



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

PŘÍDAVEK PROBIOTIK A ŘASOVÝCH VÝTAŽKŮ DO DĚTSKÝCH PŘÍKRMŮ

ADDITION OF PROBIOTICS AND ALGAE EXTRACTS TO BABY FOODS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Alexandra Liová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1691/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Alexandra Liová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Němcová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Přídavek probiotik a řasových výtažků do dětských příkrmů

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Zpracování rešerše na dané téma
- 2) Charakterizace různých řasových složek
- 3) Výběr vhodné kombinace probiotických bakterií a řasových výtažků do dětských příkrmů
- 4) Návrh optimálního složení dětského příkrmu
- 5) Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Alexandra Liová
student(ka)

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca sa zaoberá výberom vhodnej kombinácie probiotickej kultúry s riasovými extraktami ako prídavok do detských príkrmov a návrhom optimálneho zloženia detského príkrmu. Pre tieto ciele boli vybrané morské riasy arame, wakame, hijiki a kombu.

Teoretická časť je zameraná na správnu výživu detí, ich nedostatkov a možných ochorení. Následne sa zaoberá charakterizáciou probiotických kultúr a ich významom vo výžive dieťaťa. V neposlednom rade sú v teoretickej časti charakterizované jednotlivé morské riasy, ich nutričné zloženie a taktiež význam vo výžive dieťaťa.

V experimentálnej časti sa najprv analyzovali vzorky vybraných rias z hľadiska sacharidov, obsahu nerozpustnej vlákniny, fruktooligosacharidov a β -glukánov či obsahu pigmentov. Ako porovnávacía zložka sa použila vzorka inulínu, bežne používané prebiotikum do probiotických výrobkov. Dôležitou analýzou tejto experimentálnej časti bolo stanovenie vplyvu riasových extraktov na viabilitu a rast probiotických baktérií. Následne sa vykonalo modelové trávenie zmesi probiotík a riasových extraktov, pričom sa stav probiotických buniek vyhodnocoval počas trávenia aj po ukončení trávenia pomocou merania zákalu a pomocou prietokovej cytometrie.

Na záver bola navrhnutá nielen optimálna kombinácia riasového extraktu a probiotickej kultúry, ale aj možnosti zlepšenia dlhodobej viability probiotických buniek v kombinácii s riasovými extraktami.

Kľúčové slová: detský príkrm, riasy, viabilita, probiotiká

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the selection of a suitable combination of probiotic culture with algae extracts as an addition to the baby formula and the application of the optimal composition of baby formula. Arame, wakame, hijiki and kombu seaweeds were selected for these purposes.

The theoretical part is focused on the proper nutrition of children, their deficiencies and possible diseases. Subsequently, it deals with the characterization of probiotic cultures and their importance in the child's nutrition. Last but not least, the theoretical part characterizes the individual seaweeds, their nutritional composition and also their importance in the child's nutrition.

In the experimental part, samples of selected algae were first analyzed in terms of saccharides, insoluble fiber content, fructooligosaccharides and β -glucans or pigment content. A sample of inulin, a commonly used prebiotic in probiotic products, was used as a reference component. An important analysis of this experimental part was to determine the effect of algal extracts on the viability and growth of probiotic bacteria. Subsequently, a model digestion of a mixture of probiotics and algal extracts was performed, and the condition of the probiotic cells was evaluated during digestion and after digestion by measuring turbidity and flow cytometry.

Finally, not only the optimal combination of algae extract and probiotic culture was proposed, but also the possibility of improving the long-term viability of probiotic cells in combination with algal extracts.

Key words: baby food, algae, viability, probiotics

LIOVÁ, Alexandra. *Přídavek probiotik a řasových výtažků do dětských příkrmů*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131489>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Andrea Němcová.

PREHLÁSENIE:

Prehlasujem, že bakalársku prácu som vypracovala samostatne a že všetky použité zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekanom FCH VUT.

