



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 CEREÁLNÍCH VÝROBKŮ PRO ZVLÁŠTNÍ VÝŽIVU S PŘÍDAVKEM EXTRAKTŮ Z KVASINEK A ŘAS

DEVELOPMENT OF CEREAL PRODUCTS FOR SPECIAL NUTRITION WITH ADDITION OF YEAST AND ALGAE EXTRACTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Viktória Požgayová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1795/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Viktória Požgayová**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Vývoj cereálních výrobků pro zvláštní výživu s přidavkem extraktů z kvasinek a řas

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše – přehled cereálií se zvláštním zaměřením na atypické a bezlekové produkty
- 2) výběr cereálií, kvasinek a řas pro přípravu obohacených cereálních produktů
- 3) optimalizace metod stanovení základních nutričních složek cereálií a speciálních složek řas a kvasinek (vitaminy, chlorofyl, antioxidanty, apod.)
- 4) příprava směsných cereálních produktů, jejich charakterizace a biologické účinky

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Viktória Požgayová
studentka

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zameriava na vývoj bezpečkových cereálnych produktov obohatených o extrakty kvasiniek a rias.

Teoretická časť práce bola zameraná na bezpečkové cereálie používané v experimentálnej časti, na biologicky aktívne látky mikrobiálneho pôvodu a možnosti ich využitia v potravinárskom priemysle. Do práce bola zaradená aj kapitola venujúca sa hodnoteniu bezpečnosti potravín a aditív v potravinárskom priemysle. Teoretickú časť uzatvárajú použité metódy stanovenia vybraných biologicky aktívnych látok v analyzovaných vzorkách.

V experimentálnej časti práce boli analyzované tri vzorky bezpečkových múk, a to múka označená ako bezpečková, kukuričná múka a ryžová múka. Vo vzorkách bol stanovený obsah celkových sacharidov, proteínov, lepku, lipidov a bioaktívnych látok (fenolické látky, flavonoidy, antioxidanty, β -glukány). Najlepšie výsledky vo väčšine testovaných parametrov dosiahla kukuričná múka. Na prípravu mikrobiálnych extraktov bola použitá komerčne získaná biomasa rias *Spirulina* a *Chlorella* a nakultivovaná biomasa kvasiniek *Rhodospodium toruloides* a *Rhodotorula kratochvilovae*. Extrakty boli pripravené s využitím GRAS rozpúšťadiel (voda, 96 % ethanol, hexán a ich kombinácie). V pripravených extraktoch a biomase boli stanovené lipidy, proteíny a aktívne látky (pigmenty, fenolické látky, antioxidanty, vitamíny a β -glukány). Extrakty mikrorias *Spirulina* a *Chlorella* vykazovali vyššie koncentrácie väčšiny aktívnych látok ako kvasinky. Extrakty kvasiniek obsahovali vyššie koncentrácie karotenoidov, lipofilných provitamínov a β -glukánov. Bezpečnosť pripravených extraktov použitých pri príprave cereálneho produktu bola overená MTT testom cytotoxicity. Žiaden testovaný extrakt nevykazoval cytotoxické účinky. Na prípravu obohatených produktov bola na základe získaných výsledkov použitá kukuričná múka v kombinácii s biomasou *Spirulina*, vodným extraktom *Spirulina*, ethanolovým extraktom *R. toruloides* a kombináciou biomasy *Spirulina* s extraktom *R. toruloides*. V rámci práce boli pripravené dva typy obohatených cereálnych produktov, pričom vo všetkých obohatených produktoch bol zistený nárast koncentrácie sledovaných aktívnych látok.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

cereálie, lepok, karotenogénne kvasinky, mikroriasy, sinice, obohacovanie potravín, aktívne látky, cytotoxicita

ABSTRACT

This diploma thesis focuses on the development of gluten-free cereal products enriched with yeast and algae extracts.

The theoretical part of this thesis was focused on gluten-free cereals used in the experimental part, on microbial biologically active substances and on the possibility of their use in the food industry. A chapter devoted to the evaluation of food safety and additives in food industry was also included in this part. The theoretical part concludes with the description of the methods used to analyses of selected biologically active substances in the samples.

In the experimental part of this thesis, three samples of gluten-free flours were analysed, i.e. flour labelled as gluten-free, corn flour and rice flour. The content of total saccharides, proteins, gluten, lipids and bioactive substances such as phenolic substances, flavonoids, antioxidants and β -glucans were analysed in the samples. In the most of the tested parameters corn flour achieved the best results. In order to prepare the microbial extracts, commercially obtained biomass of *Spirulina* and *Chlorella* and cultivated biomass of carotenogenic yeasts *Rhodospiridium toruloides* and *Rhodotorula kratochvilovae* were used. The extracts were prepared using solvents labelled as GRAS (water, 96 % ethanol, hexane and their combinations). Lipids, proteins and active substances such as pigments, phenolic substances, antioxidants, vitamins and β -glucans were analysed in the prepared extracts and biomass. *Spirulina* and *Chlorella* extracts showed higher concentrations of bioactive substances while yeast extracts contained higher concentration of carotenoids, lipophilic provitamins and β -glucans. The safety of prepared extracts used in food applications was verified by the MTT test of cytotoxicity. None of the tested extracts showed cytotoxic effects. In order to prepare enriched cereal products, the corn flour, biomass of *Spirulina*, aqueous extract of *Spirulina*, ethanolic extract of *R. toruloides* and the combination of *Spirulina* biomass and *R. toruloides* extract were chosen based on the obtained results. Two types of enriched cereal products were prepared and in enriched products the increase of antioxidant activity, phenolic compounds and protein content was detected.

KEY WORDS

cereals, gluten, carotenogenic yeast, microalgae, cyanobacteria, food enrichment, active substances, cytotoxicity

POŽGAYOVÁ, Viktória. *Vývoj cereálních výrobků pro zvláštní výživu s přidávkem extraktů z kvasinek a řas* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149093>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som sa rada poďakovala vedúcej mojej diplomovej práce prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za odborné vedenie práce a rady pri vypracovávaní práce. Ďalej patrí moje poďakovanie Ing. Agáte Bendovej a Ing. Jane Blažkovej za ochotu, cenné rady, pomoc a čas, ktoré mi venovali pri vypracovávaní experimentálnej časti diplomovej práce, ako aj Ing. Martinovi Szotkowskému PhD.. V neposlednom rade by som sa chcela poďakovať mojej rodine a priateľovi za neustálu podporu počas celého štúdia.

OBSAH

1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČASŤ	11
2.1 Cereálie	11
2.2 Obilné zrno	11
2.3 Nutrične významné látky v cereáliách	12
2.4 Bezlepkové cereálie	13
2.4.1 Lepok	13
2.4.2 Celiakia	14
2.4.3 Bezlepkové suroviny a výrobky	15
2.4.4 Kukurica	16
2.4.5 Ryža	16
2.5 Pseudocereálie	17
2.6 Obohacovanie potravín	17
2.7 Mikroriasy	18
2.7.1 Chlorella	19
2.8 Sinice	19
2.8.1 Spirulina	20
2.9 Kvasinky	21
2.9.1 Rod <i>Rhodotorula</i>	21
2.9.2 Rod <i>Rhodospiridium</i>	22
2.10 Mikrobiálne biologicky aktívne látky	22
2.11 Antioxidanty	22
2.11.1 Polyfenolické látky	23
2.11.2 Karotenoidy	24
2.11.3 Vitamíny	25
2.12 Chlorofyl	27
2.13 Polynenasýtené mastné kyseliny	27
2.14 β -glukány	28
2.15 Bezpečnosť látok pridávaných do potravín	28
2.16 Techniky stanovenia bioaktívnych látok	29
2.16.1 Extrakcia	29
2.16.2 UV-VIS spektrofotometria	30

2.16.3	Chromatografia	30
2.16.4	Stanovenie antioxidačnej aktivity	31
2.16.5	Stanovenie cytotoxicity	31
3	CIELE PRÁCE	33
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	34
4.1	Zoznam použitých cereálií	34
4.2	Zoznam použitých mikroorganizmov	34
4.3	Zoznam chemikálií použitých pri príprave a analýze extraktov	35
4.4	Zoznam použitých prístrojov.....	35
4.5	Použité línie ľudských buniek	36
4.6	Príprava vybraných vzoriek cereálií pre analýzy	36
4.7	Stanovenie celkových sacharidov v cereáliách	36
4.8	Stanovenie mastných kyselín v cereáliách.....	37
4.8.1	Parametre analýzy na GC/FID	37
4.9	Stanovenie lepku v cereáliách	38
4.10	Stanovenie β -glukánov v cereáliách	38
4.11	Charakterizácia pripravených extraktov cereálií	39
4.11.1	Stanovenie celkových fenolických látok	39
4.11.2	Stanovenie flavonoidov	39
4.11.3	Stanovenie antioxidačnej aktivity (metóda TEAC).....	40
4.11.4	Stanovenie vo vode rozpustných proteínov podľa Hartree-Lowryho	40
4.12	Kultivácia kvasiniek vo fermentore	41
4.13	Príprava extraktov z kvasiniek	42
4.14	Príprava extraktov z mikrorias	43
4.15	Príprava kontrolných extraktov (extrakcia podľa Folcha)	43
4.16	Charakterizácia pripravených mikrobiálnych extraktov	43
4.16.1	Stanovenie celkovej výťažnosti extrakcie	43
4.16.2	Meranie absorpčných (UV-VIS) spektier pripravených extraktov	44
4.16.3	Spektrofotometrické stanovenie pigmentov	44
4.16.4	Stanovenie celkových fenolických látok	44
4.16.5	Stanovenie antioxidačnej aktivity (metóda TEAC).....	45
4.16.6	Stanovenie vo vode rozpustných proteínov podľa Hartree-Lowryho	45
4.16.7	Stanovenie pigmentov a lipofilných metabolitov s využitím HPLC.....	45

4.16.8	Stanovenie vo vode rozpustných vitamínov metódou HPLC	46
4.16.9	Stanovenie mastných kyselín s využitím GC.....	46
4.17	Stanovenie β -glukánov v mikroriasach.....	47
4.18	Stanovenie β -glukánov v kvasinkách.....	47
4.18.1	Stanovenie celkových glukánov.....	47
4.18.2	Stanovenie α -glukánov	47
4.19	MTT test cytotoxicity	48
4.20	Príprava zmesných cereálnych produktov	49
4.20.1	Príprava obohatených zmesí cereálií	49
4.20.2	Kulinárska príprava obohatených cereálnych kaší	49
4.21	Analýza pripravených cereálnych produktov.....	50
4.21.1	Stanovenie celkových fenolických látok	50
4.21.2	Stanovenie antioxidačnej aktivity (metóda TEAC).....	50
4.21.3	Stanovenie vo vode rozpustných proteínov podľa Hartree-Lowryho	50
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	51
5.1	Charakterizácia vybraných cereálií.....	51
5.1.1	Stanovenie celkových sacharidov podľa Duboisa.....	51
5.1.2	Stanovenie celkových fenolických látok a flavonoidov	52
5.1.3	Stanovenie antioxidačnej aktivity	53
5.1.4	Stanovenie mastných kyselín pomocou GC/FID	53
5.1.5	Stanovenie vo vode rozpustných proteínov	55
5.1.6	Stanovenie lepku	55
5.1.7	Stanovenie cereálnych β -glukánov.....	56
5.2	Charakterizácia extraktov z mikrorias	56
5.2.1	Celková výťažnosť extrakcie	57
5.2.2	Stanovenie pigmentov spektrofotometricky	58
5.2.3	Stanovenie celkových fenolických látok	59
5.2.4	Stanovenie antioxidačnej aktivity	60
5.2.5	Stanovenie vo vode rozpustných proteínov	61
5.2.6	Stanovenie pigmentov pomocou HPLC/PDA.....	62
5.2.7	Stanovenie mastných kyselín pomocou GC/FID	64
5.2.8	Stanovenie vitamínov rozpustných vo vode	65
5.2.9	Stanovenie β -glukánov	66

5.2.10	MTT test cytotoxicity	67
5.3	Charakterizácia extraktov z kvasiniek	68
5.3.1	Celková výťažnosť extrakcie	68
5.3.2	Stanovenie karotenoidov spektrofotometricky	69
5.3.3	Stanovenie celkových fenolických látok	70
5.3.4	Stanovenie antioxidačnej aktivity	71
5.3.5	Stanovenie lipofilných metabolitov pomocou HPLC/PDA.....	72
5.3.6	Stanovenie mastných kyselín pomocou GC/FID	74
5.3.7	Stanovenie glukánov	75
5.3.8	MTT test cytotoxicity	76
5.4	Charakterizácia pripravených obohatených cereálnych produktov	78
5.4.1	Charakterizácia pripravených obohatených cereálnych zmesí	78
5.4.2	Charakterizácia pripravených obohatených cereálnych kaší	80
6	ZÁVER	83
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	86
8	ZOZNAM SKRATIEK.....	96

1 ÚVOD

Cereálie a cereálne výrobky patria historicky medzi jedny z najviac konzumovaných plodín naprieč celou populáciou. Pre veľkú časť populácie dodnes predstavujú neoddeliteľnú súčasť každodennej stravy. V súčasnosti sa však problematickým stáva obsah lepku v obilninách. Zdravotné problémy súvisiace s rôznou mierou intolerancie lepku patria momentálne medzi jedny z najčastejšie sa vyskytujúcich zdravotných problémov v ľudskej populácii. Najzávažnejšou formou intolerancie lepku je celiakia patriaca medzi neliečiteľné autoimunitné ochorenia. Jedinou formou liečby, resp. úľavy od príznakov týchto ochorení je dodržiavanie prísnej bezlepkovej diéty.

Vzhľadom na prudký nárast počtu ľudí trpiacich rôznou formou intolerancie voči lepku v posledných rokoch rastie aj dopyt ľudí po bezlepkových verziách potravín. Tento typ potravín je vyhľadávaný nielen ľuďmi s intoleranciou lepku, ale aj zdravými jedincami zaujímavými sa o zdravú stravu. Tieto potraviny však majú podľa viacerých vedeckých štúdií oproti potravinám s obsahom lepku zníženú nutričnú hodnotu, najmä z pohľadu zníženého obsahu proteínov a vitamínov. Z tohto dôvodu je vhodné ich obohacovanie aktívnymi látkami.

Niektoré druhy mikroorganizmov patria medzi významných producentov viacerých nutričných a biologicky aktívnych zložiek. Výhodami využitia mikroorganizmov nie je len produkcia vybraných aktívnych látok bez chemickej syntézy, ale zároveň aj ich nižšie nároky na plochu kultivácie či kratší rastový cyklus. V súčasnosti patria mikroriasa *Chlorella* alebo sinica *Spirulina* medzi populárne tzv. „superpotraviny“ najmä vďaka vysokému obsahu bielkovín, vitamínov, minerálov, antioxidantov a polynenasýtených mastných kyselín. Avšak *Spirulina* a *Chlorella* nie sú jedinými mikroorganizmami produkujúcimi významné množstvá biologicky aktívnych látok. Niektoré rody kvasiniek, najmä karotenogénne kvasinky radiace sa medzi tzv. oleogénne kvasinky, sú schopné syntetizovať významné množstvá lipidov, vrátane polynenasýtených mastných kyselín a ďalších lipofilných aktívnych látok. Patri nim napr. karotenoidy (provitamíny A), ergosterol (provitamín D) alebo ubichinon (koenzým Q₁₀). Pridanie mikrobiálnych aktívnych látok do potravín predstavuje spôsob zvýšenia ich nutričnej hodnoty, a to nielen v prípade bezlepkových potravín.

Zvýšenie nutričnej hodnoty bezlepkových cereálií s využitím mikrobiálnych aktívnych látok je predmetom tejto diplomovej práce zameranej na analýzu nutričných a biologicky aktívnych látok vo vybraných cereáliách, kvasinkách a mikroriasach. Mikrobiálne extrakty budú za účelom zistenia bezpečnosti ich použitia v potravinách podrobené MTT testom cytotoxicity na bunkovej línii CaCo-2. V závere práce budú na základe získaných výsledkov navrhnuté cereálne produkty obohatené mikrobiálnymi aktívnymi látkami.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Cereálie

Cereálie, taktiež nazývané obilniny, sú rastliny, ktoré sa z botanického hľadiska radia medzi trávy (latinsky *Gramineae*). Jedná sa o jednoklíčnolistové rastliny patriace do čeľade lipnicovité (latinsky *Poaceae*). Obilniny sú pestované predovšetkým za účelom zberu jedlých semien, resp. zŕn s vysokou nutričnou hodnotou, ktoré môžu byť ďalej využívané v oblasti ľudskej výživy v rôznych formách. Môžu byť používané v celej (napr. ryža, vločky alebo rôzne obilné zrná, ktorú sú súčasťou cereálnych kaší alebo müsli výrobkov) alebo v zomletej forme. V zomletej forme sa jedná predovšetkým o múky s rôznou granuláciou (veľkosťou rozomletých zŕn) [1].

FAO OSN (anglicky *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) definuje ako cereálie, resp. obilniny, len rastliny, ktoré sa pestujú za účelom zberu suchých zŕn. V prípade, že sa plodiny zbierajú za zelena, za účelom kŕmenia, jedná sa o kŕmne plodiny. Cereálne výrobky sú definované ako výrobky pochádzajúce zo spracovania obilných zŕn chemickými alebo mechanickými procesmi alebo z výroby múky, škrobu či krupice [2].

Cereálie sú už niekoľko tisícročí globálne považované za jednu zo základných a rozsiahlo pestovaných zložiek ľudskej stravy. Z údajov zverejnených FAO OSN je celosvetová produkcia cereálií za posledných desať rokov každoročne vyššia než 2 250 miliónov ton, pričom v roku 2022 presiahla 2 765 miliónov ton. Vypestované cereálie nachádzajú využitie pri výrobe potravín a krmív, taktiež sú využívané priemyslom (napr. pri výrobe biopalív) a časť z nich je uskladňovaná [3]. Medzi najpestovanejšie obilniny sa radia pšenica, kukurica a ryža, ktoré spoločne tvoria približne 89 % všetkých vypestovaných obilnín. Celosvetová produkcia a zároveň aj spotreba pšenice každoročne rastie. Uvádza sa, že pre približne 30 % celosvetovej populácie je pšenica základnou obilninou pri konzumácii [4].

Cereálie sú celosvetovo považované za jeden zo základných zdrojov živín ako v rozvinutých tak v rozvojových krajinách. Odhaduje sa, že ich zastúpenie v ľudskej výžive tvorí až 60–70 %. Uvádza sa, že dokážu pokryť energetické nároky človeka až v dvojnásobnej miere oproti mäsovým či mliečnym výrobkom [1]. Cereálie a cereálne výrobky sú dôležitým zdrojom energie, makroživín a zároveň aj viacerých mikroživín. Taktiež sú to potraviny s pomerne lacnou produkciou, jednoduchým spôsobom transportu či uchovávaní. Obsah nutrične významných látok sa líši v závislosti na druhu cereálií a zároveň a na spôsobe ich spracovania a uchovávaní [5; 6].

Cereálie a z nich vyrábané výrobky obsahujú viaceré bioaktívne látky s potenciálne priaznivými účinkami na ľudské zdravie. Uvádza sa, že pravidelná konzumácia cereálnych produktov, najmä celozrnných, môže zohrávať pomerne významnú rolu pri prevencii ochorení kardiovaskulárneho systému, cukrovky alebo kolorektálneho karcinómu [5].

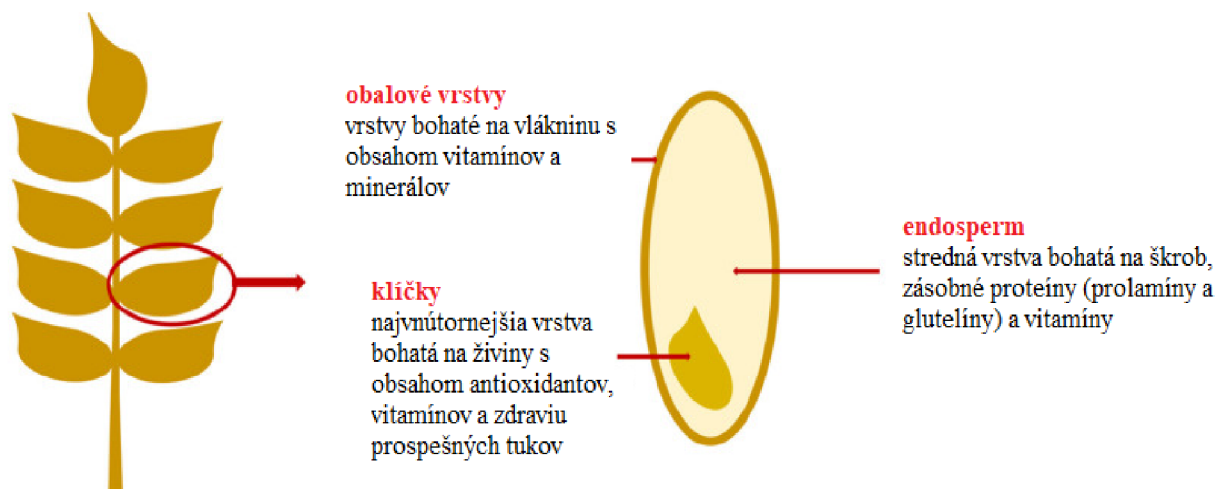
2.2 Obilné zrno

Zrná jednotlivých obilnín sú si, vzhľadom na to, že všetky obilniny patria do jednej čeľade, veľmi podobné. Napriek tomu je možné vidieť niekoľko rozdielov medzi zrnami jednotlivých

obilnín. Rozdiely spočívajú najmä v rôznej veľkosti či tvare zrna, ktorý môže byť od tenkého a podlhovastého až po guľatý tvar. Veľkosť a rozmery zrna sa líšia v závislosti od konkrétneho druhu obilniny a závisia na klimatických podmienkach (slnečný svit, priemerné teploty či ročný úhrn zrážok), ročnom období a lokalite pestovania [1].

Z hľadiska morfolologickej stavby zrna je jeho štruktúra podobná u všetkých druhov obilnín a zastúpenie jednotlivých vrstiev je rovnaké. Na povrchu zrna sa nachádza oplodie (perikarp), ktoré predstavuje najvrchnejšie obalové vrstvy chrániace zrno pred mechanickým poškodením a škodlivými faktormi. Je zložené z nerozpustných celulózy, hemicelulózy a lignínu a zároveň obsahuje aj minerálne látky a vitamíny. Perikarp obklopuje osemenie (testa), ktoré predstavuje podpovrchové obalové vrstvy tvorené neškrobovými polysacharidmi (hemicelulózy). Oplodie a osemenie sú pomerne húževnaté časti zrna, ktoré pri jeho mletí prechádzajú do otrúb [1].

Aleuronová vrstva tvorí rozhranie medzi obalovými vrstvami a endospermom. Môže obsahovať jednu alebo tri vrstvy buniek v závislosti od typu obilniny. Pšenica, ovos, raž a kukurica obsahujú jednu vrstvu, zatiaľ čo ryža a jačmeň majú tri vrstvy [5]. Endosperm predstavuje približne 80–85 % obilného zrna a je tvorený tenkostennými bunkami. Blok klíčku a štitku je významným zdrojom bielkovín, enzýmov a lipidov. Z dôvodu vysokého podielu lipidov sa však tento blok pred mlynárskym spracovaním odstraňuje za účelom zabránenia výskytu oxidačných zmien [1].



Obrázok 1: Štruktúra a zloženie obilných zrn, prevzaté z [7] a upravené

2.3 Nutrične významné látky v cereáliách

Cereálie obsahujú viaceré nutrične významné chemické zložky, pričom ich zastúpenie v jednotlivých častiach zrna je rozdielne. Endosperm je bohatý najmä na škrob a zásobné bielkoviny (prolamíny a glutelíny), zatiaľ čo ostatné vrstvy obsahujú viac proteínov s esenciálnymi aminokyselinami, vitamíny, minerály, vlákninu a lipidy. V týchto vrstvách majú zároveň vyššie zastúpenie aj bioaktívne látky ako fenolické látky, flavonoidy, taníny, karotenoidy a fytosteroly [7].

Uvádza sa, že cereálie majú najvyšší obsah polysacharidov (50–80 % váhy zrna). Nižšie zastúpenie v zrnách majú proteíny (5–6 %) a lipidy (1–10 %). Celé nezomleté zrná sú významným zdrojom minerálov, napr. vápniku, fosforu, horčík, železa, draslíku, zinku, medi

a vitamínov, napr. thiamin, riboflavín, niacín, biotín, pyridoxín a vitamíny A a E. Ich zastúpenie v zrnách je približne 1,5–2,5 %, pričom pri spracovaní signifikantne klesá vzhľadom na ich lokalizáciu v obilnom zrne [7]. Uvádza sa, že biela múka vzniknutá pri spracovaní zrn má o tretinu nižší obsah vitamínov a minerálov v porovnaní s celozrnnou múkou. Pri mletí zrn dochádza taktiež ku poklesu obsahu fenolických kyselín a lignanov. Obsah škrobu a proteínov, ktoré sa nachádzajú v endosperme, sa pri mletí výrazne neznižuje [5].

Cereálie v malej miere obsahujú aj tzv. antinutričné látky, napr. fytáty alebo inhibítory amyláz a proteáz. Tieto látky znižujú nutričnú hodnotu cereálií a cereálnych výrobkov tým, že reagujú s vitamínmi a minerálnymi látkami a zabraňujú ich vstrebávaniu v organizme. V prípade ich zvýšenej koncentrácie v potravinách môžu antinutričné látky pôsobiť na organizmus až toxicky. Množstvo antinutričných látok v potravinách je možné znížiť používaním tradičných techník prípravy potravín, napr. fermentácia či varenie [8].

2.4 Bezlepkové cereálie

Bezlepkové cereálie sú definované ako cereálie bez obsahu lepku alebo ako cereálie s obsahom lepku nižším ako 20 ppm lepku v cereáliách. Najčastejšími zástupcami bezlepkových cereálií sú kukurica, ryža, cirok, teff alebo proso. Niektoré štúdie radia medzi bezlepkové cereálie aj ovos, avšak podľa *Codex Alimentarius (Codex Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten)* je ovos obilninou obsahujúcou lepok, pričom jeho zastúpenie v endosperme je v porovnaní s ostatnými obilninami nižšie. V posledných rokoch sa záujem o bezlepkové produkty neustále zvyšuje. Predpokladá sa, že v rokoch 2020–2027 bude každoročne rásť podiel bezlepkových produktov na trhu približne o 7,6 % [4; 9].

2.4.1 Lepok

Lepok, tiež nazývaný glutén, patrí medzi vo vode nerozpustné, štruktúrne a zásobné glykoproteíny nachádzajúce sa v rastlinách z čeľade lipnicovité. Spolu so škrobom sa lepok vyskytuje v zrnách (endosperme) obilnín ako pšenica, jačmeň alebo raž. Tieto zásobné proteíny sú často označované aj názvom prolamíny, nakoľko sa v ich primárnej štruktúre nachádzajú významné množstvá aminokyselinových zvyškov glutamínu a prolínu. Prolamínové frakcie jednotlivých obilnín sú známe pod rôznymi názvami (viď Tabuľka 1) [10].

Tabuľka 1: Prehľad označenia prolamínov u jednotlivých typov obilnín

Typ obilniny	Označenie prolamínovej frakcie
pšenica	gliadíny a gluteníny
jačmeň	hordeíny
raž	secalíny
ovos	aveníny

Codex Alimentarius definuje lepok ako bielkovinovú frakciu z pšenice, raže, jačmeňa, ovosu alebo ich krížených variantov a ich derivátov, na ktorú majú niektoré osoby neznášanlivosť. Táto bielkovinová frakcia nie je rozpustná vo vode ani v 0,5 M roztoku chloridu sodného [4].

Lepok je v posledných rokoch považovaný za jeden z najčastejších potravinových alergénov. Je spájaný s ochoreniami ako sú alergie na pšenicu, intolerancia lepku, ataxia na lepok alebo najčastejšie celiakia. V potravinárskom priemysle je využívaný ako pojivo a emulgátor [11]. V pekárskom priemysle je kvalita výsledných pekárskych výrobkov závislá na kvalite a prítomnosti lepku v ceste, resp. v používaných múkach. Vďaka svojej 3D štruktúre ovplyvňuje lepok viskoelastické vlastnosti cesta a jeho schopnosť absorpcie vody a zadržiavania plynov [12].

V súčasnosti má termín lepok dva významy. Z dietologického hľadiska je za lepok považovaná prolaminová a glutelínová frakcia obilnín (pšenica, žito, jačmeň a ovos), ktorá obsahuje kritickú sekvenciu aminokyselín prejavujúcu sa príznakmi intolerance lepku, resp. celiakie. Jedná sa o nasledovné sekvencie aminokyselín:

- Pro-Ser-Gln-Gln (PSQQ),
- Gln-Gln-Gln-Pro (QQQP).

Z technologického hľadiska, najmä v pekárskom priemysle, lepok predstavuje špecifickú gélovú štruktúru tvorenú frakciami zásobných proteínov pšenice (t.j. gliadíny a gluteníny) vznikajúcu pri príprave cesta. Pri miešaní cesta dochádza, za prístupu vody, kyslíku a energie vo forme mechanickej práce, ku hydratácii zásobných proteínov za súčasného preskupenia intermolekulárnych a intermolekulárnych väzieb. Následne vzniká vyššie spomínaná dôležitá 3D štruktúra proteínov a vody [4].

Vzhľadom k čoraz častejšiemu výskytu zdravotných ťažkostí spájaných s konzumáciou lepku sa bezpečkové suroviny stávajú neoddeliteľnou súčasťou potravinárskeho priemyslu. V pekárskom odvetví priemyslu sa bezpečkové výrobky vyznačujú horšími senzorkými, štruktúrnymi a nutričnými vlastnosťami. Neprítomnosť lepku v pekárskom procese predstavuje v súčasnosti pomerne veľkú výzvu a hľadajú sa najpriateľnejšie možnosti nahradzovania lepku v bezpečkových múkach. Najpoužívanejšími náhradami lepku sú aditíva ako proteíny, enzýmy (peptidázy alebo proteázy) alebo hydrokoloidy (napr. mikrobiálny xanthán), ktoré viažu vodu a bobtnajú. Týmto dokážu nahradiť gélovitú štruktúru, ktorú vytvára lepok. Kyseliny vznikajúce pri kvasení dokážu podporiť bobtnanie polysacharidov a zlepšujú tak štruktúru bezpečkových výrobkov [13].

2.4.2 Celiakia

Celiakia je v súčasnosti jednou z najzávažnejších zdravotných ťažkostí vyvolaných konzumáciou lepku. Jedná sa o nevyliciteľné autoimunitné ochorenie, ktoré sa vyskytuje približne u 0,5–1,0 % celosvetovej populácie. Nižšia miera výskytu je na územiach s nižšou konzumáciou potravín s obsahom lepku, napr. Subsaharská Afrika alebo Japonsko. V Západných krajinách je miera výskytu celiakie vyššia. Celiakia je najčastejšie diagnostikovaná v krajinách ako Mexiko, Portugalsko, Švédsko, Česká republika a Turecko. Celiakia je v súčasnosti častejšie diagnostikovaná u žien než u mužov (pomer diagnostikovaného ochorenia u žien ku mužom je 2:1 až 3:1) [14; 15].

Celiakia je zároveň považovaná za dedičné ochorenie. Gén zodpovedný za vznik celiakie je prítomný v genóme približne 25–30 % celosvetovej populácie. Ku rozvinutiu tohto ochorenia dochádza len u cca 3 % ľudí nesúcich tento gén [14].

U pacientov trpiacich celiakiou nastáva po požití lepku imunitná odpoveď, ktorá vedie ku rôzne vážnym poškodeniam sliznice tenkého čreva. Na sliznici tenkého čreva sa vytvára zápal, ktorý spôsobuje zmenšenie povrchu sliznice tenkého čreva, čoho následkom je zníženie miery absorpcie mikroživín ako napr. železo, vápnik alebo vitamíny. Vzhľadom na to, že celiakia je považovaná za nevyliciteľné ochorenie je jedinou možnou terapiou nasadenie prísnej bezlepkovej diéty. Pri dôslednom dodržiavaní bezlepkovej diéty dochádza ku výraznému zlepšeniu zdravotného stavu a vymiznutiu väčšiny príznakov ochorenia [16; 17].

Najčastejšími príznakmi celiakie sú gastrointestinálne problémy, napr. strata hmotnosti, strata chuti do jedla, hnačka, nadúvanie, zápcha a bolesti brucha. V dôsledku zníženej absorpcie mikroživín sliznicou tenkého čreva sa vyskytuje taktiež anémia, zmeny v hustote kostí vrátane osteoporózy. U detí trpiacich celiakiou je možný výskyt porúch rastu, resp. spomalenie rastu. U žien s diagnostikovanou celiakiou sa môžu vyskytovať viaceré poruchy reprodukčného systému [14].

2.4.3 Bezlepkové suroviny a výrobky

Za bezlepkové suroviny sú považované suroviny, ktoré prirodzene neobsahujú žiadny lepok alebo suroviny, ktoré prešli špeciálnou úpravou, tzv. deproteinizáciou, za účelom zníženia obsahu lepku. Medzi prirodzene bezlepkové suroviny patria:

- bezlepkové obilniny – kukurica, ryža, cirok, proso,
- pseudocereálie – pohánka, amaranth, quinoa,
- bezlepkové suroviny – zemiaky, strukoviny, ovocie, zelenina [4].

Bezlepkové suroviny a výrobky z nich sú primárne určené pre ľudí trpiacich ochoreniami spájanými s konzumáciou lepku. Poskytujú alternatívu k obilninám s obsahom lepku, avšak bolo preukázané, že ich nutričná hodnota je nižšia než u obilnín s obsahom lepku. Bezlepkové produkty majú preukázateľne vyšší obsah polysacharidov a nasýtených mastných kyselín a zároveň nižší obsah vlákniny, proteínov, minerálov a vitamínov. Cena bezlepkových výrobkov je spravidla vyššia než pri výrobkoch s obsahom lepku (v rozmedzí 46–443 %) [18].

Spôsob označovania potravín bez obsahu lepku je definovaný nariadením komisie (EÚ) č. 828/2014 z 30. júla 2014 o požiadavkách na poskytovanie informácií spotrebiteľom o neprítomnosti alebo zníženom obsahu gluténu v potravinách. Potravinami označovanými ako „BEZ OBSAHU GLUTÉNU“ sú len potraviny s obsahom lepku nižším ako 20 mg/kg v podobe, v akej sa potravina predáva spotrebiteľovi. Označenie „VELMI NÍZKY OBSAH GLUTÉNU“ je určené pre potraviny, ktoré obsahujú jednu alebo viac zložiek pochádzajúcich zo špeciálne spracovanej pšenice, jačmeňa, raže alebo ovsa za účelom zníženia obsahu lepku. Označenie platí taktiež pre potraviny, ktoré neobsahujú viac lepku ako 100 mg/kg v podobe, v akej sa potravina predáva spotrebiteľovi. V prípade, že bezlepková potravina obsahuje ovos, nesmie obsah lepku v takomto ovse presiahnuť 20 mg/kg [4].

2.4.4 Kukurica

Kukurica je v súčasnosti najviac pestovanou obilninou na svete. Jej celosvetová ročná produkcia prebehla obilniny ako pšenica alebo ryža. V rokoch 2016/2017 bola produkcia kukurice vyššia než 1075 miliónov ton, pričom za posledných 5 rokov jej produkcia každoročne rastie, a to približne o 2,2 % ročne. Najväčšími producentmi sú Spojené štáty americké, Čína a Brazília [19].

Z chemického hľadiska je kukuričné zrno, podobne ako všetky obilné zrná, tvorené najmä sacharidmi (72 %), predovšetkým škrobom. Kukuričné proteíny sú tvorené tzv. zeínmi, čo sú zásobné proteíny (prolamíny) tvoriace približne 60 % všetkých kukuričných proteínov. Zastúpenie proteínov v kukuričnom zrne je približne 8,8 %. Kukuričné zrno ďalej obsahuje lipidy (4,6 %), minerálne látky (2,33 %) a vlákninu (2,15 %). Zastúpené sú taktiež bioaktívne látky ako fenolické látky, flavonoidy, antokyaníny, β -karotén, luteín a B vitamíny (B₁, B₂, B₃) [4; 20; 21].

Kukuričné klíčky sa využívajú na lisovanie kukuričného oleja, ktorý je bohatý na nenasýtené mastné kyseliny. Najviac zastúpené sú polynenasýtené mastné kyseliny (56 %), a to najmä kyselina linolová, olejová a palmitová. Mononenasýtené mastné kyseliny tvoria 30 % oleja a nasýtené mastné kyseliny 14 % [4].

Kukurica patrí medzi rýchlo rastúce obilniny. V minulosti bola tradične využívaná ako krmivo pre zvieratá. V rámci ľudskej výživy môže byť konzumovaná v surovom alebo spracovanom stave. Najčastejšie je kukurica spracovávaná na múku a škrob alebo na sekundárne produkty ako tortilly či raňajkové cereálie [22].

Kukuričná múka je prirodzene bezlepkovou múkou a u osôb trpiacich celiakiou alebo intoleranciou lepku slúži ako náhrada pšeničnej múky. Je vyrobená z usušených a rozmlätých kukuričných zŕn. Najčastejšie má žlté sfarbenie, avšak v závislosti na odrode použitej kukurice môže byť aj modrého alebo bieleho zafarbenia. Je považovaná za celozrnnú múku, nakoľko obsahuje kukuričný obal, endosperm aj klíčky. Kukuričná múka sa používa ako zahusťovadlo a pri príprave omáčok, polievok a niektorých dezertov [23].

2.4.5 Ryža

Ryža je celosvetovo konzumovanou obilninou, pričom sa uvádza, že pre približne 50 % populácie je jedným zo základných zdrojov živín. V súčasnosti sa pestujú dva druhy ryže, ktoré majú viacero odrôd. V Ázii sa pestuje druh s označením *Oryza sativa*, zatiaľ čo v afrických krajinách je kultivovaný druh *Oryza glaberrima*. Celosvetovo patria medzi najväčších producentov ryže ázijské krajiny ako Čína, India a Indonézia [24].

Ryža je pestovaná pre priamu spotrebu a najčastejšie sa konzumuje zrno v tepelne upravenej podobe. V Európe a Amerike je ryža najčastejšie konzumovaná ako príloha, zatiaľ čo v Ázii predstavuje základnú surovinu pri príprave jedál. Existuje viacero delení ryže, napr. podľa spôsobu úpravy môže byť ryža lúpaná alebo nelúpaná. V závislosti od tvaru zrna sa rozlišuje guľatorznná ryža, ktorá je mäkšia a ľahšie sa rozvára a dlhozrnná ryža, ktorá pri varení lepšie drží tvar. Z nutričného hľadiska obsahuje ryža vysoký podiel sacharidov, škrobu a proteínov. Zároveň má nízky obsah sodíka a lipidov [1; 4; 25].

Ryža je okrem priamej konzumácií zŕn používaná aj na výrobu škrobu a ryžovej múky. V Japonsku sa taktiež používa ako surovina pri výrobe alkoholu. Ryžová múka má biele sfarbenie a patrí medzi prirodzene bezlepkové múky s ľahkou stráviteľnosťou a nevýraznou chuťou. Vzhľadom na absenciu lepku je vhodná pre ľudí trpiacich celiakiou. Zároveň nie je vhodná na prípravu klasických kysnutých výrobkov, keďže cesto nie je dostatočne pružné a má nízku mieru zadržiavania plynov počas kysnutia. Ryžová múka je súčasťou niektorých raňajkových cereálií [4; 25].

2.5 Pseudocereálie

Pseudocereálie, resp. pseudoobilniny, sú dvojkličnolistové rastliny patriace do iných čeľadí ako lipnicovité (latinsky *Poaceae*). Sú definované ako akékoľvek rastliny nepatriace medzi trávy, ktorých produktom sú semená alebo zrná používané ako múky alebo základné potraviny či zdroje živín. Pseudocereálie produkujú zrná s vysokým obsahom škrobu, ktoré majú podobný spôsob spracovania a využitia ako tradičné obilniny. Z tohto dôvodu sa často označujú ako netradičné alebo atypické obilniny. Medzi najvýznamnejších zástupcov pseudocereálií patria pohánka, quinoa a amarant [4; 26].

Pseudocereálie sú prirodzene bezlepkové a u mnohých pacientov trpiacich ochoreniami spájanými s intoleranciou lepku sú bežnou súčasťou každodennej stravy. Najčastejšie sú konzumované vo forme celých zŕn alebo v zomletej forme ako celozrnné múky [4]. Z nutričného hľadiska sú pseudocereálie výživnejšie ako tradičné cereálie. Predstavujú veľmi dobrý zdroj mikro- a makroživín. V porovnaní s tradičnými obilninami obsahujú vyššie koncentrácie minerálov ako železo, zinok, vápnik, horčík alebo mangán. Zároveň obsahujú podobné alebo vyššie množstvo proteínov ako tradičné cereálie. Vzhľadom na to, že sa jedná o dvojkličnolistové rastliny sú zásobné proteíny (prolamíny) nahradené globulínmi a albumínmi. Proteíny prítomné v pseudocereáliách sú kvalitnejšie. Quinoa a amarant majú vysoký obsah esenciálnych aminokyselín arginínu a histidínu, vďaka čomu sú vhodnou súčasťou detskej výživy. Podobne ako tradičné cereálie aj pseudocereálie obsahujú antinutričné látky inhibujúce absorpciu minerálov, napr. fytát [26; 27].

