



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# VÝVOJ A TESTOVÁNÍ PŘÍRODNÍCH SLOŽEK POTRAVIN PRO DĚTSKOU VÝŽIVU

DEVELOPMENT AND TESTING OF NATURAL FOOD COMPOUNDS FOR INFANTS' NUTRITION

## DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Julie Hoová

## ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2022

## Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií Akademický rok: 2022/23  
Studentka: Ing. Julie Hoová  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie  
Vedoucí práce: prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

### Název dizertační práce:

VÝVOJ A TESTOVÁNÍ PŘÍRODNÍCH SLOŽEK POTRAVIN PRO DĚTSKOU VÝŽIVU

### Zadání dizertační práce:

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

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

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

## Termín odevzdání dizertační práce: 13.11.2022:

---

Ing. Julie Hoová  
studentka

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.9.2021

---

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Předložená disertační práce se zabývá vývojem a testováním přírodních složek potravin pro dětskou výživu. V rámci práce byly vybrány skupiny rostlinných potravin, které byly zkoumány z nutričního hlediska, a také na obsah biologicky významných látek, zejména látek s antioxidačním a antimikrobiálním účinkem. Z hlavních nutrientů byl sledován celkový obsah sacharidů, redukující cukry, nerozpustná vláknina, zastoupení celkového dusíku a profil mastných kyselin. Ve vybraných vzorcích byl poté sledován obsah vitaminů a provitaminů, celkových fenolických látek, flavonoidů, antioxidační kapacita, přírodní barviva, množství fruktanů a  $\beta$ -glukanů, organické kyseliny. Za účelem vyhodnocení antimikrobiálního účinku byla sledována interakce materiálů s příslušnými zástupci buněk. Bezpečnost přípravků byla hodnocena pomocí testů cytotoxicity na humánních buněčných liniích HaCaT a Caco-2.

Za účelem zvýšení stability a maskování nevhodných senzorických vjemů byla zařazena enkapsulace vybraných extraktů do nanočástic, zejména liposomů o různém složení. U těchto částic byla sledována distribuce velikosti, uniformita, zeta potenciál, enkapsulační účinnost a postupné uvolňování aktivních složek. Slunečnicový a sójový lecithin byl vyhodnocen jako nejvhodnější pro přípravu liposomů.

V další části práce byly kultivovány vybrané kmeny probiotických bakterií, u kterých byl sledován vliv použitých technik enkapsulace na jejich viabilitu. Poté byl sledován vliv přítomnosti některých látek rostlinného původu na probiotickou viabilitu, a to i v podmínkách modelového trávení. V rámci stanovení viability byly využity techniky kultivační, ale i průtoková cytometrie. Na základě získaných výsledků byly vybrány extrakty rostlinného původu bohaté na množství biologicky významných látek s pozitivním vlivem na lidský organismus i na metabolismus probiotických bakterií. Vhodnou kombinací se v této práci jevil zejména mladý ječmen s vybranými zástupci laktobacilů a bifidobakterií.

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

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

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

## **ABSTRACT**

The presented doctoral thesis is focused on development and testing of natural compounds for infant's nutrition. Selected groups of plant-based food were examined from nutritional point of view, as well as regarding the content of biologically active compounds, especially compounds with antioxidant and antibacterial activity. As basic nutrients were measured following groups of compounds: total saccharides, reducing sugars, insoluble fiber, total nitrogen, and fatty acid profile. Moreover, content of specific vitamins and provitamins, total phenolic compounds, flavonoids, antioxidant capacity, natural pigments, fructans,  $\beta$ -glucans and organic acids were determined in selected samples. The evaluation of antimicrobial effect was studied via interaction with appropriate types of microbial cells. The safety of tested materials was verified by cytotoxicity tests using human cell lines HaCaT and Caco-2.

In next part of present work, encapsulation techniques were applied to enhance stability and consumer acceptance of natural extracts. Materials were encapsulated into nanoparticles, especially into liposomes of different composition. Size distribution, uniformity, zeta potential, encapsulation efficiency and release control were monitored. Sunflower and soya bean lecithin were determined as the most suitable for preparation of stable liposomes.

Further part of the study was focused on the role of probiotics in infant's nutrition. Selected probiotic strains were cultivated and the influence of the encapsulation techniques and presence of plant extracts on probiotic viability were examined in natural form and in model digestion conditions. Cultivation techniques and flow cytometry were performed to evaluate probiotic viability. Based on the results obtained, plant extracts rich in bioactive compounds and having potential effect on human organism and probiotic bacteria were selected. As a most suitable combination, green barley and some probiotics like lactobacilli and bifidobacteria could be recommended.

Finally, the specific study focused on the transfer of selenium species from mother to child via colostrum was analyzed. Selenium is a biogenic element acting as a representative of early natural antioxidants in human body. The important role of colostrum in neonatal nutrition was confirmed by the detection of the presence of selenoprotein P in the colostrum. This protein is further taken up by the child immediately after birth and contributes as the earliest antioxidant to infant's immunity.

Overall, it can be concluded that, despite the undeniable fundamental importance of protein in childhood nutrition, further plant-based biologically active compounds and combinations of probiotics and prebiotics, represent a major benefit and contribute positively to the increase of the nutritional value and quality of foods for infant nutrition.

**KEYWORDS:** selenometabolites, antioxidants, food supplement, infants' nutrition, encapsulation, probiotics

HOOVÁ, Julie. *VÝVOJ A TESTOVÁNÍ PŘÍRODNÍCH SLOŽEK POTRAVIN PRO DĚTSKOU VÝŽIVU*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/150111>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

#### PROHLÁŠENÍ:

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

.....

podpis studenta

#### PODĚKOVÁNÍ:

*Ráda bych poděkovala mé školitelce této disertační práce, prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc., za příležitost pracovat pod jejím vedením. Velice si cením vědomostí, cenných rad a zkušeností, které jsem získala v průběhu svého studia. Ing. Petře Skoumalové, Ph.D. děkuji, za cenné přátelství, a že stála u mého vědeckého zrodu od úplného začátku a pomohla mi najít ten správný směr. Ing. Lucii Dzurické jsem vděčná za horlivé diskuze k tématu a její kritický pohled na tuto práci.*

*Také bych ráda poděkovala kolektivu doktorandů z Ústavu potravin a biotechnologií Fakulty chemické za spolupráci. V neposlední řadě děkuji celé své rodině a blízkým za podporu a důvěru, kterou ve mně vložili.*

## OBSAH

<b>1 Úvod</b> .....	<b>11</b>
<b>2 Teoretická část</b> .....	<b>12</b>
2.1 Dětská výživa .....	12
2.1.1 Období vývojového růstu dítěte .....	12
2.1.2 Stravovací období .....	12
2.1.3 Přejícné období .....	13
2.1.4 Období smíšené stravy .....	13
2.2 Charakteristika dětské stravy .....	13
2.2.1 Mateřské mléko .....	14
2.2.2 Živočišné mléko a mléčná umělá výživa .....	16
2.2.3 Komplementární výživa .....	18
2.3 Biologicky aktivní sloučeniny .....	19
2.3.1 Vitaminy.....	20
2.3.2 Vitaminy rozpustné ve vodě .....	20
2.3.3 Vitaminy rozpustné v tucích .....	24
2.3.4 Antioxidanty.....	25
2.4 Organismy s vysokým obsahem bioaktivních látek .....	28
2.4.1 Makrořasy a mikrořasy.....	28
2.4.2 Byliny a koření.....	28
2.4.3 Probiotické bakterie.....	28
2.4.4 Mikrobiom u dětí.....	34
2.5 Vybrané metody zpracování a analýzy probiotik .....	35
2.5.1 Polymerázová řetězová reakce.....	35
2.5.2 Průtoková cytometrie .....	35
2.5.3 Enkapsulace.....	36
2.5.4 Enkapsulátor .....	38
<b>3 Experimentální část</b> .....	<b>41</b>
3.1 Použité živé systémy .....	41
3.1.1 Buněčné linie.....	41
3.1.2 Mikroorganismy.....	41
3.2 Použité přístroje a pomůcky.....	41
3.2.1 Použité chemikálie .....	42
3.2.2 Chemikálie ke kultivaci mikroorganismů .....	43
3.2.3 Chemikálie ke kultivaci buněčných linií .....	43
3.2.4 Materiál.....	43
3.2.5 Komerční probiotické produkty.....	45
3.3 Metody .....	45
3.3.1 Stanovení selenu v kolostru pomocí 2D-SEC-SECxSEC-AF-ICP-MS .....	45
3.3.2 Stanovení selenu v krevních vzorcích pomocí 2D-SEC-SECxSEC-AF-ICP-MS .....	46
3.3.3 Stanovení selenometabolitů a selenoproteinu P pomocí ELISA kitu.....	47
3.3.4 Extrakce polárními rozpouštědly .....	48
3.3.5 Extrakce olejů.....	48

3.3.6	Stanovení ve vodě rozpustných celkových sacharidů podle Duboise .....	50
3.3.7	Stanovení redukujících cukrů podle Somogyi-Nelsona .....	50
3.3.8	Stanovení nerozpustné vlákniny .....	50
3.3.9	Stanovení celkového dusíku .....	51
3.3.10	Stanovení mastných kyselin pomocí GC-FID .....	51
3.3.11	Stanovení celkových fenolických látek.....	52
3.3.12	Stanovení flavonoidů.....	53
3.3.13	Stanovení antioxidační aktivity.....	54
3.3.14	Stanovení celkových fruktanů pomocí Megazyme kitu.....	54
3.3.15	Stanovení β-glukanů pomocí Megazyme kitu.....	55
3.3.16	Stanovení vybraných pigmentů spektrofotometrickou metodou.....	56
3.3.17	Stanovení cukrů a organických kyselin.....	58
3.3.18	Prvková analýza vzorků řas a sinic pomocí ICP-MS .....	59
3.3.19	Testování antimikrobiální aktivity .....	59
3.3.20	Testování cytotoxického účinku .....	60
3.3.21	Genotoxický test.....	61
3.3.22	Příprava částic s enkapsulovanou aktivní složkou a charakterizace .....	61
3.3.23	Kultivace probiotik .....	63
3.3.24	Stanovení viability probiotických bakterií .....	63
3.3.25	Sledování změn viability a uvolňování aktivních látek v průběhu modelového trávení .....	64
3.4	Statistické zpracování výsledků .....	64
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze.....</b>	<b>65</b>
4.1	Stanovení selenometabolitů v reálných vzorcích.....	65
4.1.1	Stanovení selenometabolitů ve vzorcích kolostra .....	66
4.1.2	Selenometabolity a selenoproteiny v mateřském a pupečnickovém krevním séru70	
4.1.3	Stanovení selenoproteinů pomocí ELISA kitu.....	70
4.2	Charakterizace nutričního složení vybraných typů rostlinných materiálů .....	71
4.2.1	Obsah sacharidů a nerozpustné vlákniny .....	71
4.2.2	Stanovení celkového dusíku .....	72
4.2.3	Extrakce olejů z vybraných rostlinných materiálů .....	74
4.3	Obsah vybraných biologicky aktivních látek .....	77
4.3.1	Stanovení vybraných sacharidových skupin .....	77
4.3.2	Stanovení celkových fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivity.....	78
4.3.3	Stanovení vybraných rostlinných barviv.....	80
4.3.4	Prvková analýza řas a sinic.....	82
4.3.5	Antimikrobiální vlastnosti vybraných extraktů .....	83
4.4	Charakterizace dalších rostlinných vzorků .....	83
4.4.1	Čaje určené pro děti.....	84
4.4.2	Byliny a koření.....	85
4.4.3	Šťávy a sirupy .....	88
4.5	Testy cytotoxicity.....	88
4.5.1	Porovnání cytotoxicity vzorků řas a sinice .....	88



4.5.2	Porovnání cytotoxicity vzorků rostlinných prášků .....	90
4.5.3	Stanovení genotoxického účinku na modelovém organismu.....	92
4.6	Enkapsulace.....	93
4.6.1	Enkapsulace vybraných extraktů do liposomů.....	93
4.7	Probiotické bakterie .....	102
4.7.1	Kultivace probiotických bakterií.....	103
4.7.2	Modelové trávení probiotických bakterií.....	103
4.7.3	Vliv vybraných druhů vlákniny na viabilitu probiotických bakterií v průběhu modelového trávení.....	106
4.7.4	Enkapsulace probiotických bakterií do alginátových částic .....	107
4.7.5	Interakce probiotických buněk s vybranými extrakty .....	110
4.7.6	Modelové trávení.....	112
4.8	Návrh doplňků stravy vhodných pro dětskou výživu .....	113
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>116</b>
<b>6</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>134</b>
<b>9</b>	<b>Životopis a publikační činnost.....</b>	<b>148</b>

# 1 ÚVOD

Složení stravy má odjakživa velký vliv na zdraví jedince, které je vědci různých odvětví detailně studováno. V dnešní době dochází díky sociálním sítím velmi snadno k propagaci mnoha různých doplňků stravy zaměřujících se na podporu lidského organismu. Budování imunity a zdraví jedince začíná hned po jeho narození. V době samotného vývinu je proto důležité vnímat příjem živin a látek pro udržení kondice nebo případné prevence. Složení stravy má na člověka určitý vliv, který se může projevovat zdravotními problémy nebo naopak těmto problémům napomáhá předcházet. Složení příjmu živin v průběhu těhotenství a poté složení stravy v samotném útlém věku dítěte je převážně ovlivněno rodiči a okolím dítěte. Je důležité, aby ve stravě nechyběly biologicky aktivní látky, které jsou nedílnou součástí lidského zdraví a metabolismu. Jedná se především o vitaminy, antioxidanty, nenasycené mastné kyseliny, ale i o probiotické bakterie. Bohužel poměrně často nejsou přirozené zdroje těchto aktivních látek přijímány pozitivně, zejména pak u dětských konzumentů. Pak je třeba vyvíjet techniky, které by umožnily zpracovat nutričně bohaté sloučeniny tak, aby byly přijímány lépe – enkapsulace, inkorporace do vhodných potravin nebo pochutin apod.

V současné době se na trhu díky velkému zájmu a oblibě objevují tzv. „funkční potraviny“ a „superpotraviny“. Tyto potraviny slibují posílení imunity jedince díky vysokému obsahu zdraví prospěšných látek, a tak u spotřebitelů vzbuzují snadnou dostupnost potřebných látek pro posílení organismu.

Probiotické bakterie jsou součástí střevní mikrobioty člověka, avšak správný poměr střevních bakterií je dán nejen prostředím, ve kterém se jedinec vyskytuje, ale také přijatou stravou. Probiotické bakterie se řadí mezi zdraví prospěšné bakterie a hostiteli přináší mnoho zdravotních výhod, které jsou stále studovány. Pro správný růst bakterií v tlustém střevě je potřeba, aby měly tyto bakterie vhodné podmínky. Z tohoto důvodu je doporučeno, aby se při dávkování spolu s probiotiky přijímaly i tzv. prebiotika.

Cílem této disertační práce bylo otestovat přírodní materiály bohaté na biologicky aktivní sloučeniny, které by mohly v kombinaci s vybranými bakteriemi mléčného kvašení vytvořit komplexní doplněk stravy vhodný pro děti. Vybrané vzorky by tak zastávaly úlohu podporující růst bakterií, ale zároveň by podporovaly i zdraví člověka. Jednotlivé komponenty byly charakterizovány zvlášť a na základě výsledků byla navržena jejich kombinace. V rámci práce byly využity i metody enkapsulace pro zvýšení stability aktivních látek a prodloužení jejich skladovatelnosti. Stabilita jednotlivých zkoumaných vzorků byla studována za konkrétních vhodných podmínek, a nakonec byly navrženy formy preparátů s těmito složkami. Vybrané produkty a kombinace bylo třeba sensoricky hodnotit z hlediska jejich spotřebitelské přijatelnosti.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 DĚTSKÁ VÝŽIVA

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

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

#### 2.1.1 Období vývojového růstu dítěte

Při fyzickém růstu dochází k nárůstu hmotnosti tělové tkáně, ke kterému dochází v určitých vzorcích, avšak v různé škále a letech. K fyzickému růstu dochází tedy až do doby, kdy se z dítěte stává dospělý jedinec. Mnoho novorozenců ubírá na váze krátce po narození, avšak během jednoho týdne tělesnou hmotnost znovu nabere a dostanou se zpět na váhu při narození. Většina kojenců zdvojnásobí svou váhu během 5 měsíců a ztrojnásobí ji do jednoho roku života <sup>[6]</sup>.

Během období předškolního věku dochází ke zpomalení růstu a k jeho ustálení. V této fázi je ještě nepatrný rozdíl mezi mužským a ženským pohlavím a kritickým bodem je potenciální začátek obezity. V období školního věku dochází k výraznějším rozdílům v růstu mezi ženou a mužem. U průměrné ženy dochází k mírnému zvýšení nárůstu hmotnosti a výšky nežli u průměrného muže. V průběhu dospívání poté dochází k nárůstu celkového tělesného tuku u žen, naopak u mužů dochází k tvorbě svalových tkání <sup>[6]</sup>.

#### 2.1.2 Stravovací období

Stravovací období dítěte lze podle vyživovacích nároků rozdělit do tří základních období, která do sebe postupně přecházejí a každé z nich trvá přibližně 4–6 měsíců. Tato období nejsou určována pouze funkcí trávicího ústrojí, ale také psychomotorickým vývojem jedince a funkcí vylučovacího systému <sup>[2]</sup>.

##### 2.1.2.1 Počáteční období

V tomto období trvajícím 6 měsíců, přibližně 180 dní, je kojenci podáváno výhradně mateřské mléko. Nelze podávat jiné tekutiny nebo pevnou stravu, dokonce ani vodu s výjimkou kapek nebo sirupů obsahující vitaminy, minerály nebo léky. Pokud je lékařem stanoven vážný zdravotní důvod, lze na jeho doporučení dítě dokrmovat umělou mléčnou výživou. Před prvním rokem života by ovšem neměl být kojenec krmen kravským mlékem. Kojenec by měl být kojen minimálně 8krát za den tak, aby celkové množství mléka odpovídalo přibližně 1/6 jeho hmotnosti <sup>[7],[8]</sup>.

Celosvětově je odhadováno, že pouze 34,8 % kojenců je výhradně kojeno mateřským mlékem prvních 6 měsíců jejich života. Komplementární výživa je tak nasazena dříve, což je často výživově neadekvátní a nebezpečné. Například vyšší příjem proteinů v raném věku zvyšuje risk vzniku obezity ve školním věku. Kojenci, kteří nejsou kojeni, mají 6–10krát větší pravděpodobnost úmrtí v tomto

období života než kojenci, kteří jsou výhradně krmeni mateřským mlékem. Pokud jsou krmeni umělou mléčnou výživou, dochází k průjmovému onemocnění nebo pneumonii. Tato onemocnění jsou u dětí velmi běžná a jsou častým důvodem jejich úmrtí. Také dochází ke zvyšujícímu se riziku dlouhodobě trvajících onemocnění související s imunologickým problémem. Jedná se především o astma, diabetes typu I, celiakie nebo Crohnova nemoc [8],[9].

### 2.1.3 Přechodné období

Po uplynutí 6 měsíců již výhradně mléčná strava nezajišťuje dostatečný přísun energie a nutriční potřeby dítěte. Komplementární adekvátní výživa začíná od ukončeného 6 měsíce s pokračujícím kojením do druhého roku života a déle. Od této chvíle jsou potřebné i jiné tekutiny kromě mateřského mléka. Pestrost stravy dítěte se tak rozšiřuje o pyré z jednoho druhu zeleniny, jako je například mrkev, brambor, cuketa, špenát, dýně nebo brokolice. Připravený pokrm se ovšem nedochucuje solí ani nesladí. Následně, po odzkoušení jednotlivých druhů zeleniny – pro zjištění případné intolerance nebo alergie, lze zařadit do stravy i jejich kombinace. Stravu lze v této fázi postupně obohatit i vařeným masem a od 7. měsíce se strava doplňuje také ovocně-mléčným příkrmem. Vhodná jsou v tomto případě jablka, hrušky, banány nebo meruňky [2],[7],[8].

Do konce 6. měsíce se doporučuje kaše pouze bezlepková, a to kaše kukuřičná nebo rýžová. Poté lze postupně zařazovat také pšeničné nebo žitné kaše obsahující lepek. Od počátku 9. měsíce se již zařazují vícesložkové příkrmy, jogurty, sýry a postupně se přidává i pečivo a chléb. Vhodnými tekutinami jsou pro dítě v tomto období vody, dětské čaje a ředěné ovocné šťávy [2].

Pokud nedochází k nástupu komplementární výživy nebo je podávána nepřiměřeně, může docházet k pozastavení vývinu a růstu dítěte. V tomto období nejčastěji dochází k pozastavení růstu a infekčním onemocněním. Mateřské mléko je ovšem stále nezbytnou součástí stravy, jelikož zastupuje jednu polovinu energie kojence, kterou potřebuje do dovršení prvního roku života. Do konce druhého roku života zastupuje mateřské mléko jednu třetinu přijaté energie [7].

### 2.1.4 Období smíšené stravy

Podávané jídlo v tomto období mezi 1. a 3. rokem života by mělo být měkké, nenáročné na kousání a lehce stravitelné. Strava by měla být pestrá, smíšená a nutričně hodnotná. Na druhou stranu by měla být kulinářská úprava minimální. Strava je tedy jednoduchá na přípravu a bez koření [10].

## 2.2 CHARAKTERISTIKA DĚTSKÉ STRAVY

Všechny vyrobené nebo dovezené výrobky určené dětem ve věku do 3 let musí splňovat hygienické požadavky prováděcího právního předpisu, vyhlášky MZ č. 84/2001 Sb., o hygienických požadavcích na hračky a výrobky pro děti do 3 let a také požadavky na složení a označení výrobků dané vyhláškou 54/2004 Sb. Tyto výrobky nesmí poškodit zdraví, musí vyhovovat požadavkům uvedeným ve vyhlášce, a to složením, vlastnostmi a mikrobiologickou čistotou. Dále musí být značeny a vybaveny písemným prohlášením, a to v rozsahu stanoveném vyhláškou o složení a vlastnostech výrobků a potvrzení, že byly hodnoceny za podmínek stanovených prováděcím právním předpisem [11].

Vyhláška 54/2004 Sb. zahrnuje následující kategorie potravin <sup>[12]</sup>:

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

### 2.2.1 Mateřské mléko

Mateřské mléko je pro kojence významným zdrojem nutričních látek, které pomáhají kojenci vytvářet vlastní imunitní systém a intestinální mikrobiotu a je esenciálním zdrojem pro kojence v jeho prvních 6 měsících života <sup>[7],[13]</sup>.

Mléko obsahuje mnoho biologicky aktivních látek, ale také protilátky nebo kmenové buňky s neznámou funkcí, které se následně mohou diferencovat na neurony. Z tohoto důvodu Světová zdravotnická organizace (WHO) a Dětský fond Organizace spojených národů (UNICEF) doporučila začátek přirozeného kojení mateřským mlékem bezprostředně 1 hodinu po narození dítěte a pokračovat výhradně krmením mateřským mlékem po dobu 6 měsíců. Do konce dvou let života dítěte je následně nutné zahrnovat mateřské mléko v rámci komplementární výživy, pokud tomu zdravotní stav matky a dítěte dovolí <sup>[14],[15]</sup>.

Mateřské mléko je ideálním výživovým zdrojem novorozenců a obsahuje imunokompetentní buňky a imunoglobuliny typu IgA, které protektivně působí na střevní sliznici. Kromě toho má mateřské mléko samo o sobě protektivní antimikrobiální aktivitu vůči bakteriím jako je *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii* a streptokokům <sup>[16]</sup>.

Vlastnosti a chemické složení lidského mateřského mléka je vědci zkoumáno již od počátku 20. století, a to jak z kvantitativního, tak kvalitativního hlediska. Obsahuje mnoho různých makronutrientů (sacharidy, bílkoviny, tuky a vitaminy) a také nespočet bioaktivních látek. Antimikrobiální a imunomodulační komponenty mateřského mléka kompenzují málo vyvinutý neonatální imunitní systém <sup>[17],[18]</sup>.

#### 2.2.1.1 Sacharidy

Hlavním sacharidem mateřského mléka je disacharid laktóza, jehož nejvyšší koncentrace se nachází ve zralém mléce. Mateřské mléko obsahuje přibližně 7 g laktózy na 100 ml mléka a jedná se tedy o druhý důležitý zdroj energie. Laktóza je tvořena monosacharidy glukózy a galaktózy. Jejím mikrobiálním rozkladem v intestinálním traktu dochází ke vzniku kyseliny mléčné zvyšující resorpci vápníku a vitaminů přijatých potravou. Dále se v mléce nacházejí oligosacharidy <sup>[7],[19],[20]</sup>.

Oligosacharidy lidského mateřského mléka patří do skupiny strukturně diverzních nekonjugovaných glykanů a zastupují přibližně 20 % všech sacharidů mateřského mléka. Jsou ovšem rezistentní k trávicím enzymům dětského tenkého střeva, a tedy nemají velký nutriční význam. Jejich význam spočívá v utilizaci střevní mikroflórou a s tím související zdravotní výhody v podobě prevence proti průjemovým onemocněním. Nevyužité oligosacharidy jsou metabolicky zpracovány a odváděny z těla ven společně s močí. Oligosacharidy přítomné v mateřském mléce se skládají z monosacharidových jednotek jako je glukóza, galaktóza, fukóza, N-acetylglukosamin, neuraminová

a N-acetylneuraminová kyselina. Složení je úzce spojeno s laktační fází, denní dobou anebo i výživou matky<sup>[17]</sup>.

Významné oligosacharidy do nedávné doby nebyly přítomny v umělých mléčných výživách. Z tohoto důvodu se začaly fortifikovat komerčně dostupnými oligosacharidy<sup>[18]</sup>.

### **2.2.1.2 Bílkoviny**

Mateřské mléko je od živočišného mléka rozdílné nejen v kvantitě, ale i v kvalitě. Mléko obsahuje rovnováhu mezi aminokyselinami vhodnými pro novorozence. Koncentrace bílkovin, 0,9 g na 100 ml, je menší než u živočišného mléka. Řadí se tak mezi mléka s nejnižším obsahem bílkovin, jelikož vysoký obsah proteinů by mohl zatížit ledviny novorozence odpadními dusíkatými produkty<sup>[7]</sup>.

Mateřské mléko obsahuje více než 400 různých proteinů, jež zastupují antimikrobiální a imunomodulační role, stejně jako stimulují absorpci nutrientů. Bílkoviny obsažené v mléce lze rozdělit do tří skupin, a to na kaseinové, syrovátkové a mucinové proteiny. Obsah kaseinu v mateřském mléce je nižší nežli v živočišném mléce a má i jinou molekulární strukturu pro jeho snadnější trávení. Lidské mléko navíc obsahuje více  $\alpha$ -laktalbuminu, naopak neobsahuje  $\beta$ -laktoglobulin, na který si může kojeneček vytvořit intoleranci<sup>[7],[17],[21]</sup>.

- **Volné aminokyseliny**

Volné aminokyseliny vyskytující se v lidském mateřském mléce pokrývají pouze 3–5 % přijímaného potřebného množství kojenců pro správnou funkci metabolických aktivit. Profil těchto volných aminokyselin není unikátní, ale je velmi podobný mléku i jiných primátů, jako jsou hominidé. Složení není ovšem konstantní a mění se v průběhu laktace. Kyselina glutamová, taurin, glutamin a alanin jsou nejčastěji zastoupené volné aminokyseliny v lidském mateřském mléce<sup>[17]</sup>.

### **2.2.1.3 Lipidy**

Lipidy zastupující 40–50 % celkové energie mateřského mléka (kolem 3,5 g tuků na 100 ml mléka) se tak řadí mezi jeho největší zdroj. Tuk je vyměšován v malých kapkách a množství vzrůstá s narůstající dobou krmení. Navíc je proměnlivé i v průběhu dne a nejvíce tuků mléko obsahuje pozdě odpoledne. Zadní mléko vyměšováno na konci jednoho kojení je nejbohatší na tuky a má bílou krémovou barvu. Naopak přední mléko na začátku krmení obsahuje méně tuků a jedná se o namodralou až šedou tekutinu<sup>[7],[17],[21]</sup>.

Přibližně 99 % lipidů mateřského mléka je zastoupeno triacylglyceroly. Dále jsou zastoupeny diacylglyceridy, monoacylglyceridy, volné mastné kyseliny, fosfolipidy a cholesterol. Společně tak vytvářejí tukovou emulzi<sup>[7],[18],[21]</sup>.

Mateřské mléko obsahuje přes 200 mastných kyselin, avšak mnoho jejich zastoupeno v malých koncentracích. Nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou je kyselina olejová s koncentrací 30–40 g na 100 g tuku mateřského mléka. Důležitými mastnými kyselinami obsažených v mléce jsou například dokosaheptaenová kyselina (DHA) a arachidonová kyselina (ARA), které nejsou obsažené v jiném mléce. Tyto mastné kyseliny jsou důležité pro neurologický vývoj dítěte. DHA a ARA se přidávají do umělé mléčné výživy, avšak jejich účinek není tak efektivní<sup>[7],[18],[21]</sup>.

Profil lipidických látek v mateřském mléce je variabilní a je úzce spjatý se stravovacími návyky matky a metabolismu tuků organismu matky. Mezi nejméně prostudované mastné kyseliny mateřského mléka patří větvené mastné kyseliny (BCFA). Jedná se převážně o mastné kyseliny s krátkým uhlíkovým řetězcem s více než jednou methylovou skupinou navázanou na základní uhlíkový řetězec<sup>[7],[17],[21]</sup>.

#### 2.2.1.4 Vitaminy a minerály

Mateřské mléko obvykle obsahuje dostatečné množství vitaminů pro kojence, pokud matka sama netrpí jejich nedostatkem. Obsah vitaminů je tedy závislý na výživě matky, Výjimkou je pouze vitamin D, kdy je nutné vystavit kojence dennímu světlu k vytvoření vnitřního vitaminu D [7],[21].

Jedním z nejdůležitějších biologicky aktivních prvků obsažených v mateřském mléce je selen (Se), a to převážně díky svým antioxidantním a protirakovinným vlastnostem. Přítomnost selenu v mateřském mléce je pro novorozence esenciální. Nízká hladina selenu bývá spojována s komplikacemi v době těhotenství, a to především s preeklampsií (křečemi), předčasným porodem nebo například se samovolným potratem. Selen také hraje významnou roli v metabolismu hormonů štítné žlázy, které jsou velmi důležité při vývoji plodu. Štítná žláza obsahuje nejvyšší koncentraci selenu na gram tkáně, a to díky expresi selenoproteinů v tomto orgánu. Selen nalezneme v organismu v mnoha podobách. Jedná se o anorganický selen –  $\text{Se}^{(IV)}$  a  $\text{Se}^{(VI)}$ , a selenometabolity, jako jsou například selenomethionin (SeMet), selenocystein (SeCys), selenocystin (SeC), selenocystamin (SeCa), selenoprotein P (SELENOP), glutathionperoxidáza (GPX) a selen obsahující proteiny (selenoalbumin, SeAlb) [23],[24],[25].

Selenoprotein P je glykoprotein, který zprostředkovává transport a distribuci stopového množství selenu. Jeho množství v plazmě je ukazatelem nutričního statusu v těle. V nedávné době byla nalezena přítomnost selenoproteinu P v mateřském mléce, z tohoto důvodu se začal zkoumat přenos selenu z matky na dítě prostřednictvím kojení mateřským mlékem [25].

Železo a zinek jsou přítomny v mateřském mléce poměrně v malé koncentraci, ale jejich biologická dostupnost a absorpce je vysoká [7].

#### 2.2.1.5 Další látky

Mateřské mléko obsahuje mnoho látek pomáhající chránit kojence proti infekcím. Jedná se o velmi hodnotnou ochranu bez vedlejších příznaků, jako je horečka, která bývá pro malé kojence nebezpečnou. Mléko obsahuje například imunoglobuliny, převážně imunoglobulin A (sIgA), který vytváří povrchovou vrstvu na intestinální mukóze a zabraňuje tak vstupu bakterií do buněk. Dále obsahuje bílé krvinky a syrovátkové proteiny, zde se jedná hlavně o lysozym a laktoferrin, inhibující bakterie, viry a plísňe. Také obsahuje důležité oligosacharidy, zabraňující přichycení bakterií na povrch mukózy [7],[13].

#### 2.2.2 Živočišné mléko a mléčná umělá výživa

Živočišné mléko se od lidského liší jak v kvantitě nutrientů, tak i ve své kvalitě. Pro kojence mladší 6 měsíců může být zvířecí mléko modifikováno, a to přidáním vody, sacharidů anebo mikronutrientů. Po 6 měsících života mohou kojenci dostávat převařené smetanové mléko. Kojenecká umělá výživa je obvykle vyrobena industriální modifikací kravského mléka nebo sójových produktů. Během výrobního procesu dochází k přidávku nutrientů, aby bylo mléko obsahově co nejpodobnější mléku lidskému. V současnosti se mléka obohacují o probiotické bakterie, rozpustnou probiotickou vlákninu, vitaminy, minerály nebo antioxidanty. Nicméně kvalitativní rozdíly v tučích a proteinech stále přetrvávají, a navíc chybí protiinfekční a biologicky aktivní sloučeniny, které se nacházejí v lidském mléce [7],[13].

Umělá výživa bývá navíc často nesterilní, a proto může docházet ke kontaminaci patogenními bakteriemi, jako je *Enterobacter sakazakii* nalezený v práškové umělé mléčné výživě. Sójové umělé výživy obsahují fytoestrogeny s podobnou aktivitou, jakou mají lidské estrogény. Fytoestrogeny mohou potenciálně snižovat plodnost u chlapců anebo zapříčinit předčasnou pubertu u dívek [7].

Pokud není kojeneček v počátečním období kojení výhradně mateřským mlékem, je krmen tzv. „počáteční“ formulí. Počáteční formule obsahuje upravenou bílkovinu kravského mléka, kdy tato úprava spočívá ve změně poměru syrovátky a kaseinu na poměr 1:1 nebo vyšší. Dále obsahuje laktózu, tuky v potřebném množství s významným podílem nenasycených mastných kyselin, také vitaminy a minerální látky [13].

Po ukončení 4. měsíce až do konce prvního roku života je pak krmen tzv. „pokračující“ formulí. Pokračující formule obsahuje ve srovnání s kravským mlékem snížené množství bílkovin a od počáteční formule se liší poměrem syrovátky a kaseinu. Kromě laktózy může obsahovat navíc i sacharózu [13].

U dětí trpících alergickou reakcí na bílkovinu kravského mléka nebo na sníženou aktivitu enzymu laktáza, je možné krmit speciální formulí upravenou dle potřeb dítěte. Jedná se například o hypoantigenní formule nebo sójová či antirefluxní mléka. Také je obecně zakázáno používat složky obsahující lepek a produkty obsahující med musí být ošetřeny tak, aby došlo ke zničení spor *Clostridium botulinum* [13],[26].

### **2.2.2.1 Sacharidy**

V umělé mléčné výživě může být ze sacharidů použita laktóza, maltóza, sacharóza, glukóza, maltodextriny, glukózový sirup, předvařený nebo želírující škrob. I tak bývá hlavním a nejvíce zastoupeným sacharidem mléčný cukr laktóza [13],[26].

### **2.2.2.2 Bílkoviny**

V kravském mléce se nachází až 300krát více bílkoviny kaseinu nežli v mléce lidském. Kaseiny tak tvoří až 75 % z celkových 30–40 g bílkovin v 1 l mléka. Zbytek celkových proteinů tvoří syrovátkové proteiny, přičemž z 50 % jej tvoří  $\beta$ -laktoglobulin, v menším množství pak  $\alpha$ -laktoglobulin, sérový albumin, laktotransferrin, serotransferrin a několik enzymů [20],[26].

Počáteční kojenecká výživa musí obsahovat každou nezbytnou a podmíněně nezbytnou aminokyselinu nejméně ve stejném využitelném množství jako je obsaženo v referenční bílkovině, viz Tabulka 1. Aminokyseliny mohou být do pokračovací kojenecké výživy přidány výhradně pro zlepšení výživové hodnoty bílkovin, a to pouze v množství nezbytném k tomuto účelu [21].

### **2.2.2.3 Lipidy**

Mléčný tuk obsahuje tri-, di- a monoacylglyceroly, fosfolipidy, steroly a jejich estery, volné mastné kyseliny a vitaminy rozpustné v tucích. Triacylglyceroly tvoří až 98 % lipidů mléka. Mléčný tuk má ze všech přirozených tuků nejrozmanitější složení a obsahuje poměrně vysoké množství mastných kyselin s krátkým řetězcem, jako je kyselina máselná nebo kapronová [19].

Pro výrobu umělé výživy je zakázáno používání sezamového a bavlníkového oleje. Obsah trans-izomerů mastných kyselin nesmí být větší než 3 % celkového obsahu tuků a obsah kyseliny erukové nesmí být větší nežli 1 % celkového obsahu tuků [21].

### **2.2.2.4 Vitaminy a minerální látky**

Kravské mléko obsahuje vitaminy rozpustné ve vodě i vitaminy rozpustné v tucích. V malých koncentracích jsou ovšem obsaženy vitaminy D a E. Vlivem moderních technologií zpracování mléka celkově dochází k úbytku vitaminů, díky čemuž se přistupuje k fortifikaci mléka, které slouží k přípravě dětských výrobků [19].

Kravské mléko je bohaté na vápník, draslík, sodík, fosfor a hořčík [20].



Tabulka 1 Porovnání zastoupení aminokyselin v mateřském mléce a referenční bílkovině [21]

Aminokyselina	Mateřské mléko		Referenční bílkovina kaseinu
	mg/100 kJ	mg/100 kcal	g/100 g bílkoviny
Cystin	9	38	0,3
Histidin	10	40	2,9
Isoleucin	22	90	5,4
Leucin	40	166	9,5
Lysin	27	113	8,1
Methionin	5	23	2,8
Fenylalanin	20	83	5,2
Threonin	18	77	4,7
Tryptofan	8	32	1,6
Tyrosin	18	76	5,8
Valin	21	88	6,7
Arginin	/	/	3,7

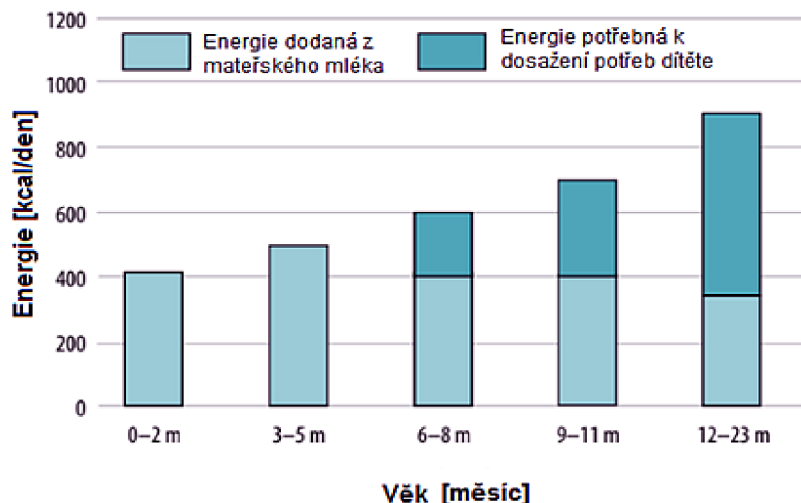
### 2.2.3 Komplementární výživa

Po uplynutí 6 měsíců života je pro kojence obtížné dosáhnout výživových potřeb pouze z lidského mléka. Trávicí systém je dostatečně vyvinutý na to, aby strávil škrob, proteiny a tuky z nemléčné stravy. Komplementární výživou se rozumí nemléčná výživa kojence, tedy jídlo a tekutiny podávané k mateřskému mléku. Optimální komplementární výživa není postavena pouze na tom, co je dítěti podáváno, ale také jak, kdy, kde a kým je dítě krmeno [7],[27].

Pokud se komplementární výživa podává později nežli v 6. měsíci, sice dosáhneme redukce vystavení chorob z jídel, avšak dítě je i tak vystaveno mikrobiálním kontaminacím z jeho přirozeného okolí, a to z půdy i z jiných zdrojů. Mikrobiální kontaminace komplementární stravy jsou hlavní příčinou průjmových onemocnění, která jsou obvyklá u dětí mezi 6. a 12. měsícem života. Správnou přípravou a skladováním komplementární stravy lze předcházet kontaminaci a riziku průjmového onemocnění [7],[28].

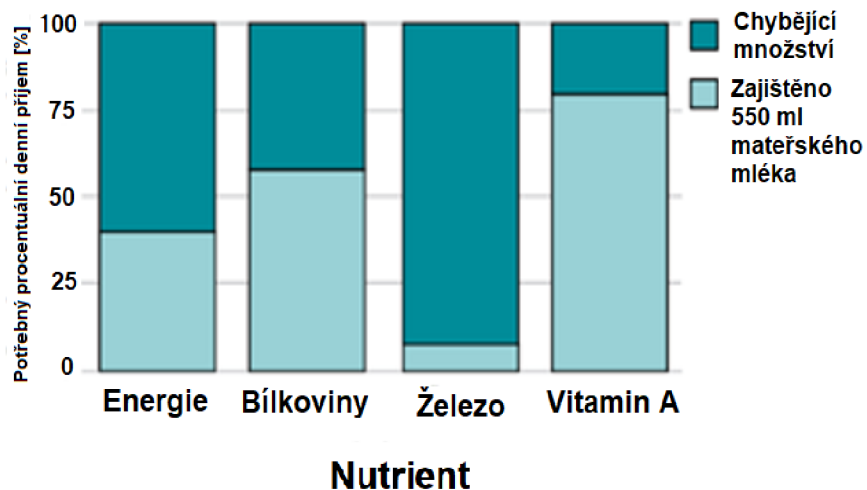
Vhodné celkové množství jídla obvykle souvisí s energií (množství vyjádřeno v kilokaloriích [kcal]), které je nutné dítěti dodat. Další nutrienty jsou také důležité a jsou buďto součástí stravy, nebo jsou přidány k základním potravinám. Ve sloupcovém grafu (Obrázek 1) je zobrazeno množství energie, které dítě potřebuje do dovršení dvou let života v porovnání s energií dodávané mateřským mlékem. Z tabulky je patrné, že mateřské mléko pokryje energetické nároky dítěte pouze do 6. měsíce jeho života. Poté dochází k nedostatku, který musí být pokryt komplementární výživou. Z toho tedy vyplývá, že by komplementární strava spolu s mateřským mlékem měla poskytovat dostatečný příjem energie, bílkovin a mikronutrientů [7].

Mezi základní ingredience komplementární výživy obvykle řadíme cereálie, ovoce a kořenovou zeleninu bohatou na škrob. Kromě tohoto základu by měl být do stravy zařazen pokrm z masa nebo ryb, které jsou dobrým zdrojem bílkovin, železa a zinku. Játra jsou zdrojem vitamínu A a folátu. Vaječný žloutek je zdrojem proteinů a vitamínu A. Mléčné produkty obstarávají zdroj vápníku, bílkovin a vitaminy skupiny B. Luštěniny jsou výborným zdrojem bílkovin a v menším množství i železa, proto se doporučuje kombinovat s potravinami napomáhající lepšímu vstřebávání železa. Zelenina a ovoce, a to především s vysokým obsahem vitamínu A a vitamínu C, zde se řadí například mrkev, mango, špenát atd. Do dvou let věku by se tuky a cholesterol neměly omezovat, nízkotučná dieta může být v tomto období nebezpečná. Přednost by se ovšem měla dávat nenasyceným mastným kyselinám před nasycenými [7],[29].



Obrázek 1 Energetické nároky dítěte [7]

Z dalšího uvedeného sloupcového grafu (Obrázek 2) je patrné, že by komplementární strava měla doplňovat nedostatek železa z mateřského mléka, a to nejlépe ze živočišných zdrojů jako je maso, vnitřní orgány, drůbež či ryby. Rostlinné alternativy kombinované s potravinami bohatými na vitamin C kvůli zlepšení absorpce železa nemohou plně nahradit živočišný zdroj tohoto důležitého mikronutrientu. Také větší množství cukrů obsažených ve sladkých nápojích snižuje chuť dítěte po výživově hodnotnější stravě. Navíc dochází k vytváření zubních kazů a takto nastavená strava vede k nadváze až k obezitě. Čaje a káva obsahují sloučeniny, které mohou interferovat s absorpcí železa. Z tohoto důvodu nejsou tyto nápoje doporučeny k podávání malým dětem [7], [28].



Obrázek 2 Profil denního potřebného příjmu vybraných nutrientů [7]

## 2.3 BIOLOGICKY AKTIVNÍ SLOUČENINY

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

glukózy. Jednotlivé superpotraviny jsou také podrobeny analytické charakterizaci k identifikaci bioaktivních sloučenin [4],[30].

Biologicky aktivní sloučeniny obsažené v malém množství v potravinách působí na naše zdraví a jejich účinek je nepřetržitě zkoumán. Citrusové plody zabraňují tvorbě zánětu, srdečních chorob a ateroskleróze. Bobulovité ovoce také obsahuje několik biologicky aktivních sloučenin vykazujících antioxidační, protizánětlivé působení [31].

### **2.3.1 Vitaminy**

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

#### **2.3.1.1 Rozdělení vitaminů a jejich charakterizace**

Vitaminy jsou biologicky aktivní organické sloučeniny. Jedná se o esenciální mikronutrienty s metabolickou a fyziologickou funkcí v lidském těle. Existuje 13 známých vitaminů rozdělených do dvou skupin podle své rozpustnosti – na vitaminy rozpustné ve vodě a na vitaminy rozpustné v tucích. Tyto organické sloučeniny se liší ve své chemické struktuře, biochemii, a dokonce i v nutriční významnosti v lidské stravě [32].

#### **2.3.1.2 Stanovení vitaminů**

Vitaminy nalezneme v potravinách, tkáních a tělních tekutinách ve velmi malém množství. Z tohoto důvodu nemohou být přímo extrahovány z velkého množství dalších látek, které mohou interferovat při chemické analýze. Složitost stanovení činí také existence vitamérů, které o stejné nebo různé biologické aktivitě. Ačkoliv moderní analytické metody nabízejí preciznost a citlivost, v oblasti potravin dávají stále pouze přibližnou hodnotu příjmu vitaminů, Výběr metody záleží na povaze vzorku a předpokládané koncentraci analyzované látky [33].

Příprava vzorku je kritickým krokem, který velmi ovlivňuje následné části analýzy. Vzorkování je dáno legislativně a jakékoliv předběžné postupy jako je konzervace a následný transport do laboratoře je extrémně důležitou součástí analýzy, kdy je většina vitaminu labilních a mohou být snadno degradovány. Ideálně by tak měl být vzorek analyzován okamžitě po jeho odebrání. Pokud je vzorek homogenní a je potřeba zmenšit jeho objem, je důležité používat nerezovou ocel. U nehomogenních vzorků je důležité pomoc třepání a přidavku vody získat polotekutý vzorek. Dalším klíčovým krokem analýzy je samotná extrakce, kdy se setkáváme s mnoha obtížemi v průběhu stanovení. Jedná se hlavně o chemickou stabilitu vitaminů, a to odolnost vůči světlu, přítomnosti kyslíku, zahřívání a hodně vůči pH prostředí. Dále se jedná o různě nízké koncentrace ve vzorcích potravin, složitost matrice a v neposlední řadě interakce s jinými makrokomponenty potravin, jako jsou polysacharidy, proteiny nebo lipidy [33],[34].

Odstranění nežádoucích látek ve vzorku, které by mohly ovlivňovat konečné stanovení zkoumané látky nebo dokonce vést k její degradaci, je tedy velmi důležité. Jednoduché vysrážení proteinů pomocí octanu zinečnatého, kyseliny perchlorové nebo trichloroctové kyseliny je následováno centrifugací nebo filtrací. Vzorek může být také kysele hydrolyzován pomocí kyseliny chlorovodíkové a poté přidán enzym takadiastáza (houbový multienzymový komplex) k extrakci převážně vitaminu skupin B. K přečištění vitaminu skupiny B se také může použít ionexová kapalinná chromatografie [35],[36].

### **2.3.2 Vitaminy rozpustné ve vodě**

Do této skupiny řadíme vitamin C a vitaminy skupiny B.

### **2.3.2.1 Vitamin B1**

Vitamin B<sub>1</sub> nebo také thiamin je esenciálním mikronutrientem, který katalyzuje nespočet klíčových biochemických reakcí zapojených v metabolismu glukózy. Je důležitým kofaktorem komplexů pyruvátdehydrogenázy a  $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenázy. Slouží tak pro produkci primárního zdroje energie, a to ATP. Důležitou roli hraje také v pentózovém cyklu, který zabezpečuje syntézu určitých neurotransmiterů, nukleových kyselin, lipidů atd. [37],[38],[39]

Thiamin patří mezi nejméně stabilní vitaminy rozpustné ve vodě. Relativně stabilní je v kyselém prostředí v pH rozmezí 2–4. Ve formě volné báze je v neutrálním a alkalickém prostředí značně nestálý. Podléhá fotodegradaci a je i oxylabilní Avšak i za optimálních podmínek pH má největší vliv na jeho stabilitu teplota. Identifikováno bylo více než 70 degradačních produktů vzniklých rozkladem thiaminu ve vodných roztocích při teplotách nad 100 °C. V průběhu technologického zpracování dochází ke ztrátám thiaminu v závislosti na velikosti zpracovávaného materiálu, obsahu tuku, vody a použité metodě tepelného zpracování [37],[38].

Thiamin se v nízkých koncentracích vyskytuje téměř ve všech potravinách. Nejbohatším zdrojem jsou kvasinky, z potravin rostlinného původu jsou jeho zdrojem obiloviny, luštěniny a rostlinná semena. Mouka bývá tímto vitamínem fortifikována. V potravinách živočišného původu je nejvíce zastoupen ve vepřovém mase a játrech, v mléce a vejcích. Nedostatek thiaminu se projevuje ztrátou chuti k jídlu, srdečními a dalšími různými neurologickými příznaky. Avitaminózou může dojít až onemocněním beri-beri, kdy dochází k nervovým poruchám zejména periferních nervů, edémům a k postižením srdce [37],[39].

### **2.3.2.2 Vitamin B2**

Mezi metabolicky aktivní formy vitamínu B<sub>2</sub> neboli riboflavinu patří jeho fosforylované formy, v organismu jako flavinmononukleotid (FMN) a flavinadeninukleotid (FAD). Riboflavin je nezbytný pro intermediární metabolismus sacharidů, aminokyselin, lipidů a podporuje antioxidační ochranu [37].

V nepřítomnosti světla je riboflavin velmi stabilním vitamínem, v neutrálním a slabě kyselém prostředí je prakticky stálý. Flavinové koenzymy jsou velmi náchylné k chemické nebo enzymové hydrolýze. Riboflavin a FMN působí jako fotosenzibilátory typu I a II, které katalyzují oxidaci organických látek vzdušným kyslíkem při ozáření viditelným světlem. Fotosenzibilátory působí jako přenašeči energie, kterou předávají tripletovému kyslíku za vzniku singletového kyslíku. Vzniklý singletový kyslík oxiduje další organické sloučeniny a současně dochází k fotodegradaci flavinů podle pH prostředí na lumichrom nebo lumiflavin. Oba flaviny vzniklé fotodegradací jsou navíc účinnějšími oxidačními činidly než samotný riboflavin. Při tepelném zpracování potravin je riboflavin velmi stálý. Potraviny obsahující větší množství tohoto vitamínu by se ovšem neměly vystavovat účinkům slunečního záření. Z tohoto důvodu by se tyto potraviny měly skladovat v neprůhledných nebo alespoň barevných obalech [38].

Zdrojem riboflavinu jsou především potraviny živočišného původu, a to játra, maso, sýry a vejce. V potravinách rostlinného původu jej nalezneme v obilovinách, luštěninách, špenátu.

Nedostatek riboflavinu se podílí na příznacích a chorobách při celkovém deficitu vitamínů skupiny B. Deficit se tak projevuje poruchami kůže a sliznic, může tak docházet k přecitlivění kůže na sluneční záření, glositidě, onemocněním jater, anémií nebo nedostatečným hojením ran. Zvýšená potřeba tohoto vitamínu je nutná u kojících matek a při infekčních onemocněních [37],[38],[40].

### **2.3.2.3 Vitamin B3**

Niacinem je obecně nazývána biologicky aktivní forma vitamínu B<sub>3</sub>, jedná se tedy o kyselinu nikotinovou, nikotinamid nebo dokonce o deriváty vykazující biologickou aktivitu nikotinamidu.

Kyselina nikotinová i nikotinamid jsou prekurzory oxidoredukčních koenzymů nikotinamidadeninukleotidu (NAD<sup>+</sup>) a nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP<sup>+</sup>) [37],[41].

Nikotinová kyselina je velmi stabilní při zahřívání ve vodných roztocích a stabilní je také v kyselém a alkalickém prostředí. Nikotinamid je velmi stálý v neutrálních roztocích, avšak v kyselém a alkalickém prostředí se hydrolyzuje na kyselinu nikotinovou. Vitamin B<sub>3</sub> je stabilní při většině technologických zpracování potravin, jako u jiných ve vodě rozpustných vitaminů bývají největší ztráty způsobené výluhem [38].

V potravinách rostlinného původu nalezneme niacin spíše ve formě kyseliny nikotinové, naopak v potravinách živočišného původu jako nikotinamid. Nejvíce jej nalezneme v kvasnicích, mase, rybách a vnitřnostech. Dále pak v arašídách nebo cereáliích. Mezi nespecifické symptomy nedostatku niacinu řadíme nespavost, bolest břicha nebo nechutenství. Dostatečným příjmem nikotinamidu lze předejít nedostatku niacinu, jehož avitaminóza se projevuje onemocněním zvané pelagra. Pelagra se projevuje průjmem, demencí, kožními změnami nebo zánětlivými změnami na sliznicích ústní dutiny, jazyka a žaludku [37],[38],[40].

#### **2.3.2.4 Vitamin B5**

Kyselina pantothenová je prekurzorem koenzymu A a plní četné metabolické funkce při metabolismu sacharidů a lipidů. Nalezneme ji ve formách acetyl-CoA, malonyl-CoA, sukcinyl-CoA atd. Také se účastní syntézy aminokyselin, hemoglobinu, hormonů nebo acetylcholinu. Je součástí proteinu ACP („Acyl Carrier Protein“) přenášející acylovou skupinu, a tudíž se podílí na reakcích syntézy mastných kyselin [37],[38],[42].

Stabilita kyseliny pantothenové ve vodných roztocích významně závisí na hodnotě pH. Nejstabilnější je v slabě kyselém prostředí, a to v rozmezí pH 4–5. Mimo pH optimum dochází k hydrolyze amidové vazby za vzniku pantoové kyseliny a β-alaninu. Vitamin B<sub>5</sub> bývá labilní při skladování a termickém zpracování potravin, ale vykazuje dobrou stabilitu při kulinárním zpracování [38].

Kyselina pantothenová je v potravinách obsažena v relativně malém množství. Zdrojem jsou zejména maso a játra, vaječné žloutky, ryby, sýry, luštěniny, rýže atd. Deficit kyseliny pantothenové není častý. Nespecificky se může projevovat nechutenstvím, anémií, křečemi v nohou, nespavostí, depresemi nebo sníženou odolností vůči infekcím [38],[42].

#### **2.3.2.5 Vitamin B6**

Vitamin B<sub>6</sub> nebo také pyridoxin je obecný název tří pyridinových derivátů vykazující biologickou aktivitu, a to pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin. Účinnou formou vitaminu B<sub>6</sub> je pyridoxal-5-fosfát, který se účastní více než 140 enzymatických reakcí. Aldehydové skupiny pyridoxalfosfátu jsou schopné reagovat s primárními aminoskupinami za vzniku Schiffových bází, a tak slouží jako důležitý kofaktor enzymů. Tento vitamin je tedy nezbytný pro funkci enzymů metabolizující aminokyseliny a glykogenolýzu [37],[38],[43].

Vitamin B<sub>6</sub> je poměrně stálý v kyselých roztocích, méně stálý je v neutrálním a alkalickém prostředí, zvláště na světle. Pyridoxol je stálejší než pyridoxal a pyridoxamin. Aminokyseliny, peptidy a bílkoviny reagují s pyridoxalem a jeho fosfátem v neutrálním prostředí za vzniku iminů. Podobně je to s redukujícími sacharidy, a to v reakcích neenzymového hnědnutí. Ztráty vitaminů při skladování a zpracování potravin jsou značně rozdílné podle komodity, tedy podle převládající formy vitaminu [38].

V největších koncentracích nalezneme pyridoxin v játrech a v mase kuřecím a rybím. Dále v celozrnných výrobcích, zelenině a ořechách. Nedostatek pyridoxinu se projevuje kožními problémy a záněty sliznic, svalovými křečemi a nervosvalovou dráždivostí. Deficience samotného vitaminu B<sub>6</sub> je ovšem vzácná, většinou se jedná o celkový nedostatek vitaminů skupiny B [37].

