

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Stanovení dietární vlákniny v potravinách

Diplomová práce

Bc. Lucie Kolínová

Výživa a potraviny

prof. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení dietární vlákniny v potravinách" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce paní prof. Ing. Lence Kouřimské, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení práce a za čas, který mi při psaní práce věnovala. Také bych chtěla poděkovat paní Ing. Petře Škvorové za odborné rady, trpělivost a za veškerou spolupráci při tvorbě této práce. Dále bych ráda poděkovala paní Ing. Ivě Kučerové, Ph.D. za pomoc v laboratoři při stanovení dietární vlákniny na přístroji ANKOM^{TDF}. A na závěr bych chtěla poděkovat mému příteli, rodině a kamarádům za podporu během celého mého studia.

Stanovení dietární vlákniny v potravinách

Souhrn

Dietární vláknina má ověřený pozitivní vliv na zdraví člověka. Klíčovou vlastností dietární vlákniny je její nestravitelnost v tenkém střevě a následný přechod do tlustého střeva, kde je zcela či částečně fermentovaná střevní mikrobiotou za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem. Literární rešerše této diplomové práce byla zaměřena zejména na metody stanovení dietární vlákniny. Fyzikální variabilita složek a chemická složitost vlákniny v různých potravinách a různé techniky zpracování potravin způsobují obtížné zvolení vhodné metody. Pro stanovení obsahu dietární vlákniny v potravinách lze metody rozdělit do základních tří kategorií: neenzymaticko–gravimetrické, enzymaticko–gravimetrické a enzymaticko–chemické, které lze dále rozdělit na metody enzymaticko–kolorimetrické a enzymaticko–chromatografické. Pro stanovení dietární vlákniny jsou nejpoužívanější metody AOAC enzymaticko–gravimetrické a metody enzymaticko–chemické, zejména Englystova metoda.

Praktická část této diplomové práce byla zaměřena na implementaci a validaci metody AOAC do laboratorní praxe. Pro stanovení dietární vlákniny ve vybraných vzorcích snídaňových cereálií byl použit přístroj ANKOM Dietary Fiber Analyzer a analytická metoda byla zvolena AOAC 991.43. Tato metoda byla zkoušena na České zemědělské univerzitě v Praze poprvé. Jelikož metoda nebyla od výrobce dostatečně popsána, muselo být odzkoušeno její fungování, což se neobešlo bez poměrně velkých problémů. Bylo nutné upravit původní metodiku a znovu vše odzkoušet. Dále byla u 5 vzorků snídaňových cereálií stanovena hrubá vláknina pomocí přístroje ANKOM²⁰⁰.

U vzorku Emco super myslí s ořechy a mandlemi bylo pomocí metody AOAC 991.43 naměřeno 3,1 % rozpustné dietární vlákniny a 5,5 % nerozpustné dietární vlákniny. Výsledná hodnota celkové dietární vlákniny byla 8,6 %. Metoda byla implementována. Podařilo se vytvořit upravenou standardizovanou metodiku, která do budoucna značně usnadní další použití této metody. Stanovením hrubé vlákniny ve vzorcích snídaňových cereálií bylo zjištěno, že nejvyšší hodnota hrubé vlákniny byla naměřena u vzorku Bonavita Dobrá vláknina (2,84 %) a nejnižší hodnota byla naměřena u vzorku Emco super myslí s ořechy a mandlemi (1,16 %).

Největším nedostatkem originální metodiky od firmy ANKOM jsou instrukce k podpůrným analytickým stanovením (stanovení dusíkatých látek a stanovení popela). Jelikož v průběhu implementace metody došlo k mnoha analytickým problémům, které se vyskytly především při procesu mineralizace a při následné destilaci a titraci na přístroji Kjeltec, bylo by dobré, kdyby výrobce doplnil podrobnější instrukce. V této práci byly výsledné hodnoty celkové dietární vlákniny ve snídaňových cereáliích nižší než hodnoty, které výrobce deklaruje na etiketě výrobku. Metodiku stanovení je tedy do budoucna třeba ještě optimalizovat pro dané reálné potravinové matrice.

Souhrnně lze říct, že stanovení dietární vlákniny pomocí přístroje ANKOM^{TDF} metodou AOAC 991.43 je složité, nákladné a časově náročné. Nicméně tato metoda je používána jako standardní, a proto je vhodné ji použít pro rutinní analytické stanovení dietární vlákniny v potravinách.

Klíčová slova: dietární vláknina, nerozpustná vláknina, validace metody

Determination of dietary fiber in food

Summary

Dietary fiber has a proven positive effect on human health. A key characteristic of dietary fiber is its indigestibility in the small intestine and subsequent passage to the large intestine, where it is fully or partially fermented by the intestinal microbiota to form short-chain fatty acids. The literature search of this thesis focused mainly on methods for the determination of dietary fiber. The physical variability of the constituents and chemical complexity of dietary fiber in different foods and the different food processing techniques make it difficult to choose a suitable method. For the determination of dietary fiber in foods, methods can be divided into three basic categories: non-enzymatic-gravimetric, enzymatic-gravimetric and enzymatic-chemical, which can be further subdivided into enzymatic-colorimetric and enzymatic-chromatographic methods. For the determination of dietary fiber, the most commonly used methods are the AOAC enzymatic-gravimetric and enzymatic-chemical methods, especially the Englyst method.

The practical part of this thesis focused on the implementation and validation of the AOAC method in laboratory practice. The ANKOM Dietary Fiber Analyzer was used to determine dietary fiber in selected breakfast cereal samples and the chosen analytical method was AOAC 991.43. This method was tested at the Czech University of Agriculture in Prague for the first time. Since the method was not sufficiently described by the manufacturer, its operation had to be tested, which was not without rather big problems. It was necessary to modify the original methodology and test everything again. Furthermore, the crude fiber was determined in 5 samples of breakfast cereals using the ANKOM²⁰⁰ instrument.

For the Emco super myslí s ořechy a mandlemi, 3,1 % soluble dietary fiber and 5,5 % insoluble dietary fiber was measured using the AOAC 991.43 method. The resulting value of total dietary fiber was 8,6 %. The method has been implemented. A modified standardized methodology has been developed which will greatly facilitate the future use of this method. The determination of crude fiber in the breakfast cereal samples revealed that the highest crude fiber value was measured in the Bonavita Dobrá vláknina sample (2.84 %) and the lowest value was measured in the Emco super myslí s ořechy a mandlemi sample (1.16 %).

The biggest shortcoming of the original ANKOM methodology is the instructions for the supporting analytical determinations (nitrogen and ash determination). As there were many analytical problems during the implementation of the method, especially during the mineralization process and the subsequent distillation and titration on the Kjeltac, it would be useful if the manufacturer would add more detailed instructions. In this thesis, the resulting values of total dietary fiber in breakfast cereals were lower than the values declared by the manufacturer on the product label. Therefore the methodology needs to be optimized for the given real food matrices in the future.

In summary, the determination of dietary fiber using the ANKOM^{TDF} instrument by the AOAC 991.43 method is difficult, expensive and time consuming. However, it is a standard method often used, therefore it is appropriate for routine analytical determination of dietary fiber in food.

Keywords: dietary fiber, insoluble fiber, method validation

Obsah

1	Úvod	9
2	Cíle práce a vědecké hypotézy	10
2.1	Cíle práce	10
2.2	Vědecké hypotézy	10
3	Literární rešerše	11
3.1	Dietární vláknina	11
3.1.1	Historie	11
3.1.2	Definice dietární vlákniny	11
3.1.3	Složení a rozdělení dietární vlákniny	12
3.2	Fyziologické účinky a zdravotní přínosy dietární vlákniny	12
3.3	Doporučený denní příjem dietární vlákniny	13
3.4	Výživová a zdravotní tvrzení dietární vlákniny	13
3.4.1.1	Výživová tvrzení	14
3.4.1.2	Zdravotní tvrzení	14
3.5	Zdroje dietární vlákniny	15
3.6	Biologická dostupnost minerálních látek	15
3.7	Vláknina jako doplněk stravy	16
3.8	Metody stanovení vlákniny	16
3.8.1	Stanovení dietární vlákniny	16
3.8.1.1	Neenzymaticko–gravimetrické metody	17
3.8.1.2	Enzymaticko–gravimetrické metody	18
3.8.1.3	Enzymaticko–chemické metody	19
3.8.2	Porovnání Englystovy metody s metodou AOAC 985.29	20
3.8.3	Analyzátory stanovení vlákniny	22
3.8.3.1	ANKOM Dietary Fiber Analyzer	22
3.8.3.2	ANKOM ²⁰⁰	22
3.8.3.3	Fibertec TM	23
4	Metodika	24
4.1	Analyzované vzorky	24
4.2	Stanovení dietární vlákniny	28
4.2.1	Stanovení dietární vlákniny přístrojem ANKOM Dietary Fiber Analyzer	28
4.2.1.1	Použité přístroje a pomůcky	28
4.2.1.2	Použité chemikálie	28
4.2.1.3	Postup	29

4.2.2	Výpočet.....	30
4.2.3	Stanovení popela.....	32
4.2.3.1	Použité přístroje a pomůcky.....	32
4.2.3.2	Postup.....	32
4.2.4	Stanovení dusíkatých látek.....	32
4.2.4.1	Použité přístroje a pomůcky.....	32
4.2.4.2	Použité chemikálie.....	32
4.2.4.3	Postup.....	32
4.3	Stanovení hrubé vlákniny přístrojem ANKOM²⁰⁰.....	34
4.3.1	Použité přístroje a pomůcky.....	34
4.3.2	Použité chemikálie.....	34
4.3.3	Postup.....	34
4.3.3.1	Příprava materiálu.....	34
4.3.3.2	Příprava roztoků.....	34
4.3.3.3	Práce na přístroji ANKOM ²⁰⁰	35
4.3.4	Výpočet.....	36
4.4	Statistická analýza.....	36
5	Výsledky.....	37
5.1	Stanovení hrubé vlákniny přístrojem ANKOM²⁰⁰.....	37
5.2	Stanovení dietární vlákniny metodou AOAC 991. 43.....	38
5.3	Upravená metodika pro stanovení dietární vlákniny metodou 991. 43 přístrojem ANKOM^{TDF}.....	39
5.3.1	Příprava vzorku, křemeliny a sáčků (SDF a IDF).....	39
5.3.2	Příprava roztoků.....	39
5.3.3	Práce na přístroji ANKOM ^{TDF}	39
5.3.4	Stanovení dusíkatých látek.....	40
5.3.4.1	Mineralizace.....	41
5.3.4.2	Destilace a titrace.....	41
5.3.5	Stanovení popela.....	41
6	Diskuse.....	42
6.1	Problémy při implementaci metody.....	42
6.1.1	Stanovení dusíkatých látek.....	42
6.1.1.1	První pokus.....	42
6.1.1.2	Druhý pokus.....	43
6.1.1.3	Třetí pokus.....	43
6.2	Porovnání analyticky stanovených hodnot.....	44

7 Závěr.....	45
8 Literatura	46

1 Úvod

Dietární vláknina je důležitou součástí lidské výživy. Má ověřený pozitivní vliv na lidské zdraví, její úloha tkví především v prevenci, ale i léčbě některých onemocnění. Pojem vláknina je souhrnné označení pro skupinu sloučenin, které se odlišují strukturou, velikostí a složením. Různé typy dietární vlákniny vykazují rozdílné zdravotní přínosy a mohou mít jednu nebo více fyziologických funkcí. Z tohoto důvodu je doporučeno přijímat dietární vlákninu z různých zdrojů.

Celosvětově neexistuje univerzální definice vlákniny. Avšak společným prvkem definic a klíčovou vlastností vlákniny je její nestravitelnost v tenkém střevě a následný přechod do tlustého střeva, kde je zcela či částečně fermentovaná střevní mikrobiotou. Nedostatečný příjem dietární vlákniny je problémem veřejného zdraví. Obecné doporučení příjmu dietární vlákniny je pro dospělého člověka 25–30 g na den.

Stanovení dietární vlákniny v potravinách je komplexním problémem, který je spojen s definicí vlákniny. Navrhování vhodných metod pro stanovení dietární vlákniny je díky chemické složitosti vlákniny velmi obtížné. Pro stanovení obsahu dietární vlákniny v potravinách lze metody rozdělit do základních tří kategorií: Neenzymaticko–gravimetrické, enzymaticko–gravimetrické a enzymaticko–chemické. V současné době se pro stanovení dietární vlákniny v potravinách nejčastěji používají enzymaticko–gravimetrické metody AOAC a enzymaticko–chemické metody, především Englystova metoda.

2 Cíle práce a vědecké hypotézy

2.1 Cíle práce

Hlavním cílem diplomové práce bylo implementovat a validovat současnou AOAC metodu pro stanovení dietární vlákniny a vyzkoušet praktické měření vzorků. Dále bylo potřeba zjistit, zda metoda funguje a upravit ji na naše podmínky. Následně byly analyticky stanovené hodnoty dietární vlákniny ve snídaňových cereáliích porovnány s hodnotami, které deklaruje výrobce.

2.2 Vědecké hypotézy

Hypotéza 1: Experimentálně zjištěné hodnoty dietární vlákniny odpovídají hodnotám uváděným pro danou potravinu v databázích nutričních hodnot.

Hypotéza 2: Pro stanovení dietární vlákniny v potravinách je přístroj ANKOM Dietary Fiber Analyzer vhodný pro každodenní praxi.

Hypotéza 3: Metoda AOAC 991.43 je vhodná pro rutinní analytické stanovení dietární vlákniny v potravinách.