2.6 Obohacovanie potravín

Uvádza sa, že podvýživa alebo chronický nedostatok základných vitamínov a minerálov, najčastejšie železa, zinku a vitamínov A a D, sú príčinou až 45 % všetkých úmrtí detí v krajinách s nízkym alebo stredným príjmom. Jedným z riešení problémov spojených s podvýživou, resp. nedostatočným príjmom mikroživín, je obohacovanie potravín [28].

Obohacovanie potravín (anglicky *Food Fortification*) zahŕňa techniky zvyšovania obsahu jednej alebo viacerých esenciálnych mikroživín v potravinách, kde je ich obsah minimálny, resp. žiadny. V súčasnosti sa jedná o lacnú a pomerne efektívnu metódu zvyšovania nutričnej hodnoty potravín, ktorej účelom je zabránenie nedostatočného príjmu mikroživín. Obohacovanie potravín môže byť cielené na celú populáciu (celoplošná fortifikácia) alebo len na špecifickú časť populácie (cielená fortifikácia), napr. deti, tehotné ženy alebo ľudia z rozvojových krajín [29].

Medzi najčastejšie obohacované potraviny patria múky, ryža, mlieko a mliečne produkty a cereálie. Bezlepkové obilniny a výrobky obsahujú nižšie zastúpenie mikroživín a z toho dôvodu sú často fortifikované. Nižší obsah mikroživín súvisí v prípade múk najmä s technologickým procesom výroby, konkrétne mletím zrn. Zrná sa stávajú lepšie stráviteľnými, zároveň však dochádza ku odstráneniu niektorých bioaktívnych látok, čo vedie ku zníženiu nutričnej hodnoty a pozitívnych vplyvov na zdravie [30].

Za účelom úspešného obohatenia potraviny je potrebné, aby bola potravina, ktorá má byť potenciálne obohacovaná, konzumovaná v dostatočnej miere časťou populácie, pre ktorú má byť určená. Obohacujúca látka musí byť dobre absorbovateľná potravínou, do ktorej je pridávaná a zároveň nesmie negatívne ovplyvniť senzorické vlastnosti pôvodnej potraviny, t.j. zhoršiť jej chuť, vôňu alebo farbu [29].

Existuje viacero spôsobov fortifikácie potravín. Biofortifikácia (anglicky *Biofortification*) využíva na vytvorenie obohatenej potraviny alebo plodiny šľachtenie, biotechnologické techniky alebo génové inžinierstvo. Najznámejším príkladom biofortifikácie je tzv. zlatá ryža, ktorá má zvýšený obsah β -karoténu a má dvojnásobný obsah železa v porovnaní s klasickou ryžou. Komerčná a priemyslová fortifikácia (anglicky *Commercial and Industrial Fortification*) je spôsob obohacovania komerčne dostupných potravín (ryža, múka, olej,...) pridaním priemyselne, resp. chemicky syntetizovaných mikroživín. Ďalšou možnosťou je fortifikácia potravín v rámci domácností (anglicky *Home Fortification*), pri ktorej sa nedostatok mikroživín v určitej populácii suplementuje konzumáciou tabliet s obsahom doplnkov výživy. Mikrobiálna fortifikácia (anglicky *Microbial fortification*) obohacuje potraviny produktami mikrobiálneho metabolizmu, napr. vitamínmi, lipidmi či pigmentami. Možné je aj obohatenie určitých potravín priamo niektorými kmeňmi probiotických baktérií alebo pridaním biomasy, najmä mikrorias [31].

Pridávanie mikrorias, najmä *Chlorella vulgaris* alebo *Arthrospira platensis*, je v súčasnosti známym konceptom. Problémom je však, najmä z pohľadu konzumenta, ich vplyv na štruktúru jedla, ktorá je ovplyvnená nielen vysokým obsahom proteínov alebo polysacharidov, ale aj zmenou senzorických vlastností (vôňa, farba, chuť) [32]. Proteíny a polysacharidy izolované z mikrorias nachádzajú využitie v rámci potravinárskeho priemyslu ako zahusťovadlá. Pridávanie celej mikrobiálnej biomasy sa však momentálne javí ako atraktívnejšie stratégie z viacerých pohľadov. Pridaním biomasy sa zvyšuje celková nutričná hodnota danej potraviny. Z ekologického hľadiska nie je nutné využívať rozpúšťadlá, ktoré môžu mať negatívny vplyv na životné prostredie [33].

2.7 Mikroriasy

Mikroriasy sú pomerne rozšírenými mikroorganizmami. V súčasnosti je známych a preskúmaných približne 30 000 druhov mikrorias, pričom sa odhaduje, že existuje viac než 50 000 rôznych druhov. Mikroriasy sú jednoduché, zväčša jednobunkové, fotosyntetizujúce mikroorganizmy obývajúce sladkovodné aj morské ekosystémy. Vyskytovať sa môžu jednotlivo alebo vo väčších kolóniách [34].

Pre svoj rast vyžadujú prostredie s dostatočným množstvom vody, prísunom oxidu uhličitého, svetla a živín a stopových prvkov. Dusík predstavuje dôležitú živinu nevyhnutnú pre rast, syntézu proteínov, nukleových kyselín a chlorofylu. Svetlo mikroriasam poskytuje zdroj energie pre fotosyntézu a rast. Hoci je mechanizmus fotosyntézy u mikrorias podobný ako u suchozemských rastlín, zdá sa, že mikroriasy sú fotosynteticky účinnejšie. Mikroriasy majú vyššiu mieru fixácie oxidu uhličitého a produkcie kyslíku spolu s vyššou produkciou biomasy a rýchlejšim rastom [34; 35].

V prípade vhodných kultivačných podmienok patria mikroriasy medzi producentov významných bioaktívnych látok využívajúcich sa v rôznych odvetviach priemyslu. Mikroriasy sú významnými producentami lipidov, ktoré môžu tvoriť 20–50 % získanej biomasy. Ďalšími nutrične významnými metabolitmi sú proteíny, pigmenty, vitamíny, aminokyseliny alebo polynenasýtené mastné kyseliny [34; 36].

2.7.1 Chlorella

Chlorella je zelená mikroriasa (*Chlorophyta*) s malými bunkami guľatého tvaru a s priemerom približne 2–10 µm. Jedná sa o jednobunkový rýchlo rastúci fotosyntetizujúci mikroorganizmus. V súčasnosti je celosvetovo považovaná za najviac kultivovanú mikroriasu. Využitie nachádza v zdravej výžive, ako výživový doplnok, ale taktiež vo farmaceutickom a kozmetickom priemysle. Možné je použitie vyextrahovaných bioaktívnych látok a pigmentov alebo celej biomasy [37; 38].

V minulosti bola *Chlorella* produkovaná a konzumovaná najmä v ázijských krajinách, konkrétne v Japonsku. V posledných rokoch sa vďaka svojim výborným nutričným a antioxidačným vlastnostiam rozšírila do celého sveta. *Chlorella* je známa vysokým zastúpením proteínov (51–58 %). Z pohľadu aminokyselín obsahuje všetky pre človeka esenciálne AMK v pomerne významných koncentráciách. Arginín, aminokyselina s potenciálnymi imunomodulačnými vlastnosťami, je v mikroriase *Chlorella* zastúpená v množstve 3200 mg/100 g biomasy [39].

Významné je aj zastúpenie sacharidov (12–17 %), lipidov (14–22 %) a ďalších významných látok ako vitamíny, minerály a antioxidanty. Zastúpenia sa líšia v závislosti od jednotlivých druhov mikroriasy *Chlorella*. Najznámejším druhmi sú *Chlorella vulgaris* a *Chlorella sorokiniana*. Uvádza sa, že komerčne dostupná *Chlorella* obsahuje všetky vitamíny potrebné pre človeka a zároveň aj vitamíny D₂ a B₁₂, ktoré sa nenachádzajú v rastlinách. Napríklad obsah kyseliny listovej, známej ako vitamín B₉, je dokonca vyšší než v špenáte. Z hľadiska obsahu minerálov je významné najmä zastúpenie železa (104 mg/100 g biomasy) a draslíku (986 mg/100 g biomasy) [39]. Uvádza sa, že mikroriasa *Chlorella* obsahuje až 4 % chlorofylu, čo je 5–10-krát viac než je obsah chlorofylu u sinice *Spirulina*. *Chlorella* je v súčasnosti považovaná za potravinový doplnok a často je pridávaná do potravín, ktoré pomáhajú predísť nedostatku železa, anémii alebo znižujú obsah cholesterolu v krvi [40].

2.8 Sinice

Sinice (tiež známe pod názvom cyanobaktérie) sa radia medzi gramnegatívne baktérie. Jedná sa o prokaryotické fotosyntetizujúce autotrofné organizmy s jednobunkovou alebo vláknitou

stielkou. Druhy s jednobunkovou stielkou majú guľovitý, oválny alebo paličkovitý tvar a sú schopné tvoriť kolónie. Pri tvorbe kolónií sa jednotlivé bunky umiestňujú kolmo na ostatné bunky bez vzniku fyziologického spojenia [41].

Sinice sú typické modrozeleným, sivomodrým alebo žltozeleným sfarbením spôsobeným prítomnosťou asimilačných pigmentov v thylakoidoch. Thylakoidy sa, na rozdiel od eukaryotických organizmov, nenachádzajú v chloroplastoch, ale voľne v protoplaste. Sinice neobsahujú vo svojej štruktúre žiadny chlorofyl b, prítomný je len chlorofyl a a iné pigmenty ako β -karotén, fykobilíny a xantofyly. Vyskytujú sa na vodných plochách chránených pred prudkým vetrom a na rôznych ponorených telesách, napr. telách vodných rastlín či kameňoch. Pre svoj život preferujú miesta s nižšou intenzitou svetla, s čím sa spája aj ich schopnosť chromatickej adaptácie, ktorá im umožňuje pomocou zmeny pomeru farbív absorbovať simultánne zelenú aj červenú časť svetelného spektra [41; 42; 43].

2.8.1 Spirulina

Spirulina je v posledných rokoch obľúbenou superpotravinou. Patrí medzi fotosyntetizujúce sinice modrozeleného sfarbenia. Radí sa do rodu *Spirulina*, resp. *Arthrospira*, pričom najviac preskúmaným a konzumovaným je druh *Arthrospira platensis*. Vyznačuje sa rýchlou, výhodnou a finančne málo náročnou kultiváciou. *Spirulina* je známa svojimi veľmi dobrými antioxidantnými a protizápalovými vlastnosťami [44].



Obrázok 2: Sinica *Spirulina* pod mikroskopom, objektív 100 x

Z nutričného hľadiska je *Spirulina* významným zdrojom proteínov, ktoré tvoria až 50–70 % suchej váhy biomasy. Uvádza sa, že konzumácia 10 g biomasy *Spirulina* denne človeku o hmotnosti 60 kg pokryje približne štvrtinu až tretinu odporúčanej dennej dávky proteínov. Zároveň má vyvážené zastúpenie nasýtených a nenasýtených mastných kyselín. Obsahuje vysoké koncentrácie esenciálnych mastných kyselín, najmä ω -3 a ω -6 mastných kyselín, ktoré pomáhajú znižovať hladinu cholesterolu v krvi. Prítomné sú taktiež sulfolipidy s vlastnosťami potenciálne ochraňujúcimi pred vírusovými infekciami. Sacharidy tvoria približne 15–25 % suchej váhy biomasy. *Spirulina* je výborným zdrojom vitamínov (B₁, B₂, B₁₂ a E), minerálov a aminokyselín [44; 33].

V rámci potravinárskeho priemyslu sa *Spirulina platensis* pridáva do viacerých typov produktov za účelom zlepšenia nutričných vlastností. *Spirulina* sa používa pri obohacovaní napr. jogurtov, kde je považovaná za prírodnú obohacujúcu ingredienciu vďaka obsahu nutričných látok a pigmentov (napr. fykocyanín – E18). Zároveň podporuje proliferáciu niektorých kmeňov mliečnych baktérií, čím zvyšuje nutričnú a biologickú hodnotu jogurtov. Biomasa *Spirulina* je možné použiť aj ako prídavok pri pečení pekárenských výrobkov. Bolo zistené, že prídavkom biomasy *Spirulina* (6 %) do chlebového cesta vykazovali všetky nutričné parametre (obsah proteínov, atď.) a antioxidačná aktivita lepšie výsledky v porovnaní s kontrolnými vzorkami [33].

2.9 Kvasinky

Kvasinky sú eukaryotické mikroorganizmy patriace do ríše *Fungi*. Jedná sa o mikroorganizmy, ktoré väčšinou dokážu skvasovať jednoduché cukry, monosacharidy a disacharidy, za vzniku ethanolu a oxidu uhličitého. U niektorých rodov sa schopnosť fermentácie cukrov nevyskytuje. Bunky kvasiniek majú zväčša elipsoidný až guľatý tvar s priemerom približne 3–6 µm. Tvar a veľkosť bunky závisia, predovšetkým na konkrétnom rode kvasiniek, veku bunky a kultivačných podmienkach. Kvasinky sa rozmnožujú pučaním alebo delením [45].

Kvasinky sa vyznačujú pevnou bunkovou stenou tvorenou najmä polysacharidmi, konkrétne glukánmi, ktoré predstavujú asi 80 %. Proteíny tvoria približne 6–10 % a vytvárajú s polysacharidmi pevnú sieť. Ďalšou zložkou bunkovej steny sú lipidy a fosfolipidy so zastúpením 3–10 %. Pevná bunková stena predstavuje komplikáciu pri extrakcii intracelulárnych metabolitov, a preto je pred samotnou extrakciou potrebné zaradiť postupy na jej rozbitie. Medzi najvýznamnejšie intracelulárne metabolity patria lipidy, najmä polynenasýtené mastné kyseliny, karotenoidy, vitamín E a provitamín D (ergosterol) [45].

2.9.1 Rod *Rhodotorula*

Kvasinky rodu *Rhodotorula* sú striktne aeróbne kvasinky patriace do kmeňu *Basidiomycota*. Jedná sa o rýchlo rastúce mikroorganizmy rozmnožujúce sa pučaním. Vyznačujú sa charakteristickým koralovým až ružovým sfarbením. Vznikajúce kolónie majú hladký a vypuklý povrch. Bunky sú elipsoidného až guľatého tvaru s priemerom približne 3–5 µm. Prirodzene sa kvasinky rodu *Rhodotorula* vyskytujú v pôde, vo vzduchu a na povrchoch listov (fylosféra) [46].

Rod *Rhodotorula* dokáže produkovať počas rastovej fáze glykogén a počas stacionárnej fáze významné množstvá lipidov a karotenoidných pigmentov. Tento rod sa radí medzi tzv. oleogénne kvasinky, ktoré sú schopné akumulovať lipidy až do zastúpenia 20–70 % hmotnosti suchej biomasy v závislosti od konkrétneho druhu kvasinky [47]. Rod *Rhodotorula* patrí medzi kvasinky, ktoré nedokážu fermentovať cukry. Tieto kvasinky sú veľmi dobrými producentmi karotenoidov, najmä β-karoténu, torulénu a torularodínu. Medzi najznámejších zástupcov patria druhy *Rhodotorula glutinis*, *R. mucilaginosa* a *R. kratochvilovae* [46].

2.9.2 Rod *Rhodospiridium*

Kvasinky rodu *Rhodospiridium* sú nepatogénne oleogénne kvasinky radiace sa do kmeňu *Basidiomycota*. Prvýkrát boli objavené a izolované zo vzduchu v roku 1922 v čínskom meste Ta-lien. Prirodzene sa vyskytujú v pôde, vo sladkých aj morských vodách alebo na listoch rastlín. Bunky kvasiniek sú oválneho až predĺženého tvaru. Kolónie sa vyznačujú žltým, oranžovým až červeným zafarbením súvisiacim s prítomnosťou karotenoidov [48; 49].

Rod *Rhodospiridium* zahŕňa kvasinky s výborným potenciálom v oblasti biotechnológií. Tieto kvasinky sa vyznačujú produkciou karotenoidov (β -karotén, torulén a torularodín), enzýmov (cefalosporín esteráza, epoxid hydroláza), koenzýmov Q₉ a Q₁₀ a lipidov. Dokážu akumulovať lipidy až do 70 % hmotnosti suchej biomasy. Syntéza lipidov je podporovaná limitáciou dusíka, železa, anorganického fosfátu alebo síry. Rod *Rhodospiridium* sa nevyznačuje schopnosťou fermentovať cukry [49; 50].

2.10 Mikrobiálne biologicky aktívne látky

Bioaktívne látky sú zlúčeniny vznikajúce v rámci primárneho alebo sekundárneho metabolizmu mikroorganizmov, ktoré majú preukázateľné prospešné účinky na ľudský organizmus a zdravie človeka. Najčastejšie sa vyznačujú antioxidantnými, antimikrobiálnymi, protirakovinovými, protizápalovými alebo imunomodulačnými vlastnosťami. V súčasnosti sa pozornosť zameriava na možnosť využitia mikrobiálnych bioaktívnych látok pri potravinárskych, kozmetických alebo farmaceutických aplikáciách. V potravinárskom priemysle by tieto látky mohli predstavovať zdroj prírodných, zdravých a nutrične bohatých potravinových ingrediencií, ktoré sú momentálne spotrebiteľmi veľmi žiadané [51].

Nevýhodou mikrobiálnych bioaktívnych látok je ich nízka stabilita a vysoká náchylnosť na degradáciu vplyvom svetla, tepla, vlhkosti či prítomnosti kyslíku. Z dôvodu nízkej stability sa v súčasnosti neodporúča ich priama konzumácia, vzhľadom k možným chemickým alebo fyzikálnym zmenám v gastrointestinálnom trakte po ich požití, vedúcim ku zmene ich biologickej aktivity. Nízka fyzikálnochemická stabilita mikrobiálnych extraktov a bioaktívnych látok môže byť vylepšená aplikáciou techník ako napr. enkapsulácia. Pri enkapsulácii aktívnych látok dochádza ku ich naviazaniu na matricu a vytvoreniu častice, ktorá ich chráni a zefektívni ich prenos k cieľovému miestu. K uvoľneniu metabolitov dochádza pri dosiahnutí vhodných podmienok [51].

2.11 Antioxidanty

Antioxidanty sú sekundárne metabolity nachádzajúce sa v rastlinách, ovocí alebo v mikroorganizmoch. Antioxidanty sú dôležité látky reagujúce s voľnými radikálmi, čím predchádzajú vzniku oxidačného stresu vedúceho ku poškodeniu buniek. Oxidačný stres vzniká v dôsledku hromadenia sa reaktívnych foriem kyslíka (anglicky *Reactive Oxygen Species* - ROS) v bunkách. Medzi najznámejšie ROS patria superoxidový anión, singletový kyslík, hydroxylový radikál alebo peroxid vodíka. ROS reagujú s molekulami v susedných bunkách a spôsobujú peroxidáciu lipidov, denaturáciu proteínov a hydroxyláciu DNA. Tieto poškodenia môžu viesť až ku odumretiu buniek. Najviac zasiahnuté orgány oxidáčnym stresom sú

mitochondrie. Oxidačný stres môže spôsobiť radu zdravotných komplikácií ako vznik rakoviny, diabetu alebo neurodegeneratívnych ochorení.

Podľa mechanizmu účinku sa antioxidanty rozdeľujú na primárne a sekundárne. Primárne antioxidanty neutralizujú oxidanty prenosom jedného atómu vodíku alebo prenosom jedného elektrónu. Sú pomerne účinné, už v malých množstvách dokážu neutralizovať veľké množstvo voľných radikálov. Sekundárne antioxidanty neutralizujú niektoré ROS zhasaním voľných radikálov, čím zároveň dochádza ku ich rýchlemu vyčerpaniu. Medzi primárne antioxidanty sa radia fenolické látky, sekundárnym antioxidantom je napr. β -karotén [52; 53].

Z hľadiska pôvodu sa antioxidanty delia na prírodné a syntetické, V súčasnosti sú najviac využívané syntetické antioxidanty, napr. butylhydroxytoluén (BHT), ktoré sa využívajú hlavne v potravinárskom priemysle pri ochrane potravín pred oxidáciou vedúcou ku zmene ich sensorických a nutričných vlastností. Syntetické antioxidanty sú pomerne nestabilné a pri dlhodobej expozícii môžu spôsobovať zdravotné problémy, napr. kožné alergie, gastrointestinálne ťažkosti či zvyšovať riziko vzniku rakoviny. Z tohto dôvodu sa zvyšuje záujem o nahradenie syntetických antioxidantov prírodnými pochádzajúcimi z rastlín, prípadne z mikroorganizmov s rýchlym rastom. Prírodné antioxidanty sú v porovnaní so syntetickými netoxické, nekarcinogénne a biodegradabilné. Rozdeľujú sa do troch hlavných kategórií, ktorými sú fenolické látky, karotenoidy a vitamíny [52; 53].

2.11.1 Polyfenolické látky

Polyfenolické látky sú skupinou rastlinných sekundárnych metabolitov vznikajúcich v rastlinách napr. po ožiarení UV žiarením alebo po napadnutí patogénmi. Dobrými zdrojmi polyfenolických látok sú potraviny rastlinného pôvodu a niektoré druhy mikrorias. Polyfenoly predstavujú bioaktívne látky s dobrými nutričnými vlastnosťami. Na organizmus pôsobia priaznivo a pomáhajú predchádzať vzniku chronických ochorení. Vzhľadom na ich schopnosť zachytávať voľné radikály a zároveň poskytovať jeden elektrón alebo vodíkový kation sú považované za hlavnú a najúčinnjšiu skupinu prírodných antioxidantov. Niektoré polyfenolické látky navyše vykazujú aj antimikrobiálnu aktivitu a inhibujú rast patogénnych mikroorganizmov, napr. *Escherichia coli* alebo rodu *Salmonella* [54; 55].

V súčasnosti je známych približne 8000 štruktúr patriacich medzi polyfenolické látky. Z chemického hľadiska obsahujú polyfenoly minimálne jeden aromatický (benzénový) kruh substituovaný aspoň jednou hydroxylovou skupinou. Práve vďaka hydroxylovej skupine vykazujú polyfenoly antioxidačné vlastnosti. Klasifikácia polyfenolov je pomerne komplikovaná a existuje viacero možností ich rozdelenia. Najviac preskúmanými kategóriami, v súvislosti s potravinami, sú fenolické kyseliny a flavonoidy [54; 55].

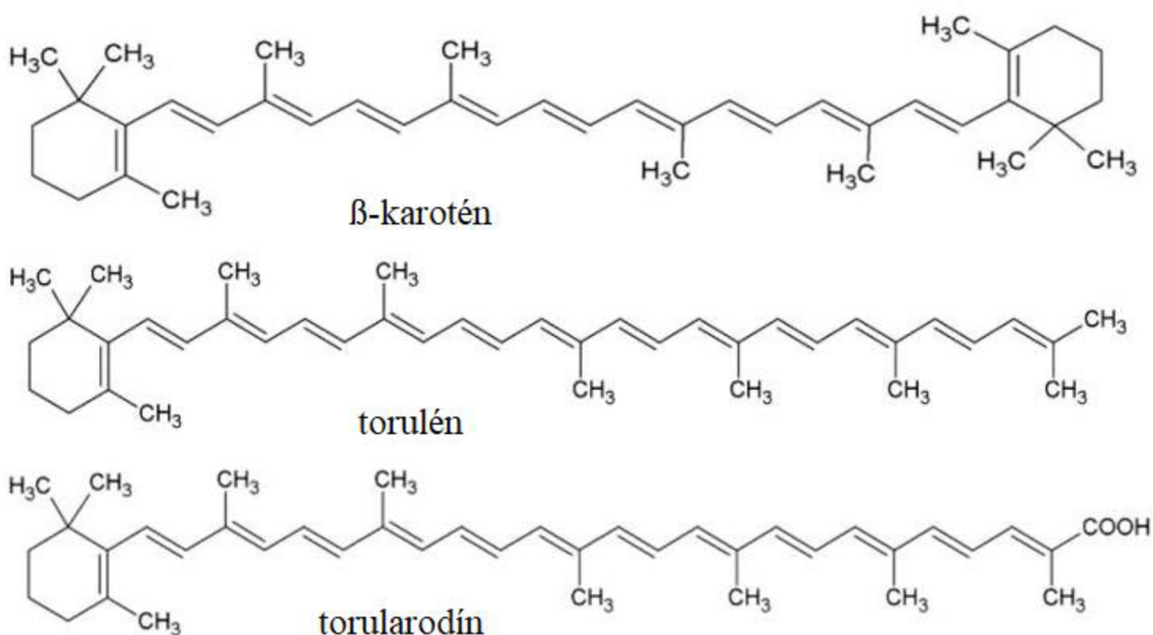
Fenolické kyseliny sú neflavonoidné polyfenoly nachádzajúce sa v ovocí, zelenine, cereáliách a kávoch zrnách. Rozdeľujú sa do dvoch hlavných skupín: kyseliny hydroxybenzoové (napr. kyselina gallová) a kyseliny hydroxyškoricové (napr. kyselina ferulová). Vyskytujú sa vo voľnej alebo vo viazanej forme. Viazané polyfenolické kyseliny je možné uvoľniť použitím kyslej, alkalickéj alebo enzýmovej hydrolýzy. Dobrými zdrojmi

fenolických kyselín sú okrem mikrorias aj zrná alebo semenka, ktoré obsahujú práve ich viazanú formu [54].

Flavonoidy predstavujú pomerne obsiahlu skupinu polyfenolických látok. Z hľadiska chemickej štruktúry sú flavonoidy zložené z dvoch aromatických kruhov spojených heterocyklom, najčastejšie 3-uhlíkatým reťazcom pyránového kruhu. Flavonoidy je možné rozdeliť na flavony, flavanony, flavonoly, flavan-3-oly a antokyaníny. Flavony a flavonoly tvoria najväčšiu skupinu flavonoidov, do ktorej patrí približne 4000 polyfenolických látok [54].

2.11.2 Karotenoidy

Karotenoidy sú pigmenty prirodzene sa nachádzajúce v ovocí, zelenine, rastlinách a mikroorganizmoch. Z chemického hľadiska sa jedná o organické lipofilné látky patriace ku izoprenoidom. Sú zložené zo skeletu so 40 atómami uhlíku a dlhých polyénových reťazcov obsahujúcich 3–15 dvojitých väzieb. Vďaka systému konjugovaných dvojitých väzieb dokážu karotenoidy absorbovať viditeľné svetlo. Dôsledkom je ich typické žlté, oranžové alebo červené sfarbenie. Na základe chemického zloženia sa karotenoidy delia na karotény (β -karotén, γ -karotén, torulén) a xantofyly (torularodín, astaxantín). Xantofyly, na rozdiel od karoténov, obsahujú vo svojej štruktúre atómy kyslíku [56; 57].



Obrázok 3: Chemická štruktúra vybraných karotenoidov, prevzaté z [57] a upravené

Karotenoidy sa vyznačujú antioxidantnými a protirakovinovými vlastnosťami a zároveň slúžia ako prekurzory vitamínu A. Uvádza sa, že napríklad luteín a zeaxantín sú účinnými antioxidantmi schopnými filtrovať modré a ultrafialové žiarenie, čím pomáhajú predchádzať rozvoju ochorení očí chronického charakteru. Najúčinnjšími antioxidantmi sú β -karotén, lykopen a luteín. Vďaka svojim vlastnostiam sa taktiež využívajú ako aditíva a farbivá v potravinárskom, kozmetickom a farmaceutickom priemysle. V súčasnosti na trhu dominujú synteticky pripravené karotenoidy. Kvôli neustále rastúcemu záujmu spotrebiteľov o zdravé a prírodné potraviny a potenciálnym kontamináciám, či už karotenoidov alebo životného

prostredia v dôsledku chemickej syntézy, sa hľadajú iné možnosti zisku karotenoidov, napr. ich zisk z mikroorganizmov. Zároveň štúdie uvádzajú, že prirodzená forma β -karoténu je lepšie absorbovateľná ľudským telom v porovnaní so syntetickou formou [58; 59].

Karotenoidy sú prirodzene syntetizované riasami, kvasinkami a baktériami. Kvasinky, najmä červené, resp. karotenoidné, sú vhodnými producentmi karotenoidov vzhľadom na rýchly rast a jednoduchú, priestorovo menej náročnú kultiváciu. Najznámejšími producentmi karotenoidov spomedzi kvasiniek sú rody *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* a druh *Phaffia rhodozyma* [59].

2.11.3 Vitamíny

Vitamíny sú organické zlúčeniny, ktoré predstavujú pre človeka esenciálne mikroživiny. Ľudský organizmus si ich nedokáže sám syntetizovať, a preto ich musia ľudia prijímať z potravy. Najčastejšími zdrojmi vitamínov sú potraviny rastlinného pôvodu ako ovocie alebo rôzne semienka. Niektoré vitamíny sú v rastlinných zdrojoch prítomné len v minimálnych množstvách. Jedná sa napr. o vitamíny D, K alebo vitamíny skupiny B, ktoré sú zároveň vo významných množstvách zastúpené v niektorých mikroriasach alebo kvasinkách [60; 61].

V organizme plnia viacero dôležitých funkcií. Môžu pôsobiť špecificky na niektoré biologické funkcie (vitamín B₇) alebo komplexne (vitamín C). Vystupujú ako prekursori, koenzýmy, hormóny, alebo antioxidanty. Zároveň dokážu regulovať rast a proliferáciu buniek. Najčastejšie sa delia podľa rozpustnosti na hydrofilné a lipofilné vitamíny. Medzi lipofilné vitamíny sa radia vitamíny A, D, E, K. Najznámejšie vitamíny rozpustné vo vode sú vitamíny skupiny B a vitamín C [61].

Vitamín A je lipofilný vitamín, ktorý je možné prijímať z dvoch typov zdrojov. Zvieracie tkanivá obsahujú retinol, zatiaľ čo rastlinné zdroje, vrátane mikrorias, obsahujú tzv. provitamín A - karotenoidy. Existujú rôzne biologicky aktívne formy retinoidov (retinol, retinal, kyselina retinová) a provitamínov A, ktoré sú v ľudskom organizme metabolizované na vitamín A počas trávenia. Medzi najznámejšie provitamín A karotenoidy patria α -karotén, β -karotén a β -kryptoxantín. Vitamín A je antioxidant a zároveň je dôležitý pre správnu funkciu zraku. Uvádza sa, že β -karotén, t.j. provitamín A, je účinnejším antioxidantom ako vitamín E.

Vitamín D je hlavným regulátorom absorpcie vápniku v organizme. Je dôležitý pre správnu funkciu imunitného systému, pre zdravé kosti a zuby a pomáha predchádzať vzniku osteoporózy. V potrave je vitamín D prítomný v dvoch formách, D₂ a D₃. Hlavnými zdrojmi vitamínu D sú ryby, rybie produkty a hriby. Ergosterol (známy ako provitamín D) je jednou z hlavných zložiek bunkovej steny húb a kvasiniek. Predstavuje náhradu cholesterolu, ktorý v bunkách zvierat zabezpečuje pevnosť bunkovej membrány. Ergokalciferol (vitamín D₂) vzniká z ergosterolu po ožiarení UV žiarením. Uvádza sa, že ergosterol aj ergokalciferol sú vitamíny prítomné v komerčne dostupnej *Chlorella*. Koncentrácia ergokalciferolu vzrastá, ak je *Chlorella* pri kultivácii vystavená UV žiareniu. Z tohto dôvodu je *Chlorella* považovaná za dobrý zdroj vitamínu D pre vegánov [39].

Vitamín E je vitamín známy predovšetkým pre svoje výborné antioxidantné vlastnosti. Vitamín E zahŕňa štyri formy tokoferolu a štyri formy tokotrienolu (α , β , γ , δ). Najúčinnějšíu

formu predstavuje α -tokoferol. Vitamín E sa okrem antioxidačných vlastností vyznačuje aj protizápalovými účinkami a taktiež pomáha znižovať hladinu cholesterolu. Uvádza sa, že vitamín E je možné použiť ako doplnok či podpornú liečbu pri neurodegeneratívnych ochoreniach. Vďaka svojim vlastnostiam nachádza využitie nielen v medicíne, ale aj potravinárskom, kozmetickom alebo farmaceutickom priemysle. Tokoferol je metabolit prítomný v niektorých druhoch mikrorias a zároveň aj kvasiniek [62].

Vitamín C alebo kyselina L-askorbová je vo vode rozpustný vitamín syntetizovaný rastlinami a niektorými mikroriasami, napr. *Chlorella*. Vyskytuje sa v cytozole a chloroplastoch buniek, kde sa aktívne účastní na procese ochrany organizmu pred oxidačným stresom. Vitamín C priamo neutralizuje ROS, konkrétne superoxidový a hydroxylový radikál. Z tohto dôvodu je považovaný za účinný antioxidant. Zároveň podporuje regeneráciu ďalšieho antioxidantu – vitamínu E (α -tokoferol). Okrem antioxidačných účinkov má aj protizápalové účinky, posilňuje imunitu a pôsobí ako kofaktor viacerých enzýmov [61; 63].

Vitamín B združuje viacero vo vode rozpustných vitamínov. Vzhľadom na rozpustnosť vo vode nedochádza ku predávkovaniu vitamínmi skupiny B. Do tejto skupiny sa radia vitamíny B₁ (thiamin), B₂ (riboflavín), B₃ (niacín), B₅ (kyselina pantothenová), B₆ (pyridoxín), B₇ (biotín), B₉ (folát) a B₁₂ (kobalamin). Dobrými zdrojmi vitamínov B sú potraviny živočíšneho a rastlinného pôvodu, napr. cereálie. Problematický je najmä príjem vitamínu B₁₂ u vegánov a vegetariánov, nakoľko tento vitamín sa v potravinách rastlinného pôvodu nenachádza. Niektoré mikroorganizmy obsahujú vitamín B₁₂, a preto predstavujú dobrý doplnok stravy pre vegetariánov a vegánov. Štúdie preukázali, že *Chlorella* obsahuje vyššie koncentrácie biologicky aktívnej formy vitamínu B₁₂, pričom *Spirulina* je bohatšia na tzv. psuedovitamín B₁₂, ktorý pre človeka nepredstavuje biologicky aktívnu formu [64]. Vzhľadom na to, že sa jedná o pomerne obsiahlu skupinu vitamínov aj účinky na zdravie sa líšia v závislosti od typu vitamínu. Väčšina vitamínov skupiny B pozitívne ovplyvňuje imunitný systém a obranyschopnosť človeka. Zastúpenie vitamínov skupiny B, ako aj ďalších vitamínov prítomných v riasach je uvedené v Tabuľka 2 a Tabuľka 3 [65; 66].

Tabuľka 2: Obsah niektorých vitamínov v biomase *Chlorella* a *Spirulina*, vytvorené na základe [61]

	obsah vitamínov [mg/g biomasy]			
	C	D	E	K
<i>Chlorella</i>	0,1–15,0	–	0,01–2,00	0,00073
<i>Spirulina</i>	–	4,00E-06	0,11–2,50	0,0127

Tabuľka 3: Obsah B vitamínov v biomase *Chlorella* a *Spirulina*, vytvorené na základe [61]

	obsah B vitamínov [μ g/g biomasy], vitamíny B ₇ a B ₁₂ [ng/g biomasy]							
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₅	B ₆	B ₇	B ₉	B ₁₂
<i>Chlorella</i>	18–23	20–68	0,15–250	21,4–190	1,9–25	0,45–1,1	3,1–3,4	0,08–2,5
<i>Spirulina</i>	10–23,8	33–45	0,13–149	13	9,6	–	0,27–4,8	0,5–6,6

2.12 Chlorofyl

Chlorofyl je pigment zelenej farby, ktorý je rozpustný v tukoch a aktívne sa podieľa na procese fotosyntézy. Väčšina rias obsahuje chlorofyl a, pričom niektoré druhy rias (napr. *Dinophyta*) sa vyznačujú aj obsahom chlorofylu b a c. Okrem mikrorias sa chlorofyl nachádza aj v zelených rastlinách, uvádza sa však, že mikroriasy sú schopné produkovať viac chlorofylu než rastliny. Mikroriasy obsahujú chlorofyl v zastúpení približne 0,5–1,5 % hmotnosti suchej biomasy. Dobrým zdrojom chlorofylu je napríklad *Spirulina*, ktorá obsahuje 1300–1700 mg chlorofylu na 100 g biomasy [65; 60].

Chlorofyl patrí medzi sekundárne metabolity s antioxidantnými, protirakovinovými, antimutagénymi a antigenotoxickými vlastnosťami. Zároveň má detoxikačné účinky, podporuje vylučovanie žlče a napomáha pri regenerácii pečene. U človeka taktiež podporuje metabolizmus proteínov, lipidov a sacharidov [67].

Chlorofyl je pigment obsiahnutý najmä v zelených mikroriasach, ktoré obsahujú v menšej miere aj ďalšie pigmenty známe ako fykobiliproteíny. Tieto sú hlavnými pigmentami najmä mikrorias žltého alebo modrého sfarbenia, avšak významne sú zastúpené aj v sinici *Spirulina*. Fykobiliproteíny sú vo vode rozpustné proteínové komplexy často využívané v nutraceutickom priemysle. Vyznačujú sa antioxidantnými a protizápalovými vlastnosťami a zároveň sú považované za neuroprotektívne a hepatoprotektívne látky. Najznámejším fykobiliproteínom je fykocyanín, ktorý sa extrahuje najmä zo *Spirulina*. Fykocyanín je charakteristický svojím modrým zafarbením a používa sa ako modré farbivo prírodného pôvodu v žuvačkách, mliečnych produktoch alebo nápojoch [67].

2.13 Polynenasýtené mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) sú lipofilné, vo vode nerozpustné zlúčeniny, patriace medzi najjednoduchšie lipidy. Tieto organické zlúčeniny vo svojej štruktúre obsahujú hydrofóbny uhlíkovodíkový reťazec o dĺžke 6–32 uhlíkov, na ktorý je naviazaná hydrofilná karboxylová skupina. Lipidy sú biologicky veľmi dôležité látky vzhľadom na to, že predstavujú zdroj energie a sú dôležitou súčasťou bunkových membrán. Z hľadiska prítomnosti alebo absencie násobných väzieb sa mastné kyseliny rozdeľujú na nasýtené a nenasýtené MK. Väčšina nasýtených (SFA) a mononenasýtených (MUFA) mastných kyselín pochádza z potravín rastlinného alebo živočíšneho pôvodu. Polynenasýtené MK (PUFA) sú vo výžive človeka dôležité a sú považované za esenciálne MK keďže ľudia si ich nedokážu sami syntetizovať [68].

PUFA sú z nutričného a zdravotného hľadiska dôležitými zložkami stravy. Napomáhajú vývinu nervového systému a pomáhajú pri prevencii zápalových a kardiovaskulárnych ochorení alebo rakoviny. Sú esenciálne pre správnu funkciu mozgu, zraku či nervov. Medzi najdôležitejšie ω -6 PUFA patria kyseliny arachidonová (ARA) a linoleová (LA). Najvýznamnejšími ω -3 PUFA sú kyseliny dokosahexaénová (DHA) a eikosapentaénová (EPA). Dobrými zdrojmi PUFA sú rôzne potraviny rastlinného a živočíšneho pôvodu a taktiež mikroorganizmy, najmä oleogénne kvasinky a niektoré mikroriasy [68].

2.14 β -glukány

β -glukány sú skupinou vo vode rozpustných polysacharidov prirodzene sa vyskytujúcich v bunkových stenách baktérií, kvasiniek, húb, rias a niektorých rastlín, napr. ovsu alebo pšenice. Molekuly β -glukánov sú tvorené monomérnymi jednotkami β -D-glukózy pospájanými α - alebo β -glykozidickými väzbami. β -glukány sú látkami s rôznymi štruktúrami a funkciami a ich biologické účinky sa líšia v závislosti na ich type. Podľa stupňa rozvetvenia a typu glykozidickej väzby sa rozlišuje viacero typov β -glukánov nachádzajúcich sa v rôznych typoch organizmov. Lineárne β -1,3-glukány sú typické pre baktérie, zatiaľ čo v kvasinkách a hubách sa nachádzajú lineárne alebo rozvetvené β -1,3-1,6-D-glukány. Rastliny, najmä cereálie a riasy obsahujú nevetvené β -1,3-1,4-D-glukány. V cereáliách sú β -glukány súčasťou aleurónovej vrstvy a ich obsah je približne 4–7 % [69].

Biologická aktivita β -glukánov je závislá na ich pôvode, veľkosti molekuly, stupni jej rozvetvenia a rozpustnosti vo vode. Väčšina β -glukánov je rezistentná voči žalúdočným kyselinám a prechádza žalúdkom v nezmenenej forme. β -glukány pochádzajúce z kvasiniek alebo húb prechádzajú do tenkého čreva, kde sa viažu na receptory makrofágov. Následne sú prenášané do sleziny, lymfatických uzlín a kostnej drene. V makrofágoch dochádza ku ich naštípeniu na menšie fragmenty schopné naviazať sa na receptory imunitných buniek. Z tohto dôvodu sa hubové a kvasinkové β -glukány považujú za látky s imunomodulačnými, antibakteriálnymi, protizápalovými vlastnosťami. Uvádza sa, že vysokomolekulárne β -glukány s β -1,3-väzbami majú najlepšie protirakovinové účinky [69; 70].