### 2.3.2.6 Vitamin H

Biotin neboli vitamin H se vyskytuje v osmi stereoizomerech, avšak biologickou aktivitu vykazuje pouze d-biotin, a to jako karboxybiotin. Biotin je důležitý pro metabolismus aminokyselin a mastných kyselin. Je kofaktorem karboxyláz, přičemž je využíván jako přenašeč CO<sub>2</sub>. Působí rovněž jako regulátor genové exprese [37].

Biotin je stálý při zahřívání, na světle, v neutrálních, a dokonce i v silně kyselých roztocích a nestálý v alkalickém prostředí. Snadno se oxiduje na směs izomerů sulfoxidů. Při zpracování potravin je biotin velmi stabilní. Ztráty při hydrotermických operacích jsou způsobeny hlavně výluhem [38].

Nejdůležitějším zdrojem jsou mléko, játra, ledviny, vejce a některé potraviny rostlinného původu jako jsou ořechy nebo luštěniny. V hojném množství se syntetizuje střevní mikroflórou. Příznaky deficitu se projevují na kůži, nervovými poruchami, nechutenstvím a svalovými bolestmi [37].

### 2.3.2.7 Kyselina listová

Kyselina listová nebo také folát či folacin je obecný název pro sloučeniny mající podobnou strukturu a vykazující biologickou aktivitu kyseliny listové. Ve své struktuře obsahují pterin, p-aminobenzoovou a glutamovou kyselinu. Významná je ovšem redukovaná forma tetrahydrofolát a jeho možné deriváty. Folát se účastní mnoha reakcí metabolismu aminokyselin a nukleotidů. Má důležitou roli při biologických metylacích (S-adenosylmethionin). Slouží jako akceptor nebo donor jediné jednotky uhlíku. Také je důležitý pro buněčné dělení a pro tkáň s vysokou mitotickou aktivitou [37],[38].

Folacin je nestálý v kyselém, neutrálním i alkalickém prostředí, za vyšších teplot, a zvláště na světle, v přítomnosti kyslíku, kovů s přechodnou valencí a riboflavinu. Vůči oxidaci je relativně málo citlivá pouze folová a 5-formyltetrahydrofolová kyselina, méně stálá je pak 5-methyltetrahydrofolová kyselina. K oxidaci běžně dochází při zpracování a skladování potravin [38].

V potravinách živočišného původu nalezneme kyselinu listovou zejména v játrech hovězích a kuřecích, mase, vejcích a mléku. V potravinách rostlinného původu pak v chřestu, brokolici nebo špenátu. Kyselina listová je také v těle syntetizována pomocí mikroflóry tlustého střeva. Při nedostatku folátu dochází k poruchám biosyntézy nukleotidů a tím i buněčné proliferace. Nedostatek navíc zvyšuje hladinu homocysteinu v plazmě, což je považováno za rizikový faktor aterosklerózy [37],[44].

### 2.3.2.8 Vitamin B12

Kobalamin je souhrnný název pro všechny korinoidy, tedy sloučeniny obsahující korinové jádro a vykazující biologickou aktivitu. Tato biogenní sloučenina je jedinou, která obsahuje kobalt. Kobalamin je kofaktorem methioninsyntázy a L-methylmalonyl-CoA mutázy. Podílí se na řadě metabolických procesů. Zejména se podílí na krvetvorbě, vývoji centrální nervové soustavy v dětském věku, přeměny homocysteinu, přeměny methylmalonyl-CoA na sukcinyl-CoA, katabolismu isoleucinu a valinu na tvorbě methioninu [37],[45].

I přes složitou strukturu je kobalamin relativně stálý v roztocích o pH v rozmezí 4 až 7. Při zpracování potravin se zdá být vitamin stabilní, hlavní příčinou ztrát je opět vyluhování [38].

Zdrojem kobalaminu jsou pouze živočišné potraviny, a to zejména játra a ostatní vnitřnosti, maso, ryby, vaječný žloutek, mléko a sýry. Nedostatek se projevuje jako anémie, psychické a nervové příznaky s poškozením periferních nervů a míchy nebo jako snížená odolnost vůči infekcím. U dětí s nedostatkem tohoto vitaminu může docházet k pomalému vývoji mozku, letargii nebo třesu [37], [38],[45].

### 2.3.2.9 Vitamin C

Ze čtyř možných izomerů je aktivní formou tohoto vitaminu pouze kyselina L-askorbová. Člověk, primáti a morčata jej nedokážou syntetizovat z důvodu chybějícího enzymu gulonolaktonoxidázy katalyzující poslední krok přeměny glukózy na askorbát. Vitaminem C se někdy označuje celý oxidoredukční systém kyselina L-askorbová ↔ kyselina L-monodehydroaskorbová ↔ kyselina L-

dehydroaskorbová, který tak svou možností poskytnout protony  $H^+$  působí jako antioxidant podílející se na ochraně proti volným radikálům a současně může chránit před oxidací jiných antioxidantů. V metabolismu je askorbát faktorem potřebným pro hydroxylaci steroidů nebo hydroxylaci prolinu a lysinu při biosyntéze kolagenu. Rovněž je nutným faktorem při biosyntéze katecholaminů, napomáhá absorpci železa ve střevech a inhibuje tvorbu nitrosaminů [37],[38],[44].

Askorbovou kyselinu lze považovat za dvojsytnou kyselinu díky schopnostem enolových hydroxylových skupin disociovat. V roztocích o fyziologických hodnotách pH se převážně vyskytuje jako monoanion. Řadí se mezi méně stabilní vitaminy. Ke ztrátám při skladování a průmyslovém zpracování potravin dochází různými způsoby. Nejvýznamnější jsou ztráty výluhem a oxidací. Tuto kyselinu oxiduje vzdušný kyslík, peroxid vodíku a jiná oxidační činidla, a to zvláště v přítomnosti kovů. Oxidace na dehydroaskorbovou kyselinu je reakcí vratnou a může probíhat různými mechanismy. Nejznámější reakcí je ovšem reakce se vzdušným kyslíkem, tzv. autooxidace, která způsobuje většinu ztrát v potravinách při jejich zpracování. Reakce závisí na hodnotě pH prostředí, kdy v kyselejších bývá pomalejší, naopak rychlejší je v neutrálním a nejrychlejší pak v alkalickém prostředí [37],[38].

Mezi nejvýznamnější zdroje tohoto vitamínu se řadí ovoce a zelenina, a to především citrusové plody, černý rybíz, kapusta, paprika atd. Nedostatek vitamínu C se projevuje kurdějemi [37],[45].

### 2.3.3 Vitaminy rozpustné v tucích

Mezi vitaminy rozpustné v tucích řadíme vitaminy A, D, E a K,

#### 2.3.3.1 Vitamin A

Vitamin A je označován jako retinol a jedná se o isoprenoid s pěti konjugovanými dvojnými vazbami v molekule. V potravinách lze nalézt mnoho analogů retinolu, jako je například 3-dehydroretinol, Nejvýznamnějším provitaminem A je  $\beta$ -karoten, Karotenoidy jsou sekundární metabolity rostlin a některých mikroorganismů vytvářející červené, oranžové a žluté pigmenty, Retinol se uplatňuje v biochemii zrakového vjemu, při syntéze proteinů, imunologických odpovědích, buněčné diferenciaci a proliferaci [37],[38],[46].

Přirozeně se vyskytující *all-trans* izomery provitaminů A a retinolu jsou nestálé. Velmi snadno dochází k jejich izomeraci během skladování potravin, a to hlavně vlivem účinku světla a vyšších teplot, Jsou také citlivé vůči oxidaci a reagují také s volnými radikály, Nedostatek vitamínu A se projevuje xerofthalmií a může vést k šerosleposti [38],[46].

V potravinách rostlinného původu se vitamin A vyskytuje pouze ve formě provitaminů. Nalezneme jej v listové zelenině a v zelenině oranžových odrůd, tedy například v mrkvi, dýni, meruňkách nebo rajčatech. Dalším zdrojem mohou být sýry a mléko [37],[46].

#### 2.3.3.2 Vitamin D

Vitamin D vzniká z provitaminů působením UV záření, Mezi nejvýznamnější deriváty patří cholekalciferol (vitamin  $D_3$ ) a ergokalciferol (vitamin  $D_2$ ). Aktivní formou vitamínu D je kalcitriol, který je po své syntéze transportován do střev. Ve střevech napomáhá resorpci vápníku stimulací syntézy CaBP („Calcium Binding Protein“) [37].

Vitaminy D jsou jako všechny lipofilní vitaminy oxylabilní látky. Při ozářování ergosterolu vzniká nejvýznamnější produkt provitamin  $D_2$ , avšak jako vedlejší produkty může vznikat ještě tachysterol, lumisterol a další produkty. Některé tyto vedlejší produkty mohou vykazovat specifickou toxicitu [38].

Cholekalciferol se běžně vyskytuje v potravinách živočišného původu, dobrým zdrojem jsou jaterní tuky mořských ryb. Při nedostatku se mohou objevit karenní příznaky, u dětí projevující se jako rachitida a u dospělých jedinců jako osteomalacie [37],[46].

### 2.3.3.3 Vitamin E

Základní struktura vitamínu E vychází z tokolu a tokotrienolu. Tokoferoly jsou formy vitamínu E s nasyceným terpenoidním postranním řetězcem odvozeným od tokolu. Tokotrienoly mají ve své struktuře naopak nenasycený terpenoidní postranní řetězec,  $\alpha$ -tokoferol je nejen významným lipofilním antioxidantem, kdy napomáhá předcházet nemocem jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba nebo kardiovaskulární onemocnění. Spolu s  $\beta$ -karotenem a ubichinonem se také podílí na ochraně integrity biomembrán [37],[38],[47].

Tokoferoly a tokotrienoly jsou monoethery příslušných hydrochinonů, a proto se snadno oxidují. Při průmyslovém zpracování je vitamin E poměrně stabilní [38].

Vitamin E se vyskytuje především v potravinách rostlinného původu, hlavně zelené listové zelenině. Nalezneme jej například v celozrnných moukách nebo rostlinných olejích. V menší míře jej nalezneme i v potravinách živočišného původu [37],[38],[47].

### 2.3.3.4 Vitamin K

Mezi hlavní formy vitamínu K řadíme fylochinon (vitamin  $K_1$ ) a menachinon (vitamin  $K_2$ ), jejichž struktura je odvozena od menachinonu s nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem. Hlavní formou vitamínu vyskytující se v plazmě je vitamin  $K_1$ , který je transportován ve vazbě na VLDL lipoproteiny. U ptáků a savců je vitamin K v redukované formě esenciálním faktorem pro karboxylaci některých proteinů, a to například v jejich struktuře vázané kyseliny glutamové na  $\gamma$ -karboxyglutamovou kyselinu. Týká se to zejména srážecích faktorů II, VII, IX, X. Antagonisté vitamínu K, deriváty kumarinu, redukci a následnou karboxylaci potlačují, což se terapeuticky využívá k snižování srážlivosti krve [37],[46].

Největší ztráty vitamínu K vznikají fotodegradací, reakcí s redukčními činidly a alkalickým prostředím. Hydrochinonové formy vitamínu se oxidují na příslušné chinony vzdušným kyslíkem. Během skladování a zpracování potravin jsou vitaminy K relativně stabilní [38].

Bohatým zdrojem je hlavně zelená listová zelenina, rostlinné oleje, maso a masné výrobky a hlavně játra [37].

## 2.3.4 Antioxidanty

Termín antioxidant je běžně využívaným termínem ve vědecké literatuře, ale může být definován mnoha způsoby podle použité metody ke stanovení antioxidační aktivity. Fyziologická role těchto sloučenin je chránit buněčné komponenty před jejich poškozením v průběhu chemických reakcí zahrnující volné radikály [48].

### 2.3.4.1 Oxidační stres

Oxidační stres nastává při nerovnováze mezi produkcí antioxidantů a volných radikálů. Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) a reaktivní dusíkaté radikály (RNS) jsou vysoce reaktivními volnými radikály, nejreaktivnějším radikálem je radikál  $OH^\bullet$ . Většina těchto radikálů je vytvářena mitochondriemi jako vedlejší produkt tvorby energie a zahrnují hydroxylové radikály, radikály superoxidů, ale také peroxid vodíku a singletový kyslík. Ve zdravých, neporušených buňkách dochází k tvorbě ROS jako vedlejších produktů syntézy ATP, při přebytku elektronů a jejich úniku z elektronového transportního řetězce [49].

Oxidační stres bývá příčinou mnoha různých chronických chorob u lidí a je způsoben zvyšující se aktivitou reaktivních kyslíkových radikálů během oxidačních procesů. Oxidace je chemická reakce přenášející elektrony z látky na oxidační činidlo. Oxidační reakce tak může vytvářet volné radikály mající nepárové elektrony schopné vykonat rychlou řetězovou reakci, destabilizovat tak jiné molekuly a vytvářet další volné radikály. Volné radikály obsahující kyslík jsou biologicky nejvýznamnějšími



volnými radikály. Během podmínek oxidačního stresu dochází k vyšší tvorbě těchto volných radikálů mitochondrií nežli enzymatických antioxidantů, jako je například superoxiddismutáza, glutathion-peroxidáza, peroxidáza, kataláza, a neenzymatických antioxidantů jako je například kyselina askorbová, tokoferol, glutathion, karotenoidy, flavonoidy přítomné endogenně nebo dodané buňce [50].

Oxidační stres zprostředkovaný ROS radikály se podílí na vývoji chronických onemocnění. Nejčastěji se jedná o rakovinu, cukrovku, srdeční choroby, mrtvici, Alzheimerovu chorobu, revmatickou artritidu, šedý zákal a stárnutí [51]. Antioxidanty reagují s volnými radikály vytvořenými v buňce a ukončují tak řetězovou reakci předtím, než dojde k poškození zdravých buněk. K ukončení řetězové reakce dochází v momentě odstranění meziproductů volných radikálů a inhibicí dalších oxidačních reakcí neutralizací volných radikálů. Na druhou stranu ovšem dochází k oxidaci antioxidantů. Molekula antioxidantu může reagovat pouze s jedním volným radikálem a z tohoto důvodu je potřeba doplňovat zdroje antioxidantů [50].

#### **2.3.4.2 Zdroje**

Hlavními zdroji antioxidantů jsou rostlinné materiály, například česnek, brokolice, zelený čaj, rajčata, mrkev, květák, borůvky, švestky a citrusové plody. S rozšiřujícím se trhem funkčních potravin obsahující antioxidanty, dochází k velkému zájmu o najít dalších jiných zdrojů bohatých na antioxidanty, které by mohly být bezpečně použity [50].

#### **2.3.4.3 Fenolické sloučeniny**

Fenolické sloučeniny jsou rostlinné sekundární metabolity běžně obsažené v bylinách a ovoci. Mnoho těchto sloučenin způsobuje zbarvení listů, plodů a květů rostliny. Do skupiny fenolických látek řadíme přibližně 8 000 přirozeně se vyskytujících sloučenin, které mají společnou základní strukturu, a to fenol. Fenolické sloučeniny obsahují dvě a více fenolických podjednotek a řadíme zde flavonoidy, stilbeny a taniny [52].

Fenolické látky jsou zkoumány z farmakologického, lékařského i biochemického hlediska. U těchto látek byl prokázán protirakovinný, protizánětlivý, antialergický, vazodilatační, antivirový, antiischemický a antioxidantní účinek. Dále také inhibují aktivitu fosfolipázy A<sub>2</sub>, cyklooxygenázy, lipoxygenázy, glutathion reduktázy. Polyfenoly reagují s ROS a tím je inaktivují. Mechanismus působení flavonoidů záleží na jejich struktuře, obecně však inhibují invazi rakovinných buněk a metastáze [48],[52].

#### **2.3.4.4 Mechanismus účinku**

Mezi tři hlavní mechanismy antioxidantních účinků fenolických látek řadíme přímou reakci s volnými radikály přenosem atomu vodíku (HAT), dále přenesení jednoho elektronu a následně přenesení protonu (SET-PT) a nakonec postupný přenos elektronu při ztrátě protonu (SPLET) [52].

Při přímé reakci s volnými radikály polyfenoly inaktivují volný radikál přenesením atomu vodíku rozrušením vazby mezi OH na molekulu volného radikálu a vzniká tak již bezpečná RH spíše a oxidovaný radikál ArO<sup>•</sup>. I když touto cestou vznikl jiný radikál, je tento radikál méně reaktivní než radikál R<sup>•</sup> [52].



Pokud dochází k přenosu elektronu, tento elektron dodán radikálu. Anion R<sup>-</sup> je energeticky stabilní díky sudému počtu elektronů. Naopak kationtový radikál ArOH<sup>+•</sup> je i v tomto případě méně reaktivním radikálem, nežli radikál R<sup>•</sup> [52].



Dále se můžeme setkat s mechanismem, kdy může docházet k chelataci iontů kovů polyfenoly vytvářející tak stabilní komplexní sloučeninu. Následně tak dochází k zachycení kovů, které by se mohly účastnit reakcí za vzniku volných radikálů. Některé kovy v nízkém oxidačním stavu, jako je

například železnatý kation  $\text{Fe}^{2+}$ , se může účastnit Fentonovy reakce s peroxidem vodíku za vzniku velmi reaktivního kyslíkového radikálu  $\text{OH}^\bullet$  [52].



### 2.3.4.5 Flavonoidy

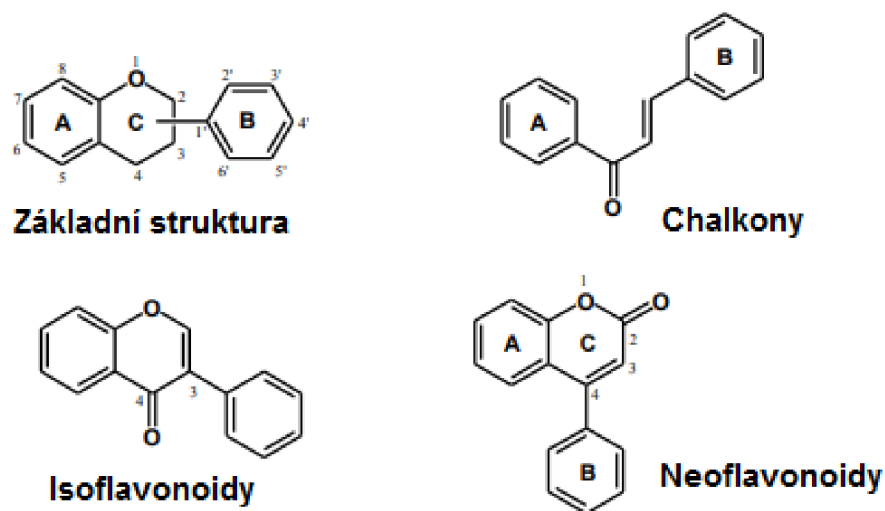
Již bylo zmíněno, že v současné době je známo více než 8 000 fenolických struktur, z toho 4 000 byly identifikovány a zařazeny mezi flavonoidy. V rostlinných pletivech bývají často jako glykosidy nebo jako kyseliny. Flavonoidy lze dále rozdělit na anthokyaniny, flavanoly, flavony, flavanony a flavonoly [53].

Základní struktura flavonoidů se skládá ze dvou benzenových kruhů A a B společných pro fenolické sloučeniny a jsou propojeny heterocyklem C s vázaným kyslíkem (Obrázek 3) [53],[54].

### 2.3.4.6 Separace, identifikace a analýza celkových fenolických látek

I přes společný fenolický stavební základ mají polyfenoly díky strukturní diverzitě různorodé fyzikálně-chemické vlastnosti. Existuje ovšem obecný postup ke stanovení polyfenolů [53].

Před samotnou extrakcí polyfenolů dochází ke sběru vzorku obsahující tyto sloučeniny. Při samotné přípravě je důležité minimalizovat ztráty, ke kterým může docházet během transportu a uchovávání vzorků. Aby se předcházelo degradaci nativních polyfenolů před jejich extrakcí, bývají vzorky často sušeny, mrazeny nebo lyofilizovány. Vzdušná vlhkost nebo voda obsažená přímo ve vzorcích podporuje aktivitu enzymů degradujících vzorky. Důležité je také vyvarovat se vysokým teplotám a oxidaci. Zvláště při sušení by mohlo být dosaženo velmi vysoké teploty. Oxidaci lze zabránit přidáním antioxidantu butyl-hydroxytoluenu nebo kyseliny askorbové. V této přípravné fázi lze využívat také technik filtrace nebo centrifugace [53],[55].



Obrázek 3 Základní struktura flavonoidů [53]

Existuje mnoho metod extrakce polyfenolů, například extrakce dle Soxhleta nebo mikrovlnná extrakce (MAE), přičemž nejčastěji se využívají extrakce rozpouštědlem, a to extrakce kapalina-kapalina (LLE) nebo tuhá fáze-kapalina (SLE). Polyfenoly jsou hydrofilní látky, k extrakci tak dochází polárními rozpouštědly, jako je voda, methanol, ethanol apod. Polyfenoly bývají navíc stabilnější při nižším pH, avšak k úpravě pH se nesmí využívat vysoká koncentrace silných kyselin, jelikož by mohlo

docházet k hydrolyze glykosidů a acylglykosidů. Extrakce tradiční cestou bývá ovšem poměrně dlouhá. Z tohoto důvodu se začaly používat extrakce za vyššího tlaku a vyšší teploty [53],[55],[56].

Nejčastěji využívané metody ke stanovení polyfenolů jsou spektrofotometrické metody. Slouží ke stanovení obsahu celkových fenolických látek, celkových flavonoidů a celkových anthokyaninů. Tyto metody jsou rychlé, ale nelze blíže určit jednotlivé sloučeniny. Interference nefenolických látek může také ovlivňovat výsledky analýzy. Mezi metody využívané k separaci polyfenolů patří chromatografické techniky. Ke kvantifikaci se využívá například vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s diodovým detektorem (DAD) nebo s detektorem hmotnostní spektrometrie (LC-MS). Isoflavony lze po derivatizaci na methylestery analyzovat pomocí plynové chromatografie (GC) [53].

## 2.4 ORGANISMY S VYSOKÝM OBSAHEM BIOAKTIVNÍCH LÁTEK

### 2.4.1 Makrořasy a mikrořasy

Mnoho druhů makrořas jsou po staletí využívány ve farmaceutickém průmyslu a jsou i přímo využívány ve výživě. Obsah makronutrientů je rozdílný nejen podle studovaných druhů, ale také podle původu a klimatických podmínek podle ročního období [56],[57].

Makrořasy určené k výživě jsou bohatým zdrojem proteinů a vlákniny. Obsah bílkovin se liší podle druhů jedlých řas. V hnědých řasách jsou hodnoty bílkovin nízké, 3–15 % hmotnosti v sušině v porovnání se zelenými a červenými řasami, kdy obsah bílkovin může dosahovat až 47 % hmotnosti v sušině [58],[59],[60].

Makrořasy nabízejí poměrně velký podíl nerozpustné vlákniny. Kromě ní obsahuje i rozpustnou vlákninu, která může být využita jako prebiotikum pro růst bifidobakterií v tlustém střevě. V makrořasách nalezneme i vitaminy a antioxidanty (fenolické látky, flavonoidy apod.). Jediným negativem konzumace makrořas je případný vysoký obsah toxických prvků jako je například kadmium [61],[62],[63].

Mikrořasy se ve výživě vyskytují také poměrně dlouhou dobu a široce se využívají jako výživové doplňky stravy. V současné době se studie zaměřují hlavně na potenciální terapeutické výhody, a to díky vysokému obsahu antioxidantů [64].

### 2.4.2 Byliny a koření

Byliny a koření se využívají jako ochucovadla pokrmů, ale zastávají také roli přírodních potravinových konzervantů. Obecně jsou považovány za bezpečné (GRAS). Ve vysokých koncentracích mohou vykazovat inhibici růstu mikroorganismů skrze narušení syntézy mikrobiálních nukleotidů a zabraňovat oxidačnímu stresu. Antimikrobiální účinek koření je úzce spojen s obsahem rostlinných látek, jako jsou flavonoidy, flavony, isoflavony apod. Přítomnost vysokých koncentrací ovšem způsobují negativní organoleptické změny potravin [65],[66].

### 2.4.3 Probiotické bakterie

Lidské střevo představuje velmi složitý ekosystém, který je kolonizován velkým množstvím mikroorganismů ovlivňující fyziologii, imunitní funkci a zdravotní stav hostitele. Mezi těmito mikroorganismy lze nalézt i takové, které vykazují probiotické působení, tedy mikroorganismy podporující zdraví hostitele. Probiotické bakterie izolované nejen ze střev, ale i z dalších prostředí, jsou komerčně využívány. I přes narůstající seznam zdravotních benefitů po konzumaci probiotik, jejich přesný mechanismus účinku není doteď zcela objasněn [67].

### 2.4.3.1 Historie probiotik

První zmínka o vztahu mezi správnou funkcí střev a lidským zdravím se datuje do dob Hippokrata (460–370 př.n.l.). Hippokrates v této době tvrdil, že všechny choroby mají zárodek ve střevech. Výzkum moderní doby přinesl nové teorie, a to již v roce 1886, kdy Theodor Escherich popsal spojení mezi střevními bakteriemi a fyziologií trávení u kojců. V roce 1892 Ludwig Doderlein přišel s domněnkou, že laktobacily mohou být využity k léčbě vaginálních infekcí [68].

Otcem probiotického konceptu je považován Élie Metchnikoff. V roce 1907 vydal knihu, ve které tvrdil, že bakterie tlustého střeva hrají roli v procesu stárnutí a ovlivňují i zdraví u dospělých jedinců. Také předpokládal, že tělo je pomalu otráveno toxiny produkovanými proteolytickými mikroby v tenkém střevě a byly tak příčinou stárnutí. Domníval se tedy, že stárnutí lze předcházet modifikováním střevní mikroflóry užitečnými bakteriemi, které lze získat požíváním kyselého mléka s bakteriemi produkující kyselinu mléčnou [68],[69].

V roce 1908 se podařilo Henrymu Tisserovi izolovat bakterie ze stolice kojence krměného mateřským mlékem. Tyto bakterie byly pojmenovány jako *Bacillus acidophilus*, později byly přejmenovány na *Bifidobacterium*. Také zjistil, že se tyto bakterie objevovaly také ve stolici kojců trpící průjmem, ale ve velmi malé koncentraci [68].

### 2.4.3.2 Definice probiotik

V roce 1974 R. B. Parker poprvé představil slovo „probiotický“ a definoval tak probiotika jako organismy a látky podporující rovnováhu střevní mikroflóry. V roce 1989 pak Roy Fuller navrhl definici probiotik. Definoval probiotika jako živý mikrobiální doplněk stravy, který má příznivý vliv na hostitelské zvíře díky zlepšení jeho střevní mikrobiální rovnováhy. Touto definicí tak zdůraznil důležitost viability probiotických bakterií. Zatím nejnovější definice probiotických bakterií byla vytvořena Potravinovou a Zemědělskou organizací (FAO) ve spolupráci se Světovou Zdravotnickou Organizací (WHO) v roce 2002. Znění této definice je následující: „Probiotické bakterie jsou živé mikroorganismy, které poskytují zdravotní výhody pro hostitele, pokud jsou podávány v adekvátním množství.“ [68],[70],[71]

### 2.4.3.3 Obecná charakteristika

Probiotika jsou živé nepatogenní mikroorganismy podporující mikrobiální rovnováhu především gastrointestinálního traktu. Zvyšující se počet klinických testů podporuje tvrzení, že probiotika pozitivně ovlivňují zdraví hostitele, a to hlavně při léčení určitých průjmových onemocnění. Mohou tak ovlivňovat fyziologii, imunitu i výživu lidského hostitele. Probiotické vlastnosti mohou být specifické podle druhu probiotického kmene, zdravotní výhody jednoho kmene tak nemusí být stejné jako u kmene jiného. Seznam mikroorganismů zařazených mezi probiotika je uveden v Tabulka 2 [72],[73].

Více než 500 různých bakteriálních druhů obývá gastrointestinální trakt dospělého jedince. Bakterie ve střevech představují majoritní zastoupení buněk lidského těla, kdy dosahují počtu až  $10^{12}$  buněk na gram obsahu tlustého střeva. Střevní mikroflóra kojence je ovšem méně komplexní než u dospělého jedince. Různorodost střevní mikroflóry je také velmi ovlivňována mnoha faktory, a to individuálně podle jedince, kdy závisí na pH, žlučových kyselinách, době průchodu a na sliznici střeva – mukóze. Dále závisí na prostředí, v tomto případě na živinách a lécích a na mikrobiálních faktorech, kam řadíme schopnost adheze, produkci bakteriocinů, bakteriální enzymy a metabolické strategie [72],[73].

Probiotiky nazýváme bakterie a kvasinky, které se mohou na trhu vyskytovat jako doplňky stravy nebo mohou být přímo součástí potraviny. Nalezneme je v podobě kapslí, tablet nebo prášku a mohou být obsaženy také v různých fermentovaných výrobcích, nejčastěji jogurtech nebo mléčných nápojích. V těchto výrobcích se mohou vyskytovat samostatně v rámci druhu nebo jako směs několika druhů. V současné době jsou hlavními probiotickými bakteriemi brány bakterie patřící do rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Oba tyto rody běžně osidlují prostředí lidského střeva [67].

K identifikaci několika druhů probiotik z potravin, ze střev zvířat a stolice se v současnosti využívá vysoce citlivá kvantitativní metoda polymerázová řetězová reakce (PCR). Důležitým krokem je výběr specifických primerů, které se specificky vážou na daný zkoumaný druh navzdory přítomnosti jiné velmi blízce příbuzné bakterie. Genová sekvence používaná pro důkaz laktobacilů a bifidobakterií je DNA kódující 16S rRNA, avšak rozlišení úzce příbuzných genů pouze na této sekvenci je velmi obtížné kvůli vysoké sekvenční homologii ve variabilních oblastech tohoto genu [74],[75].

Tabulka 2 Seznam mikroorganismů zařazených mezi probiotika [73]

ROD	DRUH	POZNÁMKA
<b>BAKTERIE</b>		
<b>LACTOBACILLUS</b>	<i>acidophilus</i>	
	<i>bulgaricus</i>	
	<i>casei</i>	
	<i>crispatus</i>	
	<i>fermentum</i>	
	<i>gasseri</i>	
	<i>johnsonii</i>	
	<i>lactis</i>	
	<i>plantarum</i>	
	<i>reuteri</i>	
	<i>rhamnosus</i> GG	
<b>BIFIDOBACTERIUM</b>	<i>adolescentis</i>	
	<i>animalis</i>	
	<i>bifidum</i>	
	<i>breve</i>	
	<i>infantis</i>	
	<i>longum</i>	
<b>BACILLUS</b>	<i>cereus</i>	
<b>ENTEROCOCCUS</b>	<i>faecalis</i>	Jejich případná patogenita a rezistence vůči vankomycinu se stále prověřuje
<b>ENTEROCOCCUS</b>	<i>faecium</i>	
<b>ESCHERICHIA</b>	<i>coli</i> Nissle	
<b>STREPTOCOCCUS</b>	<i>thermophilus</i>	
<b>KVASINKY</b>		
<b>SACCHAROMYCES</b>	<i>boulardii</i>	

#### 2.4.3.4 Vlastnosti probiotik

Probiotické vlastnosti mohou být specifické podle druhu probiotického kmene, takže zdravotní výhody jednoho druhu kmene nemusí být stejné jako u jiného téhož kmene. FAO/WHO vydalo v roce 2002 pokyny pro hodnocení probiotik v potravinách. Probiotika tak musejí vykazovat určité vlastnosti, které poté hostiteli zaručují zdravotní výhody. Minimální požadavky pro udělení probiotického statusu tedy zahrnují [76]:

- Posouzení identity kmene (rod, druh, kmen).
- *In vitro* testy ke screeningu potencionálních probiotik, jedná se o rezistenci proti nízkému pH žaludečních šťáv, žlučové kyselině a enzymům trávení, dále o antimikrobiální aktivitu vůči potenciálním patogenním bakteriím.
- Hodnocení bezpečnosti: požadavky na prokázání bezpečnosti probiotického kmene, navíc bez kontaminace jeho formy při dodávání.
- Studie *in vivo* pro zdůvodnění vlivů na zdraví cílového hostitele.

Probiotika musejí být schopny kromě průchodu nepříznivým prostředím žaludku a tenkého střeva mít schopnost také kolonizovat a reprodukovat se ve střevech, přichytout se adherentně ke střevnímu epitelu a stabilizovat rovnováhu střevní mikroflóry [73].

#### **2.4.3.5 Působení probiotik**

Působení probiotik na hostitele je poměrně dlouho známé, avšak přesný mechanismus tohoto působení nebyl ještě stále zcela objasněn [72].

- **Adheze ke střevnímu epitelu a následná kolonizace**

Adheze na mukózu, střevní sliznici, je potřebná pro jejich delší přetrvávání v prostředí střev a k projevení jejich pozitivního působení. Studie naznačují, že se jedná o vzájemné působení lektinů, lipoproteinů, adhezních molekul nebo exopolysacharidů napomáhající k navázání na střevní mukózu. Dále pomocí adheze dochází k ochraně mukózní bariéry včetně antagonismu proti patogenům. Mechanismy adheze mohou být rozděleny na specifické interakce mezi adhezními receptory a hostitelskými molekulami, jedná se tak o interakce sortáza-dependentních proteinů a „mucus-binding“ proteinů s lipoteichovou kyselinou a exopolysacharidy, a na nespecifické interakce, jako jsou elektrostatické a hydrofobní interakce [72],[77].

Například bakterie rodu *Lactobacillus* mají snahu vázat se na ligandy, receptory, živiny a adherovat na stejném hostitelském mukózním povrchu jako patogeny, a to kompetitivně s patogeny pomocí antipatogenního mechanismu, který vyžaduje různé specifické adheziny, jako je například mucus-binding protein, S-layer proteiny a proteiny účastníci se hlavních metabolických drah jako je glykolýza, glykosylace a syntéza proteinů [77].

- **Zvýšení funkce bariéry střevního epitelu**

Nespočet studií potvrdilo důležitou roli laktobacilů v udržování integrity epitelální bariéry jak *in vitro*, tak i *in vivo* [78]. Existují různé mechanismy této funkce zahrnující modulaci cytoskeletu, indukce produkce mukózy a fosforylaci proteinu buněčného spojení laterálních stěn epitelových buněk. Výsledkem je zlepšení funkce buněčného spojení a imunitní odezvy, stejně jako prevence apoptózy epitelových buněk. Pozitivní vliv laktobacilů na epitel se projevuje přímo jejich kontaktem s epitelovými buňkami přes interakci mucinů a molekul lipoteichoové kyseliny s povrchem mikrobů. Navíc může docházet k aktivaci mitogen-aktivované kinázy a proteinkinázy B. Kromě přímé interakce laktobacilů, dochází také k interakci nepřímé. V tomto případě dochází k sekreci proteinů stimulující aktivaci proteinkinázy B, dále k inhibici apoptózy a k podpoře růstu epitelových buněk [77].

- **Produkce metabolitů a snižování pH**

Přeměna fruktanů a nestravitelných sacharidů probiotickými kmeny může vést k vytváření fyziologicky důležitých molekul. Mnoho kmenů může vylepšit biologickou dostupnost makro- a mikronutrientů hostitele jejich rozložením, když je hostitel není schopen sám metabolizovat. Probiotiky produkované

enzymy, jako jsou například  $\alpha$  nebo  $\beta$ -glukosidáza, galaktosidáza a fruktofuranosidázy, se podílí na metabolismu přijatých sacharidů, avšak jejich aktivita záleží na dostupnosti uhlíkového zdroje v médiu. Metabolity vzniklé pomocí heterofermentativního metabolismu tak pomáhají inhibovat a působí na růst patogenů. Například díky mastným kyselinám s krátkým řetězcem dochází ke snížení pH, které zabraňuje růstu a kolonizaci patogenům citlivých na kyselé prostředí. Dalším příkladem je akumulování kyseliny mléčné, kdy dochází ke snížení pH prostředí, díky kterému dochází k propustnosti vnější membrány gramnegativních bakterií a inhibici aktivity ureázy. Propionát a butyrát se vyznačují také antagonistickým efektem zvláště proti karcinomu tlustého střeva [72],[77].

- **Nutriční a fyziologické působení laktobacilů**

Laktobacily mají schopnost degradovat laktózu, napomáhají řešit tedy problém při její nesnášenlivosti hostitelem nebo pomáhají řešit problém maldigesce a také zlepšují biologickou dostupnost minerálů rozkladem taninů a fytátů. Mnoho studií také uvádí schopnost produkovat vitaminy skupiny B, které jsou pro hostitele esenciální [77].

- **Mikrobiologické působení**

Probiotika ovlivňují mikrobiologické intervence k udržení nebo zlepšení mikrobiální rovnováhy v hostitelském prostředí a inhibují patogenní mikroorganismy a jejich kolonizaci. Důležitým aspektem je synergická interakce mezi probiotiky a endogenní prospěšnou mikroflórou. Například laktát produkovaný laktobacily může být přeměněn na kyselinu máselnou některými bakteriemi střeva, jako je *Eubacterium hallii*, který tak zabraňuje akumulaci kyseliny mléčné v hostitelských buňkách a současně je butyrát prospěšný pro epitelium gastrointestinálního traktu [77].

- **Produkce sloučenin proti patogenům**

Laktobacily syntetizují mnoho různých metabolitů vykazující přímou antipatogenní aktivitu vůči bakteriím, virům a plísním. Mezi tyto metabolity řadíme například kyselinu mléčnou, peroxid vodíku, bakteriociny a fenylmléčnou kyselinu [77].

Jeden z mechanismů probiotického působení je uvolňování sloučenin o molekulové hmotnosti 3–130 kDa známých jako bakteriociny. Tyto ribosomálně syntetizované antimikrobiální sloučeniny byly poprvé zmíněny v roce 1980. Bakteriociny jsou řazeny mezi 4 kategorie podle jejich molekulové hmotnosti, tepelné stability a složení aminokyselin. Obecně se vyznačují antimikrobiální aktivitou, kdy narušují permeabilitu buněk vedoucí až k lýze buněk. Sekrecí bakteriocinů mohou laktobacily kontrolovat blízké příbuzné bakterie, které se nacházejí ve stejném ekologickém prostředí prostřednictvím mechanismu způsobující membránovou propustnost a následně dochází k úniku molekul zaměřující se na jiné bakterie. Mezi bakteriociny produkované bifidobakteriemi patří bifidocin B, bifidocin A, acidocin B, bifidin I, bisin atd. Tyto bakteriociny jsou obecně stabilní v pH 3–10 a také jsou odolné vůči slabým organickým rozpouštědlům. Mají také významnou teplotní stabilitu a jsou odolné vůči chlazení, mražení a vlivu solí a enzymů. Jsou tak potencionálními kandidáty pro aplikace v potravinovém průmyslu [72],[77].

- **Imunologické působení**

Hlavním imunologickým benefitem zprostředkovaným laktobacily je modulace imunitní odezvy hostitele prostřednictvím jejich interakce s gastrointestinální mukózou. Laktobacily mohou na epitelové buňky působit přímo i nepřímo. Složky buněčné stěny laktobacilů, jako je kyselina lipoteichoová kyselina, lipopolysacharidy, peptidoglykany a lipoproteiny jsou rozpoznány buňkami hostitele díky receptorům, kdy poté dochází k aktivaci imunitních odpovědí hostitele. Nicméně různé kmeny rodů *Lactobacillus* mohou aktivovat různé složky imunitní odpovědi. Probiotické působení bylo tak zkoumáno a aplikováno v mnoha případech k prevenci a terapeutické intervenci u lidí, zvířat a v *in vitro* modelech [77].

### 2.4.3.6 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* se řadí mezi běžné mikroby střevní sliznice lidí a zvířat. Tato skupina bakterií je důležitá pro udržování stability gastrointestinálního traktu, zabraňuje střevním infekcím a obecně podporuje zdraví střev. Mnoho druhů laktobacilů se obecně řadí mezi bezpečné druhy, některé mohou dokonce interagovat s epitelálními buňkami střev [79].

Tento rod zahrnuje 145 druhů řadících se do kmene *Firmicutes*. Mnoho druhů bakterií se řadí mezi bakterie mléčného kvašení patřící mezi druhy GRAS, tedy jsou všeobecně považovány za bezpečné. Také se jedná o grampozitivní bakterie, netvořící katalázu, ale produkující kyselinu mléčnou jako hlavní produkt fermentace, kromě kyseliny mléčné mohou produkovat také acetát, ethanol, CO<sub>2</sub>, formiát a sukcinát. Tyto bakterie jsou nesporeující obligátní sacharolytické tyčinky nebo kokobacily obecně charakterizované nízkým zastoupením guaninu (G) a cytosinu (C) v genomu, kdy nejvyšší hodnota GC dosahuje 59,2 mol%. Teplota růstu bakterií je v rozsahu 2 až 53 °C a jsou navíc schopné růst v pH mezi 3 až 8. Optimální teplota a pH jsou obvykle mezi 30–40 °C a 5,5–6,2. Bakterie vyžadují komplexní nutriční požadavky, co se týče aminokyselin, peptidů, vitaminů, solí, mastných kyselin a esterů mastných kyselin. Mohou být tedy nalezeny v mléčných výrobcích, obilných výrobcích, mase a rybích výrobcích, kyselém zelí, v naložené zelenině atd. [67],[79]

- **Adaptační faktory laktobacilů k hostiteli**

Laktobacily byly také v poměrně velkém množství detekovány u lidí v žaludku a v tenkém střevě, viz (Tabulka 3). Probiotické výhody vůči hostiteli záleží na optimální adaptaci bakterií ke střevnímu prostředí hostitele, kdy se jedná o přežití, adaptaci a kolonizaci bakterií v tomto prostředí. Nejprve jsou bakterie vystaveny nepříznivým podmínkám gastrointestinálního traktu, jako je kyselé prostředí, žlučové soli, oxidace, osmóza a hladovění. Mechanismus stresové rezistence laktobacilů spočívá hlavně v integritě buněčné schránky, opravách, ochraně a exportu makromolekul z buňky a detekování přítomných stresorů. Mnoho studií je zaměřeno na studium adaptace laktobacilů na nutriční limitace, a to sacharidů, fosfátu a dusíku, které jsou důležité pro syntézu nukleových kyselin, aminokyselin a proteinů [67],[79].

Tabulka 3 Druhy laktobacilů izolovaných ze vzorků stolice [67]

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

### 2.4.3.7 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* se řadí do kmene *Actinobacteria*, který reprezentuje největší bakteriální taxonomickou jednotku. Bifidobakterie jsou grampozitivní bakterie o vysokém obsahu G + C. Jsou také nesporeující, avšak oproti laktobacilům jsou striktně anaerobní. Teplotní optimum je v rozmezí 37–41 °C a optimální pH se nachází mezi 6,5 a 7. Sacharidy fermentují heterofermentativně za produkce kyseliny octové a mléčné v poměru 3:2 [80],[81],[82].



Bifidobakterie byly poprvé izolovány ze stolice kojence Tissierem v roce 1899. Nejprve byly tyto bakterie pojmenovány *Bacillus bifidus*. Z důvodu jejich odlišné morfologické a fyziologické struktury, jež se podobala struktuře laktobacilů, byly klasifikovány do rodu *Lactobacillus*, a to převážnou část 20. století. Momentálně se tento rod skládá z 39 druhů, které se mohou shlukovat do 6 různých fylogenetických skupin, a to *B. adolescentis*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. longum*, *B. pullorum* a *B. pseudolongum* [80].

Bifidobakterie zastupují skupinu mikroorganismů, které často dominují v savčích střevech v době jejich kojení (Tabulka 4). Bifidobakterie se vyskytují na různých ekologických místech, které jsou přímo nebo nepřímo spojené s prostředím lidských nebo zvířecích střev [80],[83].

Tabulka 4 Druhy bifidobakterií vyskytující se u lidí [83]

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

#### 2.4.4 Mikrobiom u dětí

V okamžiku narození je lidské střevo považováno za sterilní, avšak po porodu dochází velmi rychle k jeho osidlování mikroorganismy. Přirozenými zdroji střevní mikroflóry jsou zástupci vaginálního a fekálního mikrobiomu matky, stejně jako mikroby z prostředí. Různorodost střevní mikroflóry závisí nejen na jednotlivém kojenci, ale také na průběhu porodu, místním prostředí a typu krmení kojence, stupně vývoje kojence a ošetření antibiotiky. Při užívání antibiotik u novorozenců může dojít k pozdějšímu správnému vývoji střevní mikroflóry zastoupenou převážně bifidobakteriemi. Také se zvětšuje riziko kolonizace patogenních bakterií jako je *klebsella*, *enterobakter*, *citrobakter*, *pseudomonas* atd. [72]

Průběh porodu hraje důležitou roli při vytváření neonatální mikroflóry. Studie metagenomiky střevní sliznice a vzorků stolice odebraných od zdravých jedinců prokázaly přítomnost 8 dominantních fylogenetických kmenů patřících do *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes* a *Actinobacteria*. Při klasickém porodu vaginální cestou dominují ve střevech kojence bakterie *Lactobacillus* spp. v porovnání s kojenci narozených pomocí císařského řezu. Například *L. plantarum*, *L. delbrueckii* a *L. reuteri* patří mezi nejčastěji se vyskytující mikroorganismy ve vzorcích stolice u švédských dětí během prvního roku života. Kromě laktobacilů obvykle dominují svým počtem u kojenců krmených mateřským mlékem bifidobakterie. Nedávné výzkumy poukázaly na určité oligosacharidy lidského mléka hrající roli ve vývoji střevní mikroflóry kojence. *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* a *Bifidobacterium bifidum* jsou totiž obdařeny genovou sadou, která kóduje enzymy specializované na metabolismus oligosacharidů lidského mléka. Bifidobakterie tak zastupují 60 až 91 % celkového zastoupení fekálních bakterií u kojenných dětí a 28 až 75 % u dětí krmených umělou mléčnou stravou. Po ustálení komplexu střevní mikroflóry po druhém

roce života dochází k poklesu zastoupení fekálních bifidobakterií na pouhé 1 až 3 %. U dětí kmených umělou mléčnou stravou navíc kolonizují střeva také bakteroidy, klostridie, enterobakterie a streptokoky [84],[85].

## 2.5 VYBRANÉ METODY ZPRACOVÁNÍ A ANALÝZY PROBIOTIK

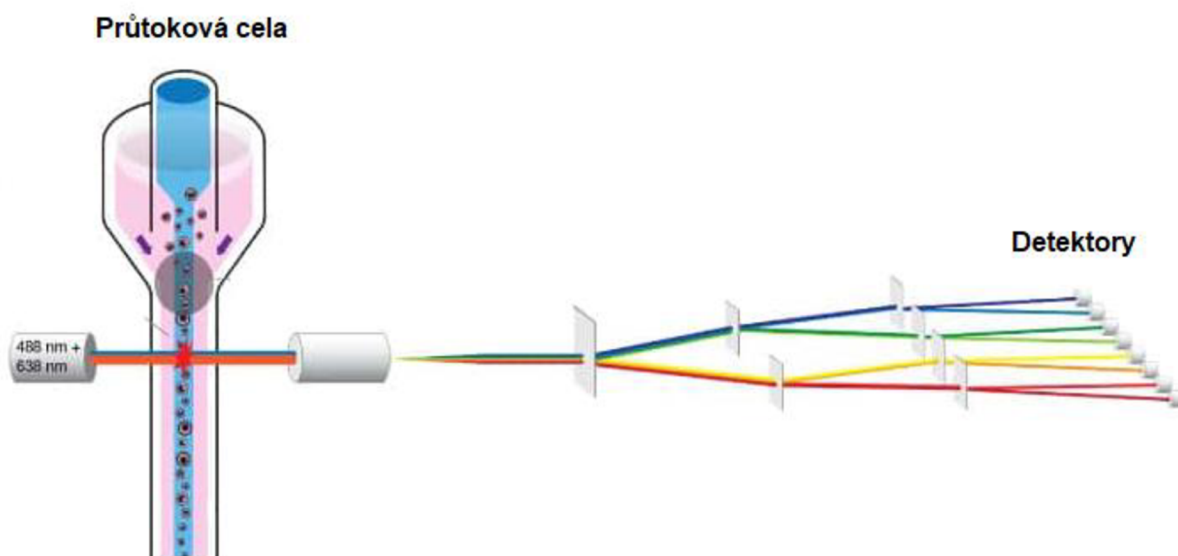
### 2.5.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce díky své schopnosti vytvářet nespočet kopií DNA sekvence, umožňuje poměrně snadnou identifikaci bakterií. Důležitou součástí je tzv. master mix, který obsahuje nukleotidy, set primerů a další komponenty kromě důležité polymerázy. Primery jsou krátké sekvence DNA, oligonukleotidy, které jsou komplementární k sekvencím na opačných vlákních templátové molekuly a které lemují segment DNA určený k amplifikaci. Pro identifikaci bakterií se používají sekvence genu pro 16S rRNA. Obecně platí, že kmeny vykazující >98% podobnost v sekvenci tohoto genu, jsou považovány za stejný druh [86],[87].

Real-time PCR (qPCR) je běžně používaným nástrojem pro identifikaci bakteriálních kmenů ze vzorků potravin nebo fekálií. Tato metoda je velmi citlivá a je schopna kvantifikace ve velkém rozsahu ( $10-10^9$  CFU). Zároveň poskytuje možnost nepřetržitě monitorovat průběh PCR reakce pomocí fluorescence a informaci o konkrétní sekvenci pak poskytne metoda teploty tání duplexu DNA [88],[89].

### 2.5.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je technika založena na měření a analýze fyzikálních parametrů unášených částic, které jsou dispergované v proudu laminárně proudící tekutiny a zároveň jsou ozařovány zdrojem světla, laserem (Obrázek 4). Za krátký čas tak lze stanovit vlastnosti jednotlivých buněk jako je například velikost, hustota nebo tvar. Pomocí fluorescenčních sond nebo barviv lze dále sledovat například viabilitu zkoumaných buněk. Průtokový cytometr dokáže sběrem dat o emitujícím fluorescenčním záření poskytnout informaci o buněčné viabilitě. Mezi běžně používaná fluorescenční barviva řadíme propidiumjodid nebo thiazolovou oranž [90],[91].



Obrázek 4 Zjednodušené zobrazení principu průtokové cytometrie [92]

### 2.5.3 Enkapsulace

Enkapsulace je moderní technologie nabízející jisté technologické výhody, a proto má uplatnění v různých odvětvích průmyslu, ať už farmaceutickém, chemickém, environmentálním či textilním. V technologickém průmyslu se nejčastěji využívá k uvolňování biologicky aktivních látek regulovanou rychlostí po delší časový úsek za specifických podmínek a také k prodloužení jejich skladovatelnosti. Mezi další uplatnění enkapsulace se řadí imobilizace buněk nebo enzymů při výrobě potravinových materiálů nebo produktů fermentace, dále zabraňuje průběh nežádoucích reakcí s dalšími složkami v roztoku, a to především s kyslíkem a vodou [93].

#### 2.5.3.1 Techniky enkapsulace

Metoda enkapsulace je definována jako zachycení jedné látky látkou druhou. Enkapsulovaná látka bývá nazývána jako aktivní, jádro nebo také vnitřní fáze. Látka, která tuto aktivní látku enkapsuluje, ohraničuje ji, bývá nazývána nosným materiálem, kapslí nebo také vnější fází. Velikost připravených částic se pohybuje v rozmezí od nanometrů až po milimetry [93].

- **Nosný materiál**

Použití nosného materiálu se liší podle využitelnosti ve vybraném technologickém odvětví. Malá část těchto látek ovšem splňuje požadavky k aplikaci v potravinovém průmyslu, jelikož předpisy pro tento průmysl je mnohem přísnější než například pro průmysl kosmetický nebo farmaceutický [94].

Výběr nosného materiálu enkapsulace je velmi důležitý, jelikož ovlivňuje účinnost samotné enkapsulace a stabilitu mikrokapsulí [95].

- 1) Materiál by měl mít dobré reologické vlastnosti při vysokých koncentracích a mělo by být jednoduché s ním manipulovat.
- 2) Musí prokazovat schopnost disperze nebo emulzifikace aktivní složky a vytvořit ta stabilní produkt.
- 3) Po chemické stránce by neměl reagovat nosný materiál s aktivní složkou, kterou chceme enkapsulovat.
- 4) Aktivní složka by díky nosnému materiálu měla být uzavřena a držena uvnitř během procesu a skladování.
- 5) V průběhu sušení by nemělo být překážkou odstranit rozpouštědlo a další materiály použité při enkapsulaci.
- 6) Maximální ochrana aktivního materiálu před vnějšími podmínkami.
- 7) Rozpustnost použitého rozpouštědla by měla být akceptována v souladu s potravinovým průmyslem (jedná se například o vodu a ethanol).

- **Aplikace enkapsulace v potravinovém průmyslu**

Metody enkapsulace se hojně využívají v potravinovém průmyslu, v této podkapitole jsou vypsány hlavní důvody jejich využití [95].

- 1) Enkapsulace chrání jádro před jeho degradací snížením reaktivity s vnějším prostředím.
- 2) Vypařování nebo rychlost přesunu jádra do vnějšího prostředí je snižována nebo úplně potlačena.
- 3) Fyzikální vlastnosti původního materiálu mohou být modifikovány a snadněji lze s nimi pracovat.
- 4) Uvolnění produktu do vnějšího prostředí lze zpomalit nebo regulovat.
- 5) Flavour jádra může být zamaskován.

- 6) Jádro může být zředěné, pokud je potřeba pouze jeho malé množství. Stále ovšem dochází k jeho rozptýlení v celém objemu nosného materiálu.
- 7) Metodu lze využít k oddělení složek ve směsi, které by spolu mohly vzájemně interagovat.

- **Typy částic**

Lze připravit tři typy částic. První typ částic, nazývaný kapsule, obsahuje vrstvu obklopující jádro, ve kterém se nachází enkapsulovaná aktivní látka. U druhého typu částic dochází k disperzi aktivní látky v celém objemu nosného materiálu a může být imobilizována i na povrchu částice. Třetí typ částic je kombinací první dvou typů. Kapsule s rozptýlenou aktivní složkou je obalena dodatečnou vrstvou. Biologicky aktivní sloučeniny se liší ve své molekulové hmotnosti, polaritě, rozpustnosti atd. Z tohoto důvodu je důležité vybrat správnou metodu enkapsulace, abychom dosáhli konkrétních fyzikálně-chemických a molekulových požadavků [95].

- **Postup enkapsulace**

Existuje mnoho technik pro enkapsulaci potravinových sloučenin, ovšem neexistuje univerzální metoda, která by se dala použít na celou řadu biologicky aktivních potravinových složek. Enkapsulované složky jsou převážně v tekuté formě, z tohoto důvodu je mnoho technik založeno na sušení [95].

### **2.5.3.2 Techniky sušení**

Pro většinu potravin a bioproduktů, u kterých dochází při jejich sušení k odstranění vody přes fázi odpařování, se k jejich enkapsulaci převážně využívají techniky sušení. Jedná se o jedny z nejstarších metod ke konzervaci a uchování po dobu několika měsíců nebo dokonce i let [96].

- **Sprejové sušení**

Sprejové sušení je nejstarší a zároveň nejrozšířeněji používanou enkapsulační technikou využívanou v potravinovém a farmaceutickém průmyslu, a to k přeměně farmaceutik v tekuté formě na prášek nebo k podpoře životaschopnosti probiotických bakterií. Výborné vlastnosti práškové formy sloučenin se projevují nejen v ochraně, stabilizaci, ale také v rozpustnosti a regulovatelném uvolňování. Touto metodou lze enkapsulovat pomocí polysacharidů (škrob, maltodextrin, kukuřičný sirup, chitosan), lipidů (stearová kyselina, mono- a diglyceridy) a proteinů (kasein, sója, pšenice) [95].

Materiál k enkapsulaci je homogenizován s nosným materiálem v poměru 1:4. Směs je poté vložena do přístroje a atomizována pomocí trysky nebo rotačního rozprašovače. Voda je odpařena pomocí horkého vzduchu, který je v kontaktu s atomizovaným materiálem. Poté jsou vzniklé kapsule shromažďovány ve spodní části přístroje. Při sprejovém sušení je důležité kontrolovat vstupní a výstupní teplotu. Pokud je vstupní teplota příliš nízká, nedochází během krátkého časového úseku k úplnému odpařování vody, vzniklý prášek tak může být stále vlhký. Naopak velmi vysoká vstupní teplota vede k praskání vzniklých mikrokapsulí. Během procesu sušení dochází ke změně morfologie částic a velikost částic podle obsahu vlhkosti a teploty sušení. V průběhu sušení dochází k tvorbě filmu na povrchu kapky a dochází tak k zakoncentrování látek, dokud se nevytvoří pórovitá suchá částice. Chladicí efekt odpařeného rozpouštědla udržuje teplotu kapek poměrně nízkou. Sprejové sušení navíc nabízí flexibilitu při regulaci velikosti částic a morfologie optimalizováním procesních parametrů a formování přítoku tekutiny do trysky. Enkapsulací pomocí sprejového sušení lze tedy připravit různé druhy částic, jako jsou jednojádrové, vícejádrové, vícestěnné částice nebo kompozity [95],[97],[98].