3 Literární rešerše

3.1 Dietární vláknina

3.1.1 Historie

Historické zmínky o vláknině jsou již z období starověkého Řecka, kdy Hippokrates řekl, že celozrnný chléb vytváří objemnější stolici než chléb z bílé mouky. V té době byl objasněn fyziologický význam vlákniny, jako prevence a zmírnění zácpy (Dai & Chau 2017).

V roce 1953 britský lékař Eban Hipsley jako první zmiňuje pojem „dietární vláknina“ v jeho článku, kde mimo jiné zjišťuje, zda nedostatek vlákniny ve stravě může být příčinou těhotenské toxémie (Hipsley 1953).

V 70. letech britští vědci Burkitt a Trowell navrhli hypotézu o dietární vláknině a koncept civilizačních chorob. Burkitt propojil myšlenky z řad oborů spolu s pozorováními z vlastní zkušenosti a navrhl radikální pohled na roli vlákniny v lidském zdraví (Cummings et al. 2018). Na základě pozorování a srovnání výskytu onemocnění a příjmu vlákniny v Africe a ve Spojeném království, Burkitt doporučil zvýšit příjem vlákniny díky jejím pozitivním fyziologickým účinkům na zdraví člověka, například zlepšení funkce střev (Grey 2006). Burkitt se svým příběhem o vláknině vycházel především z prací tří lékařů, jedním z nich byl H. Trowell, který jako první definoval dietární vlákninu, další byli P. Cleave a GD Campbell. Jeho inspirací byl také chirurg N. Painter a biochemik A. Walker. Jejich návrhem bylo, že strava s nízkým obsahem vlákniny zvyšuje riziko obezity, diabetu, ischemické choroby srdeční, zubního kazu, onemocnění tlustého střeva, divertikulózy či apendicitidy. Zjištění, že tyto nemoci mají společnou příčinu bylo naprosto průlomové. Za hypotézu dietární vlákniny byla Burkittovi připisována zásluha a stal se známý jako „Fibre Man“ (Cummings et al. 2018).

V roce 1972 Trowell poprvé definoval vlákninu jako složky rostlinné buněčné stěny, které jsou odolné vůči trávicím enzymům člověka. Mezi složky vlákniny zahrnul celulózu, hemicelulózu, pektin a lignin. Později roku 1976 definici rozšířil o nestravitelné rostlinné materiály, které nejsou součástí buněčné stěny. Například guarová a karubová guma, slizy a polysacharidy z řas – karagenany a algináty (National Research Council (US) Committee on Diet and Health 1989).

3.1.2 Definice dietární vlákniny

Určení jednotné definice vlákniny je velice náročné, jelikož je vláknina skupinou různých sloučenin, nelze ji definovat jako jednu chemickou látku. Jednotlivé složky vlákniny mají svou charakteristickou chemickou strukturu a vykazují specifické fyziologické účinky na lidské zdraví (Fuller et al. 2016).

Celosvětově neexistuje univerzální definice vlákniny. Dle Buttriss & Stokes (2008) je to především kvůli neshodě ohledně látek rostlinného původu, které by měly být v definici zahrnuty. S tím se však pojí i použití analytické metody, která se využívá ke stanovení hodnot vlákniny (Buttriss & Stokes 2008). Celkově mají definice vlákniny část společných prvků, avšak stále obsahují rozdíly, které se týkají stupně polymerace, fyziologických účinků a vztahu k potravinám a zpracování potravin (Fuller et al. 2016).

Definice se dále liší zahrnutím různých minoritních složek, například nestravitelných oligosacharidů či ligninu. Společným prvkem definic a klíčovou vlastností vlákniny je nestravitelnost v tenkém střevě a následný přechod do tlustého střeva, kde je zcela či částečně fermentovaná střevní mikrobiotou. Většina definic je v souladu s analytickými metodami, které jsou schválené Asociací oficiálních analytických chemiků (AOAC) (Buttriss & Stokes 2008). Definice dietární vlákniny pocházejí například od Codex Alimentarius Commission, Americké asociace cereálních chemiků, Health Council of the Netherlands a Institute of Medicine (Grey 2006). Podrobněji o definici vlákniny je již napsáno v mé bakalářské práci Význam vlákniny v humánní výživě (Kolínová 2020).

3.1.3 Složení a rozdělení dietární vlákniny

Dietární vláknina je skupina složek potravy, které jsou v tenkém střevě nestravitelné a jsou částečně nebo zcela fermentované v tlustém střevě za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem. Mohou být také označovány jako neškrobové polysacharidy nebo komplexní sacharidy. Dietární vláknina je zkoumána ve dvou skupinách, složky rozpustné a nerozpustné ve vodě. Rozdělení je založeno na fyzikálních, chemických a funkčních vlastnostech vlákniny. Většina potravin, které jsou zdrojem vlákniny, obsahuje přibližně dvě třetiny nerozpustné vlákniny a jednu třetinu vlákniny rozpustné. Dietární vlákninu je možné rozdělit do mnoha různých frakcí zahrnujících pektiny, beta-glukany, hemicelulózu, celulózu, rezistentní škroby, inulin, arabinoxylany a lignin. Dietární vláknina má mnoho příznivých účinků na lidské zdraví a vykazuje dobré technologické a funkční vlastnosti (Ötles & Ozgoz 2014).

Jednotlivé složky vlákniny jsou podrobně rozebrány v mé bakalářské práci Význam vlákniny v humánní výživě (Kolínová 2020).

3.2 Fyziologické účinky a zdravotní přínosy dietární vlákniny

Příjem vlákniny přináší pro lidský organismus zdravotní výhody, které zahrnují snížení rizika vzniku obezity, diabetu 2. typu, cévní mozkové příhody, hypertenze, ischemické choroby srdeční a některých gastrointestinálních poruch. Prospěšné účinky má dietární vláknina také na snížení hladiny glukózy v krvi, snížení cholesterolu v krvi, regulaci tělesné hmotnosti a má prebiotickou funkci, čímž příznivě ovlivňuje imunitní systém (Anderson 2009).

Dietární vláknina má vliv na celý gastrointestinální trakt, tedy od úst až po konečník. Rozpustná vláknina v žaludku vytváří viskózní roztok, zpomaluje vyprazdňování žaludku, čímž prodlužuje pocit nasycení a zpomaluje průchod tráveniny tenkým střevem. Zatímco nerozpustná vláknina dokáže vodu absorbovat a díky tomu zvětšuje objem potravy, má pozitivní vliv na peristaltiku střeva a urychluje střevní pasáž, čímž dochází k omezenému styku karcinogenu se sliznicí střeva. Dietární vláknina na sebe dokáže navázat žlučové kyseliny a zabránit tak tvorbě micel, čímž se zvyšuje vylučování žlučových kyselin i cholesterolu stolicí. V tlustém střevě dochází k fermentaci vlákniny a produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (BCFA), které potlačují patogenní kolonizaci, mohou měnit motorickou aktivitu, zabraňují sekreci vody a v konečném důsledku tak podporují imunitní systém (Anderson 2009; Qi 2019). Fyziologický význam vlákniny pro lidský organismus a choroby spojené

s nedostatkem vlákniny jsou podrobně rozebrány v mé bakalářské práci Význam vlákniny v humánní výživě (Kolínová 2020).

3.3 Doporučený denní příjem dietární vlákniny

Institute of Medicine doporučuje denní příjem dietární vlákniny v rozmezí 19–38 g v závislosti na věku a pohlaví (Quagliani & Felt-Gunderson 2017). Obecné doporučení dostatečného příjmu vlákniny ve stravě je dle Institute of Medicine 14 g na 1000 kcal, což v přepočtu činí přibližně 25 g vlákniny denně pro ženy a 38 g vlákniny denně pro muže (Anderson 2009, Lambeau & McRorie 2017). Dle EFSA (2017) má strava s obsahem dietární vlákniny příznivé účinky na lidské zdraví při denním příjmu dietární vlákniny pro dospělého člověka alespoň 25 g (EFSA 2017).

Národní průzkumy spotřeby naznačují, že dostatečný příjem dietární vlákniny konzumuje přibližně 5 % americké populace, přičemž v české populaci je situace velice podobná (Quagliani & Felt-Gunderson 2017). V americké populaci dospělých se pohybuje konzumace dietární vlákniny přibližně 15 g denně a u lidí s nízkosacharidovou dietou je příjem ještě nižší (Lambeau & McRorie 2017). Nedostatečný příjem dietární vlákniny je problémem veřejného zdraví a může být způsoben například špatnou orientací veřejnosti v dobrých zdrojích vlákniny, mylnou představou o naplnění doporučeného příjmu dietární vlákniny nebo potravinovými trendy jako jsou bezlepkové diety, které mají přirozeně nízký obsah vlákniny (Quagliani & Felt-Gunderson 2017).

Dále je potřeba se více věnovat vlivu zpracování potravin na složení a obsah vlákniny, například vaření, pečení, sušení, konzervování a dalším procesům úpravy a skladování potravin, které značně ovlivňují obsah, složení a kvalitu vlákniny (Phillips et al. 2019).

3.4 Výživová a zdravotní tvrzení dietární vlákniny

Podmínky pro použití zdravotních a výživových tvrzení stanovuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin, které je platné pro všechny státy Evropské unie. Nařízení bylo reakcí na základě vzrůstajícího počtu potravin, u kterých se v reklamě či při označování využívají zdravotní a výživová tvrzení. Hlavním požadavkem je, aby potraviny, které jsou uváděné na trh byly bezpečné a byly řádně označeny (Gabrovská 2017).

Cílem tohoto nařízení je regulovat zdravotní a výživová tvrzení na etiketách potravin, jak v reklamě, tak i při označování. Tvrzení by měla být srozumitelná a podložená vědeckými důkazy. Nařízení se dále snaží zajistit vysokou úroveň ochrany spotřebitelů. Předmětem tvrzení mohou být látky, které mají výživový či fyziologický účinek, například vitamíny, minerály, aminokyseliny, vláknina a další (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006).

Velké množství tvrzení o účincích dané potraviny se považovalo za vědecky nepodložené a sporné, nebyl u nich prokázán pozitivní vliv nebo vědecké výsledky nebyly shodné. U látek, které jsou předmětem tvrzení je nutné zajistit, aby bylo prokázáno, že mají pozitivní fyziologický či výživový účinek (Gabrovská 2017).

V Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 (2006) byly sestaveny podmínky k zajištění pravdivosti použitých zdravotních a výživových tvrzení:

- V konečném produktu musí být látka, o které je tvrzení napsané, v dostatečném množství, aby bylo dosaženo požadovaných účinků nebo v něm obsažena není nebo je obsažena ve sníženém množství.
- Účinná látka by měla být v produktu obsažena v takovém množství, u kterého lze předpokládat, že bude konzumováno.
- Látka by měla být využitelná pro organismus (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006).

3.4.1.1 Výživová tvrzení

Pojem výživové tvrzení zahrnuje všechna tvrzení uvádějící, naznačující nebo ze kterých vyplývá, že má potravinu prospěšné výživové vlastnosti. V důsledku, že potravinu obsahuje živinu ve sníženém, zvýšeném množství nebo ji neobsahuje vůbec nebo poskytuje energetickou hodnotu. Dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 mezi schválená výživová tvrzení pro vlákninu patří:

- **Zdroj vlákniny:** Tvrzení lze použít pouze v případě, kdy produkt ve 100 g obsahuje alespoň 3 g vlákniny nebo pokud produkt obsahuje na 100 kcal alespoň 1,5 g vlákniny.
- **S vysokým obsahem vlákniny:** Toto tvrzení lze použít pouze v případě, kdy produkt ve 100 g obsahuje alespoň 6 g vlákniny nebo pokud produkt obsahuje na 100 kcal alespoň 3 g vlákniny (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006).

3.4.1.2 Zdravotní tvrzení

Pojem zdravotní tvrzení zahrnuje všechna tvrzení uvádějící, naznačující nebo ze kterých vyplývá, že je určitá souvislost mezi potravinou, kategorií potravin nebo její složkou a lidským zdravím (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006). Potravinám se nesmí připisovat vlastnosti léčby či prevence onemocnění, které stále náleží pouze léčivům a případně i zdravotnickým prostředkům (Společnost pro výživu 2013).

Zdravotních tvrzení, která se vztahují k vláknině existuje celá řada. Při uvedení zdravotního tvrzení na obalu potravin, případně v reklamě, je nutné uvádět i stanovené omezující podmínky (Suková 2014).

Příklady schválených zdravotních tvrzení, která se vztahují k vláknině:

„Vláknina z pšeničných otrub přispívá k urychlení střevního tranzitu a zvýšení objemu stolice.“

Podmínky: Tvrzení lze použít pouze u potravin s vysokým obsahem této vlákniny. Dle tvrzení „S vysokým obsahem vlákniny“, které je popsáno výše v textu. Zároveň je důležité informovat spotřebitele, že uváděného účinku se dosáhne při příjmu alespoň 10 g vlákniny z pšeničných otrub za den.

„Pektiny přispívají k udržení normální hladiny cholesterolu v krvi.“

Podmínky: Tvrzení lze použít pouze u potravin poskytujících 6 g pektinu za den. Zároveň je důležité informovat spotřebitele, že pozitivního účinku se dosáhne při příjmu 6 g pektinu za den (Gabrovská 2017).