Cereálne β -glukány pôsobia v metabolizme glukózy a lipidov. EFSA (Európsky úrad pre bezpečnosť potravín) schválil tvrdenie, že β -glukány dokážu znižovať hladinu glukózy v krvi, v prípade, že sa v potrave nachádzajú minimálne 4 g β -glukánov z ovsu alebo jačmeňa na 30 g dostupných sacharidov. V prípade efektu β -glukánov na zníženie hladiny cholesterolu uvádzajú EFSA spolu s FDA, že konzumácia cereálnych β -glukánov zvyšuje vylučovanie žlči, ktorá stimuluje metabolizmus a eliminuje cholesterol. V porovnaní s metabolizmom glukózy sa však jedná o dlhodobý efekt, keďže účinky sa prejavujú podľa dostupných štúdií až po 5–6 týždňoch po konzumácii. Pre dosiahnutie týchto účinkov je potrebné, aby bol denný príjem cereálnych β -glukánov aspoň 3 g. Cereálne β -glukány zároveň pôsobia ako prebiotiká a využívajú sa aj ako podporná liečba pri zápaloch čriev [71].

2.15 Bezpečnosť látok pridávaných do potravín

Potravinové aditíva sú definované ako akékoľvek látky, ktoré sú úmyselne pridávané do potravín a prešli schválením americkou agentúrou FDA. Pojem potravinové aditíva alebo pridané ingrediencie zahŕňa látky, ktoré sa priamo alebo nepriamo stávajú súčasťou potravy a ovplyvňujú jej vlastnosti. Medzi priame aditíva patria látky, ktoré sú priamo pridávané do potravín, napr. farbivá či konzervanty. Látky, ktoré sa nepriamo stávajú súčasťou potravy sú látky, ktoré sa do nej dostanú v procese výroby alebo počas jej balenia, transportu alebo skladovania [72].

Schválenie od FDA nepotrebujú látky pridávané do potravín, ktoré sú považované za GRAS (anglicky *Generally Recognized As Safe* – všeobecne uznávané za bezpečné). Na posúdenie bezpečnosti látky a udeleniu statusu látky všeobecne uznávanej ako bezpečnej je nutné

predložiť FDA dôkaz o bezpečnosti a žiadosť o schválenie. Za bezpečnú sa považuje len látka, u ktorej bolo dokázané, že v zamýšľaných podmienkach použitia a koncentráciách nevykazuje žiadne negatívne účinky na zdravie človeka. V súčasnosti sa pri zavedení novej látky na trh využívajú postupy, ktoré zahŕňajú dodanie rozsiahlej dokumentácie FDA žiadateľom a následné schvaľovanie FDA. Medzi základné údaje potrebné pre udelenie statusu GRAS patrí podrobný opis identity látky, predpoklad používanej koncentrácie látky v potravine a vyhodnotenie bezpečnosti danej látky za predpokladaných podmienok použitia. Po prijatí žiadosti nasleduje posúdenie bezpečnosti z chemického, toxikologického a environmentálneho hľadiska [72].

Za jedno z GRAS potravinových aditív je uznaná aj *Spirulina*, či už vo forme biomasy alebo extraktu. Používa sa ako potravinárske farbivo do nealkoholických a alkoholických (obsah alkoholu nižší ako 20 %) nápojov, omáčok, dipov, šalátových dresingov, mliečnych výrobkov a ich alternatív alebo do zmrzlín [72]. V súčasnosti sú za jedlé mikroriasy považované mikroriasy *Chlorella*, *Tetraselmis* a *Spirulina*, ktoré sú používané v ľudskej výžive. Európska komisia radí medzi jedlé mikroriasy iba *Chlorella* a *Spirulina*, ktoré v roku 2020 zaradila do svojho katalógu bezpečnosti potravín [73].

2.16 Techniky stanovenia bioaktívnych látok

2.16.1 Extrakcia

Extrakcia je jednoduchou separačnou technikou umožňujúcou izoláciu žiadaných bioaktívnych látok z matrice, v ktorej sú prirodzene obsiahnuté. Počas extrakcie dochádza ku prechodu aktívnej látky z matrice do použitého rozpúšťadla (extrahovadla), v ktorom je extrahovaná látka lepšie rozpustná. Najčastejšie využívanými extrakciami sú extrakcie používajúce organické kvapalné rozpúšťadlo (ethanol, methanol, hexán, acetón alebo ethyl-acetát). V súčasnosti sa pri výbere vhodného rozpúšťadla berie do úvahy nielen jeho miesiteľnosť a vhodnosť, ale aj dopad na životné prostredie, pričom sa preferujú tzv. „green“ a GRAS rozpúšťadlá [52].

Najčastejšie využívanými typmi extrakcie sú Soxhletova extrakcia alebo extrakcia podľa Folcha pre nepolárne látky. Oba typy extrakcie sú pomerne jednoduché a finančne nenáročné. Ich nevýhodou je však časová náročnosť, vysoká spotreba rozpúšťadiel a v prípade extrakcie podľa Folcha aj toxicita rozpúšťadiel. Modernejšími spôsobmi extrakcie je napr. superkritická fluidná extrakcia, mikrovlnná extrakcia alebo extrakcia využívajúca ultrazvuk. Účinnosť extrakcie bioaktívnej látky závisí na výbere vhodného rozpúšťadla (jeho polarita a miesiteľnosť) a nastavení vhodných podmienok extrakcie (čas, teplota, trepanie, apod.). Pre zvýšenie efektivity extrakcie je nutná správna príprava vzorky, z ktorej chceme bioaktívnu látku extrahovať [74; 75].

Bunky mikrorias a hlavne kvasiniek majú hrubú a pevnú bunkovú stenu, ktorá zabezpečuje ochranu bunky pred vplyvmi vonkajšieho prostredia a zároveň udržiava tvar bunky. Pevnosť bunkovej steny predstavuje pri extrakcii komplikáciu z hľadiska zníženia účinnosti extrakcie. Narušenie celistvosti bunkovej steny je možné viacerými spôsobmi a vedie ku zvýšeniu výťažnosti extrakcie. Najčastejšie používanými sú mechanické (homogenizácia, ultrazvuk, zmrazenie, použitie sklenených guľčiek v kombinácii s trepaním), fyzikálne (osmotický šok), chemické (detergenty) alebo enzymatické spôsoby [74; 75].

2.16.2 UV-VIS spektrofotometria

UV-VIS spektrofotometria je bežne využívanou technikou na detekciu organických a anorganických látok. Primárne sa využíva na kvantitatívnu analýzu, ale umožňuje aj kvalitatívnu analýzu molekúl schopných absorbovať UV-VIS žiarenie. UV-VIS žiarenie zahŕňa žiarenie s vlnovými dĺžkami v rozmedzí 180–780 nm. Organické funkčné skupiny schopné absorbovať UV-VIS žiarenie sa nazývajú chromofory a každá má stanovenú približnú vlnovú dĺžku pri ktorej absorbuje maximum žiarenia [76].

Spektrofotometrické stanovenie je vhodné pre farebné roztoky analytov. Na základe kalibračných kriviek vyjadrujúcej závislosť absorpcie na koncentrácii je možné stanoviť koncentráciu sledovaného analytu v analyzovanej vzorke. Analyt by mal byť dobre rozpustný v použitom rozpúšťadle, ktoré by zároveň v oblasti absorpcie analytu nemalo absorbovať žiadne žiarenie. Ďalšou možnosťou určenia koncentrácie analytu je využitie Lambert-Beerovho zákona, kde je nameraná absorbanca priamo úmerná súčinu koncentrácie analytu c [mol/dm^3], hrúbke použitej kvety l [cm] a molárnemu absorpčnému koeficientu ε [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] [76].

Rovnica 1: Lambert-Beerov zákon

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon \quad (1)$$

2.16.3 Chromatografia

Chromatografia je jednou zo základných analytických techník umožňujúcich identifikáciu a separáciu analytov na základe ich rozdielnej afinity k stacionárnej fáze. Výsledkom chromatografickej analýzy je chromatogram, na základe ktorého je možné analyt identifikovať. Podľa plochy pod píkom je možné stanoviť koncentráciu analytu vo vzorke [76].

2.16.3.1 Kvapalinová chromatografia

Najpoužívanejším typom kvapalinovej chromatografie je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (anglicky *High Performance Liquid Chromatography – HPLC*). Je využívaná v biochémií, pri analýze životného prostredia, v potravinárskom priemysle či farmácii a toxikológii pri analýze organických, anorganických alebo biologických materiálov. V HPLC dochádza ku distribúcii analytu medzi pohybujúcou sa mobilnou fázou a nepohybujúcou sa stacionárnou fázou. Rýchlosť pohybu analytu v kolóne závisí na jeho afinite ku stacionárnej fáze. Čas potrebný na prechod analytu kolónou až ku detektoru sa označuje ako retenčný čas a umožňuje identifikáciu analytu [76; 77].

HPLC môže prebiehať v izokratickom alebo gradientovom móde. Pri izokratickom móde sa počas celej doby analýzy nemení zloženie mobilnej fáze, zatiaľ čo pri gradientovom móde sa mení zloženie mobilnej fáze a jej sila rastie, čím sa zvyšuje presnosť analýzy. Vysoká účinnosť HPLC je zabezpečená prítomnosťou čerpadla, vytvárajúceho zvýšený tlak, čím sa analýza zefektívňuje [77].

2.16.3.2 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia je analytická technika využívajúca sa pri stanovovaní prítomnosti a koncentrácie rôznych zložiek v potravinách, kozmetických a farmaceutických prípravkoch či

v životnom prostredí. Využíva sa pri stanovení analytov, ktoré môžu byť prevedené do plynného skupenstva bez ich rozloženia. Je vhodnou technikou pre plynné analyty alebo kvapalné analyty s nízkou teplotou varu [76; 78].

Princípom plynovej chromatografie je prevedenie analytu do plynnej fázy, jeho nastreknutie do kolóny a následná distribúcia medzi mobilnou a stacionárnou fázou. V plynovej chromatografii predstavuje mobilnú fázu tzv. nosný plyn. Nosný plyn musí byť inertný a najčastejšie sú to plyny ako hélium, dusík, argón alebo vodík. Analyt je unášaný nosným plynom do kolóny; existujú dva typy kolón, kapilárna a náplňová. V súčasnosti sú viac využívané účinnejšie kapilárne kolóny, ktoré sú dlhšie, s menším priemerom a vyžadujú menší objem vzorky. Jednotlivé zložky sa kolónou pohybujú rôznou rýchlosťou v závislosti od ich veľkosti a afinity ku stacionárnej fáze. Po prechode kolónou sú jednotlivé zložky analytu zachytené detektorom, ktorý výsledky spracuje do chromatogramu [76].

2.16.4 Stanovenie antioxidačnej aktivity

V posledných desaťročiach došlo k rozvoju a zdokonaleniu niekoľkých metód umožňujúcich stanovenie antioxidačnej aktivity bioaktívnych látok. Antioxidačná aktivita umožňuje určiť efektivitu antioxidantov chrániacich potraviny alebo organizmy pred vznikom oxidačného stresu a zároveň vyjadruje schopnosť antioxidantov inhibovať oxidačné procesy a eliminovať voľné radikály. Antioxidačná aktivita rôznych zlúčenín závisí na ich štruktúre a schopnosti darovať kation vodíku alebo elektrón. Najčastejšie využívané metódy na stanovenie antioxidačnej aktivity využívajú schopnosť antioxidantov zhasť voľné radikály [79].

Jednou z najviac využívaných metód stanovenia celkovej antioxidačnej aktivity je metóda TEAC (anglicky *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Jedná sa o spektrofotometrickú techniku založenú na schopnosti antioxidantu zhasť radikálový kation ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). ABTS je zeleno-modrý chromofór s absorpčným maximom pri 734 nm. Účinnosť antioxidantu sa sleduje ako zmena intenzity zafarbenia roztoku ABTS^{•+} pri 734 nm v danom časovom úseku. Pri reakcii poskytuje analyzovaný antioxidant elektrón, ktorý je zodpovedný za neutralizáciu radikálového kationu ABTS, čím znižuje intenzitu zafarbenia roztoku ABTS^{•+} v závislosti na jeho sile. Antioxidačná aktivita sa vyjadruje ako ekvivalent TROLOXu. TROLOX je syntetický vo vode rozpustný analóg vitamínu E používaný ako štandard. Metóda je vhodná pri stanovovaní antioxidačnej aktivity vzoriek biologického a rastlinného pôvodu a u potravín [80].

Ďalšou metódou umožňujúcou stanovenie antioxidačnej aktivity je metódy využívajúca radikál DPPH (1,1-difeny-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Princíp techniky je podobný ako pri metóde TEAC, rozdiel je v použitom radikále a stanovenie prebieha spektrofotometricky pri inej vlnovej dĺžke [80].

2.16.5 Stanovenie cytotoxicity

Cytotoxicita je definovaná ako schopnosť negatívne ovplyvniť viabilitu buniek. Vystavenie bunky cytotoxicky pôsobiacej látke zapríčiňuje viacero zmien v bunke, napr. redukciu bunkového rastu a proliferácie, nekrózu alebo apoptózu. Hodnotenie cytotoxicity látok prichádzajúcich do kontaktu hlavne s ľudskými bunkami je jednou zo základných

a najdôležitejších analýz predchádzajúcich začatiu používania danej látky. Testy cytotoxicity na bunkách rôznych tkanív v súčasnosti do veľkej miery nahrádzajú testovanie látok na zvieratách [81].

Medzi najpoužívanejšie metódy stanovenia cytotoxicity patrí MTT test, ktorý stanovuje metabolickú aktivitu bunky. MTT je monotetrazoliová soľ žltého sfarbenia schopná preniknúť bunkovou membránou a zároveň aj vnútornou mitochondriálnou membránou vďaka svojmu lipofilnému charakteru. Metabolicky aktívne bunky dokážu redukovať MTT mitochondriálnymi oxidoreduktázami a dehydrogenázami na formazán modrofialového zafarbenia. MTT testu predchádza spravidla niekoľko hodinová inkubácia buniek s MTT, pričom vznikajúci formazán je vo vode nerozpustný. Za účelom jeho rozpustenia je k bunkám pridávaný DMSO a zmena zafarbenia je detekovaná spektrofotometricky pri 570 nm. Výsledky testu sú výrazne ovplyvnené koncentráciou MTT, dobou inkubácie buniek s MTT a počtom buniek ľudských línií [82].

3 CIELE PRÁCE

Cieľom diplomovej práce je analýza nutričných a špeciálnych zložiek vybraných cereálií, rias a kvasiniek a následná príprava obohateného zmiešaného cereálneho produktu.

V rámci práce preto boli riešené nasledovné úlohy:

- 1) Vypracovanie literárnej rešerše so zvláštnym zameraním na atypické a bezlepkové produkty.
- 2) Výber cereálií, kvasiniek a rias pre prípravu obohatených cereálnych produktov.
- 3) Optimalizácia metód stanovenia základných nutričných zložiek cereálií a špeciálnych zložiek rias a kvasiniek (vitamíny, chlorofyly, antioxidanty, apod.).
- 4) Príprava zmesných cereálnych produktov, ich charakterizácia a biologické účinky.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Zoznam použitých cereálií

V rámci diplomovej práce boli analyzované vzorky vybraných cereálií vo forme bezlepkových múk. Vybrané múky boli:

- múka s označením bezlepková – Nominal NOMIX bezlepková mouka.
- kukuričná múka – Vilgain® BIO kukuričná mouka.
- ryžová múka – Vilgain® BIO rýžová mouka.

Tabuľka 4: Nutričné zloženie analyzovaných bezlepkových múk vzťahnuté na 100 g múky

	energetická hodnota	tuky [g]		sacharidy [g]		vláknina [g]	bielkoviny [g]	soľ [g]
		celkom	SFA	celkom	cukry			
bezlepková múka	1440 kJ/340 kcal	1,9	0,3	71,0	3,2	7,4	6,2	0,3
kukuričná múka	1401 kJ/330 kcal	2,0	0,3	69,5	1,3	6,3	8,6	<0,01
ryžová múka	1479 kJ/348 kcal	1,2	0,2	75,7	<0,5	1,1	8,5	<0,01

4.2 Zoznam použitých mikroorganizmov

V rámci diplomovej práce bola používaná biomasa z komerčne dostupných mikrorias a siníc a z kvasiniek kultivovaných na FCH VUT. Analyzované mikroriasy a sinice boli:

- *Chlorella vulgaris* – Allnature *Chlorella* prášok BIO, 100 % sladkovodná riasa *Chlorella vulgaris*.
- *Spirulina* – Allnature *Spirulina* prášok BIO, 100 % sladkovodná sinica *Spirulina*.

Tabuľka 5: Nutričné zloženie analyzovaných komerčne dostupných mikroorganizmov vzťahnuté na 100 g produktu

	energetická hodnota	tuky [g]		sacharidy [g]		bielkoviny [g]	soľ [g]
		celkom	SFA	celkom	cukry		
<i>Chlorella vulgaris</i>	1450 kJ/343 kcal	2,3	0,6	13,8	0,4	60,7	0,2
<i>Spirulina</i>	1420 kJ/336 kcal	1,0	0,5	13,1	<0,1	65,9	0,9

Analyzované kvasinky použité v rámci diplomovej práce pochádzali zo Zbierky kultúry kvasiniek (*Culture Collection of Yeast – CCY*), ktorá patrí pod Chemický ústav Slovenskej akadémie vied so sídlom v Bratislave (SR). Kvasinky boli kultivované v rámci diplomovej práce vo fermentoch na FCH VUT v Brne.

- *Rhodotorula kratochvilovae* – CCY 20-2-26
- *Rhodospiridium toruloides* – CCY 62-2-4

4.3 Zoznam chemikálií použitých pri príprave a analýze extraktov

ABTS p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Acetonitril pre HPLC, Penta (ČR)
Agar, Roth (SRN)
Dihydrogénfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner (ČR)
Dusitan sodný p.a., Lachema (ČR)
Ethanol pre UV/VIS 99 %, Penta (ČR)
Ethanol 96 % p.a., Penta (ČR)
Ethylacetát pre HPLC, Penta (ČR)
Fenol, p.a., Lach-Ner (ČR)
Folin-Ciocalteuovo činidlo, VWR Chemicals (USA)
Glukóza monohydrát, p.a., Lach-Ner (ČR)
Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Chlorid hlinitý p.a., Lach-Ner (ČR)
Chloroform p.a., Penta (ČR)
Katechín, Sigma-Aldrich (SRN)
Kvasničný autolyzát, Roth (SRN)
Kyselina gallová monohydrát (HPLC), Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina chlorovodíková, Lach-Ner (ČR)
Kyselina sírová p.a., Lach-Ner (ČR)
Methanol p.a., Penta (ČR)
Methanol pre HPLC, Penta (ČR)
Pepton z kazeínu, Carl Roth (SRN)
Peroxodisíran sodný p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Síran amónny p.a., Penta (ČR)
Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner (ČR)
Trolox p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Uhlíčan sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Sklenené guľičky s priemerom 0,25–0,5 mm, Carl Roth (SRN)
Kit pre stanovenie lepku, RIDASCREEN® Gliadin Competitive, R-Biopharm (SRN)
Kit pre stanovenie β -glukánov, β -Glucans Assay Kit (Mixed Linkage), Megazyme (IRL)
Kit pre stanovenie β -glukánov, β -Glucans Assay Kit (Yeast and Mushroom), Megazyme (IRL)
Antibiotic-Antimycotic 100X (Biosera), Biotech (SRN)
DMEM médium, Sigma-Aldrich (SRN)
Dodecylsírán sodný, Serva (SRN)
Fetálne bovinné sérum FBS, HyClone (USA)
MTT, Duchefa Biochemie (NL)
Trypsín, Versene EDTA, P-Lab (ČR)

4.4 Zoznam použitých prístrojov

Analytické váhy Pioneer, Ohaus (USA)
Centrifuga MIKRO 120, Hettich (SRN)
Centrifuga Z 366, Hermle (SRN)

Laminárny box Airstream, ESCO (SRN)
Lyofilizátor FreeZone 4.5 l Freeze Dry Systém, Labconco (USA)
Predvážky, Ohaus (USA)
Spektrofotometer UV/VIS, Boeco (SRN)
Spektrofotometer UV/VIS 1600PC, VWR (BE)
Temperovaná trepačka – Heidolph Inkubator 1000 (GE)
Termoblok Dry Block Heater, Ohaus
Tropačka Unimax 1010, Heidolph (SRN)
Vodná lázeň TW 2, Julabo GmbH (SRN)
Vortex – Fixed speed vortex mixer, Ohaus (USA)
Vortex Genie, Scientific Industries, Inc. (USA)
Vákuová rotačná odpadka Werke RV06-ML: IKA (SRN)
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
CellCulture CO₂ Inkubátor, ESCO (SRN)
ELISA Reader Synergy HTX, BioTek (SRN)
HPLC zostava s detektorom PDA (Thermo Fischer Scientific, USA)

- Dionex Ultimate Series 3000 Pump a Autosampler
- kolona Kinetex EVO C18
- Thermo Fischer Vanquish Detector
- softvér Chromeleon 7.2

GC zostava s detektorom FID (Thermo Fischer Scientific, USA)

- kapilárna kolona Zebron ZB-FAME, dĺžka 30 m
- softvér Chromeleon 7.2

4.5 Použité línie ľudských buniek

Na testovanie cytotoxicity pripravených extraktov bola použitá línia CaCo-2. Jednalo sa o bunky adenokarcinómu hrubého čreva pochádzajúce zo zbierky bunkových kultúr Cell Line Service, Eppelheim (SRN).

4.6 Príprava vybraných vzoriek cereálií pre analýzy

Z vybraných múk boli pripravené vodné extrakty, ktoré boli následne používané na spektrofotometrické stanovenie vybraných biologicky aktívnych zložiek cereálií. Extrakty boli pripravené z navážky 1,0 g múky, ktorá bola zaliata 10 ml destilovanej vody. Takto pripravené vzorky boli premiešané na vortexe a následne umiestnené na trepačku, kde prebiehala extrakcia za konštantného trepania (160 rpm, 24 hod, 37 °C). Po uplynutí doby extrakcie boli skúmavky scentrifugované (9000 rpm, 10 min) a supernatant bol odpipetovaný do čistej skúmavky. Takto pripravené vzorky boli uchovávané v mrazničke pre ďalšie analýzy.

4.7 Stanovenie celkových sacharidov v cereáliách

Celkové sacharidy boli vo vybraných múkach stanovené pomocou metódy podľa Dubois. Prvým krokom stanovenia bola kyslá hydrolyza múk s použitím 6 M kyseliny chlorovodíkovej. Do skúmavky bol navážený 1,0 g múky a bolo pridaných 10 ml 6 M HCl. Obsah skúmavky bol premiešaný na vortexe a skúmavka bola umiestnená na trepačku (160 rpm, 37 °C, 90 minút),

kde prebiehala hydrolyza. Následne bol obsah skúmavky sцентрифugovaný (9000 rpm, 6 minút) a supernatant bol odpipetovaný do čistej skúmavky.

Pre samotné stanovenie celkových sacharidov boli pripravené extrakty 1000-krát nariadené. Do skúmavky bol napipetovaný 1 ml pripravenej vzorky, 1 ml 5 % roztoku fenolu a 5 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Obsah skúmavky bol premiešaný na vortexe a ponechaný stáť 30 minút pri laboratórnej teplote. Následne bola zmeraná absorbancia pripravených vzoriek pri 490 nm oproti blanku, ktorý obsahoval 1 ml destilovanej vody. Každá vzorka bola analyzovaná trikrát a zo získaných hodnôt absorbancie bola vypočítaná priemerná hodnota, ktorá bola dosadzovaná do kalibračnej krivky.

Kalibračná krivka bola pripravená podľa rovnakého postupu s použitím štandardu, roztoku glukózy, v rozmedzí koncentrácií 0,025–0,1 mg/ml. Zo získaných dát bola zostrojená kalibračná závislosť s Rovnica 2.

Rovnica 2: Rovnica kalibračnej krivky pre stanovenie celkových sacharidov s koeficientom R^2

$$A = 9,5347 \cdot c \quad (2a)$$

$$R^2 = 0,9993 \quad (2b)$$

4.8 Stanovenie mastných kyselín v cereáliách

Obsah mastných kyselín v analyzovaných múkach bol stanovený pomocou plynovej chromatografie. Pred samotnou analýzou na GC boli vzorky podrobené transesterifikácii.

Do sklenených krimpovacích vialiek bolo navážených 50–60 mg analyzovanej múky a bolo pridaných 1,8 ml transesterifikačnej zmesi s obsahom interného štandardu C17 o koncentrácii 0,50 g/ml, rozpusteného v 15 % roztoku kyseliny sírovej v methanole. Vialky boli následne zakrimpované a umiestnené na termoblok (85 °C, 2 hodiny), kde prebiehala transesterifikácia. Po ukončení transesterifikácie boli vialky ochladené na laboratórnu teplotu a ich obsah bol kvantitatívne prevedený do sklenených vialiek o objeme 4 ml, ktoré obsahovali 0,5 ml 0,05 M NaOH. Do vialky bol pridaný 1 ml hexánu HPLC kvality. Uzavreté vialky boli následne dôkladne premiešané na vortexe (6 minút), pričom došlo ku oddeleniu fáz. Z vrchnej bezfarebnej hexánovej fázy bolo odpipetovaných 0,1 ml do sklenej vialky a bolo pridaných 0,9 ml hexánu HPLC kvality. Takto pripravené vzorky boli uložené do mrazničky, kde boli ponechané až do ich analýzy na GC.

4.8.1 Parametre analýzy na GC/FID

V pripravených vzorkách boli na GC analyzované methylestery matných kyselín, ktoré vznikli počas transesterifikácie. Parametre analýzy sú zhrnuté v Tabuľka 6.

Tabuľka 6: Parametre analýzy na GC

Prístroj	Thermo Fischer TRACETM GC
Dávkovanie	Autosampler Thermo Scientific A1 1310
Kolona	Zebtron ZB-FAME; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
Detektor	FID
Nosný plyn; prietok	vodík; 1 ml·min ⁻¹
Objem nástreku	1 μ l
t_{injektor}/t_{detektor}	250 °C/260 °C
Prietok plynov	vzduch – 350 ml·min ⁻¹ ; dusík – 30 ml·min ⁻¹ ; vodík 35 ml·min ⁻¹

4.9 Stanovenie lepku v cereáliách

Obsah lepku v analyzovaných vzorkách bol stanovený pomocou komerčne dostupného kitu RIDASCREEN® Gliadin Competitive. Pre stanovenie lepku boli najprv pripravené ethanolové extrakty vybraných vzoriek. Do skúmavky bol navážený 1,0 g múky a bolo pridaných 10 ml 60 % ethanolu. Obsah skúmavky bol premiešaný na vortexe (30 s) a následne bola skúmavka po dobu 10 minút intenzívne pretrepávaná. Po uplynutí doby extrakcie bola suspenzia scentrifugovaná (4500 rpm, 10 minút) a získaný supernatant bol 50x zriedený pufrom. Takto pripravené extrakty boli používané v ďalších krokoch analýzy.

Jednotlivé vzorky boli analyzované v duplikátoch, a preto bolo napipetovaných 50 μ l ethanolového extraktu vždy do 2 jamiek na doštičke, ktorá bola súčasťou kitu. Do každej jamky bolo pridaných 50 μ l nariadeného konjugátu a obsah jamiek bol premiešaný ľahkým zatrepaním. Pripravená doštička bola inkubovaná pri laboratórnej teplote 30 minút. Následne bola z jamiek odstránená všetka tekutina a do každej jamky bolo napipetovaných 250 μ l premývacieho pufru, ktorý bol po zatrepaní doštičky odstránený. Premytie pufrom bolo zopakované celkom trikrát. Potom bolo do každej jamky napipetovaných 100 μ l substrátu (chromogénu), doštička bola jemne zatrepaná, čím došlo ku premiešaniu obsahu a následne bola 10 minút inkubovaná v tme. Po inkubácii bolo do každej jamky pridaných 100 μ l zastavovacieho roztoku, obsah bol premiešaný a pomocou prístroja Elisa reader bola zmeraná absorbancia pri 450 nm v každej jamke.

Zároveň so vzorkami bola meraná aj kalibračná rada (0–270 ng/ml), ktorá bola súčasťou kitu. Koncentrácia gliadínu bola zistená dosadením absorbancie do kalibračnej krivky a prepočítaná na obsah lepku podľa návodu od výrobcu.

4.10 Stanovenie β -glukánov v cereáliách

Obsah β -glukánov vo vybraných cereáliách bol stanovovaný pomocou komerčne dostupného kitu β -Glucan Assay Kit (Mixed Linkage). Do skúmavky bolo navážených 80–120 mg vzorky a bolo pridaných 0,2 ml 50 % ethanolu a 4,0 ml fosfátového pufru (20 mM, pH 6,5). Obsah skúmavky bol premiešaný na vortexe a inkubovaný 60 sekúnd vo vriacej vodnej lázni. Následne bola suspenzia premiešaná na vortexe, inkubovaná ďalšie 2 minúty vo vriacej vodnej lázni a znovu premiešaná na vortexe. Potom boli skúmavky inkubované 5 minút vo vodnej lázni vyhriatej na 50 °C. Po ukončení inkubácie bolo ku každej vzorke napipetovaných 0,1 ml enzýmu lichenázy, obsah skúmavky bol premiešaný na vortexe a skúmavky boli inkubované

1 hodinu pri 50 °C. Počas inkubácie bol obsah skúmavky niekoľkokrát premiešaný. Následne bolo do skúmaviek pridaných 5 ml acetátového pufru (200 mM, pH 4,0), zmes bola premiešaná a scentrifugovaná (10 000 rpm, 10 minút). Na dno troch skúmaviek bolo napipetovaných 0,1 ml získaného supernatantu, pričom do prvých dvoch skúmaviek bolo pridaných 0,1 ml enzýmu β -glukozidázy a do tretej skúmavky 50 μ l acetátového pufru (50 mM, pH 4,0). Skúmavky boli inkubované 10 minút pri 50 °C. Následne bolo do každej skúmavky pridaných 3,0 ml GOPOD reagentu a skúmavky boli inkubované ďalších 20 minút pri 50 °C. Po ukončení inkubácie bola zmeraná absorbancia pri 510 nm proti blanku.

4.11 Charakterizácia pripravených extraktov cereálií

V pripravených vodných extraktoch múk (viď 4.6) bol spektrofotometricky stanovený obsah celkových fenolických látok, flavonoidov, antioxidačná aktivita a obsah vo vode rozpustných proteínov.

4.11.1 Stanovenie celkových fenolických látok

Pre stanovenie celkových fenolických látok v analyzovaných múkach bolo Folin-Ciocalteuovo činidlo zriedené destilovanou vodou v pomere 1:9. Do skúmavky bol napipetovaný 1 ml zriedeného Folin-Ciocalteuovo činidla, 1 ml destilovanej vody a 100 μ l pripraveného vodného extraktu. Obsah skúmavky bol dôkladne premiešaný na vortexe a ponechaný stáť pri laboratórnej teplote 5 minút. Následne bol do skúmavky pridaný 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného a obsah skúmavky bol znovu dôkladne premiešaný na vortexe. Takto pripravený roztok bol ponechaný stáť 15 minút pri laboratórnej teplote. Po uplynutí tejto doby bola zmeraná absorbancia pri 750 nm oproti slepému vzorku obsahujúcemu namiesto extraktu 100 μ l destilovanej vody. Každá vzorka bola zmeraná trikrát.

Pri príprave kalibračnej krivky bol použitý rovnaký postup, pričom namiesto extraktu bol používaný roztok kyseliny gallovej s koncentraciami v rozmedzí 0,05–0,30 mg/ml. Zo získaných dát bola zostrojená kalibračná závislosť (viď Rovnica 3).

Rovnica 3: Rovnica kalibračnej krivky pre stanovenie fenolických látok s koeficientom R^2

$$A = 3,1727 \cdot c \quad (3a)$$

$$R^2 = 0,9984 \quad (3b)$$

4.11.2 Stanovenie flavonoidov

Pre stanovenie flavonoidov bolo do skúmavky napipetovaných 0,5 ml vodného extraktu, 1,5 ml destilovanej vody a 0,2 ml 5 % roztoku dusitanu sodného. Obsah skúmavky bol premiešaný a ponechaný stáť pri laboratórnej teplote 5 minút. Následne bolo do skúmavky pridaných 0,2 ml 10 % roztoku chloridu hlinitého, obsah bol znovu premiešaný a ponechaný stáť 5 minút pri laboratórnej teplote. Po uplynutí tejto doby bolo do skúmavky pridaných 1,5 ml 1 M NaOH a 1 ml destilovanej vody. Takto pripravený roztok bol dôkladne premiešaný a po uplynutí 15 minút bola zmeraná jeho absorbancia pri 510 nm oproti blanku. Každá vzorka bola analyzovaná trikrát.

Kalibračná krivka (viď Rovnica 4) bola pripravená rovnakým postupom s použitím roztoku katechínu rozpusteného v ethanole o koncentráciách 0,05–0,5 mg/ml.

Rovnica 4: Rovnica kalibračnej krivky pre stanovenie flavonoidov s koeficientom R^2

$$A = 2,9655 \cdot c \quad (4a)$$

$$R^2 = 0,9987 \quad (4b)$$

4.11.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity (metóda TEAC)

Pre stanovenie antioxidačnej aktivity bol použitý roztok radikálového kationu ABTS^{•+} pripravený zmiešaním 7 mM roztoku ABTS^{•+} v destilovanej vode a 2,45 mM roztoku peroxidisíranu sodného. Takto pripravený roztok bol ponechaný pri laboratórnej teplote 12 hodín bez prístupu svetla a následne bol používaný pri stanovení.

Pred samotným stanovením antioxidačnej aktivity bol pripravený roztok ABTS^{•+} nariadený pomocou UV-VIS ethanolu na absorbanciu $0,700 \pm 0,020$ proti blanku, ktorým bol UV-VIS ethanol. Následne bol do skúmavky typu Eppendorf pipetovaný 1 ml pripraveného roztoku ABTS^{•+}, ku ktorému bolo pridaných 50 μ l analyzovaného extraktu. Pripravené vzorky boli ponechané v tme po dobu 10 minút a následne bola zmeraná ich absorbancia A_{10} v zúženej kremennej kyvete. Hodnota absorbancie A_0 bola zistená pridaním 50 μ l destilovanej vody ku 1 ml roztoku ABTS^{•+}, pričom absorbancia bola zmeraná ihneď po pridaní destilovanej vody.

Hodnota antioxidačnej aktivity bola získaná dosadením rozdielu absorbancií A_0 a A_{10} do rovnice kalibračnej krivky. Antioxidačná aktivita bola vyjadrená v mg TROLOXu na g biomasy. Každá vzorka bola analyzovaná v triplikátoch. Kalibračná krivka (viď Rovnica 5) bola zostrojená za použitia modelového antioxidantu TROLOXu v 60 % ethanole v objeme 10 μ l a v rozmedzí koncentrácií 0,025–0,040 mg/ml.

Rovnica 5: Rovnica kalibračnej krivky pre stanovenie antioxidačnej aktivity s koeficientom R^2

$$A = 1,2794 \cdot c \quad (5a)$$

$$R^2 = 0,9979 \quad (5b)$$

4.11.4 Stanovenie vo vode rozpustných proteínov podľa Hartree-Lowryho

Proteíny boli stanovované v pripravených vodných extraktoch analyzovaných múk. Do skúmavky bol napipetovaný 1 ml pripraveného a vhodne nariadeného extraktu spolu s 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A. Obsah skúmavky bol premiešaný a inkubovaný 10 minút vo vodnej lázni pri 50 °C. Následne boli vzorky ochladené na laboratórnu teplotu a bolo pridaných 0,1 ml Hartree-Lowryho činidla B. Obsah skúmavky bol dôkladne pretrepaný a inkubovaný 10 minút pri laboratórnej teplote. Po uplynutí tejto doby boli do skúmavky pridané 3 ml Hartree-Lowryho činidla C, vzorka bola premiešaná a inkubovaná 10 minút vo vodnej lázni vyhriatej na 50 °C. Po uplynutí tejto doby boli vzorky ochladené na laboratórnu teplotu a bola zmeraná ich absorbancia pri 650 nm oproti blanku (destilovanej vode). Každá vzorka bola analyzovaná trikrát a do kalibračnej krivky bol dosadený priemer nameraných hodnôt absorbancie.

Kalibračná závislosť (viď Rovnica 6) bola pripravená podľa rovnakého postupu z roztoku albumínu rozpusteného v destilovanej vode v rozmedzí koncentrácií 0,03–0,30 mg/ml.

Rovnica 6: Rovnica kalibračnej krivky pre stanovenie proteínov s koeficientom R^2

$$A = 2,0400 \cdot c \quad (6a)$$

$$R^2 = 0,9979 \quad (6b)$$

Hartree-Lowryho činidlo A: 50 ml 1 M NaOH; 10,0 g uhličitanu sodného; 0,2 g dihydrátu vínanu sodno-draselného a obsah odmernej banky doplniť na 100 ml destilovanou vodou.

Hartree-Lowryho činidlo B: 10 ml 1 M NaOH; 1,0 g pentahydrátu síranu meďnatého; 2,0 g vínanu sodno-draselného a obsah odmernej banky doplniť na 100 ml destilovanou vodou.

Hartree-Lowryho činidlo C: Folin-Ciocalteuovo činidlo nariadené destilovanou vodou v pomere 1:15.

4.12 Kultivácia kvasiniek vo fermentore

Vybrané kmene kvasiniek boli zaočkované z kryoskúmaviiek uchovávaných pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ na sterilné pevné YPD médium (zloženie viď Tabuľka 7) v Petriho miskách. Zaočkovaná kultúra bola kultivovaná pri laboratórnej teplote po dobu 72–96 hodín. Samotná kultivácia kvasiniek prebiehala v dvoch stupňoch, pričom najprv bolo pripravené inokulum I, následne inokulum II, ktoré bolo očkované do produkčného média vo fermentore. Počas celej kultivácie bolo pracované sterilne v očkovacom boxe a používané média a materiál boli vysterilované v tlakových hrncoch pri teplote $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 40 minút.

Inokulum I bolo pripravené zaočkováním narastenej kultúry kvasiniek na Petriho miskách do sterilného tekutého YPD média (zloženie viď Tabuľka 7) v pomere 1 kľučka kultúry na 10 ml média. Inokulum I bolo umiestnené na trepačku, kde bolo za konštantného premiešavania ponechané 24 hodín pri laboratórnej teplote. Po 24 hodinách bolo pripravené inokulum II, ktoré vzniklo preočkovaním inokula I do väčšieho objemu tekutého YPD média v pomere 1:5. Inokulum II bolo znovu ponechané 24 hodín na trepačke pri laboratórnej teplote a následne bolo v pomere 1:20 preočkované do sterilného minerálneho produkčného média (zloženie viď Tabuľka 8) vo fermentore, ktorý bol taktiež vysterilovaný.

Kultivácia kvasiniek vo fermentore prebiehala 96 hodín pri teplote $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Fermentor obsahoval 5 l sterilného minerálneho produkčného média a pH bolo počas celej doby kultivácie udržiavané na hodnote 6,5 pomocou peristaltických čerpadiel napojených na zásobníky hydroxidu sodného a kyseliny sírovej. Množstvo rozpusteného kyslíku bolo počas celej kultivácie približne 30 %. Podmienky kultivácie boli sledované pomocou kyslíkovej, teplotnej a pH sondy a ich regulácia prebiehala pomocou operačného systému.

Po ukončení kultivácie bola kultúra s médiom scentrifugovaná (9000 rpm, 5 minút), supernatant bol odliaty a získaná biomasa bola premytá destilovanou vodou a následne znovu scentrifugovaná. Premytie destilovanou vodou bolo zopakované celkom dvakrát. Získaná

biomasa bola zmrazená pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následne zlyofilizovaná. Po lyofilizácii bola vysušená biomasa uchovávaná v mrazničke pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do jej použitia.

Tabuľka 7: Zloženie používaného YPD média

typ média		zložka	navážka [g/L]
pevné	tekuté	glycerol	20,0
		kvasničný autolyzát	10,0
		pepton	20,0
		voda	1000 ml
		agar	20,0

Tabuľka 8: Zloženie používaného minerálneho produkčného média

zložka	navážka [g/L]
glycerol	92,46
KH_2PO_4	8,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,30
KNO_3	10,12
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8,00
voda	1000 ml

4.13 Príprava extraktov z kvasiniek

Na prípravu extraktov bola používaná lyofilizovaná a rehydratovaná biomasa nakultivovaných kvasiniek *Rhodotorula kratochvilovae* a *Rhodosporidium toruloides*. Do skúmavky bolo navážených 0,1 g biomasy, ku ktorým bolo pridaných 5 ml destilovanej vody a suspenzia bola dôkladne premiešaná vortexe. Pripravená suspenzia bola ponechaná 1 hodinu v tme a následne bola cez noc zmrazená. Po rozmrazení bol obsah skúmavky scentrifugovaný (4500 rpm, 6 minút) za účelom odstránenia vody. Následne boli ku biomase pridané sklenené guľičky a 10 ml rozpúšťadla alebo zmesi rozpúšťadiel. Pri príprave extraktov boli používané nasledovné rozpúšťadlá:

- 96 % ethanol,
- hexán,
- hexán a 96 % ethanol v pomere 1:1,
- hexán a 96 % ethanol v pomere 1:2,
- hexán a 96 % ethanol v pomere 2:1.