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE:

Rada by som poďakovala vedúcej tejto bakalárskej práce Ing. Andrei Němcovej, PhD., za odborné vedenie, cenné rady a usmernenie pri písaní mojej práce. Ďalej by som chcela poďakovať svojej konzultantke Ing. Julii Hoovej za ochotu, trpezlivosť a za celkovú pomoc pri experimentálnej časti. V neposlednej rade chcem poďakovať mojej rodine za podporu, ktorú mi počas štúdia poskytovala.

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	TEORETICKÁ ČASŤ	12
	2.1. Výživa detí	12
	2.2. Probiotiká.....	12
	2.2.1. Význam probiotík vo výžive dieťaťa	13
	2.2.2. Viabilita probiotík	13
	2.2.3. Probiotické mikroorganizmy	14
	2.2.3.1. Rod Lactobacillus.....	15
	2.2.3.2. Rod Bifidobacterium	15
	2.2.3.3. Rod Enterococcus.....	16
	2.2.3.4. Rod Lactococcus	16
	2.2.3.5. Rod Leuconostoc	17
	2.2.3.6. Rod Streptococcus	17
	2.2.3.7. Rod Pediococcus	18
	2.2.4. Probiotické produkty pre deti	18
	2.2.5. Riziká užívania probiotík.....	19
	2.3. Prebiotiká	20
	2.4. Fruktooligosacharidy a ich vplyv na zdravie dieťaťa	20
	2.5. β -glukány a ich vplyv na zdravie dieťaťa	21
	2.6. Riasy	21
	2.6.1. Nutričné zloženie rias	21
	2.6.1.1. Proteíny a aminokyseliny	22
	2.6.1.2. Minerálne látky	22
	2.6.1.3. Lipidy a mastné kyseliny.....	22
	2.6.1.4. Vlákna	22
	2.6.2. Pozitíva a negatíva konzumácie rias.....	23
	2.6.3. Wakame	23
	2.6.4. Hijiky	24
	2.6.5. Arame	24
	2.6.6. Kombu	24
	2.7. Produkty s riasovými extraktmi.....	25
3	CIEĽ PRÁCE	26
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
	4.1. Použité chemikálie.....	27

4.2. Použité prístroje a pomôcky	28
4.3. Charakteristika vybraných rastlinných materiálov	28
4.3.1. Vzorok použitých rias.....	28
4.3.2. Príprava extraktov k nasledujúcim analytickým metódam.....	29
4.4. Stanovenie celkových sacharidov podľa Duboisa	29
4.5. Stanovenie redukujúcich sacharidov podľa Somogyi-Nelsona	29
4.6. Stanovenie sacharidov metódou HPLC	30
4.7. Stanovenie vlákniny podľa Henneberga a Stohmana	31
4.8. Stanovenie obsahu fruktooligosacharidov	32
4.9. Stanovenie obsahu β -glukánov	33
4.10. Stanovenie pigmentov pomocou metódy HPLC	34
4.11. Stanovenie vplyvu extraktov vybraných rastlinných materiálov na viabilitu probiotických kultúr.....	35
4.11.1. Použité probiotické kultúry	35
4.11.2. Kultivácia probiotických kultúr.....	35
4.11.3. Interakcia extraktov rias a inulínu s probiotickými kultúrami	35
4.11.3.1. Stanovenie optickej hustoty probiotických buniek v kombinácii s rastlinnými extraktami	35
4.11.3.2. Stanovenie viability probiotických buniek pomocou prietokovej cytometrie.....	36
4.12. Modelové trávenie probiotických buniek s prídavkom prebiotík	36
4.12.1. Modelová žalúdočná šťava	36
4.12.2. Modelová pankreatická šťava.....	36
4.12.3. Modelová žlčová šťava.....	36
4.12.4. Stanovenie viability probiotických buniek počas modelového trávenia ...	36
5 VÝSLEDKY A DISKUSIA	38
5.1. Výsledky stanovenia množstva celkových sacharidov	38
5.2. Výsledky stanovenia množstva redukujúcich sacharidov	39
5.3. Charakterizácia vybraných vzoriek z hľadiska obsahu sacharidov pomocou metódy HPLC	40
5.4. Stanovenie množstva nerozpustnej vlákniny	40
5.5. Výsledky stanovenia množstva fruktooligosacharidov vo vzorkách rias a inulínu	41
5.6. Výsledky stanovenia množstva β -glukánov vo vzorkách rias a inulíny	42
5.7. Výsledky stanovenia pigmentov metódou HPLC.....	43
5.8. Stanovenie viability probiotických buniek v kombinácii s vybranými prebiotikami	43