Schválená zdravotní tvrzení, která se vztahují přímo k beta-glukanům:

„Beta-glukany přispívají k udržení normální hladiny cholesterolu v krvi.“

Podmínky: Tvrzení lze použít pouze v případě, kdy potravina obsahuje alespoň 1 g beta-glukanu z ovsy, ječmene, ovesných a ječných otrub nebo jejich směsi v kvantifikované porci. Zároveň je důležité informovat spotřebitele, že příznivého účinku se dosáhne při příjmu 3 g beta-glukanů za den (Suková 2014).

Další zdravotní tvrzení o beta-glukanech: *„Beta-glukan z ječmene snižuje hladinu cholesterolu v krvi.“* a *„Ovesný beta-glukan snižuje hladinu cholesterolu v krvi.“* (Gabrovská 2017).

3.5 Zdroje dietární vlákniny

Dietární vláknina se přirozeně vyskytuje v rostlinných potravinách. U jednotlivých potravin se značně liší složení a množství vlákniny. Jedním z hlavních zdrojů vlákniny jsou obilná zrna a výrobky z nich, které tvoří přibližně 50 % celkového příjmu vlákniny ve stravě v západních zemích. Složení a obsah dietární vlákniny v mlýnských obilných výrobcích se liší dle typu zpracování, druhu obilovin a rozsahu rafinace zrn. Příkladem značné ztráty dietární vlákniny je odstranění otrub při mletí obilných zrn. V obilovinách se nacházejí převážně hemicelulózy, beta-glukany, arabinoxylany, celulóza, pektiny a glykoproteiny. Nejvyšší obsah beta-glukanů mají zrna ovsy a ječmene, beta-glukany mají příznivý vliv na snížení hladiny cholesterolu v krvi.

Dobrym zdrojem dietární vlákniny jsou také ovoce a zelenina, u kterých jsou hlavními složkami pektiny, hemicelulózy, celulóza a z menší části i lignin a glykoproteiny. Příjem vlákniny ze zeleniny tvoří přibližně 30–40 % a z ovoce přibližně 16 %. Další potraviny, které jsou zdrojem vlákniny jsou luštěniny, ořechy, semínka a pseudocereálie (Dhingra et al. 2012; Esteban et al. 2017). Podrobnosti o jednotlivých zdrojích vlákniny již byly sepsány v mé bakalářské práci Význam vlákniny v humánní výživě (Kolínová 2020).

3.6 Biologická dostupnost minerálních látek

U určitých zdrojů vlákniny bylo zjištěno, že snižují vstřebávání některých minerálních látek. Jedná se především o potraviny, které jsou bohatým zdrojem vlákniny a zároveň mají vysoký obsah fytové kyseliny.

Naopak při příjmu vysoce fermentovatelné vlákniny došlo ke zlepšenému vstřebávání minerálních látek, konkrétně železa, hořčíku a vápníku, a to i v přítomnosti nízké koncentrace fytové kyseliny. Studie ukazují, že vysoce fermentovatelná vláknina, především inulin a fruktooligosacharidy podporují vstřebávání minerálů v tlustém střevě (Ötles & Ozgoz 2014).

Studie Greenwood prokázala, že strava s vysokým obsahem vlákniny není spojena s horším stavem mikroživin u lidské populace, která konzumuje běžnou stravu (Fuller et al. 2016).

Dále bylo prokázáno, že při určitém příjmu prebiotické vlákniny, především fruktanů, dochází ke zvýšenému vstřebávání vápníku. Roční studie probíhající u sta dospívajících, která zahrnovala užívání 8 g inulinu s krátkým a dlouhým řetězcem, prokázala značné zvýšení vstřebávání vápníku, které následně vedlo ke zvýšené hustotě minerálních látek v kostech (Slavin 2013).

3.7 Vláknina jako doplněk stravy

Dle Lambeau & McRorie (2017) jsou suplementy vlákniny vhodným a koncentrovaným zdrojem vlákniny, avšak většina z nich neposkytuje dané zdravotní výhody, které jsou s vlákninou spojovány. V současnosti je na trhu velké množství výrobků z vlákniny. Mohou obsahovat přírodní vlákninu, především inulin z kořene čekanky, psyllium získané ze slupek semene jitrocele indického a beta-glukany z ova či ječmene. Druhou skupinou jsou doplňky stravy, které obsahují synteticky vytvořený produkt, například polydextrózu, což je syntetický polymer sorbitolu a glukózy, methylcelulózu neboli chemicky upravenou dřevitou buničinu a pšeničný dextrin, což je upravený pšeničný škrob.

Klinické důkazy podporují, že viskózní vláknina, psyllium a beta-glukany, účinně snižují zvýšený cholesterol v krvi a u lidí s výskytem diabetu 2. typu a u pacientů s metabolickým syndromem zlepšuje kontrolu glykémie. Nerozpustná vláknina (otruby z pšenice) a neviskózní rozpustná vláknina (inulin a pšeničný dextrin) tyto zdravotní přínosy závislé na viskozitě vlákniny neposkytuje (Lambeau & McRorie 2017).

Klinicky prokázané zdravotní výhody suplementů vlákniny jsou spojeny s určitými vlastnostmi vlákniny, především s její viskozitou. Z dostupných doplňků stravy s vlákninou poskytuje zdravotní výhody jen menšina (McRorie 2015).

3.8 Metody stanovení vlákniny

Při výběru metody je důležité se zamyslet, jaký je účel stanovení, jaké je složení výrobku a myslet i na časovou a finanční náročnost metody. Stanovení obsahu vlákniny je závislý na použité metodě, proto je vždy důležité uvést metodu, která byla použita pro zjištění obsahu vlákniny (Polák 2008). Stanovení vlákniny v potravinách je komplexním problémem, který je spojen s definicí vlákniny. Metody stanovení dietární vlákniny se dělí do základních tří kategorií: Neenzymaticko–gravimetrické, enzymaticko–gravimetrické a enzymaticko–chemické, které lze dále rozdělit na metody enzymaticko–kolorimetrické a enzymaticko–chromatografické. V současné době se pro stanovení vlákniny v potravinách nejčastěji používají enzymaticko–gravimetrické metody AOAC a enzymaticko–chemické metody, především Englystova metoda. Pro veterinární studie se používá především metoda Van Soesta (Elleuch 2011).

3.8.1 Stanovení dietární vlákniny

Navrhování vhodných metod pro stanovení dietární vlákniny je obtížné. Fyzikální variabilita složek a chemická složitost vlákniny v různých potravinách a různé techniky

zpracování potravin způsobují obtížné zvolení vhodné metody. Dle Mongeau & Brooks (2016) jsou mnohé ze současných postupů stanovení celkové dietární vlákniny založeny na práci Southgate (Mongeau & Brooks 2016; Southgate 1969).

3.8.1.1 Neenzymaticko–gravimetrické metody

Neenzymaticko–gravimetrické metody patří mezi nejstarší používané metody a jsou vhodné pro stanovení hrubé vlákniny, neutrální a kyselé detergentní vlákniny. Hrubá vláknina je složena ze zbytků po chemickém rozkladu oxidativním či hydrolytickým zpracováním. Metodou není možné stanovit vlákninu rozpustnou ve vodě (Elleuch 2011).

3.8.1.1.1 Metoda dle Henneberga a Stohmanna

Weendenská analýza zahrnuje metodu stanovení podle Henneberga a Stohmanna, která stanovuje především obsah hrubé vlákniny. Principem této analýzy je vážkové stanovení vlákniny jako zbytek vzorku po dvoustupňové hydrolýze a odečtení obsahu popela. Analýza začíná třicetiminutovým vařením vzorku krmiva v 5% roztoku kyseliny sírové, poté je vzorek promýván teplou vodou až do neutrální reakce. Dále je vzorek povařen 30 minut v 5% roztoku hydroxidu draselného. Vzorek je znovu promyt teplou vodou a pevný zbytek je převeden na filtrační papír, na kterém se vzorek promyje acetonem, vysuší se, ochladí se a na závěr se zváží. Poté se dá připravený vzorek do muflové pece, kde se spálí při 550 °C. Po ochlazení se získaný popel zváží a odečte se od hmotnosti zbytku (Štercová et al. 2012).

Tato metoda byla dříve přijata AOAC jako metoda pro stanovení obsahu vlákniny v krmivech pro zvířata. Využitelnost této metody je však omezena ztrátou rozpustných a některých nerozpustných polysacharidů a části ligninu. Dalším omezením je částečné zahrnutí dusíkatého materiálu do konečného zbytku (Institute of Medicine 2001). Jako přesnější metoda pro stanovení vlákniny v krmivech se používá metoda neutrální a kyselé detergentní vlákniny (Štercová et al. 2012).

3.8.1.1.2 Metoda Van Soesta

Metoda Van Soesta zdokonalila postup stanovení vlákniny metodou kyselé detergentní vlákniny. Stanovuje vlákninu jako součet celulózy, hemicelulózy nerozpustné v kyselině a ligninu. Oproti tomu metoda neutrálního detergentu stanovuje vlákninu jako součet celulózy, hemicelulózy nerozpustné v neutrálním detergentu a ligninu (Elleuch 2011).

Metoda kyselé detergentní vlákniny využívá silné kyseliny k hydrolýze polysacharidů, celulóza a lignin však nejsou v kyselině rozpustné a jsou tak jedinými složkami kyselé detergentní vlákniny. Další polysacharidy buněčné stěny tato metoda nezahrnuje, a proto není vhodná pro použití v lidské výživě (Institute of Medicine 2001).

Metoda neutrální detergentní vlákniny je vhodná pro měření nerozpustné vlákniny a ligninu. Jako první poskytla spolehlivý odhad těchto hlavních složek dietární vlákniny, avšak gravimetrické měření je necitlivé a tato metoda není vhodná pro potraviny, které jsou bohaté na rozpustnou vlákninu (Dhingra et al. 2012).

3.8.1.2 Enzymaticko–gravimetrické metody

Enzymaticko–gravimetrické metody zahrnují enzymatické odstranění škrobu a bílkovin, vysrážení rozpustné vlákniny pomocí vodného ethanolu, vážení a izolaci zbytků dietární vlákniny, korekci na bílkoviny a minerální látky neboli popele (Dhingra et al. 2012).

3.8.1.2.1 Enzymaticko–gravimetrická Proskyho metoda AOAC

Pod vedením Proskyho měli vědci za úkol, převést definici dietární vlákniny na použitelné metody, které by podpořily předpisy pro označování potravin. Konečná ověřená metoda byla přesná díky tomu, že simulovala lidské trávení a odpovídala podmínkám uvedených v definici dietární vlákniny, odolnost vůči trávení, použitelnost v kompetentních laboratořích ve světě a použitelnost pro všechny potraviny. Přesnost byla hodnocena na základě schopnosti metody plně strávit škroby a bílkoviny, odstranění tuku z potraviny a zanechání složek vlákniny, například beta-glukanů, pektinů a hemicelulóz. Tato kritéria splňovaly enzymaticko–gravimetrické metody a následně byla vytvořena jediná standardizovaná metoda (DeVries & Rader 2005). Od roku 1985 je hlavní uznávanou oficiální metodou pro stanovení celkové dietární vlákniny enzymaticko–gravimetrická metoda AOAC 985.29 (Grey 2006). AOAC Proskyho metoda 985.29 je vhodná pro stanovení polysacharidů, některých typů rezistentních škrobů, ligninu a dalších sloučenin – fenolových sloučenin, vosků a produktů Maillardovy reakce, avšak oligosacharidy a některé typy rezistentních škrobů není možné touto metodou stanovit (Elleuch 2011).

Zjištění a uznání skutečnosti, že nestravitelné oligosacharidy a rezistentní škrob se z fyziologického hlediska také chovají jako dietární vláknina způsobilo přehodnocení definice dietární vlákniny a následné přehodnocení metod jejího stanovení. Americká asociace cereálních chemiků (AACC) jmenovala vědeckou kontrolní komisi, jejímž úkolem bylo přezkoumat a případně aktualizovat definici dietární vlákniny. Byly organizovány semináře a byla vytvořena interaktivní webová stránka přes kterou byly přijímány připomínky z celého světa. Dále byl sestaven panel díky Food and Nutrition Board of the Institute of Health a National Academy of Science. Jeho účelem bylo vypracovat navrhovanou definici vlákniny. Závěrem bylo, že je nutné přehodnotit používané metody pro měření dietární vlákniny, provést příslušné změny a pro zaplnění mezer najít nové vhodné metody (McCleary 2003).

Díky rozšíření definice dietární vlákniny bylo vyvinuto a přijato mnoho dalších metod, které jsou schválené AOAC (Asociace oficiálních analytických chemiků) a AACC (Americkou asociací cereálních chemiků). Metody musí splňovat přísná, specifikovaná výkonnostní kritéria. Díky vyvinutým novějším metodám je možné měřit širokou škálu složek dietární vlákniny, včetně nestravitelných oligosacharidů, rezistentního škrobu a nestravitelných syntetizovaných sacharidových polymerů (Grey 2006).

Mezi enzymaticko–gravimetrickými metodami byly zjištěny hlavní rozdíly týkající se podmínek analýzy, především teploty reakce, času a použitých enzymů. Lee et al. roku 1992 provedli změny v enzymaticko–gravimetrické metodě AOAC. Jejich cílem bylo zlepšit přesnost metody a zkrátit dobu analýzy. V metodě byl nahrazen fosfátový pufr za organický pufr MES–TRIS (Garbelotti 2003).