Takto pripravené vzorky boli umiestnené na trepačku (160 rpm, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), kde boli ponechané 24 hodín. Po uplynutí tejto doby boli skúmavky scentrifugované (4500 rpm, 6 minút) a supernatant bol odpipetovaný do čistých skúmaviek. Supernatant hexánových a hexán-ethanolových extraktov bol odparený na rotačnej vákuovej odparke a získaný odparok bol rozpustený v známom množstve 96 % ethanolu. Všetky pripravené extrakty boli uchovávané pri $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následne podrobené ďalším analýzám.

4.14 Príprava extraktov z mikrorias

Pri príprave extraktov bola používaná komerčne zakúpená biomasa mikroriasy *Chlorella* a sinice *Spirulina*. Do čistej skúmavky bolo navážených 0,1 g biomasy, ku ktorej bolo pridaných 10 ml rozpúšťadla alebo zmesi rozpúšťadiel. Pri extrakcii boli využívané nasledovné rozpúšťadlá a ich zmesi:

- destilovaná voda,
- 50 % ethanol,
- 96 % ethanol,
- hexán,
- hexán a 96 % ethanol v pomere 1:1.

Takto pripravené vzorky boli dôkladne premiešané na vortexe a ponechané 24 hodín na trepačke (160 rpm, 37 °C), kde prebiehala extrakcia. Následne boli pripravené vzorky scentrifugované (4500 rpm, 6 minút) a supernatant bol odpipetovaný do čistých skúmaviek. Supernatant hexánových a hexán-ethanolových extraktov bol odparený na rotačnej vákuovej odparke a získaný odparok bol rozpustený v známom množstve 96 % ethanolu. Všetky pripravené extrakty boli uchovávané pri 7 °C a následne podrobené ďalším analýzam.

Pre každú riasu a použité rozpúšťadlo bola uskutočnená aj extrakcia s prídavkom sklenených guľčiek, ktorých účelom bolo napomôcť narušeniu bunkovej steny a zvýšiť účinnosť extrakcie. Extrakty boli pripravené vyššie uvedeným postupom, pričom na začiatku extrakcie bol ku naváženej biomase pridaný rovnaký objem sklenených guľčiek.

4.15 Príprava kontrolných extraktov (extrakcia podľa Folcha)

Na prípravu kontrolných extraktov bola využitá rehydratovaná biomasa kvasiniek a biomasa mikrorias. K 0,1 g naváženej biomasy v skúmavkách boli pridané sklenené guľčičky a 10 ml zmesi rozpúšťadiel chloroform:methanol (2:1). Skúmavky boli umiestnené na vortex, kde boli intenzívne premiešavané 30 minút. Následne boli pridané 3 ml destilovanej vody a obsah skúmavky bol premiešaný a scentrifugovaný (4500 rpm, 6 minút). Spodná farebná chloroformová fáza bola odpipetovaná do sklenenej slzičkovej banky a odparená na rotačnej vákuovej odparke. Získaný odparok bol rozpustený v známom množstve 96 % ethanolu. Takto pripravený extrakt bol uchovávaný v tme pri 7 °C až do ďalších analýz.

V pripravených kontrolných extraktoch bola stanovená celková výťažnosť extrakcie, obsah karotenoidov (spektrofotometricky) a obsah lipofilných látok pomocou HPLC.

4.16 Charakterizácia pripravených mikrobiálnych extraktov

4.16.1 Stanovenie celkovej výťažnosti extrakcie

Pre stanovenie celkovej výťažnosti extrakcie bol odpipetovaný 1 ml extraktu do skúmavky typu Eppendorf, ktorá bola vopred zvážená na analytických váhach. Otvorená skúmavka s extraktom bola ponechaná v digestore za tmy až do úplného odparenia rozpúšťadla. Následne bola skúmavka znovu zvážená na analytických váhach a bolo zistené množstvo vyextrahovaného pevného podielu. V prípade vodných a ethanolových (50 % EtOH) extraktov bol 1ml extraktu odpipetovaný do zváženej skúmavky typu Eppendorf. Obsah skúmavky bol zamrazený

pri - 80 °C, následne zlyofilizovaný a zvážený na analytických váhach. Z rozdielu hmotností skúmavky pred a po odparení extraktu bola zistená hmotnosť vyextrahované pevného podielu, resp. hmotnostná koncentrácia všetkých vyextrahovaných látok z biomasy mikrorias alebo kvasiniek.

4.16.2 Meranie absorpčných (UV-VIS) spektier pripravených extraktov

Na UV-VIS spektrofotometri boli zmerané absorpčné spektrá všetkých pripravených extraktov, ktoré boli najprv vhodne nariadené. Absorpčné spektrá boli merané v rozmedzí vlnových dĺžok 200–800 nm s krokom 1 nm. Absorpčné spektrum každej vzorky bolo zmerané trikrát. Získané absorpčné spektrá boli použité na ďalšiu charakterizáciu pripravených extraktov.

4.16.3 Spektrofotometrické stanovenie pigmentov

Pre spektrofotometrické stanovenie pigmentov v extraktoch boli použité hodnoty absorpcie pri vybraných vlnových dĺžkach, získané z nameraných absorpčných spektier extraktov (viď 4.16.2). Pre výpočet obsahu chlorofylu a karotenoidov v extraktoch z mikrorias boli použité nižšie uvedené vzťahy Rovnica 7 prevzaté z článku [83]. Získané koncentrácie pigmentov boli vyjadrené v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a následne boli prepočítané na koncentrácie vyextrahovaných pigmentov v mg na g biomasy, pričom bolo zohľadnené aj riedenie pripravených extraktov.

Rovnica 7: Rovnice pre spektrofotometrické stanovenie pigmentov v extraktoch

$$c_a = (13,36 \cdot A_{664} - 5,19 \cdot A_{649}) \quad (7a)$$

$$c_b = (27,43 \cdot A_{649} - 8,12 \cdot A_{664}) \quad (7b)$$

$$c_{\text{karotenoidy}} = (1000 \cdot A_{470} - 2,13 \cdot c_a - 97,64 \cdot c_b) / 209 \quad (7c)$$

Pre výpočet obsahu karotenoidov v extraktoch z kvasiniek bol použitý nižšie uvedený vzťah prevzatý z článku [84]. Do rovnice (Rovnica 8) bola dosadená priemerná hodnota nameraných absorpcií pri 454 nm. Veličina ϵ predstavuje molárny absorpčný koeficient β -karoténu a jeho hodnota je závislá na použitom rozpúšťadle. Pre ethanol je hodnota tejto konštanty rovná $2620 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Získané koncentrácie vyextrahovaných pigmentov boli prepočítané na mg na g biomasy.

Rovnica 8: Rovnica pre spektrofotometrické stanovenie karotenoidov v extraktoch

$$c_{\text{karotenoidy}} = \frac{A_{454} \cdot 10}{\epsilon} \quad (8)$$

4.16.4 Stanovenie celkových fenolických látok

Obsah fenolických látok v pripravených extraktoch bol stanovený postupom uvedeným v kapitole 4.11.1, pričom namiesto extraktu cereálií bolo pipetovaných 100 μl pripraveného extraktu z kvasiniek alebo rias.

4.16.5 Stanovenie antioxidačnej aktivity (metóda TEAC)

Antioxidačná aktivita pripravených mikrobiálnych extraktov bola stanovená podľa postupu uvedeného v kapitole 4.11.3, pričom ku 1 ml zriedeného roztoku ABTS⁺ bolo pipetovaných 10 µl extraktu mikrorias alebo 50 µl extraktu kvasiniek.

4.16.6 Stanovenie vo vode rozpustných proteínov podľa Hartree-Lowryho

Obsah proteínov bol stanovený vo vodných extraktoch mikrorias podľa postupu uvedeného v kapitole 4.11.4. Pred samotným stanovením boli extrakty vhodne nariedené.

4.16.7 Stanovenie pigmentov a lipofilných metabolitov s využitím HPLC

Lipofilné metabolity a pigmenty boli pomocou HPLC/PDA stanovované v pripravených extraktoch. Z extraktov pripravených z biomasy *Chlorella* a *Spirulina* bol odobraný 1 ml, ktorý bol prefiltrovaný cez PTFE filter s veľkosťou pórov 0,45 µm a priemerom 13 mm do sklenenej vialky pre HPLC.

Extrakty pripravené z biomasy kvasiniek boli pred analýzou na HPLC najprv zakoncentrované. Do vopred zvážených sklenených skúmaviek boli napipetované 2 ml pripravených extraktov, ktoré boli odparené na termobloku v inertnej dusíkovej atmosfére. Pevný podiel získaný odparením bol rozpustený v 0,5 ml zmesi rozpúšťadiel ethylacetát:acetonitril (1:1), ktoré predstavovali mobilnú fázu. Zakoncentrovaná vzorka bola prefiltrovaná cez PTFE filter do sklenených vialiek pre HPLC. Všetky pripravené vzorky boli až do analýzy uchovávané v mrazničke.

4.16.7.1 Parametre analýzy na HPLC/PDA

Analýza lipofilných metabolitov prebiehala na HPLC a chromatogramy získané analýzou boli vyhodnocované v programe ChromeleonTM Chromatography Data System. Množstvo jednotlivých metabolitov bolo zistené pomocou kalibračných kriviek.

Tabuľka 9: Parametre analýzy na HPLC

Prístroj	HPLC Thermo Fischer Scientific
Kolona	EVO C18, KINETEX; 150 x 4,6 x 2,6 mm
Detektor	PDA
Čas analýzy	25 min
Prietok MF	1,2 ml·min ⁻¹
MF A	MeOH : acetonitril : 100 mM trisHCl pufr (2:84:14 obj. %)
MF B	MeOH : ethylacetát (60:40 obj. %)
Typ elúcie	gradientová

Tabuľka 10: Zloženie mobilných fáz v rôznych časoch analýzy na HPLC

t [min]	0	13	19	20	25
MF A [obj. %]	100	0	0	100	100
MF B [obj. %]	0	100	100	0	0

4.16.8 Stanovenie vo vode rozpustných vitamínov metódou HPLC

Vo vode rozpustné vitamíny boli stanovované vo vzorkách vodných extraktov *Chlorella* a *Spirulina*. Pripravené extrakty boli prefiltrované cez nylonový filter s veľkosťou pórov 0,45 µm a priemerom 13 mm do skúmaviek typu Eppendorf. Prefiltrované extrakty boli ďalej vhodne nariadené Milli-Q vodou v pomere 1:1 a podrobené analýze na HPLC. Následne bola do kalibračných rovníc dosadená plocha píku (y) získaná z chromatogramu a výsledná koncentrácia vitamínov (x) bola vyjadrená v mg/g biomasy.

Tabuľka 11: Rovnice kalibračných kriviek pre jednotlivé vitamíny

Vitamín	Rovnica kalibračnej krivky
B ₁ (thiamin)	$y = 644,721 \cdot x$
B ₂ (riboflavín)	$y = 1579,294 \cdot x$
B ₃ (niacín)	$y = 452,341 \cdot x$
B ₆ (pyridoxín)	$y = 598,852 \cdot x$
B ₉ (kyselina listová)	$y = 1663,267 \cdot x$
B ₁₂ (kobalamin)	$y = 378,364 \cdot x$
C (kyselina askorbová)	$y = 15348,184 \cdot x$

4.16.8.1 Parametre analýzy vitamínov na HPLC

Parametre analýzy vo vode rozpustných vitamínov sú uvedené v Tabuľka 12 a Tabuľka 13.

Tabuľka 12: Parametre analýzy vitamínov na HPLC

Prístroj	UlitMate 3000 HPLC and UHPLC Systems, Thermo Fischer Scientific
Kolona	Kinetex® 2.6 µm Polar C18 100Å (150 x 4,6 mm)
Detektor	Spektrofotometrický s UV-VIS detekciou (267 nm)
Čas analýzy	20 min
Teplota termostatu	35 °C
Prietok MF	1 ml/min
MF A, MF B	octan sodný, acetonitril
Typ elúcie	gradientová

Tabuľka 13: Zloženie mobilných fáz v rôznych časoch analýzy vitamínov na HPLC

t [min]	3	6	12	15	16	20
MF A [obj. %]	100	90	30	30	100	100
MF B [obj. %]	0	10	70	70	0	0

4.16.9 Stanovenie mastných kyselín s využitím GC

Obsah mastných kyselín bol stanovovaný v samotnej biomase mikrorias a kvasiniek a taktiež v pripravených extraktoch. Do vopred zvážených skúmaviek bol napipetovaný známy objem pripravených extraktov a obsah skúmaviek bol odparený na termobloku v inertnej dusíkovej

atmosfére. Odparok bol rozpustený v 1,8 ml transesterifikačnej zmesi a ďalej bolo pokračované podľa postupu uvedeného v kapitole 4.8.

Pri analýze biomasy mikrorias a kvasiniek bolo navážených 10–15 mg biomasy, ku ktorej bolo pridaných 1,8 ml transesterifikačnej zmesi a ďalej sa postupovalo podľa postupu opísaného v kapitole 4.8. Pripravené vzorky boli až do analýzy uchovávané v mrazničke.

4.17 Stanovenie β -glukánov v mikroriasach

Obsah β -glukánov v analyzovaných mikroriasach bol stanovený pomocou komerčne dostupného kitu β -Glucans Assay Kit (Mixed Linkage). Pri analýze bolo postupované podľa postupu uvedeného v kapitole 4.10.

4.18 Stanovenie β -glukánov v kvasinkách

V biomase analyzovaných kvasiniek boli stanovované celkové glukány a α -glukány. Obsah glukánov bol stanovený pomocou komerčne dostupného kitu β -Glucan Assay Kit (Yeast and Mushroom). V prvom kroku bol stanovený obsah celkových glukánov a následne α -glukánov. Obsah β -glukánov bol zistený odčítaním obsahu α -glukánov od celkových glukánov.

4.18.1 Stanovenie celkových glukánov

Do sklenených skúmaviek bolo navážených približne 90 mg biomasy kvasiniek a kvasinkového štandardu a boli pridané 2,0 ml vychladenej 12 M kyseliny sírovej. Skúmavky boli umiestnené do ľadovej lázne na 2 hodiny za občasného miešania. Následne boli do každej skúmavky pridané 4,0 ml destilovanej vody, obsah bol premiešaný na vortexe (10 sekúnd) a bolo pridaných ďalších 6,0 ml destilovanej vody, pričom obsah bol znovu premiešaný na vortexe (10 sekúnd). Skúmavky s uvoľnenými viečkami boli umiestnené do vriacej vodnej lázni, po uplynutí 5 minút boli viečka dotiahnuté a skúmavky boli inkubované vo vriacej vodnej lázni 2 hodiny. Potom boli skúmavky ochladené na laboratórnu teplotu a ich obsah bol kvantitatívne prevedený do odmernej banky (100 ml) s použitím acetátového pufru (200 mM, pH 4,5). Do odmernej banky bolo pridaných 6 ml 8 M NaOH a objem banky bol doplnený acetátovým pufrom (200 mM, pH 4,5). Obsah banky bol dôkladne premiešaný a do skúmaviek typu Eppendorf bol odobraný alikvot (1 ml), ktorý bol scentrifugovaný (13000 rpm, 5 minút). Do dvoch čistých sklenených skúmaviek bolo napipetovaných 0,1 ml supernatantu a na dno skúmaviek bolo pridaných 0,1 ml zmesi enzýmov (exo-1,3- β -glukanáza a β -glukozidáza) v acetátovom pufri (200 mM, pH 4,5). Obsah skúmaviek bol dôkladne premiešaný na vortexe a skúmavky boli inkubované pri 40 °C 60 minút. Po ukončení inkubácie boli do každej skúmavky pridané 3,0 ml GOPOD reagentu a skúmavky boli inkubované pri 40 °C ďalších 20 minút. Nakoniec boli skúmavky ochladené na laboratórnu teplotu a bola zmeraná absorbanca pri 510 nm proti blanku. Vzorky boli analyzované v duplikátoch a na výpočet obsahu celkových glukánov bola použitá priemerná hodnota absorbancie.

4.18.2 Stanovenie α -glukánov

Do sklenenej skúmavky bolo navážených 100 mg biomasy kvasiniek alebo štandardu a boli pridané 2,0 ml 1,7 M NaOH. Obsah skúmaviek bol premiešaný na vortexe a skúmavky boli umiestnené do ľadovej lázni, kde boli za občasného premiešania ponechané 20 minút. Následne

bolo pridaných 8,0 ml acetátového pufru (1,2 M; pH 3,8), 0,2 ml zmesi enzýmov (amylglukozidáza a invertáza) a obsah bol premiešaný a inkubovaný 30 minút pri 40 °C. Do skúmaviek typu Eppendorf boli odobraté 2,0 ml, ktoré boli scentrifugované (13000 rpm, 5 minút). Do sklenených skúmaviek bolo odobratých 0,1 ml supernatantu a bolo pridaných 0,1 acetátového pufru (200 mM; pH 4,5) a 3,0 ml GOPOD reagentu. Skúmavky boli inkubované pri 40 °C ďalších 20 minút a následne bola zmeraná ich absorbancia pri 510 nm proti blanku. Vzorky boli analyzované v duplikátoch a na výpočet obsahu α -glukánov bola použitá priemerná hodnota nameraných absorbancií.

4.19 MTT test cytotoxicity

Pre testovanie cytotoxicity pripravených extraktov bola použitá bunková línia Caco2. Testom boli podrobené vodné extrakty biomasy *Chlorella* a *Spirulina* v koncentračnom rozmedzí 0,39–25,00 % a ethanolové extrakty kvasiniek v rozmedzí koncentrácií 0,016–1,000 %. Kvasinkové extrakty boli testované pred a po zakoncentrovaní (4x). Počas celej doby testovania bolo pracované sterilne v boxe, ktorého povrchy boli dezinfikované 70 % ethanolom a box bol sterilizovaný UV žiarením.

Pred samotným testovaním boli použité bunky najprv kultivované v inkubačnom boxe pri teplote 37 °C, pričom obsah CO₂ bol udržiavaný na 5 %. Stav buniek bol pravidelne kontrolovaný pod inverzným mikroskopom, pričom bola sledovaná konfluencia buniek. V prípade, že bola vyššia než 80 %, bunky mohli byť použité na testovanie. Obsah lahvičky s bunkami bol dvakrát premytý PBS pufrom, aby došlo ku odstráneniu Ca²⁺ iontov a následne bol do lahvičky napipetovaný enzým trypsin, ktorý zabezpečil oddelenie buniek z dna lahvičky, kde boli prichytené. Po pridaní trypsinu bola lahvička inkubovaná 5 minút v inkubačnom boxe a následne bol jej obsah scentrifugovaný (300 rcf, 5 minút). Po centrifugácii bol odstránený supernatant a bunky boli rozsuspendované v novom EMEM médiu.

Pred začatím testu boli pomocou Bürkerovej komôrky spočítané bunky a boli nariadené do média na koncentráciu $2-5 \cdot 10^5$ buniek/ml. Vhodne nariadené bunky boli následne pipetované na sterilnú 96-jamkovú doštičku, pričom do každej jamky sa pipetovalo 100 μ l média s bunkami. Do okrajových jamiek na doštičke bolo pipetovaných 100 μ l PBS pufru, čím sa zabránilo vysychaniu doštičky počas doby testovania. Takto pripravená doštička bola umiestnená na 24 hodín do inkubačného boxu. Po uplynutí 24 hodín bolo z každej jamky dôkladne odpipetované médium, ktoré bolo nahradené pripravenými a vhodne nariadenými vzorkami v médiu. Pripravené extrakty boli pred pipetovaním na doštičku prefiltrované cez sterilný filter. Na každej doštičke bola uskutočnená aj pozitívna kontrola („cell control – CC“), kontrola média („vehicule control – VC“) a negatívna kontrola (40 % EtOH). Pripravená doštička s extraktami bola znovu uložená do inkubačného boxu na 24 hodín.

Následne bola z každej jamky odpipetovaná všetka tekutina a bolo pipetovaných 20 μ l sterilného roztoku MTT v PBS pufri o koncentrácii 2,5 mg/ml. Doštička bola umiestnená znovu do inkubačného boxu na 3 hodiny, aby mohla prebehnúť reakcia. Po uplynutí tejto doby bolo pridaných 100 μ l 10 % roztoku SDS v PBS pufri. Doštička bola zabalená do alobalu a ponechaná v tme do ďalšieho dňa, kedy bola zmeraná absorbancia v jednotlivých jamkách pri 540 nm.

4.20 Príprava zmesných cereálnych produktov

V rámci diplomovej práce boli pripravené dva typy zmesných cereálnych produktov. Jednalo sa o zmesi obohatených cereálií a kulinársky upravené a obohatené cereálne kaše.

4.20.1 Príprava obohatených zmesí cereálií

V rámci práce bolo pripravených 5 vzoriek obohatených cereálnych zmesí a jedna kontrolná vzorka. Kontrolná vzorka (A) obsahovala len kukuričnú múku bez akéhokoľvek prídavku riasy alebo kvasinky. Do skúmaviek boli navážené jednotlivé zložky podľa Tabuľka 14, ktoré boli následne zaliate definovaným objemom destilovanej vody a extrahované na trepačke (24 hod, 160 rpm, 37 °C). Po ukončení extrakcie boli suspenzie scentrifugované (4500 rpm, 6 min) a supernatant bol odpipetovaný do čistých skúmaviek. Získaný supernatant bol uchovávaný pri teplote 7 °C a podrobený ďalším analýzám.

Tabuľka 14: Zloženie pripravených cereálnych zmesí

zložka		vzorka					
		A	B1	B2	C	D	E
základ	kukuričná múka [g]	1,00	0,95	0,90	1,00	0,95	1,00
	destilovaná voda [ml]	10,00	10,00	10,00	9,50	9,50	9,50
pridané zložky	<i>Spirulina</i> (biomasa) [g]	0,00	0,05	0,10	0,00	0,05	0,00
	<i>Spirulina</i> (extrakt) [ml]	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50
	<i>Rhodospiridium toruloides</i> (extrakt) [ml]	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	0,00

4.20.2 Kulinárska príprava obohatených cereálnych kaší

V rámci práce bolo pripravených 5 druhov cereálnych kaší, ktorých základ tvorila kukuričná múka zaliata horúcou vodou (80 °C) v pomere 1:4. Ku vzniknutej kaši boli následne pridané obohacujúce zložky, t.j. vybrané extrakty mikrorias a kvasiniek, biomasa a kombinácia extraktu a biomasy. Zloženie jednotlivých vzoriek je uvedené v Tabuľka 15. Kontrolnú vzorku (A) tvorila čistá cereálna kaša bez akýchkoľvek prídavkov. Na základe získaných výsledkov boli na obohatenie cereálnych kaší vybrané:

- biomasa *Spirulina* (B),
- ethanolový (96 %) extrakt *Rhodospiridium toruloides* (C),
- kombinácia biomasy *Spirulina* a extraktu *Rhodospiridium toruloides* (D),
- vodný extrakt sinice *Spirulina* (E).

Pripravené cereálne kaše boli ponechané vychladnúť na laboratórnu teplotu a zamrazené cez noc pri teplote -80 °C a následne zlyofilizované. Zlyofilizované vzorky boli uchovávané v mrazničke až do uskutočnenia ich ďalších analýz.

Tabuľka 15: Zloženie pripravených cereálnych kaší

zložka		vzorka				
		A	B	C	D	E
základ	kukuričná múka [g]	10,0	9,5	10,0	9,5	10,0
	destilovaná voda [ml]	40,0	40,0	35,0	35,0	35,0
pridané zložky	<i>Spirulina</i> (biomasa) [g]	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0
	<i>Spirulina</i> (extrakt) [ml]	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0
	<i>Rhodospiridium toruloides</i> (extrakt) [ml]	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0

4.21 Analýza pripravených cereálnych produktov

Pripravené cereálne produkty boli ďalej charakterizované na obsah celkových polyfenolických látok, antioxidačnú aktivitu a obsah vo vode rozpustných proteínov. Vyššie uvedené látky boli stanovované vo vodných extraktoch cereálnych zmesí pripravených podľa 4.20.1. Ďalej boli analyzované zlyofilizované vzorky cereálnych kaší. Ako inšpirácia postupov analýzy slúžil článok [85]. Do skúmavky bol navážený 1,0 g zlyofilizovanej kaše a bolo pridaných 10,0 ml destilovanej vody. Takto pripravené vzorky boli umiestnené na trepačku, kde prebiehala ich extrakcia (24 hod, 160 rpm, 37 °C). Po ukončení extrakcie boli vzorky scentrifugované (4500 rpm, 6 min) a supernatant bol odpipetovaný do čistej skúmavky a uchovávaný pri 7 °C až do ďalších analýz.

4.21.1 Stanovenie celkových fenolických látok

Celkové fenolické látky boli stanovené vo vodných extraktoch podľa postupu uvedeného v kapitole 4.11.1.

4.21.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity (metóda TEAC)

Pre stanovenie antioxidačnej aktivity pripravených vzoriek bolo pipetovaných 10 µl extraktu ku 1 ml nariadeného roztoku ABTS⁺ a antioxidačná aktivita bola stanovená podľa postupu uvedeného v bode 4.11.3.

4.21.3 Stanovenie vo vode rozpustných proteínov podľa Hartree-Lowryho

Vo vode rozpustné proteíny boli v pripravených produktoch analyzované pomocou metódy Hartree-Lowryho. Postup analýzy je uvedený v kapitole 4.11.4. Vzorky boli pred samotným stanovením vhodne nariadené.

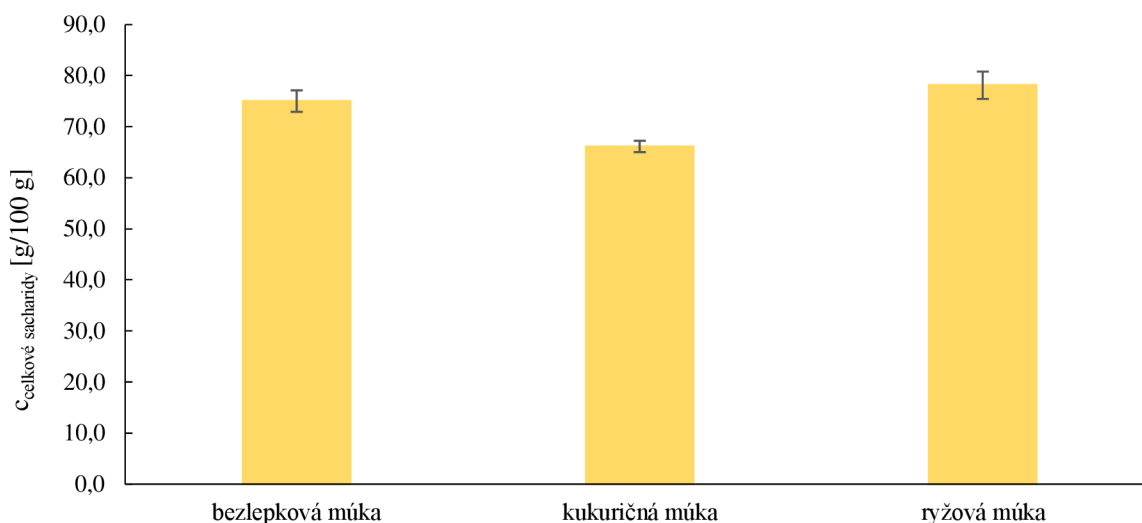
5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Táto diplomová práca bola zameraná na vývoj cereálnych produktov pre zvláštnu výživu s prídavkom extraktov rias a kvasiniek. Na základe získaných výsledkov analýz nutričných zložiek vybraných cereálií a špeciálnych zložiek vybraných rias a kvasiniek boli navrhnuté kombinácie cereálií, mikrobiálnej biomasy a mikrobiálneho extraktu, ktoré boli použité na prípravu obohateného cereálneho produktu. V rámci diplomovej práce bolo pripravených viacero zmesných cereálnych produktov, ktoré boli podrobené ďalším analýzám.

5.1 Charakterizácia vybraných cereálií

5.1.1 Stanovenie celkových sacharidov podľa Dubois

Obsah celkových sacharidov v jednotlivých vzorkách múk bol stanovený metódou podľa Dubois, pričom bola spektrofotometricky meraná intenzita vzniknutého oranžového sfarbenia roztoku. Analýza prebiehala podľa postupu uvedeného v bode 4.7 a pre výpočet bol do Rovnica 2 dosadzovaný priemer nameraných absorbancií. Získané výsledky sú uvedené v Obrázok 4.

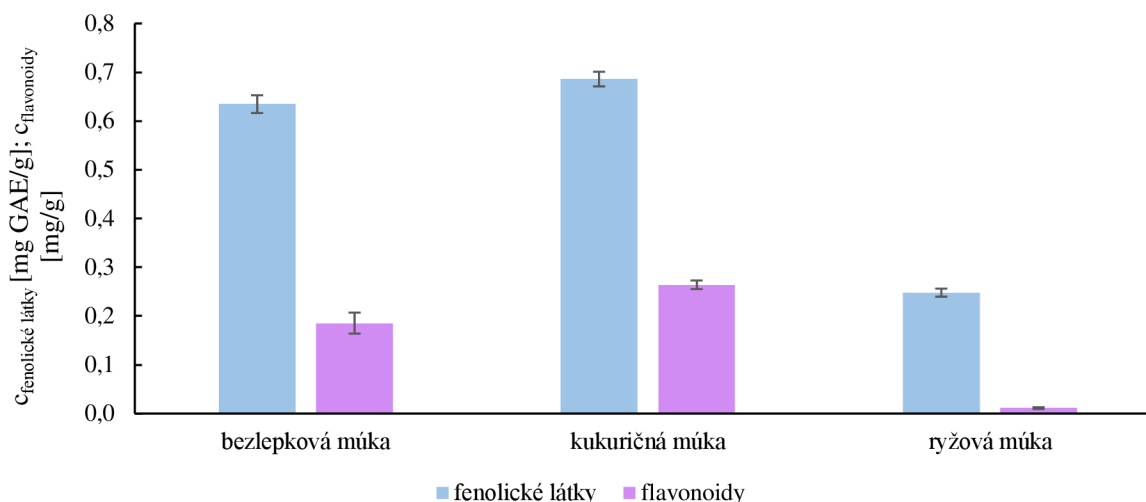


Obrázok 4: Graf koncentrácií celkových sacharidov v analyzovaných vzorkách

Polysacharidy, najmä škrob, predstavujú hlavnú zložku obilného zrna z pohľadu chemického zloženia. Uvádza sa že tvoria približne 50–80 % sušiny. Kyslá hydrolýza, ktorá bola prvým krokom stanovenia celkových sacharidov, umožnila rozklad škrobu na jednoduchšie oligosacharidy a monosacharidy, ktoré boli následne stanovené. Koncentrácie celkových sacharidov sa v analyzovaných vzorkách múk pohybovali v rozmedzí 66–79 % hmotnosti múky, čo spadá do rozmedzia hodnôt udávaných v literatúre [7]. Najvyšší obsah celkových sacharidov bol stanovený v ryžovej múke (78,14±2,68 g/100 g múky), ktorá aj podľa výrobcu udávaných hodnôt obsahovala najviac sacharidov. Najnižšia koncentrácia celkových sacharidov bola zistená vo vzorke kukuričnej múky (66,14±1,12 g/100 g múky), pričom táto múka mala spomedzi všetkých vzoriek aj podľa výrobcu deklarovaný najnižší obsah sacharidov. Odchýlky medzi stanovenými koncentraciami sacharidov vo vzorkách a výrobcom uvádzanými hodnotami boli v rozmedzí 3,2–5,7 %. Najmenšia odchýlka bola zistená pri vzorke ryžovej múky (±3,2 %) a najvyššia odchýlka (±5,7 %) pri vzorke bezlepkovej múky. Odchýlky mohli byť spôsobené nedostatočným rozkladom polysacharidov počas kyslej hydrolýzy.

5.1.2 Stanovenie celkových fenolických látok a flavonoidov

Obsah celkových fenolických látok a flavonoidov vo vzorkách vybraných múk bol stanovený spektrofotometricky podľa postupov uvedených v kapitolách 4.11.1 a 4.11.2. Priemerné hodnoty nameraných absorbancií boli dosadené do kalibračných kriviek Rovnica 3, Rovnica 4 a získané koncentrácie fenolických látok a flavonoidov boli následne vztiahnuté na navážku múky. Výsledky sú vyobrazené v nižšie uvedenom grafe (Obrázok 5).



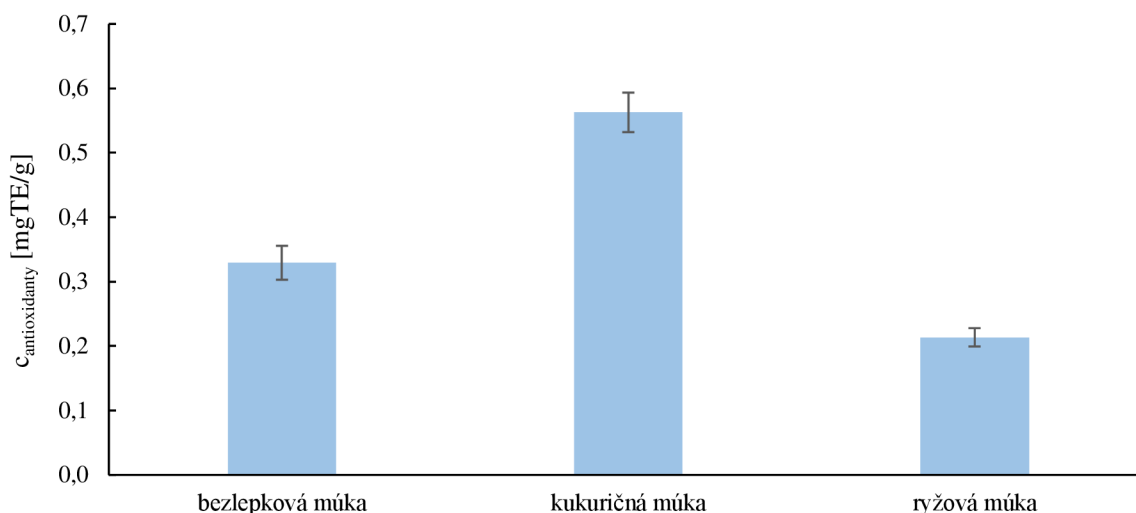
Obrázok 5: Graf koncentrácií celkových fenolických látok a flavonoidov v jednotlivých vzorkách

Najvyšší obsah celkových fenolických látok bol stanovený vo vzorke kukuričnej múky ($0,69 \pm 0,02$ mg GAE/g), v ktorej bol zároveň zistený aj najvyšší obsah flavonoidov ($0,26 \pm 0,01$ mg GAE/g). Flavonoidy tvorili približne 38,5 % celkových fenolických látok. Nižšie zastúpenie flavonoidov bolo očakávané, nakoľko flavonoidy tvoria podskupinu fenolických látok. Bezlepková múka vykazovala porovnateľný obsah celkových fenolických látok ($0,63 \pm 0,02$ mg GAE/g) s kukuričnou múkou, avšak zastúpenie flavonoidov medzi fenolickými látkami bolo nižšie (29,2 %). U ryžovej múky bol zistený najnižší obsah celkových fenolických látok ($0,25 \pm 0,01$ mg/g) spomedzi analyzovaných vzoriek a zároveň aj najnižší podiel flavonoidov (4,5 %) v rámci celkových fenolických látok.

Literatúra uvádza v porovnaní s našimi výsledkami vyššie koncentrácie celkových fenolických látok v ryžovej ($0,72$ mg GAE/g) a kukuričnej múke ($1,04$ mg GAE/g) [86]. Rozdiely medzi stanovenými a v literatúre uvádzanými hodnotami môžu byť spôsobené analyzovaním rôznych typov zrna, nakoľko obsah fenolických látok je ovplyvnený nielen podmienkami kultivácie, ale aj technologickým spracovaním zrn. Fenolické látky sa v najvyšších koncentráciách nachádzajú v perikarpe a aleurónovej vrstve, ktoré sú pri výrobe bielych múk odstraňované. Z tohto dôvodu sa v bielych múkach nachádzajú nižšie koncentrácie fenolických látok a flavonoidov než v celých zrnách cereálií. Nižšie koncentrácie môžu byť spôsobené taktiež tým, že boli analyzované vodné extrakty cereálií a nemuselo dôjsť ku úplnej extrakcii všetkých fenolických látok, najmä tých vo viazanej forme.

5.1.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Antioxidačná aktivita jednotlivých vzoriek bola stanovená spektrofotometricky podľa postupu uvedeného v bode 4.11.3. Z nameraných hodnôt absorbancií bola vypočítaná priemerná hodnota, ktorá bola následne dosadzovaná do kalibračnej krivky (Rovnica 5). Stanovené hodnoty antioxidačnej aktivity sú zobrazené v nižšie uvedenom grafe (Obrázok 6) a výsledné koncentrácie sú vyjadrené v mg ekvivalentu Troloxu na g vzorky.



Obrázok 6: Graf nameranej antioxidačnej aktivity jednotlivých vzoriek

Z vyššie uvedeného grafu je možné vidieť, že najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazovala vzorka kukuričnej múky ($0,56 \pm 0,03$ mg TE/g), u ktorej bola zároveň zistená aj najvyššia koncentrácia celkových fenolických látok, ktoré patria medzi zlúčeniny s významnými antioxidačnými vlastnosťami. Tento trend bol pozorovaný aj u ostatných vzoriek a najnižšia antioxidačná aktivita bola stanovená u vzorky ryžovej múky ($0,21 \pm 0,01$ mg TE/g), ktorá obsahovala najnižšiu koncentráciu celkových fenolických látok. Namerané výsledky odpovedajú predpokladom vychádzajúcim z literatúry, z ktorej vyplýva, že kukurica a výrobky z nej vykazujú vyššie hodnoty antioxidačnej aktivity než ryža a ryžové výrobky. Napriek tomu literatúra uvádza pre dané cereálie vyššie hodnoty antioxidačnej aktivity pri analýze metódou TEAC. Pre kukuričnú múku sa uvádza hodnota $1,83 \pm 0,08$ mg TE/g a pre ryžovú múku hodnota $1,18 \pm 0,10$ mg TE/g [86]. Rozdiely môžu byť spôsobené najmä rozdielnym spôsobom prípravy extraktov a extrakcie antioxidantov zo vzoriek cereálií, pričom pri využití vodných extrakcií nemuseli byť do vody vyextrahované všetky látky s antioxidačnými vlastnosťami, ktoré sa v cereáliách nachádzajú. V prípade kukuričnej múky sa jedná napríklad o lipofilné látky ako karotenoidy, ktoré majú taktiež antioxidačné vlastnosti a do vody neprechádzajú.

5.1.4 Stanovenie mastných kyselín pomocou GC/FID

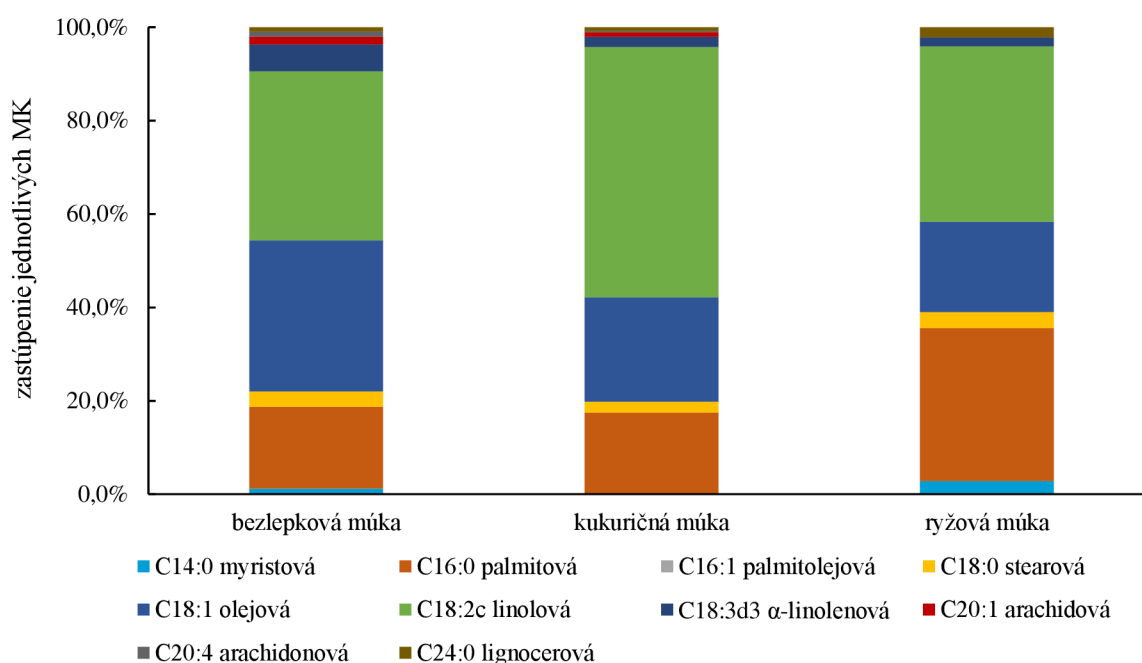
Celkový obsah lipidov ako aj zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v analyzovaných vzorkách múk bol stanovený pomocou analýzy na GC/FID. Analýza prebiehala podľa postupu uvedeného v bode 4.8 a získané dáta boli spracované do nižšie uvedených tabuliek a grafov zobrazujúcich zastúpenie celkových lipidov a jednotlivých typov mastných kyselín.