Sprejové sušení lze využít k zachování nutričních hodnot vitaminů. Tato metoda je oproti lyofilizaci 30–50krát levnější. Dále lze enkapsulovat pomocí sprejového sušení betalainy, polyfenoly, olejové kapičky atd. [95]

- **Lyofilizace**

Lyofilizace neboli sušení mrazem je velmi vhodná metoda pro dehydrataci termolabilního materiálu a pro mikroenkapsulaci založené na sublimaci. Lyofilizace je široce používanou metodou k odstranění vody k prodloužení stability probiotických bakterií během doby skladování [95],[98].

V průběhu lyofilizace dochází ke čtyřem hlavním bodům, a to k zmrazení, sublimaci, desorpci, a nakonec ke skladování. Díky lyofilizaci lze zachovat tvar, rozměry, vzhled, chuť, barvu, texturu a biologickou aktivitu. Během mražení jsou vytvářeny krystalky ledu, které mohou poškodit probiotické buňky. Velikost a růst krystalu závisí na rychlosti mražení a teplotě, velmi rychlé mražení je preferováno nežli pomalá rychlost mražení, jelikož při rychlém zmražení dochází k formování malých krystalků ledu. Formováním malých krystalků ledu se předchází rozsáhlému poškození buněk. Nejen tvorba krystalků ledu je zhoubná pro probiotika. Dále při krystalizaci vody dochází k zakoncentrování zbytkového nezmrzlého roztoku, což vede k chemickému a osmotickému poškození. Při primárním sušení je zmrzlá voda odstraněna pomocí sublimace v prostředí vakua. Při sekundárním sušení dochází k odstranění nezamrzlé vody pomocí desorpce. Nevýhodou této techniky je také její vysokoenergetická náročnost a delší doba trvání [95],[98],[99].

### **2.5.3.3 Liposomy**

Liposomy jsou uzavřené částice tvořeny lipidovým materiálem, jako jsou například fosfolipidy, rozptýlené ve vodném médiu. Během procesu vytváření dochází k tvorbě jedné nebo více vrstev, což je obdobná struktura jako u buněčných membrán. Liposomy vynikají svými vlastnostmi. Nejenže oddělují vnitřní prostředí od prostředí vnějšího, dále zlepšují stabilitu enkapsulované látky. Navíc dochází ke zlepšení biologické aktivity špatně rozpustných látek ve vodě, regulovanému uvolňování aktivní látky a biodegradabilitě liposomů [100],[101].

V současnosti existuje mnoho dostupných metod přípravy liposomů, důležité je ovšem to, aby připravené liposomy vykazovaly dobrou stabilitu a vysokou enkapsulační účinnost. Mezi běžné metody přípravy liposomů řadíme odpařování na tenké vrstvě, metodu reverzních fází nebo metodu vstřikovávání do rozpouštědla. K redukci velikosti částic jsou využívány metody sonikace, extruze za vysokého tlaku a mikrofluidizace. U těchto metod se setkáváme s problémy, například to, že částice bývají poměrně velké a jejich distribuce je poměrně široká. V tomto případě je potřebná následná granulace částic. Dalším problémem může být přítomnost organického rozpouštědla ve finálním produktu. Z tohoto důvodu se zařazují nové techniky přípravy liposomů, řadíme zde například superkritickou fluidní technologii nebo duální asymetrickou centrifugaci [101].

Tento typ částic se uplatňuje v mnoha oborech, ať už v biochemii, molekulární biologii, potravinové technologii, farmacii a lékařství [100].

### **2.5.4 Enkapsulátor**

Enkapsulátor je poloautomatický přístroj sloužící k polymerní enkapsulaci chemických látek, biologických molekul, extraktů, buněk a mikroorganismů. Tento přístroj lze využívat za sterilních i nesterilních podmínek. Přístroj se skládá z regulační jednotky se stříkačkovým čerpadlem, elektrickým a pneumatickým systémem a reakční nádoby. Princip vzniku kapslí je založen na regulovaném laminárním kapalném proudu, kdy za pomoci vibrace s optimální frekvencí dochází k rozbití kapek na

kapičky o stejné velikosti. Velikost kapiček závisí na několika parametrech, například na frekvenci vibrací, amplitudě, velikosti trysky atd. [102]

Aktivní látka se smíchá s nosným polymerem, jedná se převážně o polysacharidy, a směs se převede do stříkačky nebo tlakové láhve. Pomocí stříkačkového čerpadla nebo tlakového vzduchu je směs tlačena do pulzační komory. Kapalina je poté přetlačována přes provrtanou trysku a na jejím výstupu dochází k rozdělování na jednotlivé kapičky stejné velikosti. Tyto kapky procházejí elektrickým polem mezi tryskou a elektrodou, kde získávají povrchový náboj. Dopadající kapičky kulovitého tvaru padají do vytvrzovacího roztoku díky vzniklým elektrostatickým silám, Vytvrzovací roztok tak musí být elektricky uzemněn [102].

V závislosti na několika proměnných dochází ke vzniku 50 až 5 000 kapiček za sekundu. Vzniklé kapičky jsou ve vytvrzovacím roztoku kontinuálně míchány magnetickým míchadlem, aby nedošlo k jejich shlukování [102].

#### **2.5.4.1 Alginát**

Alginát, respektive sodná sůl kyseliny alginátové, je ve vodě rozpustný polysacharid, který je izolován z hnědých druhů řas čeledi *Pheophyceae*. Jedná se o nerozvětvený polysacharid skládající se ze dvou zbytků uronové kyseliny v různém poměru M/G,  $\alpha$ -L-gulonové kyseliny (G) a  $\beta$ -D-mannuronové kyseliny (M), Vlastnosti gelu se projevují na základně kompozice M/G a také na základě organizace M a G v řetězci [103],[104].

Alginátové kapsle se obvykle připravují kapáním buněčné suspenze v roztoku alginátu do síťujícího roztoku dvojmocného iontu. Nejčastěji je používán vápenatý iont. Interakce vápenatých iontů s karboxylovými skupinami tvoří unikátní molekulovou síť, která dodává gelu pevnost. Existují studie pracující také s barnatým kationtem, I přes větší pevnost částic, baryum ovšem nevyniká biokompatibilitou jako vápník [105].

Alginát sodný je klinicky ověřený imunomodulační biopolymer, který je zcela biodegradabilní, biokompatibilní a netoxický. I při malých koncentracích ovlivňuje reologické vlastnosti vodných roztoků [106].

#### **2.5.4.2 Chitosan**

Chitosan se řadí mezi polysacharidy a je využíván jako netoxický a biokompatibilní biopolymer převážně v biomedicíně a farmaceutickém odvětví. Je odvozený od deacetylovaného chitinu, který je součástí exoskeletu hmyzu, schránek koryšů a buněčných stěn hub. Chitosan je lineární kopolymer 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranózy a 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glykopyranózy. Díky přítomnosti aminových skupin, může být chitosan přeměněn na polyelektrolyt pouze v kyselém médiu. Chitosan tak nese pozitivní náboj a může reagovat s povrchy s negativním nábojem. Aby došlo ke zpevnění vazeb chitosanových kapslí, přikapávají se do tripolyfosfátu sodného nebo do hexametafosfátu sodného [107].

Ve formě nanočástic navíc vykazuje vyšší antimikrobiální aktivitu vůči *Escherichia coli*, *Salmonella choleraes*, *Salmonella typhimurium* a *Staphylococcus aureus* než pouhý roztok chitosanu [107],[108].

## Cíle práce

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

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

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

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 POUŽITÉ ŽIVÉ SYSTÉMY

#### 3.1.1 Buněčné linie

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

#### 3.1.2 Mikroorganismy

Kultury získané z České sbírky Masarykovy univerzity v Brně kultivované dle doporučení poskytovatele kultur – Tabulka 5 a Tabulka 6.

Tabulka 5 Testované bakteriální kultury pro antimikrobiální testy

CCM	KULTURA
1569	<i>Micrococcus luteus</i>
4417	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
3954	<i>Escherichia coli</i>
8587	<i>Serratia marcescens</i>

Tabulka 6 Testované probiotické kultury

CCM	KULTURA
4833	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
4798	<i>Lactobacillus casei</i>
7190	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
7039	<i>Lactobacillus plantarum</i>
7825 <sup>T</sup>	<i>Bifidobacterium breve</i>
3762	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
4990	<i>Bifidobacterium longum</i>

### 3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Analytické váhy, Ohaus, USA

Předvážky, Ohaus, USA

Centrifuga Eppendorf MiniSpin, CZE

Centrifuga Hermle Z36 HK, CZE

Vakuová odparka IKA Werke, RV06-ML, DEU

Lyofilizátor Labconco FreeZone Triad Freeze Dry, USA

Termoblok VWR, CZE

Vortex, Ohaus, USA

Ultrazvukový homogenizátor Bandelin Sonplus HS3200, SonorexTechnik, DEU

Enkapsulátor BÜCHI B-395, BÜCHI, DEU

Kuchyňský lis Yoda, Yoda, CZE



Kjeldatherm KT-L, Gerhardt, DEU

Soxtherm, Gerhardt, DEU

Nanofotometr, Implen GmbH, DEU

Spektrofotometr UV-VIS, Boeco, DEU

Zetasizer Nano ZS, Malvern, GBR

HPLC/PDA/RI sestava

HPLC/UV-VIS sestava

- Sestava Dionex Ultimate 30000, Thermo Fisher Scientific, USA
- DAD řady Vanquish, Thermo Fisher Scientific, USA
- Kolona C18 EVO 150 mmx4,6 mmx2,6 µm, Phenomenex
- Kolona F5 100 A, mmx4,6 mmx2,6 µm, Phenomenex
- Kolona F5 100 A, mmx4,6 mmx2,6 µm, Phenomenex
- Předkolona C18, AJ0-4287, Phenomenex

GC/FID sestava

- Thermo Scientific TRACETM 1300 Gas Chromatograph, Thermo Fisher Scientific, USA
- Detektor FID, Thermo Fisher Scientific, USA
- Thermofisher Scientific AI 1310 Autosampler
- Kolona LION LN-FAME, 30 mx0,32 mmx0,20 µm, Chromservis, CZE

Laminární box Aura mini, BioAir Instruments, USA

Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom, CZE

Optický mikroskop Intraco Micro LM 666 PV/LED, CZE

Software Dino-Capture 2,0, CZE

Biohazard laminární box, Airstream II, ESCO, DEU

Centrifuga EBA 200, Hettich, DEU

Centrifuga Beckman, USA

Cell Culture CO2 inkubátor, ESCO, DEU

Vodní lázeň Stuart, DEU

Software Gen 5, Biotek, USA

Software Toupview, ToupTek Photonics, CHN

ELISA reader HTX, BioTek, USA

Microscope ZEISS EVO LS 10, Zeiss, DEU

ICP-MS, Agilent Technologies, JPN

HPLC 1260 Infinity Quaternary LC, Agilent technologies, JPN

Kolony pro SECxAF, GE Healthcare, SWE

### **3.2.1 Použité chemikálie**

Standardy pro HPLC (sacharidový kit, k. L-askorbová, k. citronová, β-karoten, vybrané fenolické látky atd.), Sigma-Aldrich, DEU

Acetát amonný, Sigma-Aldrich, DEU

2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) ABTS, Sigma Aldrich, DEU

Peroxodisíran amonný, Sigma Aldrich, DEU

6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-dikarboxylová kyselina Trolox, Sigma Aldrich, DEU

Folin-Ciocalteuovo činidlo, Lachner, CZE

Alginát sodný, Sigma Aldrich, DEU

Phosphatidylcholin, Sigma Aldrich, DEU  
Rozpouštědla pro HPLC, Gradient Grade, Lach:Ner, CZE  
Trifluoroctová kyselina, Sigma Aldrich, DEU  
Komerční Fructan kit, Megazyme, IRL  
Komerční  $\beta$ -glucan kit, Megazyme, IRL  
Komerční ELISA kit, SEPP1, Elabscience, USA  
Slunečnicový lecithin, Fichema, CZE  
Vaječný lecithin, Sigma-Aldrich, DEU  
Cholesterol, Sigma Aldrich, DEU  
Pankreatin z vepřové slinivky, Sigma-Aldrich, DEU  
Pepsin z prasečí žaludeční sliznice, Sigma-Aldrich, DEU  
Žlučové kyseliny, Sigma-Aldrich, DEU

### **3.2.2 Chemikálie ke kultivaci mikroorganismů**

Biological agar powder, Himedia, IN  
Nutrient Broth medium, Himedia, IN  
MRS lactobacili Broth, Himedia, IN  
Yeast extract powder, Himedia, IN  
Pepton, Himedia, IN

### **3.2.3 Chemikálie ke kultivaci buněčných linií**

DMEM high glucose, w/o pyruvate, HyClone, USA  
Earl's Dulbecco, Biowest, FR  
Fetální bovinné sérum HyClone, USA  
Antibiotic-antimycotic 100X, Biosera, DEU  
MTT, WVR, USA  
Pyruvát sodný, WVR, USA  
NADH, WVR, USA,  
2,4-dinitrofenylhydrazin, Sigma-Aldrich, DEU  
Komerční kit EBPI SOS Chromotest, CAN

### **3.2.4 Materiál**

#### **3.2.4.1 Vzorky pro stanovení selenometabolitů a selenoproteinu P**

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

#### **3.2.4.2 Vlákna**

Vzorky vláknin byly zakoupeny přes internetový obchod se zdravou výživou pro sportovce. Jakon sirup byl jako jediný ve formě viskózní tekutiny.

- Inulin, Česká republika
- Chia vláknina, Velká Británie
- Bambusová vláknina, Německo
- Jakon sirup, Peru
- Směs chlorelly a spirulliny, EU

#### **3.2.4.3 Makrořasy, mikrořasy a sinice**

Vzorky vysušených mořských makrořas byly zakoupeny z internetového obchodu zdravé výživy. Před samotnou extrakcí a analýzou musely být vzorky makrořas pomlety na prášek pro zvětšení povrchu částic a zvýšení účinnosti extrakce.

Vzorky chlorelly a spiruliny byly zakoupeny v místní zdravé výživě již v podobě prášku v Brně.

- Chlorella, Čína
- Spirulina, Čína
- Arame, Japonsko
- Wakame, Japonsko
- Hijiki, Japonsko
- Kombu, Japonsko

#### **3.2.4.4 Rostlinné prášky**

Rostlinné prášky mladého ječmene, zelené pšenice, moringy a matcha byly také pořízeny v místní zdravé výživě v Brně. Prášky nemusely být před analýzami upravovány, pouze bylo zajištěno, aby nedocházelo k absorpci vzdušné vlhkosti.

- Mladý ječmen, EU
- Mladá pšenice, EU
- Moringa, Indie
- Matcha, Čína

#### **3.2.4.5 Semínka a ořechy**

Semínka a ořechy pro získání rostlinných olejů byly zakoupeny ve zdravé výživě v Brně. Vlašské ořechy byly získány samosběrem v roce 2018. Při lisování za studena nebyly plody narušeny, pouze u extrakce hexanem a přímého stanovení mastných kyselin došlo k rozrušení obalu a plodu dezintegrací pomocí sekáčku anebo případně se využila třecí miska s tloučkem.

- Sezamové semínka, Indie
- Lněná semínka, Rusko
- Konopná semínka, EU
- Dýňová semínka, Česká republika
- Římský kmín, Rakousko

#### **3.2.4.6 Byliny, koření a čaje**

Vzorky suchých částí bylin byly zakoupeny ve zdravé výživě, případně v obchodech k tomu určených. Vzorky koření a čajů běžně dostupných byly zakoupeny v supermarketech v Brně.

- Heřmánek, Česká republika
- Chmel, Česká republika
- Hřebíček, Rakousko
- Skořice, Česká republika
- Malinový čaj, Česká republika

- Jeřabinový čaj, Česká republika
- Fenyklový čaj, Česká republika

### 3.2.4.7 Šťávy a sirupy

Čerstvé ovocné nebo zeleninové šťávy byly připraveny pomocí odšťavněním zakoupeného ovoce. V případě nutnosti byly přefiltrovány přes gázu. Dílčí analýzy byly provedeny ihned po přípravě šťávy.

Zakoupené sirupy byly po otevření analyzovány v co nejkratším čase, aby nedošlo k mikrobiální kontaminaci, která by mohla ovlivnit charakterizaci vzorků.

- Lesní plody, Německo
- Bezinka, Německo
- Ananas, Thajsko
- Pomeranč, Španělsko
- Pomelo, Čína
- Hruška, Česká republika
- Zelná šťáva, Česká republika

### 3.2.5 Komerční probiotické produkty

- Bipro Junior, Valsun
- APO-LAKTÍK, Apotex

## 3.3 METODY

### 3.3.1 Stanovení selenu v kolostru pomocí 2D-SEC-SECxSEC-AF-ICP-MS

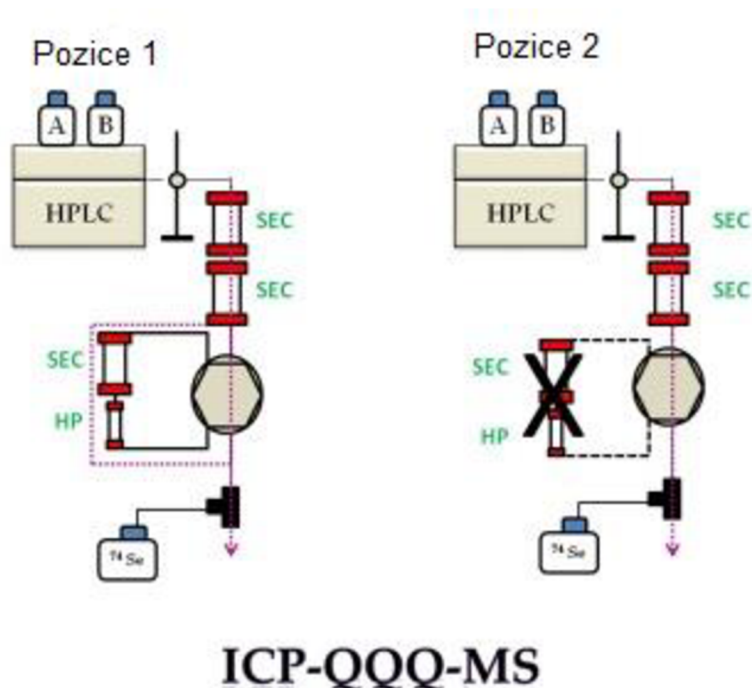
Bílkovinné vzorky mateřského mléka byly získány ultracentrifugací při 31 000 rpm po dobu 90 minut při teplotě 4 °C. Následně bylo 100 µl proteinového sedimentu přefiltrováno a nastříknuto do smyčky nastaveného systému metody 2D-SEC-SECxSEC-AF-ICP-MS [109].

Separace selenometabolitů a selenoproteinů byla provedena za pomoci dvou 5 ml HiTrap desalting kolon (SEC, 16 mm x 25 mm), které byly zapojeny v sérii a spojeny pomocí 6cestného ventilu k další též SEC koloně a 1 ml afinitní koloně (HEP-HP, 7 x 25 mm). Byly využity dvě pozice ventilu, a to pozice 1 (2D-SEC-SECxSEC-AF-ICP-MS) a pozice 2 (2D-SEC-SEC-ICP-MS).

Jako mobilní fáze byly využity roztoky 50 mmol·l<sup>-1</sup> (MF A) a 1,5 mol·l<sup>-1</sup> roztok octanu amonného (MF B) o průtokové rychlosti 1,3 ml·min<sup>-1</sup>. Nastavené parametry mobilních fází v průběhu jednoho měření znázorňuje následující tabulka a schéma (Tabulka 7, Obrázek 5).

Tabulka 7 Podmínky separace vzorků mateřského mléka

Čas [min]	Mobilní fáze	Pozice ventilu
0–5,4	A	1
5,4–12	A	2
12–35	B	1



Obrázek 5 Schéma podmínek separace pro vzorek mateřského mléka

### 3.3.2 Stanovení selenu v krevních vzorcích pomocí 2D-SEC-SECxSEC-AF-ICP-MS

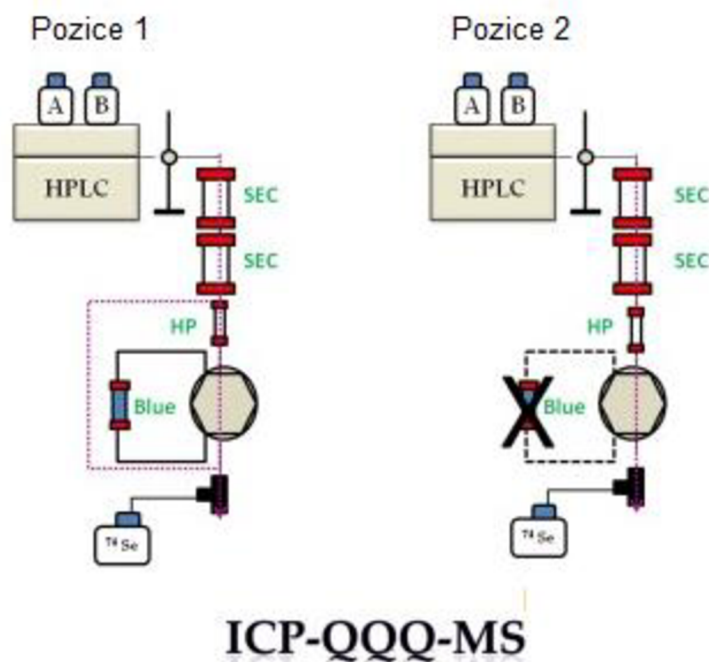
Mateřské a pupečnickové sérum bylo přefiltrováno přes PVDF filtry (průměr 20 mm, pórovitost 0,45  $\mu\text{m}$ ) a rovnou nastříknuto do smyčky nastaveného systému metody 2D-SEC-SECxSEC-AF-ICP-MS. Jako referenční standard bylo použito lidské sérum BCR-637.

Separace selenometabolitů a selenoproteinů byla provedena podobně jako u kolostra s tou výjimkou, že byly použity pouze dvě separační kolony (SEC-SEC) a byla přidána jedna afinitní kolona pro retenci SeAlb ve stacionární fázi Blue-Sepharose kolony (BLUE-HP). Opět byly využity dvě pozice 6cestného ventilu, a to pozice 1 (2D-SEC-SEC-AF(HP)xAF(BLUE-HP)-ICP-MS) a pozice 2 (2D-SEC-SEC-AF(HP)-ICP-MS) <sup>[110]</sup>.

Jako mobilní fáze byly využity roztoky 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (MF A) a 1,5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok octanu amonného (MF B) o průtokové rychlosti 1,3  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Nastavené parametry mobilních fází v průběhu jednoho měření znázorňuje následující tabulka a schéma (Tabulka 8, Obrázek 6).

Tabulka 8 Podmínky separace vzorků krevního séra

Čas [min]	Mobilní fáze	Pozice ventilu
0–20	A	1
20–24	B	2
24–40	B	1



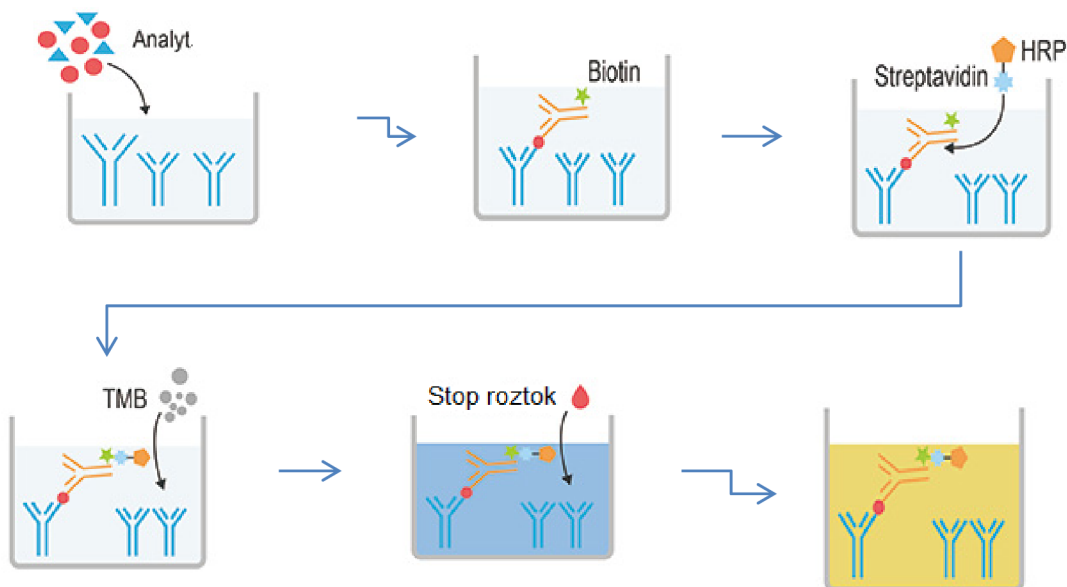
Obrázek 6 Schéma podmínek separace pro vzorek krevního séra

### 3.3.3 Stanovení selenometabolitů a selenoproteinů P pomocí ELISA kitu

Selenoprotein P ve všech vzorcích byl také stanoven pomocí ELISA kitu (Elabscience, Houston, USA). Tento kit je založen na principu biotin-avidin konjugace (Obrázek 7), kdy byla do jamek předem navázána protilátka specifická pro lidský selenoprotein P. Reálné vzorky byly nejprve centrifugovány při 1 000 rpm po dobu 20 minut při teplotě 4 °C. Supernatanty byly dle potřeby naředěny PBS puforem o pH 7 a naředěné vzorky byly použity k dalším krokům měření.

Připravené vzorky o objemu 100  $\mu$ l byly přidány do jamek mikrotitrační destičky a následně proběhla inkubace po dobu 90 minut při 37 °C. Po inkubaci byly roztoky z jamek odpipetovány a byl přidán pracovní roztok s biotinem. Opět následovala inkubace po dobu 60 minut při 37 °C. Po této inkubaci byly jamky promyty PBS puforem a bylo přidáno 100  $\mu$ l HRP pracovního roztoku a mikrodestička byla inkubována 30 minut při 37 °C. Následně byly jamky opět promyty PBS puforem a do jamek bylo přidáno 90  $\mu$ l roztoku substrátu (tetrametylbenzidín) a jamky byly inkubovány 15 minut při 37 °C. Po poslední inkubaci byla reakce zastavena stop roztokem kyseliny sírové a barevná změna byla proměřena spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm.

Pomocí lidského referenčního standardu BCR-637 o koncentraci 10  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  byla připravena kalibrační řada o koncentračním rozmezí 0,2–10  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



Obrázek 7 Zobrazení postupu stanovení selenoproteinů pomocí ELISA kitu

### 3.3.4 Extrakce polárními rozpouštědly

Vzorky rostlinných materiálů byly extrahovány vodou a 20% roztokem ethanolu. Navážka 1 g vzorku byla extrahována 10 ml rozpouštědla ( $0,1 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) a za stálého míchání při zvýšené teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  byly inkubovány po dobu 24 hodin. Po skončení extrakce byly vzorky přefiltrovány přes gázu a následně byl filtrát ještě centrifugován při 7 000 rpm po dobu 5 minut. Supernatanty byly ponechány k dílčím stanovením.

Tekuté vzorky byly v případě nutnosti také centrifugovány za stejných podmínek a vhodně naředěny pro dílčí stanovení.

### 3.3.5 Extrakce olejů

Ze suchých rostlinných vzorků byl extrahován lipidický extrakt. U semínek byl navíc využit i kuchyňský přístroj lis Yoda (Yoda, CZE).

#### 3.3.5.1 Lisování za studena

Dle instrukcí přístroje byla podle druhu semínek zvolena rychlost šneka a lisování (Obrázek 8). Vzorky nebyly předem upraveny. Po vylisování byla zaznamenána hmotnost oleje a vypočítán výtěžek uvedený v procentech.



Obrázek 8 Kuchyňský lis Yoda

### 3.3.5.2 Extrakce lipidických extraktů

Pomocí automatického přístroje Soxtherm, Gerhardt, byly pomocí hexanu extrahovány oleje z rostlinných vzorků (Obrázek 9). Parametry extrakce přizpůsobené vlastnostem vzorku a rozpouštědla jsou uvedeny v Tabulka 9. Po dokončení extrakce bylo zbývající rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce. Po dokonalém vysušení slzičkových nádob se získanými oleji byla vypočítána daná výtěžnost.



Obrázek 9 Průběh extrakce pomocí přístroje Soxtherm



Tabulka 9 Podmínky extrakce lipidických extraktů pomocí automatického přístroje Soxtherm

Parametr	Hodnota
Teplotní maximum	200 °C
Extrakční teplota	170 °C
Pulzní redukce	3 s
Interval redukce	3,5 min
Extrakce za vysoké teploty	1,5 hod
Odpařování A	5x interval
Čas extrakce	1 hod
Odpařování B	2x interval
Odpařování C	10 min
Délka programu	3 hod 4 min

### 3.3.6 Stanovení ve vodě rozpustných celkových sacharidů podle Duboise

Kolorimetrická metoda je založena na dehydrataci cukrů koncentrovanou kyselinou sírovou a následné kondenzaci vzniklého furfuralu nebo 5-hydroxymethylfurfuralu s fenolem <sup>[111]</sup>.

K 1 ml vzorku byl přidán 1 ml 5% fenolu s 5 ml koncentrované 96% kyseliny sírové. Roztok byl ihned zamíchán a po dobu 30 minut byl inkubován při laboratorní teplotě. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 490 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí roztoku D-glukózy o koncentraci v rozmezí 0,02–0,1 mg·ml<sup>-1</sup>. Výsledná koncentrace celkových sacharidů byla vypočítána pomocí následující kalibrační rovnice:

$$A [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}] = 6,576 \cdot c \quad (4)$$

$$R^2 = 0,992$$

### 3.3.7 Stanovení redukujících cukrů podle Somogyi-Nelsona

Kolorimetrická metoda je založená na vzniku molybdenové modře vzniklou redukcí arsenomolybdenové kyseliny měďnými ionty <sup>[112]</sup>.

K 1 ml vzorku bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II <sup>[113]</sup>. Následně byl vzorek umístěn do vroucí lázně po dobu 10 minut. Poté byl vzorek ochlazen pod tekoucí vodou na laboratorní teplotu. K ochlazenému vzorku bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III. Vzniklý oxid měďný byl rozpuštěn promícháním na vortexu. Nakonec byl doplněn objem vzorku na 10 ml destilovanou vodou a byla proměřena absorbance při 720 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí roztoku D-glukózy o koncentraci v rozmezí 0,001–0,01 mg·ml<sup>-1</sup>. Výsledná koncentrace redukujících sacharidů byla vypočítána pomocí následující kalibrační rovnice:

$$A [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}] = 17,438 \cdot c \quad (5)$$

$$R^2 = 0,995$$

### 3.3.8 Stanovení nerozpustné vlákniny

Nerozpustná vláknina byla stanovena pomocí metody podle Henneberga a Stohmanna <sup>[114]</sup>.

Do 50 ml destilační baňky bylo naváženo 2,5 g vzorku. K navážce bylo přidáno 200 ml 5% kyseliny sírové a baňka byla umístěna do topného hnízda. Následně po dobu 30 minut probíhal var pod zpětným chladičem. Po ukončení varu byl roztok za tepla přefiltrován přes filtrační kelímeček a promyt horkou vodou. Zbytek na filtračním kelímku byl kvantitativně převeden zpět do destilační baňky a k němu bylo přidáno 200 ml 5% roztoku NaOH. Následně probíhal opět var pod zpětným chladičem po

dobu 30 minut. Po přefiltrování do filtračního kelímku a promytí horkou vodou a ethanolem, byl obsah kelímku vysušen při 105 °C. Po vychladnutí byl kelímek zvážen a vložen do muflové pece, kde byl spálen při teplotě kolem 650 °C. Hmotnost popela byla poté odečtena od hmotnosti vysušené sedimenty. Výsledná hmotnost nerozpustné vlákniny se tak vypočte dle následujícího vztahu:

$$m_{\text{vláknina}} [\text{g}] = m_{\text{vysušení}} - m_{\text{spálení}} \quad (6)$$

### 3.3.9 Stanovení celkového dusíku

Stanovení celkového dusíku bylo provedeno podle modifikované Kjeldahlovy metody<sup>[115]</sup>.

Do mineralizačních trubic byl vložen navážený 1 g vysušeného vzorku a přidáno 10 ml koncentrované kyseliny sírové a 2 g Weiningerova katalyzátoru. Vzorky byly následně mineralizovány pomocí automatického přístroje Kjeldatherm KT-L (Gerhardt, Německo) při teplotě 410 °C po dobu 2,5 hodiny (Tabulka 10). Po ochlazení byly mineralizáty rozpuštěné v malém množství destilované vody. Následně bylo k mineralizátům přidáno pár kapek fenolftaleinu a pomocí přístroje Vapodest (Gerhardt, Německo) byly vzorky destilovány do předlohy, která obsahovala 25 ml standardizované kyseliny sírové o koncentraci 0,05 mol·dm<sup>-3</sup>. Po ukončení destilace bylo do předlohy přidáno několik kapek Tashirova indikátoru a roztok byl titrován standardizovaným roztokem NaOH o koncentraci 0,1 mol·dm<sup>-3</sup>. Hmotnostní zastoupení celkového dusíku bylo poté vypočteno dle následujícího vztahu:

$$w_N [\%] = \frac{2 \cdot M_N \cdot (c_{H_2SO_4} \cdot V_{H_2SO_4} - \frac{c_{NaOH} \cdot V_{NaOH}}{2})}{m_{\text{vzorek}}} \quad (7)$$

Tabulka 10 Parametry mineralizačního procesu pro stanovení celkového dusíku

	Čas	Proces
<b>Krok 1</b>	15 min	zahřívání 100 °C
<b>Krok 2</b>	15 min	zahřívání 200 °C
<b>Krok 3</b>	120 min	zahřívání 410 °C
<b>Krok 4</b>	30 min	chlazení

### 3.3.10 Stanovení mastných kyselin pomocí GC-FID

Před samotnou analýzou mastných kyselin pomocí GC-FID bylo potřeba vzorky transesterifikovat. Dle povahy vzorku bylo do krimpovacích vialek navážené potřebné množství vzorku (homogenní prášek – 15 mg, extrahovaný olej – 10 mg). K navážkám byla přidána transesterifikační směs o objemu 1,8 ml. Transesterifikační směs obsahovala 15 % (V/V) koncentrované 96% kyseliny sírové a 0,5 mg·ml<sup>-1</sup> interního standardu mastné kyseliny C13 rozpuštěných v methanolu o HPLC kvalitě. Vialky byly poté zakrimповané a inkubovány v termobloku při 85 °C po dobu 120 minut. Po inkubaci a vychladnutí byl celý obsah převeden do větších 4 ml vialek, ve kterých bylo nachystaných 0,5 ml 0,05 NaOH. Ke směsi byl přidán ještě 1 ml hexanu o HPLC kvality. Vialky byly protřepány na multipozičním vortexu po dobu 5 minut. Po oddělení fází bylo z horní hexanové fáze odebráno 0,1 ml, které byly převedeny do nové skleněné vialky. K tomuto objemu vzorku bylo přidáno 0,9 ml čistého hexanu o HPLC kvalitě a vzorky byly připraveny k analýze. Podmínky stanovení jsou uvedeny v Tabulka 11. Vzorky a koncentrace mastných kyselin byly poté srovnávány a vyhodnoceny podle zakoupeného mixu standardů (C4–C24, Sigma-Aldrich, DEU).

Tabulka 11 Podmínky analýzy přístroje GC-FID

Podmínky měření	
<b>Sestava</b>	Trace™ 1300 Gas Chromatograph (Thermo Fisher Scientific)
<b>Kolona</b>	Zebron ZB-FAME, 30 m x 0,25 mm x 0,20 μm (7HG-G033-10)
<b>Teplota injektoru</b>	250 °C, poměr děliče toku 10
<b>Nosný plyn</b>	Vodík
<b>Průtok MF</b>	1 ml·min <sup>-1</sup>
<b>Objem vzorku</b>	20 μl
<b>Detektor</b>	FID, teplota 260 °C Průtok-vzduch 350 ml·min <sup>-1</sup> , dusík 30 ml·min <sup>-1</sup> , vodík 35 ml·min <sup>-1</sup>
<b>Doba analýzy</b>	25,5 min
<b>Software</b>	Chromeleon XSP

### 3.3.11 Stanovení celkových fenolických látek

Kolorimetrická změna je způsobená oxidací fenolů v zásaditém prostředí za současné redukce molybdenanů a wolframanů na modře zbarvené oxidy [116].

K 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla v poměru 1:9 destilovanou vodou byl přidán 1 ml destilované vody a 50 μl vzorku. Po promíchání byl roztok ponechán k inkubaci po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a poté bylo přidáno 1,5 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného (21,8 g na 100 ml destilované vody při 20 °C). Po promíchání a 15minutové inkubaci při laboratorní teplotě byla měřena absorbance při 750 nm. Jako kalibrační roztok byla použita kyselina gallová v koncentračním rozmezí 0,1–0,7 mg·ml<sup>-1</sup>. Výsledná koncentrace celkového obsahu fenolických látek byla vypočítána pomocí následující kalibrační rovnice.

$$A [\text{g} \cdot \text{l}^{-1}] = 17,438 \cdot c \quad (8)$$

$$R^2 = 0,995$$

#### 3.3.11.1 Identifikace a stanovení vybraných fenolických látek

Vzorky pro analýzu byly připravené smícháním 1 ml vzorku s 1 ml hexanu. Po promíchání byly ke směsi přidány 2 ml 70% roztoku methanolu. Po protřepání byla odebrána polární frakce a vhodně naředěna MiliQ vodou. Připravené vzorky byly nakonec přefiltrovány přes nylonový filtr do připravené čisté vialky, které byly umístěné do autosampleru sestavy kapalinového chromatografu. Podmínky stanovení jsou uvedeny v tabulkách (Tabulka 12 a Tabulka 13). Výsledky byly porovnávány s výsledky kalibračních rovnic standardních roztoků, které byly rozpuštěny v methanolu (Tabulka 14).

Tabulka 12 Podmínky stanovení fenolických látek

Podmínky měření	
<b>Sestava</b>	Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific)
<b>Kolona</b>	Kinetex F5 (150x4,6 mm, 2,6 μm)
<b>Teplota separace</b>	35 °C
<b>Průtok mobilní fáze</b>	0,4 ml·min <sup>-1</sup>
<b>Objem vzorku</b>	20 μl
<b>Detektor</b>	DAD Vanquish, λ = 260 a 280 nm
<b>Doba analýzy</b>	30 min
<b>Software</b>	Chromeleon 7

Tabulka 13 Složení mobilních fází a gradientová eluce

	Směs	% (V/V)
<b>Mobilní fáze A</b>	0,1% TFA	100
<b>Mobilní fáze B</b>	ACN	100
<b>Retenční čas [min]</b>	<b>Mobilní fáze A [%]</b>	<b>Mobilní fáze B [%]</b>
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
25	100	0

Tabulka 14 Standardní roztoky a kalibrační rovnice pro stanovení fenolických látek

Standard	Rovnice regrese [ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ] (9)
epikatechin	$y = 1154 \cdot x$
epikatechin-galát	$y = 2946,9 \cdot x$
katechin	$y = 565,62 \cdot x$
kofein	$y = 9532,5 \cdot x$
rutin	$y = 14960,6 \cdot x$
saponarin	$y = 2946,9 \cdot x$
naringerin	$y = 279,38 \cdot x$
kyselina ferulová	$y = 6614,1 \cdot x$
kyselina gallová	$y = 5315,7 \cdot x$
kyselina chlorogenová	$y = 639,47 \cdot x$
kyselina kávová	$y = 2047,2 \cdot x$
kyselina vanilová	$y = 4707,1 \cdot x$
kyselina kumarová	$y = 4962,2 \cdot x$
kyselina sinapová	$y = 3927,6 \cdot x$

### 3.3.12 Stanovení flavonoidů

Kolorimetrická změna sledovaná při stanovení je způsobená vytvořením stabilních komplexů chloridu hlinitého s  $\text{C}_4$  ketoskupinou a s  $\text{C}_3$  nebo  $\text{C}_5$  hydroxylovou skupinou flavonoidů za vzniku oranžově zbarveného roztoku <sup>[117]</sup>.

K 0,5 ml stanovovaného vzorku bylo přidáno 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% dusitanu sodného. Po promíchání se roztok nechal 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě a potom bylo přidáno 0,2 ml 10% chloridu hlinitého. Po promíchání se nechal roztok opět 5 minut inkubovat a poté byl přidán 1,5 ml  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Roztok se nechal 15 minut inkubovat. Poté byla změřena absorbance při 510 nm. Jako kalibrační roztok byl použit roztok katechinu rozpuštěného v ethanolu v koncentračním rozmezí 0,05–0,3  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Výsledná koncentrace flavonoidů byla vypočítána pomocí následující kalibrační rovnice.

$$A [\text{g} \cdot \text{l}^{-1}] = 17,438 \cdot c \quad (10)$$

$$R^2 = 0,995$$

### 3.3.13 Stanovení antioxidační aktivity

Ke stanovení byla využita jedna ze základních metod stanovení antioxidační kapacity využívající roztok ABTS<sup>•+</sup> [118]. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) (ABTS) byla rozpuštěna v destilované vodě na molární koncentraci mmol·l<sup>-1</sup>. Radikálový kationt ABTS<sup>•+</sup> byl získán reakcí s 2,45 mmol·l<sup>-1</sup> peroxidisíranu draselného. Roztok byl ponechán nejméně 12 hodin ve tmě při laboratorní teplotě. Před použitím byl radikál zředěný UV-VIS ethanolem na absorpenci  $A = 0,700 \pm 0,020$  při 734 nm proti UV-VIS ethanolu. Do zúžené kyvety byl napipetován 1 ml zředěného roztoku ABTS, následně bylo přidáno 10 µl extraktu. Následně byl zaznamenán pokles absorbance po 10 minutách inkubace ve tmě při laboratorní teplotě. Referenční vzorek byl připraven použitím 10 µl destilované vody. Pro kalibraci byl připraven roztok 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylové kyseliny (Trolox) v rozmezí koncentrací 50–400 µg·ml<sup>-1</sup>. Celková antioxidační aktivita byla vypočítána pomocí následující kalibrační rovnice a vyjádřena jako hodnota TEAC.

$$A [\text{g} \cdot \text{l}^{-1}] = 17,438 \cdot c \quad (11)$$
$$R^2 = 0,995$$

### 3.3.14 Stanovení celkových fruktanů pomocí Megazyme kitu

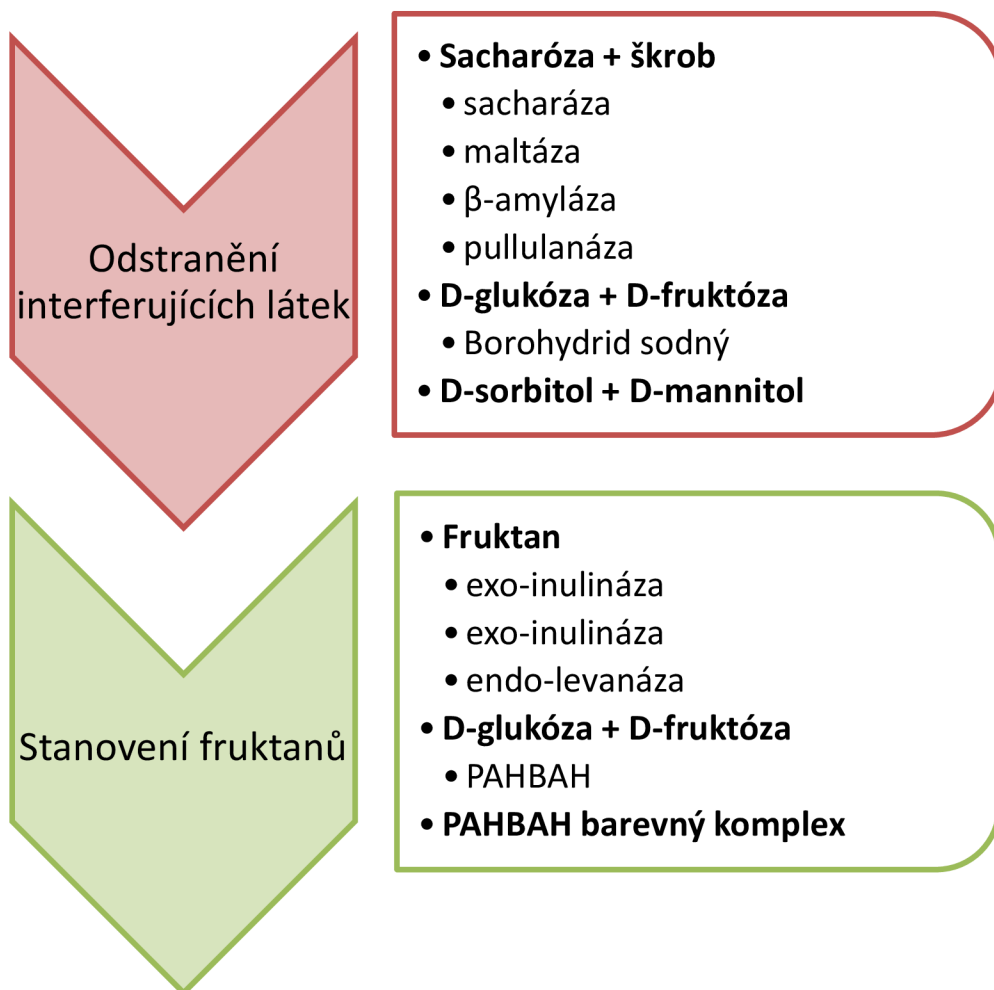
Stanovení celkových fruktanů bylo provedeno pomocí komerčně zakoupeného kitu od firmy Megazyme (Fructan Assay kit, Megazyme, IRL). Roztoky byly nachystány dle pokynů výrobce [119].

Reakční slepý vzorek byl připraven napipetováním 0,3 ml pufru II. Pro stanovení fruktanů probíhá paralelně referenční kontrola, a to přidáním 0,2 ml standardního roztoku fruktózy do 0,9 ml pufru II. Z takto připraveného referenčního vzorku bylo do čtyř zkumavek napipetováno po 0,2 ml a do každé zkumavky bylo poté přidáno ještě 0,1 ml pufru II. 400 mg rostlinného vzorku bylo navážených do uzavíratelných skleněných zkumavek a bylo přidáno 25 ml destilované vody. Zkumavky byly umístěny do vroucí lázně a inkubovány při 100 °C po dobu 10 minut s občasným promícháním. Po skončení inkubace byly zkumavky se vzorky ochlazeny pod tekoucí vodou na laboratorní teplotu. Obsah zkumavek byl následně centrifugován při 13 000 rpm po dobu 5 minut. 0,2 ml supernatantu bylo odpipetováno do čisté skleněné zkumavky, ke kterému bylo přidáno 0,2 ml roztoku sacharázy. Směs byla inkubována při 30 °C po dobu 30 minut. Poté bylo do směsi napipetováno 0,2 ml roztoku alkalického borohydridu. Obsah zkumavek byl promíchán a inkubován při 40 °C po dobu 30 minut. Po ukončení inkubace bylo do zkumavek přidáno 0,5 ml roztoku 200 mM kyseliny octové a vše bylo promícháno na vortexu.

Po promíchání bylo do třech zkumavek odpipetováno 0,2 ml vzniklé směsi. Do dvou zkumavek bylo následně napipetováno 0,1 ml enzymového roztoku fruktanázy. Do třetí zkumavky bylo namísto fruktanázy napipetováno 0,1 ml pufru II a tento vzorek byl použitý jako slepý vzorek. Nakonec byly všechny zkumavky inkubovány při 40 °C po dobu 30 minut. Po skončení inkubace bylo do všech zkumavek obsahující reálné vzorky, reakční slepý vzorek, fruktózovou kontrolu a slepé vzorky, přidáno 5 ml PAHBAH reagentu. Všechny zkumavky byly inkubovány ve vroucí lázni po dobu 6 minut. Zkumavky byly po inkubaci ve vroucí lázni ochlazeny pod tekoucí vodou na laboratorní teplotu a ihned byla změřena absorbance proti reakčnímu slepému vzorku při vlnové délce 410 nm. Princip stanovení znázorňuje Obrázek 10.

Hmotnostní koncentrace fruktanů, která byla následně převedena na navážku vzorku, byla vypočtena dle následujícího vztahu obsaženého v rámci kitu:

$$\text{Fruktany } [\% w/w] = (A_{\text{vzorek}} - A_{\text{reference}}) \cdot \frac{54,5 \mu\text{g D-fruktózy}}{m_{\text{navážka vzorku}}} \cdot F \cdot 61,9 \quad (12)$$



Obrázek 10 Princip stanovení celkových fruktanů pomocí kitu uvedený výrobcem

### 3.3.15 Stanovení β-glukanů pomocí Megazyme kitu

Stanovení β-glukanů bylo provedeno pomocí komerčně zakoupeného kitu od firmy Megazyme (β-glucan assay kit, Mixed linkage, IRL). Roztoky byly nachystány dle pokynů výrobce [120].

Při stanovení β-glukanů probíhala paralelně i příprava a stanovení glukózové kontroly, která byla připravena smícháním standardního roztoku glukózy, dostupného v soupravě, s 0,1 ml pufru II. Reakční slepý vzorek byl připraven smícháním 0,1 ml destilované vody a 0,1 ml pufru II.

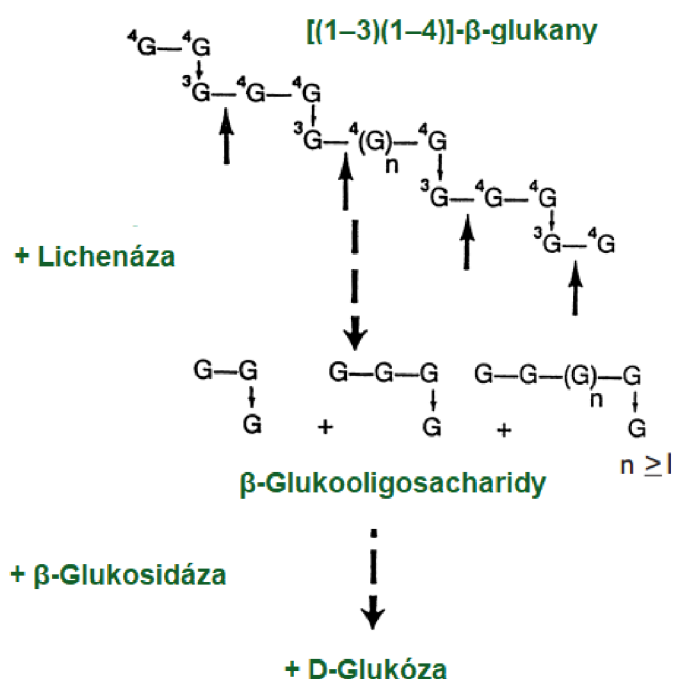
80–120 mg suchého a homogenizovaného vzorku bylo naváženo do skleněné uzavíratelné zkumavky. Poté bylo přidáno 0,2 ml roztoku ethanolu a 4 ml pufru I. Obsah zkumavek byl promíchán a zkumavky byly vloženy do vroucí lázně po dobu 1 minuty. Po opětovném promíchání byly zkumavky s obsahem inkubovány ve vroucí lázni po dobu 2 minut. Následně proběhla inkubace při 50 °C po dobu 5 minut a po uplynulé době bylo přidáno 0,2 ml roztoku lichenázy. Zkumavky se vzorky byly uzavřené parafilmem a inkubovány při 50 °C po dobu 1 hodiny s občasným promícháním. Po ukončení hodinové inkubace bylo do zkumavek přidáno 5 ml pufru III a vzorky byly promíchány na vortexu. Zkumavky byly ochlazeny pod tekoucí vodou na laboratorní teplotu a obsah byl poté zcentrifugován při 8 000 rpm po dobu 6 minut.

Ze supernatantu bylo do třech zkumavek odpipetováno po 0,1 ml. Do dvou zkumavek pak bylo přidáno 0,1 ml  $\beta$ -glukosidázy a do třetí byl přidán 0,1 ml pufru II. Všechny zkumavky byly inkubovány při teplotě 50 °C po dobu 10 minut.

Po skončení inkubace bylo do všech zkumavek obsahujících reálné vzorky, reakční slepý vzorek, glukózovou kontrolu a slepé vzorky, přidáno 3 ml GOPOD reagentu. Všechny zkumavky byly inkubované při 50 °C po dobu 20 minut. Zkumavky byly po inkubaci v lázni ochlazeny na laboratorní teplotu a ihned byla změřena absorbance proti reakčnímu slepému vzorku při vlnové délce 510 nm. Princip stanovení znázorňuje Obrázek 11.

Hmotnostní koncentrace  $\beta$ -glukanů, která byla následně převedena na navážku vzorku, byla vypočtena dle následujícího vztahu obsaženého v rámci kitu:

$$\beta - \text{glukany } (\% w/w) = (A_{\text{vzorek}} - A_{\text{reference}})g \cdot \frac{100 \mu\text{g D-glukózy}}{A_{100 \mu\text{g D-glukózy}} \cdot V \cdot F \cdot 0,9} \cdot \frac{1}{m_{\text{navážka vzorku}}} \quad (13)$$



Obrázek 11 Princip enzymatického štěpení glukanů pro jejich následné stanovení uvedený výrobcem

### 3.3.16 Stanovení vybraných pigmentů spektrofotometrickou metodou

Obsah celkových karotenoidů a chlorofylů *a* ( $C_a$ ) a *b* ( $C_b$ ) byl stanoven extrakcí roztokem acetonu. V 5 ml acetonu byly rozetřeny 2 g suchého a homogenizovaného vzorku a dusitan sodný. Vzniklá směs byla přefiltrována přes filtrační papír do 25 ml odměrné baňky a obsah byl doplněn po rysku. U takto připravených vzorků byla proměřena absorbance při absorpčním maximu chlorofylu. V případě stanovení karotenoidů byla sestrojena kalibrační rovnice  $\beta$ -karotenu  $y [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}] = 0,056 \cdot x - 0,022$  v rozmezí koncentrací 0,5–10  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Koncentrace chlorofylů byla poté vypočtena dle následujících vztahů vztažených na zvolené extrakční rozpouštědlo, aceton <sup>[121]</sup>.

$$C_a [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}] = 11,24 \cdot A_{662} - 2,69 \cdot A_{645} \quad (14)$$

$$C_b [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}] = 20,13 \cdot A_{662} - 4,68 \cdot A_{645} \quad (15)$$

### 3.3.16.1 Stanovení a identifikace vybraných pigmentů a vitaminů

10–20 mg suchého a homogenizovaného vzorku bylo s pomocí 1 ml destilované vody rehydratováno po dobu 30 minut. Po centrifugaci při 14 000 rpm po dobu 3 minut byl supernatant odstraněn a k sedimentu byly přidány skleněné kuličky a 1 ml vybraného rozpouštědla pro extrakci sledovaných pigmentů. Zkumavky se vzorky byly následně vortexovány na multipozičním vortexu po dobu 15 minut a poté byly přidány další 2 ml vybraného rozpouštědla. Zkumavky byly opět vortexovány po dobu 10 minut. Nakonec byl k obsahu zkumavek přidán 1 ml destilované vody a po protřepání byla směs centrifugována při 3 000 rpm po dobu 1 minuty.

Do skleněných zkumavek byla odpipetována chloroformová, hexanová nebo ethanolová fáze (dle vybraného extrakčního rozpouštědla) a rozpouštědlo bylo odpařené umístěním zkumavky do termobloku při teplotě 45 °C a za přítomnosti dusíku. Po odpaření byl ke vzorku přidán 1 ml směsi acetonitrilu s ethylacetátem HPLC kvality v poměru 2:1. Po promíchání byly připravené vzorky přefiltrovány přes 0,45 µm nylonový filtr do vialky a analyzovány dle podmínek analýzy (Tabulka 15, Tabulka 16). Výsledky byly vypočteny dle sestavených kalibračních rovnic po vyhodnocení standardních roztoků (Tabulka 17).