Dle DeVries & Rader (2005) nastala první velká modifikace metody 985.29 v návaznosti na prodej sady enzymů od určitého výrobce pro metodu 985.29. Enzymy splňovaly požadavky

na aktivitu, ale obsahovaly nečistoty, které se při analýze spojovaly s fosfátem pufrů za vzniku sraženiny s vlákninou. Nečistota enzymů vedla k variabilním a vysokým hodnotám slepých pokusů, které u ostatních dodavatelů enzymů nebyly viditelné. Použití pufrů MES–TRIS eliminovalo problém s ko-precipitací, a tak byl problém částečně vyřešen. Použitím organických pufrů místo fosfátových pufrů došlo k upravení metody 985.29 na metodu 991.43 (DeVries & Rader 2005).

McCleary et al. kolem roku 2010 vyvinuli novou metodu, která vychází z oficiálních metod AOAC (985,29; 991,43; 2001,03 a 2002.02). Metoda zahrnuje stanovení nestravitelných oligosacharidů a rezistentního škrobu ve vysokomolekulární rozpustné a nerozpustné vláknině (Elleuch 2011).

3.8.1.3 Enzymaticko–chemické metody

Principem enzymaticko–chemické analýzy je enzymatické odstranění škrobu, oddělení rozpustných polysacharidů dietární vlákniny od cukrů s nízkou molekulovou hmotností a konečných produktů hydrolyzy škrobu pomocí srážení 80% ethanolem (McCleary 2003).

V hydrolyzovaných polysacharidech lze obsah neutrálních cukrů stanovit plynovou rozdělovací chromatografií (GLC) nebo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Dále se kolorimetricky stanoví jednotlivé monosacharidy a uronové kyseliny. Pro celkové cukry lze použít pouze spektrofotometrii. Zbytek po hydrolyze nerozpustných či celkových polysacharidů je izolován filtrací a je kvantifikován jako Klason lignin. Celková dietární vláknina je součtem neškrbových polysacharidů a Klason ligninu (Elleuch 2011).

3.8.1.3.1 Metoda Southgate

Southgate roku 1969 vyvinul postup, který vychází z principů Widdowson & McCance z roku 1935, při kterém u stejného vzorku byla postupně provedena kompletní sacharidová analýza cukrů, škrobů, ligninu, celulózy a necelulóзовých polysacharidů. Stanovuje tedy rozpustnou i nerozpustnou vlákninu a zahrnuje i odhad obsahu ligninu, avšak byly zde zaznamenány problémy s úplným odstraněním škrobu a se specifickými kolorimetrickými reakcemi pro uronové kyseliny, pentózy a hexózy (Dhingra et al. 2012; McCleary 2003).

3.8.1.3.2 Uppsalova metoda

Metoda Uppsalova AOAC 994.13 zahrnuje měření uronových kyselin, neutrálních cukrů a Klason ligninu neboli nerozpustného zbytku po kyselé hydrolyze. Celková hodnota dietární vlákniny se získá součtem těchto složek. U vzorku se nejprve odstraní škrob pomocí amylázy a amyloglukosidázy (Grey 2006). Celkovou vlákninu vysrážíme pomocí 80% ethanolu a centrifugou je následně odstředěna. Rozpustná a nerozpustná vláknina je hydrolyzována pomocí kyseliny sírové. Neutrální cukry jsou stanoveny kapalinovou chromatografií, Klason lignin gravimetricky a uronové kyseliny kolorimetricky (Elleuch et al. 2011).

3.8.1.3.3 Englystova metoda

Englystova metoda vychází z extrakční metody Southgate. Englyst pomocí plynové chromatografie aplikoval přímé měření cukru, což výrazně zlepšilo specifčnost této metody. Důležitým faktem je, že tato metoda neměří lignin (Dhingra et al. 2012).

Výhodou Englystovy metody je jasná identifikace složek, které jsou klasifikované jako neškrobové polysacharidy, odděleně nestravitelné oligosacharidy a rezistentní škrob, bez větší interference mezi metodami. Avšak velkou nevýhodou u této metody je sporná reprodukovatelnost (Grey 2006).

3.8.2 Porovnání Englystovy metody s metodou AOAC 985.29

Pro tabulky složení potravin je ve Spojeném království měřena dietární vláknina Englystovou metodou. Metoda AOAC 985.29 udává v porovnání s Englystovou metodou výrazně vyšší hodnoty vlákniny, především u potravin, které mají vyšší obsah škrobu, například chléb, brambory, kukuřičné lupínky či fazole. Důvodem je získání frakce rezistentního škrobu RS3 jako dietární vlákniny. Dalším důvodem nižších hodnot u Englystovy metody je, že nezahrnuje v analýze lignin, který se vyskytuje například v celozrnných obilovinách. Díky tomu je nutné si uvědomit, že hodnoty v tabulkách potravin a výživová doporučení získané Englystovou metodou se budou značně lišit a nebudou se shodovat s hodnotami, které jsou deklarované na etiketách potravinářských výrobků, které jsou založeny na enzymaticko–gravimetrických metodách AOAC (Grey 2006).

Elleuch et al. (2012) stanovoval obsah vlákniny v obalech sezamových semen metodou enzymaticko–gravimetrickou AOAC a enzymaticko–chemickou metodou. Metoda AOAC zahrnovala neškrobové polysacharidy, rezistentní škroby a lignin a metoda enzymaticko–chemická zahrnovala neškrobové polysacharidy a Klason lignin. Výsledky ukázaly, že při stanovení metodou AOAC je obsah vlákniny ve vzorku 1,3krát vyšší než obsah vlákniny, který byl stanoven metodou enzymaticko–chemickou. Rozdíl je však velmi vysoký a není možné, aby byl vysvětlen pouze množstvím rezistentního škrobu. Dle Wolterse et al. (1992) by u metody AOAC mohl být rozdíl způsoben nadhodnocením množství vlákniny, koprecipitací oligosacharidů a produktů Maillardovy reakce, a u metody enzymaticko–chemické kvůli nižšímu množství vlákniny z důvodu ztráty polysacharidů při hydrolýze (Elleuch et al. 2012; Wolters et al. 1992).

Hlavní metody stanovení dietární vlákniny včetně měřených složek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Hlavní metody pro stanovení dietární vlákniny (Grey 2006)

Název metody	Typ metody	Měřené složky
Celková dietární vláknina (TDF)	Enzymaticko–gravimetrická AOAC 985.29 AOAC 991.43	Rozpustné a nerozpustné polysacharidy – včetně rezistentního škrobu (RS3) a ligninu
Englystova metoda pro neškrobové polysacharidy	Enzymaticko–chemická nebo plynová rozdělovací chromatografie (GLC) nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	Neškrobové polysacharidy
Englystova metoda pro rezistentní škroby	Enzymatická	Rezistentní škroby
Metoda Uppsala AOAC 994.13	Enzymaticko–chemická	Rozpustné a nerozpustné polysacharidy–včetně rezistentního škrobu (RS3) a ligninu
AOAC 995.16 AACC 32–33 AOAC 997.08	Enzymatická	Beta–glukany
AOAC 999.03	Enzymatická a ionexová chromatografie	Fruktany – oligofruktany, deriváty inulinu, fruktooligosacharidy
AOAC 2000.11	Enzymatická a kolorimetrie	Fruktany – oligofruktany, deriváty inulinu, fruktooligosacharidy
AOAC 2001.02	Vysokoúčinná chromatografie na měničích aniontů (HPAEC)	Polydextróza
AOAC 2001.03	Vysokoúčinná chromatografie na měničích aniontů s pulzní amperometrickou detekcí (HPAEC–PAD)	Trans–galaktooligosacharidy
AOAC 2002–02 AACC 37.42	Enzymatická, gravimetrická a kapalinová chromatografie	Celková dietární vláknina v potravinách obsahující rezistentní maltodextriny
	Enzymatická	Rezistentní škroby a vláknina z řas

3.8.3 Analyzátory stanovení vlákniny

Pro stanovení vlákniny se dnes již využívají analyzátory, které napomáhají automatizaci celého procesu. Snižují náklady a zvyšují přesnost (ANKOM technology).

3.8.3.1 ANKOM Dietary Fiber Analyzer

ANKOM Dietary Fiber Analyzer (obr. 1) je účinným pomocníkem pro kontrolu kvality, nutričního značení a výzkumu. Automatizace analytické metody stanovení dietární vlákniny snižuje náklady na práci i na vzorek a zároveň zvyšuje preciznost a přesnost. Vícekanálové čerpadlo, které je řízené počítačem, automatizuje přidávání enzymů, chemických roztoků a oplachů. Úrovně míchání a teplota jsou řízeny v průběhu celé analýzy, díky tomu se snižuje potřeba několika vodních lázní. Advanced Filter Bag Technology zvětšuje plochu filtračního povrchu, díky čemuž se zkrátí doba potřebná k filtraci vzorků a snižuje se tak použití kelímků a vakuových baněk. Příkladem jsou vzorky ovesných otrub, které se trvale filtrují za přibližně dvě minuty. Propracovaný systém umožňuje uživateli provádět analýzy rozpustné dietární vlákniny (SDF), nerozpustné dietární vlákniny (IDF) a celkové dietární vlákniny (TDF) samostatně, v průběhu filtrace není třeba manipulace technika (ANKOM technology).



Obrázek 1: Analyzátor vlákniny ANKOM Dietary Fiber Analyzer (ANKOM technology)

3.8.3.2 ANKOM²⁰⁰

ANKOM²⁰⁰ (obr. 2) je analyzátor vlákniny, který je schopen analyzovat širokou škálu vzorků. Je vhodný pro stanovení neutrální a kyselý detergentní vlákniny a pro stanovení hrubé vlákniny především pro krmiva a píče. Tento přístroj je velmi přesný a je opakovaně dosaženo konzistentních výsledků. Díky filtračním sáčkům je možné analyzovat až 24 vzorků najednou. Jeho výhodou je, že snižuje náklady na pracovní sílu a oproti konkurenčním alternativám je cenově velice výhodný (ANKOM technology).



Obrázek 2: Analyzátor vlákniny ANKOM²⁰⁰ (ANKOM technology)

3.8.3.3 FibertecTM

FibertecTM 8000 (obr. 3) je plně automatizovaný a používá se především pro referenční analýzy krmivářské vlákniny. Jeho velkou výhodou je, že snižuje čas obsluhy na 2 minuty. Díky minimálnímu lidskému zásahu do analýzy jsou výsledky konzistentnější. Přístroj je schopen zpracovat až 6 vzorků najednou a zajišťuje dávkování činidel a odpěňovače, zahřívání, proplachování vodou a regulaci vytápění. Přístroj je vhodný pro stanovení hrubé vlákniny, neutrální a kyselý detergentní vlákniny, kyselého detergentního ligninu a pro stanovení dietární vlákniny podle oficiálních standardů AOAC, ISO, EC, metoda van Soest a van Weende (MILCOM servis).



Obrázek 3: Analyzátor vlákniny FibertecTM 8000 (MILCOM servis)

4 Metodika

4.1 Analyzované vzorky

Pro stanovení dietární vlákniny bylo vybráno 5 vzorků snídaňových cereálií, u kterých výrobce na obalu deklaruje vysoký obsah vlákniny. Všechny vzorky byly zakoupeny v tržní síti.

Vzorek č. 1 (Obr. 4): Emco super myslí bez přidaného cukru s ořechy a mandlemi

Výrobce na etiketě deklaruje následující složení výrobku: „Celozrnné ovesné vločky 46 %, vláknina z kořene čekanky 19 %, řepkový olej, pšeničná mouka, kukuřično-pšeničná krupka (kukuřičná krupice, pšeničná mouka, pšeničná krupice, kukuřičná mouka), lískové ořechy 4 %, kukuřično-pšeničný extrudát (kukuřice, pšenice, jedlá sůl), pražené mandle 2,2 %, strouhaný kokos, aroma, antioxidanty (askorbylpalmitát, přírodní extrakt s vysokým obsahem tokoferolů).“ V tabulce 2 jsou uvedeny výrobcem deklarované nutriční hodnoty tohoto výrobku.

Tabulka 2: Nutriční hodnoty vzorku č.1 (výživové údaje na 100 g)

Energetická hodnota	1676 kJ/ 400 kcal
Tuky	18 g
z toho nasycené mastné kyseliny	2,6 g
Sacharidy	42 g
z toho cukry	2,8 g
Vláknina	19 g
Bílkoviny	9,1 g
Sůl	0,04 g



Obrázek 4: Vzorek č. 1

Vzorek č. 2 (Obr. 5): Emco Lehké & Křehké – kanadské brusinky a goji

Výrobce na etiketě deklaruje následující složení výrobku: „Celozrnné cereálie 77 % (ovesné vločky 42 %, ječné vločky 26 %, pšeničné vločky 19 %, žitné vločky sladové 13 %), proslazená klikva velkoplodá 16,9 % (sušená klikva velkoplodá 51 %, cukr, rýžová mouka, slunečnicový olej), sušené goji 3 %, slunečnicové semínko 2,5 %, přírodní aroma.“ V tabulce 3 jsou uvedeny výrobcem deklarované nutriční hodnoty tohoto výrobku.

Tabulka 3: Nutriční hodnoty vzorku č. 2 (výživové údaje na 100 g)

Energetická hodnota	1502 kJ/ 356 kcal
Tuky	4,8 g
z toho nasycené mastné kyseliny	0,8 g
Sacharidy	63 g
z toho cukry	13 g
Vláknina	10 g
Betaglukany	2,4 g
Bílkoviny	10 g
Sůl	0,05 g



Obrázek 5: Vzorek č. 2

Vzorek č. 3 (Obr. 6): Emco Lehké & Křehké – mrkev a jablko

Výrobce na etiketě deklaruje následující složení výrobku: „Celozrnné cereálie 79 % (ovesné vločky 42 %, ječné vločky 25 %, pšeničné vločky 20 %, žitné vločky sladové 13 %), ovesné vločky s koncentrovanou mrkvovou šťávou 10 % (ovesné vločky, koncentrovaná mrkvová šťáva 12 %), kousky proslazené mrkve 9 % (mrkev 80 %, fruktóza, slunečnicový olej), kousky sušených jablek 2 %.“ V tabulce 4 jsou uvedeny výrobcem deklarované nutriční hodnoty tohoto výrobku.