Tabuľka 16: Zastúpenie lipidov a typov mastných kyselín v analyzovaných vzorkách

vzorka	obsah lipidov [g/100g]	zastúpenie typov MK [%]		
		SFA	MUFA	PUFA
bezlepková múka	1,33	22,93	34,11	42,96
kukuričná múka	2,18	21,30	22,65	56,05
ryžová múka	1,20	41,55	18,66	39,79

Ako je možné vidieť z vyššie uvedenej tabuľky (Tabuľka 16), najvyššie zastúpenie lipidov obsahovala vzorka kukuričnej múky (2,18 g/100 g), čo odpovedá predpokladom podľa údajov uvedených na obaloch od výrobcu. Nami stanovená hodnota koncentrácie lipidov je mierne vyššia než výrobcom udávaná, konkrétne o 0,18 g/100g. Najnižší obsah lipidov bol zistený v ryžovej múke (1,2 g/100 g), pričom táto hodnota sa zhoduje s údajmi uvádzanými výrobcom. Najvyšší rozdiel medzi stanovenou a výrobcom udávanou hodnotou je v prípade bezlepkovej múky, kde je nami stanovená hodnota nižšia o 0,57 g/100 g.

Z pohľadu zastúpenia jednotlivých typov mastných kyselín v rôznych múkach obsahovala najvyššie množstvo nasýtených MK múka s najnižším celkovým obsahom lipidov, a to ryžová múka (41,55 %). Táto múka zároveň obsahovala spomedzi všetkých vzoriek najnižšie zastúpenie PUFA, ktoré patria medzi významné a zdraviu prospešné biologicky aktívne látky. Najnižšie zastúpenie SFA bolo zistené v kukuričnej múke, ktorá zároveň obsahovala najvyšší podiel PUFA (56,05 %). Ako je možné vidieť z nižšie uvedeného grafu (Obrázok 7), celkovo bola najviac zastúpenou v každej vzorke kyselina linolová (C18:2c) patriaca medzi PUFA. Najviac zastúpenou MUFA vo všetkých vzorkách bola kyselina olejová (C18:1) a celkovo najviac zastúpenou SFA bola kyselina palmitová (C16:0).



Obrázok 7: Graf zastúpenia jednotlivých MK v analyzovaných vzorkách

5.1.5 Stanovenie vo vode rozpustných proteínov

Obsah vo vode rozpustných proteínov bol stanovený v pripravených vodných extraktoch analyzovaných múk Hartree-Lowryho metódou (viď 4.11.4). Koncentrácie vo vode rozpustných proteínov boli získané dosadením priemeru nameraných absorbancií do kalibračnej krivky (Rovnica 6) a sú uvedené v Tabuľka 17.

Tabuľka 17: Stanovené koncentrácie vo vode rozpustných proteínov v analyzovaných vzorkách múk

vzorka	$c_{\text{proteíny}}$ [g/100 g]
bezlepková múka	1,75 ± 0,06
kukurličná múka	0,64 ± 0,02
ryžová múka	1,02 ± 0,03

Obilniny obsahujú viacero frakcií proteínov (albumíny, globulíny, prolaminy a glutelíny), ktoré vykazujú rozdielnu rozpustnosť v závislosti na type použitého rozpúšťadla. Spomedzi proteínov obsiahnutých v obilných zrnách sú vo vode rozpustné len albumíny, ktorých zastúpenie sa líši u rôznych typov obilnín. Z tohto dôvodu sú aj stanovené hodnoty proteínov v analyzovaných vzorkách výrazne nižšie než hodnoty celkových koncentrácií proteínov uvádzané výrobcom na obaloch jednotlivých múk. Najvyššia koncentrácia vo vode rozpustných proteínov bola zistená vo vzorke bezlepkovej múky (1,75±0,06 g/100 g). Najmenší obsah vo vode rozpustných proteínov bol stanovený vo vzorke kukuričnej múky (0,64±0,02 g/100 g). Vyšší obsah proteínov u bezlepkovej múky je pravdepodobne spojený s obsahom bezlepkového pšeničného škrobu, ktorý obsahuje viac vo vode rozpustných proteínov, keďže pochádza zo pšenice, ktorá obsahuje vo všeobecnosti vyššie koncentrácie albumínov než ryža alebo kukurica [1].

5.1.6 Stanovenie lepku

V analyzovaných vzorkách múk bol stanovený obsah lepku podľa postupu uvedeného v kapitole 4.9. Najprv bola zistená koncentrácia gliadínu vo vzorkách, ktorá bola následne prepočítaná na koncentráciu gluténu. Získané výsledky sú zobrazené v nižšie uvedenej tabuľke (Tabuľka 18).

Tabuľka 18: Koncentrácie lepku stanovené v jednotlivých vzorkách

vzorka	$c_{\text{glutén}}$ [mg/kg]
bezlepková múka	15,51 ± 1,64
kukurličná múka	7,40 ± 1,09
ryžová múka	4,02 ± 0,92

Zo získaných výsledkov je možné konštatovať, že vo všetkých analyzovaných vzorkách bola stanovená koncentrácia lepku nižšia než je hraničná koncentrácia (20 mg lepku/kg), a teda všetky analyzované múky sa radia medzi bezlepkové. Najvyššia koncentrácia lepku bola stanovená v bezlepkovej múke (15,51±1,64 mg/kg), ktorú tvorí zmes bezlepkového pšeničného škrobu, kukuričnej múky, ľanovej a lupinovej múky. Vyšší obsah lepku môže súvisieť práve

s obsahom bezlepkového pšeničného škrobu, ktorý sa vyrába deproteináciou klasického pšeničného škrobu, keďže pšenica prirodzene obsahuje vyššie koncentrácie lepku. Z tohto dôvodu môže aj bezlepkový pšeničný škrob obsahovať nízke zbytkové koncentrácie lepku alebo môže pri technologickom spracovaní dôjsť ku jeho kontaminácii. Najnižšia koncentrácia lepku bola zistená v ryžovej múke ($4,02 \pm 0,92$ mg/kg). Kukuričná a ryžová múka obsahovali výrazne nižší obsah lepku a vzhľadom na to, že sa jedná o prirodzene bezlepkové obilniny je možné, že prítomnosť lepku bola spôsobená kontamináciou múky pri procese jej výroby alebo počas jej analýzy.

5.1.7 Stanovenie cereálnych β -glukánov

Obsah β -glukánov bol vo vybraných vzorkách stanovený pomocou komerčne dostupného kitu a podľa postupu uvedeného v bode 4.10. Obsah β -glukánov bol zistený pomocou výpočtového Excelu od výrobcu kitu, do ktorého boli dosadzované namerané hodnoty absorbancií jednotlivých vzoriek. Výsledné stanovené koncentrácie β -glukánov sú uvedené v Tabuľka 19.

Tabuľka 19: Stanovený obsah β -glukánov v analyzovaných vzorkách múk

vzorka	$C_{\text{glukány}}$ [g/100 g]
kukuričná múka	$0,039 \pm 0,004$
ryžová múka	$0,104 \pm 0,004$
bezlepková múka	$0,039 \pm 0,004$

Cereálne β -glukány tvoria súčasť bunkových stien, v ktorých sú viazané. V cereálnych zrnách sa ich najvyššie koncentrácie nachádzajú najmä v obalových vrstvách zrna, t.j. v otrubách, ale taktiež v aleurónovej vrstve. Jedná sa o časti zrna, ktoré sú pri spracovaní zrn na múku bežne odstraňované, a preto je obsah β -glukánov v múkach spravidla nižší než v celých zrnách alebo v celozrnných múkach. Nami stanovené koncentrácie β -glukánov v analyzovaných vzorkách múk sa nachádzajú v rozmedzí 0,039–0,104 %, čo sú pomerne nízke hodnoty. Najnižšia koncentrácia β -glukánov bola stanovená vo vzorke kukuričnej múky ($0,039 \pm 0,004$ g/100 g), pričom bezlepková múka mala veľmi podobný obsah β -glukánov. Najvyššie zastúpenie β -glukánov bolo zistené vo vzorke ryžovej múky ($0,104 \pm 0,004$ g/100 g), pričom stanovená koncentrácia bola takmer trikrát vyššia než pri ostatných vzorkách. Literatúra uvádza, že v porovnaní s ostatnými cereáliami, ktoré obsahujú β -glukány najmä v obalových vrstvách, v ryži sú β -glukány distribuované naprieč celý zrnom, a teda aj ich obsah v ryžovej múke je v porovnaní s inými typmi bezlepkových múk vyšší [87].

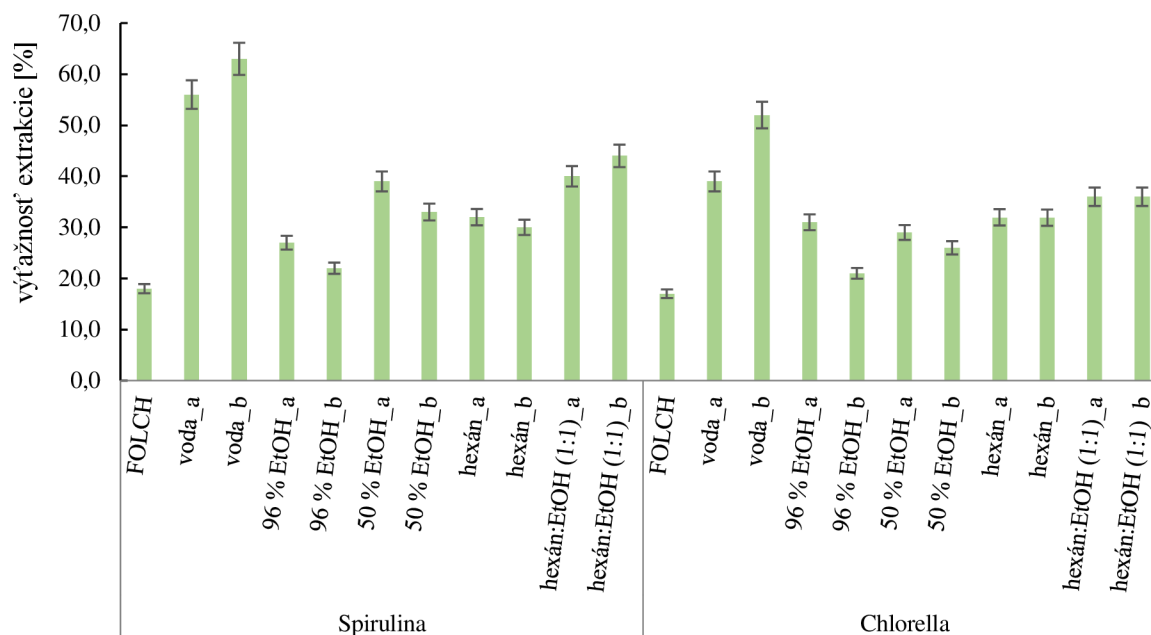
5.2 Charakterizácia extraktov z mikrorias

V rámci diplomovej práce boli pripravované extrakty z komerčne dostupnej mikroriasy *Chlorella* a sinice *Spirulina*. Extrakty boli pripravené za použitia troch rozpúšťadiel so statusom GRAS (voda, ethanol a hexán) a ich kombinácií. Extrakcie boli vykonané s aj bez prídavku sklenených guľčiek, pri ktorých bol predpoklad, že napomôžu lepšiemu rozrušeniu bunkovej steny a budú viesť ku vyššiemu výťažkom biologicky aktívnych látok. Získané výsledky sú uvedené v nasledujúcich kapitolách. Pre lepšiu orientáciu v grafoch je pri

extraktov pripravených bez použitia sklenených guľičiek uvedené označenie „_a“ a pri extraktov s použitím sklenených guľičiek „_b“.

5.2.1 Celková výťažnosť extrakcie

Celková výťažnosť extrakcie bola stanovená podľa postupu uvedeného v kapitole 4.16.1. a vyjadruje hmotnostný podiel všetkých vyextrahovaných pevných látok v jednotlivých extraktoch. Všetky získané výsledky sú vyobrazené v nižšie uvedenom grafe (Obrázok 8).



Obrázok 8: Graf celkových výťažností jednotlivých typov extrakcií pre biomasu *Spirulina* a *Chlorella*

Vyššie uvedený stĺpcový diagram zobrazuje stanovené percentuálne výťažnosti pre jednotlivé extrakty. Celková výťažnosť pripravených extraktov sa pohybovala v rozmedzí 17,0–63,0 % v závislosti na type použitej riasy a rozpúšťadla, resp. kombinácii rozpúšťadiel. Z grafu je možné pozorovať, že najvyššiu výťažnosť extrakcie (63,0 %) dosahoval vodný extrakt sinice *Spirulina* pripravený s guľičkami. Táto istá extrakcia dosiahla najvyššiu výťažnosť aj pri extrakte mikroriasy *Chlorella* (52,0 %). Najvyššia percentuálna výťažnosť extrakcie však neznamená, že sa v týchto extraktoch musí vyskytovať aj najvyššia koncentrácia bioaktívnych látok. Výťažnosť vyjadruje len hmotnostný podiel celkovej sušiny v pripravených extraktoch.

Najnižšie hodnoty celkovej výťažnosti extrakcie boli zaznamenané pri extraktoch pripravených s použitím 96% ethanolu pri oboch typoch biomasy. Pri znížení koncentrácií ethanolu (50 % ethanol) došlo ku zvýšeniu výťažnosti extrakcie, čo pravdepodobne súvisí s vyšším zastúpením vody v extraktoch, keďže pre vodu boli dosiahnuté najvyššie hodnoty celkových výťažností. Prídavok 96% ethanolu k hexánu zvýšil účinnosť extrakcie v porovnaní s použitím samotných rozpúšťadiel. To mohlo súvisieť s rozdielnou polaritou použitých rozpúšťadiel, ktorá napomohla extrakcii polárnych, ale aj nepolárnych látok. Zo získaných výsledkov nie je možné jednoznačne určiť vplyv prítomnosti guľičiek na výťažnosť extrakcie. Pri vodných a hexán-ethanolových extraktoch došlo pri použití guľičiek k zlepšeniu výťažnosti, avšak u ostatných extraktov boli celkové výťažnosti v oboch prípadoch podobné alebo mierne

nižšie pri použití guľičiek. Vo všeobecnosti je možné konštatovať, že vyššia výťažnosť extraktív bola zaznamenaná pri extraktoch z buniek *Spirulina*. Výnimku z tohto trendu predstavujú etanolové extrakty (96 %), pri ktorých bola vyššia výťažnosť zaznamenaná pri extraktoch z mikroriasy *Chlorella*.

5.2.2 Stanovenie pigmentov spektrofotometricky

V pripravených extraktoch boli podľa postupu uvedeného v kapitole 4.16.3 spektrofotometricky stanovené pigmenty. Získané hodnoty absorpcií pri vybraných charakteristických vlnových dĺžkach boli spriemerované a priemerná hodnota bola dosadená do Rovnice 7. Vypočítané koncentrácie boli vyjadrené v mg/g biomasy. Výsledné koncentrácie jednotlivých pigmentov sú zhrnuté v nižšie uvedenej tabuľke (viď Tabuľka 20).

Tabuľka 20: Spektrofotometricky stanovené koncentrácie pigmentov v extraktoch (označenie „p.m.d.“ znamená „pod mezou detekcie“ využívanej metódy)

biomasa	extrakt	Cchlorofyl A [mg/g]	Cchlorofyl B [mg/g]	Cchlorofyly [mg/g]	Ckarotenoidy [mg/g]
<i>Spirulina</i>	FOLCH	10,190 ± 0,007	5,198 ± 0,011	15,388 ± 0,018	p.m.d.
	voda_a	3,076 ± 0,027	4,389 ± 0,107	7,465 ± 0,134	p.m.d.
	voda_b	2,380 ± 0,019	3,050 ± 0,062	4,737 ± 0,101	p.m.d.
	96 % EtOH_a	15,117 ± 0,038	2,926 ± 0,082	18,043 ± 0,120	p.m.d.
	96 % EtOH_b	13,926 ± 0,045	3,050 ± 0,062	16,977 ± 0,107	p.m.d.
	50 % EtOH_a	1,570 ± 0,008	1,302 ± 0,011	2,872 ± 0,018	p.m.d.
	50 % EtOH_b	1,573 ± 0,013	1,523 ± 0,012	3,095 ± 0,025	p.m.d.
	hexán_a	0,074 ± 0,002	p.m.d.	0,074 ± 0,002	0,579 ± 0,002
	hexán_b	0,116 ± 0,004	0,068 ± 0,011	0,184 ± 0,016	0,441 ± 0,006
	hexán:EtOH (1:1)_a	15,263 ± 0,116	1,777 ± 0,050	17,040 ± 0,167	p.m.d.
	hexán:EtOH (1:1)_b	7,300 ± 0,016	1,058 ± 0,031	8,358 ± 0,048	p.m.d.
<i>Chlorella</i>	FOLCH	5,867 ± 0,012	1,876 ± 0,016	7,742 ± 0,028	p.m.d.
	voda_a	0,300 ± 0,003	0,261 ± 0,015	0,561 ± 0,018	p.m.d.
	voda_b	0,294 ± 0,004	0,241 ± 0,016	0,535 ± 0,013	p.m.d.
	96 % EtOH_a	9,617 ± 0,025	3,477 ± 0,005	13,094 ± 11,997	p.m.d.
	96 % EtOH_b	9,255 ± 0,042	2,742 ± 0,016	11,997 ± 0,058	p.m.d.
	50 % EtOH_a	0,744 ± 0,004	0,420 ± 0,012	1,163 ± 0,017	p.m.d.
	50 % EtOH_b	0,561 ± 0,013	0,287 ± 0,030	0,847 ± 0,043	p.m.d.
	hexán_a	3,143 ± 0,004	0,445 ± 0,002	3,588 ± 0,006	p.m.d.
	hexán_b	3,322 ± 0,009	0,434 ± 0,010	3,756 ± 0,018	p.m.d.
	hexán:EtOH (1:1)_a	8,124 ± 0,100	1,973 ± 0,151	10,097 ± 0,251	p.m.d.
	hexán:EtOH (1:1)_b	11,766 ± 0,111	3,052 ± 0,0081	14,819 ± 0,192	p.m.d.

Koncentrácie pigmentov v jednotlivých extraktoch boli stanovené z nameraných absorpčných spektier pripravených extraktov. Ako vyplýva z vyššie uvedenej tabuľky, najvyššia koncentrácia celkových chlorofylov, predstavujúca súčet koncentrácie chlorofylu a a chlorofylu b, bola stanovená v etanolvom extrakte (96 % EtOH) *Spirulina* a to 18,043±0,120 mg/g biomasy. Na základe získaných výsledkov je možné konštatovať, že v extraktoch zo sinice *Spirulina* sa v porovnaní s mikroriasou *Chlorella* nachádzali vyššie

koncentrácie celkových chlorofylov. Zároveň bol pri extraktoch pozorovaný trend vyššieho obsahu chlorofylu a než chlorofylu b. Výnimku z tohto trendu predstavovali iba vodné extrakty *Spirulina*, pri ktorých boli stanovené vyššie koncentrácie chlorofylu b. Najnižšie koncentrácie jednotlivých a zároveň aj celkových chlorofylov boli zistené v hexánových extraktoch *Spirulina*. To pravdepodobne súvisí s polaritou použitého rozpúšťadla, keďže hexán patrí medzi nepolárne rozpúšťadlá, zatiaľ čo chlorofyly sú zlúčeniny polárneho charakteru. Z tohto dôvodu boli stanovené vyššie koncentrácie chlorofylov pri použití polárnych rozpúšťadiel, t.j. vody a ethanolu. Nepolárny charakter hexánu však umožnil extrakciu karotenoidov, ktoré boli detegované v pomerne nízkych koncentráciách len v hexánových extraktoch *Spirulina*. V iných extraktoch sa ich koncentrácia nachádzala pod medzou detekcie (p.m.d.).

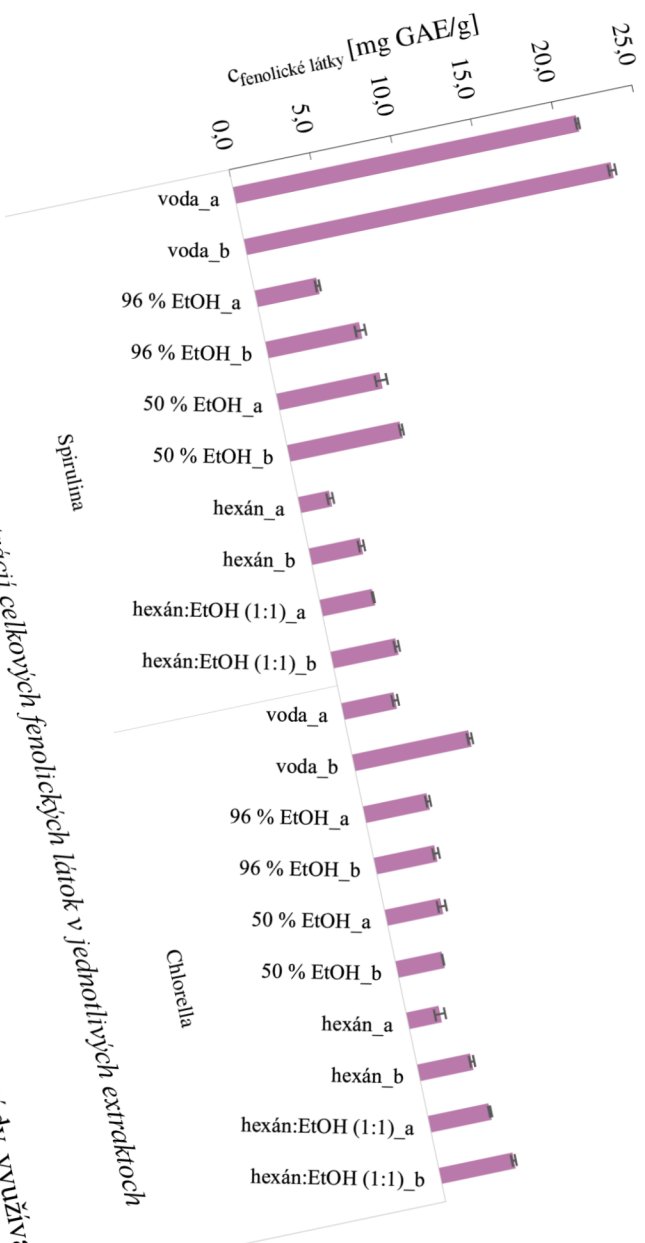
V extraktoch pripravených z mikroriasy *Chlorella* boli najvyššie koncentrácie celkových a jednotlivých chlorofylov stanovené v hexán-ethanolových (1:1) a ethanolových (96 %) extraktoch. Najnižší obsah chlorofylov bol zistený v extraktoch pripravených s destilovanou vodou. Prítomnosť karotenoidov nebola spektrofotometricky zistená ani v jednom z pripravených extraktov mikroriasy *Chlorella*. Zo získaných výsledkov vyplýva, že najlepšie extrakčné činidlo pre chlorofyly predstavuje ethanol, pričom s jeho stúpajúcou koncentráciou dochádzalo ku zvýšeniu obsahu chlorofylov v extraktoch. Zastúpenie chlorofylov v mikroriasach predstavuje podľa literatúry 0,5–1,5 % biomasy, čo približne odpovedá aj nami stanoveným hodnotám [65]. Obsah chlorofylov závisí na predovšetkým na druhu mikroriasy a jej kultivačných podmienkach, čo pravdepodobne mohlo spôsobiť odchýlku pri nami stanovených koncentráciách. Vo väčšine extraktov bol sledovaný trend poklesu koncentrácie pigmentov pri použití sklenených guľčiek počas extrakcie.

5.2.3 Stanovenie celkových fenolických látok

Koncentrácie celkových fenolických látok boli v pripravených extraktoch z biomasy *Spirulina* a *Chlorella* stanovené spektrofotometricky podľa postupu uvedeného v kapitole 4.16.4. Každá vzorka bola analyzovaná v triplikátoch a priemerná hodnota bola dosadená do kalibračnej rovnice (Rovnica 3). Výsledné koncentrácie boli vyjadrené ako mg ekvivalentu kyseliny gallovej (GAE) na g biomasy a sú zhrnuté v nižšie uvedenom grafe (Obrázok 9).

Najvyššie koncentrácie celkových fenolických látok boli stanovené pre riasy *Spirulina* aj *Chlorella* vo vodných extraktoch. Najvyšší obsah celkových fenolických látok bol zistený vo vodnom extrakte *Spirulina* ($22,77 \pm 0,21$ mg GAE/g biomasy) pripravenom s použitím guľčiek. Pri extraktoch pripravených z mikroriasy *Chlorella* bola najvyššia koncentrácia fenolických látok stanovená taktiež vo vodnom extrakte ($7,22 \pm 0,13$ mg GAE/g biomasy), avšak v porovnaní s extraktom zo *Spirulina* sa jedná o približne trikrát nižšiu hodnotu. Voda sa teda javí ako najúčinnnejšie extrakčné činidlo pre fenolické látky. Vo všeobecnosti sa udáva, že *Chlorella* obsahuje nižšie koncentrácie celkových fenolických látok než *Spirulina*, čomu odpovedajú aj stanovené hodnoty [88]. V prípade ethanolových extraktov bol pri sinici *Spirulina* pozorovaný trend poklesu koncentrácie celkových fenolických látok pri zvyšujúcej sa koncentrácii ethanolu. Pri extraktoch z mikroriasy *Chlorella* sa však tento trend nepotvrдил a pri použití 96 % ethanolu boli zaznamenané mierne vyššie koncentrácie fenolických látok. Najnižšie koncentrácie boli pre oba typy biomasy stanovené v hexánových extraktoch, pričom prídavok ethanolu do extrakčnej zmesi zvýšil účinnosť extrakcie fenolických látok. U všetkých

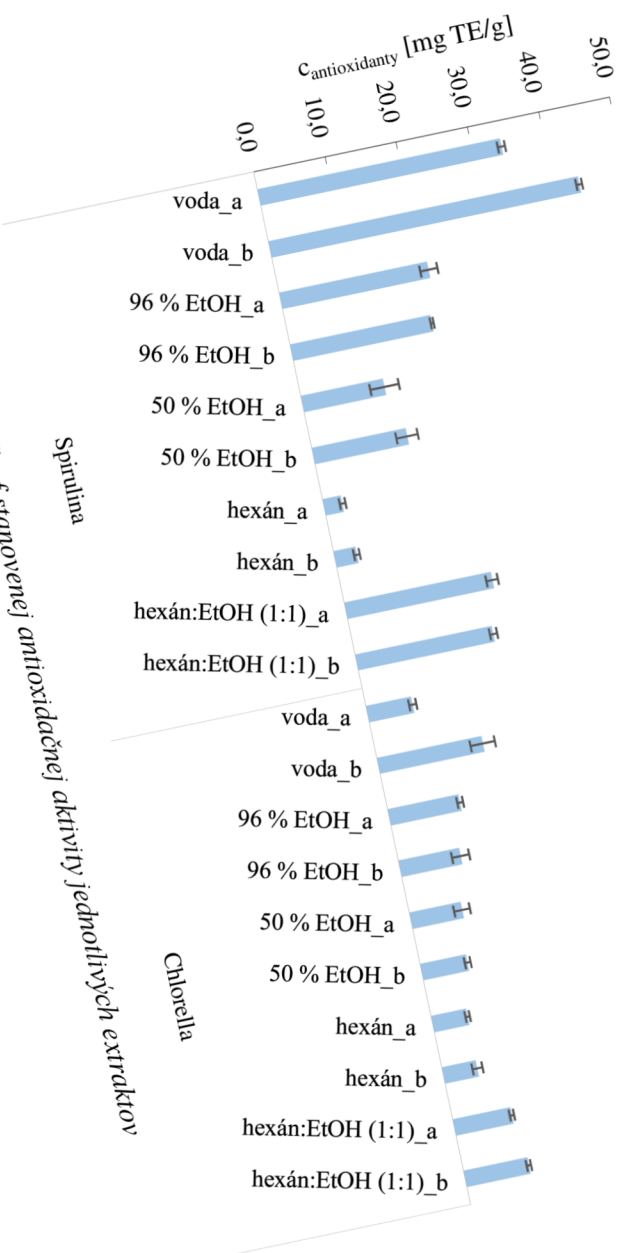
extrakcii boli zaznamenané vyššie koncentrácie celkových fenolických látok pri použití guľičiek počas extrakcie.



Obrázok 9: Graf koncentrácií celkových fenolických látok v jednotlivých extraktoch

5.2.4 Stanovenie antioxidantnej aktivity

Antioxidantná aktivita pripravených extraktov bola stanovená pomocou metódy využívajúcej radikál kationu ABTS^{•+} podľa postupu uvedeného v kapitole 4.16.5. Výsledné koncentrácie antioxidantov boli vyjadrené v mg ekvivalentu Troloxu (TE) na g biomasy a sú zhrnuté v nižšie uvedenom grafe (viď Obrázok 10).



Obrázok 10: Graf stanovenej antioxidantnej aktivity jednotlivých extraktov

Stanovené hodnoty antioxidačnej aktivity sa v jednotlivých extraktoch pohybujú v rozmedzí od $2,59 \pm 0,40$ mg TE/g pre hexánový extrakt *Spirulina* do $43,44 \pm 0,40$ mg TE/g pre vodný extrakt sinice *Spirulina*. Ako je možné pozorovať aj vo vyššie uvedenom grafe (viď Obrázok 10), vodné extrakty v kombinácii s použitím sklenených guľčiek vykazovali najvyššiu antioxidačnú aktivitu. Jedná sa zároveň o extrakty, v ktorých boli stanovené najvyššie koncentrácie celkových fenolických látok (viď Obrázok 9), z čoho vyplýva, že vysoká antioxidačná aktivita týchto extraktov pravdepodobne súvisí s prítomnosťou vyextrahovaných fenolických látok s antioxidačnými vlastnosťami. Najnižší obsah antioxidantov bol pre *Spirulina* aj *Chlorella* stanovený v hexánových extraktoch, avšak prídavok ethanolu k hexánu zvýšil koncentráciu vyextrahovaných antioxidantov. Pre obe riasy je v ethanolových extraktoch možné pozorovať nárast antioxidačnej aktivity pri rastúcej koncentrácii ethanolu. Antioxidačná aktivita extraktov pripravených s prítomnosťou ethanolu ako extrakčného činidla je pravdepodobne spojená s obsahom chlorofylov, nakoľko v týchto extraktoch boli nižšie koncentrácie fenolických látok avšak vyššie koncentrácie chlorofylov. Zo stanovených hodnôt antioxidačnej aktivity v jednotlivých vzorkách nie je možné jednoznačne určiť vplyv prítomnosti sklenených guľčiek počas extrakcie na koncentráciu antioxidantov v extrakte.

5.2.5 Stanovenie vo vode rozpustných proteínov

Koncentrácie vo vode rozpustných proteínov boli v pripravených vodných extraktoch stanovené spektrofotometricky metódou podľa Hartree-Lowryho podľa postupu uvedeného v kapitole 4.16.6. Výsledné koncentrácie proteínov boli prepočítané na mg proteínov na g biomasy a sú uvedené v Tabuľka 21.

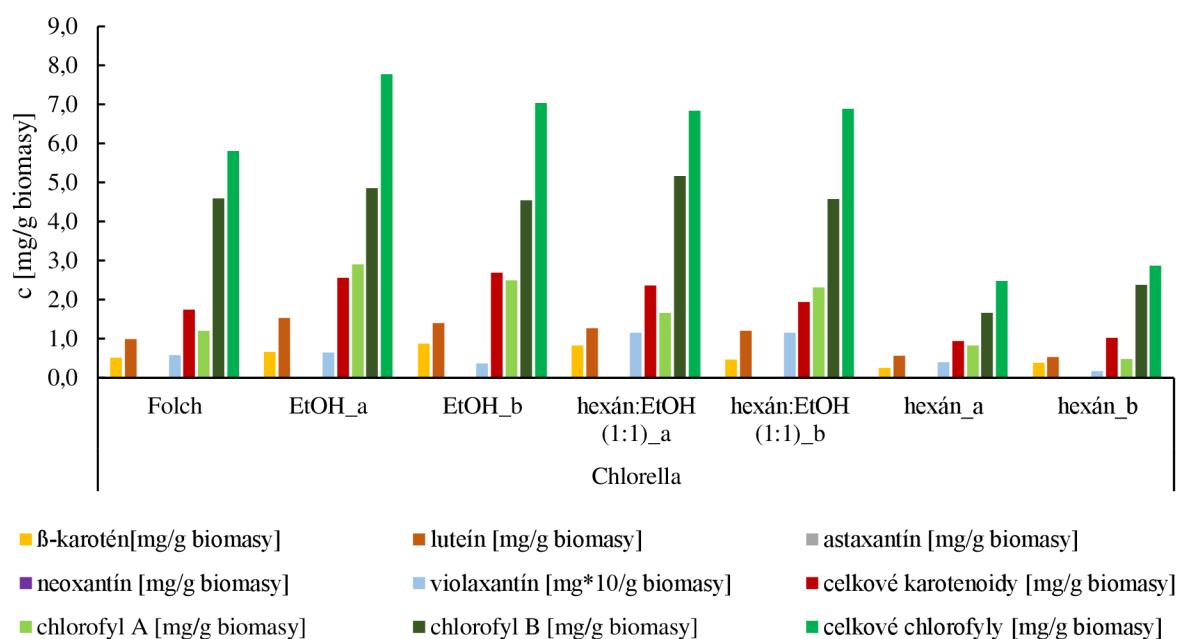
Tabuľka 21: Koncentrácie proteínov stanovených vo vodných extraktoch

typ extraktu	extrakt	$c_{\text{proteíny}}$ [mg/g]
vodný	<i>Spirulina</i>	$361,9 \pm 6,8$
	<i>Spirulina</i> + guľčky	$373,9 \pm 18,1$
	<i>Chlorella</i>	$153,4 \pm 4,5$
	<i>Chlorella</i> + guľčky	$163,9 \pm 5,2$

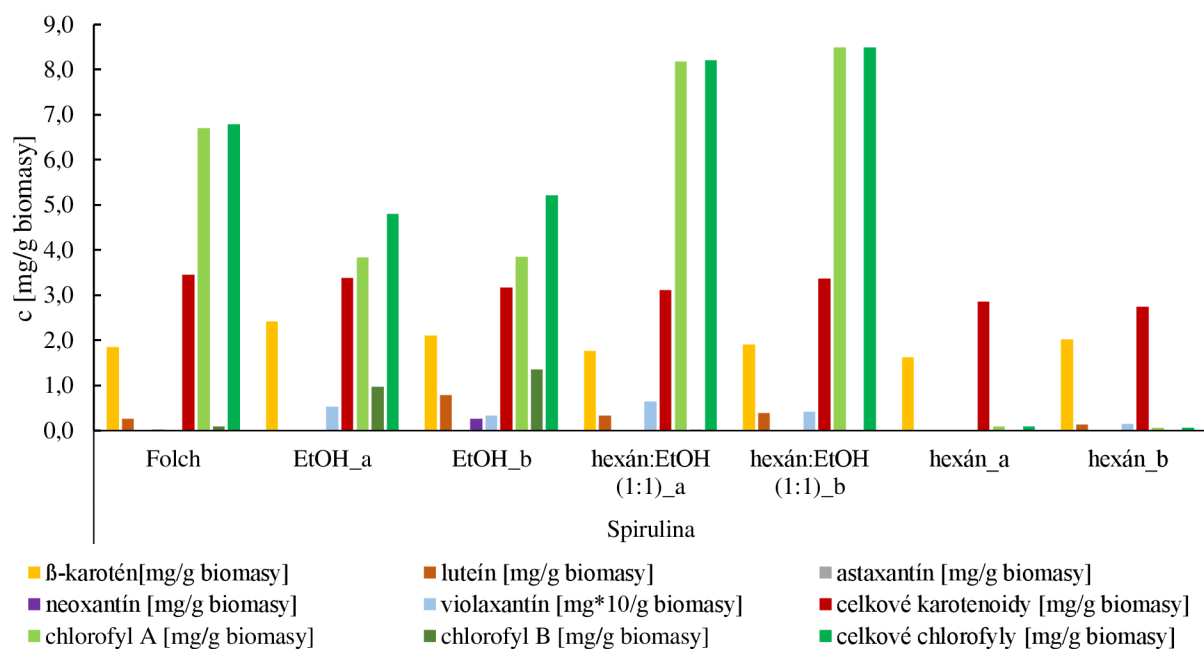
Z vyššie uvedených výsledkov vyplýva, že vodné extrakty sinice *Spirulina* a mikroriasy *Chlorella* obsahovali pomerne vysoké zastúpenie proteínov, pričom obsah proteínov stanovený v sinici *Spirulina* bol viac než dvakrát vyšší v porovnaní s mikroriasou *Chlorella*. Vyšší obsah proteínov v sinici *Spirulina* bol očakávaný na základe hodnôt uvedených výrobcom na obaloch oboch produktov. Zároveň sú však stanovené hodnoty koncentrácie proteínov výrazne nižšie v porovnaní s hodnotami uvedenými na obale. Odchýlka mohla byť spôsobená nedostatočnou extrakciou proteínov do vody alebo ich prípadnou čiastočnou denaturáciou počas extrakcie. Zo získaných výsledkov je možné konštatovať, že vyššie koncentrácie proteínov boli stanovené vo vzorkách extraktov pripravených s prídavkom sklenených guľčiek, ktoré mohli narušením bunkovej steny napomôcť extrakcii proteínov v nej viazaných a zvýšiť tak obsah proteínov v extrakte.

5.2.6 Stanovenie pigmentov pomocou HPLC/PDA

Analýze na HPLC/PDA boli podrobené extrakty pripravené s použitím 96 % ethanolu, hexánu a kombinácie rozpúšťadiel hexán:ethanol (1:1). Zároveň boli analyzované extrakty pripravené s a bez použitia sklenených guľičiek. Pomocou HPLC/PDA boli vo vybraných extraktoch analyzované prítomné pigmenty, t.j. karotenoidy a chlorofyly, podľa postupu uvedeného v kapitole 4.16.7. Výsledky získané analýzou extraktov sú zhrnuté pre *Spirulina* aj *Chlorella* v nižšie uvedených grafoch (viď Obrázok 11, Obrázok 12).



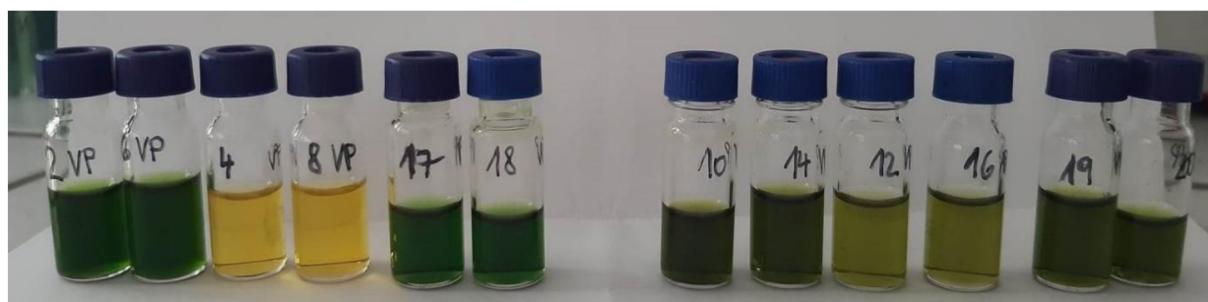
Obrázok 12: Koncentrácie pigmentov stanovené pomocou HPLC/PDA v extraktoch *Chlorella*



Obrázok 11: Koncentrácie pigmentov stanovených pomocou HPLC/PDA v extraktoch *Spirulina*

Z vyššie uvedených grafov je možné konštatovať, že extrakty pripravené z biomasy *Spirulina* obsahovali vyššie koncentrácie karotenoidov než extrakty mikroriasy *Chlorella*. Naopak, extrakty pripravené z mikroriasy *Chlorella* obsahovali vo všetkých extraktoch, okrem ethanolových (96 %) vyššie koncentrácie chlorofylov než extrakty zo sinice *Spirulina*. Extrakty zo *Spirulina* obsahovali vyššie množstvo chlorofylu a než chlorofylu b. V prípade extraktov z *Chlorella* bol zistený opačný trend, koncentrácie chlorofylu b prevyšovali chlorofyl a. Pri porovnaní kontrolných extrakcií podľa Folcha s pripravenými extraktami bolo zistené, že kontrole extrakty obsahovali vyššie koncentrácie karotenoidov, avšak nižšie koncentrácie chlorofylov než ostatné pripravené extrakty. To mohlo byť spôsobené tým, že extrakcia podľa Folcha je cielejšia na lipofilné metabolity, t.j. karotenoidy, zatiaľ čo chlorofyly sú látky polárnejšieho charakteru, a preto boli do extraktov podľa Folcha vyextrahované v menšej miere.