Tabulka 15 Podmínky stanovení vybraných pigmentů a vitaminů

<b>Podmínky měření</b>	
<b>Sestava</b>	Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific)
<b>Kolona</b>	Kinetex EVO C18 (150x4,6 mm, 2,6 µm)
<b>Teplota separace</b>	25 °C
<b>Průtok mobilní fáze</b>	1,2 ml·min <sup>-1</sup>
<b>Objem vzorku</b>	20 µl
<b>Detektor</b>	DAD Vanquish, λ = 435 nm
<b>Doba analýzy</b>	25 min
<b>Software</b>	Chromeleon 7

Tabulka 16 Složení mobilních fází a gradientová eluce

	Směs	% (V/V)
<b>Mobilní fáze A</b>	ACN:TrisHCl pH 8:Methanol	84:14:2
<b>Mobilní fáze B</b>	Methanol:Ethylacetát	80:40
<b>Retenční čas [min]</b>	<b>Mobilní fáze A [%]</b>	<b>Mobilní fáze B [%]</b>
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
25	100	0



Tabulka 17 Sledované pigmenty a vitaminy

Standard	Rovnice regrese [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ] (16)
$\beta$ -karoten	$y = 3,915 \cdot x + 1,011$
lutein	$y = 17,391 \cdot x + 0,211$
celkové karotenoidy	$y = 3,915 \cdot x + 1,011$
ubichinon	$y = 0,231 \cdot x + 0,00$
chlorofyl a	$y = 8,327 \cdot x - 0,063$
chlorofyl b	$y = 4,429 \cdot x - 0,070$
tokoferol	$y = 0,669 \cdot x - 0,337$
cholecalciferol	$y = 2,631 \cdot x + 2,749$

### 3.3.17 Stanovení cukrů a organických kyselin

Vzorky byly před samotnou analýzou vyčištěny pomocí Carrezova činidla I a II [122]. Po centrifugaci při 7 000 rpm po dobu 10 minut byl supernatant přefiltrován přes nylonový filtr o průměru pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Podle potřeby byly případně naředěny roztokem 5 mmol kyseliny sírové. Pro detekci cukrů byl použit refraktometrický detektor, pro detekci vybraných organických kyselin pak PDA detektor při vlnové délce 210 nm. Kalibrační křivky byly sestaveny na základě koncentrační řady v rozmezí 0,2–5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro kvantitativní stanovení látek. Podmínky měření naleznete v tabulce (Tabulka 18). Výsledné hodnoty byly vypočteny podle sestavených kalibračních rovnic (Tabulka 19).

Tabulka 18 Podmínky stanovení sacharidů a organických kyselin

<b>Podmínky měření</b>	
<b>Sestava</b>	Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific)
<b>Kolona</b>	Rezex™ ROA-organic Acid H <sup>+</sup> (8%) (300x7,8 mm, 2,6 $\mu\text{m}$ )
<b>Teplota separace</b>	30 °C
<b>Mobilní fáze</b>	5 mmol H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Průtok mobilní fáze</b>	0,2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
<b>Objem vzorku</b>	20 $\mu\text{l}$
<b>Detektor</b>	RI, 35 °C, 10 Hz; PDA, $\lambda = 210 \text{ nm}$
<b>Doba analýzy</b>	15 min
<b>Software</b>	Chromleon 6

Tabulka 19 Standardy sledovaných látek a jejich kalibrační rovnice

	Standard	Rovnice regrese [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ] (17)
Cukry	Sacharóza	$y = 9,101 \cdot x - 2,790$
	D-Glukóza	$y = 5,995 \cdot x + 0,183$
	D-Fruktóza	$y = 6,115 \cdot x - 0,001$
	D-Arabinóza	$y = 3,126 \cdot x - 0,008$
	D-manóza	$y = 5,654 \cdot x - 0,011$
Kyseliny	Kyselina citrónová	$y = 33,585 \cdot x + 0,226$
	Kyselina L-askorbová	$y = 172,650 \cdot x - 0,672$
	Kyselina L-mléčná	$y = 38,610 \cdot x - 1,630$
	Kyselina octová	$y = 52,703 \cdot x + 33,164$

### 3.3.18 Prvková analýza vzorků řas a sinic pomocí ICP-MS

Ve vzorcích řas byly pomocí ICP-MS s kvadrupólovým analyzátozem stanoveny vybrané izotopy prvků, a to  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{51}\text{V}$ ,  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{75}\text{As}$ ,  $^{78}\text{Se}$ ,  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ . Navážky řas (0,5 g) byly před samotnou analýzou připraveny mineralizací 7 ml koncentrovanou kyselinou dusičnou s 1 ml 30% peroxidu vodíku v PFA teflonových zkumavkách za pomoci mikrovlnného ohřevu (Tabulka 20). Citlivost přístroje ICP-MS byla optimalizována pomocí komerčně zakoupeného roztoku směsi prvků Li, Co, Y a Tl o koncentraci  $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jako kolizní plyny byly použity helium a kyslík o vysoké čistotě a vodík. Nosným plynem byl argon o průtoku  $1,08 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$  [123]. Řízení a zpracování dat byly realizovány pomocí softwaru Agilent Expert.

Tabulka 20 Podmínky extrakce pomocí MARS

	Čas	Proces	Energie
Krok 1	5 min	zahřívání 80 °C	1 000 W
Krok 2	5 min	zahřívání 50 °C	
Krok 3	20 min	zahřívání 190 °C	
Krok 4	30 min	chlazení	0 W

### 3.3.19 Testování antimikrobiální aktivity

Ke stanovení antimikrobiální aktivity testovaných vzorků byla využita převážně standardní diluční metoda. Samotné testování bylo provedeno pomocí vybraných zástupců mikroorganismů na vhodných kultivačních médiích a za optimálních podmínek.

#### 3.3.19.1 Kultivace vybraných zástupců G<sup>+</sup> mikroorganismů

Jako testovací modelové grampozitivní mikroorganismy pro sérii antimikrobiálních testů byly zvoleny dva bakteriální kmeny, *Micrococcus luteus* CCM 1569 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4417. Kultury byly uchovávány na agarových plotnách v podobě křížového roztěru nebo případně v tekutém médiu při 8 °C v lednici. Před samotným experimentem byla vždy připravena čerstvá narostlá kultura přeočkováním z uchovávané kultury do sterilního příslušného média.

Pro kultivaci mikroorganismů bylo vždy využito 50 ml daného média sterilovaného ve 100ml Erlenmeyrových baňkách v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut. Připravené sterilní médium bylo zaočkováno 1–10% inokulem dané bakteriální kultury, Kultivace bakterií probíhala v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin, v případě *M. luteus* za stálého třepání a v případě *S. epidermidis* staticky bez třepání.

#### 3.3.19.2 Kultivace vybraných zástupců G<sup>-</sup> mikroorganismů

Jako testovací modelové gramnegativní mikroorganismy pro sérii antimikrobiálních testů byly zvoleny dva bakteriální kmeny, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Serratia marcescens* CCM 8587. Kultury byly uchovávány na agarových plotnách v podobě křížového roztěru nebo případně v tekutém médiu při 8 °C v lednici. Před samotným experimentem byla vždy připravena čerstvá narostlá kultura přeočkováním z uchovávané kultury do sterilního příslušného média.

Kultivace probíhala stejně jako v kapitole 3.3.19.1. Kultivace bakterií probíhala v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin, v případě *S. marcescens* za stálého třepání a v případě *E. coli* staticky bez třepání.

### 3.3.19.3 Testování antimikrobiální aktivity pomocí bujónové diluční metody

Stanovení je založeno na turbidimetrickém sledování růstu mikroorganismů na mikrotitrační destičce [124]. Kultivace mikroorganismů v příslušném médiu probíhala v 96-jamkových destičkách podle podmínek uvedených v kapitolách 3.3.19.1, 3.3.19.2, kdy k 150  $\mu\text{l}$  suspenze buněk v příslušném médiu o přibližné koncentraci  $1 \cdot 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$  bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  sledované látky s potenciálním antimikrobiálním účinkem. Referenčním vzorkem byla kultura s přidavkem 50  $\mu\text{l}$  sterilního rozpouštědla (voda, ethanol apod.). V časových intervalech 0 a 24 hodin, případně 48 hodin, byla odečtena absorbance při vlnové délce 630 nm.

$$\text{Viabilita [\% kontroly]} = \frac{A_{\text{blank } 24} - A_{\text{blank } 0}}{A_{\text{vzorek } 24} - A_{\text{vzorek } 0}} \cdot 100 \quad (18)$$

### 3.3.20 Testování cytotoxického účinku

#### 3.3.20.1 Kultivace HaCat buněk

Kultivace HaCat buněk probíhala v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) s přidavkem 10% sterilního fetálního bovinního séra a 1% směsi antibiotik/antimykotik (penicilin, streptomycin, amfotericin B). Kultivace buněk probíhala v inkubátoru s řízenou atmosférou 5 %  $\text{CO}_2$ , při 37 °C a 97% vlhkostí. Při dosažení 80–90% konfluency byly buňky pasážovány pomocí roztoku trypsinu. Uvolněné buňky byly rozsuspendovány ve sterilním fosfátovém pufru a centrifugovány při 340 rcf po dobu 5 minut. Usazená peleta byla rozsuspendována v čerstvém sterilním médiu a s využitím Bürkerovy komůrky a obarvením buněk pomocí trypanové modři v poměru 1:1 byla stanovena celková koncentrace buněk. Buněčná suspenze byla dle potřeby ředěna čerstvým DMEM médiem.

#### 3.3.20.2 Kultivace Caco-2 buněk

Kultivace Caco-2 buněk probíhala v médiu EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) s přidavkem 10% sterilního fetálního bovinního séra a 1% směsi antibiotik/antimykotik (penicilin, streptomycin, amfotericin B) a 1% neesenciálních aminokyselin. Kultivace buněk probíhala v inkubátoru s řízenou atmosférou 5 %  $\text{CO}_2$ , při 37 °C a 97% vlhkostí. Při dosažení 80–90% konfluency byly buňky pasážovány pomocí roztoku trypsinu. Uvolněné buňky byly rozsuspendovány ve sterilním EMEM médiu a byly centrifugovány při 300 rcf po dobu 5 minut. Usazená peleta byla rozsuspendována v čerstvém sterilním médiu a s využitím Bürkerovy komůrky a obarvením buněk pomocí trypanové modři v poměru 1:1 byla stanovena celková koncentrace buněk. Buněčná suspenze byla dle potřeby dále ředěna čerstvým EMEM médiem.

#### 3.3.20.3 MTT test cytotoxicity

Kolorimetrická změna přeměny MTT viabilními buňkami na nerozpustný fialový formazanový produkt, který je následně rozpuštěn vybraným detergentem (SDS nebo DMSO) [125].

MTT test testovaných vzorků byl prováděn převážně v 96jamkových mikrotitračních destičkách. Buněčná kultura ( $1,5\text{--}2 \cdot 10^4$  na 100  $\mu\text{l}$  v jedné jamce) byla napipetována do jamek a destička byla kultivována v inkubátoru s řízenou atmosférou po dobu 24 hodin. Následně bylo médium nahrazeno 100  $\mu\text{l}$  kultivačního média s různou objemovou koncentrací testovaného vzorku a destička byla opět inkubována dalších 24 hodin. Po odpipetování média s testovaným vzorkem bylo do každé jamky napipetováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku MTT/PBS o koncentraci  $2,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Destička byla inkubována 3 hodiny v řízené atmosféře, a nakonec bylo do jamek přidáno 100  $\mu\text{l}$  10% roztoku SDS/PBS. Destičky byly ponechány ve tmě a na druhý den byla změřena absorbance pomocí ELISA readeru při 540 nm.

Viabilita buněk kultivovaných s testovanými vzorky byla porovnávána s metabolickou aktivitou buněk inkubovaných v čistém médiu. Součástí testu byla i kontrola za působení rozpouštědla v maximální užité koncentraci a rovněž i pozitivní kontrola, tzn. inhibice viability buněk působením 40% ethanolu.

$$\text{Viabilita [\% kontroly]} = \frac{A_{CC}}{A_{\text{po inkubaci se vzorkem}}} \cdot 100 \quad (19)$$

#### 3.3.20.4 LDH test cytotoxicity

Při poškození buněčné membrány dochází k uvolnění cytosolického enzymu laktátdehydrogenázy do extracelulárního média. Tato metoda tak využívá schopnost uvolněného LDH enzymu v médiu katalyzovat reverzibilní přeměnu pyruvátu na laktát za současné spotřeby NADH [126].

Pro stanovení cytotoxicity s využitím LDH testu bylo využito kultivačního média s testovanými vzorky inkubovanými s buněčnou linií v rámci MTT testu. Tento test rovněž probíhal za pomoci mikrotitračních destiček. K 10 µl supernatantů bylo přidáno 50 µl roztoku NADH v pyruvátu. Tento roztok vznikl rozpuštěním NADH do 0,75mM roztoku pyruvátu sodného na konečnou koncentraci 1 mg·ml<sup>-1</sup>. Po 30minutové inkubaci při 37 °C bylo do jamek přidáno 50 µl roztoku 2,4-dinitrofenylhydrazinu (20 mg 2,4-DNPH rozpuštěno ve 100 ml 1 M HCl). Destička byla ponechána ve tmě po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Nakonec bylo do jamek připipetováno 50 µl 4 M roztoku NaOH a po 5 minutách byla změřena absorbance při 450 nm.

Aktivita laktátdehydrogenázy byla vypočtena z kalibrační křivky vytvořené ze standardního roztoku pyruvátu sodného v NADH v koncentracích odpovídající absolutní aktivitě 0–2 000 U·ml<sup>-1</sup>. Součástí testu byla i negativní a pozitivní kontrola, jako tomu bylo i u MTT testu.

$$A [\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}] = -0,002 \cdot 0,751 \quad (20)$$

$$R^2 = 0,965$$

#### 3.3.21 Genotoxický test

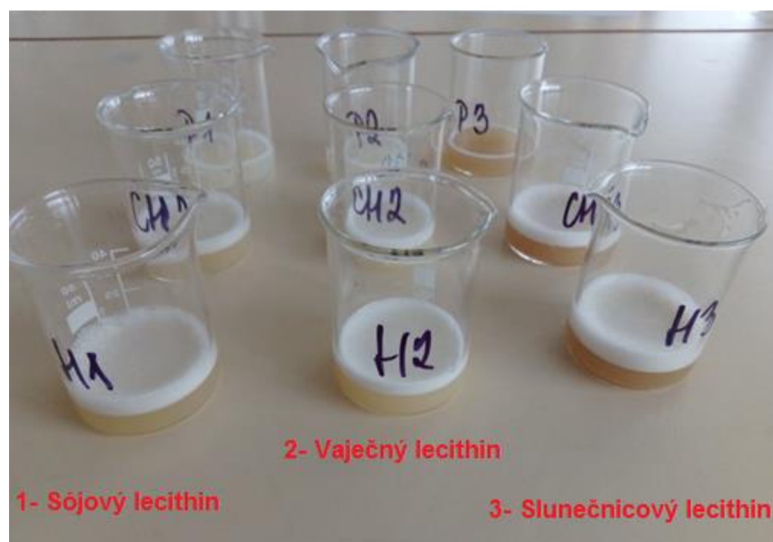
Stanovení genotoxického účinku připravených extraktů bylo provedeno pomocí komerčního kitu EBPI SOS Chromotest<sup>TM</sup> [127].

Nejprve byly kultivovány kultury *E. coli* při teplotě 37 °C za anaerobních podmínek po dobu 16 hodin. Připravená buněčná suspenze byla naředěna čerstvým médiem na absorbanci 0,05–0,06 při 630 nm. Test byl prováděn na 96-jamkových destičkách. Pozitivní kontrolou byl standardní mutagen 4-nitrochinolinoxid (4-NQO) rozpuštěný v 10% DMSO na koncentraci 10 µg·ml<sup>-1</sup>. Negativní kontrolou bylo použité rozpouštědlo. Test byl proveden dle postupu uvedeného daným výrobcem. Měření absorbancí při 630 nm podává informace o produkci β-galaktosidázy, a tedy o genotoxicitě vzorku, zatímco měření při 405 nm slouží jako kontrola viability bakteriálních buněk.

#### 3.3.22 Příprava částic s enkapsulovanou aktivní složkou a charakterizace

##### 3.3.22.1 Příprava liposomových částic

Navázka lecithinu a cholesterolu v poměru 9:1 byla přidána k 10 ml vybraného polárního rozpouštědla s obsahem aktivní látky určené k enkapsulaci. Příprava liposomů byla provedena pomocí ultrazvukového homogenizátoru, kdy byla připravená směs homogenizována po dobu 1 minuty při frekvenci 50 Hz za současného chlazení pomocí chladicí lázně. Barevný rozdíl opalescentního roztoku suspenze liposomů můžete vidět na obrázku (Obrázek 12).



Obrázek 12 Připravené suspenze liposomů s různým lecithinem (P-prázdné, Ch-chmel, H-heřmánek)

Při práci s nepolárními látkami byla nejprve navázka lecithinu, cholesterolu a nepolární látky určené k enkapsulaci rozpuštěna v 1 ml chloroformu a poté byla směs přidána k 10 ml polárního rozpouštědla. Následně byla provedena ultrasonifikace za stejných podmínek. Na závěr byl z emulze na magnetické míchačce při 40 °C odpařen chloroform.

### 3.3.22.2 Analýza částic velikostí částic, polydispersity a elektrokinetické stability pomocí DLS

Distribuce velikostí částic v suspenzních roztocích byla analyzována s využitím dynamického rozptylu světla [128]. Vzorky byly vhodně naředěny destilovanou vodou a analyzovány pomocí přístroje ZetaSizer Nano za laboratorních podmínek. Přístroj zaznamenává časovou závislost kolísání intenzity rozptýleného světla dané Brownovým pohybem částic, které pak umožní určit difúzní koeficient částic a vypočítat distribuci velikosti částic v daném roztoku.

Měření elektrokinetické stability pomocí zeta potenciálu je založeno na technice "Laser Doppler Velocimetry", tedy na kinetice částic v kapalině za působení elektrického pole. Jedná se o rozdíl potenciálů na pohybovém rozhraní, který se ustavuje při relativním pohybu tuhé fáze s elektrickou dvojrystvou vůči roztoku. Znaménko je opačné než znaménko iontů vnější vrstvy elektrické dvojrystvy. Čím větší náboj nese, tím je stabilnější [128]. Vzorky byly opět vhodně naředěny destilovanou vodou a analyzovány pomocí přístroje ZetaSizer Nano za laboratorních podmínek.

### 3.3.22.3 Analýza částic – enkapsulační účinnost

Suspenzní vzorek částic byl centrifugován při 14 000 rpm. Poté byl supernatant slit, vhodně naředěn a dílčími spektrofotometrickými metodami (popsané v kapitole 3.3.11 a 3.3.13) byla stanovena koncentrace zbylé volné enkapsulované složky (fenolických látek). Vzorky byly analyzovány před a po enkapsulaci a ze získaných hodnot byla vypočítána enkapsulační účinnost dané metody, a to podle následující rovnice:

$$EU [\%] = \frac{\text{aktivní látka}_{\text{celkové množství}} - \text{aktivní látka}_{\text{volné množství}}}{\text{aktivní látka}_{\text{celkové množství}}} \cdot 100 \quad (21)$$

#### **3.3.22.4 Příprava polysacharidových částic pomocí enkapsulátoru**

Příprava polysacharidových částic pomocí enkapsulátoru BÜCHI probíhala na principu metody zesítění. Při přípravě alginátových částic byl jako síťující roztok zvolen chlorid vápenatý o stejné koncentraci jako vybraný polymer a objemu 100 ml. Enkapsulovaná složka byla rovnoměrně dispergována do obalového materiálu, 1% nebo 2% roztoku alginátu sodného.

Enkapsulovaná aktivní látka (mikroorganismy, biologické látky, případně chemikálie) se smíchá se zapouzdřovacím polymerem, alginátem sodným, a směs je z tlakové láhve vzduchem tlačena do pulzační komory. Kapalina prochází přes trysku s definovaným průměrem a na výstupu z trysky se rozděluje do jednotlivých kapiček stejné velikosti. Tyto kapičky procházejí elektrickým polem mezi tryskou a elektrodou, kde získávají povrchový náboj. Elektrostatické odpuzivé síly způsobí rozptýlení kapiček dopadajících do vytvrzovacího roztoku, který je pomocí magnetické míchačky kontinuálně míchán. Velikost částice reguluje několik parametrů včetně frekvence, amplitudy, velikosti trysky, rychlosti průtoku a fyzikálních vlastností směsi produktu s polymerem. Obecně platí, že průměr vytvořené částice je dvojnásobkem průměru zvolené trysky, avšak průměr se v rámci podmínek přístroje může lišit až o 15 % [129].

Enkapsulační účinnost byla obdobně stanovena jako u liposomových částic v kapitole 3.3.22.3.

#### **3.3.23 Kultivace probiotik**

Probiotické kultury, viz Tabulka 6, byly kultivovány v komerčním *Lactobacillus* MRS médiu (formulace dle deMan, Rogosa and Sharpe [130]). Potřebné množství práškového média bylo rozpuštěno v destilované vodě v poměru dle uvedeného návodu na obale (55,15 g na 1 000 ml destilované vody) a vysterilováno.

Připravené sterilní médium bylo zaočkováno 10% inokulem dané probiotické kultury ve sterilním boxu. Samotná kultivace bakterií probíhala v termostatu při 37 °C po dobu maximálně 24 hodin. Narostlá kultura byla následně použita k dalším krokům vybraných experimentů. V případě přípravy tuhého média bylo k tekutému připravenému MRS médiu přidán ještě bakteriální agar o koncentraci 15 g·l<sup>-1</sup>.

##### **3.3.23.1 Růstová křivka**

U všech vybraných probiotických kmenů byla změřena růstová křivka pomocí optické hustoty v tekutém MRS médiu v daných časových intervalech. Kultivace probíhala v 96-jamkových destičkách, kdy 200 µl MRS média bylo zaočkováno 100 µl suspenze bakteriálních buněk o koncentraci 1·10<sup>5</sup> CFU·ml<sup>-1</sup>. Pomocí ELISA readeru temperovaného na 37 °C byla ve 30minutových intervalech měřena absorbance při vlnové délce 630 nm.

##### **3.3.23.2 Příprava buněčných suspenzí pro dílčí analýzy**

Narostlá kultura probiotických buněk byla centrifugována při 2 000 rpm po dobu 5 minut, po odstranění supernatantu byla buněčný sediment promyt rozsuspendováním sterilní destilovanou vodou a opětovnou centrifugací při 2 000 rpm po dobu 5 minut. Nakonec byl odstraněn supernatant a získaný sediment rozsuspendován v 10 ml sterilní destilované vody a takto připravená suspenze byla použita pro další analýzy.

#### **3.3.24 Stanovení viability probiotických bakterií**

Nárůst buněčné kultury byl sledován změnou optické hustoty při 630 nm. Viabilita buněk byla ověřena kultivační metodou podle postupu v kapitole 3.3.23 a zároveň pomocí průtokové cytometrie, kdy k

vhodně naředěné suspenzi probiotických buněk bylo přidáno 5 µl roztoku propidiumjodidu o koncentraci 1 mg·ml<sup>-1</sup>. Naředěné suspenze buněk s propidiumjodidem byly inkubovány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu nejméně 10 minut, poté bylo provedeno stanovení viability při emisi o vlnové délce 615 nm.

### 3.3.25 Sledování změn viability a uvolňování aktivních látek v průběhu modelového trávení

Buněčné suspenze nebo připravené částice byly podrobeny sledování stability v prostředí modelového trávení.

Narostlá kultura bakteriálních buněk byla připravena dle postupu v kapitole kapitole 3.3.23. Liposomy nebo alginátové částice byly připraveny dle postupu v kapitole 3.3.22.1 a 3.3.22.4.

Vzorky podrobené modelovému trávení (Tabulka 21) byly smíchány se žaludeční šťávou v poměru 1:1. Vzorky byly inkubovány po dobu 30 minut na temperované třepačce při 37 °C a za stálého mírného míchání. Po inkubaci se žaludeční šťávou byla ke směsi přidána v poměru 1:1 směs pankreatické šťávy se žlučovými kyselinami. Takto připravená směs byla opět inkubována na temperované třepačce, ale po dobu 60 minut. V čase 0 min, 30 min a 60 min byly provedeny odběry pro sledování uvolněných látek (viabilita, EU).

Tabulka 21 Složení modelových roztoků <sup>[131]</sup>

<i>Žaludeční šťáva</i>	0,25 g pepsin rozpuštěných ve 100 ml destilované vody, poté přídavek 0,84 ml 35% HCl, pH 0,9
<i>Pankreatická šťáva</i>	0,25 g pankreatu a 1,5 g NaHCO <sub>3</sub> rozpuštěných ve 100 ml destilované vody, pH 9
<i>Žlučové kyseliny</i>	0,4 g žlučových solí rozpuštěných ve 100 ml fosfátového pufru, pH 8

## 3.4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno pomocí matematických funkcí programu MS Excel a SW Origin.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předložená disertační práce je zaměřena na vývoj a testování složek potravin a doplňků určených pro dětskou výživu. Cílem práce bylo stanovení biologicky aktivních látek získaných z rostlinných anebo živočišných materiálů, které by byly vhodné a významné pro doplňování a obohacení dětské výživy. První část experimentální práce byla věnována problematice přirozeného doplňování selenu do novorozeneckého organismu. Za tímto účelem byla v reálných vzorcích získaných z matky a dítěte stanovována koncentrace selenu, jakožto antioxidantu běžně se vyskytujícího v lidském organismu, a dále jeho přestup z matky na dítě v průběhu kojení.

V další části práce byla pozornost věnována potravinám rostlinného původu. U vybraných rostlinných vzorků zkoumána nejen výživová hodnota stanovením vybraných makronutrientů, ale také byly charakterizovány z antioxidačního, antimikrobiálního a možného cytotoxického hlediska. U vybraných vzorků byl také sledován prebiotický účinek.

Poslední část práce byla věnována kombinaci rostlinných látek a probiotik, tedy i interakci probiotik s vybranými kmeny bakterií mléčného kvašení. Biologicky aktivní látky s probiotickým účinkem byly samostatně nebo spolu s probiotickými bakteriemi následně v rámci vývoje potravin nového typu enkapsulovány do různých typů mikro- a nanočástic za účelem zvýšení stability, kvality a spotřebitelské přijatelnosti. Reakce spotřebitelů na nově vyvíjené produkty byla zkoumána pomocí senzorické analýzy.

### 4.1 STANOVENÍ SELENOMETABOLITŮ V REÁLNÝCH VZORCÍCH

Cílem této části práce bylo stanovení koncentrace biogenního selenu vázaného v makrosloženinách v reálných vzorcích získaných od 20 párů matka-dítě. Selen působící v těle jako antioxidant může být v různých formách přenášen z matky na dítě, a to pomocí kolostra nebo ještě v prenatalním stádiu prostřednictvím pupeční šňůry. Z tohoto důvodu byly zkoumány 3 typy reálných vzorků, a to vzorek mateřského mléka (Obrázek 13, A) odebraný do 48 hodin po porodu, žilní krevní vzorek od matky a dítěte (Obrázek 13, B) odebraný ihned po jeho narození. Hlavním zkoumaným metabolitem byl tzv. selenoprotein P. Jedná se o glykoprotein obsahující nejvíce atomů selenu v krevní plasmě [132]. Stanovení bylo provedeno pomocí optimalizované metody na sestavě 2D-SEC-SECxSEC-AF-ICP-MS a pro porovnání byla provedena enzymatická metoda pomocí ELISA kitu. Sledovanými sloučeninami byly především glutathionperoxidáza, selenoproteiny a selenoalbumin.



Obrázek 13 Vzorky pro stanovení specií selenu získaných od páru matka-dítě;

A – kolostrum, B – vzorky krevního séra



#### 4.1.1 Stanovení selenometabolitů ve vzorcích kolostra

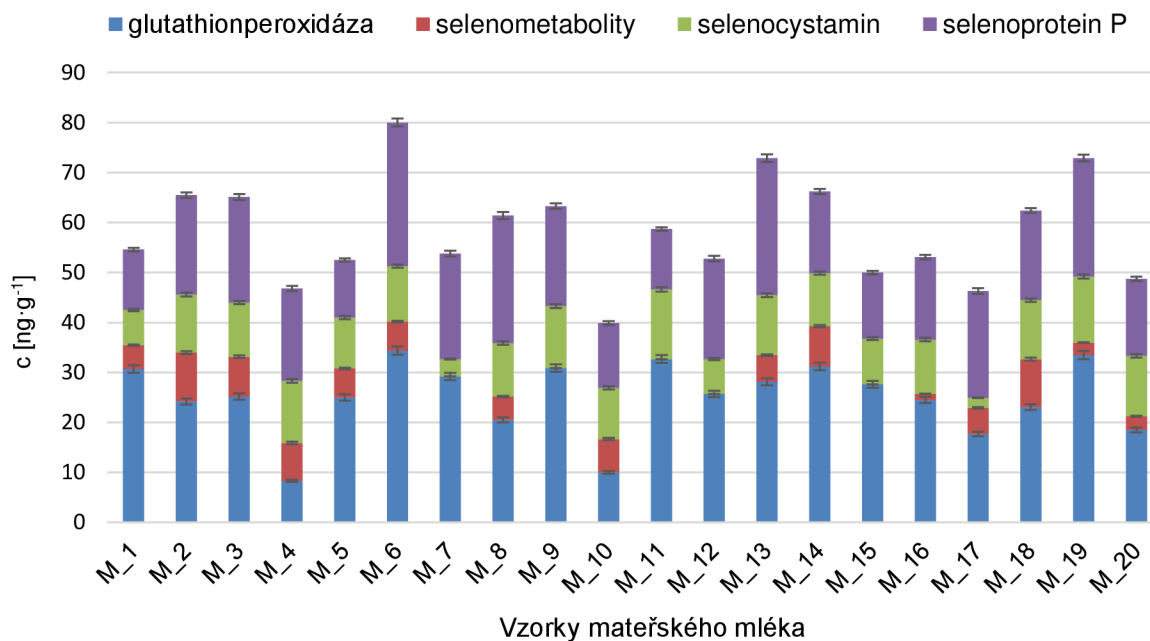
Vzorky pro analýzu selenu ve vzorcích mateřského mléka (M1–20) pomocí 2D-SEC-SECxSEC-AF-ICP-MS byly připraveny dle postupu v kapitole 3.3.1, kde jsou popsány i samotné podmínky analýzy. Výsledky jsou prezentovány jako koncentrace selenu v  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ . Všechny vzorky byly změřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

V grafu (Obrázek 14) se nachází shrnutí výsledků koncentrací sledovaných selenometabolitů a selenoproteinu P v mateřském mléce.

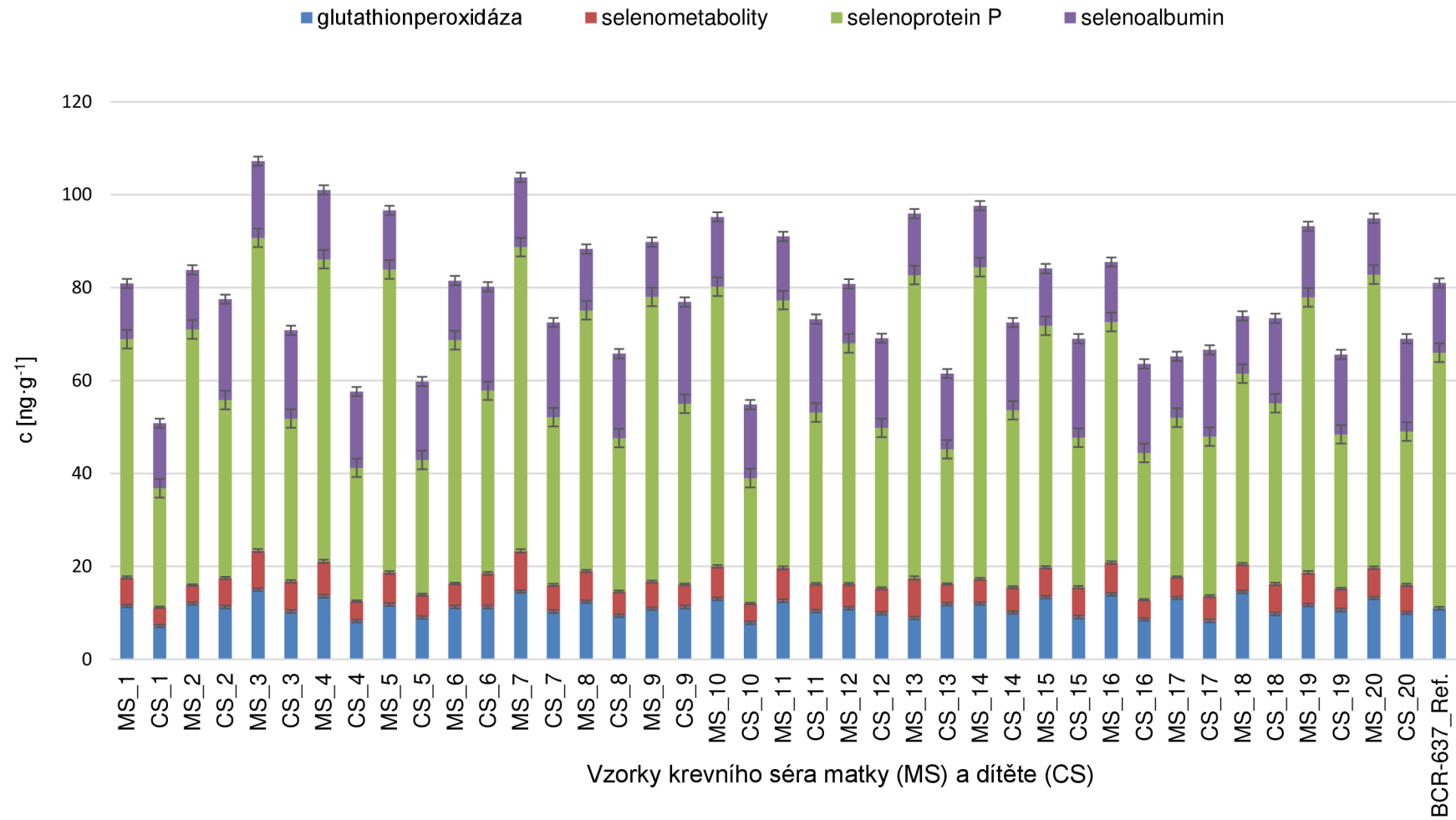
Relativní zastoupení selenu ve sledovaných sloučeninách je dle výsledků uvedených v grafu v sestupném pořadí – nejvyšší zastoupení má glutathionperoxidáza ( $25,6 \pm 6,3 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ), dále selenoprotein P ( $18,8 \pm 5,1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ), selenocystamin ( $10,1 \pm 3,2 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a selenometabolity ( $4,4 \pm 3,4 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Poměrně vysoké zastoupení selenu u glutathionperoxidázy, zastupující roli antioxidantu, indikuje správnou funkci štítné žlázy, která je producentem tohoto enzymu. Zároveň také z výsledků vyplývá, že zkoumané objekty obsahují vysoké zastoupení selenoproteinu P, a tudíž nevykazují deficit selenu v těle [133].

Vybraná analytická metoda byla schopna díky změně polohy ventilu a cest mobilní fáze přes vybrané kolony oddělit selenocystamin od ostatních selenometabolitů v mateřském mléce. V krevním séru se selenocystamin již nenachází. Separace byla docílena izolováním selenoproteinu P v afinitní koloně a současnou elucí selenocystaminu přes SEC kolony přímo do ICP-MS. Zároveň bylo touto metodou docíleno separace selenometabolitů z glutathion peroxidázy.

Selenaalbumin, který je také součástí mateřského mléka, nemohl být touto metodou stanoven, a to z důvodu nulové afinity k heparinové afinitní koloně. K jeho eluci docházelo tedy v rámci mrtvého objemu mobilní fáze.



Obrázek 14 Grafické znázornění zastoupení jednotlivých sledovaných analytů ve všech analyzovaných vzorcích



Obrázek 15 Grafické znázornění zastoupení jednotlivých sledovaných analytů ve všech analyzovaných vzorcích krevních sér

#### 4.1.2 Selenometabolity a selenoproteiny v mateřském a pupečnickovém krevním séru

Reálné vzorky krevního séra matky (MS 1–20) a dítěte (pupečnickové krevní sérum, CS 1–20) byly také pomocí 2D-SEC-SECxSEC-AF-ICP-MS analyzovány na přítomnost selenometabolitů a selenoproteinů. Vzorky byly před samotnou analýzou připraveny dle postupu v kapitole 3.3.2, kde jsou popsány i podmínky analýzy. Výsledky jsou prezentovány jako koncentrace selenu v  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ . Všechny vzorky byly změřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

V grafu (Obrázek 15) se nachází shrnutí výsledků koncentrací sledovaných selenometabolitů a selenoproteinů v krevních sérech matky (MS) a dítěte (CS).

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

Z výsledků tedy vyplývá, že mateřské mléko obsahuje vysoké koncentrace glutathionperoxidázy, které je dítětem v podobě stravy přijímáno v prvních dnech života. Naopak selenoprotein P byl ve vyšších koncentracích zastoupen v pupečnickovém krevním séru, a tudíž je jeho transfer pomocí kolostra nižší.

#### 4.1.3 Stanovení selenoproteinů pomocí ELISA kitu

Pomocí komerčně zakoupeného ELISA kitu pro stanovení selenoproteinů byly získány hodnoty koncentrací ve všech reálných vzorcích získaných od dvojice matka-dítě. Tyto hodnoty byly následně porovnány s výsledky získanými pomocí separace chromatografickou metodou s detektorem ICP-MS.

Připravené reálné vzorky podle postupu v kapitole 3.3.3 byly použity pro analýzu pomocí ELISA kitu dle postupu uvedeného ve stejné kapitole. Všechny vzorky byly změřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledky jsou prezentovány jako koncentrace selenu v  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

V tabulkách (Příloha 1) se nachází shrnutí výsledků koncentrací sledovaných specií selenu (suma hodnot) v mateřském mléce (M), krevních sérech matky (MS) a dítěte (CS) stanovených pomocí ICP-MS a ELISA metody. Pro porovnání výsledků těchto dvou metod stanovení byly výsledné hodnoty získané ELISA metodou, která slouží ke stanovení molekul selenoproteinů, přepočteny na koncentraci zastoupení selenu, a to na základě dedukce, že selenoprotein P obsahuje 10 atomů selenu <sup>[134]</sup>.

Pomocí ELISA metody byla v mateřském mléce stanovena průměrná hodnota selenoproteinů na  $405,3 \pm 129,6 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  a po přepočtení na množství selenu  $5,61 \pm 1,80 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ . Tato hodnota je třikrát menší, nežli hodnota získaná pomocí detektoru ICP-MS. Ve všech zkoumaných vzorcích se toto schéma potvrdilo a můžeme tvrdit, že pomocí ICP-MS došlo k získání přesnějších výsledků. I když je metoda pomocí ELISA kitu rychlejší, je to tedy zřejmě na úkor přesnosti a citlivosti stanovení <sup>[135]</sup>.

Kombinací dvou analytických metod byla prokázána přítomnost specií selenu v kolostru, jeho využitelnost, a tím potvrzena důležitost mateřského mléka v rámci dětské výživy, jelikož se jedná o významný zdroj živin a aktivních látek u novorozenců.

## 4.2 CHARAKTERIZACE NUTRIČNÍHO SLOŽENÍ VYBRANÝCH TYPŮ ROSTLINNÝCH MATERIÁLŮ

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

V práci byly na základě screeningu trendů v oblasti výživy vybrány tři skupiny rostlinných materiálů k následným analýzám. Z nutričního hlediska byly tyto rostlinné vzorky analyzovány pro obsah ve vodě rozpustných sacharidů, nerozpustné vlákniny, celkového dusíku s následným výpočtem hrubé bílkoviny a zastoupení mastných kyselin.

První skupinou (3.2.4.2) jsou mořské makrořasy, které jsou dostupné v sušené formě, mikrořasa a sinice dostupná v podobě prášku. Konkrétně se jedná o arame, wakame, hijiki, kombu, chlorellu a spirulinu. Tato skupina je považována za tzv. „jídlo budoucnosti“.

Druhou skupinou (3.2.4.3) jsou rostlinné prášky získané z rostlinných částí zelených rostlin, které se hojně využívají jako doplněk stravy a jsou často řazeny mezi tzv. „superpotraviny“. Do této skupiny byl zařazen matcha prášek, mladý ječmen a pšenice a moringa.

Třetí skupinou (3.2.4.5), která byla vybrána hlavně na základě potenciální vysoké výtěžnosti lipidické frakce, jsou semínka a ořechy. Opět byly vybrány takové vzorky, které lze považovat za „superpotraviny“, a to lněné semínko, konopné semínko, vlašské ořechy, dýňová semínka, sezamové semínko a římský kmín.

### 4.2.1 Obsah sacharidů a nerozpustné vlákniny

Vzorky rostlinné vlákniny (3.2.4.2), která je hojně používána jako doplněk stravy například u sportovců, byly analyzovány pro obsah ve vodě rozpustných celkových sacharidů, redukujících sacharidů a nerozpustné vlákniny. Vzorky pro stanovení sacharidů spektrofotometrickou metodou byly nejprve extrahovány v destilované vodě podle postupu v kapitole 3.3.4. Následně byly stanoveny celkové sacharidy podle metody v kapitole 3.3.6 a redukující sacharidy podle metody v kapitole 3.3.7. Nerozpustná vláknina byla stanovena vážkovou metodou podle postupu v kapitole 3.3.8. U některých vzorků byly identifikovány i jednotlivé vybrané sacharidy pomocí HPLC podle postupu v kapitole 3.3.17. Všechny vzorky byly měřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledky jsou vyjádřeny v  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  suchého vzorku (Tabulka 22).

Z naměřených hodnot vzorků vlákniny je zřejmé, že vzorky chia vlákniny a jakon sirupu obsahují největší množství ve vodě rozpustných sacharidů s hodnotami nad  $400 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . U vzorku jakon sirupu byl také stanoven vysoký obsah redukujících cukrů, a to  $232,6 \pm 0,14 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Tato hodnota je ve srovnání se vzorkem inulinu mnohokrát vyšší a lze jej používat jako rostlinné sladidlo. Naopak nerozpustná vláknina byla u vzorku jakonu stanovena ve velmi nízké, až nulové hodnotě. Z hodnot nerozpustné vlákniny lze vyzdvihnout vzorky chia, bambusové vlákniny a směsi chlorelly se spirulinou. Pomocí analýzy HPLC byla potvrzena přítomnost oligosacharidů ve vzorku inulinu, ve kterém bylo zaznamenáno i vysoké množství fruktózy a glukózy. U chia vlákniny bylo zaznamenáno i zastoupení manózy. U jakon sirupu byly opět potvrzeny oligosacharidy a vysoké množství fruktózy.

U vzorků řas a sinice byly zaznamenány poměrně vysoké hodnoty celkových i redukujících sacharidů. Vzorek arame obsahoval nejvíce celkových sacharidů ( $319,3 \pm 15,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), redukujících sacharidů ( $245,80 \pm 7,80 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a zároveň i nerozpustné vlákniny ( $640,0 \pm 25,3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Pomocí metody HPLC bylo u vzorky arame stanoveno i největší množství glukózy a fruktózy ( $21,03 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) v porovnání s inulinem ( $26,48 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Ve vzorku wakame bylo naopak stanoveno největší množství

sacharózy (97,02 mg·g<sup>-1</sup>). Celkově lze říci, že vzorky mořských makrořas obsahují velké množství nerozpustné vlákniny významné pro organismus.

Podobné výsledky byly pozorovány i u rostlinných prášků. U všech se hodnoty nerozpustné vlákniny pohybovaly kolem 200 mg·g<sup>-1</sup>. Vysoká hodnota je dána nejspíše zdrojem samotného prášku, který je získán mletím zelených listů rostlin. Z této skupiny nejvyšší hodnoty všech sledovaných sacharidů vykazovala matcha a mladý ječmen, ve kterých bylo pomocí HPLC stanoveno i větší množství sacharózy kolem 30 mg·g<sup>-1</sup>, ve vzorcích rostlinných prášků se vyskytla i arabinóza, která je součástí hemicelulóz.

Význam analýzy zastoupení sacharidů a nerozpustné vlákniny je v této práci ten, že slouží jako zdroj energie nejen pro konzumenta, ale zvláště pro mikrobiom tlustého střeva. Nerozpustná vláknina je mikrobiomem fermentována a vznik kyselin s krátkým řetězcem, čímž může stimulovat funkci střevního epitelu a zároveň udržovat nižší pH, a tím vytvářet nevhodné podmínky pro patogeny [136].

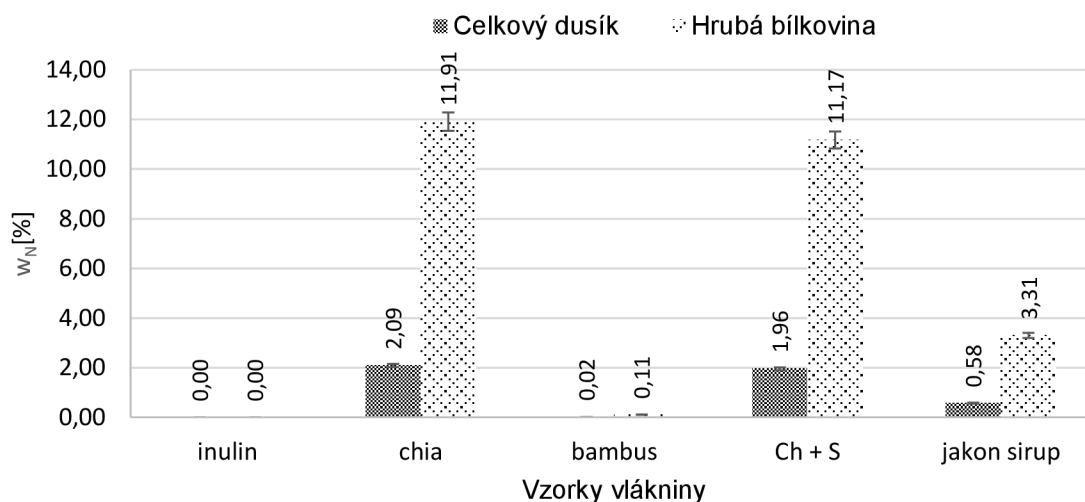
Tabulka 22 Stanovení sacharidů ve vodných extraktech a nerozpustné vlákniny ve vzorcích

Vzorky		Celkové sacharidy	Redukující sacharidy	Nerozpustná vláknina
		c [mg·g <sup>-1</sup> ]	c [mg·g <sup>-1</sup> ]	c [mg·g <sup>-1</sup> ]
vláknina	inulin	83,8 ± 1,1	11,04 ± 0,12	0,0 ± 0,0
	chia vláknina	437,6 ± 0,2	0,90 ± 0,02	97,9 ± 2,4
	bambusová vláknina	0,9 ± 0,2	0,07 ± 0,13	175,8 ± 4,2
	chlorella + spirulina	6,0 ± 0,3	2,34 ± 0,08	61,7 ± 1,5
	jakon sirup	632,4 ± 0,6	232,6 ± 0,14	0,5 ± 0,1
řasy a sinice	chlorella	67,6 ± 6,8	41,50 ± 1,00	81,9 ± 4,1
	spirulina	46,8 ± 10,0	16,50 ± 0,30	40,5 ± 2,0
	arame	319,3 ± 15,4	245,80 ± 7,80	640,0 ± 25,3
	wakame	77,0 ± 3,8	5,40 ± 1,51	18,1 ± 2,4
	hijiki	95,5 ± 13,2	12,20 ± 1,30	501,1 ± 16,8
	kombu	22,7 ± 5,4	16,80 ± 4,12	311,4 ± 15,2
rostlinný prášek	matcha	131,6 ± 2,9	34,30 ± 1,40	249,1 ± 12,5
	moringa	25,4 ± 7,8	79,60 ± 1,90	246,7 ± 12,3
	mladá pšenice	61,8 ± 0,5	19,00 ± 0,70	225,7 ± 11,3
	mladý ječmen	76,2 ± 0,4	39,70 ± 0,20	205,6 ± 10,3

#### 4.2.2 Stanovení celkového dusíku

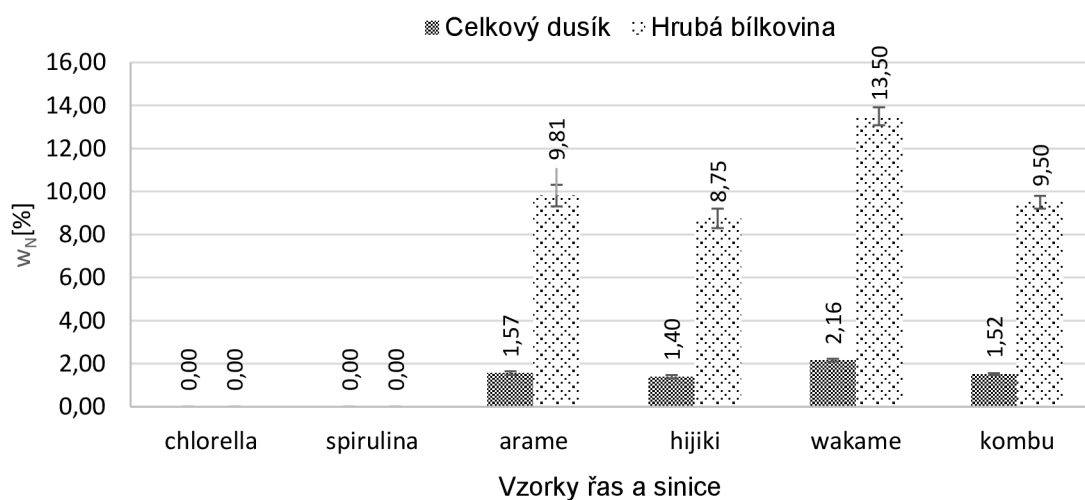
Rostlinné vzorky (3.2.4.2, 3.2.4.3, 3.2.4.4) byly podrobeny analýze stanovení hrubé bílkoviny modifikovanou metodou podle Kjeldahla, a to podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.9. K přepočtu celkového dusíku na hrubou bílkovinu byl využit faktor 5,7 (ostatní mouky, těstoviny) pro vzorky vláknin, faktor 6,25 (ostatní potraviny) pro řasy a sinice a faktor 5,83 (ječmen, oves, žito) pro rostlinné prášky [137]. Všechny vzorky byly měřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledky jsou vyjádřeny v hmotnostních procentech.

Nejvyšší hodnoty celkového dusíku v rámci vlákniny byly stanoveny u chia vlákniny a směsi chlorelly se spirulinou (Obrázek 16). Necelých 12 % hrubé bílkoviny vypočítán u chia vlákniny se téměř shoduje s deklarovanou hodnotou výrobce (9 g na 100 g výrobku). Chia vláknina je tak bohatým zdrojem nejen nerozpustné vlákniny, ale i bílkovin.



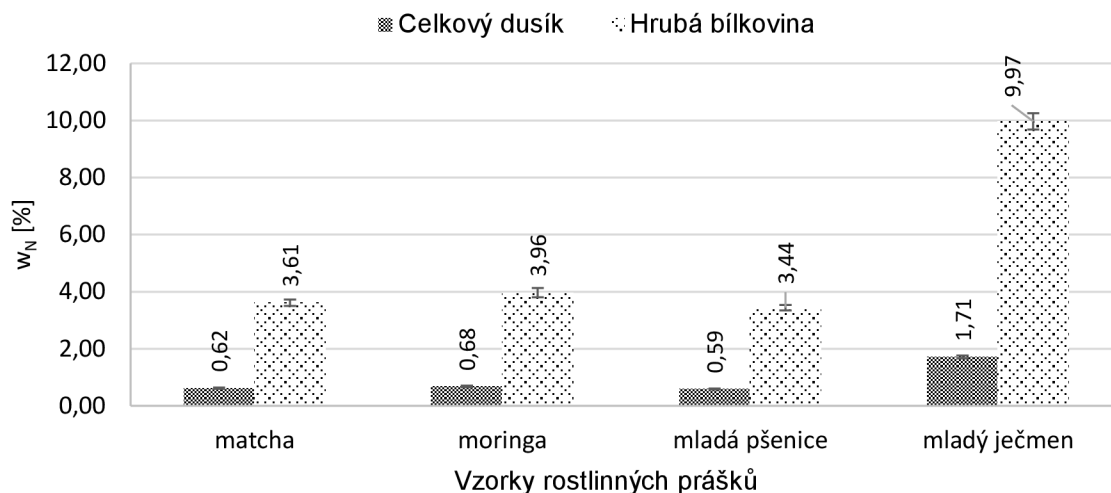
Obrázek 16 Stanovení dusíku ve vzorcích vlákniny

Vzorky mořských řas mohou také sloužit jako zdroj bílkovin (Obrázek 17). Nejvyšší hodnota celkového dusíku byla stanovena u vzorku wakame s hodnotou  $2,16 \pm 0,03$  % a hrubé bílkoviny na  $13,50 \pm 0,63$  %. U ostatních mořských řas se hodnota hrubé bílkoviny pohybovala do 10 %. U vzorků samostatné spiruliny a chlorelly došlo při mineralizaci k úplnému spálení navážky a dosažení nulových hodnot. U těchto vzorků by proto byla nutná optimalizace kroků samotné mineralizace.



Obrázek 17 Stanovení dusíku ve vzorcích řas a sinice

U všech vzorků rostlinných prášků byly naměřeny hodnoty celkového dusíku (Obrázek 18). Nejvyšší celkový dusík a hrubé bílkoviny byl naměřen u vzorku mladého ječmene ( $1,71 \pm 0,02$  %;  $9,97 \pm 1,05$  %). U ostatních vzorků se hodnota pohybovala kolem 0,6 % celkového dusíku.



Obrázek 18 Stanovení dusíku ve vzorcích rostlinných prášků

Z výsledků stanovení celkového dusíku vyplývá, že z každé skupiny testovaných vzorků lze vybrat vzorky s dostatečným obsahem bílkovin, jehož množství je porovnatelné s množstvím nacházející se například v mouce nebo rýži. Dusík je ve výživě nezbytným zdrojem aminokyselin a samotné proteiny obsažené v potravině souvisí s její kvalitou a senzoryckými vlastnostmi [138], [139].

#### 4.2.3 Extrakce olejů z vybraných rostlinných materiálů

Lipidické extrakty byly z vybraných vzorků (3.2.4.3, 3.2.4.4, 3.2.4.5) extrahovány hexanem, a to pomocí přístroje Soxtherm dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.5.2. Vzorky semínek musely být před samotnou extrakcí pomlety, aby došlo k účinnější extrakci látek. Extrakce probíhala paralelně ve dvou opakováních a získané průměrné hodnoty výtěžnosti vyjádřené jako hmotnostní zastoupení v procentech jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 23). Pro srovnání získaných olejů, byly vzorky semínek lisovány za studena pomocí kuchyňského lisu Yoda, dle postupu v kapitole 3.3.5.1.

Ze všech vzorků byl úspěšně extrahován lipidický extrakt. Nejvyšší výtěžnost byla pozorována u vzorků semínek, které jsou obecně bohatým zdrojem lipidů, především mastných kyselin. Nejvyšší výtěžnost byla pozorována u vlašského ořechu s  $61,26 \pm 3,04$  %. Za zmínku ovšem stojí poměrně malá výtěžnost u dýňových semínek, a to pomocí obou metod. Poměrně malý výtěžek byl způsoben zřejmě šarží výrobku, kdy se semínka jevila již na pohled velmi suchá. Pomocí lisu za studena byla získána pouze pokrutina, která může být použita pro následnou extrakci hexanem. Důležitou roli před samotnou extrakcí hexanem bylo rozrušení samotných semínek. Pokud byla semínka dostatečně velká, rozrušení bylo snadnější s výsledkem vyšší výtěžnosti, a to i v případě lisování za studena. U ostatních vzorků rostlinného materiálu byla výtěžnost obecně nízká, maximálně do 6,5 %, až na vzorek moringy (až 13 %), jejíž listy jsou bohaté na lipidické látky, především na PUFA [140].

U získaných olejů byl zjištěn obsah fenolických látek, celková antioxidační aktivita a profil mastných kyselin. Vybrané lipidické extrakty byly následně enkapsulovány do liposomů vytvořených ze sójového lecithinu, a to pro zvýšení stability olejů.

Tabulka 23 Výtěžnost rostlinných olejů extrahovaných hexanem pomocí přístroje Soxtherm a olejů získaných lisováním za studena pomocí lisu Yoda

		Soxtherm	Lisování za studena
Vzorky		w [%]	w [%]
řasy a sinice	chlorella	3,54 ± 0,45	–
	spirulina	1,78 ± 0,57	–
	arame	0,16 ± 0,12	–
	wakame	0,43 ± 0,23	–
	kombu	0,32 ± 0,17	–
rostlinný prášek	matcha	6,00 ± 0,85	–
	moringa	13,52 ± 1,07	–
	mladá pšenice	3,21 ± 1,02	–
	mladý ječmen	6,30 ± 1,74	–
semínka	konopné semínko	31,35 ± 2,44	36,85
	lněné semínko	75,43 ± 3,15	17,41
	vlašský ořech	61,26 ± 3,04	32,15
	dýňová semínka	13,40 ± 1,89	–
	sezamová semínka	29,15 ± 1,79	41,26
	kmín římský	14,96 ± 0,78	2,69

#### 4.2.3.1 Zastoupení mastných kyselin v extrahovaných vzorcích

Vzorky olejů extrahovaných hexanem pomocí přístroje Soxtherm a lisováním za studena (4.2.3) byly podrobeny analýze mastných kyselin pomocí plynové chromatografie s plamenovým detektorem. Vzorky olejů byly nejprve transesterifikovány, a to podle postupu v kapitole 3.3.10. Samotná analýza pomocí GC-FID je popsána v téže kapitole. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledky mastných kyselin jsou vyjádřeny v  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  získaného oleje, výsledky zastoupení skupin nasycených, mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin jsou vyjádřeny v hmotnostních procentech z celkových mastných kyselin. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 24).