Tabulka 4: Nutriční hodnoty vzorku č. 3 (výživové údaje na 100 g)

Energetická hodnota	1471 kJ/ 351 kcal
Tuky	3,9 g
z toho nasycené mastné kyseliny	0,7 g
Sacharidy	63 g
z toho cukry	10 g
Vláknina	10 g
Bílkoviny	11 g
Sůl	0,04 g



Obrázek 6: Vzorek č. 3

Vzorek č. 4 (Obr. 7): Bonavita Fit cereálie špaldové lupínky čokoládové

Výrobce na etiketě deklaruje následující složení výrobku: „Pšeničná špaldová mouka celozrnná 36 %, pšeničná celozrnná mouka, mléčná čokoláda 12 % [cukr, kakaové máslo, sušené plnotučné mléko, kakaová hmota, rostlinné tuky (palmový olej, olej z máslovníku, Sal, olej z jader manga), sušená syrovátka, mléčný tuk, laktóza, emulgátory: slunečnicový lecitin a polyglycerylpolyricinoleát; přírodní vanilkové aroma], pšeničné otruby, kukuřičné lupínky 7,6 % [kukuřičná krupice, cukr, jedlá sůl s jódem (jedlá sůl, jodičnan draselný), ječný sladový výtažek, uhličitan vápenatý], cukr, jedlá sůl s jódem (jedlá sůl, jodičnan draselný), lešticí směs (tapiokový škrob, cukr, lešticí látka: šelak, kokosový olej, kyselina: kyselina citronová, konzervant: kyselina sorbová, ječný sladový výtažek.“ V tabulce 5 jsou uvedeny výrobcem deklarované nutriční hodnoty tohoto výrobku.

Tabulka 5: Nutriční hodnoty vzorku č. 4 (výživové údaje na 100 g)

Energetická hodnota	1548 kJ/ 367 kcal
Tuky	6,6 g
z toho nasycené mastné kyseliny	2,8 g
Sacharidy	60 g
z toho cukry	13 g
Vláknina	10 g
Bílkoviny	12 g
Sůl	1,6 g

**Obrázek 7: Vzorek č. 4****Vzorek č. 5 (Obr. 8): Bonavita Dobrá vláknina**

Výrobce na etiketě deklaruje následující složení výrobku: „Pšeničné otruby 41,5 %, pšeničná mouka celozrnná 17,6 %, kukuřičná vláknina 15,5 %, cukr, glukóza, kukuřičný škrob, emulgátor: slunečnicový lecitin, ječný sladový výtažek, slunečnicový olej s rozmarýnem (slunečnicový olej, extrakt z rozmarýnu), skořice 0,3 %, aroma, minerální látka: uhličitán vápenatý.“ V tabulce 6 jsou uvedeny výrobcem deklarované nutriční hodnoty tohoto výrobku.

Tabulka 6: Nutriční hodnoty vzorku č. 5 deklarované výrobcem (výživové údaje na 100 g)

Energetická hodnota	1485 kJ/ 354 kcal
Tuky	4 g
z toho nasycené mastné kyseliny	0,6 g
Sacharidy	57 g
z toho cukry	20 g
Vláknina	25 g
Bílkoviny	9,9 g
Sůl	0,06 g



Obrázek 8: Vzorek č. 5

4.2 Stanovení dietární vlákniny

4.2.1 Stanovení dietární vlákniny přístrojem ANKOM Dietary Fiber Analyzer

4.2.1.1 Použité přístroje a pomůcky

- ANKOM Total Dietary Fiber Analyzer – ANKOM Technology, USA
- Filtrační sáčky ANKOM IDF, SDF – ANKOM Technology, USA
- Držák na vážení sáčků – ANKOM Technology, USA
- Tavička – American International Electric, USA
- Exsikátor – ANKOM Technology, USA
- Analytická váha AS 220 R2 PLUS – RADWAG; Šumperk, Česká republika
- pH metr ORION STAR A211 – Thermo Fisher Scientific, USA
- Mlýnek IKA MultiDrive basic – IKA, Německo
- Sušárna horkovzdušná – Memmert, Německo
- Sušící stojan – ANKOM Technology, USA
- Oplachový stojan (aceton) – ANKOM Technology, USA
- Běžně používané laboratorní pomůcky a sklo

4.2.1.2 Použité chemikálie

- Křemelina – ANKOM Technology, USA
- Mes – ANKOM Technology, USA
- Tris – ANKOM Technology, USA
- α -amyláza – ANKOM Technology, USA
- Proteáza – ANKOM Technology, USA
- Amyloglukozidáza – ANKOM Technology, USA
- 3M roztok kyseliny chlorovodíkové k výrobě 0,561M roztoku HCl – PENTA; Chrudim, Česká republika
- Hydroxid sodný 0,5M – VWR Chemicals, USA
- Ethanol 96%, 78% – VWR Chemicals, USA
- Aceton (>99%) – VWR Chemicals, USA
- Destilovaná voda

4.2.1.3 Postup

4.2.1.3.1 Příprava materiálu

Vzorky byly nejprve důkladně zhomogenizovány pomocí mlýnku IKA MultiDrive a přemístěny do uzavíratelné nádoby. Bylo popsáno a zváženo 6 sáčků IDF a 6 sáčků SDF s přesností na 4 desetinná místa. Sáčky byly váženy vždy pomocí držáku na vážení sáčků. Byla navážena křemelina 6x po 1 g. Ze vzorku číslo 1 bylo naváženo 6x 0,5 g vzorku s přesností na 4 desetinná místa.

4.2.1.3.2 Příprava roztoků

Pro přípravu pufru bylo naváženo 9,76 g enzymu MES a 6,1 g enzymu TRIS, které byly následně rozředěné a rozmíchané v malé kádince a poté bylo doplněno destilovanou vodou do objemu 0,85 l. Následně bylo měřeno pH pomocí pH metru a úprava pH pomocí 6M roztoku NaOH na požadované pH 8,2 (při teplotě 24 °C). Pro přípravu 0,561M roztoku HCl bylo použito 187 ml 3M roztoku HCl do celkového objemu 1000 ml. Bylo odebráno 5 ml enzymu α -amylázy, proteázy a amyloglukozidázy a doplněno destilovanou vodou do 25 ml. Pro přípravu 95% roztoku ethanolu bylo použito 10,4 ml 96% ethanolu na 1000 ml.

4.2.1.3.3 Práce na přístroji ANKOM^{TDF}

Pro stanovení dietární vlákniny ve vzorcích snídaňových cereálií byla použita metoda AOAC 991.43. Přístroj ANKOM^{TDF} (obr. 10) byl nejprve řádně pročištěn. Následně bylo vše potřebné k analýze připojeno k přístroji ANKOM^{TDF} – enzymy (po rysku 15 ml či více), destilovaná voda, pufr, 78% ethanol a 95% ethanol. Poté byly nasazeny sáčky SDF, které byly následně naplněny křemelinou, která se v analýze používá ke zlepšení filtrace a flokulace SDF frakce. Dále byly nasazeny sáčky IDF, do kterých se následně přidal vzorek.

Přístroj ANKOM^{TDF} poté pracoval přibližně 4 h, avšak přibližně po 1 h bylo nutné změřit a upravit pH pomocí HCl či NaOH na požadované pH 4–4,7. Pomocí kapátka bylo přidáno přibližně 11 větších kapek 0,561M roztoku HCl. Po ukončení programu byly nejprve sundány IDF sáčky a přendány na stojan, kde byly propláchnuty acetonem. Totéž bylo provedeno u SDF sáčků. Poté se ze sáčků nechal odpařit aceton po dobu 30–40 minut. Sáčky byly zataveny (3–4 s) a sušeny přibližně 90 minut při teplotě 105 °C, poté byly přemístěny do exsikátoru a po vychladnutí byly zváženy.

U třech sáčků SDF a u třech sáčků IDF, které byly použity pro následnou analýzu dusíkatých látek, byly odštíhnuty průhledné plastové části sáčku, zbytek sáčku byl přeložen na třetiny a poté znovu na třetiny (pouze u IDF se překládá 2x na třetiny). Následně byly zataveny a vloženy do odštíhnuté části sáčku. U zbylých sáčků, u třech SDF a třech IDF, byly plastové části sáčku ponechány. Sáčky byly složeny, zataveny a připraveny pro následné stanovení popela.



Obrázek 9: Analyzátor vlákniny ANKOM Dietary Fiber Analyzer v průběhu analýzy

4.2.2 Výpočet

Výpočet IDF (%)

$$= \frac{[(R1+R2)/2]-P-A-B}{(M1+M2)/2} * 100$$

$$= \frac{[((fF1-fS1)+(fF2-fS2))/2]-P-A-B}{(M1+M2)/2} * 100$$

M1; M2 = původní hmotnost duplicitních vzorků (g)

R1; R2 = hmotnost zbytku pro duplicitní vzorky (g)

fF = finální hmotnost filtračního sáčku se zbytkem (g)

fS = počáteční hmotnost filtračního sáčku (g)

P = hmotnost bílkovin ze zbytku a sáčku (g)

A = hmotnost popela ze zbytku a sáčku (g)

B = hmotnost slepého pokusu (g)

$$= [(BR1 + BR2)/2] - PB - AB$$

$$= [((fBF1 - fBS1) + (fBF2 - fBS2))/2] - PB - AB$$

BR1; BR2 = hmotnost zbytku po duplicitních slepých vzorcích (g)

fBF = hmotnost finálního prázdného filtračního sáčku (g)

fBS = hmotnost počátečního prázdného filtračního sáčku (g)

PB = hmotnost bílkovin z prázdného filtračního sáčku (g)

AB = hmotnost popela z prázdného filtračního sáčku (g)

Výpočet SDF (%)

$$= \frac{[(R1+R2)/2]-P-A-B}{(M1+M2)/2} * 100$$

$$= \frac{[((fF1-fS1-D1)+(fF2-fS2-D2))/2]-P1-(A2-D2)-B}{(M1+M2)/2} * 100$$

M1; M2 = původní hmotnost duplicitních vzorků (g)

R1; R2 = hmotnost zbytku pro duplicitní vzorky (g)

fF = konečná hmotnost filtračního sáčku se zbytkem (g)

fS = počáteční hmotnost filtračního sáčku (g)

D = původní hmotnost křemeliny (g)

P = hmotnost bílkovin ze zbytku a sáčku (g)

A = hmotnost popela ze zbytku a sáčku (g)

B = hmotnost slepého pokusu (g)

$$= [(BR1 + BR2)/2] - PB - AB$$

$$= [((fBF1 - fBS1) + (fBF2 - fBS2))/2] - PB - AB$$

BR1; BR2 = hmotnost zbytku po duplicitních slepých vzorcích (g)

fBF = hmotnost konečného prázdného filtračního sáčku (g)

fBS = hmotnost počátečního prázdného filtračního sáčku (g)

PB = hmotnost bílkovin z prázdného filtračního sáčku (g)

AB = hmotnost popela z prázdného filtračního sáčku (g)

DB = původní hmotnost křemeliny v prázdném filtračním sáčku (g)

Výpočet TDF (%)

Celková dietární vláknina se vypočítá součtem hodnot % IDF a % SDF.

4.2.3 Stanovení popela

4.2.3.1 Použité přístroje a pomůcky

- Muflová pec – Memmert, Německo
- Analytická váha AS 220 R2 PLUS – RADWAG; Šumperk, Česká republika
- Spalovací kelímky
- Exsikátor

4.2.3.2 Postup

Nejprve byly spalovací kelímky vyžehány v muflové peci přibližně 60 minut při teplotě 600 °C, poté byly dány do exsikátoru a po vychladnutí byly zváženy. Složené, utěsněné sáčky IDF a SDF byly označeny a vloženy do spalovacího kelímku. Kelímky se sáčky byly vloženy do muflové pece na 3 h při teplotě 600 °C, poté byly přesunuty do exsikátoru a po vychladnutí byly zváženy.

4.2.4 Stanovení dusíkatých látek

4.2.4.1 Použité přístroje a pomůcky

- Kjeltec 2400 – FOSS, Dánsko
- Míchačka s ohřevem – Stuart, Německo
- Mineralizační hnízdo Tecator digester – FOSS, Dánsko
- Mineralizační trubice
- Mineralizační stojan
- Analytická váha AS 220 R2 PLUS – RADWAG; Šumperk, Česká republika

4.2.4.2 Použité chemikálie

- Kyselina sírová 96% – PENTA; Chrudim, Česká republika
- Katalyzátorové tablety Kjetabs – Thomson & Capper, Anglie
- Hydroxid sodný g.r. 98% pro přípravu 35% hydroxidu sodného – Lach-ner; Neratovice, Česká republika
- Kyselina chlorovodíková 0,1M – Lach-ner; Neratovice, Česká republika
- Kyselina boritá g.r. 99,5% pro přípravu 4% kyseliny borité – Lach-ner; Neratovice, Česká republika
- Bromkresolová zeleň – Fisher Scientific; Neratovice, Česká republika
- Methylčerveně – Lach-ner; Neratovice, Česká republika

4.2.4.3 Postup

Pro stanovení dusíkatých látek byla použita Kjeldahlova metoda.