Spektrofotometrickou metódou bola zistená koncentrácia karotenoidov jedine v hexánových extraktoch *Spirulina*, avšak na základe analýzy na HPLC je možné konštatovať, že v každom extrakte boli karotenoidy detegované. Rozdiely mohli byť spôsobené najmä menšou presnosťou spektrofotometrického stanovenia, keďže HPLC využíva pre stanovenie štandardy jednotlivých karotenoidov, pričom spektrofotometricky sa karotenoidy stanovujú len na základe absorbancie pri dvoch charakteristických vlnových dĺžkach. Najvyššia koncentrácia karotenoidov bola stanovená v ethanolovom extrakte sinice *Spirulina* (bez guľičky), a to 3,384 mg/g. Najviac zastúpeným karotenoidom bol vo všetkých extraktoch β -karotén, predstavujúci provitámín A. V prípade extraktov zo sinice *Spirulina* sa jeho koncentrácie pohybovali v rozmedzí 1,628–2,418 mg/g, čo odpovedá hodnotám udávaným v literatúre (1,5–2,5 mg/g v závislosti od podmienok kultivácie). Koncentrácie celkových karotenoidov však boli nižšie než hodnoty udávané v literatúre. Najvyššia koncentrácia chlorofylu *a*, spolu s celkovými chlorofylmi bola zistená v hexán-ethanolovom (1:1) extrakte (3,384 mg/g) pričom sa jednalo o hodnotu nižšiu než udáva literatúra (13,0–17,0 mg/g v závislosti na podmienkach kultivácie) [60]. V tomto prípade pravdepodobne nedošlo ku úplnej extrakcii chlorofylov z biomasy.



Obrázok 13: Vzhľad pripravených extraktov pred analýzou na HPLC, 2 - *Spirulina* (96 % ethanol), 6 - *Spirulina* (96 % ethanol+guľičky), 4 - *Spirulina* (hexán), 8 - *Spirulina* (hexán+guľičky), 17 - *Spirulina* (hexán:ethanol 1:1), 18 - *Spirulina* (hexán+ethanol 1:1 +guľičky), 10 - *Chlorella* (96 % ethanol), 14 - *Chlorella* (96 % ethanol+guľičky), 12 - *Chlorella* (hexán), 16 - *Chlorella* (hexán+guľičky), 19 - *Chlorella* (hexán:ethanol 1:1), 20 - *Chlorella* (hexán+ethanol 1:1 +guľičky)

Pri porovnaní extraktov *Chlorella* so *Spirulina*, obsahovali extrakty z *Chlorella* nižšie koncentrácie β -karoténu. Zároveň boli zistené vyššie koncentrácie luteínu a violaxantínu, patriacich medzi karotenoidy s dobrými antioxidantnými vlastnosťami. Koncentrácie celkových karotenoidov sa v pohybovali v rozmedzí od 0,944 mg/g pri hexánových extraktoch do

2,693 mg/g pri ethanolových extraktoch. Koncentrácie celkových chlorofylov sa pohybovali od 2,476–7,770 mg/g, pričom bol zachovaný rovanký trend ako pri karotenoidoch, t.j. najnižšie koncentrácie boli stanovené v hexánových extraktoch a najvyššie v ethanolových extraktoch. Stanovené koncentrácie sa nachádzajú mierne na spodnej hranici rozmedzia koncentrácií chlorofylu u mikroriasy *Chlorella* (0,5–1,5 %). Nižšie koncentrácie mohli byť spôsobené degradáciou pigmentov pred analýzou, nakoľko chlorofyly spolu s karotenoidmi patria medzi zlúčeniny citlivé na teplo a svetlo [65].

5.2.7 Stanovenie mastných kyselín pomocou GC/FID

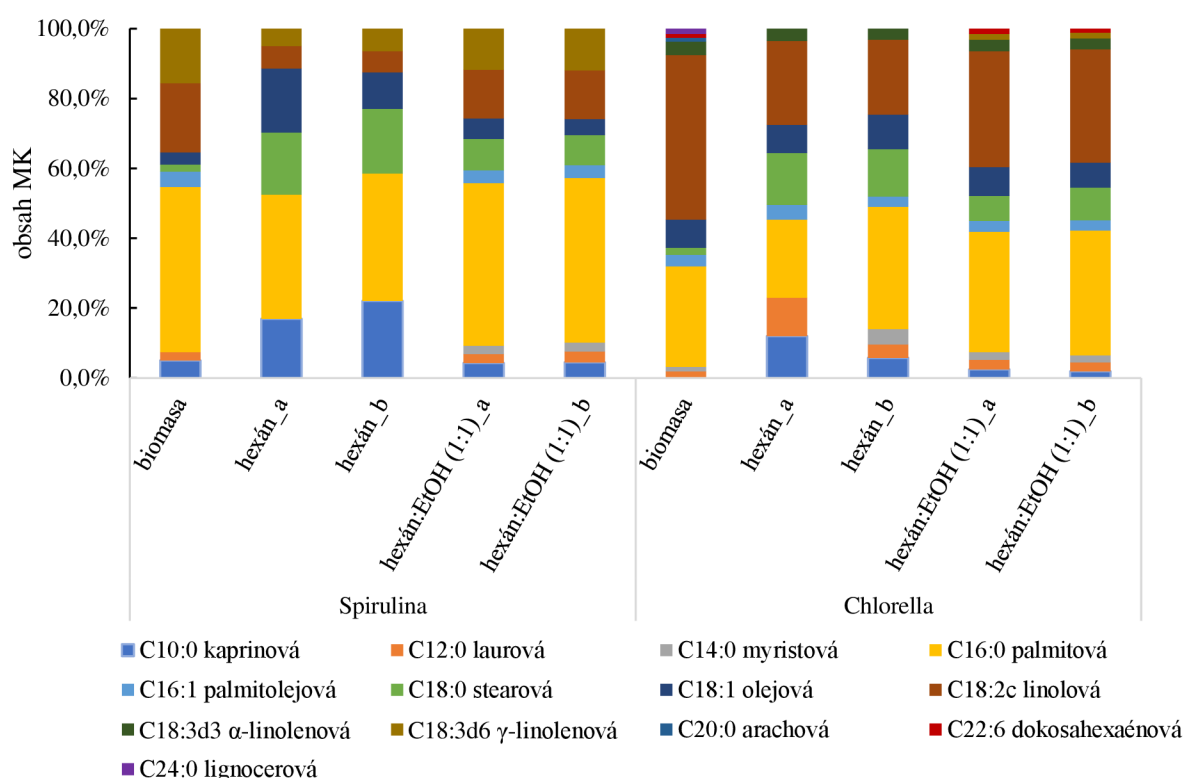
Obsah celkových lipidov a jednotlivých mastných kyselín, bol stanovený vo vzorkách biomasy *Spirulina* a *Chlorella* a zároveň aj v hexánových a hexán-ethanolových (1:1) extraktoch. Postup prípravy vzoriek ako aj postup samotnej analýzy sú uvedené v kapitole 4.16.9. V prípade extraktov bol najprv odparený 96 % ethanol a lipidy boli stanovované len v získanom olejovom extrakte. Získané výsledky sú zhrnuté v Tabuľka 22.

Z výsledkov analýzy jednotlivých vzoriek na plynovom chromatografe vyplýva, že vyšší obsah lipidov bol stanovený v biomase mikroriasy *Chlorella*, a to konkrétne 8,81 g/100 g. Vyššie zastúpenie lipidov bolo na základe nutričných údajov uvedených na obale očakávané práve v biomase *Chlorella*. Stanovený obsah lipidov je v porovnaní s obsahom uvádzaným výrobcom takmer štyrikrát vyšší, podobný trend bol pozorovaný aj v prípade sinice *Spirulina*. Pri porovnaní zastúpenia lipidov v biomase a extraktoch je možné pozorovať zvýšené množstvo lipidov práve v extraktoch. Tento výsledok bol očakávaný keďže sa jednalo o extrakty s využitím nepolárneho rozpúšťadla hexánu napomáhajúcemu extrakcii lipidov. Z hľadiska jednotlivých typov extraktov boli zistené vyššie koncentrácie lipidov v extraktoch pripravených s kombináciou rozpúšťadiel hexán:ethanol (1:1) a taktiež v extraktoch pripravených s použitím sklenených guľčiek. Sklenené guľčky napomohli rozrušeniu bunkových stien mikrorias a tým zefektívniť extrakciu lipidov. Výnimku tvoria len hexán-ethanolové extrakty mikroriasy *Chlorella*, kde bolo vyššie zastúpenie lipidov v extrakte bez použitia guľčiek.

Tabuľka 22: Zastúpenie lipidov a jednotlivých typov MK v biomase a extraktoch

vzorka		obsah lipidov [%]	zastúpenie typov MK [%]		
			SFA	MUFA	PUFA
<i>Spirulina</i>	biomasa	6,26	56,83	7,73	35,44
	hexán_a	28,37	70,31	18,31	11,38
	hexán_b	30,68	77,01	10,40	12,58
	hexán:EtOH (1:1)_a	35,47	64,77	9,47	25,75
	hexán:EtOH (1:1)_b	38,68	65,81	8,28	25,91
<i>Chlorella</i>	biomasa	8,81	36,62	11,28	52,10
	hexán_a	27,63	60,36	12,10	27,54
	hexán_b	32,09	62,64	12,83	24,52
	hexán:EtOH (1:1)_a	37,38	49,05	11,28	39,67
	hexán:EtOH (1:1)_b	32,28	51,59	10,08	38,33

Z hľadiska obsahu jednotlivých typov MK bolo zistené, že v biomase aj v extraktoch tvorili väčšinu lipidov nasýtené mastné kyseliny, pričom ich najvyšší obsah bol stanovený v hexánovom extrakte sinice *Spirulina* (77,01 %). Spomedzi nenasýtených MK mali vyššie zastúpenie PUFA, ktoré patria medzi MK s najpriaznivejšími účinkami na ľudské zdravie. Najvyššie koncentrácie PUFA boli stanovené v biomase *Chlorella* (52,10 %), avšak v pripravených extraktoch už prevládali SFA. Vyššie zastúpenie PUFA bolo stanovené v hexán:ethanolových extraktoch než v hexánových. Ako je možné pozorovať z nižšie uvedeného grafu (Obrázok 14), v prípade sinice *Spirulina* bola najviac zastúpenou MK kyselina palmitová patriaca medzi SFA. Spomedzi nenasýtených MK to boli kyselina olejová (SFA) a kyseliny linolová a γ -linolénová (PUFA). Najviac zastúpenou MK kyselinou v biomase aj extraktoch mikroriasy *Chlorella* bola kyselina linolová (PUFA), pričom výnimku tvoril len hexánový extrakt, v ktorom bola stanovená najvyššia koncentrácia pri kyseline palmitovej (SFA). V biomase *Chlorella* bola zároveň detegovaná aj ω -3 MK, kyselina dokosahexaénová (1,10 %) dôležitá pre správnu činnosť mozgu a zraku. Jej prítomnosť bola stanovená aj v hexán:ethanolových extraktoch, pričom jej zastúpenie sa v porovnaní so zastúpením v biomase mierne zvýšilo (1,24–1,44 %).



Obrázok 14: Graf zastúpenia jednotlivých MK v biomase a v extraktoch

5.2.8 Stanovenie vitamínov rozpustných vo vode

Vitamíny rozpustné vo vode boli stanovované vo vodných extraktoch mikroorganizmov *Spirulina* a *Chlorella* pomocou analýzy na HPLC s UV-VIS detekciou podľa postupu uvedeného v kapitole 4.16.8. Zo získaných chromatogramov bolo zistené, že ani v jednej z analyzovaných vzoriek vodných extraktov nebola zistená prítomnosť vitamínov skupiny B. Vitamíny B sú obecné zastúpené v mikroriasach v nízkych koncentráciách (ng– μ g/g biomasy)

a z toho dôvodu nemuselo dôjsť ku extrakcii týchto vitamínov v dostatočnom a detekovateľnom množstve. Zároveň to mohlo byť spôsobené aj nevhodnou metódou pre extrakciu týchto vitamínov [61]. Aj keď sa jedná o vo vode rozpustné vitamíny, samotná voda nemusí byť postačujúcim extrakčným činidlom. Jediný detegovaný vo vode rozpustný vitamín v analyzovaných vodných extraktoch bol vitamín C. V extrakte zo *Spirulina* bola zistená vyššia koncentrácia vitamínu C ($0,345 \pm 0,001$ mg/g biomasy) než v extrakte z *Chlorella* ($0,063 \pm 0,003$ mg/g biomasy). Pri porovnaní obsahu vitamínu C v *Chlorella* sa v literatúre udávajú vyššie hodnoty (0,1–15,0 mg/g) než boli nami stanovené koncentrácie [61]. Rozdiely mohli byť spôsobené nedostatočnou extrakciou vitamínov, vzhľadom na absenciu vitamínov B vo vzorkách alebo taktiež nízkym, resp. žiadnym obsahom týchto vitamínov v biomase, nakoľko ich obsah závisí na podmienkach kultivácie a zložení kultivačného média.

5.2.9 Stanovenie β -glukánov

Obsah β -glukánov bol stanovovaný v biomase mikroriasy *Chlorella* a sinice *Spirulina* s využitím komerčne dostupného enzymatického kitu podľa postupu uvedeného v kapitole 4.17. Výsledné koncentrácie β -glukánov boli vypočítané dosadením nameraných hodnôt absorbancií do výpočtového Excelu od výrobcu kitu. Získané výsledky sú zhrnuté v nižšie uvedenej tabuľke (viď Tabuľka 23).

Tabuľka 23: Obsah glukánov v jednotlivých vzorkách

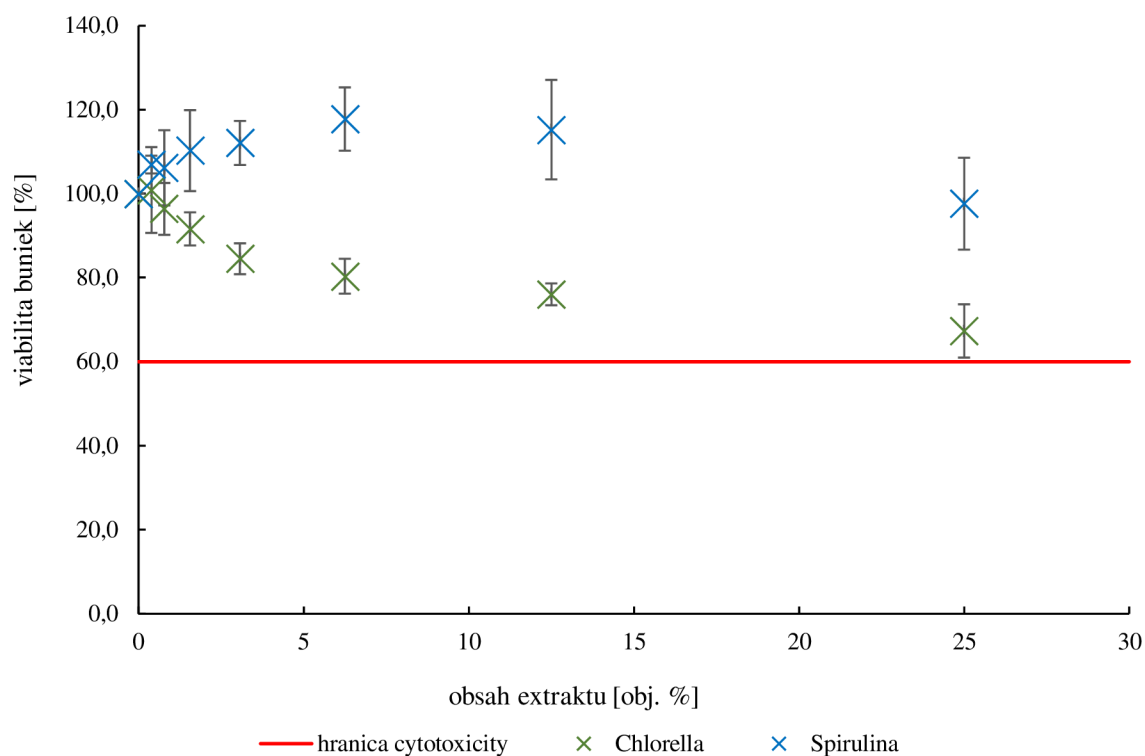
vzorka	$C_{\text{glukány}}$ [g/100 g]
<i>Spirulina</i>	$0,068 \pm 0,004$
<i>Chlorella</i>	$0,093 \pm 0,014$

V mikroriasach tvoria β -glukány súčasť bunkových stien, v ktorých sú pomerne pevne viazané. Vzhľadom na to je proces ich extrakcie pomerne komplikovaný a vyžaduje viacero krokov vrátane enzymatických a hydrolytických reakcií. Ako vyplýva z vyššie uvedenej tabuľky (Tabuľka 23) obsah glukánov v analyzovaných vzorkách bol v oboch prípadoch nižší než 0,1 %. Pri porovnaní stanovených β -glukánov s ich obsahom v analyzovaných múkach je možné konštatovať, že aj *Spirulina* aj *Chlorella* obsahovali vyššie zastúpenie β -glukánov ako bezlepková a kukuričná múka, ale zároveň nižšie než ryžová múka.

Vyššie zastúpenie glukánov bolo zistené v biomase *Chlorella* ($0,093 \pm 0,014$ g/100 g). V porovnaní s obsahom β -glukánov stanoveným v biomase *Spirulina* obsahovala *Chlorella* o približne 37 % viac β -glukánov. Vzhľadom na to, že β -glukány patria medzi polysacharidy môže byť ich vyššie zastúpenie v *Chlorella* spojené s vyšším výrobcom deklarovaným obsahom sacharidov. Obsah β -glukánov pri mikroriasach sa v dostupnej literatúre pomerne líši a závisí hlavne na kultivačných podmienkach a konkrétnom druhu mikroriasy [89].

5.2.10 MTT test cytotoxicity

Z pripravených extraktov boli na základe získaných výsledkov vybrané vodné extrakty *Spirulina* aj *Chlorella* pripravené v kombinácii s prídavkom sklenených guľičiek, ktoré boli podrobené MTT testom cytotoxicity. Cytotoxické účinky boli testované na bunkovej línii CaCo-2 (pasáž 58) podľa postupu uvedeného v kapitole 4.19. Za extrakty s cytotoxickými účinkami boli považované extrakty, pri ktorých počas testovania klesla viabilita kultúr pod hranicu 60 %. Výsledky MTT testu cytotoxicity sú znázornené v nižšie uvedenom grafe (Obrázok 15) predstavujúcom závislosť viability buniek na koncentrácii testovaného extraktu.



Obrázok 15: Závislosti viability buniek CaCo-2 v závislosti na koncentrácii extraktov rias

Z vyššie uvedeného grafu viability buniek je možné konštatovať, že vodné extrakty mikroriasy *Chlorella* mali na bunky menej priaznivé účinky než vodné extrakty sinice *Spirulina*. Pri testovaní extraktov pripravených z mikroriasy *Chlorella* bol pozorovaný pokles viability buniek v závislosti na zvyšujúcej sa koncentrácii testovaného extraktu. Najnižšia viabilita buniek bola stanovená pri testovaní extraktu s koncentráciou 25,0 obj. %, kedy viabilita dosahovala 67,3 %. Stále sa však jedná o hodnotu vyššiu než je stanovená hranica cytotoxicity, z čoho vyplýva, že žiadny z pripravených extraktov *Chlorella* nevykazoval cytotoxické účinky. Vodný extrakt *Spirulina* mal na základe dát uvedených v grafe výraznejšie priaznivejšie účinky na testované bunky v porovnaní s extraktom *Chlorella*. Pri zvyšujúcej sa koncentrácii testovaného extraktu bol pozorovaný nárast viability buniek a to až do koncentrácie 12,5 obj. %, kedy bol zaznamenaný jej mierny pokles. Z toho vyplýva, že testované extrakty v nižších koncentráciách obsahovali látky, ktoré podporovali rast a metabolizmus buniek a obecnne mali na bunky priaznivý vplyv. Najnižšia viabilita bola v prípade testovaného vodného extraktu *Spirulina* zistená pri najvyššej testovanej koncentrácii,

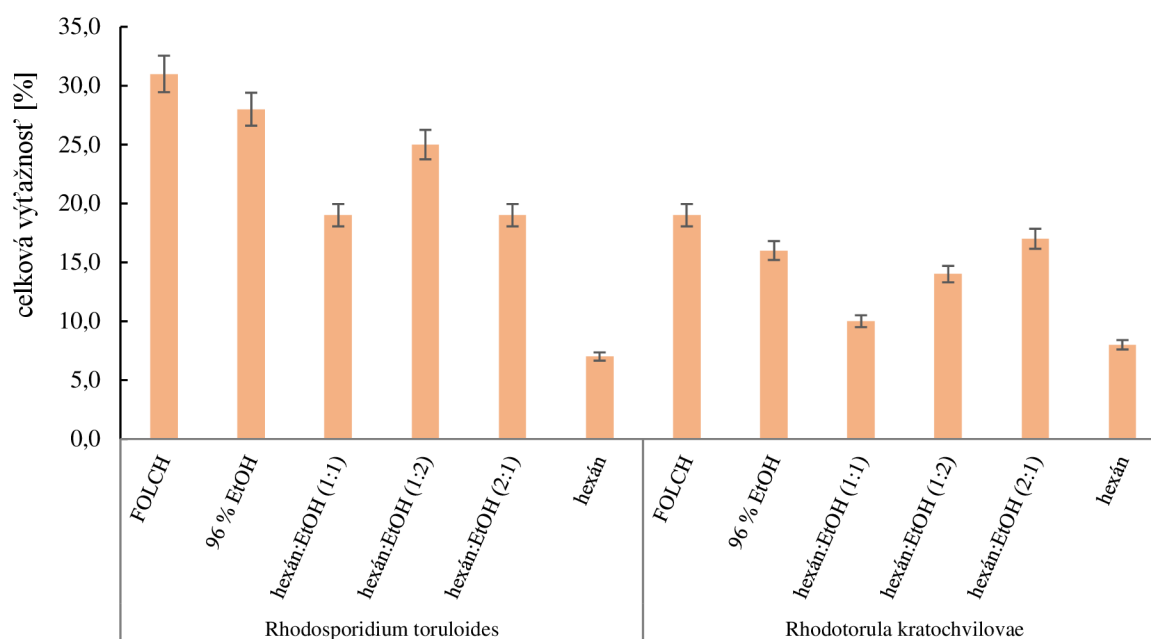
t.j. 25,0 obj. %, pričom aj v tomto prípade bola hodnota blízko 100 % viabilite, konkrétne bola zistená viabilita 97,6 %. Na základe získaných výsledkov je možné konštatovať, že testované vodné extrakty *Chlorella* a *Spirulina* nevykazovali za podmienok testovania cytotoxické účinky a ich použitie v potravinových aplikáciách by bolo v testovaných koncentráciách bezpečné.

5.3 Charakterizácia extraktov z kvasiniek

V rámci diplomovej práce bola na prípravu extraktov použitá biomasa z kvasiniek *Rhodosporidium toruloides* a *Rhodotorula kratochvilovae* kultivovaných v laboratórnom fermentore. Pri príprave extraktov boli využívané rozpúšťadlá so statusom GRAS (ethanol a hexán) a ich rôzne kombinácie. Zároveň boli pripravené aj kontrolné extrakty extrakciou podľa Folcha, ktorá je účinná pri extrakcii lipofilných metabolitov, avšak používa rozpúšťadlá chloroform a methanol, ktoré nemajú udelený status GRAS. Tieto extrakty boli použité na porovnanie účinnosti extrakcie. Získané výsledky sú uvedené v nasledujúcich kapitolách.

5.3.1 Celková výťažnosť extrakcie

Celková výťažnosť pripravených extraktov bola stanovená podľa postupu uvedeného v kapitole 4.16.1. Stanovené hodnoty celkovej výťažnosti pre jednotlivé extrakty sú zobrazené v nižšie uvedenom grafe (Obrázok 16) a predstavujú hmotnostný podiel vyextrahovaných pevných látok v extrakte.



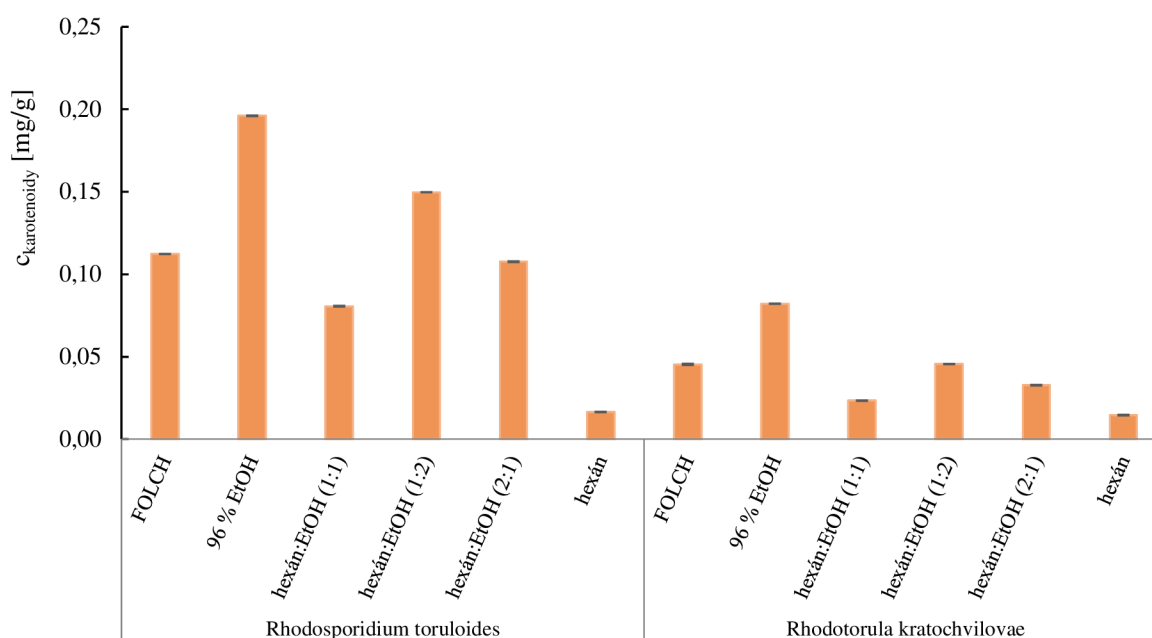
Obrázok 16: Graf celkových výťažností extrakcií pre jednotlivé typy extrakcie

Stĺpcový diagram zobrazuje percentuálne hodnoty celkových výťažností jednotlivých typov extrakcií v závislosti na type rozpúšťadla a použitej biomasy. Pre obe kvasinky bola najvyššia výťažnosť extrakcie dosiahnutá pri extrakcii podľa Folcha, čo odpovedá predpokladu, keďže sa jedná o extrakciu, ktorá je cieľená na lipofilné metabolity tvoriace väčšinu bioaktívnych látok kvasiniek. Vyššia výťažnosť extrakcie podľa Folcha bola stanovená pre kvasinku *Rhodosporidium toruloides* (31,0 %), zatiaľ čo pre kvasinku *Rhodotorula kratochvilovae* bola

19,0 %. Extrakcie využívajúce 96 % ethanol poskytovali výťažnosti najviac podobné tým u extraktov podľa Folcha. V prípade kvasinky *Rhodosporidium toruloides* bola výťažnosť v porovnaní s extrakciou podľa Folcha nižšia o približne 10 %, zatiaľ čo pri *Rhodotorula kratochvilovae* bola výťažnosť nižšia o približne 16 %. Najnižšie hodnoty výťažnosti extrakcie boli stanovené pre obe kvasinky v hexánových extraktoch. Samotný hexán sa nejaví ako vhodné rozpúšťadlo pre extrakciu lipofilných metabolitov, avšak v kombinácii s ethanolom v rôznych pomeroch došlo u oboch kvasiniek ku zvýšeniu celkových výťažností extrakcií. Na základe vyššie uvedeného grafu je možné konštatovať, že extrakcia bola účinnejšia pri kvasinke *Rhodosporidium toruloides* než pri kvasinke *Rhodotorula kratochvilovae*.

5.3.2 Stanovenie karotenoidov spektrofotometricky

Koncentrácie karotenoidov v jednotlivých extraktoch boli stanovené spektrofotometricky podľa postupu uvedeného v kapitole 4.16.3. Priemerné hodnoty nameraných absorbancií boli dosadené do Rovnice 8 a bol dopočítaný obsah karotenoidov. Výsledné koncentrácie karotenoidov sú zobrazené v nižšie uvedenom grafe (Obrázok 17).



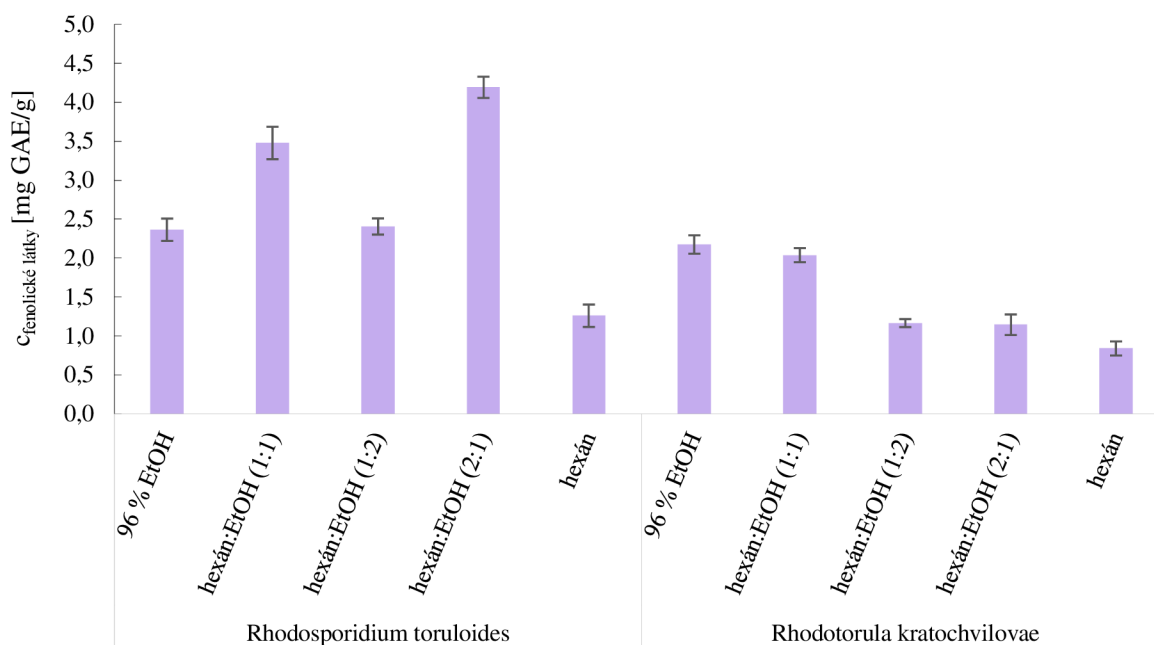
Obrázok 17: Spektrofotometricky stanovené koncentrácie karotenoidov v jednotlivých extraktoch

Najvyššie koncentrácie karotenoidov boli spektrofotometricky stanovené v extraktoch pripravených s použitím 96 % ethanolu ako extrakčného činidla. V ethanolovom extrakte kvasinky *Rhodosporidium toruloides* bola stanovená najvyššia koncentrácia karotenoidov ($0,11 \pm 0,00$ mg/g biomasy) spomedzi všetkých pripravených extraktov. V rovnakom extrakte kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* bola koncentrácia karotenoidov spektrofotometricky stanovená na $0,08 \pm 0,00$ mg/g biomasy. Najnižšie koncentrácie karotenoidov boli zistené v hexánových extraktoch kvasiniek. Prídavkom ethanolu ku hexánu došlo ku nárastu koncentrácií vyextrahovaných karotenoidov. Spomedzi extraktov pripravených kombináciou hexánu a ethanolu vykazovali najvyššie koncentrácie karotenoidov extrakty pripravené extrakčnou zmesou hexán:ethanol (1:2). Ethanol sa teda javí ako lepšie extrakčné činidlo pre extrakciu karotenoidov ako hexán. Pri porovnaní extraktov z jednotlivých kvasiniek je z grafu

možné vidieť, že extrakty pripravené z kvasinky *R. toruloides* obsahovali vyššie koncentrácie karotenoidov než extrakty z kvasinky *R. kratochvilovae*, čo súvisí pravdepodobne s nižším obsahom karotenoidov v biomase kvasinky *R. kratochvilovae*.

5.3.3 Stanovenie celkových fenolických látok

Obsah celkových fenolických látok bol v pripravených extraktoch stanovený podľa postupu uvedeného v kapitole 4.16.4 spektrofotometrickou metódou využívajúcou zriedené Folin-Ciocalteuovo činidlo. Priemerné hodnoty nameraných absorbancií pre jednotlivé extrakty boli dosadené do Rovnica 3 a výsledné koncentrácie celkových fenolických látok boli vyjadrené v mg GAE na g biomasy. Získané výsledky sú vyobrazené v nižšie uvedenom grafe (Obrázok 18).



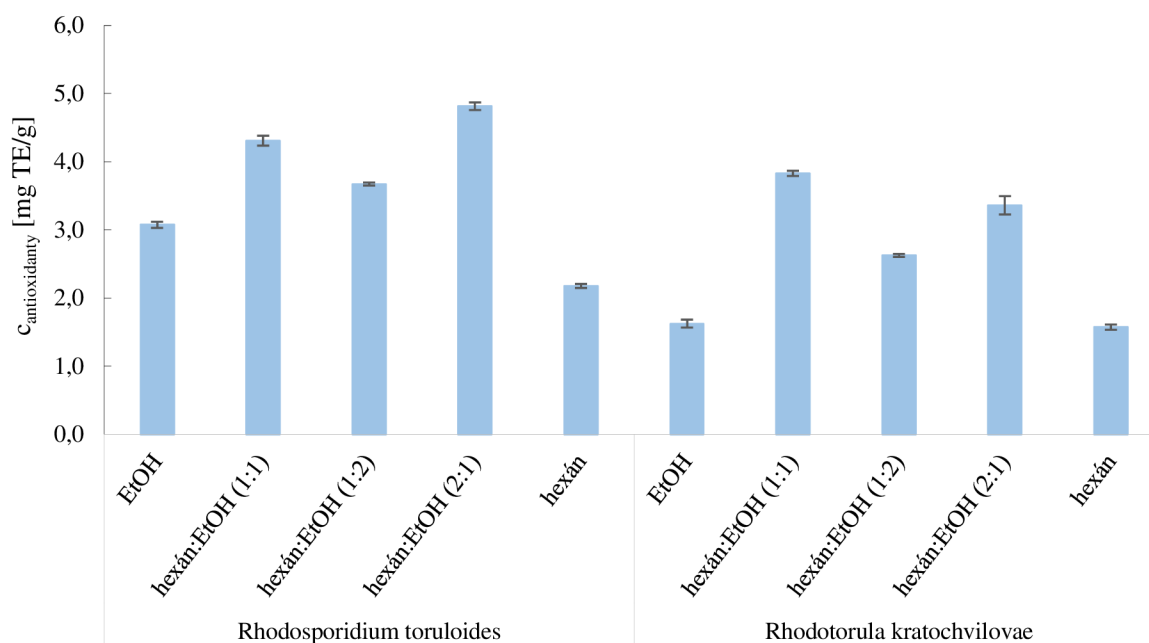
Obrázok 18: Stanovené koncentrácie celkových fenolických látok v extraktoch kvasiniek

Fenolické látky sa radia medzi sekundárne metabolity s významnými biologickými účinkami produkované najmä rastlinami a riasami. Vzhľadom na to sa v súčasnosti pozornosť sústreďuje najmä na tento typ fenolických látok. Menej známymi sú fenolické látky produkované kvasinkami, avšak existujú štúdie, ktoré sa zaoberajú produkciou fenolických látok aj práve kvasinkami za optimálnych podmienok ich kultivácie. Koncentrácie celkových fenolických látok v analyzovaných extraktoch pripravených z kvasiniek sa pohybovali v rozmedzí od $0,84 \pm 0,09$ mg GAE/g biomasy do 4,18 mg GAE/g biomasy. Vo vyššie uvedenom grafe sú viditeľné rozdiely medzi koncentraciami fenolických látok v extraktoch z jednotlivých kvasiniek. Extrakty z kvasinky *Rhodosporidium toruloides* vykazovali vo všetkých prípadoch vyššie koncentrácie fenolických látok než extrakty z kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*. Pri oboch kvasinách boli stanovené najnižšie koncentrácie fenolických látok v hexánových extraktoch. Nakoľko tento typ extraktov vykazoval najnižšie koncentrácie fenolických látok aj pri riasových extraktoch, je možné konštatovať, že samotný hexán sa nejaví ako vhodné extrakčné činidlo pre tento typ aktívnych látok. Najvyššia koncentrácia celkových fenolických látok bola stanovená pri hexán-ethanolovom (2:1) extrakte kvasinky

Rhodospiridium toruloides ($4,19 \pm 0,014$ mg GAE/g biomasy), pričom u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* bola najvyššia stanovená koncentrácia približne o polovicu nižšia ($2,17 \pm 0,12$ mg GAE/g biomasy). Pri porovnaní stanovených koncentrácií celkových fenolických látok s dostupnou literatúrou sú nami stanovené hodnoty výrazne nižšie, keďže literatúra uvádza koncentrácie celkových fenolických látok v desiatkach mg GAE/g biomasy [90]. Odchýlky od literatúry však mohli byť spôsobené použitím iných kmeňov kvasiniek, extrakčných činidiel a zároveň kultivačných podmienok.

5.3.4 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Antioxidačná aktivita bola stanovená v pripravených extraktoch kvasiniek po ich odparení a rozpustení v 96 % ethanole podľa postupu uvedeného v kapitole 4.16.5. Vzorky boli analyzované v triplikátoch a priemer nameraných absorbancií bol dosadený do Rovnica 5. Zistené koncentrácie antioxidantov boli vyjadrené v mg ekvivalentu Troloxu na g biomasy. Stanovené hodnoty antioxidačnej aktivity sú zobrazené v nižšie uvedenom grafe (Obrázok 19).