Pomocí přístroje Soxtherm a GRAS rozpouštědla, hexanu, bylo z chlorelly a spiruliny ze skupiny řas a sinic extrahováno nejvíce mastných kyselin. V oleji chlorelly bylo stanoveno až  $158,65 \pm 7,54 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . Z tohoto množství mastných kyselin měly polynenasycené mastné kyseliny největší zastoupení, a to až  $56,69 \pm 3,88 \%$ . Za zmínku stojí, že z této skupiny mastných kyselin byla detekována například esenciální kyselina linolová ( $41,0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) a  $\alpha$ -linolenová ( $55,6 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Kromě polynenasycených mastných kyselin se ve velkém množství stanovily i nasycené a mononenasycené mastné kyseliny, kyselina palmitová, stearová a olejová ( $51,8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ;  $23,3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ;  $5,8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). U vzorku spiruliny byla navíc stanovena  $\alpha$ -linolenová i  $\gamma$ -linolenová kyselina ( $7,3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ;  $49,7 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

Nejvyšší obsah mastných kyselin ve skupině rostlinných prášků byl stanoven u vzorku matcha, a to  $3,54 \pm 0,45 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . I u tohoto vzorku měly polynenasycené mastné kyseliny největší zastoupení, a to až  $70,97 \pm 7,64 \%$ . Koncentrace kyseliny linolové ( $13,95 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) a  $\alpha$ -linolenové ( $54,8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) byly opět nejvyšší. Obecně byly hodnoty mastných kyselin v této skupině velmi nízké. V rámci práce byly stanoveny mastné kyseliny i přímo z navážky vzorků. Ve stanoveném množství nebyl výrazný rozdíl



mezi stanoveným obsahem z navážky vzorku a z extrahovaného oleje. Vzorky lipidických extraktů byly použity pro enkapsulaci do liposomů, z tohoto důvodu byly diskutovány naměřené hodnoty.

Tabulka 24 Zastoupení mastných kyselin v rostlinných vzorcích extrahovaných hexanem pomocí přístroje Soxtherm

		<b>Mastné kyseliny</b>	<b>SFA</b>	<b>MUFA</b>	<b>PUFA</b>
Vzorky		c [mg·g <sup>-1</sup> ]	w [%]	w [%]	w [%]
řasy a sinice	chlorella	158,65 ± 7,54	30,28 ± 0,54	13,04 ± 3,34	56,69 ± 3,88
	spirulina	144,45 ± 6,77	37,96 ± 8,18	6,75 ± 0,97	55,3 ± 7,20
	aramé	85,38 ± 6,12	38,16 ± 1,84	22,65 ± 2,13	39,19 ± 9,03
	wakame	108,08 ± 11,39	36,36 ± 1,73	15,03 ± 2,87	48,61 ± 10,01
	hijiki	86,44 ± 5,30	55,72 ± 5,24	14,75 ± 2,67	29,53 ± 11,36
	kombu	86,40 ± 4,70	36,17 ± 2,47	28,03 ± 1,70	35,81 ± 5,23
prášek	matcha	3,54 ± 0,45	21,58 ± 0,66	7,45 ± 1,11	70,97 ± 7,64
	moringa	1,78 ± 0,57	58,86 ± 5,70	9,15 ± 1,99	31,99 ± 4,08
	mladá pšenice	0,16 ± 0,12	16,04 ± 1,04	5,85 ± 2,13	78,12 ± 9,03
	mladý ječmen	0,43 ± 0,23	43,48 ± 2,65	7,44 ± 0,91	49,08 ± 3,34
semínka	konopné semínko	720,04 ± 21,80	8,46 ± 1,45	9,62 ± 1,98	81,92 ± 8,14
	lněné semínko	713,82 ± 12,15	10,47 ± 0,36	15,05 ± 0,10	74,48 ± 6,15
	vlašský ořech	819,30 ± 14,04	9,04 ± 0,18	12,45 ± 0,25	78,51 ± 5,92
	dýňová semínka	280,59 ± 11,91	18,35 ± 2,25	36,79 ± 3,32	44,86 ± 2,45
	sezamová semínka	23,89 ± 8,70	22,22 ± 2,27	33,76 ± 3,42	44,03 ± 3,07
	kmín římský	12,60 ± 2,55	24,88 ± 1,82	0,00 ± 0,12	75,12 ± 10,14

U vzorků semínek a ořechů byl z analyzovaných materiálů očekáván nejvyšší obsah mastných kyselin, který byl také potvrzen. Vysoký obsah byl stanoven u vzorků konopného semínka 720,04 ± 21,80 mg·g<sup>-1</sup>, lněného semínka 713,82 ± 12,15 mg·g<sup>-1</sup> a vlašských ořechů 819,30 ± 14,04 mg·g<sup>-1</sup>. U všech zmíněných vzorků měly největší zastoupení opět polynenasycené mastné kyseliny, a to až 80 %. V příloze (Příloha 2) naleznete vzorový graf zastoupení mastných kyselin ve lněném oleji extrahovaný hexanem pomocí přístroje Soxtherm a získaný lisováním za studena pomocí kuchyňského lisu YODA.

Získané oleje izolované oběma metodami byly porovnány v rámci zastoupení mastných kyselin (Tabulka 25). Překvapivě vyšší výtěžnost mastných kyselin pomocí lisu byla pozorována u sezamových semínek a římského kmínu, jejichž struktura se velmi špatně dezintegrovala před samotnou extrakcí, a z toho důvodu nebyla vysoká výtěžnost výsledných olejů. Celkově lze tvrdit, že oběma metodami se získá velké množství zastoupených polynenasycených mastných kyselin. Velmi významný rozdíl byl pozorován u stanovených polynenasycených mastných kyselin u vylisovaných olejů z konopného, lněného semínka a ořechů, kdy bylo stanoveno i malé množství kyseliny arachidonové (ARA) a eikosapentaenové (EPA), které se účastní mnoha biochemických mechanismů v těle, jako je genová exprese nebo mediátor syntézy lipidů. Obecně hrají polynenasycené mastné kyseliny důležitou roli v lidské výživě, kdy podporují biologickou, fyziologickou aktivitu jedince a přinášejí mnoho dalších zdravotních výhod [141],[142].

Tabulka 25 Srovnání zastoupení mastných kyselin olejů získaných pomocí extrakce a lisování za studena

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

### 4.3 OBSAH VYBRANÝCH BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

V této části práce byla pozornost zaměřena na stanovení obsahu vybraných biologicky aktivních látek, jako jsou například celkové fruktany,  $\beta$ -glukany, rostlinná barviva, antioxidační a antimikrobiální aktivity. Skupiny vzorků řas a sinice a rostlinných prášků, které byly analyzovány z nutričního hlediska, byly analyzovány i v této části. Navíc, s ohledem na vybrané biologicky aktivní látky, byly zkoumány i ovocné a zeleninové šťávy, sirupy, čaje ale také extrakty vybraných bylin a koření.

#### 4.3.1 Stanovení vybraných sacharidových skupin

Pomocí komerčně zakoupených kitů byly vypočítány koncentrace celkových fruktanů, které jsou součástí fruktooligosacharidů, a  $\beta$ -glukanů ve vzorcích rostlinných prášků, řas a sinice. Stanovení fruktanů bylo provedeno podle postupu v kapitole 3.3.14 a  $\beta$ -glukanů podle postupu v kapitole 3.3.15. Všechny vzorky byly měřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledky jsou vyjádřeny v mg·g<sup>-1</sup> suchého vzorku (Tabulka 26).

Vzorek inulinu, který je zástupcem rozpustné vlákniny složený z jednotek fruktooligosacharidů vykazovala nejvyšší obsah fruktanů, a to 749,938 ± 3,071 mg·g<sup>-1</sup>. Tento vzorek můžeme v našem případě brát jako referenční vůči ostatním zkoumaným vzorkům. Řasy a sinice nevykazovaly vysoké hodnoty fruktanů. Naopak u vzorků mladého ječmenu a matcha byl naměřen vysoký obsah, a to nad 100 mg·g<sup>-1</sup>. Tyto látky tak mají potenciál zastoupit inulin, který se běžně využívá jako prebiotikum. V kombinaci s probiotiky slouží jako substrát a dostupný zdroj živit pro růst probiotických bakterií, které je jsou schopny fermentovat v tlustém střevě za vzniku kyselin s krátkým řetězcem [143],[144].

U vzorků byl navíc stanoven obsah  $\beta$ -glukanů, u kterých byl rovněž potvrzen pozitivní vliv na lidské zdraví [145]. Nejvyšší obsah byl stanoven u vzorku arame (245,80 ± 7,80 mg·g<sup>-1</sup>) a poté u hijiki a kombu, kde se hodnota pohybuje kolem 12–16 mg·g<sup>-1</sup>. Přítomnost  $\beta$ -glukanů ve výživě je výhodná v mnoha směrech. Tyto látky ovlivňují hodnotu cholesterolu a hodnotu glukózy v krvi po jídle. Pro snížení hodnoty cholesterolu v krvi se doporučuje denní dávka příjmu  $\beta$ -glukanů až 3 g. Detailnější mechanismus účinku ovšem nebyl objasněn [145].

Tabulka 26 Stanovení skupin sacharidů ve vybraných vzorcích

Vzorky	Fruktany	$\beta$ -glukany	
	c [mg·g <sup>-1</sup> ]	c [mg·g <sup>-1</sup> ]	
řasy a sinice	inulin	749,938 ± 3,071	–
	chlorella	2,600 ± 0,130	0,45 ± 0,53
	spirulina	1,230 ± 0,060	0,19 ± 0,02
	arame	0,948 ± 0,342	245,80 ± 7,80
	wakame	1,394 ± 0,843	5,40 ± 1,51
	hijiki	0,714 ± 0,052	12,20 ± 1,30
	kombu	–	16,80 ± 4,12
rostlinný prášek	matcha	125,74 ± 6,29	10,65 ± 0,53
	moringa	2,81 ± 0,14	3,98 ± 0,20
	mladá pšenice	32,53 ± 1,63	19,21 ± 0,96
	mladý ječmen	152,57 ± 7,63	18,76 ± 0,94

#### 4.3.2 Stanovení celkových fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivity

Pro využití rostlinných extraktů s obsahem biologicky aktivních látek v dětské výživě byla pozornost věnována extrakcím pomocí GRAS rozpouštědel, konkrétně destilovanou vodou, ethanolovým roztokem a hexanem. V rámci ethanolových extrakcí byl sledován i obsah sledovaných látek v rámci koncentrační řady ethanolu, kdy byl roztoku 20% ethanolu zvolen jako nejúčinnější, a proto byl v rámci disertační práce využit. Vzorky vybrané na základě potenciálních antioxidačních a antimikrobiálních účinků. Jednalo se o vzorky řas a sinic (3.2.4.3), rostlinných prášků (3.2.4.4) a semínek a ořechů (3.2.4.5).

##### 4.3.2.1 Polární extrakty – Vodné a ethanolové extrakty

Vzorky rostlinného materiálu byly analyzovány pro celkový obsah fenolických látek, celkových flavonoidů a antioxidační účinek. Pro stanovení všech tří zkoumaných skupin biologicky aktivních látek byly vzorky extrahovány do destilované vody nebo 20% ethanolového roztoku o hmotnostní koncentraci 0,05 nebo 0,1 g·ml<sup>-1</sup> podle postupu v kapitole 3.3.4. Následně byly vzorky připraveny k dílčím analýzám. Stanovení celkových fenolických látek je popsáno v kapitole 3.3.11, celkových flavonoidů v kapitole 3.3.12 a antioxidační aktivita v kapitole 3.3.13. Všechny vzorky byly měřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 27). Výsledky jsou vyjádřeny v mg·g<sup>-1</sup> suchého vzorku.

Z hlediska obsahu celkových fenolických látek byly vzorky rostlinných prášků extrahované destilovanou vodou vyhodnoceny jako nejbohatší. Nejvyšší hodnoty fenolických látek vykazovala spirulina 64,01 ± 6,07 mg·g<sup>-1</sup> a matcha 54,50 ± 2,50 mg·g<sup>-1</sup>. Vysoký obsah fenolických látek měl vliv i na hodnoty antioxidační aktivity, kdy v případě vzorku matcha byla stanovena až na hodnotu 100,52 ± 1,32 mg·g<sup>-1</sup>.

Tabulka 27 Charakterizace rostlinných extraktů z hlediska obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity

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

V rámci extrakce byly zvoleny pouze GRAS rozpouštědla, jelikož použití jiných (potenciálně toxických) organických rozpouštědel nevyhovuje legislativním stanovám <sup>[146]</sup>, a proto nedocházelo k vyšší extrakční účinnosti fenolických látek polárními rozpouštědly, kdy účinnějším rozpouštědlem by byl v tomto případě nejspíše methanol. Připravené extrakty však mohou být po lyofilizaci ve formě prášku využity do doplňků stravy určených dětem, a to bez dalších úprav.

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV-VIS detektorem (3.3.11.1) byla u vybraných vzorků sledována přítomnost některých individuálních fenolických látek. Existuje několik tisíc druhů fenolických látek <sup>[50]</sup>, proto byla metoda zaměřena na významné fenolické látky přítomné v daném vzorku. Kyselina gallová byla identifikována ve všech extraktech, nejvyšší koncentrace byla stanovena u vzorků chlorelly (5,9 ± 0,1 mg·g<sup>-1</sup> ve vodném extraktu a 5,0 ± 0,1 mg·g<sup>-1</sup> u ethanolových extraktů). Dále byla u řas a sinic identifikována kyselina chlorogenová s obsahem kolem 0,5 ± 0,1 mg·g<sup>-1</sup>.

Ve vzorcích mladé pšenice a matcha bylo identifikováno nejvíce druhů i nejvyšší množství sledovaných fenolických látek. Obecně výsledky korespondovaly se spektrofotometrickou metodou, kdy největší koncentrace fenolických látek byly naměřeny ve vodných extraktech. Kromě kyseliny gallové byl identifikován i rutin, saponarin nebo kyselina sinapová a ferulová. Všechny tyto fenolické látky vykazují antioxidační aktivitu a mohou mít významnou roli u protizánětlivých nebo protirakovinných onemocnění <sup>[147],[148]</sup>. U matcha jako jediného vzorku byla stanovena i hodnota

kofeinu, a to  $5,8 \pm 0,1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Denní příjem kofeinu do  $2,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  u dětí zvyšuje jejich pozornost a kognitivní vnímání. Vyšší hodnoty by ovšem vykazovaly spíše negativní účinky v podobě hyperaktivity [149].

#### 4.3.2.2 Hexanové extrakty

Lipidické extrakty získané extrakcí hexanem (3.3.5.2) byly také proměřeny na obsah biologicky aktivních látek jako v předchozí kapitole 4.3.2.1. Rozdíl ve stanovení byl ten, že 100  $\mu\text{l}$  oleje bylo rozpuštěno v 1 ml ethanolu a po dobu 24 hodin byly vzorky protřepávány. Následně proběhly dílčí analýzy. Všechny vzorky byly měřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 28). Výsledky jsou vyjádřeny v  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  oleje.

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

Tabulka 28 Charakterizace hexanových extraktů rozpuštěných v ethanolu z hlediska obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity

hexanový extrakt		Fenolické látky	Antioxidační aktivity
		c [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	c [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ]
řasy a sinice	chlorella	$5,67 \pm 0,74$	$3,08 \pm 0,63$
	spirulina	$10,21 \pm 0,33$	$2,30 \pm 0,25$
	arame	$3,45 \pm 0,29$	$1,88 \pm 0,14$
	wakame	$5,08 \pm 0,20$	$1,78 \pm 0,19$
	hijiki	$7,45 \pm 0,27$	$1,65 \pm 0,15$
	kombu	$5,42 \pm 0,18$	$2,05 \pm 0,27$
rostlinný prášek	matcha	$13,95 \pm 0,14$	$7,59 \pm 0,20$
	moringa	$8,01 \pm 0,77$	$0,55 \pm 0,03$
	mladá pšenice	$14,36 \pm 1,47$	$1,32 \pm 0,04$
	mladý ječmen	$9,08 \pm 0,06$	$1,23 \pm 0,16$
semínka	konopné semínko	$9,03 \pm 0,30$	$3,66 \pm 0,16$
	lněné semínko	$14,15 \pm 0,65$	$7,12 \pm 0,32$
	vlašský ořech	$4,37 \pm 0,38$	$4,69 \pm 0,36$
	dýňová semínka	$0,47 \pm 0,21$	$0,55 \pm 0,05$
	sezamová semínka	$8,86 \pm 0,83$	$0,12 \pm 0,11$
	kmín římský	$1,78 \pm 0,31$	$0,62 \pm 0,08$

#### 4.3.3 Stanovení vybraných rostlinných barviv

V rámci významných biologicky aktivních látek byla také stanovena koncentrace chlorofylu *a* a *b* a celkových karotenoidů v suchých vzorcích rostlinných materiálů uvedených v kapitole 3.2.4.3 a 3.2.4.4. Vysušené a homogenizované vzorky byly extrahovány čistým acetonem podle postupu v kapitole 3.3.16. Následně bylo změřeno absorpční spektrum vzorků a dle absorpčních maxim jednotlivých látek byly dopočítány koncentrace, a to podle vzorce v téže kapitole 3.3.16. Všechny vzorky byly změřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledky jsou vyjádřeny v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  suchého vzorku (Tabulka 29).

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

Chlorofyly a karotenoidy jsou významnými rostlinnými barvivy, která zastupují mnoho biologických funkcí. Jednou z jejich významných rolí jsou i antioxidační vlastnosti. Ze skupiny karotenoidů to jsou například lykopen, lutein nebo  $\beta$ -karoten, který nejlépe v kombinaci s vitamínem E, chrání organismus před oxidativním stresem. Tímto způsobem lze předcházet nemocem jako je rakovina nebo kardiovaskulární choroby <sup>[150]</sup>.

Tabulka 29 Stanovené množství chlorofylů a karotenoidů

		Chlorofyl <i>a</i>	Chlorofyl <i>b</i>	Karotenoidy
Vzorky		c [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	c [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	c [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]
řasy a sinice	chlorella	$1\,876 \pm 60$	$740 \pm 39$	$3\,463 \pm 19$
	spirulina	$1\,180 \pm 18$	$176 \pm 6$	$1\,035 \pm 12$
	arame	$830 \pm 10$	$19 \pm 7$	$17 \pm 12$
	wakame	$42 \pm 8$	$18 \pm 3$	$53 \pm 2$
	hijiki	$37 \pm 6$	$10 \pm 7$	$8 \pm 1$
	kombu	$20 \pm 3$	$36 \pm 6$	$4 \pm 2$
rostlinný prášek	matcha	$132 \pm 3$	$34 \pm 1$	$249 \pm 13$
	moringa	$25 \pm 8$	$80 \pm 2$	$247 \pm 10$
	mladá pšenice	$62 \pm 1$	$19, \pm 1$	$226 \pm 11$
	mladý ječmen	$76 \pm 0$	$38 \pm 0$	$206 \pm 10$

Doplňující analýzou spektrofotometrického stanovení přírodních barviv <sup>[116]</sup> byla chromatografická analýza metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Materiál byl podroben extrakci dle Folche a stanovení pomocí HPLC podle postupu v kapitole 3.3.16.1. Výsledky obsahu barviv poměrově korespondují s naměřenými hodnotami spektrofotometrickou metodou. Je potřeba podotknout, že metoda HPLC je přesnější a extrakce dle Folche byla navíc účinnější, jelikož využívá organických rozpouštědel, a to chloroformu a methanolu, které jsou vůči rostlinným membránám efektivnější. Proto byly zjištěné koncentrace barviv vyšší nežli při stanovení spektrofotometrickou metodou. Nejvyšší obsah chlorofylů byl naměřen u chlorelly ( $29,53 \pm 1,32 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a spiruliny ( $7,02 \pm 0,97 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Obsah samotného  $\beta$ -karotenu byl i u těchto vzorků nejvyšší, a to  $9,21 \pm 1,70 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  u chlorelly a  $3,52 \pm 0,99 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  u spiruliny. U všech vzorků řas byl navíc identifikován i lutein pohybující se převážně do  $30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , jen u vzorku chlorelly se pohybovala hodnota až nad  $900 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

U vzorků rostlinných prášků bylo pomocí extrakce dle Folche extrahováno a stanovené nejvíce celkových karotenoidů u vzorku moringy ( $3,49 \pm 0,87 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a vzorku matcha ( $1,60 \pm 1,07 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). V těchto vzorcích se navíc identifikoval i lykopen o podobné koncentraci. Dále se ve vzorcích stanovil i v malém množství lutein a ubichinon ( $20\text{--}300 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

U vzorků rostlinného prášku byla barviva extrahována také pomocí hexanu a ethanolu, jakožto GRAS rozpouštědly, a obsah byl stanoven pomocí HPLC dle stejných podmínek analýzy. Extrakce barviv nebyla tak účinná jako v případě extrakce podle Folche. Extrakcí hexanem se ale povedla extrakce

stejných látek –  $\beta$ -karotenu, luteinu a ubichinonu. Koncentrace všech látek ale byla 2krát až 10krát nižší. Extrakce ethanolem byla účinná ve větší míře jen v rámci chlorofylu a celkových karotenoidů, kdy převládajícím karotenoidem byl i v tomto případě  $\beta$ -karoten (Příloha 3).

#### 4.3.4 Prvková analýza řas a sinic

U vzorků řas a sinic (3.2.4.3), u kterých se potenciálně mohou kumulovat potravinové kontaminanty [151],[152], byla provedena prvková analýza. Stanovení jednotlivých prvků bylo provedeno pomocí ICP-MS s kvadrupólovým analyzátozem podle postupu v kapitole 3.3.18. Ve vzorcích makrořas, mikrořasy a sinice byla zkoumána koncentrace 13 vybraných prvků. Vzorek kombu byl vyřazen, jelikož nedošlo ke správné mineralizaci vzorku. Všechny vzorky byly měřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledky jsou prezentovány v  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  suchého vzorku (Tabulka 30).

Tabulka 30 Výsledné koncentrace izotopů prvků ve vzorcích řas a sinice

Prvek	chlorella	spirulina	arame	wakame	hijiki
	koncentrace [ $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ]				
<sup>27</sup> Al	41,07 ± 1,42	7,14 ± 0,79	5,20 ± 2,03	9,95 ± 2,30	65,17 ± 8,16
<sup>51</sup> V	0,40 ± 0,03	0,08 ± 0,00	0,57 ± 0,03	0,23 ± 0,01	1,46 ± 0,14
<sup>52</sup> Cr	1,51 ± 0,84	0,08 ± 0,00	0,51 ± 0,17	0,22 ± 0,04	1,18 ± 0,53
<sup>55</sup> Mn	61,34 ± 9,37	49,75 ± 1,66	2,83 ± 0,11	4,44 ± 0,41	42,78 ± 0,17
<sup>56</sup> Fe	1 421,05 ± 17,32	111,72 ± 2,19	37,43 ± 2,05	37,89 ± 2,78	64,25 ± 4,78
<sup>59</sup> Co	1,01 ± 0,12	3,89 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,22 ± 0,03
<sup>60</sup> Ni	0,98 ± 0,04	1,72 ± 0,04	1,06 ± 0,66	0,68 ± 0,20	1,44 ± 0,17
<sup>63</sup> Cu	5,50 ± 0,42	6,03 ± 0,14	2,76 ± 0,51	0,89 ± 0,26	7,44 ± 0,85
<sup>66</sup> Zn	18,27 ± 1,77	27,79 ± 0,25	15,89 ± 1,86	7,46 ± 0,39	6,34 ± 0,69
<sup>75</sup> As	0,33 ± 0,02	0,25 ± 0,03	27,40 ± 0,70	34,65 ± 0,06	59,00 ± 0,79
<sup>78</sup> Se	1,33 ± 0,57	0,98 ± 0,66	0,93 ± 0,50	0,59 ± 0,02	0,86 ± 0,57
<sup>111</sup> Cd	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,59 ± 0,05	5,39 ± 5,47	0,65 ± 0,05
<sup>208</sup> Pb	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,12	0,19 ± 0,02	1,37 ± 1,67	0,32 ± 0,06

V tabulce jsou uvedené výsledky prvkové analýzy ve vybraných vzorcích. Média potřebná pro kultivaci řas *in vitro* často obsahují různé prvky kovů pro svůj růst, nejčastěji železo nebo selen. Některé prvky jsou esenciální i pro lidský organismus, jedná se zejména o hořčík, měď a železo.

Ve volné přírodě dochází k samovolné kumulaci těchto kovů v rostlinném materiálu, jako například kadmia, hliníku nebo olova, která patří mezi potravinové kontaminanty s potenciální toxicitou již při malých koncentracích. Regulace Evropské komise v rámci legislativy (č. 629/2008, č.488/2014) nastavila pouze maximální hodnoty koncentrace kadmia ( $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v různých potravinových doplňcích obsahujících mořské řasy. Pro hliník a olovo nebyly evropskou legislativou nastaveny limitní koncentrace, ale průměrné hodnoty olova v analyzovaných vzorcích mořských řas doposud nepřekročily hodnoty  $0,05\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  [151],[152].

Naměřené hodnoty vzorků zahrnutých v této kapitole nevykazovaly překročení hranice  $0,05\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , s výjimkou železa u vzorku chlorelly. Obecně u všech vzorků vykazovalo množství železa nejvyšší obsah, nejvíce právě u vzorku chlorelly, a to  $1\ 421,05 \pm 17,32\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ . Při dodržení denní dávky mohou být vzorky řas a sinice vhodným zdrojem železa například pro pacienty trpící anémií nebo sideropenií.

#### 4.3.5 Antimikrobiální vlastnosti vybraných extraktů

Metoda bujónové diluční metody je založena na očkování testované kultury k testovaným látkám a po inkubaci v optimálních kultivačních podmínkách dochází k vyhodnocení minimální inhibiční koncentrace antimikrobiální látky. Vyhodnocení lze provádět vizuálně, turbidimetricky nebo přímým stanovením počtu buněk v komůrkách nebo pomocí průtokové cytometrie <sup>[91],[153]</sup>.

Pomocí diluční bujónové metody byla ověřována antimikrobiální aktivita vybraných rostlinných vzorků podle postupu v kapitole 3.3.19.3. V rámci experimentu proběhlo i stanovení případného inhibičního účinku samotného rozpouštědla, které sloužilo jako referenční kontrola. Všechny vzorky byly měřeny třikrát a z hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Antimikrobiální účinek byl následně převeden jako nárůst buněk v % ve srovnání s negativní/referenční kontrolou.

Tabulka 31 Antimikrobiální účinek extraktů řas a sinice

Vzorek	rozpouštědlo	EC	ML	SM	SE
chlorella	voda	–	–	–	–
	20% etoh	++++	–	+	–
spirulina	voda	+++	+++	+++	++
	20% etoh	++++	+++	+++	++++
arame	voda	–	+	–	–
	20% etoh	–	–	–	++
wakame	voda	–	–	–	–
	20% etoh	–	–	–	+
hijiki	voda	–	–	–	–
	20% etoh	–	–	–	–
kombu	voda	–	–	–	–
	20% etoh	–	–	–	++

EC	<i>Escherichia coli</i>	(–)	stejný nárůst jako referenční kontrola
ML	<i>Micrococcus luteus</i>	(+)	75–95 % kontroly
SM	<i>Serratia marcescens</i>	(++)	55–74 % kontroly
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(+++)	25–54 % kontroly
		(++++)	0–24 % kontroly

Většina extraktů řas a sinice vykazovaly téměř nulovou inhibici růstu u všech testovaných zástupců gram pozitivních a gram negativních mikroorganismů (Tabulka 31). Výjimku tvořily ethanolové extrakty kombu, wakame a arame, které vykazovaly antimikrobiální účinek vůči *S. epidermidis*, ale pouze do 20 % inhibice. Výrazný antimikrobiální účinek u všech testovaných kmenů vykazovaly extrakty vodné i ethanolové vzorku spiruliny. Ethanolové extrakty spiruliny (o koncentraci 25 mg·ml<sup>-1</sup>), vykazovaly navíc u kmenů *E. coli* a *S. epidermidis* vykazovaly i minimální inhibiční koncentraci, kdy z 99 % nedošlo k nárůstu buněk po dobu 24hodinové inkubace. U spiruliny byly sice prokázány antimikrobiální účinky vůči vybraným mikroorganismům, ale výsledky byly ovlivněny typem studované řasy nebo sinice, vybranou extrakční metodou, a tedy přítomnosti aktivních látek, anebo testované kultuře <sup>[154]</sup>. Jednou z možností, jak zvýšit antimikrobiální účinek testovaných extraktů, by bylo jejich zakoncentrování, například sušením pomocí lyofilizace.



## 4.4 CHARAKTERIZACE DALŠÍCH ROSTLINNÝCH VZORKŮ

Pro doplnění vlastního návrhu doplňku stravy byly navíc testovány následující vzorky potravin se zaměřením na obsah biologicky aktivních látek a biologický vliv. Tyto rostlinné materiály slouží pro doplnění sensorického profilu nového typu doplňku stravy (ovocné a zeleninové šťávy, sirupy, 3.2.4.7) v tekuté formě nebo případně pro navýšení antimikrobiálních vlastností výrobku (byliny a koření, čaje, 3.2.4.6). Tyto rostlinné materiály lze považovat za běžně se vyskytující potraviny v dětské výživě.

### 4.4.1 Čaje určené pro děti

Komerčně zakoupené čaje určené pro děti a kojící matky byly testovány z hlediska obsahu fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivity. Vzorky byly připraveny podobně jako v kapitole 3.3.4 s tím rozdílem, že jedna sada byla extrahována horkou vodou a louhována po dobu 5 min (doporučený postup přípravy dle výrobce). Dílčí stanovení byla měřena dle postupů v kapitolách 3.3.11, 3.3.12, 3.3.13. U extraktů připravených horkou vodou byla stanovena i antimikrobiální aktivita podle postupu v kapitole 3.3.19.3.

Tabulka 32 Charakterizace čajů z hlediska obsahu bioaktivních látek

Rostlinný extrakt		Fenolické látky	Flavonoidy	Antioxidační aktivita
		c [mg·g <sup>-1</sup> ]	c [mg·g <sup>-1</sup> ]	c [mg·g <sup>-1</sup> ]
horká dH <sub>2</sub> O 5 min	malinový čaj	294,07 ± 4,00	15,83 ± 0,63	83,52 ± 7,42
	jeřabinový čaj	300,72 ± 4,62	23,13 ± 1,46	186,36 ± 13,66
	fenyklový čaj	317,43 ± 0,50	7,40 ± 0,68	91,67 ± 17,32
dH <sub>2</sub> O 24 h, 37 °C	malinový čaj	62,37 ± 0,51	12,24 ± 0,17	74,93 ± 8,23
	jeřabinový čaj	59,17 ± 0,61	21,91 ± 0,61	86,73 ± 0,28
	fenyklový čaj	39,82 ± 0,09	2,92 ± 0,36	21,64 ± 0,32

Dle získaných výsledků (Tabulka 32) se extrakce fenolických látek horkou vodou prokázala jako účinnější až 6krát více nežli extrakce delší inkubací za zvýšené teploty. Na koncentraci flavonoidů různý postup extrakce významný vliv neměl. Antioxidační aktivita byla u extrakce horkou vodou vyšší, nejvyšší u jeřabinového čaje (186,36 ± 13,66 mg·g<sup>-1</sup>). Je nutné také podotknout vliv složení čaje na tyto výsledky. Fenyklový čaj jako jediný podle údajů na obale obsahoval pouze fenykl. Ostatní dva čaje obsahovaly ve velké míře i plod šípku, který je sám o sobě brán jako bohatý zdroj vitamnu C a antioxidantů <sup>[155],[156]</sup>.

Vzorky čajů byly testovány i pro potenciální antimikrobiální aktivitu podle postupu v kapitole 3.3.19.3. Dvojkovým ředěním byla získaná koncentrační řada vzorku, do které byla zaočkována suspenze buněk dané kultury. Dle výsledků v tabulce (Tabulka 33), že čaje viditelně ovlivňovaly růst pouze u *M. luteus*. Vyšší koncentrace čaje maliny inhibovala růst *E. coli* a fenyklu růst *S. marcescens*, a to do 55 % kontroly.

Podle získaných výsledků i přidavek ovocného čaje do pitného režimu dítěte může přispět při vhodné volbě typu čaje k pozitivnímu vlivu na zdraví dítěte.

Tabulka 33 Charakterizace čajů z hlediska antimikrobiální aktivity

Vzorek	V/V [%]	EC	SM	ML	SE
malina	3,13	–	–	++	–
	6,25	+	–	++	–
	12,50	+	–	+	–
	25,00	++	+	–	–
jeřabina	3,13	–	–	+	+
	6,25	+	–	+	+
	12,50	+	–	+	–
	25,00	+	+	+	–
fenykl	3,13	–	–	++	+
	6,25	–	–	++	+
	12,50	–	+	++	–
	25,00	–	++	++	–

EC	<i>Escherichia coli</i>	(–)	stejný nárůst jako referenční kontrola
ML	<i>Micrococcus luteus</i>	(+)	75–95 % kontroly
SM	<i>Serratia marcescens</i>	(++)	55–74 % kontroly
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(+++)	25–54 % kontroly
		(++++)	0–24 % kontroly

#### 4.4.2 Byliny a koření

Vybraní dva zástupci ze skupiny bylin a dva druhy koření byly podrobeny sledování bioaktivních látek podobně jako v předchozích kapitolách. Výběr byl podřízen častému použití uvedených druhů bylin i koření ve výrobcích pro dětskou výživu. Extrakce probíhala podle postupu v kapitole 3.3.4. Dílčí stanovení byly provedeny stejně jako v kapitole 4.4.1. Výsledné hodnoty stanovení bioaktivních látek jsou zobrazeny v Tabulka 34 a antimikrobiálního účinku v Tabulka 35.

Tabulka 34 Charakterizace bylin a koření z hlediska obsahu bioaktivních látek

Extrakt	Fenolické látky	Flavonoidy	Antioxidační aktivita	
	c [mg·g <sup>-1</sup> ]	c [mg·g <sup>-1</sup> ]	c [mg·g <sup>-1</sup> ]	
vodné	chmel otáčivý	0,62 ± 0,04	0,12 ± 0,63	1,86 ± 7,42
	heřmánek pravý	15,67 ± 0,01	23,13 ± 1,46	4,72 ± 13,66
	skořice	50,33 ± 0,08	24,36 ± 0,12	24,36 ± 0,12
	hřebíček	36,50 ± 3,70	10,06 ± 3,10	31,30 ± 4,60
ethanolové	chmel otáčivý	1,7 ± 0,20	0,14 ± 0,04	1,54 ± 8,23
	heřmánek pravý	38,6 ± 0,02	21,91 ± 0,61	5,04 ± 0,28
	skořice	52,14 ± 0,02	47,52 ± 0,14	47,52 ± 0,14
	hřebíček	19,78 ± 1,32	7,26 ± 0,98	12,14 ± 1,64

Získané hodnoty fenolických látek byly u většiny vzorek v rámci extrakce vodou nebo 20% ethanolem takřka podobné. Nejvyšší naměřené hodnoty byly zaznamenány u vzorku skořice, a to při obou typech extrakce. Nejvyšší hodnoty fenolických látek vykazoval její vodný extrakt,  $50,33 \pm 0,08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , flavonoidů a antioxidační aktivitu pak ethanolový extrakt,  $47,52 \pm 0,14 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  a  $47,52 \pm 0,14 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ .

U chmele byla naměřena velmi nízká hodnota fenolických látek. U tohoto vzorku by byla vhodná změna způsobu extrakce, a to horkou vodou, aby došlo k narušení rostlinného pletiva šišťice. Chmel přirozeně obsahuje fenolické látky, a dokonce vykazuje antimikrobiální účinek převážně vůči grampozitivním bakteriím [154].

U získaných extraktů byl sledován i potenciální antimikrobiální účinek. Vodné extrakty všech zkoumaných látek vykazovaly určitou inhibici růstu grampozitivní bakterie *M. luteus*, nejvíce pak koncentrované vzorky skořice a hřebíčku, kdy byl růst inhibován převážně do 55 % kontroly. Nejvyšší testované koncentrace extraktů vykazovaly i inhibici růstu u *E. coli*. Inhibice růstu *S. marcescens* byla pozorována převážně u vzorku heřmánku a skořice, ale obecně byla míra inhibice velmi malá.

Tabulka 35 Charakterizace bylin a koření z hlediska antimikrobiální aktivity

Vzorek	V/V [%]	EC	SM	ML	EC	SM	ML
		vodné extrakty			ethanolové extrakty		
chmel	3,13	-	-	++	-	-	-
	6,25	+	-	++	-	-	-
	12,50	+	-	+	+	-	-
	25,00	++	-	-	-	+	+
heřmánek	3,13	-	+	-	-	++	-
	6,25	-	+	-	+	++	-
	12,50	+	+	+	++	+++	-
	25,00	++	++	++	+	+++	+
skořice	3,13	-	+	++	-	-	-
	6,25	-	+	++	-	+	-
	12,50	-	+	++	-	+	+
	25,00	+	++	++	+	+	++
hřebíček	3,13	-	+	+	-	-	+
	6,25	-	+	++	-	-	+
	12,50	-	+	++	+	-	++
	25,00	+++	-	+++	++	-	+++

EC	<i>Escherichia coli</i>	(-)	stejný nárůst jako referenční kontrola
ML	<i>Micrococcus luteus</i>	(+)	75–95 % kontroly
SM	<i>Serratia marcescens</i>	(++)	55–74 % kontroly
		(+++)	25–54 % kontroly
		(++++)	0–24 % kontroly

#### 4.4.3 Šťávy a sirupy

V ovocných a zeleninových šťávách připravených podle postupu 3.3.4 byla stanovena antioxidační aktivita podle postupu v kapitole 3.3.13 a vitamin C pomocí postupu v kapitole 3.3.17. Všechny vzorky byly měřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce (Tabulka 36).

U připravených šťáv bylo nejvíce vitaminu C staveno u vzorku zelí ( $0,430 \pm 0,018 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). U hrušky a pomela mohlo docházet oxidací k rychlé přeměně vitaminu C. Obecně platí, že v citrusových plodech se nachází více vitaminu C než ve sladkých plodech. Překvapující ovšem byla v porovnání stanovena koncentrace vitaminu C u sirupů. U některých vzorků byl výrobcem deklarovaný vyšší obsah vitaminu C, který se potvrdil. Nejvyšší koncentrace vykazoval pomerančový sirup ( $1,242 \pm 0,100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a lesní směs ( $0,740 \pm 0,005 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). K velkému překvapení vyšší antioxidační aktivitu vykazovaly sirupy oproti šťávám. V sirupech se mohly nacházet zakonzentrované případné interferující látky, také mohlo docházet k urité fortifikaci v průběhu technologického zpracování sirupů.

Vzorek zelné šťávy vykazoval nejnižší hodnotu pH, a to 3,57. Z tohoto důvodu byla u tohoto vzorku sledována přítomnost i jiných kyselin. Kromě stanoveného vitaminu C vzorek obsahoval i vysoké množství kyseliny octové o koncentraci  $145,53 \pm 0,42 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a dokonce i kyseliny mléčné o koncentraci  $8,22 \pm 0,41 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Tabulka 36 Charakterizace sirupů a šťáv z hlediska obsahu antioxidačních látek

Vzorek	Vitamin C	Antioxidační aktivita	
	c [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	c [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	
sirupy	pomeranč	$1,242 \pm 0,100$	$1,346 \pm 0,153$
	lesní směs	$0,740 \pm 0,005$	$0,792 \pm 0,030$
	ananas	$0,211 \pm 0,050$	$0,121 \pm 0,026$
	citron	$0,250 \pm 0,021$	$0,077 \pm 0,003$
	bezinka	$0,310 \pm 0,030$	$0,248 \pm 0,040$
šťávy	hruška	$0,008 \pm 0,002$	$0,893 \pm 0,002$
	pomelo	$0,077 \pm 0,003$	$0,530 \pm 0,046$
	ananas	$0,140 \pm 0,005$	$0,655 \pm 0,016$
	zelí	$0,430 \pm 0,018$	$0,820 \pm 0,020$

## 4.5 TESTY CYTOTOXICITY

V rámci této kapitoly byly vybrány vodné extrakty rostlinných prášků a řas a sinic s ohledem na obsah fenolických látek analyzovány z hlediska jejich vlivu na metabolickou aktivitu lidských buněčných linií. Byly vybrány dva typy buněčných linií, a to lidské keratinocyty HaCat a buňky adenokarcinomu tlustého střeva Caco-2. Obě tyto linie se hojně využívají jako modelové linie, pro zkoumání bezpečnosti vzorků určených do potravin nebo používaných pro kosmetické účely.

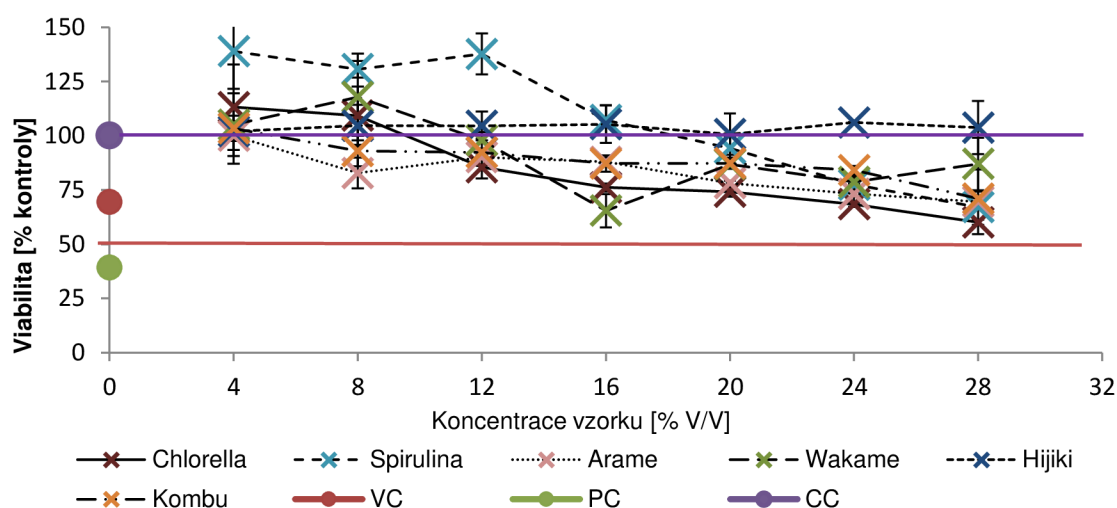
### 4.5.1 Porovnání cytotoxicity vzorků řas a sinice

Testy cytotoxicity vodných extraktů všech zkoumaných řas a sinice byly pro porovnání ovlivnění metabolické aktivity buněk prováděny paralelně na dvou různých liniích, a to na lidských imortalizovaných keratinocytech HaCaT (3.3.20.1) a buňkách adenokarcinomu tlustého střeva Caco-2 (3.3.20.2). Připravené extrakty byly sterilovány přefiltrováním přes filtr o rozměrech pórů  $0,2 \mu\text{m}$ .

Následně byly naředěny příslušným kultivačním médiem na celkový objem 100  $\mu$ l a přidány k buňkám podle postupu v kapitole 3.3.20.3. Toxický účinek je pak vyjádřen jako pokles metabolické aktivity buněk po kultivaci se zkoumaným vzorkem ve srovnání s kontrolou. Všechny vzorky byly měřeny třikrát, ze získaných dat byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Maximální teoretická koncentrace fenolických sloučenin na navážku daného vzorku při maximální objemové koncentraci je uvedena v **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..**

Tabulka 37 Objemová koncentrační řada a maximální koncentrace vzorků

Zvolené obj. koncentrace vzorků [%]	4	8	12	16	20	24	28
<b>Max. teoretická koncentrace fenolických sloučenin [<math>\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}</math>]</b>							
<b>chlorella</b>	5						
<b>wakame</b>			1				
<b>matcha</b>							16
<b>spirulina</b>	18			1			
<b>hijiki</b>							7
<b>arame</b>	7			2			
							2
							2
							2
							2

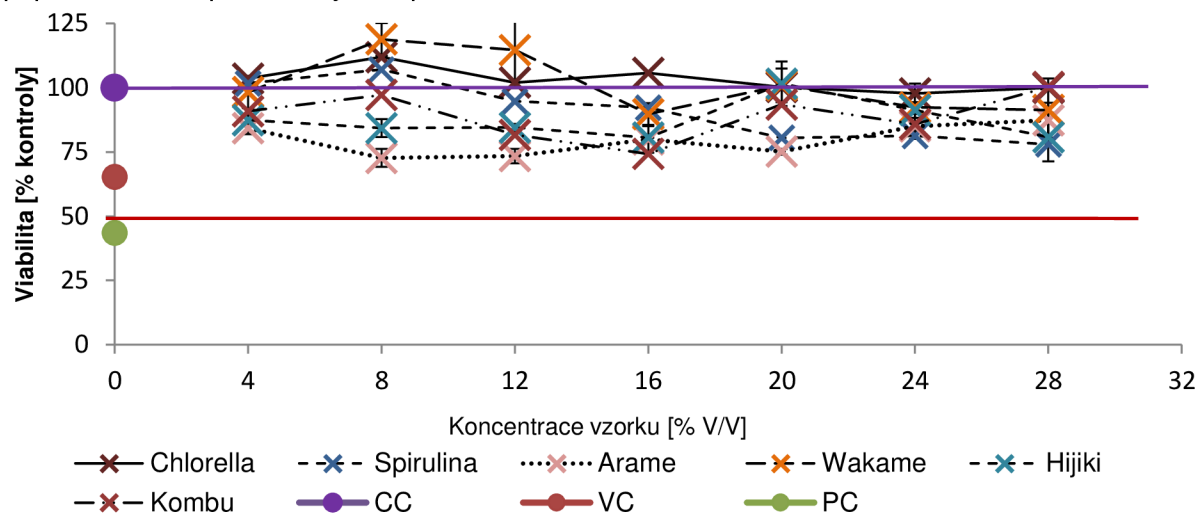


Obrázek 19 Viabilita HaCaT buněk po expozici vodných extraktů řas a sinice na pasáži 15 stanovené pomocí MTT testu

U obou buněčných linií nedošlo po expozici extraktů řas a sinice k významnému vlivu na metabolickou aktivitu v porovnání s kontrolou. U nižších objemových koncentrací testovaných extraktů, a to především u chlorelly, spiruliny a wakame v médiu, byla navíc pozorována podpora metabolické aktivity buněk. Nejvýrazněji u extraktů spiruliny od objemové koncentrace 4 % do 16 %. S rostoucí koncentrací extraktů ovšem viabilita buněk klesala v porovnání s buněčnou kontrolou. U buněčné linie HaCaT (3.3.20.1) bylo pozorováno snížení viability k hranici 60 % u nejvyšších objemových koncentrací extraktů chlorelly, spiruliny a wakame. I přes snížení viability buněk nedošlo k překročení hranice 50 %, která odpovídá cytotoxickému účinku.

U buněčné linie Caco-2 (3.3.20.2) došlo ke snížení viability buněk, avšak ne tak výrazně jako tomu bylo u linie HaCaT. Viabilita se držela nad hranicí 70 %, přičemž v celé koncentrační řadě se hodnoty viability pohybovaly v podobných hodnotách jako kontrola buněk. V obou případech se kontrola

rozpouštědla pohybovala okolo 65 %. Lze tedy konstatovat, že ovlivnění viability mohlo být způsobeno především zvyšujícím se množstvím rozpouštědla v médiu, které bylo v kontaktu s buňkami za kultivačních podmínek po dobu 24 hodin. Všechny testované vzorky lze pomocí MTT testu na dvou buněčných liniích považovat za bezpečné a lze je tedy považovat za vhodné jak do kosmetických přípravků, tak do potravinových doplňků.



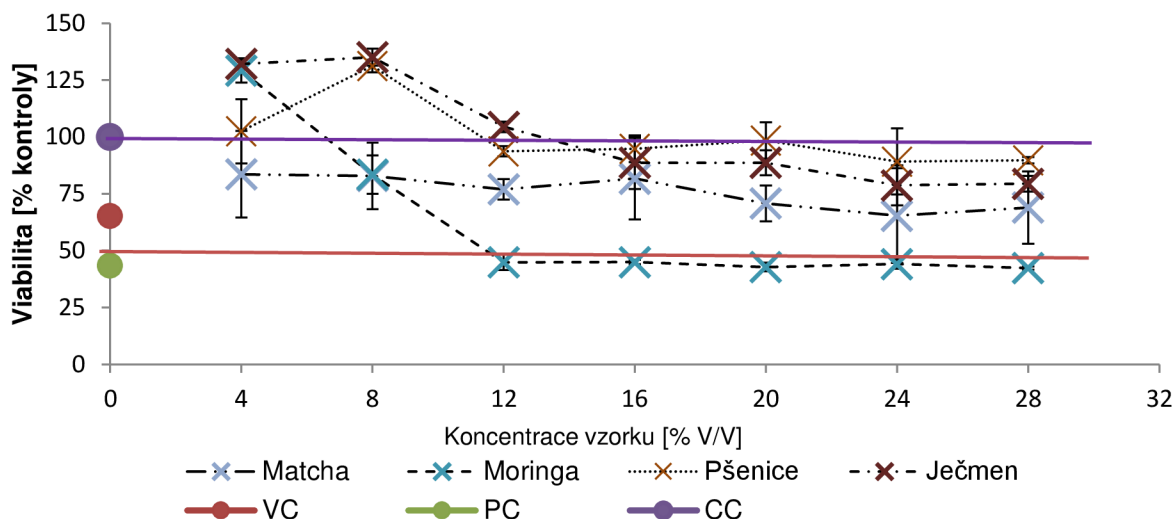
Obrázek 20 Viability Caco-2 buněk po expozici vodných extraktů řas a sinice na pasáži 57 stanovené pomocí MTT testu

#### 4.5.2 Porovnání cytotoxicity vzorků rostlinných prášků

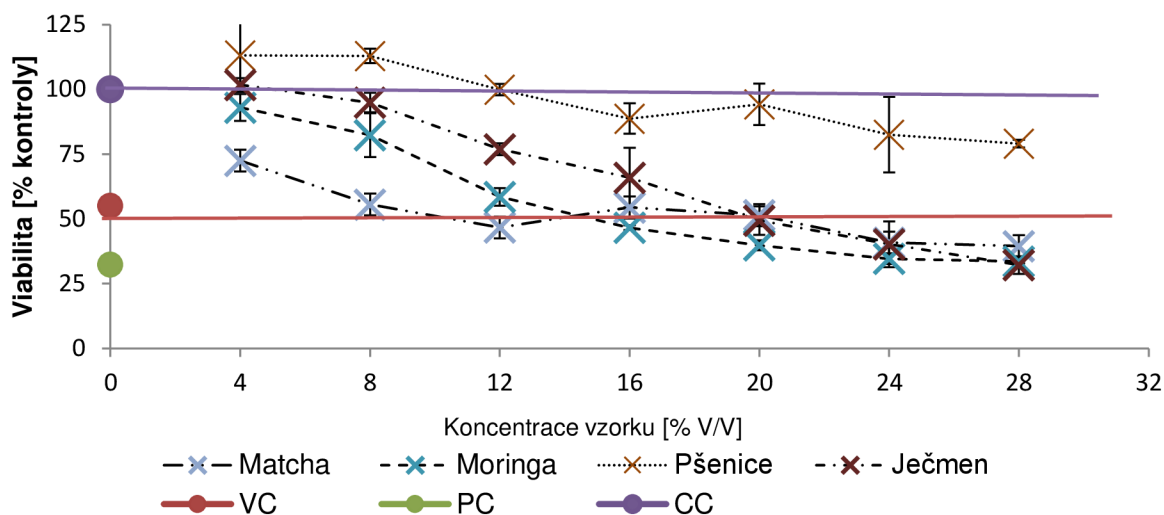
Vodné extrakty rostlinných prášků byly pro testování cytotoxicity pomocí MTT testu připraveny pro testování stejně jako vzorky v kapitole 4.5.1. Připravené extrakty byly opět testovány na buněčných liniích HaCaT a Caco-2. Všechny vzorky byly měřeny třikrát, ze získaných dat byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Finální hmotnostní koncentrace podle naváжки suchého prášku v jednotlivých objemových koncentracích extraktů jsou uvedeny v tabulce (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).

Testování na buněčné linii HaCaT prokázalo, že vzorky nevykazovaly významný vliv na metabolickou aktivitu buněk (Obrázek 21). Vzorky nepůsobily toxicky až na výjimku vzorku moringy, který od objemové koncentrace 12 % překročil a pohyboval se na hranici 50 % viability buněk v porovnání s kontrolou. Ve více studiích byl potvrzen vliv extraktů moringy na metabolickou aktivitu lidských buněk, a to i u jiných typů buněk. Navíc podporuje i jejich apoptózu <sup>[158],[159]</sup>. Vzorky ječmene a pšenice nesnižovaly viabilitu buněk v celé koncentrační zkoumané řadě, naopak ji v koncentracích 4 a 8 % podporovaly a zvyšovaly.

Po expozici vzorků na buněčné linii Caco-2 byla pozorována snižující se viabilita buněk se zvyšující se objemovou koncentrací vzorků u ječmene, matcha a moringy (Obrázek 22). Nejvýraznější vliv na aktivitu vykazoval extrakt moringy, a to již od koncentrace 16 %.



Obrázek 21 Viabilita HaCaT buněk po expozici vodnými sterilními rostlinnými prášky na pasáži 17 stanovení pomocí MTT



Obrázek 22 Viabilita Caco-2 buněk po expozici vodnými sterilními rostlinnými prášky na pasáži 58 stanovení pomocí MTT

Pro doplnění a srovnání toxického účinku vodných extraktů rostlinných prášků matcha, moringa a ječmen na buněčnou linii Caco-2, u kterých byl pozorován toxický účinek od koncentrace 12 % a výše, byl využit další typ testu, tzv. LDH test (laktátdehydrogenázový test) podle postupu v kapitole 3.3.20.4. Tento test se využívá pro kontrolu toxického účinku zkoumaných extraktů. LDH test mohl být proveden pouze po testování na buněčné linii HaCat, u které tak byla sledována intaktnost plazmatické membrány. Kolorimetrickou metodou byla sledována aktivita cytosolického enzymu laktátdehydrogenázy uvolněného do kultivačního média vlivem expozice látek s toxickým účinkem. Postup stanovení je uveden v kapitole 3.3.20.4. Všechny vzorky byly prověřeny nejméně třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledky jsou uvedeny v  $U \cdot ml^{-1}$  (Tabulka 38).

Z výsledků LDH testu vyplývá, že výsledné hodnoty aktivity enzymu u žádného ze vzorků nepřekročily hodnoty kontroly rozpouštědla ani pozitivní kontroly. Z toho lze usoudit, že negativní vliv

na intaktnost membrány nevykazoval ani jeden zkoumaný vzorek. Zvolené objemové koncentrace testovaných extraktů tak lze považovat za bezpečné.

Tabulka 38 Výsledky LDH testu pro vodné roztoky rostlinných prášků

<b>Obj. koncentrace</b>	<b>Pšenice</b>	<b>Ječmen</b>	<b>Matcha</b>	<b>Moringa</b>
<b>[% V/V]</b>	<b>[U·ml<sup>-1</sup>]</b>			
<b>CC</b>	86,89 ± 2,99	86,89 ± 2,99	67,45 ± 1,51	67,45 ± 1,51
<b>4</b>	98,70 ± 2,60	120,20 ± 0,60	45,20 ± 1,86	48,83 ± 0,15
<b>8</b>	73,20 ± 0,50	21,20 ± 10,70	61,75 ± 2,27	51,83 ± 2,03
<b>12</b>	144,70 ± 0,90	102,70 ± 1,60	41,49 ± 1,65	150,27 ± 1,65
<b>16</b>	165,20 ± 1,30	162,70 ± 5,30	55,57 ± 0,59	161,09 ± 3,19
<b>20</b>	128,70 ± 3,30	157,70 ± 1,90	82,68 ± 3,80	165,84 ± 3,81
<b>24</b>	57,70 ± 4,60	93,70 ± 5,30	85,01 ± 3,55	174,68 ± 5,23
<b>28</b>	45,70 ± 9,50	69,20 ± 1,90	59,27 ± 1,81	157,42 ± 1,83
<b>VC</b>	348,49 ± 6,14	348,49 ± 6,14	141,76 ± 2,99	141,76 ± 2,99
<b>PC</b>	374,28 ± 5,40	374,28 ± 5,40	261,54 ± 0,98	261,54 ± 0,98

#### 4.5.3 Stanovení genotoxického účinku na modelovém organismu

Genotoxický efekt připravených extraktů zkoumaných rostlinných materiálů byl proveden pomocí komerčního kitu EBPI SOS Chromotest™ s využitím modelového organismu geneticky modifikované bakterie *E. coli* podle postupu v kapitole 3.3.21. Roztok standardního mutagenu 4-NQO v 10% DMSO v koncentračním rozmezí 0,08–10 µg·ml<sup>-1</sup>. Negativní kontrolou byla použita rozpouštědla, voda.