4.2.4.3.1 Mineralizace

Vzorek byl nejprve podroben mineralizaci, během které došlo k převedení organicky vázaného dusíku na amoniak, který zůstal navázán ve formě síranu amonného. Složené, utěsněné sáčky IDF a SDF byly označeny a vloženy do mineralizačních trubic. Do trubic s IDF sáčky bylo přidáno 17 ml 96% kyseliny sírové a 3 katalyzátorové tablety (směs K_2SO_4 a $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) a do trubic s SDF sáčky bylo přidáno 27 ml 96% kyseliny sírové a 3 katalyzátorové tablety. Všechny trubice byly vloženy do mineralizačního stojanu, který byl přesunut do mineralizačního hnízda. Na trubice byl nasazen odsávač par, byla puštěna vodní vývěva a nastavena teplota. Pro zpomalení rychlosti pění během procesu trávení byla zvýšena teplota postupně. Nejprve 15 min při 150 °C, poté 15 min při 250 °C, dále 15 min při 350 °C a nakonec 40 min při 420 °C. Po vychladnutí bylo do každé trubice přidáno 10 ml destilované vody.

4.2.4.3.2 Destilace a titrace

Destilace a titrace probíhala automaticky pomocí přístroje Kjeltec 2400 (obr. 10), který má vlastní titraci. Po konzultaci s technikem z firmy ANKOM nám bylo doporučeno nastavit následující objemy pro krok destilace: 50 ml destilované vody, 25 ml 4% kyseliny borité a 90 ml 35% hydroxidu sodného.

Mineralizační trubice byla vložena do přístroje a přibližně po 5 minutách přístroj vyhodnotil obsah dusíkatých látek. Pomocí vodních par se v zásaditém prostředí 35% hydroxidu sodného uvolnil ze síranu amonného amoniak, který byl následně v chladiči kondenzován a odebírán do 4% kyseliny borité a indikátoru složeného z methylčerveně a bromkresolové zeleně. Amoniak alkalizuje prostředí předlohy, došlo ke změně zbarvení indikátoru, barva se změnila na zelenou. Taktéž došlo k neutralizaci prostředí pomocí titrace kyselinou chlorovodíkovou. Titrace byla ukončena po dosažení bodu ekvivalence.



Obrázek 10: Přístroj Kjeltec v průběhu analýzy

4.3 Stanovení hrubé vlákniny přístrojem ANKOM²⁰⁰

4.3.1 Použité přístroje a pomůcky

- ANKOM²⁰⁰ – ANKOM Technology, USA
- Analytická váha AS 220 R2 PLUS – RADWAG; Šumperk, Česká republika
- Filtrační sáčky – ANKOM Technology, USA
- Sušárna – Memmert, Německo
- Muflová pec – Memmert, Německo
- Tavička – PENTA; Chrudim, Česká republika
- Varná konvice
- Exsikátor
- Spalovací kelímky
- Běžně používané laboratorní pomůcky a sklo

4.3.2 Použité chemikálie

- 96% kyselina sírová – PENTA; Chrudim, Česká republika
- 98% hydroxid sodný – Lach-ner; Neratovice, Česká republika
- Křemelina – ANKOM Technology, USA
- Aceton
- Destilovaná voda

4.3.3 Postup

4.3.3.1 Příprava materiálu

Vzorky byly nejprve důkladně zhomogenizovány pomocí mlýnku IKA MultiDrive a přemístěny do uzavíratelné nádoby. Filtrační sáčky byly popsány fixem a sušeny přibližně 45 minut při 103 °C. Sáčky byly vyndány ze sušárny a vloženy do exsikátoru, po vychladnutí byly zváženy. Do označených sáčků byl navážen 1 g vzorku a 1 g křemeliny s přesností na 4 desetinná místa a sáčky byly následně zataveny, jeden sáček byl ponechán prázdný a označen jako slepý pokus. Obsah sáčku byl rozprostřen po celé ploše lehkým poklepáním. Jelikož jsou vzorky tučnější, jejich obsah tuku na 100 g je více než 3,5 %, tak před samotnou analýzou bylo nutné provést odtučnění vzorku pomocí acetonu. Sáčky byly pár minut proprány v acetonu a poté byly rozprostřeny na filtrační papír, kde se nechaly řádně vyschnout.

4.3.3.2 Příprava roztoků

Bylo naváženo 25 g 98% hydroxidu sodného, který byl následně rozředěn destilovanou vodou do objemu 2 l. Do malého množství vody bylo opatrně přidáno 14 ml 96% kyseliny sírové a poté byla přidána destilovaná voda do objemu 2 l.

4.3.3.3 Práce na přístroji ANKOM²⁰⁰

Sáčky byly vloženy do nosiče, do každého patra 3 sáčky. I přesto, že nebyla využita všechna patra nosiče, do přístroje Ankom²⁰⁰ je nutné vkládat nosič s plným počtem pater. Nosič se sáčky byl vložen do přístroje Ankom²⁰⁰ a zatížen závažím. Po zapnutí byl přidán roztok kyseliny sírové až po okraj, poklop byl řádně uzavřen a bylo zapnuto míchání a topení. Po dosažení 100 °C Ankom²⁰⁰ pracoval přibližně 60 minut. Po uplynutí času bylo vypnuto míchání a topení a následně byl otevřen ventil a roztok byl vypuštěn. Poklop byl opatrně otevřen až po úplném vypuštění kapaliny. Ventil byl uzavřen a do přístroje byla nalita horká destilovaná voda, na 5 minut bylo puštěno míchání, poté bylo míchání vypnuto a voda byla vypuštěna. Tento proces proplachování proběhl 3x. Dále byl přidán roztok hydroxidu sodného, uzavřen poklop a zapnuto míchání a topení. Po dosažení 100 °C Ankom²⁰⁰ pracoval přibližně 60 minut. Po uplynutí času bylo vypnuto míchání, topení, byl vypuštěn roztok a opět 3x probíhalo proplachování horkou destilovanou vodou.

Po skončení procesu bylo vyndáno závaží a nosič se vzorky byl přesunut na filtrační papír. Sáčky byly pinzetou předány do nádoby s acetonem a řádně byly promíchány. Sáčky byly přemístěny mezi suché filtrační papíry a lehce z nich byl vymačkán aceton.

Po úplném odpaření acetonu byly sáčky přemístěny do nádoby, která byla vložena do sušárny a přibližně 3 hodiny probíhalo sušení při teplotě 103 °C. Po vychladnutí byly sáčky zváženy, vloženy do předem zvážených spalovacích kelímků a byly vloženy do muflové pece, kde byly spalovány do úbytku konstantní hmotnosti (několik hodin) při teplotě 600 °C. Po ukončení spalování byly kelímky přemístěny do exsikátoru a po vychladnutí byly zváženy a byla zjištěna hodnota popela.



Obrázek 11: Analyzátor vlákniny ANKOM²⁰⁰ v průběhu analýzy

4.3.4 Výpočet

Výpočet CF (hrubá vláknina) v % (m/m)

$$= \frac{[A + B - C - (E * 0,9818)]}{F} * 100$$

A = hmotnost vysušeného sáčku

B = hmotnost prázdného kelímku

C = hmotnost kelímku po spálení

E = hmotnost prázdného sáčku

F = navážka vzorku (g)

4.4 Statistická analýza

Všechna data byla zpracována pomocí softwaru Excel (Microsoft Corporation, USA). Byly vypočteny průměry a směrodatné odchylky. Výsledné hodnoty jsou uváděny v hmotnostních procentech (g/100 g). Ke zjištění statisticky významných rozdílů mezi vzorky byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA) v programu STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA) při použití hladiny významnosti $\alpha = 0,05$.

5 Výsledky

Tato diplomová práce byla zaměřena na zavedení a ověření AOAC metody na stanovení dietární vlákniny do laboratorní praxe. Výsledkem je vypracování standardního operačního postupu.

Po odzkoušení metody dle manuálu od výrobce ANKOM Technology bylo potřeba metodiku značně upravit. Některé důležité části nebyly v metodice dostatečně zdůrazněny. Bylo nutné domyslet koncovku při mineralizaci, nebylo zdůrazněno odstřihávání plastu u filtračních sáčků či zdůrazněno ponechání plastu u sáčků určených pro následnou analýzu popela. Některé části metodiky byly chaotické a při následné analýze šlo spíše o pokus omyl. Analytické problémy, které nastaly v průběhu analýzy jsou podrobně popsány a diskutovány v kapitole Diskuse.

5.1 Stanovení hrubé vlákniny přístrojem ANKOM²⁰⁰

Tabulka 7 znázorňuje výsledné hodnoty hrubé vlákniny ve snídaňových cereáliích. Každý vzorek byl proměřen ve třech opakováních, výsledná hodnota je průměrem tří měření. Nejvyšší hodnota hrubé vlákniny byla naměřena u vzorku Bonavita Dobrá vláknina (2,84 %) a nejnižší hodnota byla naměřena u vzorku Emco super myslí s ořechy a mandlemi (1,16 %). Mezi jednotlivými vzorky byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly, které jsou vyznačeny indexy u průměrů. Vzorek Bonavita Dobrá vláknina měl nejvyšší hodnotu hrubé vlákniny a statisticky se lišil od všech ostatních vzorků. Naopak vzorky Emco super myslí s ořechy a mandlemi, Emco Lehké & Křehké (brusinky a goji) a Emco Lehké & Křehké (mrkev a jablko) se od sebe nelišily. Rozdíly nebyly též mezi vzorky Emco Lehké & Křehké (brusinky a goji) a Bonavita Fit cereálie špaldové lupínky.

Tabulka 7: Obsah hrubé vlákniny (%) ve vzorcích snídaňových cereálií

Vzorky snídaňových cereálií	1.opakování (%)	2.opakování (%)	3.opakování (%)	Průměrný obsah hrubé vlákniny (%)	Směrodatná odchylka
Emco super myslí s ořechy a mandlemi	0,91	1,13	1,44	1,16 ^c	0,27
Emco Lehké & Křehké (brusinky a goji)	1,49	1,49	1,46	1,48 ^{bc}	0,02
Emco Lehké & Křehké (mrkev a jablko)	1,11	1,30	1,10	1,17 ^c	0,11
Bonavita Fit cereálie špaldové lupínky	2,12	1,83	1,51	1,82 ^b	0,31
Bonavita Dobrá vláknina	2,87	2,78	2,88	2,84 ^a	0,06

Pozn.: Rozdílné indexy u průměrných hodnot indikují vzorky, které se statisticky významně liší ($p < 0,05$).

5.2 Stanovení dietární vlákniny metodou AOAC 991. 43

Tabulka 8 znázorňuje výsledné procentuální hodnoty rozpustné dietární vlákniny (SDF), nerozpustné dietární vlákniny (IDF) a celkové dietární vlákniny (TDF) ve vzorku č. 1 (Emco super myslí s ořechy a mandlemi). Hodnoty IDF a SDF byly vypočteny podle výpočtu uvedeného v metodice a hodnota TDF je součtem hodnot IDF a SDF.

Tabulka 8: Obsah dietární vlákniny ve vzorku č. 1 (%)

Vzorek	SDF (%)	IDF (%)	TDF (%)
Emco super myslí s ořechy a mandlemi	3,1	5,5	8,6

Tabulka 9 znázorňuje průměrné hodnoty zbylých bílkovin a popela u rozpustné dietární vlákniny (SDF) a nerozpustné dietární vlákniny (IDF) ve vzorku č. 1 (Emco super myslí s ořechy a mandlemi).

Tabulka 9: Hmotnost bílkovin a popela ze zbytku a sáčku (g)

Typ dietární vlákniny	Hmotnost bílkovin ze zbytku a sáčku (g)	Hmotnost popela ze zbytku a sáčku (g)
SDF	0,0018	0,0089
IDF	0,0011	0,0078

5.3 Upravená metodika pro stanovení dietární vlákniny metodou 991. 43 přístrojem ANKOM^{TDF}

V průběhu implementace metody došlo k mnoha analytickým problémům, které se vyskytly především při procesu mineralizace a při následné destilaci a titraci na přístroji Kjelttec. Výsledkem implementace této metody je nová upravená metodika následujícím způsobem.

5.3.1 Příprava vzorku, křemeliny a sáčků (SDF a IDF)

- 1) Vzorky zhomogenizujte pomocí mlýnku se sítím 0,5 mm (jemněji mleté vzorky by mohly způsobit nízké hodnoty).
- 2) Pokud vzorky obsahují 10 % tuku a více, tak je nutné provést odtučnění vzorků dle oficiálních metod.
- 3) 6 sáčků IDF a 6 sáčků SDF popište fixem, který je odolný vůči rozpouštědlům. Poté sáčky zvažte pomocí originálního držáku na vážení sáčků od firmy ANKOM technology a zaznamenejte si hmotnosti.
- 4) Na každý ze šesti připravených filtračních papírů přidejte 1 g křemeliny a zaznamenejte si hmotnosti.
- 5) Na každý ze šesti připravených filtračních papírů přidejte 0,5 g vzorku s přesností na 4 desetinná místa a zaznamenejte si hmotnosti.