5.8.1.	Výsledky analýzy vplyvu vybraných extraktov na viabilitu probiotických baktérií.....	44
5.8.2.	Výsledky stanovenia viability a počtu probiotických buniek počas modelového trávenia	52
5.9.	Návrh optimálneho zloženia detského príkrmu s prídavkom prebiotík a probiotík	55
6	ZÁVER.....	57
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	59
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV.....	67

1 ÚVOD

V súčasnosti sa kladie veľký dôraz na zdravú výživu detí. Do skupiny zdravých potravín, či skôr zdravých zložiek potravín sa stále viac dostávajú produkty s prídavkom probiotických kultúr ako sú *Lactobacillus acidophilus* alebo *Bifidobacterium breve*. Ako probiotiká sa najviac využívajú baktérie mliečneho kvasenia. Za posledné roky sa stále viac detí stretáva s rôznymi alergiami a to hlavne na určité zložky potravín. Taktiež mnoho detí trpí nedostatočnou imunitou alebo rôznymi črevnými ochoreniami. Práve z tohto dôvodu potom rodičia hľadajú pre svoje deti zdravú cestu liečby, a tou sú v mnohých prípadoch práve detské príkrmy s obsahom probiotík a prebiotík. Probiotiká sú však živé mikroorganizmy, ktoré môžu byť ohrozené najmenšou zmenou prostredia, či nedostatočným zdrojom živín. Z tohto dôvodu je výhodné pridávať do probiotických produktov taktiež určitý druh prebiotika, prípadne konzumovať prebiotikum mimo užívania probiotík. Väčšina ľudí si pod pojmom prebiotikum predstavi vlákninu, napríklad inulín. K prebiotikám patrí ale aj ovocie, či zelenina alebo potraviny s vysokým obsahom nerozpustnej vlákniny a s vysokým obsahom sacharidov.

V posledných rokoch sa objavuje čoraz viac štúdií, ktoré sa zaoberajú nutričnými hodnotami najrôznejších morských rias. Hľadajú sa v nich nové zdroje sacharidov, či minerálnych látok ale aj rôznych pigmentov. Hlavne kvôli vhodnému obsahu sacharidov a vysokému obsahu nerozpustnej vlákniny sú vhodné aby sa pridávali k probiotickým výrobkom.

Táto práca je zameraná práve na skúmanie morských rias a ich nutričných hodnôt. Testovanie a analýzy sú pritom zamerané na vytvorenie vhodnej kombinácie prebiotického zložky, teda morskej riasy a probiotického zložky.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Výživa detí

Stravovacie návyky a výživa dieťaťa hrajú pri jeho vývoji veľkú rolu a sú dôležitou súčasťou jeho každodenného života. Nevyvážená strava, či vysoká spotreba energie vedie k vzniku kardiovaskulárnych chorôb, obezity a niektorých ďalších tzv. civilizačných ochorení. V súčasnej dobe je problémom najmä vysoký príjem energie, vysoká spotreba tukov a ich nesprávne zloženie. Neprimeraný je aj obsah cholesterolu, soli a cukru v prijímanej strave. K nedostatkom vo výžive detí patrí nízky príjem vitamínu C a vlákniny.