U všech vzorků, které byly testovány na bezpečnost pomocí MTT testu, byl hodnocen genotoxický potenciál jako doplňkový biologický test. Pro vyhodnocení genotoxického potenciálu testované látky slouží SOS-indukční faktor (SOSIF). Hodnoty genotoxického potenciálu byly vypočítány podle následujícího vzorce:

$$\text{SOSIF} = \frac{(OD_{630} \text{ vzorek}) / (OD_{405} \text{ vzorek})}{(OD_{630} \text{ neg.kontrola}) / (OD_{405} \text{ neg.kontrola})} \quad (22)$$

Všechny připravené a testované extrakty byly podle návodu dostupného ke kitu měřeny ve čtyřech různých koncentracích vzniklých dvojkovým ředěním původní koncentrace extraktů připravených pro testy cytotoxicity (MTT test). Vzorky makrořas byly testovány v objemových koncentracích 50; 25; 12,5 a 6,3 %.

Tabulka 39 Tabulkové hodnoty obecné klasifikace genotoxického účinku

<b>SOSIF &lt; 1,5</b>	negenotoxický potenciál
<b>1,5 &lt; SOSIF &lt; 2,0</b>	neprůkazně toxický
<b>SOSIF &gt; 2,0</b>	genotoxický a vhodný pro další testování

Všechny testované vzorky vykazovaly hodnotu nižší než 1,5 dle tabelovaných hodnot uvedených v tabulce (Všechny připravené a testované extrakty byly podle návodu dostupného ke kitu měřeny ve čtyřech různých koncentracích vzniklých dvojkovým ředěním původní koncentrace extraktů připravených pro testy cytotoxicity (MTT test). Vzorky makrořas byly testovány v objemových koncentracích 50; 25; 12,5 a 6,3 %.

Tabulka 39) a mohou být tedy považovány za negenotoxické.



## 4.6 ENKAPSULACE

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

### 4.6.1 Enkapsulace vybraných extraktů do liposomů

Extrakty obsahující fenolické látky a antioxidanty, které mohou potenciálně ovlivňovat střevní mikroflóru, byly nejprve enkapsulovány do liposomů ze sójového lecithinu. Následně byly vybrány dvě skupiny rostlinných extraktů, které byly enkapsulovány do liposomů z lecithinu různého původu, a to kromě sójového, tak slunečnicového a vaječného. Toto srovnání bylo cíleno na porovnání těchto liposomů z hlediska fyzikálně-chemických vlastností a využití liposomů pro cílený transport aktivních látek do tlustého střeva.

#### 4.6.1.1 Enkapsulace extraktů řas a sinice do liposomů

Extrakty řas a sinice připravené dle postupu v kapitole 3.3.4, byly enkapsulovány do liposomů tvořených sójovým lecithinem a cholesterolem a připravených podle postupu v kapitole 3.3.22.1. Vzniklé liposomy byly následně charakterizovány pomocí přístroje ZetaSizer metodou DLS, a to z hlediska distribuce velikosti částic, polydisperzity a zeta potenciálu v rámci jejich elektrokinetického potenciálu (3.3.22.2). Následně byla měřena i enkapsulační účinnost stanovením volných aktivních látek (3.3.22.3). Všechny vzorky byly měřeny třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

Dle výsledků uvedených v tabulce (Tabulka 40) můžeme u distribuce velikosti částic a polydisperzity vidět vliv rozpouštědla, kterým byly aktivní látky extrahovány, na fyzikální vlastnosti částic. Enkapsulované vodné extrakty vykazovaly velikost částic od 340–370 nm s výjimkou extraktu hijiki, jejichž průměrná velikost byla  $275,07 \pm 10,36$  nm. Hodnota polydisperzity překračující hodnotu 0,7 odpovídá o vysoké rozmanitosti distribuce velikosti částic a takové vzorky nejsou vhodné k měření vlastností částic pomocí DLS [160]. Polydisperzita se u všech připravených částic v této práci pohybovala do hodnoty 0,4 a lze tedy vytvořené částice považovat za prakticky uniformní.

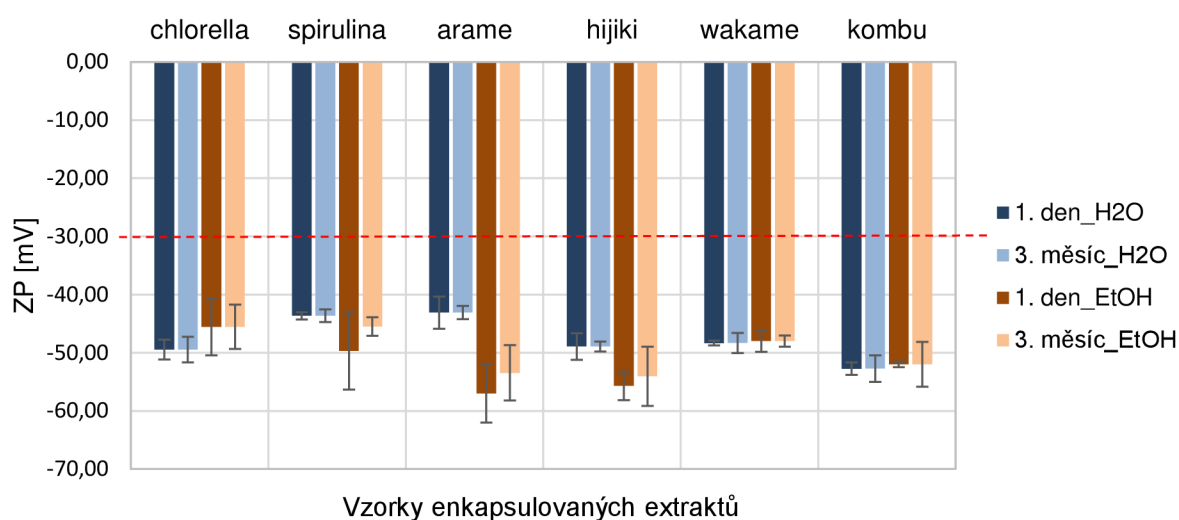
Částice s enkapsulovanými ethanolovými extrakty vykazovaly menší velikost pohybující se od 255–310 nm s polydisperzitou kolem 0,3. I tyto částice můžeme řadit mezi uniformní nanočástice.

Všechny měřené vzorky navíc vykazovaly zeta potenciál nižší než hodnotu  $-30$  mV [161] (Obrázek 23). V případě spiruliny, hijiki a arame byl u liposomů s enkapsulovanými ethanolovým extraktem naměřen i vyšší zeta potenciál nežli s nekapsulovaným vodným extraktem. V ostatních případech byly hodnoty zeta potenciálu velmi podobné. Z grafu lze také vyčíst, že po tříměsíčním skladování za nižší teploty  $8$  °C nedošlo k viditelné změně zeta potenciálu. Částice byly i v průběhu skladování stále stabilní.

Stabilita liposomů byla v časovém úseku 3 měsíců sledována i z hlediska uvolněných aktivních látek. Výsledky uvedené v tabulce (Tabulka 41) vypovídají o vysoké stabilitě částic s enkapsulovanými fenolickými látkami u obou druhů extraktů. Částice navíc vykazovaly i antioxidační aktivitu, která ale po uplynutí 3 měsíců klesla. Antioxidanty, které nebyly plně inkorporovány do jádra liposomů, ale zůstaly na povrchu liposomu, tak zřejmě ztratily svůj antioxidační účinek.

Tabulka 40 Fyzikální charakterizace připravených liposomů s extrakty řas a sinice

Aktivní složka	vodné extrakty		ethanolové extrakty	
	Velikost [nm]	PDI [/]	Velikost [nm]	PDI [/]
chlorella	367,50 ± 5,65	0,325 ± 0,020	265,57 ± 21,47	0,323 ± 0,039
spirulina	356,83 ± 7,01	0,257 ± 2,661	310,90 ± 4,55	0,412 ± 0,023
arame	345,60 ± 2,49	0,238 ± 0,017	301,13 ± 23,74	0,340 ± 0,057
wakame	344,70 ± 4,41	0,390 ± 0,018	269,03 ± 1,92	0,330 ± 0,009
hijiki	275,07 ± 10,36	0,338 ± 0,047	269,67 ± 7,03	0,303 ± 0,009
kombu	345,27 ± 8,90	0,387 ± 0,012	255,40 ± 1,82	0,325 ± 0,029



Obrázek 23 Dlouhodobá stabilita připravených liposomů ze sójového lecithinu s enkapsulovanými extrakty extrahovanými různými GRAS rozpouštědly (voda, 20% ethanol)

Tabulka 41 Dlouhodobá stabilita z hlediska enkapsulační účinnosti

Vzorek	Fenolické látky		Antioxidační aktivita		
	EU [%]		EU [%]		
	1. den	3. měsíc	1. den	3. měsíc	
vodné	chlorella	99,77 ± 2,66	99,96 ± 3,49	94,52 ± 4,01	46,54 ± 5,38
	spirulina	82,27 ± 5,33	81,26 ± 1,29	98,61 ± 3,40	75,84 ± 5,14
	arame	90,66 ± 3,59	94,54 ± 0,94	94,76 ± 4,82	49,63 ± 8,23
	wakame	80,81 ± 2,91	81,73 ± 2,51	97,15 ± 3,50	92,05 ± 4,88
	hijiki	95,77 ± 1,94	93,33 ± 2,28	83,04 ± 6,17	67,74 ± 6,82
	kombu	81,82 ± 5,06	63,35 ± 0,48	90,32 ± 2,72	79,57 ± 4,73
ethanolové	chlorella	93,17 ± 2,82	87,95 ± 3,08	77,88 ± 3,45	75,96 ± 3,08
	spirulina	99,68 ± 1,18	93,52 ± 0,31	79,11 ± 3,83	69,19 ± 2,28
	arame	94,95 ± 0,30	95,39 ± 1,48	71,28 ± 3,45	64,76 ± 5,12
	wakame	70,45 ± 7,00	67,68 ± 1,80	92,54 ± 2,18	86,36 ± 0,48
	hijiki	99,88 ± 9,62	98,16 ± 1,57	94,51 ± 3,03	90,74 ± 4,82
	kombu	63,87 ± 1,48	54,79 ± 2,28	92,90 ± 2,49	74,93 ± 4,67

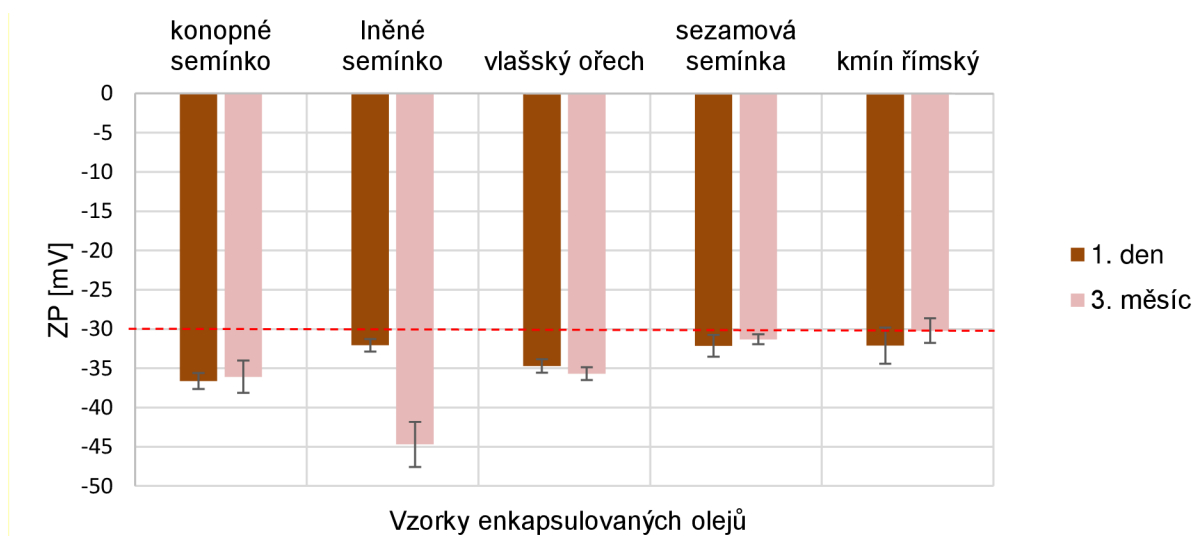
#### 4.6.1.2 *Enkapsulace extrahovaných olejů do liposomů*

Lipidické extrakty byly také enkapsulovány do liposomů připravených ze sójového lecithinu a cholesterolu podle postupu v kapitole 3.3.22.1. Měření fyzikálních vlastností proběhly stejně jako v předchozí kapitole 4.6.1.2.

V následující tabulce (Tabulka 42) jsou zobrazeny výsledky distribuce velikosti a polydisperzity částic. Ze všech připravených extraktů vykazovaly lipidické extrakty nejmenší velikosti částic, a to v rozmezí 210–260 nm. Naměřená polydisperzita byla také nízká – kolem 0,3, pouze v případě sezamových semínek a kmínu římského se blížila k hraniční hodnotě 0,7. To mohlo být způsobené špatným rozpouštěním oleje, který vykazoval tuhou konzistenci danou zastoupením nasycených mastných kyselin. Špatná polydisperzita a agregace částic vzorků s enkapsulovaným olejem ze sezamových semínek a kmínu římského se projevila také v rámci stability měřením zeta potenciálu. Hodnota se pohybovala kolem hranice nestability –30 mV (Obrázek 24).

Tabulka 42 Fyzikální charakterizace připravených liposomů ze sójového lecithinu s enkapsulovanou lipidickou složkou

Aktivní složka	Velikost [nm]	PDI [/]
konopné semínko	248,10 ± 2,66	0,325 ± 0,020
lněné semínko	237,17 ± 3,00	0,257 ± 2,661
vlašský ořech	210,63 ± 0,60	0,238 ± 0,017
sezamová semínka	241,7 ± 17,70	0,702 ± 0,078
kmín římský	253,07 ± 6,67	0,531 ± 0,053



Obrázek 24 Dlouhodobá stabilita připravených liposomů ze sójového lecithinu s enkapsulovanou lipidickou složkou

Enkapsulační účinnost (Tabulka 43 Dlouhodobá stabilita liposomů s extrahovaným olejem z hlediska enkapsulační účinnosti Tabulka 43) nebyla po změření fyzikálních vlastností částic nijak překvapující. Nejmenší enkapsulační účinnost fenolických látek byla stanovena opět u vzorků s enkapsulovaným extraktem sezamového semínka a kmínu římského. I když u všech ostatních vzorků došlo ke stabilizaci částic v době skladování, u těchto dvou vzorků klesla enkapsulační účinnost nejvíce, a to až na hodnotu 41,93 ± 3,51 % u sezamového semínka. Z tohoto důvodu byla změřena i

bezpečnost těchto částic pomocí MTT stanovení na buněčné linii Caco-2 (viz Příloha 4). Vzorky liposomů s enkapsulovanými extrakty do 8 % objemové koncentrace snižovaly viabilitu buněk do hraniční 50% viability kontroly, poté došlo k rapidnímu ovlivnění metabolické aktivity. Tyto liposomy nebyly tedy vhodně připraveny, což mělo za následek jejich špatnou kvalitu.

Liposomy ale i po třech měsících vykazovaly poměrně vysoký antioxidační účinek, který sice klesl, ale pohyboval se stále v rozmezí 60–80 %. Nejstabilnějšími liposomy se jevíly vzorky s lipidickým extraktem lněného semínka.

Tabulka 43 Dlouhodobá stabilita liposomů s extrahovaným olejem z hlediska enkapsulační účinnosti

Vzorek	Fenolické látky		Antioxidační aktivita	
	EU [%]		EU [%]	
	1. den	3. měsíc	1. den	3. měsíc
konopné semínko	80,95 ± 2,28	84,59 ± 2,60	99,63 ± 4,18	79,32 ± 3,07
lněné semínko	79,74 ± 0,48	94,10 ± 1,83	99,81 ± 6,83	80,14 ± 2,26
vlašský ořech	85,36 ± 3,08	75,28 ± 7,91	99,62 ± 1,40	71,26 ± 1,56
sezamová semínka	56,00 ± 3,51	41,93 ± 4,17	94,51 ± 4,39	59,47 ± 2,59
kmín římský	75,31 ± 7,31	65,83 ± 2,56	95,73 ± 3,56	62,73 ± 2,57

#### 4.6.1.3 Enkapsulace vodných extraktů rostlinných prášků do liposomů s různým lecithinem

Vodné extrakty obsahující biologicky aktivní látky rostlinných prášků byly enkapsulovány do liposomů za účelem stabilizace a prodloužení účinku. Tato část enkapsulačních experimentů byla navíc zaměřena na přípravu a charakterizaci liposomů z lecithinu získaného ze tří různých zdrojů, a to slunečnice, sóji a vejce. Důvodem bylo srovnání vlastností liposomů připravených z téhož materiálu (lecithin) získaného z různých přírodních zdrojů. Liposomy byly připraveny a charakterizovány stejně jako v předchozí kapitole 4.6.1.2.

V tabulce (Tabulka 44) lze pozorovat, že průměrná velikost částic se pohybuje převážně v rozmezí 207–310 nm, s výjimkou moringy a zeleného ječmene enkapsulovaných do liposomů s vaječným lecithinem (vzor grafického znázornění distribuce částic je uveden v Příloha 5). Obecně lze z výsledků konstatovat, že liposomy složené ze sójového a slunečnicového lecithinu vykazovaly nižší distribuci velikosti částic nežli liposomy obsahující vaječný lecithin. U obou vzorků moringy a ječmene enkapsulovaných do liposomů z vaječného liposomu byla naměřena také vyšší polydisperzita, ale stále pod hranicí 0,7. Pravděpodobně mohlo docházet k agregaci částic, které mohou být stále brány jako relativně uniformní.

Kromě velikosti a polydisperzity byla u částic zkoumána i dlouhodobá stabilita měřením zetapotenciálu a enkapsulační účinnosti. Výsledky zobrazuje grafické znázornění (Obrázek 25). Z grafu lze nejprve porovnat připravené částice bez enkapsulované aktivní látky, aby bylo patrné, jak použité materiály ovlivňují jejich fyzikální vlastnosti. Nejstabilnějšími částicemi v čase 0 byly vyhodnoceny liposomy ze slunečnicového lecithinu, jelikož jako jediné překročily hranici nestability – 30 mV, a to na hodnotu  $-37,2 \pm 4,3$  mV. Hodnotu nestability nepřekročila ani po prvním týdnu skladování s hodnotou zeta potenciálu  $-31,8 \pm 0,9$  mV.

Z výsledků lze však vyvodit, že přídavek aktivních látek má na liposomy stabilizační vliv. Enkapsulováním extraktů s aktivními látkami došlo ke stabilizaci částic nejen v čase 0, ale i v rámci

celého časového úseku skladování. Extrakty ječmene, pšenice a matcha nejvíce podpořily stabilitu připravených liposomů obsahujících slunečnicový nebo sójový lecithin. Všechny tyto zmíněné liposomy vykazovaly zeta potenciál nižší jak  $-35$  mV, liposomy s enkapsulovaným extraktem ječmene dokonce po třech měsících dosáhly hodnoty zeta potenciálu  $-44,7 \pm 0,79$  mV.

Tabulka 44 Fyzikální charakterizace připravených liposomových částic s lecithinem různého původu

	Vzorky liposomů	Velikost [nm]	PDI [/]
Sl_liposomy	prázdné	$246,76 \pm 9,62$	$0,327 \pm 0,071$
	matcha	$210,33 \pm 5,65$	$0,238 \pm 0,011$
	moringa	$247,73 \pm 1,39$	$0,256 \pm 0,006$
	mladá pšenice	$256,33 \pm 2,37$	$0,275 \pm 0,000$
	mladý ječmen	$223,47 \pm 2,16$	$0,233 \pm 0,008$
V_liposomy	prázdné	$309,51 \pm 2,83$	$0,376 \pm 0,021$
	matcha	$206,60 \pm 2,12$	$0,182 \pm 0,026$
	moringa	$852,00 \pm 12,14$	$0,453 \pm 0,016$
	mladá pšenice	$253,67 \pm 2,12$	$0,269 \pm 0,010$
	mladý ječmen	$414,57 \pm 21,73$	$0,432 \pm 0,050$
So_liposomy	prázdné	$246,20 \pm 6,90$	$0,262 \pm 0,007$
	matcha	$245,93 \pm 5,54$	$0,415 \pm 0,003$
	moringa	$240,57 \pm 0,69$	$0,367 \pm 0,046$
	mladá pšenice	$207,93 \pm 3,55$	$0,314 \pm 0,029$
	mladý ječmen	$213,60 \pm 0,65$	$0,300 \pm 0,028$

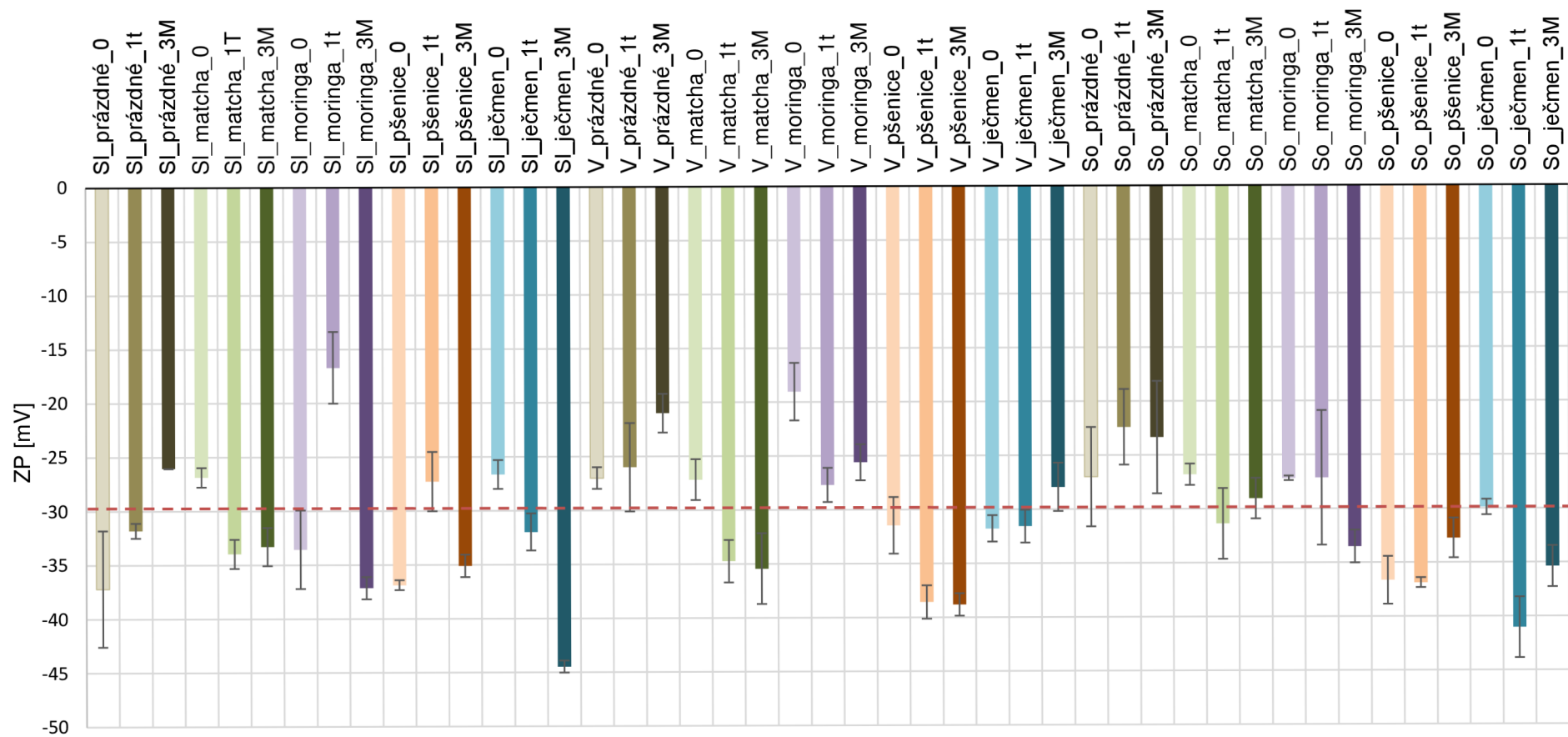
Sl\_ ..... liposomy ze slunečnicového lecithinu

V\_ ..... liposomy z vaječného lecithinu

So\_ ..... liposomy ze sójového lecithinu

V tabulce (Tabulka 45) jsou zobrazeny výsledky enkapsulační účinnosti jednotlivých liposomů s enkapsulovanými vodnými extrakty po dobu tříměsíčního skladování za snížené teploty  $8$  °C v prostředí vody. Tyto výsledky potvrzují průběh stabilizace liposomů, kdy došlo ke zvýšení enkapsulační účinnosti fenolických sloučenin, která se po celou dobu držela nad hodnotami 75 %. Vzorek matcha vykazoval nejvyšší enkapsulační účinnost, a to u všech liposomů různých typů s hodnotou nad 93 %.

Z výsledků dlouhodobé stability liposomů skládající se z tří různých typů lecithinu lze vyvodit, že liposomy z vaječného lecithinu v kombinaci s enkapsulovanými vodnými extrakty rostlinných prášků nevykazovaly tak vysokou stabilitu a uniformnost částic jako u lecithinu ze sóje nebo slunečnice. Významnou roli hraje přesná struktura a čistota lecithinu, který byl extrahován z příslušných zdrojů. Nevýhodou vaječného lecithinu je také jeho živočišný původ a produkty obsahující právě vaječný lecithin by tak nemohly dostat označení „vegan“<sup>[161],[163]</sup>. Sójový a slunečnicový lecithin je tedy vhodnou složkou pro přípravu liposomů vykazující dobrou stabilitu a uniformnost.



Liposomy s enkapsulovanými složkami

Obrázek 25 Dlouhodobá stabilita (okamžitá\_0, týdenní\_1t, 3měsíční\_3M) připravených liposomů s enkapsulovaným vodným extraktem rostlinného materiálu z hlediska zeta potenciálu

Tabulka 45 Enkapsulační účinnost připravených liposomů tvořených lecithinem z různého zdroje původu v průběhu 3 měsíců

Vzorek liposomů	Fenolické látky	Antioxidační aktivita	Vzorek liposomů	Fenolické látky	Antioxidační aktivita	Vzorek liposomů	Fenolické látky	Antioxidační aktivita
	EU [%]			EU [%]			EU [%]	
SI_matcha_0	95,08 ± 6,84	97,16 ± 0,30	V_matcha_0	95,34 ± 4,74	97,35 ± 2,91	So_matcha_0	95,75 ± 0,25	97,27 ± 0,22
SI_matcha_1T	94,37 ± 8,23	97,33 ± 0,25	V_matcha_1T	95,43 ± 1,28	97,29 ± 0,11	So_matcha_1T	95,94 ± 0,96	97,63 ± 1,15
SI_matcha_3M	94,41 ± 2,28	98,27 ± 0,72	V_matcha_3M	93,21 ± 5,18	85,55 ± 0,05	So_matcha_3M	94,15 ± 1,05	86,00 ± 0,01
SI_moringa_0	99,72 ± 0,57	93,14 ± 8,88	V_moringa_0	85,55 ± 8,19	95,03 ± 5,46	So_moringa_0	93,05 ± 7,80	95,89 ± 1,20
SI_moringa_1T	92,34 ± 0,33	94,72 ± 0,24	V_moringa_1T	99,14 ± 0,17	99,33 ± 1,91	So_moringa_1T	93,18 ± 0,18	98,29 ± 0,88
SI_moringa_3M	89,87 ± 0,48	90,28 ± 0,25	V_moringa_3M	93,03 ± 0,25	92,29 ± 2,83	So_moringa_3M	92,52 ± 0,41	93,23 ± 0,18
SI_pšenice_0	83,79 ± 2,26	89,84 ± 0,84	V_pšenice_0	88,72 ± 0,18	92,39 ± 6,87	So_pšenice_0	90,58 ± 0,63	89,84 ± 0,84
SI_pšenice_1T	85,93 ± 0,16	91,57 ± 0,07	V_pšenice_1T	78,83 ± 0,80	91,31 ± 2,30	So_pšenice_1T	87,10 ± 0,82	83,93 ± 5,51
SI_pšenice_3M	86,36 ± 0,26	77,88 ± 0,09	V_pšenice_3M	86,76 ± 1,22	83,68 ± 0,11	So_pšenice_3M	89,70 ± 0,14	84,33 ± 0,12
SI_ječmen_0	78,78 ± 6,92	87,14 ± 8,26	V_ječmen_0	90,61 ± 1,65	87,14 ± 13,32	So_ječmen_0	90,73 ± 1,79	92,83 ± 1,44
SI_ječmen_1T	85,94 ± 0,04	91,62 ± 0,47	V_ječmen_1T	89,06 ± 0,66	97,12 ± 1,34	So_ječmen_1T	89,32 ± 0,44	95,64 ± 0,69
SI_ječmen_3M	84,58 ± 0,23	85,36 ± 0,30	V_ječmen_3M	92,39 ± 0,24	90,78 ± 0,12	So_ječmen_3M	93,08 ± 0,10	94,40 ± 0,10

#### 4.6.1.4 Modelové trávení připravených liposomů s různým lecithinem

Vliv působení trávicích šťáv na fyzikálně-chemické vlastnosti připravených liposomů s extrakty s antimikrobiálním účinkem pro cílené působení v tlustém střevě proti nežádoucím bakteriím byly studovány v této části práce.

Extrakty heřmánku a chmele byly nejprve enkapsulovány do liposomů složených z lecithinu různého původu a cholesterolu. Kromě základních charakteristik částic a dlouhodobé stability ve vodném prostředí byla sledována jejich stabilita v průběhu modelového trávení. Liposomy byly připraveny dle postupu v kapitole 3.3.22.1 a modelové trávení proběhlo dle následujícího postupu v kapitole 3.3.25.

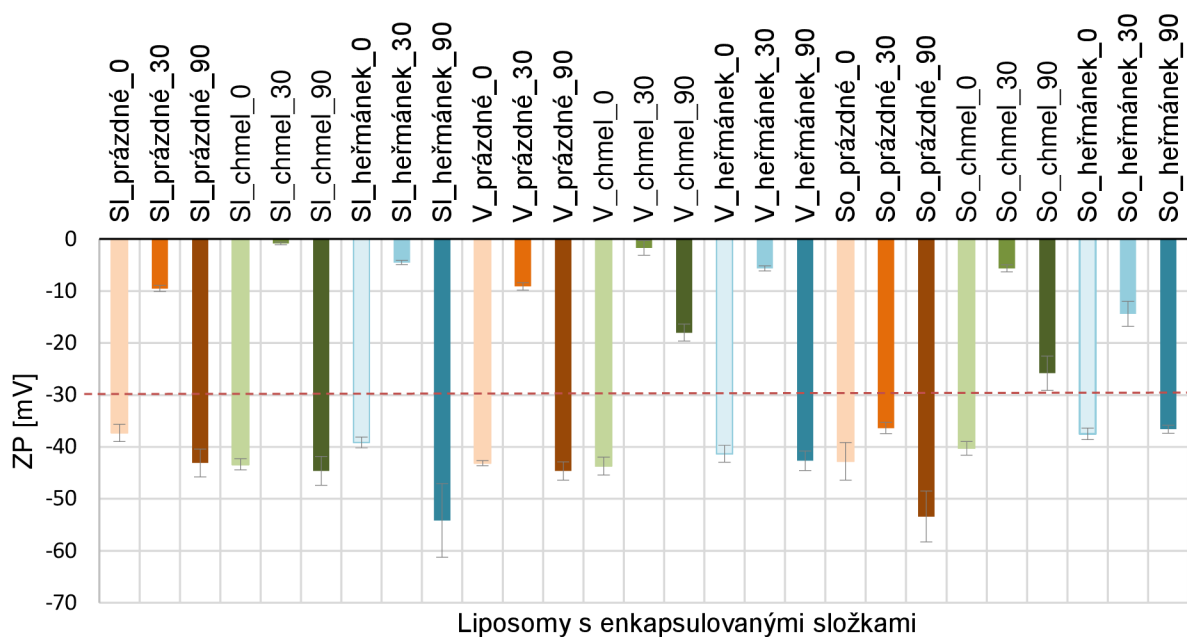
Tabulka 46 Fyzikální charakterizace připravených liposomů s lecithinem z různých zdrojů a enkapsulovaným rostlinným vodným extraktem

Vzorky liposomů		Velikost [nm]	PDI [I]
Sl <sub>-</sub> liposomy	prázdné	246,76 ± 9,62	0,327 ± 0,071
	chmel	210,33 ± 5,65	0,238 ± 0,011
	heřmánek	247,73 ± 1,39	0,256 ± 0,006
V <sub>-</sub> liposomy	prázdné	309,51 ± 2,83	0,376 ± 0,021
	chmel	206,60 ± 2,12	0,182 ± 0,026
	heřmánek	852,00 ± 12,14	0,453 ± 0,016
So <sub>-</sub> liposomy	prázdné	246,20 ± 6,90	0,262 ± 0,007
	chmel	245,93 ± 5,54	0,415 ± 0,003
	heřmánek	240,57 ± 0,69	0,367 ± 0,046

V tabulce (Tabulka 46) jsou uvedeny naměřené hodnoty distribuce velikosti částic a jejich polydisperzita. I u těchto vzorků extraktů bylo u liposomů z vaječného lecithinu naměřená nejvyšší velikost, u vzorku heřmánku až 852,00 ± 12,14 nm. Tyto poměrně velké částice ale vykazovaly uniformitu, jelikož polydisperzita nepřekročila hodnotu 0,7. Připravené liposomy ze sójového a slunečnicového lecithinu byly v rámci těchto sledovaných fyzikálních charakteristik velmi podobné.

I v tomto případě bylo pozorováno zvýšení stability liposomů po enkapsulování aktivních složek do všech typů liposomů (Obrázek 26). Všechny liposomy po přípravě byly stabilní a s velmi nízkými hodnotami zeta potenciálu kolem -40 mV. Po inkubaci v žaludeční šťávě došlo k destabilizaci liposomů, jejich zeta potenciál se zvýšil k nulovým hodnotám. Destabilizace je dána interním pH-gradientem liposomů, který se odvíjí od pH prostředí. S nižší hodnotou pH dochází zároveň k rychlejší hydrolyze lipidů obsažených v membránové dvojvrstvě liposomů [164],[165]. Nejméně stabilními liposomy v prostředí pH 0,9 se jevíly částice s enkapsulovanými chmelem, konkrétně slunečnicové. Po inkubaci a ukončeném modelovém trávení, kdy se pH pohybovalo v rozmezí 7,5–8 (jako ve střevní šťávě), došlo k opětovné stabilizaci částic a snížení hodnoty zeta potenciálu opět pod hranici nestability – 30 mV. Hodnoty se u některých vzorků dokonce snížily až pod hranici -40 mV.





Obrázek 26 Stabilita připravených liposomů s lecithinem z různých zdrojů a enkapsulovaným rostlinným vodným extraktem za modelových podmínek enzymového trávení

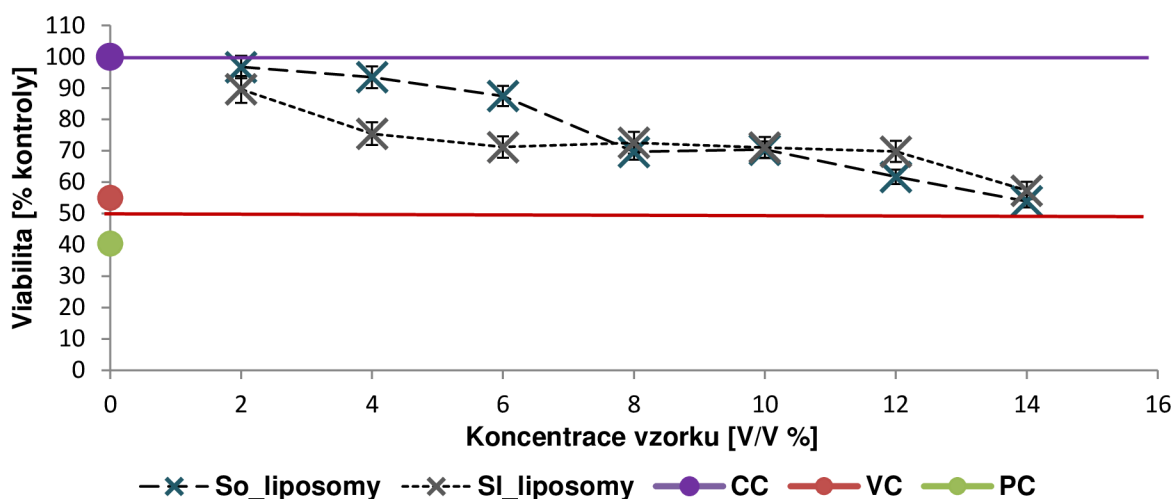
Tabulka 47 Enkapsulační účinnost připravených liposomů tvořených lecithinem různého původu a enkapsulovanými rostlinným vodným extraktem v průběhu modelového enzymatického trávení

Vzorky liposomů	t [min]	Fenolické látky	Antioxidační aktivita	
		EU [%]	EU [%]	
SI_liposomy	chmel	0	81,76 ± 6,14	84,40 ± 3,47
		30	62,85 ± 8,23	68,43 ± 4,02
		90	51,94 ± 2,28	51,18 ± 0,78
	heřmánek	0	94,75 ± 5,51	85,89 ± 6,37
		30	64,27 ± 0,33	63,56 ± 1,08
		90	52,26 ± 0,48	57,80 ± 3,52
V_liposomy	chmel	0	75,68 ± 4,01	77,60 ± 3,15
		30	50,53 ± 8,23	54,51 ± 4,14
		90	36,88 ± 3,08	37,60 ± 1,24
	heřmánek	0	78,00 ± 3,54	78,49 ± 2,03
		30	46,63 ± 3,98	51,13 ± 1,31
		90	36,28 ± 4,54	38,81 ± 3,39
So_liposomy	chmel	0	70,95 ± 9,44	82,00 ± 0,24
		30	62,71 ± 8,23	48,93 ± 8,23
		90	46,80 ± 3,17	41,88 ± 5,14
	heřmánek	0	76,25 ± 8,87	77,97 ± 9,82
		30	55,86 ± 0,15	55,38 ± 0,26
		90	36,80 ± 6,04	42,36 ± 2,36

V tabulce (Tabulka 47) jsou zobrazeny výsledky enkapsulační účinnosti v průběhu modelového trávení. Z výsledků vyplývá, že i přes opětovnou stabilizaci liposomů po přidání směsi pankreatické šťávy se žlučovými kyselinami a zvýšení pH, nedošlo k opětovné enkapsulaci aktivních látek. V nízkém pH došlo k částečné difúzi aktivních látek do prostředí modelových šťáv, které se projevilo na snížení enkapsulační účinnosti ve všech případech o více než 50 %. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla pozorována u liposomů ze slunečnicového lecithinu u obou testovaných extraktů (kolem 50 % v rámci fenolických látek i antioxidační aktivity).

#### 4.6.1.5 MTT test liposomových částic

Liposomy připravené ze sójového nebo slunečnicového lecithinu byly ověřeny jako uniformní a stabilní částice vhodné pro enkapsulaci aktivních látek. Jejich bezpečnost, respektive potenciální vliv na metabolickou aktivitu střevního epitelu byl zkoumán pomocí MTT testu na buněčné linii Caco-2 podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.20.3. Prázdné liposomy určené k testování cytotoxicity byly připraveny dle postupu v kapitole 3.3.22.1. Všechny vzorky byly měřeny třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.



Obrázek 27 MTT test prázdných připravených liposomů ze slunečnicového a sójového lecithinu

Z výsledků je patrné (Obrázek 27), že se zvyšující se objemovou koncentrací dochází ke snižování viability buněk ve srovnání s kontrolou. Nejvyšší testovaná koncentrace liposomů 14 % se blíží k hodnotě viability 50 %, ale tuto hodnotu ani jeden vzorek nepřekročil. Lze ovšem doporučit, aby přídavek liposomů nepřekročil maximální hodnotu objemové koncentrace 12 %.

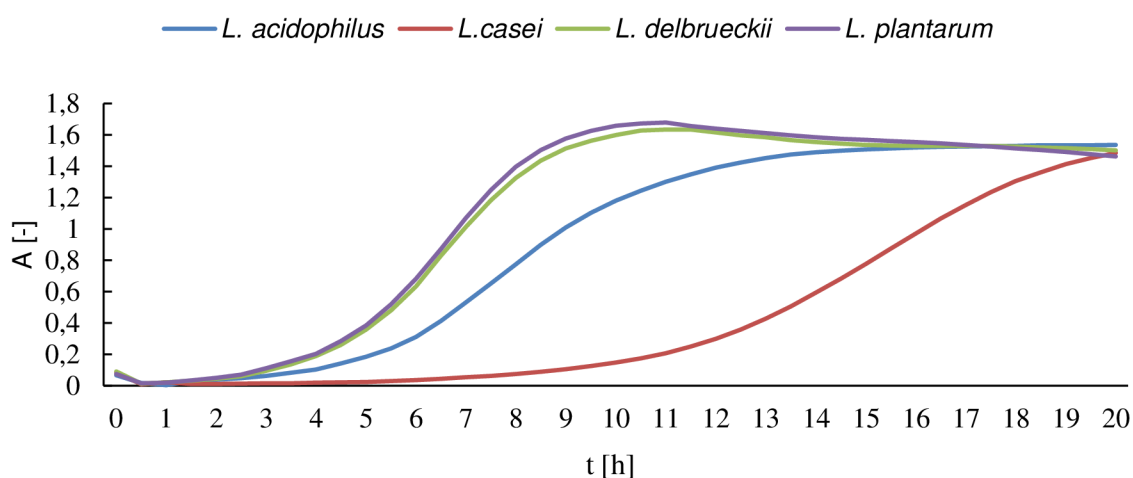
## 4.7 PROBIOTICKÉ BAKTERIE

V této kapitole byla sledována viabilita vybraných probiotických bakterií v prostředí o různém pH anebo s vybranými rostlinnými extrakty. Zároveň byly testovány i možnosti enkapsulace probiotik. Probiotické bakterie mohou být užitečným doplňkem jako samotné, tak zejména v kombinaci s dalšími aktivními látkami rostlinného původu, které byly analyzovány v předchozích částech práce. Povaha rostlinných vzorků může přímo pozitivně ovlivňovat organismus dítěte, ale také nepřímo právě prostřednictvím probiotických bakterií vyskytujících se přirozeně v tlustém střevě.

#### 4.7.1 Kultivace probiotických bakterií

Nejprve byly sledovány růstové křivky vybraných probiotických bakterií podle postupu v kapitole 3.3.23.1. Stanovení růstových křivek bylo provedeno za účelem stanovit vhodnou dobu pro zahájení dílčích experimentů tak, aby se daný kmen nacházel ve své exponenciální fázi (Obrázek 28).

V případě vybraných druhů rodu *Lactobacillus* bylo pozorováno, že druhy *L. delbrueckii* a *L. plantarum* vykazovali krátkou lag fázi oproti zbylým dvěma druhům. Stacionární fázi tak dosáhly již v 10. hodině kultivace. Kmen *L. acidophilus* dosáhl exponenciální fáze až po 6 hodinách kultivace a stacionární okolo 14. hodiny po zaočkování. U *L. casei* nastala exponenciální fáze až ve 12. hodině kultivace a stacionární až po 20. hodině kultivace. *Bifidobacterium breve*, *bifidum* a *longum* vykazovaly podobnou růstovou křivku se začátkem exponenciální fáze kolem 2 hodin kultivace a začátkem stacionární kolem 10. hodiny kultivace.



Obrázek 28 Ukázka růstových křivek bakterií rodu *Lactobacillus*

#### 4.7.2 Modelové trávení probiotických bakterií

Nakultivované buňky (3.1.2) byly ve své exponenciální fázi podrobeny modelovému trávení podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.25. Testování bylo prováděno z důvodu cíleného transportu probiotických bakterií do tlustého střeva a ovlivnění viability pH a enzymy v průběhu trávení. Pomocí kultivace na MRS médiu a odečtení narostlých kolonií na Petriho miskách podle postupu v kapitole 3.3.24, vždy v triplicátech. Naměřené hodnoty počtu bakterií ( $\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) před a po trávení jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 48).

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

Tabulka 48 Sledování viability probiotických bakterií před a po modelovém trávení

	Kmen	$t_0$ min [CFU·ml <sup>-1</sup> ]	$t_{90}$ min [CFU·ml <sup>-1</sup> ]	Rozdíl [%]
L.	<i>casei</i>	$4,25 \cdot 10^9 \pm 2,28 \cdot 10^8$	$4,04 \cdot 10^9 \pm 2,38 \cdot 10^8$	4,84
	<i>acidophilus</i>	$4,05 \cdot 10^9 \pm 1,14 \cdot 10^8$	$3,83 \cdot 10^9 \pm 2,49 \cdot 10^8$	5,44
	<i>plantarum</i>	$5,20 \cdot 10^9 \pm 2,13 \cdot 10^8$	$2,87 \cdot 10^9 \pm 1,38 \cdot 10^8$	44,79
	<i>delbrueckii</i>	$3,21 \cdot 10^9 \pm 2,02 \cdot 10^8$	$2,86 \cdot 10^9 \pm 1,67 \cdot 10^8$	10,89
B.	<i>breve</i>	$4,61 \cdot 10^9 \pm 2,13 \cdot 10^8$	$3,08 \cdot 10^9 \pm 1,86 \cdot 10^8$	33,07
	<i>bifidum</i>	$5,22 \cdot 10^9 \pm 2,04 \cdot 10^8$	$2,80 \cdot 10^9 \pm 1,40 \cdot 10^8$	34,47
	<i>longum</i>	$3,94 \cdot 10^9 \pm 2,27 \cdot 10^8$	$1,30 \cdot 10^9 \pm 2,04 \cdot 10^8$	20,04

U kmenů rodu *Lactobacillus* byl také proveden pokus schopnosti přežití v reálné potravíně o nízkém pH. Jako modelová potravina byla vybrána šťáva z kysaného zelí o pH 3,47. Zelná šťáva byla před zaočkováním podrobena pasteraci při teplotě 90 °C po dobu 30 sekund. Tento pasterační krok měl poměrně malý vliv na aktivní látky obsažené v zelné šťávě a je v souladu s vyhláškou č. 397/2021 Sb., která označuje zeleninový výrobek s nálevem v neprodyšně uzavřeném obale s pH nižším jak 4 za pasterovaný po prohřátí obsahu na 80 až 90 °C [166]. Metody charakterizace takto ošetřené zelné šťávy byla provedena dle stejných postupů jako v kapitole 4.2, výsledky stanovení koncentrace biologických aktivních látek jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 49).

Z výsledku je patrné, že došlo k mírnému poklesu koncentrace všech sledovaných látek. Tento jev se předpokládá, jelikož vlivem tepla mohou sacharidy podléhat dehydrataci nebo degradaci [167]. Fenolické látky a celkově antioxidanty patří mezi termolabilní látky a delší proces zahřívání by na jejich obsah měl negativní vliv [168]. U vzorku zelné šťávy byla navíc pomocí metody HPLC podle postupu v kapitole 3.3.17, detekováno množství vitamínu C, a to  $0,43 \pm 0,08$  mg·ml<sup>-1</sup>, a kyseliny L-mléčné,  $8,22 \pm 0,41$  mg·ml<sup>-1</sup>.

Tabulka 49 Charakterizace zelné šťávy z hlediska bioaktivních látek

Vzorek	Celkové sacharidy [mg·ml <sup>-1</sup> ]	Redukující cukry [mg·ml <sup>-1</sup> ]	Fenolické látky [mg·ml <sup>-1</sup> ]	Antioxidační aktivita [mg·ml <sup>-1</sup> ]	pH
Čerstvá šťáva	$2,84 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,03$	$1,05 \pm 0,01$	$0,82 \pm 0,02$	3,57
Pasterovaná šťáva	$1,86 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,24$	$0,63 \pm 0,01$	3,47

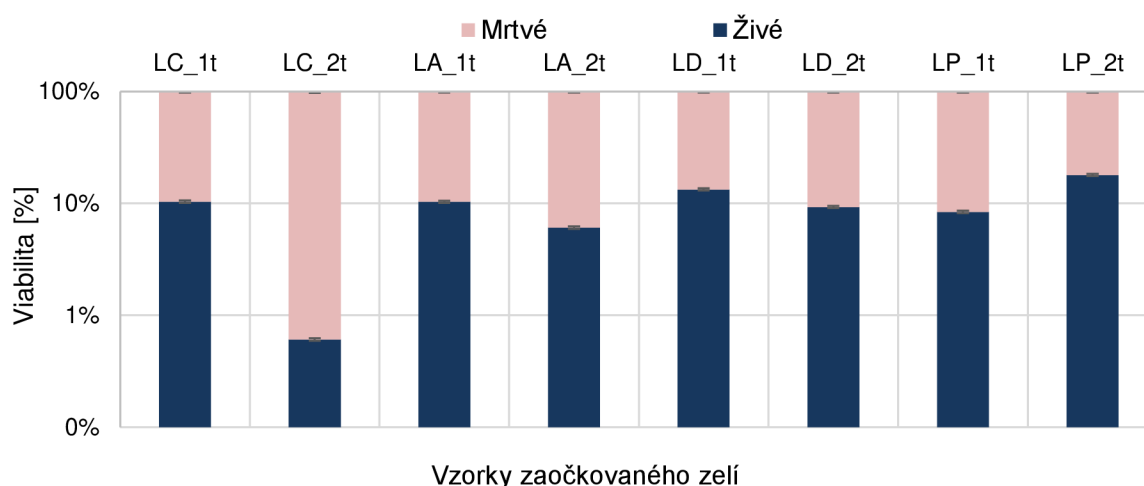
Do vzorku zelné šťávy byla zaočkována koncentrace buněk  $1 \cdot 10^5$  CFU·ml<sup>-1</sup> vybraných druhů laktobacilů. Nejprve byl růst buněk sledován pomocí optické hustoty po dobu 24 hodin v časovém rozmezí 30 minut, kdy buňky jednotlivých kmenů nepřekročily svou lag fázi a experiment byl prodloužen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

Tabulka 50 Buněčná viabilní koncentrace v zelné šťávě v průběhu 2 týdnů

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

Většina vybraných druhů rodu *Lactobacillus* byla schopna přežít v reálném vzorku zelné šťávy o velmi nízké hodnotě pH, avšak s nízkou viabilitou (Tabulka 50, Obrázek 29). Viability jednotlivých kmenů nepřekročily hodnotu 15 %, ale svým počtem se životaschopné bakterie pohybovaly nad hodnotu  $1 \cdot 10^6$  CFU·ml<sup>-1</sup>, s výjimkou *L. casei*, jehož viabilita klesla pod 1 % po dvou týdnech od zaočkování. Produkty, ve kterých jsou obsaženy zdraví prospěšné bakterie, musí obsahovat  $10^6$ – $10^8$  CFU·ml<sup>-1</sup> těchto bakterií do konce expirační doby [169]. Tento fakt nebyl pozorován pouze u *L. casei* po dvou týdnech v zelné šťávě.

Při porovnání s modelovým trávením můžeme vyvodit, že *L. casei* dlouhodobě nedokáže přežít v prostředí s nízkým pH.



Obrázek 29 Odběry a stanovení viability v zaočkovaných vzorcích pasterované zelné šťávy;

1. týden\_1t, 2. týden\_2t

U vzorků zaočkovaného zelí byl také sledován obsah vybraných aktivních látek (Tabulka 51). U *L. plantarum*, u kterého byla stanovena nejvyšší viabilita po 2 týdnech, a to 16,87 %, bylo navíc zaznamenáno zajímavé zvýšení redukujících cukrů. Zvýšení koncentrace mohla nastat štěpením větších sacharidových jednotek v rámci fermentace touto bakterií. Zároveň došlo i ke zvýšení množství kyseliny mléčné a kyseliny octové (obě o necelých 10 mg·ml<sup>-1</sup>), čímž se pH vzorku pohybovalo kolem 3,37. I pomocí těchto výsledků byla potvrzena nízká životaschopnost *L. casei* a jeho nízká schopnost přežít v kyselém prostředí s hodnotou pH pod 4.

Tabulka 51 Změna vybraných sledovaných analytů v průběhu skladování zaočkované šťávy

Vzorek	Sacharidy [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]		Redukující cukry [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]		Kys. L-mléčná [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	
	Týden 1	Týden 2	Týden 1	Týden 2	Týden 1	Týden 2
LA	$1,17 \pm 0,11$	$7,35 \pm 0,11$	$14,72 \pm 0,55$	$20,45 \pm 0,41$	$10,12 \pm 0,43$	$10,61 \pm 0,01$
LC	$3,92 \pm 0,15$	$4,15 \pm 0,26$	$31,16 \pm 0,67$	$22,94 \pm 0,41$	$9,41 \pm 0,23$	$9,35 \pm 0,12$
LD	$7,31 \pm 0,51$	$6,04 \pm 0,32$	$24,85 \pm 0,63$	$19,78 \pm 0,52$	$9,30 \pm 0,09$	$7,53 \pm 0,05$
LP	$2,66 \pm 0,26$	$1,67 \pm 0,19$	$12,04 \pm 0,32$	$26,76 \pm 0,22$	$10,19 \pm 0,59$	$18,91 \pm 0,02$

#### 4.7.3 Vliv vybraných druhů vlákniny na viabilitu probiotických bakterií v průběhu modelového trávení

U komerčně zakoupených probiotických produktů byl zkoumán vliv modelových trávicích šťáv na viabilitu probiotických buněk. Tyto komerční produkty byly vybrány pro jejich povahu a obsah probiotických bakterií a vliv modelového trávení na jejich viabilitu. Postup modelového trávení je uveden v kapitole 3.3.25. I v tomto případě byla využita kultivace na MRS médiu a odečtení narostlých kolonií na Petriho miskách, vždy v triplicátech.

Z výsledků v tabulce (Tabulka 52) vyplývá, že po hodinové kultivaci komerčních směsných produktů s testovanými vzorky vlákniny v porovnání s kontrolou došlo k podpoření viability probiotických buněk. Nejvyšší počet buněk byl stanoven u kombinace sáčku Biopron Junior s jakon sirupem, u kterého bylo stanoveno největší množství ve vodě rozpustných sacharidů a zároveň i redukujících sacharidů.