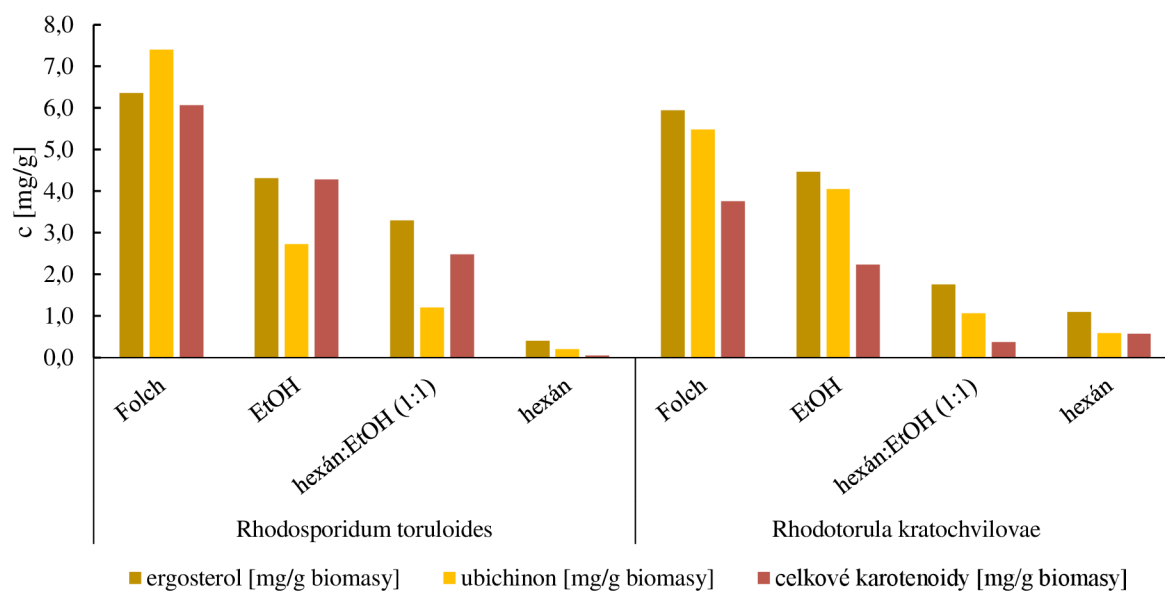
Obrázok 19: Stanovené hodnoty antioxidačnej aktivity v extraktoch z kvasiniek

Z vyššie uvedeného grafu vyplýva, že antioxidačná aktivita sa v analyzovaných vzorkách líšila na základe použitej kvasinky a extrakčného činidla. Extrakty pripravené z kvasinky *Rhodospiridium toruloides* obecné vykazovali vo všetkých extraktoch vyššie hodnoty antioxidačnej aktivity ako extrakty z kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*. Nižšie hodnoty antioxidačnej aktivity môžu súvisieť v prípade kvasinky *R. kratochvilovae* s celkovým nižším obsahom karotenoidov a fenolických látok (viď Obrázok 17, Obrázok 18), ktoré patria medzi látky s antioxidačnými vlastnosťami. Najvyššia antioxidačná aktivita ($4,81 \pm 0,06$ mg TE/g) bola stanovená v extrakte kvasinky *R. toruloides* pripravenom kombináciou rozpúšťadiel hexán:ethanol v pomere 2:1, ktorý zároveň obsahoval najvyššiu koncentráciu fenolických látok. Najnižšie hodnoty antioxidačnej aktivity boli rovnako ako pri extraktoch z *Chlorella* a *Spirulina* stanovené v hexánových extraktoch oboch kvasiniek, v ktorých bol zistený najmenší obsah karotenoidov a fenolických látok. Pri hexánovom extrakte kvasinky *R. kratochvilovae*

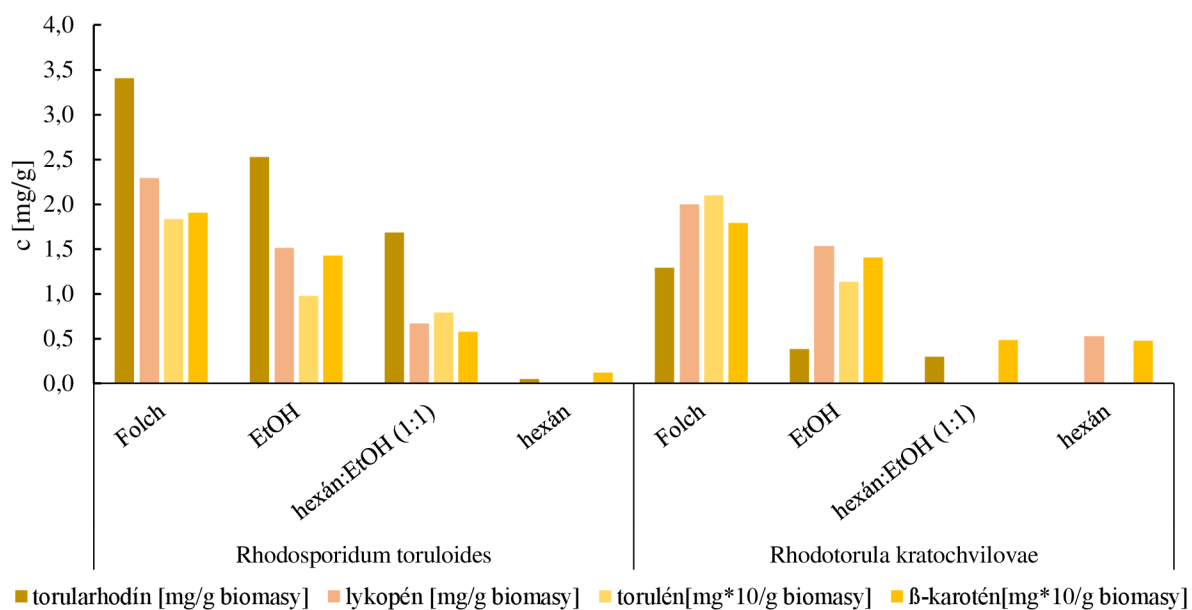
bola zaznamenaná celkovo najnižšia antioxidačná aktivita ($1,57 \pm 0,04$ mg TE/g). Najlepšie antioxidačné vlastnosti vykazovali pri oboch kvasinkách extrakty pripravené kombináciami hexánu a ethanolu. Pri všetkých testovaných pomeroch týchto rozpúšťadiel bola zistená vyššia antioxidačná aktivita než pri extraktoch pripravených samotným 96 % ethanolom alebo hexánom. Zároveň bol pri oboch kvasinkách pozorovaný trend poklesu antioxidačnej aktivity so zvyšujúcou sa koncentráciou ethanolu v extrakčnej zmesi a to aj napriek tomu, že ethanolové extrakty vykazovali vyššiu antioxidačnú aktivitu než hexánové.

5.3.5 Stanovenie lipofilných metabolitov pomocou HPLC/PDA

Obsah lipofilných metabolitov bol stanovený analýzou vybraných extraktov na HPLC/PDA podľa postupu uvedeného v kapitole 4.16.7. Pre analýzu boli vybrané ethanolové (96 %), hexánové a hexán-ethanolové (1:1) extrakty kvasiniek. Výsledné koncentrácie analyzovaných metabolitov sú uvedené v nižšie uvedených grafoch (Obrázok 20, Obrázok 21).

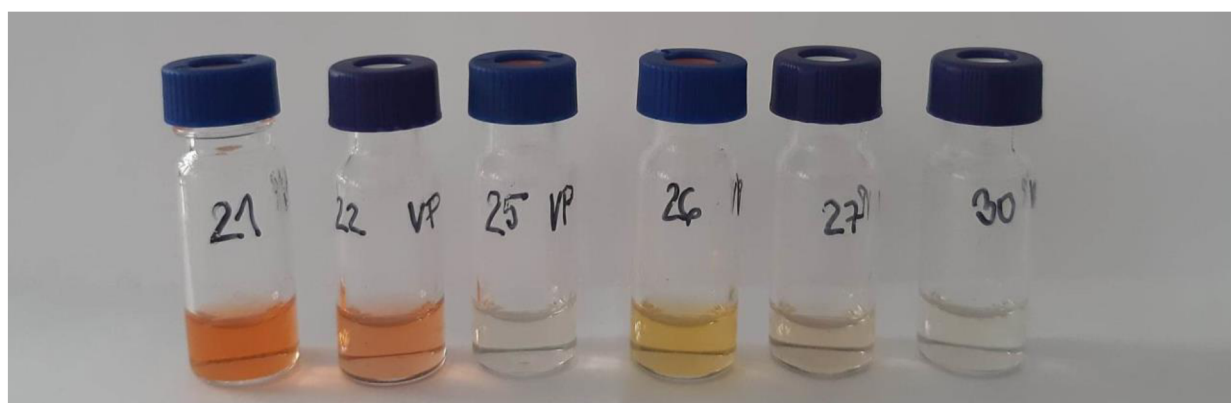


Obrázok 20: Koncentrácie lipofilných metabolitov v analyzovaných extraktoch



Obrázok 21: Koncentrácie jednotlivých karotenoidov v analyzovaných vzorkách

Z grafu (vid' Obrázok 20) vyplýva, že najvyššie vyextrahované koncentrácie lipofilných metabolitov (ergosterol, ubiquinon a celkové karotenoidy) boli dosiahnuté v prípade extrakcie podľa Folcha. Získané výsledky odpovedajú predpokladu, vzhľadom na to, že sa jedná o extrakciu vhodnú práve pre látky nepolárneho charakteru. Z hľadiska koncentrácie jednotlivých metabolitov v pripravených GRAS extraktoch boli najvyššie koncentrácie ergosterolu dosiahnuté v ethanolových extraktoch oboch kvasiniek. Ergosterol je súčasťou bunkových membrán húb a kvasiniek a plní rovnakú funkciu ako cholesterol v ľudských a zvieracích bunkových membránach. Zároveň predstavuje provitamín D₂, nakoľko po jeho ožiarení UV žiarením vzniká vitamín D₂ (ergokalciferol). Najvyššia koncentrácia bola stanovená v extrakte kvasinky *R. kratochvilovae* (4,470 mg/g), pričom táto koncentrácia odpovedala približne 75 % koncentrácie v extrakte podľa Folcha. V extrakte kvasinky *R. toruloides* bola najvyššia koncentrácia ergosterolu stanovená na podobnú hodnotu (4,313 mg/g). Najnižšie koncentrácie ergosterolu boli zistené v hexánových extraktoch oboch kvasiniek. Rovnaký trend bol pozorovaný aj pri obsahu ubiquinonu v extraktoch. Ubichinon (koenzým Q₁₀) je súčasťou mitochondriálneho dýchacieho reťazca a zároveň je antioxidantom chrániacim mitochondrie a lipidové membrány pred oxidačným poškodením. Najvyššia koncentrácia bola stanovená v ethanolovom extrakte kvasinky *R. kratochvilovae* (4,056 mg/g), čo predstavovalo takmer 74 % ubiquinonu v extrakte podľa Folcha. Najvyššie koncentrácie celkových karotenoidov boli stanovené v extraktoch podľa Folcha, pričom z pripravených GRAS extraktov obsahovali vyššie zastúpenie celkových karotenoidov extrakty pripravené z kvasinky *R. toruloides*, ktoré boli aj výrazne viac zafarbené v porovnaní s extraktami kvasinky *R. kratochvilovae* (vid' Obrázok 22). Celkové karotenoidy boli vo vyššej miere zastúpené v ethanolových extraktoch, pričom pri kvasinke *R. toruloides* obsahoval extrakt 4,283 mg/g celkových karotenoidov (takmer 71 % karotenoidov vyextrahovaných podľa Folcha). Aj v prípade celkových karotenoidov boli najnižšie koncentrácie stanovené v hexánových extraktoch a to aj napriek tomu, že hexán ako nepolárne rozpúšťadlo by mal byť vhodným extrakčným činidlom pre nepolárne látky. Nízke výťažnosti však mohli byť spôsobené prítomnosťou vody v biomase po jej rehydratácii, čo mohlo vzhľadom na nemiesiteľnosť vody a hexánu ovplyvniť účinnosť extrakcie karotenoidov do hexánu.



Obrázok 22: Vzhľad pripravených extraktov z kvasiniek pred analýzou na HPLC, 21 - *R. toruloides* (96 % ethanol), 22 - *R. toruloides* (hexán:ethanol 1:1), 25 - *R. toruloides* (hexán), 26 - *R. kratochvilovae* (96 % ethanol), 27 - *R. kratochvilovae* (hexán:ethanol 1:1), 30 - *R. kratochvilovae* (hexán).

Zároveň boli zistené výrazné rozdiely medzi karotenoidmi detegovanými v extraktoch spektrofotometricky a pomocou HPLC. Výrazne nižšie koncentrácie stanovené spektrofotometricky mohli byť spôsobené nižšou presnosťou spektrofotometrického stanovenia, ktoré na stanovenie karotenoidov využíva ako štandard len β -karotén a jeho absorpčné maximum pri 454 nm. Z tohto dôvodu je pravdepodobné, že spektrofotometricky bola detegovaná najmä koncentrácia β -karoténu, keďže rôzne karotenoidy majú absorpčné maximá pri rozdielnych vlnových dĺžkach. Pri porovnaní koncentrácií karotenoidov stanovených spektrofotometricky a koncentracii β -karoténu pomocou HPLC sú stanovené hodnoty približne podobné. Najvyššie koncentrácie β -karoténu (viď Obrázok 21) boli stanovené v ethanolových extraktoch oboch kvasiniek a predstavovali veľmi podobné hodnoty, t.j. 0,142 mg/g (RT) a 0,141 mg/g (RK). Spomedzi jednotlivých karotenoidov vykazovali vo všetkých extraktoch najmenšie zastúpenie torulén spolu s β -karoténom. Vyššie zastúpenie mal lykopen, najmä v ethanolových extraktoch pre obe kvasinky. Vo všetkých extraktoch *R. toruloides* bol najviac zastúpeným karotenoidom torularodín (v ethanolovom extrakte 2,527 mg/g). V extraktoch kvasinky *R. kratochvilovae* bol najviac zastúpeným karotenoidom lykopen (v ethanolovom extrakte 1,533 mg/g).

5.3.6 Stanovenie mastných kyselín pomocou GC/FID

Zastúpenie celkových lipidov spolu s jednotlivými typmi MK bolo stanovené podľa postupu uvedeného v kapitole 4.16.9. Analýze na GC bola podrobená biomasa oboch kvasiniek a pripravené hexánové a hexán:ethanolové (1:1) extrakty. Získané výsledky boli spracované do nižšie uvedenej tabuľky (Tabuľka 24) a grafu zobrazujúcich podiel lipidov vo vzorke spolu so zastúpením jednotlivých typov MK.

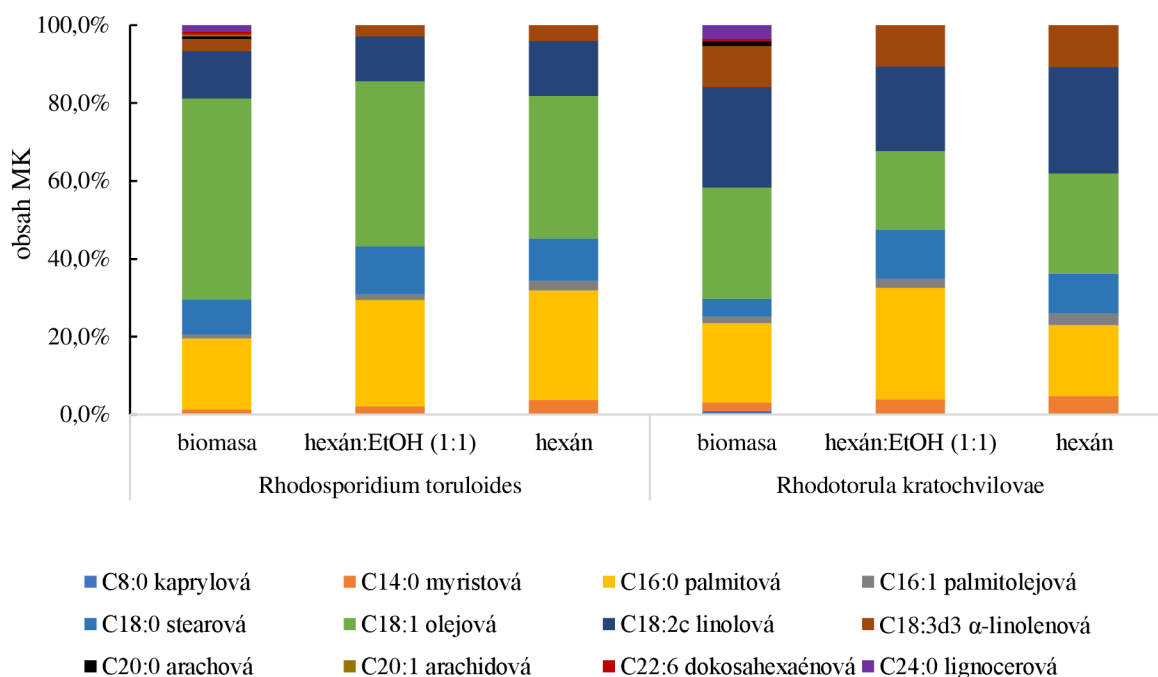
Tabuľka 24: Zastúpenie lipidov a jednotlivých typov MK v biomase a extraktoch kvasiniek

vzorka		lipidy [%]	zastúpenie typov MK [%]		
			SFA	MUFA	PUFA
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	biomasa	11,92	30,93	53,17	15,90
	hexán:EtOH (1:1)	54,11	41,73	43,83	14,44
	hexán	67,03	42,80	39,02	18,19
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	biomasa	8,09	32,68	30,16	37,16
	hexán:EtOH (1:1)	52,97	45,19	22,60	32,21
	hexán	57,82	33,05	28,96	37,99

Oba analyzované kmene kvasiniek patria medzi tzv. oleogénne kvasinky a v závislosti na podmienkach kultivácie dokážu akumulovať v biomase významné množstvá lipidov. Pri porovnaní oboch kmeňov kvasiniek bolo vyššie zastúpenie lipidov stanovené v biomase aj extraktoch kvasinky *Rhodosporidium toruloides*. Analyzované extrakty obsahovali vyššie koncentrácie lipidov nakoľko boli pripravené s použitím nepolárneho rozpúšťadla hexánu a boli cieľené na extrakciu práve lipofilných látok. Preto v nich bol vyšší obsah lipidov predpokladaný. Samotná biomasa obsahuje okrem lipidov viacero typov bioaktívnych látok, napr. polysacharidy alebo proteíny, ktoré do hexánových extraktov neprechádzajú a z tohto

dôvodu bolo v biomase nižšie zastúpenie lipidov. Najvyššia koncentrácia lipidov bola stanovená v hexánovom extrakte kvasinky *Rhodospiridium toruloides* (67,03 %), pričom v rovnakom type extraktu bolo zistené najvyššie zastúpenie lipidov aj u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*.

Z hľadiska prítomnosti násobných väzieb prevládali u kvasinky *Rhodospiridium toruloides* MUFA, ktoré zároveň predstavovali väčšinu MK aj v hexán-ethanolovom extrakte. Pri použití hexánu ako extrakčného činidla došlo ku navýšeniu obsahu SFA. Spomedzi jednotlivých MK bola v biomase tejto kvasinky stanovená najvyššia koncentrácia kyseliny olejovej (51,66 %) patriacej medzi MUFA. Výrazné zastúpenie mala aj kyselina palmitová (SFA), ktorej koncentrácie v extraktoch boli vyššie než v samotnej biomase. Spomedzi PUFA bola aj v biomase aj v extraktoch najviac zastúpená kyselina linolová. V biomase *R. toruloides* boli detegované aj nízke zastúpenia DHA (0,60 %) a ARA (0,46 %), avšak v extraktoch už ich prítomnosť zistená nebola. Pri kvasinke *R. kratochvilovae* prevládali v biomase aj v hexánovom extrakte PUFA, v hexán:ethanolovom extrakte tvorili väčšinu MK SFA. Celkovo táto kvasinka obsahovala rovnomernejšie zastúpenie prevládajúcich MK. V biomase a hexánovom extrakte mala najväčšie zastúpenie kyselina olejová (MUFA), v hexán:ethanolom extrakte to bola kyselina palmitová (SFA). Najzastúpenejšou PUFA bola kyselina linolová. Aj u tejto kvasinky bol pozorovaný výskyt DHA v biomase, avšak ani v týchto extraktoch jej prítomnosť už nebola zistená.



Obrázok 23: Graf zastúpenia jednotlivých MK v biomase a extraktoch

5.3.7 Stanovenie glukánov

Obsah glukánov bol stanovovaný v biomase kvasiniek podľa postupu uvedeného v kapitole 4.18. Na stanovenie bol využitý komerčne dostupný enzymatický kit od spoločnosti Megazyme. Stanovenie glukánov prebiehalo v dvoch krokoch, pričom najprv bol stanovený

obsah celkových glukánov a následne obsah α -glukánov. Rozdielom koncentrácií celkových a α -glukánov bol zistený obsah β -glukánov. Výsledné stanovené koncentrácie celkových aj jednotlivých glukánov boli vyjadrené v g na 100 g biomasy a sú zhrnuté v nižšie uvedenej tabuľke (Tabuľka 25).

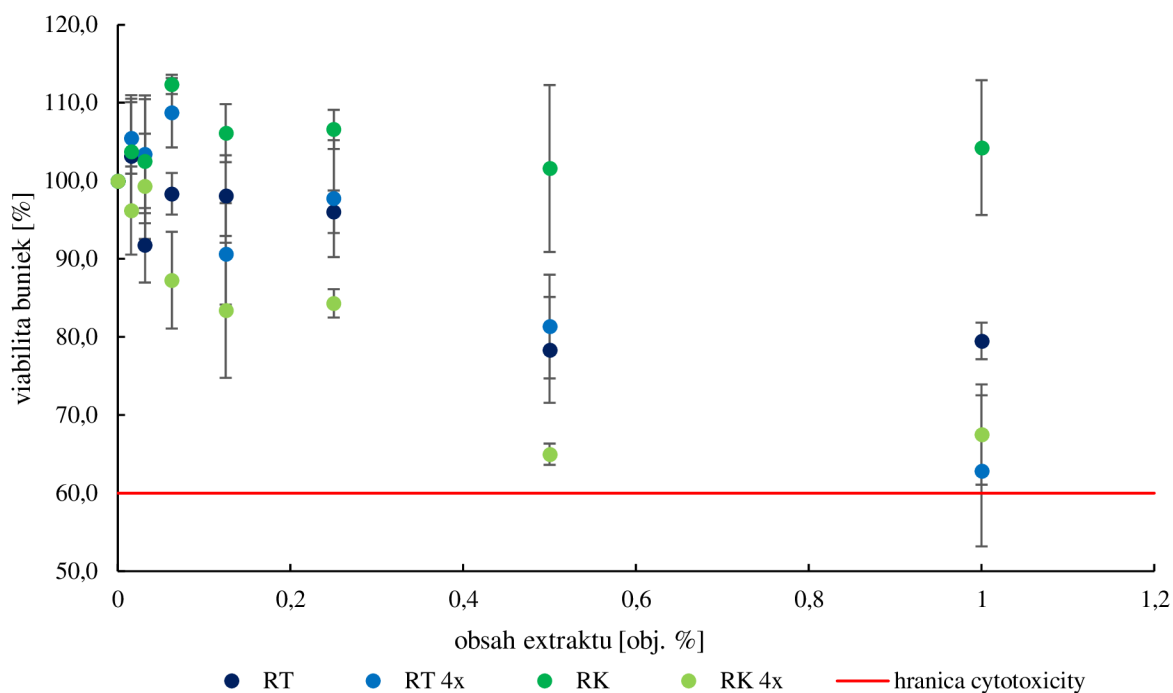
Tabuľka 25: Koncentrácie glukánov stanovené v analyzovaných kvasinkách

vzorka	typ glukánov	$c_{\text{glukány}}$ [g/100 g]
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	celkové glukány	20,942 \pm 0,261
	α -glukány	4,490 \pm 0,164
	β -glukány	16,452 \pm 0,096
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	celkové glukány	10,211 \pm 0,403
	α -glukány	0,785 \pm 0,009
	β -glukány	9,426 \pm 0,412

Zo získaných výsledkov je možné konštatovať, že obsah glukánov sa v analyzovaných kvasinkách pomerne líšil. Z vyššie uvedených výsledkov vyplýva, že stanovený obsah celkových glukánov bol u kvasinky *Rhodosporidium toruloides* (20,942 \pm 0,261 g/100 g) približne dvakrát vyšší než u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* (10,211 \pm 0,403 g/100 g). Rozdielne zastúpenie stanovených glukánov v analyzovaných kvasinkách mohlo byť spôsobené celkovo nižšou syntézou glukánov kvasinkou *R. kratochvilovae* alebo prípadne rozdielom v pevnosti bunkovej steny, ktorý mohol spôsobiť náročnejšiu extrakciu glukánov z tejto kvasinky a viedol k nižšej stanovenej koncentrácii glukánov. Z hľadiska jednotlivých glukánov bol pri oboch kvasinkách pozorovaný vyšší obsah β -glukánov než α -glukánov. V prípade kvasinky *R. toruloides* tvorili α -glukány približne 21 % celkových glukánov, zatiaľ čo β -glukány viac než 78 %. Výraznejší rozdiel v zastúpení jednotlivých glukánov bol pozorovaný u kvasinky *R. kratochvilovae*, u ktorej bolo zastúpenie α -glukánov približne 8 % a β -glukány tvorili až 92 % celkových glukánov. V porovnaní s analyzovanými vzorkami múk a mikrorias obsahovali kvasinky výrazne vyššie zastúpenie β -glukánov.

5.3.8 MTT test cytotoxicity

Stanovenie cytotoxicity pomocou MTT testu bolo uskutočnené podľa postupu uvedeného v kapitole 4.19, pričom pre testovanie boli vybrané ethanolové (96 %) extrakty kvasiniek *Rhodosporidium toruloides* (v grafe označená ako „RT“) a *Rhodotorula kratochvilovae* (v grafe označená ako „RK“). Extrakty boli testované v nezakoncentrovanej a štyrikrát zakoncentrovanej podobe na bunkovej línii CaCo-2 (pasáž 58). Výsledky testov cytotoxicity sú zobrazené v nasledujúcom grafe (Obrázok 24) spolu s hranicou 60 % viability buniek, ktorá predstavuje hranicu cytotoxicity.



Obrázok 24: Závislosť viability buniek CaCo-2 na koncentrácii extraktov kvasiniek

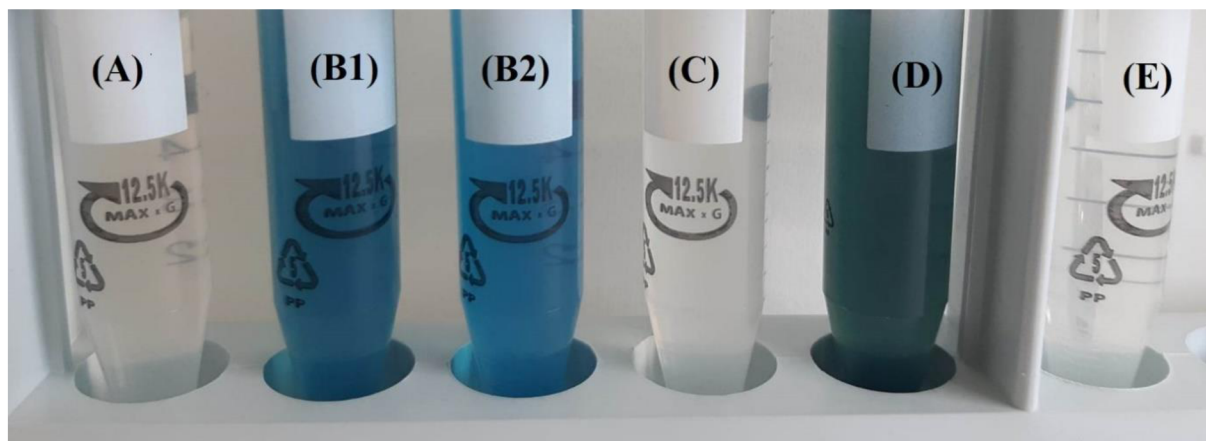
Z vyššie uvedeného grafu vyplýva, že viabilita buniek sa pomerne líšila v závislosti na type testovaného extraktu. Vzhľadom na prítomnosť ethanolu v extrakte, ktorý by potenciálne mohol negatívne ovplyvniť bunky, boli testované nižšie koncentrácie týchto extraktov v porovnaní s vodnými extraktami *Spirulina* a *Chlorella*. Zo získaných dát zobrazených vo vyššie uvedenom grafe sa ako najmenej cytotoxický javí nezakonzentrovaný extrakt kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*. V prípade tohto extraktu bola viabilita kultúry pre všetky testované koncentrácie extraktu vyššia než 100,0 %, z čoho vyplýva, že v extrakte sa nachádzali látky, ktoré na bunky pôsobili priaznivým vplyvom a napomáhali ich rastu. Pri testovaní štyrikrát zakonzentrovaného extraktu bol zistený výrazný vplyv tohto extraktu na viabilitu buniek, ktorá bola v tomto prípade najnižšia spomedzi všetkých testovaných extraktov. So stúpajúcou koncentráciou testovaného extraktu výrazne klesala viabilita buniek, avšak aj pri najvyššej testovanej koncentrácii extraktu (1,0 obj. %) bola stanovená na 67,5 %, čo je stále vyššia hodnota než je hranica cytotoxicity. V prípade testovania extraktu kvasinky *Rhodospiridium toruloides* v jeho nezakonzentrovanej podobe klesla viabilita kultúry pod 90,0 % pri koncentrácii extraktu vyššej než 0,25 obj. %. Pri najvyššej testovanej koncentrácii viabilita buniek klesla na hodnotu 79,5 %, ktorá nie je považovaná za cytotoxickú. Zakonzentrovaná podoba tohto extraktu vykazovala pri koncentráciách nižších než 0,125 obj. % viabilitu vyššiu než 100,0 % a na bunky teda pôsobila priaznivejšie než nezakonzentrovaný extrakt, čo pravdepodobne súviselo s vyšším obsahom aktívnych látok. Pri vyšších testovaných koncentráciách viabilita buniek dosahovala podobné hodnoty ako nezakonzentrovaný extrakt, avšak pri najvyššej testovanej koncentrácii extraktu bola zaznamenaná najnižšia viabilita buniek (62,8 %) spomedzi všetkých testovaných extraktov. Zo získaných výsledkov vyplýva, že za podmienok testovania nevykazoval ani jeden z extraktov cytotoxické účinky voči použitým bunkám.

5.4 Charakterizácia pripravených obohatených cereálnych produktov

V závere experimentálnej časti diplomovej práci boli na základe výsledkov zhrnutých v predchádzajúcich kapitolách pripravené cereálne produkty obohatené o vybrané extrakty a biomasu mikrorias a kvasiniek. Na prípravu produktov boli vybrané nasledovné zložky, kukuričná múka, biomasa *Spirulina*, ethanolový extrakt kvasinky *Rhodospiridium toruloides* a vodný extrakt sinice *Spirulina*. Pripravené cereálne produkty boli ďalej charakterizované, pričom bol stanovený obsah celkových fenolických látok a vo vode rozpustných proteínov. Biologické účinky boli stanovené zmeraním antioxidačnej aktivity pripravených produktov.

5.4.1 Charakterizácia pripravených obohatených cereálnych zmesí

Cereálne zmesi boli pripravené z kukuričnej múky a boli obohacované prídavkom jednotlivých zložiek (biomasa *Spirulina* a extrakty zo *Spirulina* a *Rhodospiridium toruloides*) a zároveň aj kombináciou biomasy zo *Spirulina* a extraktu z *R. toruloides*. Postup prípravy a zloženie jednotlivých zmesí sú uvedené v kapitole 4.20.1. Pripravené zmesi boli ponechané extrahovať a získané vodné extrakty (viď Obrázok 25) boli ďalej analyzované.



Obrázok 25: Vzhľad pripravených vodných extraktov cereálnych zmesí

Vyššie uvedený obrázok (Obrázok 25) zobrazuje vzhľad pripravených vodných extraktov obohatených cereálnych zmesí. Kontrolná vzorka (A) bola bezfarebná rovnako ako vzorky (C) (E), ku ktorým boli pridávané samostatne extrakty. V prípade prídavku biomasy (B1), (B2), resp. biomasy a extraktu kvasinky (D), došlo ku zmene zafarbenia pripraveného extraktu z dôvodu prítomných pigmentov v biomase *Spirulina*. Vzorky s prídavkom čistej biomasy *Spirulina* (B1) a (B2) vykazovali rôzne intenzívne modré sfarbenie, pričom vzorka (D) bola sfarbená do modrozelenej farby. Zmena zafarbenia mohla byť v tomto prípade spôsobená prídáním ethanolového extraktu kvasinky.

5.4.1.1 Vyhodnotenie analýz obohatených cereálnych zmesí

Pripravené vodné extrakty cereálnych zmesí boli podrobené ďalším analýzám, pričom bol sledovaný vplyv prídavku vybraných obohacujúcich látok na obsah polyfenolov, antioxidantov a proteínov vo vzorkách. Získané výsledky pre jednotlivé testované parametre sú zhrnuté v nižšie uvedenej tabuľke (Tabuľka 26).

Tabuľka 26: Stanovené koncentrácie vybraných aktívnych látok v analyzovaných vzorkách

vzorka	$c_{\text{polyfenoly}}$ [mg GAE/g]	$c_{\text{antioxidanty}}$ [mg TE/g]	$c_{\text{proteíny}}$ [mg/g]
A	$0,62 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,06$	$7,71 \pm 0,57$
B1	$1,03 \pm 0,05$	$1,47 \pm 0,04$	$20,57 \pm 0,35$
B2	$1,18 \pm 0,02$	$1,52 \pm 0,08$	$23,89 \pm 0,48$
C	$0,68 \pm 0,03$	$0,68 \pm 0,04$	$9,20 \pm 0,13$
D	$1,17 \pm 0,03$	$1,51 \pm 0,01$	$21,39 \pm 0,78$
E	$0,73 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,01$	$9,04 \pm 0,27$

(A) - kontrolná vzorka, (B) - 5% prídavok biomasy *Spirulina*, (B2) - 10% prídavok biomasy *Spirulina*, (C) - prídavok extraktu z *R. toruloides*, (D) - prídavok biomasy *Spirulina* (5%) a extraktu *R. toruloides*, (E) – prídavok extraktu zo *Spirulina*

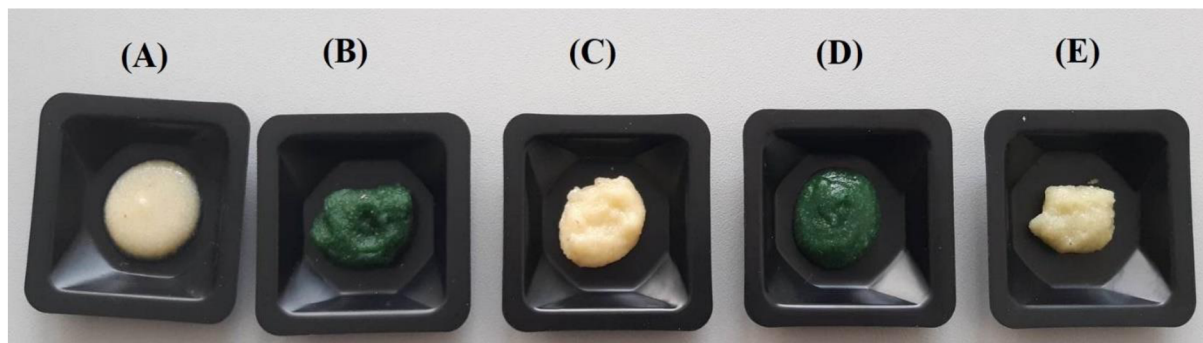
Z vyššie uvedenej tabuľky (viď Tabuľka 26) vyplýva, že vo všetkých obohatených cereálnych zmesiach došlo pri všetkých sledovaných biologicky aktívnych látkach k zvýšeniu ich koncentrácie, avšak v rôznej miere. V prípade stanovenia celkových fenolických látok sa nárast ich koncentrácií v obohatených cereálnych zmesiach pohyboval v rozmedzí 9,68–90,32 %. K najmenšiemu navýšeniu došlo pri vzorke (C) s prídavkom extraktu kvasinky *Rhodospiridium toruloides*, pričom aj v tomto extrakte bolo spomedzi všetkých prídávaných obohacujúcich látok stanovené najnižšie množstvo fenolických látok. Najvýraznejší nárast koncentrácie celkových fenolických látok bol zaznamenaný vo vzorke (B2), ktorá obsahovala 10 % biomasy *Spirulina* ($1,18 \pm 0,02$ mg GAE/g). Pri porovnaní zmesi s 5 %, 10 % *Spirulina* a kombináciou kvasinkového extraktu a biomasy *Spirulina* boli koncentrácie celkových fenolických látok podobné.

Pri stanovení antioxidačnej aktivity obohatených cereálnych zmesí sa jej nárast pohyboval v rozmedzí 18,33–30,00 % pri prídavku samostatných extraktov a v rozmedzí 150,00–158,33 % pri pridaní biomasy *Spirulina*, resp. pri kombinácii biomasy *Spirulina* a extraktu kvasinky *R. toruloides*. Najnižší nárast bol podobne ako pri stanovení celkových fenolických látok zistený v zmesi s obsahom kvasinkového extraktu. Po prídavku biomasy do zmesi sa antioxidačná aktivita výrazne zvýšila, pričom pri 10 % zastúpení biomasy v zmesi bola viac než trikrát vyššia ($1,52 \pm 0,08$ mg TE/g) v porovnaní s kontrolnou vzorkou (A). Rozdiely v cereálnych zmesiach s prídavkom biomasy *Spirulina* boli veľmi malé (do 9,00 %), z čoho vyplýva, že *Spirulina* je veľmi dobrým zdrojom antioxidantov.

Pri stanovení vo vode rozpustných proteínov v analyzovaných obohatených vzorkách bolo zistené najvýraznejšie navýšenie ich koncentrácie spomedzi všetkých sledovaných biologicky aktívnych látok. Po prídavku extraktov sa koncentrácie zvýšili len mierne pre obe vzorky (do 20,00 %), pričom pri prídavku biomasy *Spirulina* bolo zvýšenie výraznejšie a pohybovalo sa v rozmedzí 166,80–209,86 %. Zistené výsledky potvrdzujú, že *Spirulina* je veľmi dobrým zdrojom proteínov. Je tak možné konštatovať, že z hľadiska obohatenia o proteíny, rovnako ako pri fenolických látkach a antioxidantoch, bola pre obohatenie produktov vhodnejšia biomasa než pripravené extrakty. Najvyššia koncentrácia proteínov bola stanovená vo vzorke s 10 % zastúpením biomasy *Spirulina*, konkrétne ($1,52 \pm 0,08$ mg/g).

5.4.2 Charakterizácia pripravených obohatených cereálnych kaší

V rámci diplomovej práce bolo podľa postupu uvedeného v kapitole 4.20.2 pripravených päť vzoriek cereálnych kaší. Jednalo sa o jednu kontrolnú vzorku (A) bez akéhokoľvek prídavku a štyri vzorky cereálnych kaší obohatené biomasou alebo extraktami z kvasiniek a mikrorias, pričom zloženie jednotlivých vzoriek je uvedené v Tabuľka 15. Na základe dostupných článkov bola pre prípravu cereálnej kaše s prídavkom biomasy *Spirulina* vybraná koncentrácia 5 % *Spirulina*, nakoľko sa jednalo o hodnotiteľmi najlepšie hodnotené zastúpenie *Spirulina*. Na nižšie uvedenom obrázku (viď Obrázok 26) je zobrazený vzhľad pripravených vzoriek obohatených cereálnych kaší.

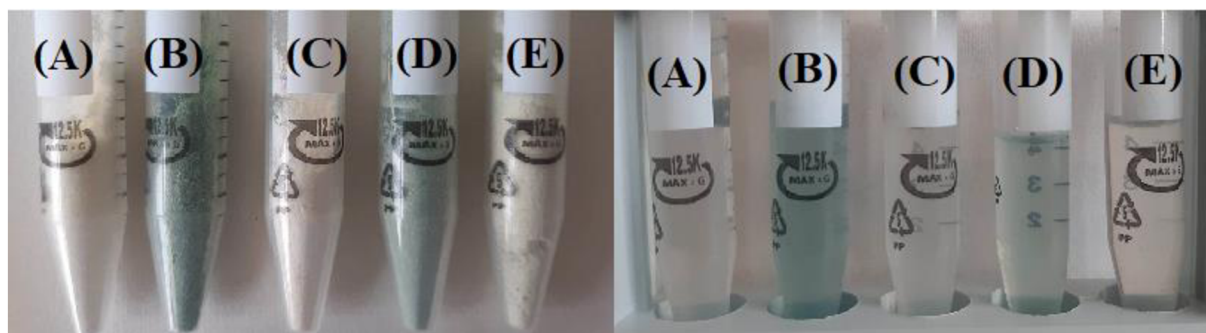


Obrázok 26: Vzhľad pripravených cereálnych kaší; (A) – kontrolná vzorka, (B) – kaša s biomasou sinice *Spirulina*, (C) – kaša s extraktom z kvasinky *Rhodosporidium toruloides*, (D) – kaša s biomasou sinice *Spirulina* a extraktom z kvasinky *Rhodosporidium toruloides* a (E) – kaša s extraktom zo sinice *Spirulina*

Ako je vidieť na vyššie uvedenom obrázku (Obrázok 26) cereálna kaša pripravená zo samotnej kukuričnej múky bez akéhokoľvek prídavku (kontrolná vzorka A) vykazovala najredšiu konzistenciu a so svojim slabožltým sfarbením bola najsvetlejšou vzorkou. Kaša si zachovala vôňu kukuričnej múky. V prípade prídavku biomasy *Spirulina* došlo ku zmene zafarbenia a kaše boli sfarbené do tmavozelenej farby. V prípade vzorky (B), ku ktorej bolo pridaných 5 % biomasy *Spirulina*, bola sledovaná najhustejšia konzistencia pripravenej kaše. Kaša (D) s prídavkom biomasy *Spirulina* a extraktu kvasinky vykazovala mierne redšiu konzistenciu ako kaša (B) a menej intenzívne zelené sfarbenie. V prípade kaše (C) spôsobil prídavok extraktu kvasinky *Rhodosporidium toruloides* zvýšenie hustoty kaše a farba bola mierne oranžovejšia než pri kontrolnej vzorke. Posledná kaša pripravená s prídavkom extraktu sinice *Spirulina* (E) mala podobnú konzistenciu ako vzorka (C) a vykazovala mierne zelenkavé sfarbenie.

5.4.2.1 Analýzy pripravených obohatených cereálnych kaší

Pripravené kaše boli po zamrazení zlyofilizované a boli z nich pripravené vodné extrakty podľa postupu uvedeného v kapitole 4.21. Vzhľad zlyofilizovaných kaší spolu s pripravenými vodnými extraktmi je zobrazený na nižšie uvedenom obrázku (Obrázok 27). V pripravených vodných extraktoch boli stanovené koncentrácie celkových fenolických látok, vo vode rozpustných proteínov a antioxidačná aktivita pomocou spektrofotometrických stanovení. Získané výsledky sú zhrnuté v nižšie uvedenej súhrnnej tabuľke (Tabuľka 1 Tabuľka 27).



Obrázok 27: Vzhľad lyofilizovaných kaší a z nich pripravených vodných extraktov

Tabuľka 27: Stanovené koncentrácie aktívnych látok v vodných extraktoch cereálnych kaší

vzorka	$C_{\text{polyfenoly}}$ [mg GAE/g]	$C_{\text{antioxidanty}}$ [mg TE/g]	$C_{\text{proteíny}}$ [mg/g]
A	$0,51 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,09$	$25,92 \pm 0,55$
B	$0,89 \pm 0,03$	$0,78 \pm 0,04$	$31,86 \pm 0,21$
C	$0,58 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,07$	$26,49 \pm 0,21$
D	$0,89 \pm 0,02$	$0,86 \pm 0,06$	$33,64 \pm 0,48$
E	$0,65 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,06$	$27,57 \pm 0,44$

(A) – kontrolná vzorka, (B) – kaša s biomasou sinice *Spirulina*, (C) – kaša s extraktom z kvasinky *Rhodospiridium toruloides*, (D) – kaša s biomasou sinice *Spirulina* a extraktom z kvasinky *Rhodospiridium toruloides* a (E) – kaša s extraktom zo sinice *Spirulina*

Ako je možné vidieť na vyššie uvedenom obrázku (Obrázok 27), lyofilizované kaše mali v porovnaní s čerstvo pripravenými kašami svetlejšie zafarbenie, ktorému odpovedali aj farby pripravených vodných extraktov. Pri stanovení jednotlivých biologicky aktívnych látok v analyzovaných vzorkách vyplýva z Tabuľka 27, že vo všetkých analyzovaných vzorkách došlo ku navýšeniu koncentrácie biologicky aktívnych látok.