Deti sa často môžu dostať do situácie, kedy je potrebná zmena obsahu ich jedálneho lístka. Je to predovšetkým v období rekonvalescencie alebo ochorenia. V mnohých prípadoch je zmena jedálneho lístka tým najlepším liečebným prvkom. V živote dieťaťa existuje niekoľko vývojových fáz, pričom každá z nich si vyžaduje iné zloženie stravy, iný príjem energie či vody [1].

Podľa výživových nárokov sa stravovacie obdobia dieťaťa rozdeľujú do troch štádií, pričom tieto štádiá na seba nadväzujú a každé z nich trvá 4–6 mesiacov. Jednotlivé obdobia sú určované funkčnosťou tráviaceho ústrojenstva, funkčnosťou vylučovacieho ústrojenstva a psychomotorickým vývojom dojčťa [2].

Prvé obdobie od narodenia dieťaťa sa nazýva počiatočné obdobie a je charakteristické výhradne mliečnou stravou dojčťa. V prípade vážnych zdravotných problémov je možné dokrmovať podľa odporúčania lekára. Prechodné obdobie začína od 6. mesiaca života, kedy je potrebné do jedálneho lístka zaradiť okrem materského mlieka vhodné druhy zeleniny ako sú mrkva, zemiak či cuketa. Najbežnejším spracovaním týchto surovín je forma kaše, prípadne pyré [3].

Tretím štádiom je obdobie zmiešanej stravy, počas ktorého by malo byť podávané jedlo ľahko stráviteľné a mäkké. Strava by mala byť pestrá a nutrične hodnotná [2].

Všetky potravinové produkty, či už vyrobené alebo dovezené musia spĺňať vybrané požiadavky na zloženie potravín pre počiatočnú a pokračovaciu dojčenskú výživu a výživu malých detí, ďalej požiadavky na zloženie obilných kaší a ostatných príkrmov podľa vyhlášky 54/2004 Sb [4].

2.2. Probiotiká

Probiotiká sú definované Organizáciou pre výživu a poľnohospodárstvo a Svetovou zdravotníckou organizáciou (FAO/WHO) ako živé organizmy, ktoré sú v primeranom množstve pre človeka zdraviu prospešné [5]. Väčšinou ide o baktérie mliečneho kvasenia, ktoré sú charakterizované vysokou adaptabilitou na životné prostredie, schopnosťou žiť v rôznych

prostrediach a metabolickou schopnosťou produkovať kyselinu mliečnu fermentáciou sacharidov [6]. Medzi najčastejšie študované a používané probiotické mikroorganizmy patria baktérie rodu *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Saccharomyces* [7]. Množstvo a druh mikroorganizmov obsiahnutých v mliečnych výrobkoch vymedzuje vyhláška č. 397/2016 Sb [8].

2.2.1. Význam probiotík vo výžive dieťaťa

Významnou úlohou týchto mikroorganizmov je obnova črevnej mikroflóry a liečba hnačkových ochorení, najmä rotavírusových hnačiek u detí. Pozitívny prínos probiotík je taktiež pri liečbe ulceróznej kolitídy, laktózovej intolerancii, pri syndróme dráždivého čreva či pri infekcii, ktorú spôsobuje baktéria *Helicobacter pylori* [9]. Je známe, že prítomnosť probiotických baktérií v tráviacom trakte pomáha lepšie hydrolyzovať a teda aj vstrebávať bielkovinu. Účinkom miernej lipázovej aktivity probiotických baktérií dochádza k lepšej využitiu tukových častíc. Aktivácia laktázy zlepšuje toleranciu a využitie laktózy z mliečnej výživy dieťaťa [10].

Pozitívne vplyvajú na liečbu infekcií horných dýchacích ciest, znižujú riziko rakoviny hrubého čreva a močového mechúra. Probiotické mikroorganizmy sa využívajú nielen pri liečbe atopických ekzémov a alergií, ale aj ako prevencia pred zubným kazom [9].