5.3.2 Příprava roztoků

- 1) Pro přípravu roztoku pufru MES – TRIS je potřeba navážit 9,76 g enzymu MES a 6,1 g enzymu TRIS, které následně rozřeďte a rozmíchejte v malé kádince a poté doplňte destilovanou vodou do objemu 0,85 l. pH upravte na 8,2 (při teplotě 24 °C) pomocí 6M roztoku NaOH a následně doplníme destilovanou vodu do objemu 1 l.
- 2) Pro přípravu 0,561M roztoku HCl použijeme 187 ml 3M roztoku HCl do celkového objemu 1 000 ml.
- 3) Pro přípravu roztoků enzymů odebereme 5 ml α -amylázy, 5 ml proteázy a 5 ml amyloglukozidázy a každý doplníme destilovanou vodou do 25 ml.
- 4) Pro přípravu 95% roztoku ethanolu použijeme 10,4 ml 96% ethanolu na 1000 ml.

5.3.3 Práce na přístroji ANKOM^{TDF}

- 1) Přístroj ANKOM^{TDF} nejprve zapněte, potvrďte přívod dusíku a rozsahy tlaku. Na displeji zvolte metodu 991.43.

- 2) Před samotnou analýzou přístroj řádně pročistěte přesně podle pokynů v originálním manuálu od ANKOMU.
- 3) Vše potřebné k analýze připojte k přístroji – enzymy (po rysku 15 ml či více), destilovanou vodu, roztok pufru MES – TRIS a 78% a 95% ethanol.
- 4) Nasad'te všechny SDF sáčky (dle pokynů v originálním manuálu, tryska musí být uvnitř sáčku, každý sáček vycentrujte podle černých čar) a přidejte tyč D.
- 5) SDF sáčky naplňte křemelinou (důležité je, aby byla křemelina pod dávkovací tryskou).
- 6) Nasad'te všechny IDF sáčky (dle pokynů v originálním manuálu).
- 7) Sáčky IDF vložte do horní části SDF sáčků (alespoň 20 mm) a přidejte tyč B a C.
- 8) IDF sáčky naplňte vzorkem (důležité je, aby byl vzorek pod dávkovací tryskou) a přidejte tyč A.
- 9) SDF sáčky zajistěte pomocí háčku na tyči C.
- 10) Nastavte ruční kontrolu pH a poté již můžete spustit automatické procesy.
- 11) Přístroj pracuje přibližně 4 h.
- 12) Po cca 1 h (přístroj se ozve sám) změřte a upravte pH pomocí 0,561M HCl či 6 M NaOH na požadované pH 4–4,7 (roztok průběžně promíchejte).
- 13) Po ukončení programu sundejte IDF sáčky a přendejte je na oplachový stojan. Všechny sáčky propláchněte acetonem (2 kolečka u každého sáčku – všechny zbytky na stěnách sáčku musí být spláchnuty), totéž udělejte u SDF sáčků.
- 14) Po odpaření acetonu (cca 30–40 minut) sáčky zatavte těsně nad filtrem, tavičku nastavte na 3–4 a následně sáčky zatavte po dobu 3–4 vteřin.
- 15) Všechny sáčky umístěte do sušicího stojanu a umístěte ho do sušárny nastavené na 105 °C a vysušte je do konstantní hmotnosti (přibližně 90 minut).
- 16) Po vysušení přemístěte všechny sáčky do exsikátoru od ANKOM technology.
- 17) Po vychladnutí sáčky zvažte pomocí originálního držáku na vážení sáčků od firmy ANKOM technology a zaznamenejte si hmotnosti.
- 18) U sáčků určených pro následnou analýzu dusíkatých látek odstříhnete průhledné plastové části sáčku. Důležité je nechat přibližně 1 cm nad zataveným spojem. Zbytek sáčku přeložte na třetiny a poté znovu na třetiny (pouze u IDF se překládá 2x na třetiny)
- 19) Přeložené zbytky sáčku zatavte. Tavičku nastavte na 6 a zatavte sáčky po dobu 3–4 vteřin a vložte je do odstříhnuté a popsané části sáčku.
- 20) U zbylých sáčků určených pro následnou analýzu popela plastové části ponechte (žádný plast se neustřihává).
- 21) Sáčky přeložte tak, aby na konci zůstal 1 cm plastu a následně sáčky zatavte. Tavičku nastavte na 6 a zatavte sáčky po dobu 3–4 vteřin a vložte je do odstříhnuté a popsané části sáčku.

5.3.4 Stanovení dusíkatých látek

Pro stanovení dusíkatých látek použijte Kjeldahlovu metodu.

5.3.4.1 Mineralizace

- 1) Připravené sáčky IDF a SDF označte a vložte do mineralizačních trubic.
- 2) Do mineralizačních trubic s IDF sáčky přidejte 17 ml 96% kyseliny sírové a 3 katalyzátorové tablety (směs K_2SO_4 a $CuSO_4 \cdot 5H_2O$.)
- 3) Do mineralizačních trubic s SDF sáčky přidejte 27 ml 96% kyseliny sírové a taktéž 3 katalyzátorové tablety.
- 4) Všechny mineralizační trubice vložte do mineralizačního stojanu a přesuňte je do mineralizačního hnízda.
- 5) Nasadte odsávač par, spusťte vodní vývěvu a nastavte teplotu.
- 6) Důležitým krokem je navyšování teploty postupně. Díky tomu dojde ke zpomalení rychlosti pění během procesu trávení.
- 7) Teplotu navyšujte následovně: 15 min při 150 °C, poté 15 min při 250 °C, dále 15 min při 350 °C a nakonec 40 min při 420 °C.
- 8) Po vychladnutí přidejte do každé trubice 10 ml destilované vody.

5.3.4.2 Destilace a titrace

- 1) Destilace a titrace probíhá automaticky pomocí přístroje Kjeltec 2400 s vlastní titrací.
- 2) Nejprve je nutné přednastavit hodnoty na přístroji Kjeltec.
- 3) Pro krok destilace nastavte následující objemy: 50 ml destilované vody, 25 ml 4% kyseliny borité a 90 ml 35% hydroxidu sodného.
- 4) Připravené mineralizační trubice vložte do přístroje Kjeltec. Obsah mineralizačních trubic musí být rozmíchán. Pokud obsah nelze rozmíchat, tak jej nejprve zahřejte, rozmíchejte a až poté vložte do přístroje Kjeltec.
- 5) Přibližně po 5 minutách přístroj Kjeltec vyhodnotí obsah dusíkatých látek.

5.3.5 Stanovení popela

- 1) Spalovací kelímky nejprve vyžehjte v muflové peci cca 60 minut při teplotě 600 °C.
- 2) Vyžíhané kelímky vložte do exsikátoru a po vychladnutí je zvažte.
- 3) Připravené sáčky IDF a SDF označte a vložte do označeného spalovacího kelímku.
- 4) Kelímky se sáčky vložte do muflové pece na 3 h při teplotě 600 °C.
- 5) Kelímky přesuňte do exsikátoru a po vychladnutí je zvažte.

6 Diskuse

Tato diplomová práce byla zaměřená na zavedení a ověření AOAC metody pro stanovení dietární vlákniny do laboratorní praxe. Cílem bylo vyzkoušet, zda metoda funguje a upravit ji na naše podmínky. Pro stanovení dietární vlákniny byla použita metoda AOAC 991.43. Hodnoty byly stanoveny pomocí přístroje ANKOM^{TDF}.

Automatizace analytické metody stanovení dietární vlákniny pomocí přístroje ANKOM^{TDF} šetří čas a zvyšuje přesnost výsledných hodnot. Originální metodika od firmy ANKOM technology je velmi hezky zpracována. V metodice je popsán krok za krokem a k lepšímu pochopení jsou téměř ke každému kroku přiložené obrázky. Nicméně metodu je nutné nejprve vyzkoušet a případně ji upravit na podmínky dané laboratoře. Celkové náklady na stanovení dietární vlákniny několika vzorků jsou poměrně vysoké. Celý proces stanovení dietární vlákniny metodou AOAC 991.43, který zahrnuje přípravu roztoků, přípravu materiálu, samotnou analýzu na přístroji ANKOM^{TDF}, stanovení dusíkatých látek a stanovení popela, je také poměrně zdlouhavý.

Největším nedostatkem originální metodiky od ANKOMU jsou instrukce k podpurným analytickým stanovením (stanovení dusíkatých látek a stanovení popela). Jelikož v průběhu implementace metody došlo k mnoha analytickým problémům, které se vyskytly především při procesu mineralizace a při následné destilaci a titraci na přístroji Kjeltec, bylo by dobré, kdyby výrobce doplnil podrobnější instrukce. Pro krok destilace na přístroji Kjeltec bylo nutné přenastavit objemy vody, kyseliny borité a hydroxidu sodného. V metodice je nutné zdůraznit ponechání alespoň 1–2 cm plastové části sáčku nad filtrační částí sáčku, a to z důvodu vysokého obsahu 96% kyseliny sírové. Dále je nutné zdůraznit ponechání veškerého plastu u sáčků, které jsou určeny pro následnou analýzu popela.

6.1 Problémy při implementaci metody

6.1.1 Stanovení dusíkatých látek

Největší analytické problémy se vyskytovaly při procesu mineralizace a při následné destilaci a titraci na přístroji Kjeltec.

6.1.1.1 První pokus

První pokus mineralizace probíhal přesně podle návodu. Složené, utěsněné sáčky IDF a SDF byly označeny a vloženy do mineralizačních trubíc. Do trubíc s IDF sáčky bylo přidáno 17 ml 96% kyseliny sírové, 2 katalyzátorové tablety Kjetabs (směs K_2SO_4 a $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) a 10 ml 35% peroxidu vodíku, což je oxidačně redukční činidlo, které se využívá jako podpora a urychlení reakce. Do trubíc s SDF sáčky bylo přidáno 27 ml 96% kyseliny sírové, taktéž 2 katalyzátorové tablety a 10 ml 35% peroxidu vodíku. Všechny trubice byly vloženy do mineralizačního stojanu, který byl přesunut do mineralizačního hnízda. Pro zpomalení rychlosti pění během procesu trávení bylo důležitým krokem zvýšení teploty postupně až na 420 °C. Po vychladnutí bylo do každé trubice přidáno 10 ml destilované vody. Veškerý časový harmonogram byl dodržen dle návodu.

Problém nastal především u sáčků SDF, ke kterému bylo přidáno velké množství kyseliny sírové. Vzorek nešel zmineralizovat a barva byla stále tmavě hnědá. Dále byl problém s peroxidem, který při analýze moc pěnil, zapáchal a došlo až k přepálení vzorku. Jedním z důvodů, proč reakce nemohla proběhnout úspěšně bylo nedostatečné množství katalyzátoru a druhým důvodem bylo ustříhnutí velkého množství plastu z filtračních sáčků, který je tam potřeba kvůli silné kyselině, která byla v přebytku.

6.1.1.2 Druhý pokus

Postup u druhého pokusu mineralizace byl již pozměněn. Mineralizace probíhala na slepém pokusu, sáčky byly pouze s křemelinou bez vzorku. Do jedné mineralizační trubice byl přidán IDF sáček s jedním gramem křemeliny, 2 katalyzátorové tablety Kjetabs a 17 ml 96% kyseliny sírové. Do druhé trubice byl přidán SDF sáček s jedním gramem křemeliny, 2 katalyzátorové tablety Kjetabs a 27 ml 96% kyseliny sírové. Zbytek mineralizačních trubic byl naplněn pouze 10 ml 96% kyseliny sírové. Všechny trubice byly vloženy do mineralizačního stojanu, který byl přesunut do mineralizačního hnízda. Pro zpomalení rychlosti pění během procesu trávení byla zvýšena teplota postupně až na 420 °C. Po vychladnutí bylo do každé trubice přidáno 10 ml destilované vody. Veškerý časový harmonogram byl dodržen dle návodu.

Nebyl zde přidán peroxid vodíku, což vedlo k lepšímu průběhu analýzy, nedošlo k přepálení, barva již nebyla tak tmavě hnědá a celkově došlo k menšímu pění. Problém však nastal opět u sáčku SDF, ke kterému bylo přidáno velké množství kyseliny sírové, který se opět nezmineralizoval.

6.1.1.3 Třetí pokus

Před třetím pokusem proběhla konzultace s technikem z firmy ANKOM. Bylo nám doporučeno odstříhnout méně plastu především u sáčků SDF, z důvodu velkého množství 96% kyseliny sírové. Byly ponechány přibližně 1–2 cm plastové části sáčku nad filtrační částí sáčku. Byly přidány 3 katalyzátorové tablety, tedy více než je v návodu původní metodiky, což značně zlepšilo průběh mineralizace. Nebyl zde přidán peroxid vodíku, což také vedlo k lepšímu průběhu analýzy.

Postup u třetího pokusu mineralizace byl následovný. Mineralizace probíhala na slepém pokusu, upravené SDF a IDF sáčky, dle nových pokynů, byly pouze s křemelinou bez vzorku. Do jedné mineralizační trubice byl přidán IDF sáček s jedním gramem křemeliny, tentokrát již 3 katalyzátorové tablety Kjetabs a 17 ml 96% kyseliny sírové. Do druhé trubice byl přidán SDF sáček s jedním gramem křemeliny, také 3 katalyzátorové tablety Kjetabs a 27 ml 96% kyseliny sírové. Zbytek mineralizačních trubic byl naplněn pouze 10 ml 96% kyseliny sírové. Všechny trubice byly vloženy do mineralizačního stojanu, který byl přesunut do mineralizačního hnízda. Důležitým krokem bylo navýšení teploty postupně až na 420 °C. Po vychladnutí bylo do každé trubice přidáno 10 ml destilované vody.

