF abstracts, P-106 p.180-181. ISBN 978-963-06-7878-0.
- Márová I., Gojkovič Ž., Lichnová A., Vondráčková H., Petrik S., Dvořáková T.: **Analysis of phenolic content and antimutagenic properties in selected cereal products**. 10th International Nutrition and Diagnostics Conference. 2010, Proceedings, p. 86. ISBN 978-80-7395-257-0.
- Duroňová K., Lichnová A., Márová I.: **Use of *Saccharomyces cerevisiae* D7 test system to study of antimutagenicity/genotoxicity of several kinds of honey**. 37th Annual Conference on Yeasts; Smolenice (Slovakia), 13 – 15 May, 2009. Book of Abstracts, p.100, 2009. ISSN 1336-4839.
- Dvořáková T., Lichnová A., Duroňová K., Skutek M., Obruča S., Márová I.: **Antioxidant and antimutagenic properties of several kinds of cereals with honey**. 9th International Conference Vitamins, Nutrition and Diagnostics, Brno 2009. Book of Abstracts, p.166-167. ISBN 978-80-7318-809-2.

Tuzemské konference

- Lichnová A., Vondráčková H., Hurtová J., Márová I.: **Analysis of phenolic compounds in some cereal products**. XL. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr, 3.5.-5.5.2010. Sborník příspěvků, str.44-45., p.261 ISSN 1802-1433.