Po modelovém trávení došlo k poklesu počtu viabilních buněk u všech sledovaných kombinací vzorků. Nejmenší rozdíl v počtu viabilních buněk byl pozorován u vzorků kapek Apo-Laktík v kombinaci s jakon sirupem. I přes vysoký procentuální rozdíl po provedení modelového trávení nedošlo ke snížení viabilních buněk na hranici  $1 \cdot 10^6 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Tabulka 52 Koncentrace viabilních buněk v průběhu modelového trávení v interakci se vzorky vlákniny

	Kombinace	$t_0 \text{ min}$	$t_{90} \text{ min}$	Rozdíl [%]
		[ $\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	[ $\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	
Biopron Junior	/	$6,50 \cdot 10^7 \pm 1,10 \cdot 10^7$	$1,50 \cdot 10^7 \pm 0,60 \cdot 10^7$	76,92
	inulin	$1,76 \cdot 10^8 \pm 0,92 \cdot 10^8$	$1,30 \cdot 10^7 \pm 0,45 \cdot 10^7$	92,61
	chia vláknina	$7,56 \cdot 10^8 \pm 1,80 \cdot 10^8$	$1,10 \cdot 10^7 \pm 0,15 \cdot 10^7$	95,54
	bambusová vláknina	$9,60 \cdot 10^8 \pm 1,28 \cdot 10^8$	$1,40 \cdot 10^7 \pm 0,60 \cdot 10^7$	98,54
	Ch + S	$5,88 \cdot 10^8 \pm 2,68 \cdot 10^8$	$2,20 \cdot 10^7 \pm 0,05 \cdot 10^7$	96,26
	jakon sirup	$8,72 \cdot 10^8 \pm 0,32 \cdot 10^8$	$1,30 \cdot 10^7 \pm 0,70 \cdot 10^7$	98,51
APO-LAKTÍK	/	$7,30 \cdot 10^7 \pm 0,50 \cdot 10^7$	$1,20 \cdot 10^7 \pm 0,10 \cdot 10^7$	96,90
	inulin	$3,82 \cdot 10^8 \pm 1,56 \cdot 10^8$	$2,80 \cdot 10^7 \pm 0,05 \cdot 10^7$	83,56
	chia vláknina	$2,80 \cdot 10^7 \pm 0,15 \cdot 10^7$	$1,30 \cdot 10^7 \pm 0,05 \cdot 10^7$	92,67
	bambusová vláknina	$2,50 \cdot 10^7 \pm 1,28 \cdot 10^7$	$1,70 \cdot 10^7 \pm 0,80 \cdot 10^7$	53,57
	Ch + S	$2,60 \cdot 10^7 \pm 0,20 \cdot 10^7$	$1,80 \cdot 10^7 \pm 0,60 \cdot 10^7$	32,00
	jakon sirup	$9,40 \cdot 10^7 \pm 0,80 \cdot 10^7$	$2,70 \cdot 10^7 \pm 0,70 \cdot 10^7$	30,77

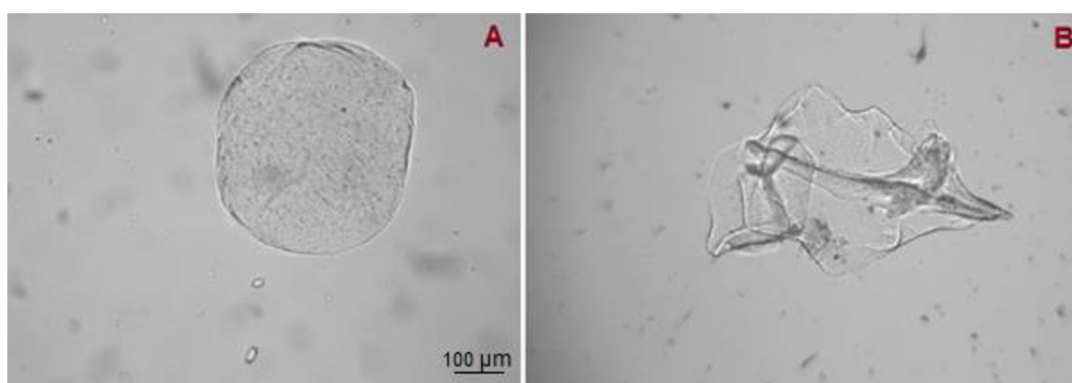
#### 4.7.4 Enkapsulace probiotických bakterií do alginátových částic

Metody enkapsulace byly v této části práce využity pro ochranu životaschopnosti bakterií. Modelovou probiotickou bakterií byl zvolen *L. acidophilus*, komerční preparáty nebyly využity z toho důvodu, že se v preparátu vyskytují již v lyofilizované formě.

Pomocí průtokové cytometrie byl stanoven počet viabilních buněk *L. acidophilus* pro následnou enkapsulaci do alginátových částic připravených enkapsulátorem s tryskou o průměru 400  $\mu\text{m}$  podle postupu v kapitole 0. Po zesíťování alginátových částic byl ve vytvrzovacím roztoku stanoven zbylý neenkapsulovaný počet bakteriálních buněk. Díky disperzi buněk v celém alginátovém roztoku a následnému zesíťení ve vytvrzovacím roztoku došlo k 100% enkapsulaci probiotických buněk. Tato skutečnost byla potvrzena změřením koncentrace buněk před enkapsulací ( $1,10 \cdot 10^7 \pm 0,30 \cdot 10^7$  CFU $\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a po enkapsulaci ( $0,80 \cdot 10^2 \pm 0,02 \cdot 10^2$  CFU $\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Následně byly připravené částice lyofilizovány. Na obrázcích (Obrázek 30, Obrázek 31, Obrázek 32) lze pozorovat deformaci částice po provedené lyofilizaci.

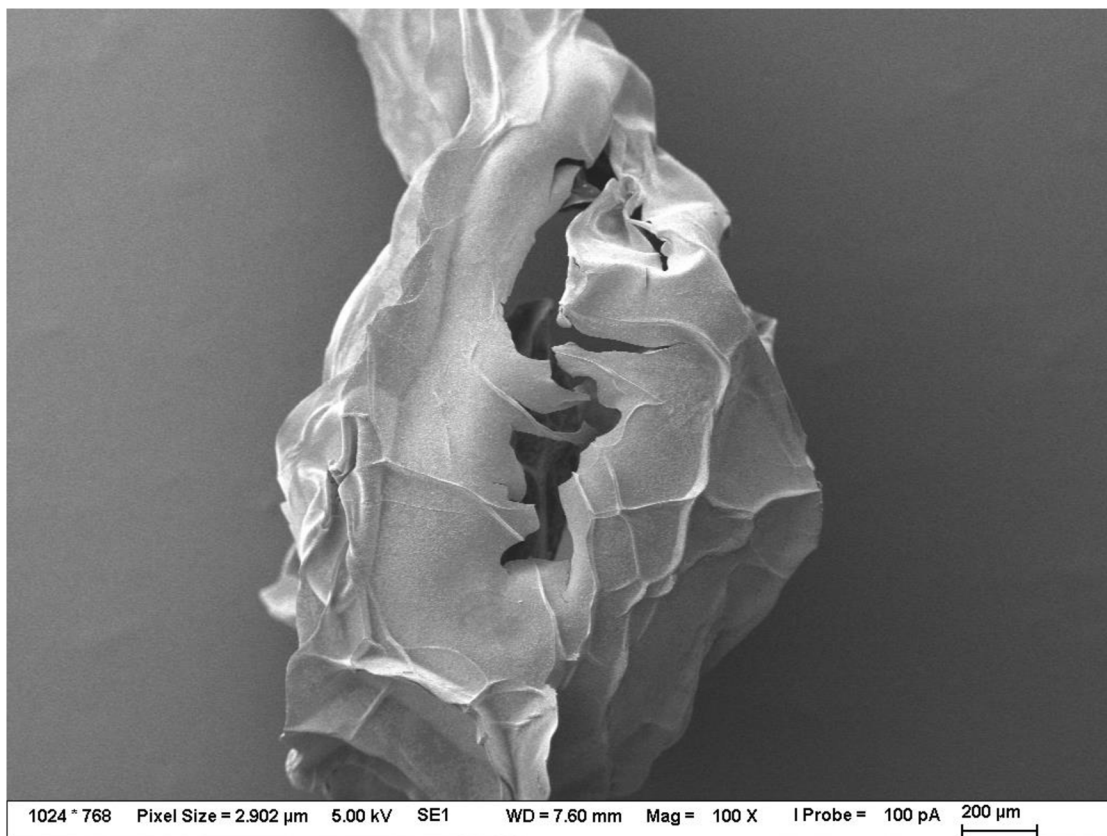
I u vzorků nakultivovaných probiotických buněk, a následně použité technice enkapsulace, bylo provedeno modelové trávení. Opět byl sledován vliv přídavku vlákniny (3.2.4.2) k nakultivovaným buňkám před začátkem modelového trávení. Postup měření a výsledky byly získány stejně jako v přechodí kapitole 4.7.3.

Z výsledků v tabulce (Tabulka 53) je patrné, že hodinová inkubace vlákniny s nakultivovanými buňkami *L. acidophilus* napomohla ke zvýšení jejich viability, a to až o jeden logaritmický řád. Po provedeném modelovém trávení došlo opět ke snížení, ale již ne k tak vysokému jako u komerčních produktů.

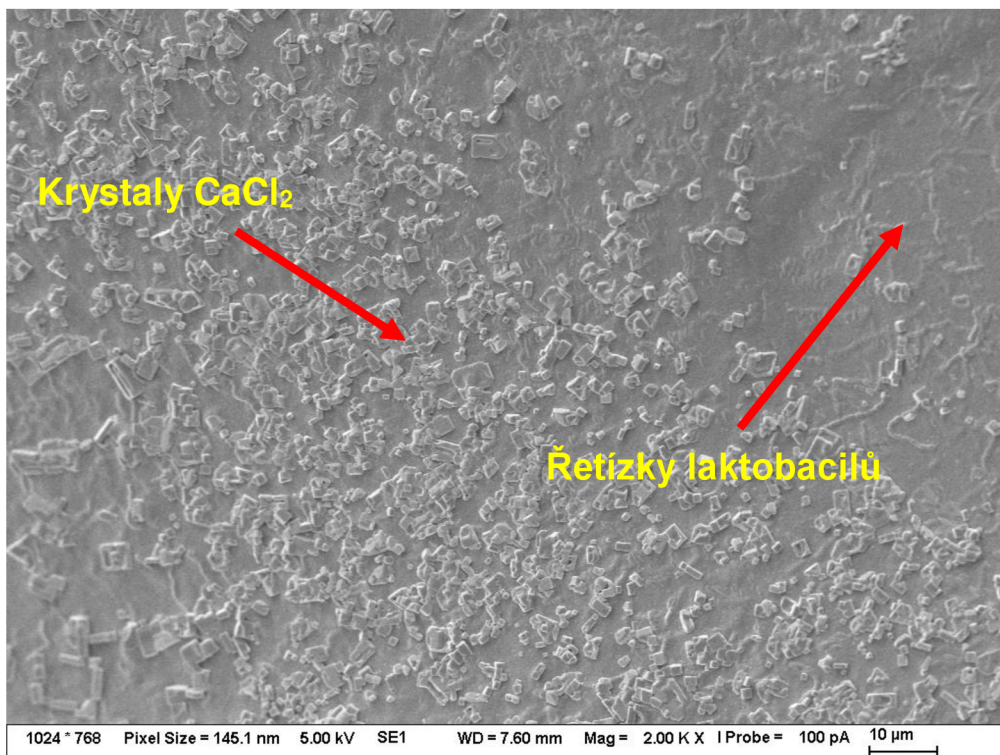


Obrázek 30 Alginátové částice před a po provedeném sušení mrazem (světelný mikroskop);

A – nelyofilizovaná částice, B – lyofilizovaná částice; zvětšení 40x



Obrázek 31 Lyofilizovaná částice vyfocena pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM, Zeiss EVO LS 10, Německo) po minutovém coatingu zlatem; zvětšení 100x



Obrázek 32 Lyofilizovaná částice vyhodnocena pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM, Zeiss EVO LS 10, Německo) po minutovém coatingu zlatem; zvětšení 2 000x



U lyofilizovaných buněk a částic nedošlo k úplné rehydrataci po hodinové inkubaci se vzorky vlákniny, což lze pozorovat na množství viabilních buněk před začátkem modelového trávení ( $1 \cdot 10^6$ – $1,7 \cdot 10^7$  CFU·ml<sup>-1</sup>). Díky enkapsulaci nedošlo k velkému snížení počtu viabilních buněk, ale počet buněk je o logaritmický řád nižší nežli u nelyofilizovaných buněk. Je nutné ovšem podotknout, že k rozpadu částic a rehydrataci může v tlustém střevě dojít i po delším časovém úseku, nežli po 90 minutách trávení. Kombinace enkapsulace do alginátových částic a následná lyofilizace tak napomáhá zachovat viabilitu probiotických bakterií v průběhu modelového trávení. Lze také předpokládat, že přírůstek lyofilizovaných částic s enkapsulovanými probiotiky by mohl sloužit jako přírůstek i do kyselých šťáv, kde by nedocházelo k tak rapidnímu snížení viability vlivem nízkého pH prostředí. Dalším předpokladem je, že v interakci s vlákninou by tak mohlo dojít k vysoké podpoře viability probiotických buněk. Zároveň z výsledků vyplývá, že vzorek jakon sirupu by mohl být vhodným prebiotikem do synbiotických produktů namísto běžně používaného inulinu.

Tabulka 53 Modelové trávení *L. acidophilus* v různých formách se vzorky vlákniny

	Vzorek	$t_{0 \text{ min}}$ [CFU·ml <sup>-1</sup> ]	$t_{90 \text{ min}}$ [CFU·ml <sup>-1</sup> ]	Rozdíl [%]
nelyofilizované buněk	/	$5,40 \cdot 10^7 \pm 0,20 \cdot 10^7$	$2,30 \cdot 10^7 \pm 0,50 \cdot 10^7$	57,41
	inulin	$1,40 \cdot 10^8 \pm 0,30 \cdot 10^8$	$6,00 \cdot 10^7 \pm 0,30 \cdot 10^7$	57,14
	chia vláknina	$1,10 \cdot 10^8 \pm 0,10 \cdot 10^8$	$8,40 \cdot 10^7 \pm 0,50 \cdot 10^7$	23,64
	bambusová vláknina	$1,40 \cdot 10^8 \pm 0,30 \cdot 10^8$	$1,10 \cdot 10^8 \pm 0,10 \cdot 10^8$	21,43
	Ch + S	$2,30 \cdot 10^8 \pm 0,30 \cdot 10^8$	$6,80 \cdot 10^7 \pm 0,50 \cdot 10^7$	70,43
	jakon sirup	$1,20 \cdot 10^8 \pm 0,10 \cdot 10^8$	$2,80 \cdot 10^7 \pm 0,20 \cdot 10^7$	76,67
lyofilizované buněk	/	$1,00 \cdot 10^7 \pm 0,40 \cdot 10^7$	$1,00 \cdot 10^6 \pm 0,20 \cdot 10^6$	90,00
	inulin	$1,70 \cdot 10^7 \pm 0,50 \cdot 10^7$	$8,00 \cdot 10^6 \pm 0,20 \cdot 10^6$	52,94
	chia vláknina	$1,00 \cdot 10^7 \pm 0,20 \cdot 10^7$	$6,00 \cdot 10^6 \pm 0,50 \cdot 10^6$	40,00
	bambusová vláknina	$1,10 \cdot 10^7 \pm 0,30 \cdot 10^7$	$4,00 \cdot 10^6 \pm 1,00 \cdot 10^6$	63,64
	Ch + S	$1,40 \cdot 10^7 \pm 0,50 \cdot 10^7$	$7,00 \cdot 10^6 \pm 0,30 \cdot 10^6$	50,00
	jakon sirup	$1,10 \cdot 10^7 \pm 0,20 \cdot 10^7$	$4,00 \cdot 10^6 \pm 0,20 \cdot 10^7$	63,64
lyofilizované částice s buňkami	/	$6,00 \cdot 10^6 \pm 0,40 \cdot 10^7$	$1,20 \cdot 10^6 \pm 0,1 \cdot 10^7$	80,00
	inulin	$1,30 \cdot 10^7 \pm 0,2 \cdot 10^7$	$1,00 \cdot 10^7 \pm 0,10 \cdot 10^7$	23,08
	chia vláknina	$1,90 \cdot 10^6 \pm 0,5 \cdot 10^7$	$1,20 \cdot 10^6 \pm 0,20 \cdot 10^6$	36,84
	bambusová vláknina	$1,00 \cdot 10^7 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$7,00 \cdot 10^6 \pm 0,20 \cdot 10^6$	30,00
	Ch + S	$1,00 \cdot 10^7 \pm 0,2 \cdot 10^7$	$9,00 \cdot 10^6 \pm 0,20 \cdot 10^7$	10,00
	jakon sirup	$5,00 \cdot 10^6 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$5,00 \cdot 10^6 \pm 0,10 \cdot 10^6$	0,00

#### 4.7.4.1 MTT test biopolymerního materiálu použitého pro enkapsulaci probiotik

I u polysacharidových částic byl testován vliv na metabolickou aktivitu buněčné linie Caco-2. Byly připraveny dvě hmotnostní koncentrace alginátu 0,5% a 1% a zesíťování pomocí 1,5% roztoku chloridu vápenatého po dobu 0,5 hodiny. Pro testování byly odváženy dvě různé hmotnosti zesíťovaných částic. Následně byly přidány do média EMEM a inkubovány s buněčnými liniemi. MTT test probíhal dle standardního postupu uvedeného v kapitole 3.3.20.3.

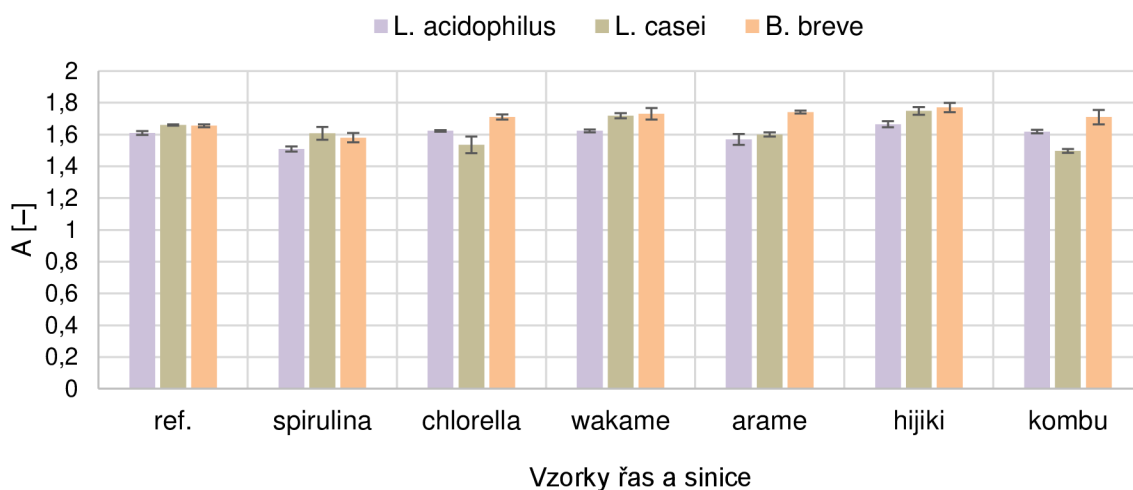
Alginátové částice připravené ze dvou různých koncentrací alginátu a o rozdílné hmotnosti vykazovaly netoxický účinek, kdy viabilita neklesla ani pod hranici 80 % ve srovnání s kontrolou (Tabulka 54). Tento materiál je tedy vhodný pro enkapsulaci probiotik a použití do výrobků určených ke konzumaci.

Tabulka 54 MTT test polysacharidových částic

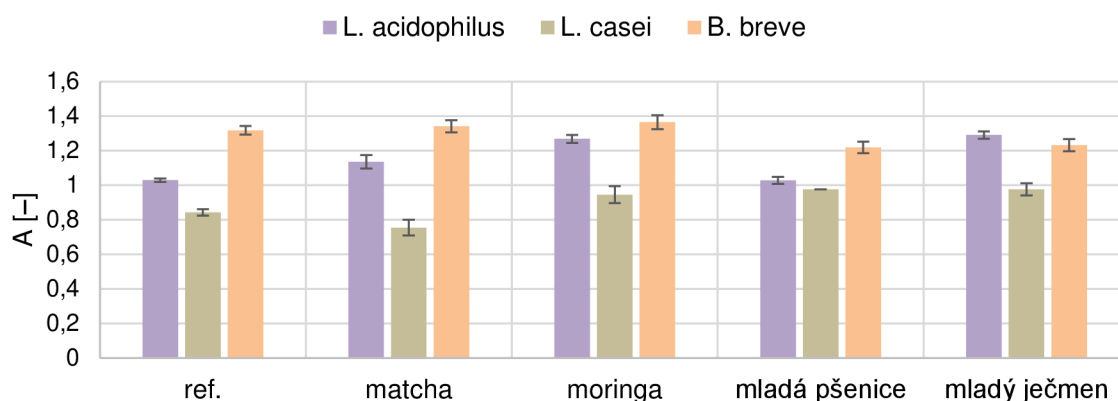
Hmotnostní koncentrace alginátu	m [g]	Viabilita [% kontroly]
0,5%	94,48	84,02 ± 5,55
	54,30	80,24 ± 5,70
1%	102,65	91,17 ± 5,55
	53,03	87,92 ± 7,93
CC	–	100
VC	–	60,97 ± 4,77
PC	–	43,12 ± 8,80

#### 4.7.5 Interakce probiotických buněk s vybranými extrakty

Vzorky vodných extraktů testovaných řas a sinice, rostlinných prášků, bylin a koření, sirupů a šťáv připravených podle kapitoly 3.3.4 byly testovány pro jejich vliv na růst probiotických bakterií. Vzorky řas a sinice byly před testováním navíc dvakrát naředěny kvůli povaze vzorku (vyšší viskozita, horší filtrace přes sterilní filtr). Připravené vzorky byly zaočkovány suspenzí probiotických buněk a byla sledována změna optické hustoty po 24hodinové inkubaci za kultivačních podmínek stejně jako v postupu v kapitole 3.3.19.3. Pro zjištění viability buněk v suspenzi byla na konci kultivačního měření pomocí optické hustoty provedena i průtoková cytometrie podle postupu v kapitole 3.3.24.



Obrázek 33 Změna optické hustoty probiotických buněk po 24hodinové kultivaci s testovanými extrakty řas a sinice



Vzorky rostlinných prášků

Obrázek 34 Změna optické hustoty probiotických buněk po 24hodinové kultivaci s testovanými extrakty rostlinných prášků

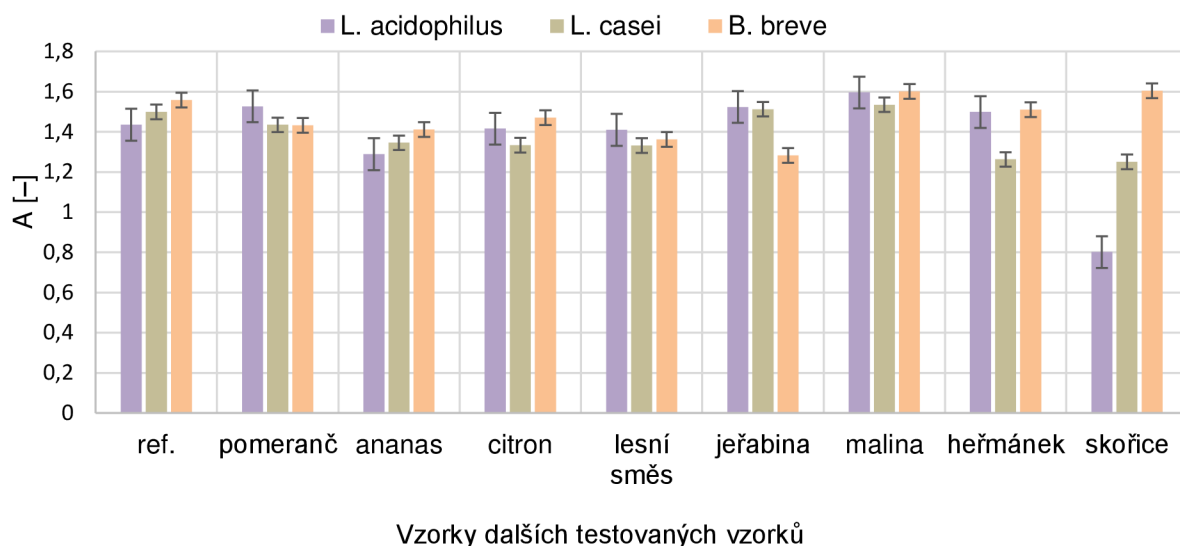
Z výsledků naměřené optické hustoty bylo zjištěno, že po 24hodinové kultivaci s extrakty řas a sinice nedocházelo k rapidnímu nárůstu nebo poklesu buněk v suspenzi (Obrázek 33). U rostlinných prášků byl pozorován viditelný nárůst optické hustoty u *L. acidophilus* a *L. casei*, které byly inkubovány s mladým ječmenem, moringou a s matcha (Obrázek 34). Fenolické látky nacházející se v rostlinách mohou vykazovat inhibiční účinek vůči grampozitivním bakteriím. Mohou tedy inhibovat růst převážně probiotických kmenů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* [170]. Z tohoto důvodu byla viabilita přezkoumána i pomocí průtokové cytometrie.

Tabulka 55 Viabilita probiotik stanovená průtokovou cytometrií

Vzorek	Čas [h]	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>
		Viabilita [%]		
ref.	0	73	77	74
	24	80	97	95
		77	100	97
		96	100	97
		89	100	98
94	97	98		
ref.	0	69	67	70
	24	71	73	72
		84	90	83
		82	98	81
		70	84	74
		52	73	52
		82	83	86
		64	59	63

V tabulce (Tabulka 55) je zobrazeno zastoupení viabilních buněk vyjádřených v procentech vybraných probiotických kmenů po 24hodinové interakci se vzorky. U obou testovaných skupin lze pozorovat vyšší procento viability nežli u reference dané kultury. Ze vzorků řas a sinice byla nejvyšší

viabilita pozorována u spiruliny a chlorelly, nejmenší u kombu a arame. U vzorku rostlinných prášků byla pozorována vysoká viabilita u všech testovaných směsí probiotického kmene s extraktem rostlinného prášků. Z výsledků lze tedy vyvodit, že extrakty neměly inhibující účinek na růst probiotických bakterií, naopak byly schopny udržet jejich životaschopnost.



Obrázek 35 Změna optické hustoty probiotických buněk po 24hodinové kultivaci s testovanými extrakty dalších testovaných vzorků

Ani u ostatních vzorků rostlinných preparátů nebyla pozorována viditelná změna v rámci optické hustoty po 24hodinové kultivaci, s výjimkou vzorku skořice, případně heřmánku. Tato skutečnost může být dána tím, že vzorek skořice sám o sobě vykazoval antimikrobiální účinek vůči gramnegativním, a hlavně vůči grampozitivním bakteriím. Jedná se tedy o významný zdroj antimikrobiálních látek vůči případným patogenům, ale má i inhibiční účinek vůči probiotickým bakteriím. Z tohoto důvodu je vhodné využívat možnosti enkapsulace skořicového extraktu pro řízené uvolňování aktivních látek. I u vzorků malinového čaje a jeřabinového čaje byla pozorována nižší viabilita probiotických buněk pomocí průtokového cytometru. Ta byla stále vysoká, ale pohybovala se pouze nad 50 %. Tyto extrakty neobsahují mnoho živin pro růst bakterií, ale dle výsledků nedochází k příliš vysoké inhibici růstu probiotických bakterií.

#### 4.7.6 Modelové trávení

Modelové trávení proběhlo podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.25. Změna růstu probiotických buněk v přítomnosti přírodních extraktů byla sledována pomocí optické hustoty zaočkováním do MRS média v mikrotitrační destičce podle postupu 3.3.19.3. V jamkách s nárůstem absorbance po 90 minutách trávení, byla změřena viabilita buněk pomocí průtokového cytometru. Viabilita byla také potvrzena zaočkováním směsi po trávení do čerstvého MRS média a po kultivaci byla opět změřena viabilita pomocí průtokového cytometru.

U všech zkoumaných extraktů vzorků, které byly v interakci s jednotlivými druhy probiotických bakterií, došlo v průběhu inkubace se žaludeční šťávou k vysoké inhibici viability bakterií. Po 90 minutách modelového trávení ovšem došlo k mírnému nárůstu optické hustoty (grafické znázornění vybraných extraktů v kombinaci s probiotickou kulturou je uvedeno v Příloha 6). U těchto vzorků byla změřena viabilita pomocí průtokového cytometru (Tabulka 56). Z tabulky je tak zřejmé, že

viabilita buněk byla velmi nízká a pouze u vzorků mladého ječmene a spiruliny docházelo k udržení viability okolo 28 %. Po zaočkování do optimálního kultivačního média byly tyto bakteriální buňky schopné růst a zachovat svou viabilitu v porovnání s referencí, kdy k buňkám nebyl přidán žádný extrakt.

Tabulka 56 Výsledky viability probiotických bakterií po modelovém trávení v kombinaci s extrakty

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

#### 4.8 NÁVRH DOPLŇKŮ STRAVY VHODNÝCH PRO DĚTSKOU VÝŽIVU

V této disertační práci byly testovány přírodní složky potravin pro dětskou výživu. V rámci tohoto tématu bylo jedním z cílů vytvořit doplněk stravy, který by přinesl v rámci dětského stravování doplňující zdroj biologicky aktivních látek pro podporu samotného organismu přímo nebo prostřednictvím střevní mikrobioty. Z tohoto důvodu byly vybrány vzorky tzv. „superpotravin“, které by byly vhodné nutričně, vykazovaly obsah zdraví prospěšných látek a měly i případný pozitivní vliv na probiotické bakterie.

Vhodnou rostlinnou složkou, která by mohla být kombinována s probiotiky, je například chia vláknina nebo jakon sirup, u kterých bylo stanoveno velké množství sacharidů a při přímé konzumaci nabízí chia vláknina také vysoký obsah nerozpustné vlákniny a dusíkatých látek. Na základě stanovení by bylo možné kombinovat s probiotiky například i vzorek arame nebo spiruliny. Vzorek arame obsahoval také vysoké množství sacharidů a dusíku, ale navíc i vysoké množství  $\beta$ -glukanů. U extraktů spiruliny byl významný obsah mastných kyselin a antimikrobiální vliv na grampozitivní a gramnegativní bakterie. U rostlinných prášků vynikal vzorek mladého ječmene a matcha. Mladý ječmen obsahoval nejvíce celkových fruktanů, vysoké množství dusíku, mastných kyselin. U těchto vzorků byla pozorována také podpora viability probiotických bakterií. Extrakty, které obsahují nestabilní nízkomolekulární látky, lze enkapsulovat do liposomů o malé velikosti a vysoké stabilitě. Kromě sójového lecithinu lze využívat na přípravu liposomů také slunečnicový lecithin, který nemá tak

vysokou čistotu, ale má stejně dobré fyzikálně-chemické vlastnosti a je zároveň levnější. V kombinaci s enkapsulačními technikami jako je enkapsulace do alginátových částic, případně s následnou lyofilizací, lze docílit komplexního doplňku stravy.



Obrázek 36 Připravené alginátovo-agarové částice se vzorky rostlinných prášků nebo šťáv






Prvním jednoduchým návrhem kombinace rostlinných složek a probiotických bakterií je jejich enkapsulace do polysacharidových částic. Kvůli rychlé difuzi nízkomolekulárních fenolických látek nebo případně vitaminů z alginátových částic (navíc nízká EU do 30 %), lze zároveň využít enkapsulaci do liposomů na bázi slunečnicového nebo sójového lecithinu pro řízené uvolňování těchto látek. Pro zvýšení atraktivity připravených alginátových částic lze připravit i větší částice určitého vzhledu. Byly proto odzkoušeny kombinace s chia vlákninou, spirulinou, jakon sirupem nebo také s mladým ječmenem. Pro snížení alginátového zápachu byl roztok alginátu zkombinován s agarem. Výsledný vzhled je uveden na obrázku (Obrázek 36). Připravené částice se vzhledem medvídky byly následně podrobeny sensorické analýze na Fakultě chemické VUT v Brně. Výsledkem hodnocení pomocí pavučinových grafů bylo zjištění, že připravené vzorky vykazovaly přípach mořských řas a slanost ze zbytků chloridu vápenatého. Pozitivním výsledkem byl ovšem vzhled, který hodnotitelé hodnotili kladně a produkt by používali. Návrh použitého sensorického formuláře a výsledky vybrané sensorické analýzy jsou uvedeny v příloze a (Příloha 7). Zamaskování zápachu může být řešeno vložením částic přímo do potraviny, například čokolády, která zamaskuje tento zápach, přičemž díky obsaženým částicím dostane navíc atraktivnější vzhled.

Pro snadnější konzumaci lze přidávat částice v čerstvé podobě přímo do tekutých potravin, čaje nebo nesycené limonády, nebo v lyofilizované formě do sypkých potravin, jako jsou například ovesné kaše, a tedy snadno zamíchat do potraviny. Jelikož je obecně známo, že rostlinné prášky nemají u spotřebitelů chuťovou oblíbenost, byla vytvořena kombinace extraktu matcha nebo moringy s ovocnou šťávou (Obrázek 37). Kombinace ovocných šťáv a sirupu ovlivňovala celkový flavour nápojů, a to z hlediska kyselosti a sladkosti. Nejlépe hodnoceným se stal vzorek Q3 obsahující 50 % vody, 0,5 % moringy, 10 % hruškové, 10 % jablečné, 10 % ananasové a 10 % pomelové šťávy, 4 % bezového sirupu a cukr. U vzorku byl nejhůře hodnocen vzhled a malé částičky z prášku moringy.



Obrázek 37 Extrakty rostlinného prášku s ovocnou šťávou

Tabulka 57 Vzhled alginátových částic bez a s přidavkem extraktů

				
Alginátové částice (AČ) 1 000 μm	Lyofilizované AČ	Lyofilizované AČ chlorella	Lyofilizované AČ matcha	Lyofilizované AČ mladý ječmen

Jako prebiotikum oproti běžnému inulinu může být dle výsledků jakon sirup, mladý ječmen, spirulina nebo arame. Vodné extrakty obsahují nejen nutričně významné látky, ale i biologicky aktivní látky. Konkrétním návrhem je pak také enkapsulace prebiotika a probiotických bakterií do alginátových částic s následnou lyofilizací. Vzhled těchto kombinací lze vidět tabulce (Tabulka 57).

## 5 ZÁVĚR

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

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

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



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

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

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

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

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

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

U testovaných extraktů vzorek řas a sinice a rostlinných prášků byl stanoven a porovnán cytotoxický účinek na dvě různé lidské buněčné linie. Tyto linie byly vybrány pro stanovení bezpečnosti v potravinách a případně i v kosmetice. Pro testování cytotoxicity byly vybrány linie Caco-2 (střevní epitel) a HaCat linie (keratinocyty). Nebyl zjištěn výrazný rozdíl v cytotoxickém účinku při vlivu expozice extraktů na obě vybrané buněčné linie, pouze u vyšších koncentrací moringy a matcha. Pro kontrolu byla u těchto vzorků sledována i intaktnost buněčné membrány HaCat buněk. Bylo

ovšem zjištěno, že i přes snížení mitochondriální aktivity nedošlo k narušení buněčné membrány buněk. Obecně lze tedy extrakty považovat za bezpečné i pro využití v kosmetice.

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

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

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

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

4-NQO	4-nitrochinolin oxid	LLE	extrakce kapalina-kapalina
ACP	proteinový přenašeč acylové skupiny	MAE	mikrovlnná extrakce
ARA	arachidonová kyselina	MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
ATCC	American Type Culture Collection	MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny
ATP	adenosintrifosfát	NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid
BCFA	mastné kyseliny s větveným řetězcem	NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
BHI	Brain Heart Infusion	NB	Nutrient Broth
BMI	„Body Mass Index“, index tělesné hmotnosti	PBS	fosfátový pufr
C	cytosin	PCR	polymerázová řetězová reakce
CFU	„Colony Forming Units“, kolony tvořící jednotku	qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
CLS	Cell Line Services	PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
DAD	detektor s diodovým polem	RI	refraktometrický index
DHA	dokosahexaenová kyselina	RNS	„Reactive Nitrogen Species“, reaktivní dusíkaté spíše
DLS	„Dynamic Light Scattering“, dynamický rozptyl světla	ROS	„Reactive Oxygen Species“, reaktivní kyslíkové spíše
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	SDS	dodecyl sulfát sodný
DMSO	dimethyl sulfoxid	SeAlb	selenoalbumin
ELISA	„Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay“, imunochemická reakce s enzymatickou detekcí	SeC	selenocystin
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium	SeCa	selenocystamin
FA	mastné kyseliny	SeCys	selenocystein
FAD	flavinadenindinukleotid	SELENOP	selenoprotein P
FAO	„Food and Agriculture Organisation“, Potravinová a Zemědělská organizace	SeMet	selenomethion
FID	plamenově ionizační detektor	SET-PT	přenos jednoho elektronu s následným přenosem protonu
FMN	flavinmononukleotid	SFA	nassečené mastné kyseliny
G	guanin	SLE	extrakce tuhá fáze-kapalina
GC	plynová chromatografie	SOSIF	SOS Induction Factor
GPX	glutathionperoxidáza	SPLET	postupný přenos leketronu při ztrátě protonu
GRAS	„Generally Recognized as Safe“, všeobecně považovaný za bezpečný	TEAC	„Trolox Equivalent of Antioxidant Capacity“, trolox ekvivalent antioxidační kapacity
HAT	přenos atomu vodíku	TMB	tetramethylbenzidin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie	VLDL	velmi nízkodenzitní lipoprotein
HRP	peroxidáza z křenu	WHO	„World Health Organisation“, Světová zdravotnická organizace
<i>In vitro</i>	umělé podmínky laboratoře		
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem		

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VINCENTOVÁ, Dana. Výživa novorozence, kojence a batolete. *Pediatric pro praxi*, 2006, roč. 7, č. 4, s. 224-226, ISSN: 1213-0494
- [2] NEVORAL, Jiří a Magdalena PAULOVÁ. Výživa kojenců, 2, vyd. Praha: Státní zdravotní ústav, 2007, ISBN 978-80-7071-286-3
- [3] HORTENSIUS, Lisa M. a Ruurd M. VAN ELBURG a kol. Postnatal Nutrition to Improve Brain Development in the Preterm Infant: A Systematic Review From Bench to Bedside. *Frontiers in Physiology* [online]. 2019, **10** [cit. 2021-09-24]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2019.00961
- [4] ADÁMKOVÁ, Věra, Realita dodržování stravovacích doporučení v praxi: Strava jako prevence civilizačních chorob. *Interní medicína* [online], 2011, 13(11), 427-430 [cit. 2019-01-12]. Dostupné z: www.internimedica.cz
- [5] HOU, Lei a Anna H. KONGSTED a kol. Pre- and Early-Postnatal Nutrition Modify Gene and Protein Expressions of Muscle Energy Metabolism Markers and Phospholipid Fatty Acid Composition in a Muscle Type Specific Manner in Sheep. *PLoS ONE* [online]. 2013, 8(6) [cit. 2021-09-24]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0065452
- [6] SAMOUR, Patricia Queen a Kathy King HELM. *Handbook of pediatric nutrition*, 3rd ed. Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett, c2005, ISBN 978-0-7637-8356-3.
- [7] World Health Organization. *Infant and Young Child Feeding: Model Chapter for Textbooks for Medical Students and Allied Health Professionals*. [online] 1, vyd. Ženeva, 2009. ISBN 978-92-4-159749-4. [cit. 2019-12-21]. Dostupné z: www.who.int/
- [8] ONDRIOVÁ, Iveta. Výživa kojenců v kontextu jejich optimálního růstu a vývoje. *Zdravotnictví a medicína* [online]. ČR, 2014 [cit. 2019-12-21]. Dostupné z: http://zdravi.euro.cz/.
- [9] SUIKKANEN, Julia a Hanna-Maria MATINOLLI a kol. Early postnatal nutrition after preterm birth and cardiometabolic risk factors in young adulthood. *PLOS ONE* [online]. 2018, **13**(12) [cit. 2021-09-24]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0209404
- [10] BERKOVÁ, Kamila. Obecné zásady výživy dětí a dorostu. *Pediatric pro praxi*. 2002, č. 6, s. 301-302
- [11] SOSNOVCOVÁ, Jitka. Legislativa pro výrobky pro děti do 3 let. *Právní požadavky SZÚ* [online]. ČR, 2008 [cit. 2019-12-20].
- [12] Vyhláška 54/2004 Sb.: *Vyhláška o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití*. MVČR, 2014. Dostupné z: https://www.zakonyprolidi.cz/
- [13] ROZTOČIL, Aleš. *Moderní porodnictví*. Praha: Grada. 2008, ISBN 978-802-4719-412.
- [14] SANI, Mahsa a Sepideh EBRAHIMI a kol. Differentiation Potential of Breast Milk-Derived Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. 2017, 14(5), 587-593 [cit. 2022-09-24]. ISSN 1738-2696. Dostupné z: doi:10.1007/s13770-017-0066-x
- [15] World Health Organization (WHO), 2018. *Infant and Young Child Feeding*, pp. 66–67. https://doi.org/10.1787/health\_glance\_ap-2018-22-en.

- [16] ANDREAS, Nicholas J., Beate KAMPMANN a Kirsty MEHRING LE-DOARE. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development* [online]. 2015, 91(11), 629-635 [cit. 2021-03-19]. ISSN 03783782. Dostupné z: doi:10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013
- [17] WALSH, Clodagh a Jonathan A. LANE a kol. Human milk oligosaccharides: Shaping the infant gut microbiota and supporting health. *Journal of Functional Foods* [online]. 2020, 72 [cit. 2022-09-24]. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2020.104074
- [18] GARWOLIŃSKA, Dorota, Jacek NAMIEŚNIK a kol. Chemistry of Human Breast Milk—A Comprehensive Review of the Composition and Role of Milk Metabolites in Child Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2018, 66(45), 11881-11896 [cit. 2021-03-19]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.8b04031
- [19] JIMRAMOVSKÝ, František. Umělá výživa kojenců. *Angis Revue* [online]. Brno, 2014 [cit. 2019-12-27]. Dostupné z: <http://www.angisrevue.cz/>
- [20] ČERNÁ, Marie a kol. Nutriční hodnota mléka a mléčných výrobků. 1. vyd., Praha: VÚPP, 1979. 141 s.
- [21] GAJDUŠEK, Stanislav. *Laktologie*, Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. 2003. ISBN 80-715-7657-3.
- [22] RAYMAN, Margaret P. The importance of selenium to human health. *The Lancet* [online]. 2000, 356(9225), 233-241 [cit. 2021-09-24]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(00)02490-9
- [23] DOREA, Jose G. Selenium and breast-feeding. *British Journal of Nutrition* [online]. 2002, 88(5), 443-461 [cit. 2021-09-24]. ISSN 0007-1145. Dostupné z: doi:10.1079/BJN2002692
- [24] KÖHRLE, Josef. *Selenium and the thyroid* [online]. 2013, 20(5), 441-448 [cit. 2022-09-24]. ISSN 1752-296X. Dostupné z: doi:10.1097/01.med.0000433066.24541.88
- [25] BURK, Raymond F. a Kristina E. HILL. Selenoprotein P—Expression, functions, and roles in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2009, 1790(11), 1441-1447 [cit. 2021-09-24]. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.026
- [26] FOX, P. F. a P. L. H. MCSWEENEY. *Dairy chemistry and biochemistry*. New York: Blackie Academic. 1998, ISBN 04-127-2000-0.
- [27] FRÜHAUF, Pavel. Nemléčná výživa kojenců a batolat: Příkrmy. [online], 2006, 5, 271-274 [cit. 2019-01-12]. Dostupné z: [www.pediatriepropraxi.cz](http://www.pediatriepropraxi.cz).
- [28] AJALA, Lawrence Olusegun a Onaheed Babiker DAFALLAH a kol. Mineral compositions of infant complementary foods in relation to dietary daily intake and synergistic/antagonistic interrelationships. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* [online]. 2020, 71(7), 804-814 [cit. 2021-09-24]. ISSN 0963-7486. Dostupné z: doi:10.1080/09637486.2020.1738353
- [29] FRÜHAUF, Pavel a Peter Szitányi. *Výživa v pediatrii* [online] Praha: Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví [online]. 2013, [cit. 2019-01-22]. ISBN 978-80-87023-26-6.
- [30] VAN DEN DRIESSCHE, José J., Jogchum PLAT a Ronald P, MENSINK. Effects of superfoods on risk factors of metabolic syndrome: a systematic review of human

- intervention trials. *Food & Function* [online]. 2018, 9(4), 1944-1966 [cit. 2019-01-04], DOI: 10.1039/C7FO01792H, ISSN 2042-6496.  
Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7FO01792H>
- [31] KARASAWA, Marines Marli Gniech a Chakravarthi MOHAN. Fruits as Prospective Reserves of bioactive Compounds: A Review, *Natural Products and Bioprospecting* [online]. 2018, 8(5), 335-346 [cit. 2019-01-12]. DOI: 10.1007/s13659-018-0186-6, ISSN 2192-2195.  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13659-018-0186-6>
- [32] SANTOS, J. a J., A. MENDIOLA a kol. Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in green leafy vegetables during storage, *Journal of Chromatography A*. 2012, DOI: 10.1016/j.chroma.2012.04.067. ISSN 00219673.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967312006747>.
- [33] BRUBACHER, G. B. a kol. *Methods for the determination of vitamins in food, recommended by COST 91*. New York: Elsevier Applied Science Publishers. c1985, ISBN 08-533-4339-X.
- [34] FANALI, Chiara a ko. Advanced analytical techniques for fat-soluble vitamin analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2017, **87**, 82-97 [cit. 2019-01-28], DOI: 10.1016/j.trac.2016.12.001. ISSN 01659936.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993616303375>
- [35] SPÍNOLA, Vítor a kol. Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1369**, 2-17 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.09.087. ISSN 00219673.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731401557X>
- [36] BLAKE, Christopher J. Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2007, **389**(1), 63-76 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1007/s00216-007-1309-9. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-007-1309-9>
- [37] KOPŘIVA, Vladimír. *Vybrané kapitoly z biochemie potravin*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 2014, ISBN 978-80-7305-677-3.
- [38] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Vybrané kapitoly z biochemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, ISBN 978-80-86659-15-2.
- [39] KERNS, Jennifer, C.Gutierrez, Thiamin, *Advances in Nutrition* [online]. Oxford University Press. 2017, **8**(2), 395-397 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.3945/an.116.013979. ISSN 2161-8313.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5347104/pdf/an013979.pdf>
- [40] WANG, Peng a kol. Indirect Competitive Immunoassay for Detection of Vitamin B 2 in Foods and Pharmaceuticals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, **61**(29), 7048-7054 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1021/jf401078t. ISSN 0021-8561.  
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf401078t>
- [41] MACKAY, Douglas a kol. Niacin: chemical forms, bioavailability, and health effects. *Nutrition Reviews* [online]. 2012, **70**(6), 357-366 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2012.00479.x. ISSN 00296643.

- Dostupné z: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/j.1753-4887.2012.00479.x>
- [42] RAGGI, Thiago a kol. Characterization of pantothenic acid deficiency and the dietary requirement of juvenile hybrid striped bass. *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, *Aquaculture* [online]. 2016, 451, 326-329 [cit. 2019-01-30]. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.09.028. ISSN 0044-8486.
- [43] ZUO, Hui a kol. Markers of vitamin B6 status and metabolism as predictors of incident cancer: The Hordaland Health Study. *International Journal of Cancer* [online]. 2015, **136**(12), 2932-2939 [cit. 2019-01-30]. DOI: 10.1002/ijc.29345. ISSN 0020-7136.
- [44] KOOLMAN, Jan a Klasu-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 4, Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [45] BAHADIR, Ayseur a kol. Oral vitamin B12 treatment is effective for children with nutritional vitamin B12 deficiency. *Journal of Pediatrics and Child Health* [online]. Oxford, 2014 50(9), 721-725 [cit. 2019-01-30]. DOI: 10.1111/jpc.12652. ISSN 10344810. Dostupné z: <http://search.proquest.com/>
- [46] DEBELO, Hawi a kol. Vitamin A. *Advances in Nutrition* [online]. Oxford University Press. 2017, 8(6), 992-994 [cit. 2019-01-30]. DOI: 10.3945/an.116.014720. ISSN 2161-8313, Dostupné z: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
- [47] CASSILETH, Barrie a kol. Vitamin E. *Oncology* [online]. 2010, 24(7) [cit. 2019-01-30]. ISSN 08909091
- [48] PROCHÁZKOVÁ, D. a kol. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia* [online]. 2011, 82(4), 513-523 [cit. 2019-01-09]. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.01.018. ISSN 0367326X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com>.
- [49] VENEGONI, Whitney a kol. The use of antioxidants in the treatment of traumatic brain injury. *Journal of Advanced Nursing* [online]. 2017, 73(6), 1331-1338 [cit. 2019-01-09]. DOI: 10.1111/jan.13259. ISSN 03092402. Dostupné z: <http://doi.wiley.com>.
- [50] MISHRA, Vijendra a kol. Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* [online]. 2015, 63(14), 3615-3626 [cit. 2019-01-10]. DOI: 10.1021/jf506326t. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org>.
- [51] VALKO, Marian a Dieter LEIBFRITZ a kol. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* [online]. 2007, **39**(1), 44-84 [cit. 2019-1-09]. ISSN 13572725. Dostupné z: [doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001)
- [52] LEOPOLDINI, Monica a kol. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* [online]. 2011, 125(2), 288-306 [cit. 2019-01-10]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.08.2012. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/>
- [53] TSAO, Rong. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* [online]. 2010, 2(12), 1231-1246 [cit. 2019-01-30]. DOI: 10.3390/nu2121231. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/>
- [54] MAZZONE, Gloria a kol. Antioxidant properties comparative study of natural hydroxycinnamic acids and structurally modified derivatives: Computational insights.

- Computational and Theoretical Chemistry* [online]. 2016, 1077, 39-47 [cit. 2019-01-10]. DOI: 10.1016/j.comptc.2015.10.011. ISSN 2210271X.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/>
- [55] MONRAD, Jeana K. a kol. Design and Optimization of a Semicontinuous Hot–Cold Extraction of Polyphenols from Grape Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, **60**(22), 5571-5582 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1021/jf300569w. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf300569w>
- [56] MOREIRA, Manuela M, a kol. A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, **403**(4), 1019-1029 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1007/s00216-011-5703-y. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/>
- [57] Cardozo, K. H. M., et al. (2007). Metabolites from algae with economical impact. Comparative biochemistry and physiology. Part C. *Toxicology and Pharmacology*, **146**, 60–78.
- [58] MAMATHA, B.S. a K.K. NAMITHA a kol. Studies on use of Enteromorpha in snack food. *Food chemistry* [online]. OXFORD: Elsevier, 2007, **101**(4), 1707-1713 [cit. 2022-09-24]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2006.04.032
- [59] PATARRA, Rita Ferreira a Lisete PAIVA. Nutritional value of selected macroalgae. *Journal of Applied Phycology* [online]. 2011, **23**(2), 205-208 [cit. 2021-09-24]. ISSN 0921-8971. Dostupné z: doi:10.1007/s10811-010-9556-0
- [60] MARSHAM, Sara, Graham W. SCOTT a Michelle L. TOBIN. Comparison of nutritive chemistry of a range of temperate seaweeds. *Food chemistry* [online]. OXFORD: Elsevier, 2007, **100**(4), 1331-1336 [cit. 2021-09-24]. ISSN 0308-8146.  
Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.029
- [61] HOEBLER, Christine a Fabienne GUILLON. Supplementation of pig diet with algal fibre changes the chemical and physicochemical characteristics of digesta. *Journal of the science of food and agriculture* [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2000, **80**(9), 1357-1364 [cit. 2021-09-24]. ISSN 0022-5142.  
Dostupné z: doi:10.1002/1097-0010(200007)80:91357::AID-JSFA6573.0.CO;2-B
- [62] SINGH, Sawraj, Bhushan N. KATE a U. C. BANERJEE. Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. *Critical reviews in biotechnology* [online]. ABINGDON: Informa UK, 2005, **25**(3), 73-95 [cit. 2022-09-24]. ISSN 0738-8551.  
Dostupné z: doi:10.1080/07388550500248498
- [63] KUMAR, Yogesh a Somya SINGHAL. Ultrasound assisted extraction of selected edible macroalgae: Effect on antioxidant activity and quantitative assessment of polyphenols by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Algal Research* [online]. 2020, **52** [cit. 2021-09-24]. ISSN 22119264.  
Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2020.102114
- [64] DENG, Ruitang a Te-Jin CHOW. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae Spirulina. *Cardiovascular Therapeutics* [online]. 2010, **28**(4), e33-e45 [cit. 2021-09-24]. ISSN 17555914.  
Dostupné z: doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x



- [65] BAG, Anwesa a kol. Evaluation of Synergistic Antibacterial and Antioxidant Efficacy of Essential Oils of Spices and Herbs in Combination. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(7) [cit. 2022-09-24]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0131321
- [66] AKHTAR, Saeed a Azhari SIDDEEG. Polyphenol-Rich Extracts of Traditional Culinary Spices and Herbs and Their Antibacterial Activity in Minced Beef. *Journal of Food Quality* [online]. 2019, **2019**, 1-9 [cit. 2022-09-24]. ISSN 0146-9428. Dostupné z: doi:10.1155/2019/1702086
- [67] TURRONI, Francesca a Marco VENTURA. Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a Lactobacillus and Bifidobacterium perspective, Cellular and Molecular Life Sciences [online]. 2014, **71**(2), 183-203 [cit. 2019-01-02]. DOI: 10.1007/s00018-013-1318-0. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-013-1318-0>
- [68] MIZOCK, Barry A. Probiotics, Disease-a-Month [online]. 2015, **61**(7), 259-290 [cit. 2018-12-04]. DOI: 10.1016/j.disamonth.2015.03.011. ISSN 00115029. Dostupné z <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011502915000607>
- [69] SÁNCHEZ, Borja a kol. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition* [online]. 2017, **61**(1) [cit. 2019-01-24]. DOI: 10.1002/mnfr.201600240. ISSN 16134125. Dostupné z: <http://doi.wiley.com>
- [70] PANDIYAN, Priyadarshini a kol. Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today* [online]. 2013, **5**(1), 55-59 [cit. 2018-12-13] DOI: 10.1016/j.dit.2013.03.003. ISSN 09757619. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/>
- [71] HUME, M.E. a kol. Historic perspective: Prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. *Poultry Science* [online]. 2011, **90**(11), 2663-2669 [cit. 2019-01-24]. DOI: 10.3382/ps.2010-0,1030. ISSN 0032-5791. Dostupné z: <https://academic.oup.com/>
- [72] SARKAR, Amrita a Santanu MANDAL. Bifidobacteria—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. *Microbiological Research* [online]. 2016, **192**, 159-171 [cit. 2019-01-05]. DOI: 10.1016/j.micres.2016,07.001. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501316304323>.
- [73] WILLIAMS, N. T. Probiotics, *American Journal of Health-System Pharmacy* [online]. 2010, **67**(6), 449-458 [cit. 2018-12-05], DOI: 10,2146/ajhp090168. ISSN 1079-2082. Dostupné z: <http://www.ajhp.org/cgi/doi/10.2146/ajhp090168>
- [74] SATTLER, Verity Ann a kol. Development of a Strain-Specific Real-Time PCR Assay for Enumeration of a Probiotic Lactobacillus reuteri in Chicken Feed and Intestine, *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(2) [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1371/journal.pone.0090208. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0090208>
- [75] SHEU, Sen-Je a kol. Use of Tuf Gene-Based Primers for the PCR Detection of Probiotic Bifidobacterium Species and Enumeration of Bifidobacteria in Fermented Milk by Cultural and Quantitative Real-Time PCR Methods. *Journal of Food Science* [online]. 2010, **75**(8), M521-M527 [cit. 2019-01-28], DOI: 10.1111/j,1750-3841.2010.01816.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/>
- [76] VANDENPLAS, Yvan, Geert HUYS a Georges DAUBE. Probiotics: an update, *Jornal de Pediatria* [online]. 2015, **91**(1), 6-21 [cit. 2018-12-04], DOI: 10.1016/j.jpmed,2014.08.005. ISSN 00217557.

- Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021755714001478>
- [77] ZHANG, Zhongwang, Jianliang LV, Li PAN a Yongguang ZHANG. Roles and applications of probiotic Lactobacillus strains, *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2018, 102(19), 8135-8143 [cit. 2018-12-26], DOI: 10.1007/s00253-018-9217-9. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-9217-9>
- [78] KOZAKOVA, Hana a kol. Colonization of germ-free mice with a mixture of three lactobacillus strains enhances the integrity of gut mucosa and ameliorates allergic sensitization. *Cell Mol. Immunol.* [online]. 2016, **13**(2), 251-262 [cit. 2022-11-06]. ISSN 1672-7681. Dostupné z: [doi:10.1038/cmi.2015.09](https://doi.org/10.1038/cmi.2015.09)
- [79] SALVETTI, Elisa, Sandra TORRIANI a Giovanna E, FELIS. The Genus Lactobacillus: A Taxonomic Update, Probiotics and Antimicrobial Proteins [online]. 2012, 4(4), 217-226 [cit. 2018-12-06], DOI: 10.1007/s12602-012-9117-8. ISSN 1867-1306. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12602-012-9117-8>
- [80] TURRONI, Francesca. Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA. Genomics and ecological overview of the genus Bifidobacterium. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2011, **149**(1), 37-44 [cit. 2019-01-05], DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.010. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510007002>
- [81] HUQ, Tanzina, a kol. Encapsulation of Probiotic Bacteria in Biopolymeric System, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2013, 53(9), 909-916 [cit. 2019-01-25], DOI: 10.1080/10408398.2011.573152. ISSN 1040- 8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/>
- [82] WOHLGEMUTH, Steffen a kol. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. 2010, **300**(1), 3-10 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.08.003. ISSN 14384221. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/>
- [83] LUGLI, Gabriele Andrea a Christian MILANI. Investigation of the Evolutionary Development of the Genus Bifidobacterium by Comparative Genomics. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2014, 80(20), 6383-6394 [cit. 2019-01-03], DOI: 10.1128/AEM.02004-14. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM,02004-14>
- [84] PRABHURAJESHWAR, Chidre a R. K. CHANDRAKANTH. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical Journal* [online]. 2017, 40(5), 270-283 [cit. 2018-12-05], DOI: 10.1016/j.bj.2017.06.008. ISSN 23194170. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2319417017300094>
- [85] JUNICK, Jana a Michael BLAUT. Quantification of Human Fecal Bifidobacterium Species by Use of Quantitative Real-Time PCR Analysis Targeting the groEL Gene, *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2012, 78(8), 2613-2622 [cit. 2019-01-03], DOI: 10.1128/AEM.07749-11. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM,07749-11>

- [86] AHRBERG, Christian D. a Pavel NEUŽIL. Doubling Throughput of a Real-Time PCR. *Scientific Reports* [online]. Macmillan Publishers, **15**(10), 1-10 [cit. 2022-09-24]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep12595
- [87] WAGES, J.M. POLYMERASE CHAIN REACTION. *Encyclopedia of Analytical Science* [online]. Elsevier, 2005, 2005, 243-250 [cit. 2021-08-30]. ISBN 9780123693976. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-369397-7/00475-1
- [88] KARUNANATHIE, Harsheni, Ping Siu KEE, Shioh Fern NG, Martin A. KENNEDY a Eng Wee CHUA. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie* [online]. 2022, **197**, 130-143 [cit. 2021-08-30]. ISSN 03009084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2022.02.009
- [89] FIBI, Silvia, Viviana KLOSE a kol. Suppression subtractive hybridisation and real-time PCR for strain-specific quantification of the probiotic *Bifidobacterium animalis* BAN in broiler feed. *Journal of microbiological methods* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, 2016, **123**, 94-100 [cit. 2022-09-24]. ISSN 0167-7012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2016.02.011
- [90] MICHELUTTI, Luca, Michela BULFONI a Emanuele NENCIONI. A novel pharmaceutical approach for the analytical validation of probiotic bacterial count by flow cytometry. *Journal of microbiological methods* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2020, **170**, 105834-105834 [cit. 2022-09-24]. ISSN 0167-7012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2020.105834
- [91] WILKINSON, Martin G. Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. LONDON: Elsevier, 2018, **78**, 1-10 [cit. 2022-09-24]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2018.05.006
- [92] *Flow Cytometry* [online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometers/>
- [93] NEDOVIC, V. a kol. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. 2011, vol. 1, s, 1806-1815 [cit. 2018-12-26], DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.26. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/>
- [94] ZUIDAM, N. J. a kol. Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing [online]. London: Springer, 2009, s. 31-100 [cit. 2018-12-26]. ISBN 1441910077
- [95] RAY, Sohini a kol. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience* [online]. 2016, 13, 76-83 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1016/j.fbio.2015.12.009. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/>
- [96] ISHWARYA, S. P. a kol. Spray-freeze-drying: A novel proces for the drying of foods and bioproducts. *Trends in Food Science & Technilogy* [online]. 2015, s, 161 – 181 [cit. 2018-12-26]. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.10.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [97] APRAGAUS, Cordin a kol. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, 194 – 2014 [cit. 2019-01-04]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.05.037. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/>

- [98] BROECKX, Géraldine a kol. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, 505(1-2). 303-318 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.002. ISSN 03785173.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/>
- [99] WANNING, Stefan a kol. Pharmaceutical spray freeze drying. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, s. 136 – 153 [cit. 2018-07-06]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.053. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/>
- [100] SILVA, Raquel a Helena FERREIRA. Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2010, 17(3), 628-632 [cit. 2019-01-16]. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2009.10.010. ISSN 13504177.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417709001746>
- [101] HUANG, Zhenjun a kol. Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2014, 9(4), 176-182 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1016/j.ajps.2014.06.001. ISSN 18180876.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1818087614000336>
- [102] BUCHI, Enkapsulátor B-395 Pro:Manuál
- [103] MAZUR, Kamila a kol. Hydration of Sodium Alginate in Aqueous Solution. *Macromolecules* [online]. 2014, 47(2), 771-776 [cit. 2019-01-16]. DOI: 10.1021/ma4023873. ISSN 0024-9297.  
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ma4023873>
- [104] GOHIL, Ramesh M. Synergistic blends of natural polymers, pectin and sodium alginate. *Journal of Applied Polymer Science*[online]. 2011, 120(4), 2324-2336 [cit. 2019-01-16]. DOI: 10.1002/app.33422. ISSN 00218995.  
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.33422>
- [105] MAZZITELLI, Stefania, a kol. Preparation of cell-encapsulation devices in confined microenvironment. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2013, 65(11-12), 1533-1555 [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1016/j.addr.2013.07.021. ISSN 0169409x.
- [106] BALYURA, Mariya a kol. Transplantation of bovine adrenocortical cells encapsulated in alginate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2015, 112(8), 2527-2532 [cit. 2019-01-16]. DOI: 10.1073/pnas.1500242112. ISSN 0027-8424.  
Dostupné z: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1500242112>
- [107] THANDAPANI, Gomathi a kol. Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, 104, 1794-1806 [cit. 2019-01-16]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.057. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/>
- [108] WIARACHAI, Orphan a Nuttha THONGCHUL. Surface-quaternized chitosan particles as an alternative and effective organic antibacterial materiál. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2012, 92, 121-129 [cit. 2019-01-16]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.11.034. ISSN 09277765.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/>
- [109] ARIAS-BORREGO, A. a B. CALLEJÓN-LEBLIC a kol. A novel HPLC column switching method coupled to ICP-MS/QTOF for the first determination of selenoprotein P

- (SELENOP) in human breast milk. *Food Chemistry* [online]. 2020, **321** [cit. 2021-09-25]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.126692
- [110] CALLEJÓN-LEBLIC, Belén a Gema RODRÍGUEZ-MORO a kol. Absolute quantification of selenoproteins and selenometabolites in lung cancer human serum by column switching coupled to triple quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2020, **1619** [cit. 2021-09-25]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2020.460919
- [111] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356
- [112] SHAO, Yijing a Amy Hui-Mei LIN. Improvement in the quantification of reducing sugars by miniaturizing the Somogyi-Nelson assay using a microtiter plate. *Food Chemistry* [online]. 2018, 240, 898-903 [cit. 2022-09-25]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.083
- [113] Estimation of reducing sugar by Nelson-Somogyi method. *Researchgate.com* [online]. [cit. 2022-09-06]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/>
- [114] GIDENNE, T. Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science* [online]. 2003, **81**(2-3), 105-117 [cit. 2022-09-25]. ISSN 03016226. Dostupné z: doi:10.1016/S0301-6226(02)00301-9
- [115] Czech Standards Institute (2003) CSN 46 1011-18: testing of cereals, pulses, and oilseeds-Part 18: testing of cereals-determination of nitrogen matter content. Czech Office for Standards, Metrology and Testing, Prague
- [116] SINGLETON, V. L., Jr J. A. ROSSI. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents*. *American Journal of Enology and Viticulture* 1965, 16 (3): 144-158
- [117] CHANG C. Y. M., WEN H., CHERN J.. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 2002; 10(3): 178- 182
- [118] RE R., PELLEGRINI N. a kol. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, 26(9-10): 1231-1237. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315- 3. ISSN 08915849.
- [119] Fructan assay procedure. In: *Megazyme* [online]. IRL, 2020 [cit. 2022-09-06]. Dostupné z: [https://www.megazyme.com/documents/Assay\\_Protocol/K-FRUC\\_DATA.pdf](https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-FRUC_DATA.pdf)
- [120] Mixed-Linkage Beta-Glucan. In: *Megazyme* [online]. IRL, 2020 [cit. 2022-09-06]. Dostupné z: [https://www.megazyme.com/documents/Assay\\_Protocol/K-BGLU\\_DATA.pdf](https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-BGLU_DATA.pdf)
- [121] LICHTENTHALER, Hartmut K. a Claus BUSCHMANN. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* [online]. 2001, **1**(1), F4.3.1-F4.3.8 [cit. 2021-09-25]. ISSN 25725599. Dostupné z: doi:10.1002/0471142913.faf0403s01
- [122] LACTOSE IN FEEDINGSTUFFS. In: *Gafta* [online]. 2018 [cit. 2022-09-06]. Dostupné z: [https://www.gafta.com/write/MediaUploads/Contracts/2018/METHOD\\_10.2\\_LACTOSE\\_IN\\_FEEDINGSTUFFS.pdf](https://www.gafta.com/write/MediaUploads/Contracts/2018/METHOD_10.2_LACTOSE_IN_FEEDINGSTUFFS.pdf)

- [123] CALLEJÓN-LEBLIC, Belén, José Luis GÓMEZ-ARIZA, Antonio PEREIRA-VEGA a Tamara GARCÍA-BARRERA. Metal dyshomeostasis based biomarkers of lung cancer using human biofluids. *Metallomics*. 2018, **10**(10), 1444-1451. ISSN 1756-5901.
- [124] WIEGAND I., HILPERT K., HANCOCK R.E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*. 2008, **3**(2): 163-175.
- [125] LI, X., et al. Hydrophobic tail length, degree of fluorination and headgroup stereochemistry are determinants of the biocompatibility of (fluorinated) carbohydrate surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009, **73**(1), 65-74
- [126] BROWN, D., et al. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology And Applied Pharmacology*. 2001, **175**, 191-199.
- [127] ENVIRONMENTAL BIO-DETECTION PRODUCTS, INC. SOS-ChromoTest: A Users Guide.
- [128] Particle size distribution. In: Malvern [online]. © 2013 [cit. 2013-03-16].
- [129] BÜCHI LABORTECHNIK AG. Návod k použití: Enkapsulátor B-395 Pro. 2011.
- [130] Technical data. In: *Himedia* [online]. 2022 [cit. 2022-09-06]. Dostupné z: [https://www.himedia.cz/katalog/produkty/mikrobiologie/granulovana-kultivacni-media/product/GM641\\_lactobacillus-mrs-agar-mrs-agar](https://www.himedia.cz/katalog/produkty/mikrobiologie/granulovana-kultivacni-media/product/GM641_lactobacillus-mrs-agar-mrs-agar)
- [131] Československý lékopis. Praha: Avicenum – Zdravotnické nakladatelství, 1987
- [132] BURK, Raymond F. a Kristina E. HILL. Selenoprotein P—Expression, functions, and roles in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2009, **1790**(11), 1441-1447 [cit. 2022-08-25]. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.026
- [133] NOURBAKSH, Mitra a Fatemeh AHMADPOUR. Selenium and its relationship with selenoprotein P and glutathione peroxidase in children and adolescents with Hashimoto's thyroiditis and hypothyroidism. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 2016, **34**, 10-14 [cit. 2022-09-25]. ISSN 0946672X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtemb.2015.10.003
- [134] BROWN, KM a JR ARTHUR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutrition* [online]. 2001, **4**(2b), 593-599 [cit. 2022-09-06]. ISSN 1368-9800. Dostupné z: doi:10.1079/PHN2001143
- [135] HOOVÁ, Julie a kol. Digging deeper into the mother-offspring transfer of selenium through human breast milk. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2021, **99** [cit. 2022-09-06]. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2021.103870
- [136] KOÇ, F. a kol. The public health rationale for increasing dietary fibre: Health benefits with a focus on gut microbiota. *Nutrition Bulletin* [online]. 2020, **45**(3), 294-308 [cit. 2022-09-25]. ISSN 1471-9827. Dostupné z: doi:10.1111/nbu.12448
- [137] ADAM, Martin. Laboratoř analýzy potravin. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2020
- [138] FUJIHARA, S. a kol. Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Some Cereal Products in Japan. *Journal of Food Science* [online]. 2008, **73**(3), C204-C209 [cit. 2022-09-25]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00665.x

- [139] DAY, Li. Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security. *Trends in food science & technology* [online]. LONDON: Elsevier, 2013, **32**(1), 25-42 [cit. 2022-09-25]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2013.05.005
- [140] SAINI, R. K., N. P. SHETTY a P. GIRIDHAR. GC-FID/MS Analysis of Fatty Acids in Indian Cultivars of Moringa oleifera: Potential Sources of PUFA. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 2014, **91**(6), 1029-1034 [cit. 2022-09-25]. ISSN 0003-021X. Dostupné z: doi:10.1007/s11746-014-2439-9
- [141] ALAGAWANY, Mahmoud, Shaaban S. ELNESR a kol. Omega-3 and omega-6 fatty acids in poultry nutrition: Effect on production performance and health. *Animals (Basel)* [online]. BASEL: Mdpi, 2019, **9**(8), 573 [cit. 2022-09-25]. ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani9080573
- [142] TROESCH, Barbara, Manfred EGGERSDORFER a kol. Expert Opinion on Benefits of Long-Chain Omega-3 Fatty Acids (DHA and EPA) in Aging and Clinical Nutrition. *Nutrients* [online]. Switzerland: MDPI, 2020, **12**(9), 1-25 [cit. 2022-09-25]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12092555
- [143] CAETANO, Brunno F. R., Nelci A. DE MOURA, Ana P. S. ALMEIDA, Marcos C. DIAS, Katia SIVIERI a Luis F. BARBISAN. Yacon (Smallanthus sonchifolius) as a Food Supplement: Health-Promoting Benefits of Fructooligosaccharides. *Nutrients* [online]. BASEL: Mdpi, 2016, **8**(7), 436 [cit. 2022-09-25]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu8070436
- [144] OLIVEIRA, Ricardo Pinheiro de Souza. Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. *Journal of Food Engineering* [online]. 2011, **107**(1), 36-40 [cit. 2022-09-06]. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.06.005
- [145] RIEDER, Anne, Svein Halvor KNUTSEN a Simon BALLANCE. In vitro digestion of beta-glucan rich cereal products results in extracts with physicochemical and rheological behavior like pure beta-glucan solutions – A basis for increased understanding of in vivo effects. *Food hydrocolloids* [online]. OXFORD: Elsevier, 2017, **67**, 74-84 [cit. 2022-09-25]. ISSN 0268-005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2016.12.033
- [146] Vyhláška o požadavcích na extrakční rozpouštědla používaná při výrobě potravin: Vyhláška č. 253/2018 Sb. In: Praha, 2018, ročník 2018. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-253>
- [147] MANCUSO, Cesare a Rosaria SANTANGELO. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food and chemical toxicology* [online]. OXFORD: Elsevier, 2014, **65**, 185-195 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0278-6915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2013.12.024
- [148] MIN, Seon-young, Che-hwon PARK, Hye-won YU a Young-jin PARK. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of saponarin and its impact on signaling pathways of raw 264.7, rbl-2h3 and hacat cells. *International journal of molecular sciences* [online]. Basel: MDPI, 2021, **22**(16), 8431 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1661-6596. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22168431

- [149] SEIFERT, Sara M. akol. Health Effects of Energy Drinks on Children, Adolescents, and Young Adults. *Pediatrics* [online]. 2011, **127**(3), 511-528 [cit. 2022-09-27]. ISSN 0031-4005. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2009-3592
- [150] FIEDOR, Joanna a Květoslava BURDA. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients* [online]. 2014, **6**(2), 466-488 [cit. 2022-09-26]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu6020466
- [151] RUBIO, C. Metals in edible seaweed. *Chemosphere* [online]. 2017, **173**, 572-579 [cit. 2022-09-26]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.01.064
- [152] Singh, S., Kate, B. N., Banerjee, U. C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25 (3), 73-95.)
- [153] KOWALSKA-KROCHMAL, Beata a Ruth DUDEK-WICHER. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens* [online]. 2021, **10**(2) [cit. 2022-09-06]. ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens10020165
- [154] MOHAMMED, Zainab Abd Ameer, Haifaa M. JAWAD a Nada Mohammed REDA. The Effect of Algal Extract of Spirulina Platensis, Cladophora Glomerata on Some Positive and Negative Bacterial Isolates of Gram Stain. *NeuroQuantology* [online]. Bornova Izmir: NeuroQuantology, 2021, **19**(6), 67-72 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1303-5150. Dostupné z: doi:10.14704/nq.2021.19.6.NQ21070
- [155] SIMA, Ioana Anamaria a Costel SÂRBU. Evaluation of polyphenolic fingerprints and antioxidant profiles of wild fruits. *International journal of food science & technology* [online]. HOBOKEN: Blackwell Publishing, 2016, **51**(6), 1433-1440 [cit. 2022-09-28]. ISSN 0950-5423. Dostupné z: doi:10.1111/ijfs.13111
- [156] GRAJZER, Magdalena, Anna PRESCHA a kol. Characteristics of rose hip (*Rosa canina* L.) cold-pressed oil and its oxidative stability studied by the differential scanning calorimetry method. *Food chemistry* [online]. OXFORD: Elsevier, 2015, **188**, 459-466 [cit. 2022-09-28]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.034
- [157] BOCQUET, Laetitia, Sevser SAHPAZ, Natacha BONNEAU, a kol. Phenolic compounds from humulus lupulus as natural antimicrobial products: New weapons in the fight against methicillin resistant staphylococcus aureus, leishmania mexicana and trypanosoma brucei strains. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. BASEL: Mdpi, 2019, **24**(6), 1024-26 [cit. 2022-09-28]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24061024
- [158] POTEŠT, Marina a MONTESANO a kol. Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of *Moringa oleifera* Lam on lymphoid and monocytoid cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* [online]. 2019 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1792-0981. Dostupné z: doi:10.3892/etm.2019.7544
- [159] ARÉVALO-HÍJAR, Lucía. Antibacterial and Cytotoxic Effects of *Moringa oleifera* (*Moringa*) and *Azadirachta indica* (*Neem*) Methanolic Extracts against Strains of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Dentistry* [online]. 2018, **2018**, 1-5 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1687-8728. Dostupné z: doi:10.1155/2018/1071676
- [160] DANAEI, M. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* [online]. 2018, **10**(2) [cit. 2022-09-27]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057



- [161] Smith MC, Crist RM, Clogston JD. (2017) Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem.* 409: 5779-5787
- [162] PENG, Shengfeng, Liqiang ZOU, Wei LIU a kol. Fabrication and Characterization of Curcumin-Loaded Liposomes Formed from Sunflower Lecithin: Impact of Composition and Environmental Stress. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. WASHINGTON: American Chemical Society, 2018, **66**(46), 12421-12430 [cit. 2022-09-28]. ISSN 0021-8561.  
Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.8b04136
- [163] MIGUEL-JIMENEZ, Sara, Maria Montserrat RIVERA DEL ALAMO a kol. In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Animal reproduction science* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2020, **215**, 106315 [cit. 2022-09-28]. ISSN 0378-4320. Dostupné z: doi:10.1016/j.anireprosci.2020.106315
- [164] SHAO, Xiao-ru, Xue-qin WEI a kol. Effects of Micro-environmental pH of Liposome on Chemical Stability of Loaded Drug. *Nanoscale research letters* [online]. New York: Springer US, 2017, **12**(1), 504-504 [cit. 2022-09-28]. ISSN 1931-7573. Dostupné z: doi:10.1186/s11671-017-2256-9
- [165] ALLEN ZHANG, Jia-ai a John PAWELCHAK. Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions. Part 1: Lipid hydrolysis. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* [online]. AMSTERDAM: Elsevier, 2000, **50**(3), 357-364 [cit. 2022-09-28]. ISSN 0939-6411. Dostupné z: doi:10.1016/S0939-6411(00)00127-2
- [166] Vyhláška o požadavcích na konzervované ovoce a konzervovanou zeleninu, skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich a banány č. 397/2021 Sb. ze dne 29. 10. 2021
- [167] SORIA, A.C., M. BROKŁ a kol.. Sample Preparation for the Determination of Carbohydrates in Food and Beverages. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* [online]. Elsevier, 2012, 2012, 213-243 [cit. 2022-09-29]. ISBN 9780123813749. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-381373-2.00135-6
- [168] SANTOS, Nataly A. a kol. Commercial antioxidants and thermal stability evaluations. *Fuel* [online]. 2012, **97**, 638-643 [cit. 2022-09-30]. ISSN 00162361. Dostupné z: doi:10.1016/j.fuel.2012.01.074
- [169] ERTEM, Hatice a Songül ÇAKMAKÇI. Shelf life and quality of probiotic yogurt produced with *Lactobacillus acidophilus* and *Gobdin* [online]. 2018, **53**(3), 776-783 [cit. 2022-09-30]. ISSN 09505423. Dostupné z: doi:10.1111/ijfs.13653
- [170] KASPRZAK-DROZD, Kamila, a kol.. Beneficial effects of phenolic compounds on gut microbiota and metabolic syndrome. *International journal of molecular sciences* [online]. Switzerland: MDPI, 2021, **22**(7), 3715 [cit. 2022-10-06]. ISSN 1661-6596. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22073715

## 8 PŘÍLOHY

### Příloha 1 Stanovení koncentrace selenu v mateřském mléce a krevním séru matky a dítěte

#### A. Výsledky koncentrací selenu ve vzorcích kolostra

VZOREK	SELENOPROTEIN P	SELEN	SELEN
	ELISA	ELISA	2D-SEC-SECXSEC-AF-ICP-MS
	[ng·g <sup>-1</sup> ]	[ng·g <sup>-1</sup> ]	[ng·g <sup>-1</sup> ]
M_1	550,2 ± 71,5	7,70 ± 0,15	12,18 ± 0,28
M_2	360,6 ± 46,8	5,01 ± 0,10	19,84 ± 0,46
M_3	450,4 ± 58,5	6,33 ± 0,12	21,15 ± 0,49
M_4	460,3 ± 59,8	6,70 ± 0,13	18,55 ± 0,43
M_5	230,4 ± 29,9	3,163 ± 0,06	11,56 ± 0,26
M_6	500,2 ± 65	6,94 ± 0,13	28,74 ± 0,66
M_7	490,9 ± 63,7	6,87 ± 0,13	21,13 ± 0,49
M_8	500,3 ± 65	6,97 ± 0,13	25,55 ± 0,59
M_9	460,4 ± 59,8	6,32 ± 0,12	20,01 ± 0,46
M_10	130,5 ± 16,9	1,83 ± 0,03	13,15 ± 0,30
M_11	210,5 ± 27,3	3,02 ± 0,06	12,20 ± 0,28
M_12	460,6 ± 59,8	6,48 ± 0,12	20,16 ± 0,46
M_13	530,2 ± 68,9	7,45 ± 0,14	27,44 ± 0,63
M_14	280,3 ± 36,4	3,96 ± 0,07	16,36 ± 0,37
M_15	310,8 ± 40,3	4,26 ± 0,08	13,28 ± 0,30
M_16	660,4 ± 85,8	9,16 ± 0,17	16,56 ± 0,38
M_17	420,6 ± 54,6	5,84 ± 0,11	21,40 ± 0,49
M_18	380,8 ± 49,4	5,22 ± 0,10	17,96 ± 0,41
M_19	360,2 ± 46,8	4,97 ± 0,09	23,76 ± 0,55
M_20	340,3 ± 44,2	4,79 ± 0,09	15,44 ± 0,35

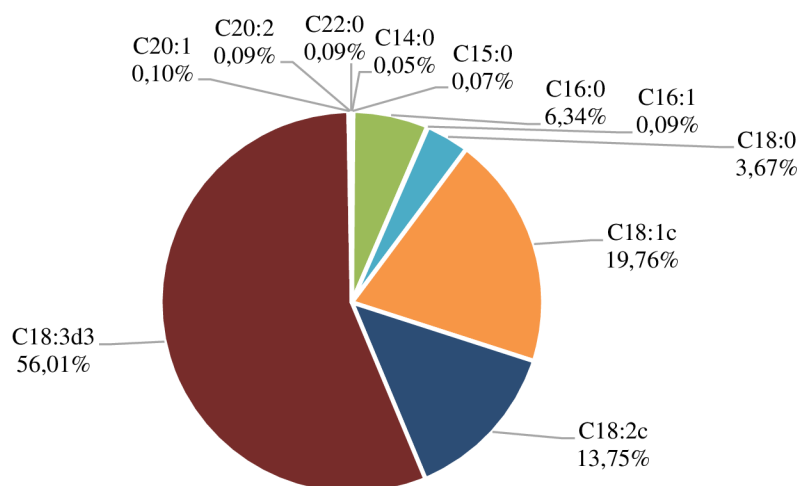
B. Výsledky koncentrací selenu ve vzorcích krevního séra matky

<b>VZOREK</b>	<b>SELENOPROTEIN P ELISA</b>	<b>SELEN ELISA</b>	<b>SELEN 2D-SEC-SECXSEC-AF-ICP-MS</b>
MS_1	1 450,1 ± 174,0	20,17 ± 0,34	51,34 ± 1,33
MS_2	3 430,6 ± 411,6	47,59 ± 0,81	55,04 ± 1,43
MS_3	2 490,4 ± 298,8	34,47 ± 0,58	67,33 ± 1,75
MS_4	1 370,4 ± 164,4	19,01 ± 0,32	65,01 ± 1,69
MS_5	1 230,9 ± 147,6	17,12 ± 0,29	65,20 ± 1,70
MS_6	1 010,1 ± 121,2	13,93 ± 0,24	52,40 ± 1,36
MS_7	910,1 ± 109,2	12,64 ± 0,21	65,41 ± 1,70
MS_8	2 160,0 ± 259,2	29,88 ± 0,51	56,13 ± 1,46
MS_9	980,1 ± 117,6	13,50 ± 0,23	61,35 ± 1,59
MS_10	1 570,5 ± 188,4	21,75 ± 0,37	60,24 ± 1,57
MS_11	880,4 ± 105,6	12,15 ± 0,21	57,67 ± 1,50
MS_12	1 790,6 ± 214,8	24,75 ± 0,42	51,81 ± 1,35
MS_13	1 730,6 ± 207,6	23,94 ± 0,41	65,20 ± 1,70
MS_14	1 540,2 ± 184,8	21,46 ± 0,36	67,13 ± 1,74
MS_15	1 490,3 ± 178,8	20,73 ± 0,35	52,14 ± 1,35
MS_16	2 380,2 ± 285,6	32,91 ± 0,56	51,85 ± 1,35
MS_17	1 580,0 ± 189,6	21,90 ± 0,37	34,34 ± 0,89
MS_18	1 670,1 ± 200,4	23,21 ± 0,39	41,06 ± 1,07
MS_19	920,3 ± 110,4	12,75 ± 0,22	59,26 ± 1,54
MS_20	1 290,6 ± 154,8	17,94 ± 0,30	63,17 ± 1,64

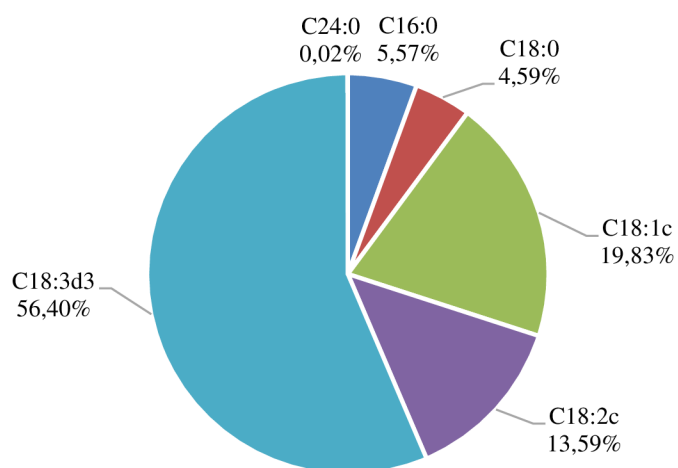
C. Výsledky koncentrací selenu ve vzorcích krevního séra dítěte

<b>VZOREK</b>	<b>SELENOPROTEIN P</b> ELISA	<b>SELEN</b> ELISA	<b>SELEN</b> 2D-SEC-SECXSEC-AF-ICP-MS
CS_1	900,1 ± 99,0	12,47 ± 0,19	25,61 ± 0,51
CS_2	1 100,2 ± 121,1	15,26 ± 0,23	38,36 ± 0,77
CS_3	770,4 ± 84,7	10,62 ± 0,16	35,02 ± 0,70
CS_4	660,4 ± 72,6	9,10 ± 0,14	28,70 ± 0,57
CS_5	1 100,2 ± 121	15,20 ± 0,23	29,00 ± 0,58
CS_6	570,2 ± 62,7	7,93 ± 0,12	39,31 ± 0,79
CS_7	570,0 ± 62,7	7,81 ± 0,12	36,13 ± 0,72
CS_8	880,3 ± 96,8	12,12 ± 0,18	32,94 ± 0,66
CS_9	990,3 ± 108,9	13,72 ± 0,21	38,91 ± 0,78
CS_10	1 200,2 ± 132	16,66 ± 0,25	27,01 ± 0,54
CS_11	460,4 ± 50,6	6,37 ± 0,09	36,96 ± 0,74
CS_12	900,4 ± 99,1	12,40 ± 0,19	34,54 ± 0,69
CS_13	560,2 ± 61,6	7,83 ± 0,12	29,00 ± 0,58
CS_14	1 040,2 ± 114,4	14,41 ± 0,22	38,16 ± 0,76
CS_15	800,1 ± 88,0	11,10 ± 0,17	32,26 ± 0,64
CS_16	1 000,0 ± 110,2	13,83 ± 0,21	31,64 ± 0,63
CS_17	930,2 ± 102,3	12,92 ± 0,19	34,35 ± 0,69
CS_18	810,4 ± 89,1	11,24 ± 0,17	38,95 ± 0,78
CS_19	930,6 ± 102,3	12,88 ± 0,19	33,27 ± 0,66
CS_20	890,7 ± 97,9	12,33 ± 0,18	33,08 ± 0,66

**Příloha 2** Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vzorku oleje získaného z Iněného semínka

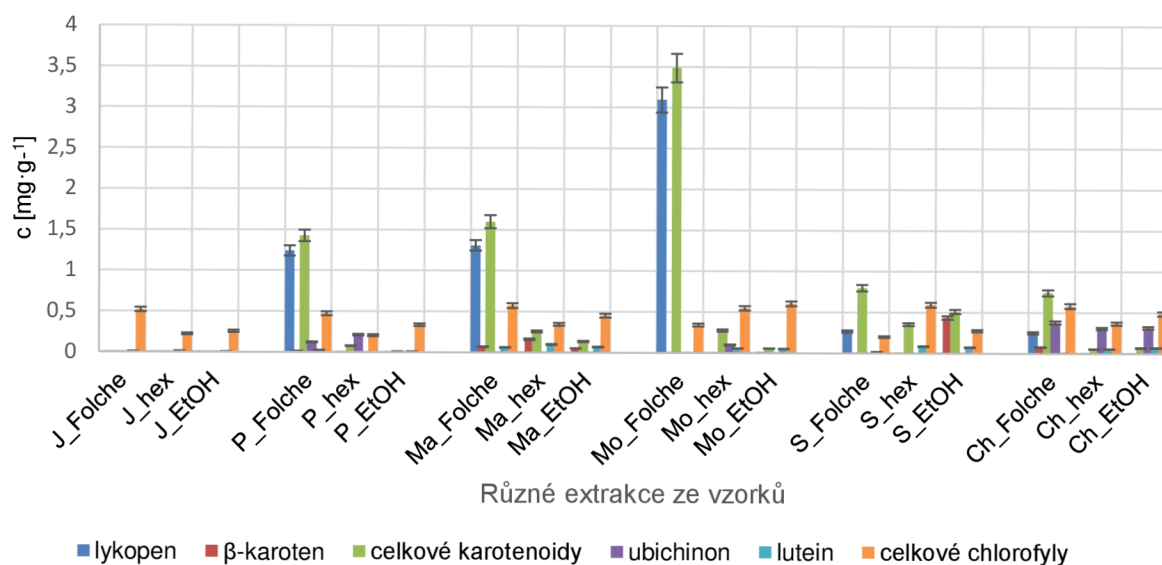


*A. Vzorek oleje Iněného semínka získaný extrakcí hexanem*



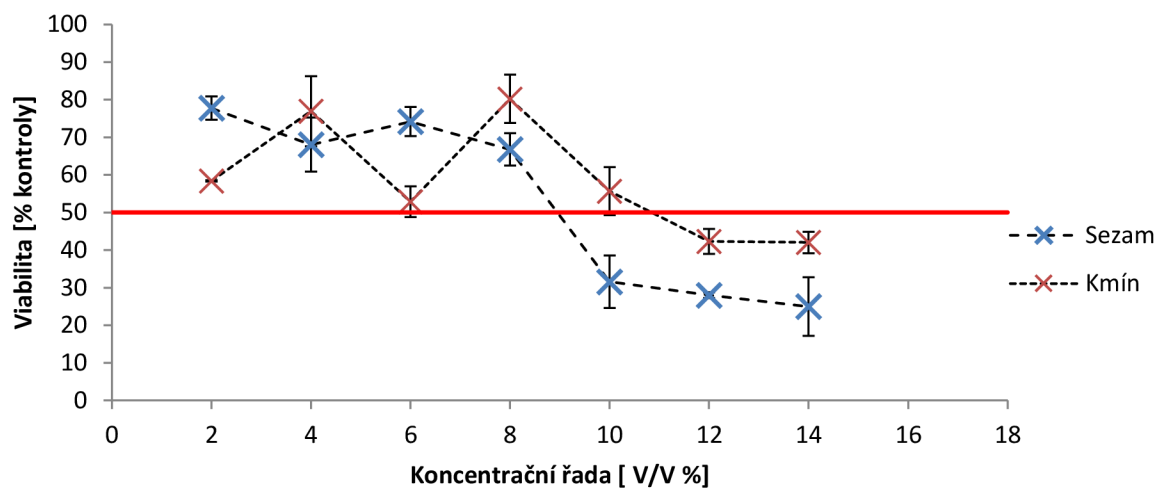
*B. Vzorek oleje Iněného semínka získaný lisováním za studena*

**Příloha 3** Extrakce karotenoidů, chlorofylů a ubichinonu různými rozpouštědly

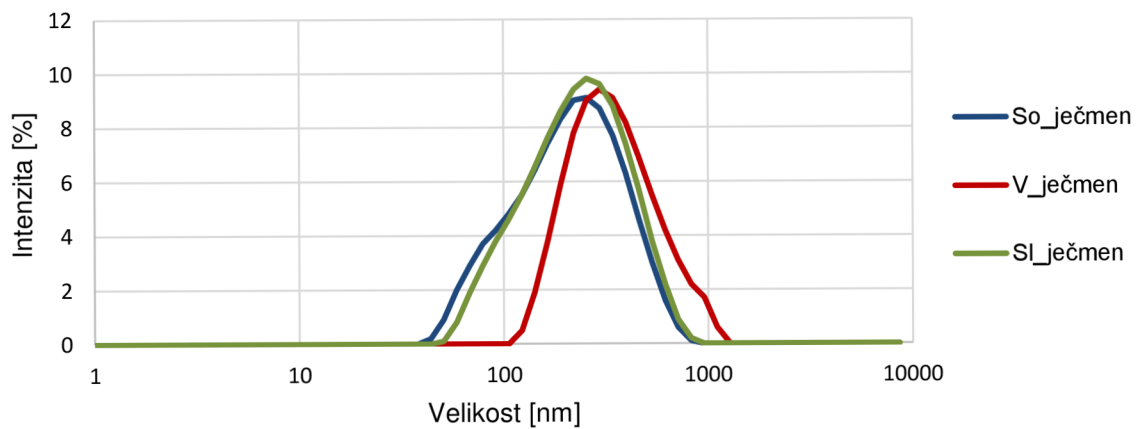


J.....ječmen  
P.....pšenice  
Ma.....matcha  
Mo.....moringa  
S.....spirulina  
Ch.....chlorela  
Folche.....extrakce chloroformem a methanolem  
Hex.....extrakce hexanem  
EtOH.....extrakce 96% ethanolem

**Příloha 4** MTT test vzorků sójových liposomů s enkapsulovanými lipidickými extrakty na buněčné linii Caco-2

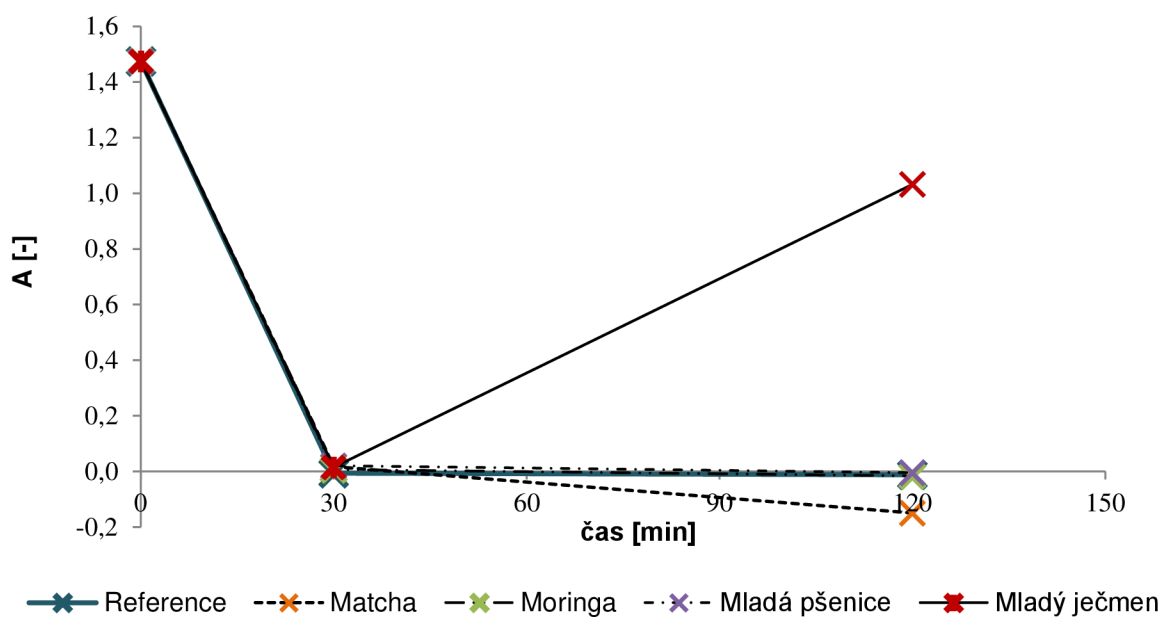


**Příloha 5** Analýza distribuce liposomů z lecithinu různého původu s enkapsulovanými extraktem mladého ječmene metodou DLS

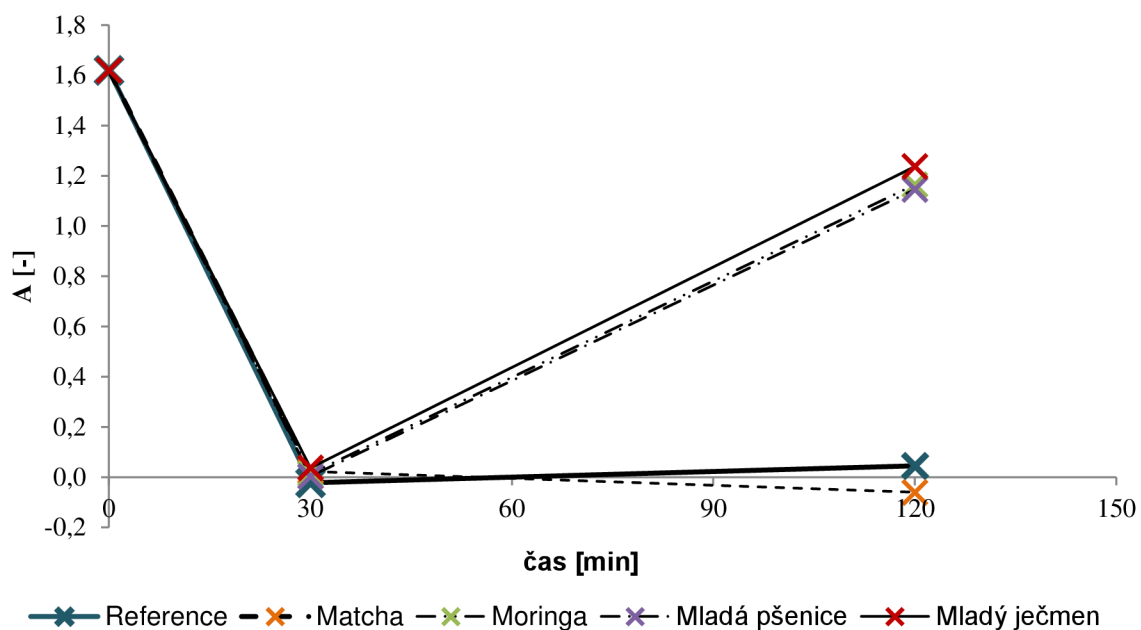




**Příloha 6** Růst buněk probiotických bakterií s vybranými probiotiky v průběhu modelového trávení



*A. Lactobacillus acidophilus*



*B. Lactobacillus casei*



## A. Dotazník pro senzorycké hodnocení doplňků stravy – Sada 2

Vážení hodnotitelé,  
zhodnoťte, prosím, předložené vzorky doplňků stravy.

**Hodnotitel** Student/Doktorand/Akademik

Datum:

Čas:

Zdravotní stav (zakroužkujte):    kuřák / nekuřák                                    muž / žena

Věk:

- a) 15–25 let
- b) 26–35 let
- c) 35 a více

**Jaké je Vaše stanovisko před ochutnáváním? (Želatinové bonbóny)**

- a) Nečokoládové cukrovinky na bázi želatiny mám velmi rád/a
- b) Nečokoládové cukrovinky na bázi želatiny mám rád/a
- c) Nečokoládové cukrovinky na bázi želatiny nemám příliš rád/a
- d) Nečokoládové cukrovinky na bázi želatiny nemám vůbec rád/a

**Jaký máte vztah k probiotickým preparátům? (Netýká se mléčných výrobků, jako je např.**

jogurt)

- 1. Probiotické preparáty užívám často
- 2. Probiotické preparáty užívám občas
- 3. Probiotické preparáty vůbec ne užívám

### **1a) Senzorické hodnocení vzorků pomocí stupnice**

Senzorycky zhodnoťte (oznámkujte jako ve škole):

- 1. Vynikající
- 2. Velmi dobrá
- 3. Dobrá
- 4. Uspokojivá
- 5. Nevyhovující

Kód vzorku	Vzhled a barva	Chuť	Vůně	Konzistence	Celkové hodnocení
E01					
E02					
E03					
E04					






**2a) Pořadový test**

(seřadte vzorky dle vlastních preferencí a případně uveďte poznámku k produktu)



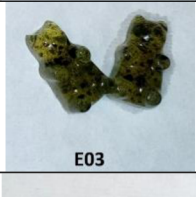

Číslo pořadí	Kód vzorku	Poznámka

**B. Výsledky senzoričké analýzy**

- Hodnocené vzorky– Sada 1

Kód	Složení probiotického preparátu	Vzhled
A01	+ sirup + jakon	
B01	+ sirup + chia vláknina	
C01	+ sirup	
D01	+ sirup + acerola	
E01	+ sirup + chlorela a spirulina	

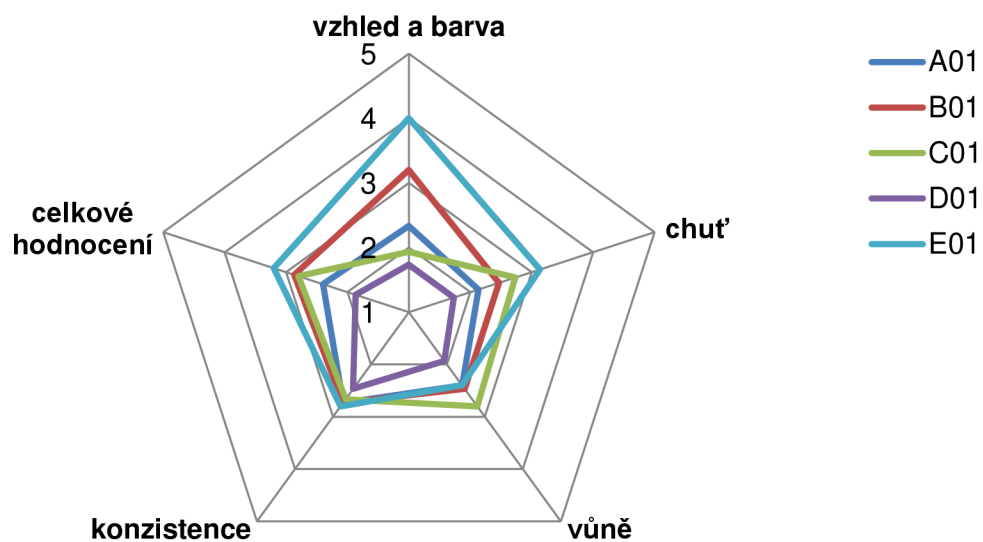
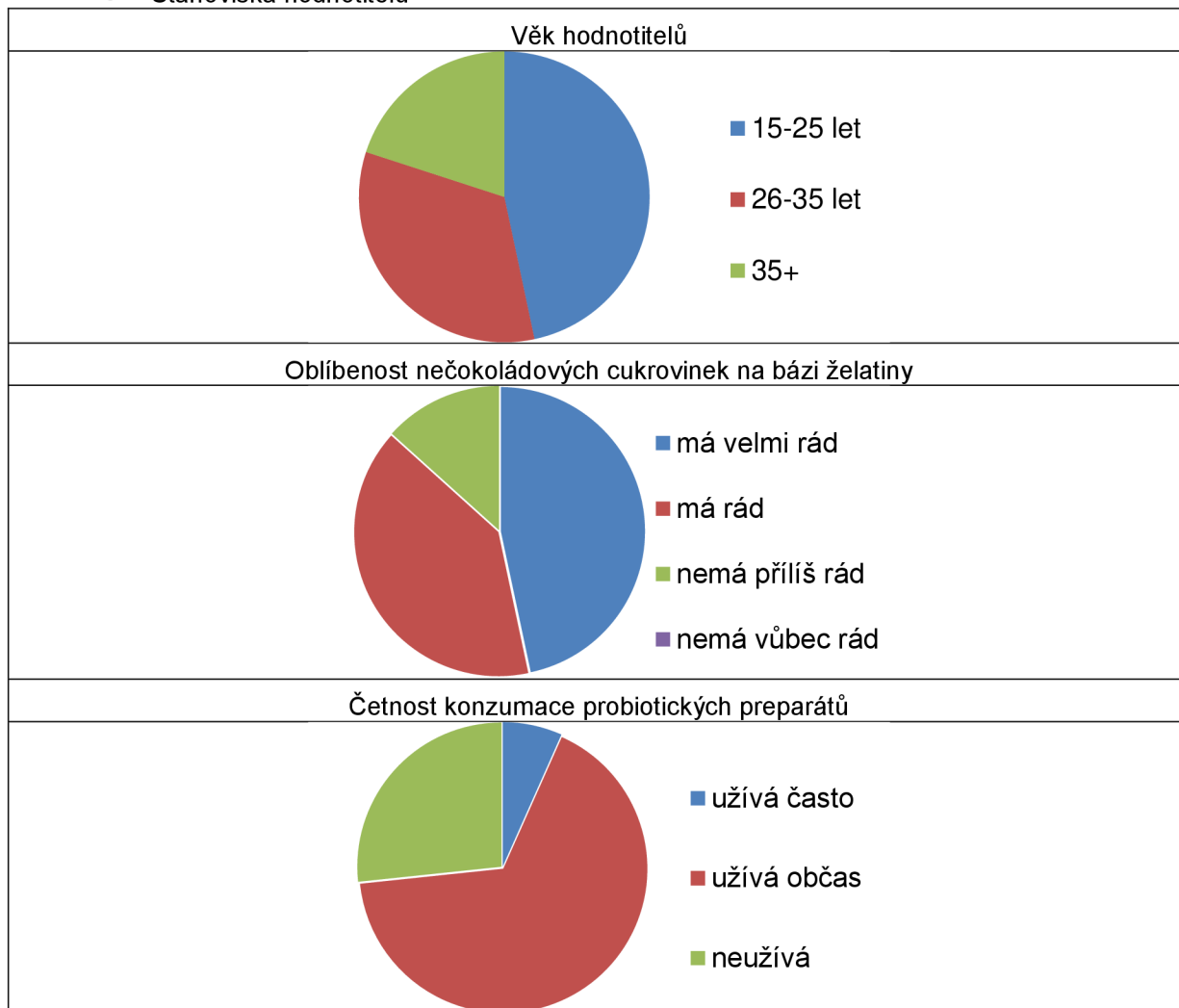
- Hodnocené vzorky– Sada 2

E01	Alginát : Agar (1:1)	3% roztok sirupu lesní směs s chlorellou a spirulinou	
E02		1,5% roztok sirupu lesní směs s chlorellou a spirulinou	
E03		3% roztok sirupu pomeranč s chlorellou a spirulinou	
E04		1,5% roztok sirupu pomeranč s chlorellou a spirulinou	

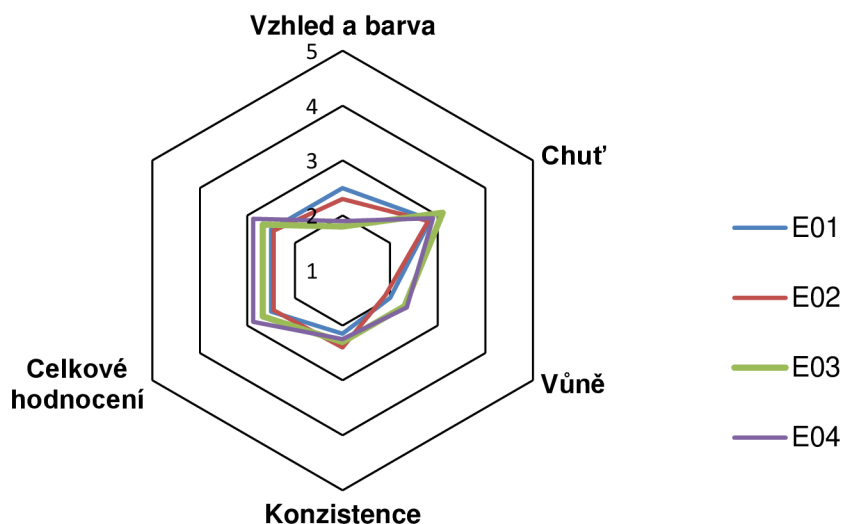
V rámci testování přijatelnosti vzorku pomocí senzorké analýzy, bylo sestaveno stupnicové hodnocení a byla hodnocena celková přijatelnost připravených vzorků nového typu doplňku stravy. Pro hodnocení vybraných deskriptorů byla využita pětibodová stupnice (1 vynikající → 5 nevyhovující). Hodnotitelé také měli za úkol v rámci pořadového testu označit nejlepší a nejhorší vzorek dle vlastních preferencí pro jednotlivé deskriptory, které již v této práci nebyly detailně zahrnuty.

Připravené návrhy probiotických preparátů s přídavkem rostlinné složky bylo hodnoceno 15 hodnotiteli a jejich stanoviska jsou znázorněna v následujících grafech.

- Stanoviska hodnotitelů



*Senzorické hodnocení připravených preparátů, 1 sada*



#### *Senzorické hodnocení připravených preparátů, 2 sada*

V první sadě vzorků byly testovány vzorky s přidavkem různých typů potenciálních probiotických složek. Známkami ze sensorického hodnocení byly zprůměrovány a znázorněny graficky.

Z výsledků této sensorické analýzy bylo patrné, že hodnotitelům celkově na vzorcích nevyhovoval vzhled přidaného materiálu, který byl vizuálně výrazný. Z tohoto důvodu nejlépe dopadly vzorky D01 a C01 se známkami pod 2. Nejhorší byl vyhodnocen vzorek E01 se známkou 3,2. Z hlediska hodnocení chuti byl opět nejlépe hodnocen vzorek D01 s průměrnou známkou 1,7. Na druhém místě se se známkou 2,1 umístil vzorek A01. Nejhorší byl hodnocen vzorek E01 s výslednou známkou 3,1. Ostatní vzorky byly v průměru hodnoceny jako dobré. Někteří hodnotitelé uváděli, že u vzorku E01 jim je nepříjemná nahořklá chuť shluklých částíček, tedy chlorelly a spiruliny. Totéž popisovali u vzorku B01, kdy se jim částice nerozpustné chia vlákniny dostávaly mezi zuby, což jim bylo nepříjemné. U vzorku C01 jim vadila málo sladká chuť. Dalším parametrem byla vůně připravených preparátů. I zde byl nejlépe hodnocen vzorek D01 s průměrnou známkou 1,9. Na druhém místě se se známkou 2,4 umístily vzorky A01 a E01. Naopak nejhorší byl se známkou 2,8 hodnocen vzorek C01. Na závěr byla hodnocena konzistence. U testovaných vzorků však nebyly pozorovány výrazné rozdíly v hodnocení jejich konzistence. Nejlépe byl ohodnocen vzorek D01. Obecně lze konstatovat, že hodnotitelům vadila málo sladká chuť vzorků a nahořklá chuť chia vlákniny a řas a sinic.

Na základě nízké oblíbenosti vzorku E01, byla vytvořena druhá sada pro optimalizaci a zvýšení přijatelnosti právě tohoto vzorku. Žádné hodnoty známek nepřesáhly 3,1, tudíž lze vzorky na základě hodnocení považovat za velmi dobré. Na základě celkového hodnocení se jako nejpříjemnější vzorek jevil E01 a E02 s hodnocením 2,5. Vzorky E03 a E04 byly ohodnoceny známkou 2,9. Další optimalizací by byl přidavek pouhých extraktů, avšak by se ztratila výhoda obsahu významné nerozpustné vlákniny. Z hlediska vzhledu a barvy byl nejlépe hodnocen vzorek E03 s průměrnou známkou 1,8. Velmi podobně byl hodnocen s výslednou známkou 1,9 vzorek E04. Na třetí místo se se známkou 2,3 zařadil vzorek E02. Naopak nejhorší byl známkou 2,5 hodnocen vzorek E01.

Dalším hodnotícím parametrem byla chuť. Zde byl nejlépe hodnocen vzorek E02 s průměrnou známkou 2,8, naopak nejhorší byl hodnocen vzorek E03 s výslednou známkou 3,1. U vzorku E04 hodnotitelé uváděli, že by ocenili sladší chuť. Jako třetí parametr byla hodnocena vůně jednotlivých vzorků. Zde byl nejlépe hodnocen vzorek E02 s průměrnou známkou 1,9, na druhém místě byl vzorek E01 hodnocený známkou 2. Na třetí místo byl ohodnocen vzorek E03 s hodnocením 2,3 a na

posledním místě se umístil vzorek E04 s hodnocením 2,4. Hodnotitelé u posledních dvou vzorků uváděli, že vzorky mají nepříjemnou „tráвовou“ vůni. Některým hodnotitelům tato vůně evokovala bylinkovou vůni, která jim byla příjemná. Nakonec byla u vzorků oznámkována jejich konzistence. Znamka všech vzorků se pohybovala mezi hodnotou 2,5–2,4, přičemž nejlépe byl hodnocen vzorek E01 a nejhůře vzorek E02.

## 9 ŽIVOTOPIS A PUBLIKAČNÍ ČINNOST



### Životopis

#### **Osobní informace**

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

#### **Vzdělání**

2017–současnost Doktorské studium  
Fakulta chemická, Chemie a technologie potravin – obor: Potravinářská chemie, Vysoké učení technické v Brně  
Disertační práce: Vývoj a testování přírodních složek potravin pro dětskou výživu.  
2020–2021 Vzdělávací kurz Veterinářství (Maturitní vysvědčení)  
2015–2017 Navazující magisterské studium  
Fakulta chemická, Chemie a technologie potravin – obor: Potravinářská chemie a biotechnologie, Vysoké učení technické v Brně  
Diplomová práce: Využití technik enkapsulace k přípravě výrobků určených pro dětskou výživu.  
2012–2015 Bakalářské studium  
Fakulta chemická, Chemie a technologie potravin – obor: Potravinářská chemie, Vysoké učení technické v Brně  
Bakalářská práce: Příprava a využití vybraných typů nanočástic v kosmetice.  
2008–2012 Masarykovo gymnázium Příbor, p.o.  
maturitní zkouška: český jazyk, matematika (státní), matematika, chemie, angličtina (školní)

#### **Pracovní zkušenosti**

1/2019–současnost Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ph.D. student – ÚCHPBT  
10/2017–12/2018 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, CMV, Ph.D. student – laboratoř biotechnologií

#### **Zahraniční stáže**

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

#### **Pedagogická činnost**

2022/2023 – zimní semestr Praktikum z biochemie  
2021/2022 – letní semestr Praktikum z kosmetologie, Praktikum z fyziologie a klinických metod  
2018/2019 – zimní semestr Praktikum z biochemie (náslechy)  
2017/2018 – zimní semestr Praktikum z biochemie (náslechy)



**HOOVÁ, J.**; STREČANSKÁ, P.; SKOUMALOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Probiotic viability and content of phytochemicals in fermented white cabbage juice. 2022.

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

**HOOVÁ, J.**; SKOUMALOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. *Influence of potential modern prebiotics on probiotic growth*. 2021. s. 75-75.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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