Po procesu mineralizace bylo problémem rychlé tvrdnutí obsahu v mineralizační trubici. Před samotnou analýzou na přístroji Kjeltec bylo potřeba obsah mineralizační trubice nejprve zahřát v topném hnízdě, aby došlo k úplnému rozpuštění. Z důvodu velkého množství 96% kyseliny sírové bylo potřeba přenastavit hodnoty vody a hydroxidu na přístroji Kjeltec.

Konzultant z firmy ANKOM nám doporučil následující objemy pro krok destilace: 50 ml destilované vody, 25 ml 4% kyseliny borité a 90 ml 35% hydroxidu sodného. Tento pokus byl již úspěšný, slepý pokus byl na hodnotě slepého pokusu přístroje.

6.2 Porovnání analyticky stanovených hodnot

U vzorku Emco super myslí s ořechy a mandlemi bylo pomocí metody AOAC 991.43 naměřeno 8,6 % celkové dietární vlákniny. Výrobce Emco na etiketě deklaruje celkový obsah vlákniny 19 g na 100 g výrobku. Stanovené výsledné hodnoty celkové dietární vlákniny ve snídaňových cereáliích byly nižší než hodnoty, které výrobce deklaruje na etiketě výrobku. Jedním z důvodů je, že před samotnou analýzou dietární vlákniny nebyl vzorek odtučněn. Výrobce na etiketě deklaruje obsah tuku 18 g na 100 g, pokud by byl tuk odečten a zohledněn v navážce, tak by byla výsledná hodnota dietární vlákniny 10,5 %. Dalším důvodem je, že výrobek obsahuje vlákninu z kořene čekanky (inulin). Pro stanovení inulinu je tato metoda AOAC 991.43 nedostatečná. Vhodnějšími metodami jsou vylepšené novější metody AOAC 997.08 a 999.03. Další faktor, který mohl ovlivnit výsledné hodnoty je heterogenita vzorku. Pro přesnější analýzu dietární vlákniny by bylo vhodnější zhomogenizovat celé balení snídaňových cereálií a až poté odebrat reprezentativní vzorek pro následné stanovení dietární vlákniny.

Dále byla u 5 vzorků snídaňových cereálií stanovena hrubá vláknina na přístroji ANKOM²⁰⁰. Nejvyšší hodnota hrubé vlákniny byla naměřena u vzorku Bonavita Dobrá vláknina (2,84 %), u kterého výrobce Emco na etiketě deklaruje celkový obsah vlákniny 25 g na 100 g výrobku. Tyto hodnoty mají společný nejvyšší obsah vlákniny z vybraných vzorků. Nejnižší hodnota byla naměřena u vzorku Emco super myslí s ořechy a mandlemi (1,16 %), u kterého výrobce Emco na etiketě deklaruje celkový obsah vlákniny 19 g na 100 g výrobku. Při porovnání stanovených hodnot hrubé vlákniny s hodnotami, které výrobce deklaruje na etiketě lze říct, že výsledné hodnoty u všech vybraných vzorků jsou značně nižší než deklarovaný obsah dietární vlákniny. Jedním z důvodů je, že tato metoda neumožňuje stanovení rozpustné dietární vlákniny a některých nerozpustných polysacharidů a části ligninu, které jsou zahrnuty v celkovém obsahu vlákniny na etiketě výrobku. Tato metoda je v porovnání s předchozí metodou velmi jednoduchá, rychlá a celkové náklady jsou výrazně nižší. Nicméně tato metoda neumožňuje stanovení všech složek dietární vlákniny, a proto jsou výsledné hodnoty velmi nízké. Tato metoda je vhodná spíše pro stanovení hrubé vlákniny v krmivech.

7 Závěr

Praktická část této diplomové práce byla zaměřena na implementaci a validaci AOAC metody. Pro stanovení dietární vlákniny ve vybraných vzorcích snídaňových cereálií byla použita metoda AOAC 991.43. Tato metoda byla zkoušena na České zemědělské univerzitě v Praze poprvé. Jelikož metoda nebyla od výrobce dostatečně popsána, muselo být odzkoušeno její fungování, což se neobešlo bez poměrně velkých problémů. Bylo nutné upravit původní metodiku a znovu vše odzkoušet, a proto nebylo možné proměřit tolik vzorků.

Pro stanovení dietární vlákniny byl použit přístroj ANKOM Dietary Fiber Analyzer, který je vhodný pro každodenní praxi. Automatizované stanovení dietární vlákniny metodou AOAC 991.43 oproti manuálnímu stanovení šetří čas a zvyšuje přesnost výsledných hodnot. Nicméně je nutné zmínit, že stanovení dietární vlákniny s použitím enzymů metodou AOAC 991.43 je poměrně zdlouhavý proces a celkové náklady jsou vysoké. Souhrnně lze říct, že tato metoda je složitá, ale je brána jako standardní postup, takže by výsledky změřené pomocí této metody měly být navzájem porovnatelné, a proto je vhodná pro rutinní analytické stanovení dietární vlákniny v potravinách.

Dále byla v 5 vzorcích snídaňových cereálií stanovena hrubá vláknina na přístroji ANKOM²⁰⁰. Nejvyšší hodnota hrubé vlákniny byla naměřena u vzorku Bonavita Dobrá vláknina (2,84 %) a nejnižší hodnota byla naměřena u vzorku Emco super myslí s ořechy a mandlemi (1,16 %). Tato metoda je v porovnání s metodou AOAC 991.43 velmi jednoduchá, rychlá a celkové náklady jsou výrazně nižší. Nicméně tato metoda neumožňuje stanovení rozpustné dietární vlákniny a některých nerozpustných polysacharidů a části ligninu, které jsou důležitou součástí mnoha potravin.

U vzorku Emco super myslí s ořechy a mandlemi bylo pomocí metody AOAC 991.43 naměřeno 3,1 % rozpustné dietární vlákniny a 5,5 % nerozpustné dietární vlákniny. Výsledná hodnota celkové dietární vlákniny byla 8,6 %. Stanovené výsledné hodnoty celkové dietární vlákniny ve snídaňových cereáliích byly nižší než hodnoty, které výrobce deklaruje na etiketě výrobku, což mohlo být způsobeno řadou faktorů (obsah tuku, homogenita a reprezentativnost vzorku pro analýzu apod.), které je třeba do budoucna zohlednit při využití metody pro analýzu dané potraviny.

Metoda byla implementována, avšak do budoucna je ještě nutné metodu odzkoušet a optimalizovat. Podařilo se vytvořit upravenou standardizovanou metodiku, která do budoucna značně usnadní další použití této metody.

8 Literatura

- Anderson JW, Baird P, Davis RH, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, Waters V, Williams ChL. 2009. Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews* **67**: 188-205.
- ANKOM technology. ANKOM TDF Fiber Analyzer. Available from <https://www.ankom.com/product-catalog/ankom-tdf-fiber-analyzer> (accessed January 2022).
- Bonavita. Dobrá vláknina. Available from <https://eshop.bonavita.cz/cs/products/view/23?cat-node=5> (accessed March 2022).
- Bonavita. Špaldové lupínky s čokoládou. Available from <https://eshop.bonavita.cz/cs/products/view/324?cat-node=5> (accessed March 2022).
- Buttriss JL, Stokes CS. 2008. Dietary fibre and health: an overview. *Nutrition Bulletin* **33**(3): 186-200.
- Cummings J, Engineer A. 2018. Denis Burkitt and the origins of the dietary fibre hypothesis. *Nutrition Research Reviews* **31**(1): 1-15.
- Dai FJ, Chau CF. 2017. Classification and regulatory perspectives of dietary fiber. *Journal of Food and Drug Analysis* **25**(1): 37-42.
- DeVries JW, Rader JI. 2005. Historical perspective as a guide for identifying and developing applicable methods for dietary fiber. *Journal of AOAC International* **88**(5): 1349-1366.
- Dhingra D, Michael M, Rajput H, Patil RT. 2012. Dietary fibre in foods: a review. *Journal of food science and technology* **49**(3): 255-266.
- EFSA. 2017. Dietary Reference Values for nutrients Summary report. EFSA Supporting Publication **14**(12).
- Elleuch M, Bedigian D, Besbes S, Blecker C, Attia H. 2012. Dietary Fibre Characteristics and Antioxidant Activity of Sesame Seed Coats (Testae). *International Journal of Food Properties* **15**(1): 25-37.
- Elleuch M, Bedigian D, Roiseux O, Besbes S, Blecker C, Attia H. 2011. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry* **124**: 411-421.
- Emco. Lehké & Křehké – kanadské brusinky a goji. Available from https://emco.cz/eshop/produkt/lehke-krehke-kanadske-brusinky-a-goji/?gclid=Cj0KCQiAybaRBhDtARIsAIEG3kkgfN4jYkmLHyZpuwE5PK1jGgzwp7wSz__LI8bVsuUJ6fM40hov5bgaAs1JEALw_wcB (accessed March 2022).
- Emco. Super myslí bez přidaného cukru s ořechy a mandlemi. Available from https://emco.cz/eshop/produkt/super-mysli-bez-pridaneho-cukru-s-orisky-a-mandlemi/?yottly_online=Ko%25C5%25A1%25C3%25ADk&yottly_recommender=personalised-substitutes (accessed March 2022).
- Esteban RM, Mollá E, Benítez V. 2017. Sources of Fiber. Pages 121-146 in Samaan RA, editor. *Dietary Fiber for the Prevention of Cardiovascular Disease*. Academic Press.

- Fuller S, Beck E, Salman H, Tapsell L. 2016. New Horizons for the Study of Dietary Fiber and Health: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition* **71**(1): 1-12.
- Gabrovská D. 2017. Zdravotní a výživová tvrzení ve vztahu k sacharidům. Konference „Potraviny zdraví a výživa“. Available from <https://www.vyzivaspol.cz/wp-content/uploads/2017/06/4.pdf> (accessed January 2022).
- Garbelotti ML, Marsiglia DAP, Torres EAF. 2003. Determination and validation of dietary fiber in food by the enzymatic gravimetric method. *Food Chemistry* **83**(3): 469-473.
- Gray J. 2006. Dietary fiber: Definition, analysis, physiology and health. ILSI Europe, Brussels, Belgium.
- Grizly. Emco Mysli Sypané lehké a křehké – Mrkev a jablko. Available from https://www.grizly.cz/emco-mysli-sypane-lehke-a-krehke-mrkev-a-jablko-550-g-expirace?utm_source=dognet&a_aid=59cb8a5975ae2&a_bid=e2647eb1&chan=vpcz# (accessed March 2022).
- Hipsley EH. 1953. Dietary “Fibre” and Pregnancy Toxaemia. *British Medical Journal* **2**(4833): 420-422.
- Institute of Medicine. 2001. Dietary Reference Intakes: Proposed Definition of Dietary Fiber. The National Academies Press, Washington (DC).
- Kolínová L. 2020. Význam vlákniny v humánní výživě [BSc. Thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Lambeau KV, McRorie JW. 2017. Fiber supplements and clinically proven health benefits. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners* **29**(4): 216-223.
- McCleary BV. 2003. Dietary fibre analysis. *Proceedings of the Nutrition Society* **62**(01): 3-9.
- McRorie JW. 2015. Evidence-Based Approach to Fiber Supplements and Clinically Meaningful Health Benefits, Part 1. *Nutrition Today* **50**(2): 82-89.
- MILCOM servis. Fibertec™ 8000. Available from <https://www.milcomservis.cz/96-aktuality/134-vylepseny-fibertec-8000> (accessed January 2022).
- Mongeau R, Brooks SPJ. 2016. Dietary Fiber: Determination. Pages 383-391 in Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, editors. *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 ze dne 20. prosince 2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin. 2006. Úřední věstník Evropské unie. Available from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1924&from=SV> (accessed January 2022).
- National Research Council (US) Committee on Diet and Health. 1989. *Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk*. National Academies Press (US), Washington (DC).
- Ötles S, Ozgoz S. 2014. Health effects of dietary fiber. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria* **13**(2): 191-202.

- Phillips KM, Haytowitz DB, Pehrsson PR. 2019. Implications of two different methods for analyzing total dietary fiber in foods for food composition databases. *Journal of Food Composition and Analysis* **84**.
- Polák P. 2008. Vlákna – nenahraditelná složka potravin. *Maso* **19**: 30-32.
- Qi X, Tester RF. 2019. Utilisation of dietary fibre (non-starch polysaccharide and resistant starch) molecules for diarrhoea therapy: A mini-review. *International Journal of Biological Macromolecules* **122**: 572-577.
- Quagliani D, Felt-Gunderson P. 2016. Closing America's Fiber Intake Gap: Communication Strategies From a Food and Fiber Summit. *American Journal of Lifestyle Medicine* **11**(1): 80-85.
- Slavin J. 2013. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients* **5**(4): 1417-1435.
- Southgate DAT. 1969. Determination of carbohydrates in food. I. Available carbohydrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **20**(6): 326-330.
- Společnost pro výživu. 2013. Výživová a zdravotní tvrzení. Available from <https://www.vyzivaspol.cz/vyzivova-a-zdravotni-tvrzeni-2/> (accessed January 2022).
- Suková I. 2014. Označování potravin – průvodce pro spotřebitele. Ministerstvo zemědělství. Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/publikace/Oznacovani%20potravin%20-%20posledni%20verze%20web.pdf> (accessed January 2022).
- Štercová E, Straková E, Rusníková L, Hudečková P. 2012. Chemická analýza krmiv.
- Wolters MGE, Verbeek C, Westerop JMV. 1992. Comparison of different methods for determination of dietary fiber. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International* **75**: 626-634.