Pri stanovení celkových fenolických látok bola vo všetkých analyzovaných vzorkách stanovená vyššia koncentrácia než v kontrolnej vzorke. Zvýšenie sa pre jednotlivé vzorky pohybovalo v rozmedzí 13,73–74,51 %. Najmenej sa zmenila koncentrácia celkových fenolických látok vo vzorke (C), ktorá obsahovala prídavok extraktu kvasinky *Rhodospiridium toruloides*, pričom tento extrakt obsahoval spomedzi všetkých pridávaných látok najnižšiu koncentráciu celkových fenolických látok. Najvyššia koncentrácia celkových fenolických látok ($0,89 \pm 0,01$ mg GAE/g) bola zistená vo vzorkách (B) a (D), ktoré obsahovali prídavok biomasy *Spirulina*, resp. biomasy *Spirulina* a extraktu *R. toruloides*. V tomto prípade je možné navýšenie koncentrácie fenolických látok pripísať najmä prídavku biomasy *Spirulina*, ktorá predstavuje dobrý zdroj fenolických látok. Pri prídavku vodného extraktu *Spirulina* sa v porovnaní s kašou s obsahom kvasinky koncentrácia fenolických látok zvýšila, avšak zároveň bola nižšia než pri prídavku celej biomasy. To mohlo byť spôsobené tým, že do vodných extraktov sa pravdepodobne nepodarilo vyextrahovať fenolické látky v takej miere ako boli obsiahnuté v biomase.

Trend zvýšenia koncentrácie aktívnych látok v obohatených produktoch bol sledovaný aj v prípade stanovenia antioxidačnej aktivity jednotlivých vzoriek. Všetky pripravené vzorky vykazovali výrazne vyššiu antioxidačnú aktivitu než kontrolná vzorka. Najvyššia antioxidačná aktivita bola stanovená v kaši s prídavkom biomasy *Spirulina* a extraktu *R. toruloides*, pričom v porovnaní s kontrolnou vzorkou bola viac než trikrát vyššia. Stanovené hodnoty antioxidačnej aktivity však nemusia byť úplne presné, keďže počas jej stanovenia došlo po pridaní extraktu ku roztoku ABTS^{•+} ku vytvoreniu zákalu a tvorbe zrazenín. Vzhľadom na prítomnosť 96 % ethanolu, ktorým bol riedený roztok ABTS^{•+} na požadovanú absorbanciu je pravdepodobné, že došlo ku vyzrážaniu bielkovín prítomných v extraktoch. Vzniknutý zákal a zrazeniny znemožnili meranie absorbancie, nakoľko tento typ analýzy vyžaduje číre roztoky bez zákalu, ktorý ovplyvňuje absorbanciu. Vzhľadom na to bola antioxidačná aktivita stanovovaná upraveným postupom, kedy boli tesne pred zmeraním poklesu absorbancie v 10. minúte vzorky scentrifugované (60 s, 14500 rpm) a absorbancia bola meraná v získanom supernatante. Počas stanovenia bolo pracované s ohľadom na elimináciu vystavenia vzorku svetlu, avšak je možné, že pri prenose vzoriek do centrifúgy boli vzorky vystavené väčšiemu množstvu svetla než pri zachovaní klasického postupu, čo mohlo ovplyvniť, resp. navýšiť výsledné hodnoty antioxidačnej aktivity.

Pri stanovení obsahu vo vode rozpustných bielkovín bol pri všetkých vzorkách pozorovaný nárast ich koncentrácie, pričom zvýšenie sa pohybovalo v rozmedzí 2,20–29,78 %. Spomedzi analyzovaných biologicky aktívnych látok tak došlo v prípade bielkovín k najmenšiemu nárastu po pridaní obohacujúcich látok. Najmenší nárast koncentrácie bielkovín bol zistený vo vzorke (C), v ktorej bol pridaný len extrakt z kvasinky (26,49±0,21 mg/g). Najvyššia koncentrácia vo vode rozpustných proteínov bola stanovená vo vzorke (D), 33,64±0,48 mg/g, ktorá obsahovala prídavok biomasy *Spirulina* a extraktu kvasinky *R. toruloides*. Vzhľadom na nízke navýšenie koncentrácie bielkovín v prípade prídavku samotného extraktu kvasinky je možné pripísať výrazné zvýšenie koncentrácie bielkovín vo vzorke prítomnosti biomasy *Spirulina*, keďže aj vzorka kaše len s prídavkom biomasy *Spirulina* vykazovala pomerne vysokú koncentráciu bielkovín (31,86±0,21 mg/g).

6 ZÁVER

Predložená diplomová práca bola zameraná na vývoj cereálnych produktov obohatených o extrakty rias a kvasiniek určených pre zvláštnu výživu, konkrétne pre bezlepkovú diétu. V rámci práce boli analyzované hlavné nutričné a biologicky aktívne zložky vybraných komerčne dostupných cereálií. Súčasne boli pripravené extrakty vybraných kmeňov kvasiniek, mikrorias a siníc, ktoré boli charakterizované na obsah biologicky aktívnych látok. Na základe vykonaných analýz a získaných výsledkov boli vybrané najzaujímavejšie vzorky cereálií a extraktov, ktoré boli v závere práce použité na prípravu obohatených cereálnych produktov.

V experimentálnej časti práce boli analyzované vybrané najbežnejšie používané múky bez obsahu lepku, t.j. múka s označením bezlepková, kukuričná múka a ryžová múka. V analyzovaných vzorkách bol stanovený obsah celkových sacharidov metódou podľa Duboisa po kyslej hydrolýze vzoriek umožňujúcej rozklad najviac zastúpených sacharidov v cereáliách, polysacharidov. Najvyššia koncentrácia celkových sacharidov bola zistená v ryžovej múke ($78,14 \pm 2,68$ g/100 g) a najnižšia v kukuričnej múke ($66,14 \pm 1,12$ g/100 g). Ďalšími analyzovanými nutričnými zložkami boli lipidy, pričom najvyšší obsah lipidov bol analýzou na GC/FID zistený v kukuričnej múke ($2,18$ g/100 g), ktorá mala zároveň najvyššie zastúpenie PUFA (56,05 %) spomedzi analyzovaných múk. Pri analýze proteínov bola využívaná spektrofotometrická metóda podľa Hartree-Lowryho, ktorá však umožnila stanovenie len proteínov rozpustných vo vode. Ich najvyššia koncentrácia bola stanovená v múke s označením bezlepková. V rámci analýzy bioaktívnych zložiek bol spektrofotometricky stanovený obsah celkových fenolických látok a flavonoidov, antioxidačná aktivita bola stanovená metódou TEAC a obsah β -glukánov enzymatickým kitom. Najvyššia koncentrácia celkových fenolických látok ($0,69 \pm 0,02$ mg GAE/g), flavonoidov ($0,26 \pm 0,01$ mg/g) a antioxidantov ($0,56 \pm 0,03$ mg/g) bola zistená v kukuričnej múke. Najvyššie zastúpenie cereálnych β -glukánov bolo vo vzorke ryžovej múky ($0,104 \pm 0,004$ g/100 g). Pri analýze obsahu lepku, bolo zistené, že všetky analyzované vzorky múky obsahovali nižšiu koncentráciu lepku než 20 mg/kg a spĺňali požiadavky pre označenie bezlepkových potravín.

Ďalšou časťou experimentálnej časti bola príprava extraktov z vybraných mikroorganizmov. V rámci práce boli kultivované vybrané kmene kvasiniek, t.j. *Rhodospiridium toruloides* a *Rhodotorula kratochvilovae* vo fermentore a biomasa mikroriasy *Chlorella* a sinice *Spirulina* bola získaná komerčne. Extrakty boli pripravené použitím rozpúšťadiel so statusom GRAS, konkrétne vody, hexánu, ethanolu a ich rôznych kombinácií. V extraktoch biomasy *Chlorella* a *Spirulina* bol spektrofotometricky stanovovaný obsah fenolických látok, chlorofylov, karotenoidov, antioxidantov a vybrané extrakty boli podrobené aj analýze mastných kyselín na GC/FID, pigmentov na HPLC/PDA a vitamínov rozpustných vo vode (HPLC). Z analyzovaných extraktov obsahoval najviac fenolických látok, antioxidantov a proteínov vodný extrakt sinice *Spirulina*, ktorý zároveň obsahoval po ethanolových extraktoch (96 %) druhé najvyššie koncentrácie jednotlivých aj celkových chlorofylov. Jediným vo vode rozpustným vitamínom detegovaným vo vodných extraktoch bol vitamín C, ktorý bol vo väčšom množstve stanovený práve vo vodnom extrakte *Spirulina*. Analýza extraktov na HPLC umožnila presnejšie stanovenie jednotlivých pigmentov a potvrdila najvyšší obsah chlorofylov v ethanolovom extrakte *Spirulina*. Zároveň bola vo všetkých extraktoch zistená aj prítomnosť

karotenoidov, pričom spektrofotometricky boli karotenoidy stanovené len v hexánových extraktoch. To mohlo byť spôsobené nižšou presnosťou spektrofotometrického stanovenia. Analýzou biomasy, hexánových a hexán-ethanolových extraktov na GC/FID bol zistený obsah lipidov vo vzorkách, pričom vyššie zastúpenie lipidov bolo stanovené v biomase a extraktoch *Chlorella*. Najviac zastúpenými boli vo všetkých extraktoch aj v oboch typov biomasy SFA. Výnimkou bola len biomasa *Chlorella*, v ktorej výrazne prevládali PUFA (52,10 %). Pri analýze β -glukánov v biomase bola ich vyššia koncentrácia zistená u *Chlorella* (0,093 g/100 g), avšak stále je to relatívne nízka koncentrácia a vybrané druhy mikrorias preto nepredstavujú dobrý zdroj β -glukánov.

Vybrané kmene kvasiniek zahrnuté v experimentálnej časti práce patria medzi oleogénne kvasinky a predstavujú dobrý zdroj najmä lipofilných metabolitov. Extrakty boli vzhľadom na lipofilný charakter metabolitov pripravené za využitia hexánu, 96 % ethanolu a ich kombinácií. Najvyššie koncentrácie karotenoidov boli spektrofotometricky aj pomocou analýzy na HPLC stanovené v 96 % ethanolových extraktoch. Pomocou HPLC boli v ethanolových extraktoch oboch kvasiniek zistené aj najvyššie koncentrácie ergosterolu (provitámín D₂) a ubichinonu (koenzým Q₁₀). Pri analýze biomasy a extraktov na GC/FID boli stanovené vyššie zastúpenia lipidov u kvasinky *R. toruloides*, pričom u všetkých vzoriek prevládali nenasýtené MK. Pripravené extrakty boli podrobené stanoveniu antioxidantnej aktivity metódou TEAC a vyššie hodnoty antioxidantnej aktivity boli zistené v extraktoch z kvasinky *R. toruloides*. Najvyššia antioxidantná aktivita bola stanovená v hexán-ethanolovom extrakte *R. toruloides* (4,81±0,06 mg TE/g). V porovnaní s antioxidantnou aktivitou rias bola antioxidantná aktivita kvasiniek nižšia. Obsah β -glukánov bol stanovený v biomase oboch kvasiniek a vyššie hodnoty boli zistené pri kvasinke *R. toruloides*, ktorá obsahovala 20,942±0,261 g glukánov/100 g, z čoho β -glukány tvorili 16,452±0,096 g/100 g.

Vzhľadom na získané výsledky boli pre obohatenie cereálnych produktov vybrané vodné extrakty mikrorias a ethanolové extrakty kvasiniek, ktoré boli podrobené MTT testom cytotoxicity za účelom stanovenia ich bezpečnosti. Testy cytotoxicity boli uskutočnené na bunkovej línii CaCo-2 a žiaden z testovaných extraktov nevykazoval cytotoxické účinky. V prípade *Spirulina* extrakt za podmienok testu pôsobil na bunky priaznivo a zvyšoval ich viabilitu pri koncentráciách do 12,5 obj. % nad 100 %. Kvasinkové extrakty boli vzhľadom na prítomnosť 96 % ethanolu ako rozpúšťadla testované v nižších koncentráciách, t.j. do 1,0 obj. % a neboli zistené žiadne cytotoxické účinky extraktov na bunky.

V závere experimentálnej časti diplomovej práce boli na základe výsledkov analýz pripravené zmesné cereálne produkty, ktorých základ tvorila kukuričná múka obohatovaná o vodný extrakt *Spirulina*, ethanolový extrakt *R. toruloides*, biomasu *Spirulina* a kombináciu biomasy *Spirulina* a extraktu *R. toruloides*. Z uvedených zložiek boli pripravené cereálne zmesi, ktoré by mohli nájsť využitie ako suroviny a cereálne kaše. V pripravených produktoch bol pozorovaný vplyv prídavku obohacujúcich zložiek na obsah celkových fenolických látok, antioxidantnej aktivity a vo vode rozpustných proteínov. V pripravených cereálnych zmesiach došlo po prídavku obohacujúcich zložiek ku zvýšeniu koncentrácie fenolických látok (9,68–90,32 %), antioxidantnej aktivity (18,33–158,33 %) a proteínov (17,25–209,86 %). V prípade cereálnych kaší je možné konštatovať, že kulinárska príprava nemala na obsah obohacujúcich

zložiek negatívny vplyv nakoľko v obohatených zmesiach taktiež došlo ku nárastu koncentrácií všetkých sledovaných parametrov. Koncentrácia polyfenolov sa zvýšila v rozmedzí 13,73–74,51 %, antioxidačná aktivita o 60,00–244,00 % a obsah proteínov o 2,20–29,78 %.

Na základe získaných výsledkov bolo zistené, že biomasa sinice *Spirulina*, resp. jej kombinácia s kvasinkovým extraktom, zvyšovali obsah biologicky aktívnych látok vo vyššej miere než samotné extrakty. Momentálne sa javí ako efektívnejší spôsob obohacovania cereálnych výrobkov práve použitie biomasy, v prípade kvasiniek by však bolo potrebné používanú biomasu najprv imortalizovať, aby sa predišlo možným negatívnym účinkom na zdravie človeka. Pre efektívnejšie obohacovanie cereálií mikrobiálnymi extraktami by mohla lepšie riešenie ako pridávanie extraktov v kvapalnej podobe predstavovať enkapsulácia pripravených extraktov, prípadne ich zakonzentrovaných foriem obsahujúcich vyššie koncentrácie biologicky aktívnych látok. Enkapsulácia by zároveň mohla pomôcť ochrániť niektoré termolabilné biologicky aktívne látky pred ich degradáciou počas kulinárskej prípravy a napomôcť zvýšeniu nutričnej hodnoty bezpečkových cereálnych produktov.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] SLUKOVÁ, Marcela, Pavel SKŘIVAN a Marie HRUŠKOVÁ. *Cereální chemie a technologie: Zpracování obilovin - mlýnská a těstářenská výroba*. 1st ed. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2017. ISBN 978-80-7592-000-3.
- [2] MORIN, Jean-François a Michèle LEES, ed. *FOODINTEGRITY HANDBOOK: A GUIDE TO FOOD AUTHENTICITY ISSUES AND ANALYTICAL SOLUTIONS*. 8 rue de Thessalie, 44240 La Chapelle s/ Erdre Cedex: Goubault Imprimeur, 2018. ISBN 978-2-9566303-0-2.
- [3] *FAO: FAO Cereal Supply and Demand Brief* [online]. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2023 [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: <https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>
- [4] SKŘIVAN, Pavel. *Cereální chemie a technologie II: sekundární zpracování obilovin - pekářenská technologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2022. ISBN 978-80-7592-135-2.
- [5] MCKEVITH, Brigid. Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*. 2004, **29**(2), 111-142. ISSN 1471-9827. Dostupné z: doi:10.1111/j.1467-3010.2004.00418.x
- [6] GARG, Monika, Anjali SHARMA, Shreya VATS, Vandita TIWARI, Anita KUMARI, Vibhu MISHRA a Meena KRISHANIA. Vitamins in Cereals: A Critical Review of Content, Health Effects, Processing Losses, Bioaccessibility, Fortification, and Biofortification Strategies for Their Improvement. *Frontiers in Nutrition*. 2021, **8**. ISSN 2296-861X. Dostupné z: doi:10.3389/fnut.2021.586815
- [7] GARUTTI, Mattia, Gerardo NEVOLA, Roberta MAZZEO et al. The Impact of Cereal Grain Composition on the Health and Disease Outcomes. *Frontiers in Nutrition*. 2022, **9**. ISSN 2296-861X. Dostupné z: doi:10.3389/fnut.2022.888974
- [8] SAMTIYA, Mrinal, Rotimi ALUKO a Tejpal DHEWA. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. *Food Production, Processing and Nutrition*. 2020, 2(1). ISSN 2661-8974. Dostupné z: doi:10.1186/s43014-020-0020-5
- [9] KHAIRUDDIN, Muhammad a Ola LASEKAN. Gluten-Free Cereal Products and Beverages: A Review of Their Health Benefits in the Last Five Years. *Foods*. 2021, 10(11). ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10112523
- [10] BALAKIREVA, Anastasia a Andrey ZAMYATNIN. Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities. *Nutrients*. 2016, **8**(10). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu8100644
- [11] KARAMDOUST, Sanaz, Mohammad-Reza MILANI-HOSSEINI a Farnoush FARIDBOD. Simple detection of gluten in wheat-containing food samples of celiac diets with a novel fluorescent nanosensor made of folic acid-based carbon dots through

- molecularly imprinted technique. *Food Chemistry*. 2023, **410**. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2022.135383
- [12] KIOSOK, Konrad, Renata WELC-STANOWSKA a Agnieszka NAWROCKA. Changes in the conformation and biochemical properties of gluten network after phenolic acid supplementation. *Journal of Cereal Science*. 2023. ISSN 07335210. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcs.2023.103651
- [13] WILLIAM, Djeukeu, Assiene ARMEL, Dongho FABIEN a Gouado INOCENT. Effect of bleaching and fermentation on the physico-chemical, pasting properties and bread baking performance of various gluten free flour. *Measurement: Food*. 2023, 9. ISSN 27722759. Dostupné z: doi:10.1016/j.meafoo.2022.100073
- [14] CAIO, Giacomo, Umberto VOLTA, Anna SAPONE, Daniel LEFFLER, Roberto DE GIORGIO, Carlo CATASSI a Alessio FASANO. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Medicine*. 2019, 17(1). ISSN 1741-7015. Dostupné z: doi:10.1186/s12916-019-1380-z
- [15] CAEIRO, Carolina, Caroline PRAGOSA, Marisa CRUZ, Cidália PEREIRA, Sónia PEREIRA a José HUERTA. The Role of Pseudocereals in Celiac Disease: Reducing Nutritional Deficiencies to Improve Well-Being and Health. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2022, 2022, 1-8. ISSN 2090-0732. Dostupné z: doi:10.1155/2022/8502169
- [16] PELLEGRINI, Nicoletta a Carlo AGOSTONI. Nutritional aspects of gluten-free products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015, **95**(12), 2380-2385. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.7101
- [17] POLO, Andrea, Kashika ARORA, Hana AMEUR, Raffaella DI CAGNO, Maria DE ANGELIS a Marco GOBBETTI. Gluten-free diet and gut microbiome. *Journal of Cereal Science*. 2020, **95**. ISSN 07335210. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcs.2020.103058
- [18] MYHRSTAD, Mari, Marlene SLYDAHL, Monica HELLMANN, Lisa GARNWEIDNER-HOLME, Knut LUNDIN, Christine HENRIKSEN a Vibeke TELLEHANSEN. Nutritional quality and costs of gluten-free products: a case-control study of food products on the Norwegian market. 2021, 65. ISSN 1654-661X. Dostupné z: doi:10.29219/fnr.v65.6121
- [19] SERNA-SALDIVAR, Sergio O., ed. *Corn: Chemistry and Technology*. Third Edition. Elsevier Inc. in cooperation with AACC International, 2019. ISBN 978-0-12-811886-3. Dostupné z: doi:10.1016/C2016-0-01986-1
- [20] SUN, Huaxing, Qian JU, Jie MA et al. *The effects of extruded corn flour on rheological properties of wheat-based composite dough and the bread quality*. 2019, **7**(9), 2977-2985. ISSN 2048-7177. Dostupné z: doi:10.1002/fsn3.1153

- [21] BIELECKA, Joanna, Renata MARKIEWICZ-ŻUKOWSKA, Anna PUŚCION-JAKUBIK, Monika GRABIA, Patryk NOWAKOWSKI, Jolanta SOROCZYŃSKA a Katarzyna SOCHA. Gluten-Free Cereals and Pseudocereals as a Potential Source of Exposure to Toxic Elements among Polish Residents. *Nutrients*. 2022, **14**(11). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu14112342
- [22] SOUSA, Milena, Rafaiane GUIMARÃES, Marcos ARAÚJO et al. Characterization of corn (*Zea mays* L.) bran as a new food ingredient for snack bars. *LWT*. 2019, 101, 812-818. ISSN 00236438. **Dostupné z:** doi:10.1016/j.lwt.2018.11.088
- [23] YAZDANPANAH, Sedigheh, Samaneh ANSARIFARD, Mahsa HASANI a Néstor GUTIÉRREZ-MÉNDEZ. Development of Novel Gluten-Free Sausage Based on Chickpea, Corn Flour, and HPMC. *International Journal of Food Science*. 2022, **2022**, 1-7. ISSN 2314-5765. Dostupné z: doi:10.1155/2022/3616887
- [24] WAMBUGU, Peterson, Marie-Noelle NDJIONDJOP a Robert HENRY. Genetics and Genomics of African Rice (*Oryza glaberrima* Steud) Domestication. *Rice*. 2021, 14(1). ISSN 1939-8425. Dostupné z: doi:10.1186/s12284-020-00449-6
- [25] GUJRAL, Hardeep, Bharati SHARMA a Pardeep SINGH. Utilization of flour from rice brokens in wheat flour chapatti: evaluation of dough rheology, starch digestibility, glycemic index and retrogradation behavior. *Journal of Food Science and Technology*. 2019, 56(5), 2490-2500. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-019-03726-5
- [26] MIR, Nisar, Charanjit RIAR a Sukhcharn SINGH. Nutritional constituents of pseudo cereals and their potential use in food systems: A review. 2018, 75, 170-180. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2018.03.016
- [27] CASTRO-ALBA, Vanesa, Claudia LAZARTE, Daysi PEREZ-REA, Nils-Gunnar CARLSSON, Annette ALMGREN, Björn BERGENSTÅHL a Yvonne GRANFELDT. Fermentation of pseudocereals quinoa, canihua, and amaranth to improve mineral accessibility through degradation of phytate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019, 99(11), 5239-5248. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.9793
- [28] OLSON, Rebecca, Breda GAVIN-SMITH, Chiara FERRABOSCHI a Klaus KRAEMER. Food Fortification: The Advantages, Disadvantages and Lessons *from* Sight and Life Programs. *Nutrients*. 2021, 13(4). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu13041118
- [29] GARCIA-CASAL, Maria, Juan PEÑA-ROSAS, Luz DE-REGIL, Jeffrey GWIRTZ a Sant-Rayn PASRICHA. Fortification of maize flour with iron for controlling anaemia and iron deficiency in populations. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018, 2018(12). ISSN 14651858. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD010187.pub2

- [30] KAMALI ROUSTA, Leila, Samad BODBODAK, Mohammad NEJATIAN, Amir GHANDEHARI YAZDI, Zahra RAFIEE, Jianbo XIAO a Seid JAFARI. Use of *encapsulation technology* to enrich **and** fortify bakery, pasta, and cereal-based products. 2021, 118, 688-710. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2021.10.029
- [31] LIYANAGE, C a M HETTIARACHCHI. Food fortification. *Ceylon Medical Journal*. 2011, 56(3), 124-127. ISSN 2386-1274. Dostupné z: doi:10.4038/cmj.v56i3.3607
- [32] LETRAS, P., S. OLIVEIRA, J. VARELA, M.C. NUNES a A. RAYMUNDO. 3D printed gluten-free cereal snack with incorporation of *Spirulina (Arthrospira platensis)* and/or *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*. 2022, **68**. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2022.102863
- [33] WANG, Mengwei, Zihao YIN, Weihong SUN, Qiufan ZHONG, Yu ZHANG a Mingyong ZENG. Microalgae play a structuring role in food: Effect of *spirulina platensis* on the *rheological, gelling characteristics*, and mechanical properties of soy protein isolate hydrogel. *Food Hydrocolloids*. 2023, 136. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2022.108244
- [34] CAI, Yongqiu, Hooi Ren LIM, Kuan Shiong KHOO, Hui-Suan NG, Yanxue CAI, Jihui WANG, Andy TAK-YEE CHAN a Pau Loke SHOW. An integration *study of microalgae bioactive retention: From microalgae biomass to microalgae bioactives nanoparticle*. *Food and Chemical Toxicology*. 2021, **158**. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2021.112607
- [35] ZIGANSHINA, Elvira E., Svetlana S. BULYNINA a Ayrat M. ZIGANSHIN. Growth Characteristics of *Chlorella sorokiniana* in a Photobioreactor during the Utilization of Different Forms of Nitrogen at Various Temperatures. *Plants*. 2022, **11**(8). ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants11081086
- [36] ZULLAIKAH, Siti, Adi Tjipto UTOMO, Medina YASMIN, Lu Ki ONG a Yi Hsu JU. Ecofuel conversion technology of inedible lipid feedstocks to renewable fuel. *Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment* [online]. Elsevier, 2019, 237-276 [cit. 2020-12-27]. ISBN 9780081027288. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102728-8.00009-7
- [37] MASOJÍDEK, J. a G. TORZILLO. Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier, 2008, 2226-2235. ISBN 9780080454054. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008045405-4.00830-2
- [38] PANAHI, Yunes, Ahmad YARI KHOSROUSHAHI, Amirhossein SAHEBKAR a Hamid Reza HEIDARI. Impact of Cultivation Condition and Media Content on *Chlorella vulgaris* Composition. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2019, 9(2), 182-194. ISSN 2228-5881. Dostupné z: doi:10.15171/apb.2019.022

- [39] BITO, Tomohiro, Eri OKUMURA, Masaki FUJISHIMA a Fumio WATANABE. Potential of Chlorella as a Dietary Supplement to Promote Human Health. *Nutrients*. 2020, 12(9). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12092524
- [40] BAZARNOVA, Julia, Liudmila NILOVA, Elena TRUKHINA, Maya BERNAVSKAYA, Yulia SMYATSKAYA a Tugba AKTAR. Use of Microalgae Biomass for Fortification of Food Products from Grain. *Foods*. 2021, 10(12). ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10123018
- [41] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. Mikroskopické praktikum z hydrobiologie. Praha: Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, 2002.
- [42] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana, Dana VEJMELOVÁ a Pavlína ČIHÁKOVÁ. Technická mikrobiologie a hydrobiologie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2017. ISBN 1579511252.
- [43] ZÁHOROVSKÁ, Erika. Systém a evolúcia nižších rastlín. 2. nezm. vyd. Bratislava: Univerzita Komenského, 1998. ISBN 80-223-1240-1.
- [44] SOUIY, Zoubeida, Nesrine ZAKHAMA, Imed CHERAIEF a Mouhamed HAMMAMI. Nutritional, physical, microbial, and sensory characteristics of gluten-and sugar-free cereal bar enriched with *spirulina* and flavored with neroli essential oil. *LWT*. 2022, 169. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2022.113955
- [45] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [46] HERNÁNDEZ-ALMANZA, Ayerim, Julio CESAR MONTANEZ, Miguel A. AGUILAR-GONZÁLEZ, Cristian MARTÍNEZ-ÁVILA, Raúl RODRÍGUEZ-HERRERA a Cristóbal N. AGUILAR. Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for *food industry*. *Food Bioscience*. 2014, 5, 64-72. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2013.11.007
- [47] POONTAWEE, Rujiralai, Wichien YONGMANITCHAI a Savitree LIMTONG. Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production. *Process Biochemistry*. 2017, 53, 44-60. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2016.11.013
- [48] KURTZMAN, Cletus P. a Jack W. FELL. The Yeasts, A Taxonomic Study: Fourth Edition. 4. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V., 1998. ISBN 0 444 81312 8.
- [49] WEN, Zhiqiang, Sufang ZHANG, Chuks Kenneth ODOH, Mingjie JIN a Zongbao K ZHAO. Rhodosporidium toruloides - A potential red yeast chassis for lipids and beyond.

- FEMS Yeast Research. 2020, 20(5). ISSN 1567-1356. Dostupné z: doi:10.1093/femsyr/foaa038
- [50] ZHU, Zhiwei, Sufang ZHANG, Hongwei LIU et al. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature Communications*. 2012, 3(1). ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms2112
- [51] CAI, Yongqiu, Hooi Ren LIM, Kuan Shiong KHOO, Hui-Suan NG, Yanxue CAI, Jihui WANG, Andy TAK-YEE CHAN a Pau Loke SHOW. An integration study of microalgae bioactive retention: From microalgae biomass to microalgae bioactives nanoparticle. *Food and Chemical Toxicology*. 2021, **158**. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2021.112607
- [52] LOURENÇO, Sofia C., Margarida MOLDÃO-MARTINS a Vítor D. ALVES. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules*. 2019, 24(22). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24224132
- [53] RANI, Alka, Khem SAINI, Felix BAST, Sanjeet MEHARIYA, Shashi BHATIA, Roberto LAVECCHIA a Antonio ZUORRO. Microorganisms: A Potential Source of Bioactive Molecules for Antioxidant Applications. *Molecules*. 2021, **26**(4). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26041142
- [54] ARFAOUI, Leila. Dietary Plant Polyphenols: Effects of Food Processing on Their Content and Bioavailability. *Molecules*. 2021, 26(10). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26102959
- [55] ABBAS, Munawar, Farhan SAEED, Faqir Muhammad ANJUM et al. Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*. 2017, 20(8), 1689-1699. ISSN 1094-2912. Dostupné z: doi:10.1080/10942912.2016.1220393
- [56] SERETI, Fani, Aikaterini PAPADAKI, Maria ALEXANDRI, Vasiliki KACHRIMANIDOU a Nikolaos KOPSAHELIS. Exploring the potential of novel *R. kratochvilovae* red yeasts towards the sustainable synthesis of natural carotenoids. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2023, 31. ISSN 23525541. Dostupné z: doi:10.1016/j.scp.2022.100927
- [57] RAPOPORT, Alexander, Irina GUZHOVA, Lorenzo BERNETTI, Pietro BUZZINI, Marek KIELISZEK a Anna Maria KOT. Carotenoids and Some Other Pigments from Fungi and Yeasts. *Metabolites*. 2021, 11(2). ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo11020092
- [58] MATTOS, Mariana Vilar Castro da Veiga de, Mariano MICHELON a Janaina Fernandes de Medeiros BURKERT. Production and stability of food-grade liposomes containing microbial carotenoids from *Rhodotorula mucilaginosa*. *Food Structure*. 2022, 33. ISSN 22133291. Dostupné z: doi:10.1016/j.foostr.2022.100282

- [59] CHENG, Yu-Ting a Chu-Fang YANG. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2016, 61, 270-275. ISSN 18761070. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtice.2015.12.027
- [60] ALFADHLY, Nawal K. Z., Nawfal ALHELFI, Ammar B. ALTEMIMI, Deepak Kumar VERMA, Francesco CACCIOLA a Arunaksharan NARAYANANKUTTY. Trends and Technological Advancements in the Possible Food Applications of *Spirulina* and Their Health Benefits: A Review. *Molecules*. 2022, 27(17). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27175584
- [61] DEL MONDO, Angelo, Arianna SMERILLI, Elisabet SANÉ, Clementina SANSONE a Christophe BRUNET. Challenging microalgal vitamins for human health. *Microbial Cell Factories*. 2020, 19(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-020-01459-1
- [62] REGNER-NELKE, Liesa, Christopher NELKE, Christina B. SCHROETER, Rainer DZIEWAS, Tobias WARNECKE, Tobias RUCK a Sven G. MEUTH. Enjoy Carefully: The Multifaceted Role of Vitamin E in Neuro-Nutrition. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(18). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms221810087
- [63] COULOMBIER, Noémie, Thierry JAUFFRAIS a Nicolas LEBOUVIER. Antioxidant Compounds from Microalgae: A Review. *Marine Drugs*. 2021, 19(10). ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md19100549
- [64] VAN DEN OEVER, Sabrina P. a Helmut K. MAYER. Biologically active or just “pseudo”-vitamin B12 as predominant form in algae-based nutritional supplements?. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2022, 109. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2022.104464
- [65] DOLGANYUK, Vyacheslav, Daria BELOVA, Olga BABICH, Alexander PROSEKOV, Svetlana IVANOVA, Dmitry KATSEROV, Nikolai PATYUKOV a Stanislav SUKHIKH. Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules*. 2020, 10(8). ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10081153
- [66] MITRA, Saikat, Shyamjit PAUL, Sumon ROY et al. Exploring the Immune-Boosting Functions of Vitamins and Minerals as Nutritional Food Bioactive Compounds: A Comprehensive Review. *Molecules*. 2022, 27(2). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27020555
- [67] KOYANDE, Apurav Krishna, Kit Wayne CHEW, Krishnamoorthy RAMBABU, Yang TAO, Dinh-Toi CHU a Pau-Loke SHOW. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*. 2019, 8(1), 16-24. ISSN 22134530. Dostupné z: doi:10.1016/j.fshw.2019.03.001

- [68] SHAH, Aabid Manzoor, Wu YANG, Hassan MOHAMED, Yingtong ZHANG a Yuanda SONG. Microbes: A Hidden Treasure of Polyunsaturated Fatty Acids. *Frontiers in Nutrition*. 2022, 9. ISSN 2296-861X. Dostupné z: doi:10.3389/fnut.2022.827837
- [69] MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, Iwona, Karolina KUJAWOWICZ a Anna Maria WITKOWSKA. Beta-Glucans from Fungi: Biological and Health-Promoting Potential in the COVID-19 Pandemic Era. *Nutrients*. 2021, 13(11). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu13113960
- [70] RAHAR, Sandeep, Gaurav SWAMI, Navneet NAGPAL, ManishaA NAGPAL a GaganShah SINGH. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. 2011, 2(2). ISSN 2231-4040. Dostupné z: doi:10.4103/2231-4040.82953
- [71] HENRION, Muriel, Célia FRANCEY, Kim-Anne Lê a Lisa LAMOTHE. Cereal B-Glucans: The Impact of Processing and How It Affects Physiological Responses. *Nutrients*. 2019, 11(8). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11081729
- [72] BAGCHI, Debasis a Sreejayan NAIR, ed. Chapter 7 - Regulatory constraints on new product development and approval procedures in the United States. In: *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*. Elsevier Inc., 2017, s. 123-148. ISBN 978-0-12-802780-6.
- [73] RAMOS-ROMERO, Sara, Joan Ramon TORRELLA, Teresa PAGÈS, Ginés VISCOR a Josep Lluís TORRES. Edible Microalgae and Their Bioactive Compounds in the Prevention and Treatment of Metabolic Alterations. *Nutrients*. 2021, 13(2). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu13020563
- [74] KOT, Anna M., Iwona GIENKA, Anna BZDUCHA-WRÓBEL, Stanisław BŁAŻEJAK a Agnieszka KURCZ. Comparison of simple and rapid cell wall disruption methods for improving lipid extraction from yeast cells. *Journal of Microbiological Methods*. 2020, 176. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2020.105999
- [75] ZHOU, Jianjun, Min WANG, Jorge A. SARAIVA et al. Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches. *Food Chemistry*. 2022, 384. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2022.132236
- [76] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Fundamentals of analytical chemistry*. Ninth edition. Australia: Brooks/Cole Cengage Learning, 2014. ISBN 978-0-495-55828-6.
- [77] DEN UIJL, Mimi J., Peter J. SCHOENMAKERS, Bob W.J. PIROK a Maarten R. BOMMEL. Recent applications of retention modelling in liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 2021, 44(1), 88-114. ISSN 1615-9306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.202000905

- [78] KIM, Jeong Eun, Inseok YANG, Dong Min MOON, Jin Seog KIM a Kiryong HONG. New Analytical Method for Measuring the Atomic Weight of Neon Using Gas Chromatography with a Thermal Conductivity Detector. *ACS Omega*. 2021, 6(22), 14476-14480. ISSN 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.1c01434
- [79] MENDONÇA, Jenifer da Silva, Rita de Cássia Avellaneda GUIMARÃES, Verônica Assalin ZORGETTO-PINHEIRO et al. Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. *Molecules*. 2022, 27(11). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27113563
- [80] MUNTEANU, Irina Georgiana a Constantin APETREI. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(7). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22073380
- [81] NASHAAT, Yousra. Evaluation of the Cytotoxicity and apoptotic effect of Nano triple antibiotic paste with Nano anti-inflammatory drug as an intracanal medicament. *European Endodontic Journal*. 2020. ISSN 25480839. Dostupné z: doi:10.14744/ej.2020.29292
- [82] GHASEMI, Mahshid, Tyron TURNBULL, Sonia SEBASTIAN a Ivan KEMPSON. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(23). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms222312827
- [83] LICHTENTHALER, Hartmut K. a Claus BUSCHMANN. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001, 1(1), 431-438. ISSN 25725599. Dostupné z: doi:10.1002/0471142913.faf0403s01
- [84] MARTÍNEZ, J.M., F. SCHOTTROFF, K. HAAS, T. FAUSTER, M. SAJFRTOVÁ, I. ÁLVAREZ, J. RASO a H. JAEGER. Evaluation of pulsed electric fields technology for the improvement of subsequent carotenoid extraction from dried *Rhodotorula glutinis* yeast. *Food Chemistry*. 2020, **323**. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.126824
- [85] CHANDRASEKARA, Anoma, Indraneela SENANAYAKE, Disna KUMARI a Fereidoon SHAHIDI. Effect of processing on the antioxidant activities of porridges and Pittu prepared from finger millets (*Eleusine coracana*). *Food Production, Processing and Nutrition*. 2022, 4(1). ISSN 2661-8974. Dostupné z: doi:10.1186/s43014-022-00097-x
- [86] BANI, Corinne, Chiara DI LORENZO, Patrizia RESTANI, Francesca MERCOGLIANO a Francesca COLOMBO. Phenolic Profile and In Vitro Antioxidant Activity of Different Corn and Rice Varieties. *Plants*. 2023, 12(3). ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants12030448
- [87] PHUWADOLPAISARN, Pattraporn. Comparison of β -Glucan Content in Milled Rice, Rice Husk and Rice Bran from Rice Cultivars Grown in Different Locations of Thailand

and the Relationship between β -Glucan and Amylose Contents. *Molecules*. 2021, 26(21). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26216368

[88] MACHU, Ludmila, Ladislava MISURCOVA, Jarmila VAVRA AMBROZOVA, Jana ORSAVOVA, Jiri MLCEK, Jiri SOCHOR a Tunde JURIKOVA. Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products. *Molecules*. 2015, 20(1), 1118-1133. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules20011118

[89] MARKOU, Giorgos, Christos ELIOPOULOS, Anthoula ARGYRI a Dimitrios ARAPOGLOU. Production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* Enriched in β -Glucans through Phosphorus Limitation. *Applied Sciences*. 2021, 11(17). ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app11178121

[90] SALAR, Raj Kumar, Milan CERTIK, Vlasta BREZOVA, Marta BRLEJOVA, Vladimira HANUSOVA a Emília BREIEROVÁ. Stress influenced increase in phenolic content and radical scavenging capacity of *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26. *3 Biotech*. 2013, 3(1), 53-60. ISSN 2190-572X. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-012-0069-1

8 ZOZNAM SKRATIEK

ARA	kyselina arachidonová
ABTS	2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
AMK	aminokyseliny
DHA	kyselina dokosahexaénová
DMSO	dimethylsulfoxid
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
EFSA	Európsky úrad pre bezpečnosť potravín
FAO	Organizácia pre výživu a poľnohospodárstvo patriaca pod OSN
FDA	Úrad pre kontrolu liečiv a potravín, USA
GAE	ekvivalent kyseliny gallovej
GC	plynová chromatografia
GLN	glutamín
GRAS	látka všeobecne považovaná za bezpečnú
HPLC	vysokoučinná kvapalinová chromatografia
LA	kyselina linolénová
MK	mastné kyseliny
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid
MUFA	mononenасыtené mastné kyseliny
OSN	Organizácia spojených národov
PRO	prolín
PUFA	polynenasýtené mastné kyseliny
ROS	reaktívne formy kyslíka
SER	serín
SDS	dodecylsulfát sodný
SFA	nasýtené mastné kyseliny
TE	ekvivalent Troloxu
TEAC	antioxidačná kapacita látok ekvivalentná Troloxu
UV-VIS	oblasť ultrafialového a viditeľného žiarenia