Prítomnosť probiotických baktérií napomáha aj k lepšiemu vstrebávaniu vápnika a zvyšuje sa prirodzená syntéza vitamínov skupiny B [10].

Probiotiká súťažia s patogénnymi baktériami o naviazanie na sliznicu črevnej steny, čím posilňujú vnútornú sliznicu čreva a následne zamedzujú adhéziou patogénnych baktérií na dané miesto. Produkujú látky zvané bakteriocíny a látky ako sú napríklad organické kyseliny, či peroxid vodíka. Mikroorganizmy prítomné v zažívacom trakte reagujú s epiteliálnymi a imunitnými bunkami, čím stimulujú vrodený imunitný systém človeka. Črevná mikroflóra môže prispieť k spracovaniu potravinových antigénov v tráviacom trakte. Výsledkom spracovania týchto antigénov je precitlivenosť na určitý druh jedla až vznik atopie. Probiotiká majú schopnosť upraviť štruktúru potenciálnych antigénov, znižujú ich imunogenicitu, priepustnosť čreva a tvorbu prozápalových cytokínov, ktoré sú zvýšené u pacientov s rôznymi alergickými ťažkosťami. [11].

2.2.2. Viabilita probiotík

Na zabezpečenie pozitívneho vplyvu probiotík na zdravie človeka je potrebné udržať viabilitu a metabolickú aktivitu probiotických mikroorganizmov počas spracovania a predaja potravín

a následne v tráviacom trakte užívateľa. Na zvýšenie a udržanie životaschopnosti probiotík v potravinových produktoch existujú rôzne spôsoby, napríklad výber probiotík rezistentných voči kyselinám a žlči, použitie nádob nepriepustných pre kyslík, adaptácia na stres či enkapsulácia. Mikroenkapsulácia sa v posledných rokoch radí medzi najnovšie a vysoko účinné metódy na zvýšenie viability probiotík. Na zvýšenie životaschopnosti probiotických kultúr v jogurtovom prostredí sa používa aj dvojstupňová fermentácia. Výsledkom pokusu s použitím dvojstupňovej fermentácie, po šiestich týždňoch skladovania jogurtu, bola väčšia retencia životaschopných buniek *L. acidophilus* a *B. longum* ako pri jedноступňovej fermentácií [12].

Ďalšou skúmanou metódou na udržanie viability probiotík je sušenie. Niekoľko prác dokazuje, že správne vysušené mikroorganizmy zostávajú životaschopné aj pri dlhodobom skladovaní pri izbovej teplote. Proces dehydratácie však spočíva v odstránení veľkého množstva intracelulárnej vody, čo vedie k membránovej deformácii alebo bunkovej smrti. Vysychanie zvyšuje kontakt bunkových povrchov so vzduchom, a teda aj s molekulami kyslíka, vyvoláva tvorbu a intracelulárnu akumuláciu reaktívnych foriem kyslíka, čo spôsobuje poškodenie bunkových proteínov, lipidov a nukleových kyselín [13].

2.2.3. Probiotické mikroorganizmy

Ako bolo už spomenuté vyššie, probiotiká sú v podstate baktérie mliečného kvasenia. Všeobecne baktérie sú po fyziologickej stránke rôznorodé prokaryotické mikroorganizmy, po stránke morfolologickej sa jedná o veľmi podobné organizmy. Tvar buniek je odvodzovaný od tyčínok alebo kokov a ich veľkosť sa rádovo udáva v niekoľkých μm . Z fyziologického hľadiska sú baktérie heterotrofné mikroorganizmy, ktoré získavajú živiny premenou organických látok. Produktom ich metabolizmu môže byť napr. kyselina mliečna.

Do skupiny baktérií mliečného kvasenia môžeme zaradiť niektoré druhy rodov *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Bifidobacterium*. S výnimkou bifidobaktérií sú všetky rody fylogeneticky príbuzné. Bifidobaktérie sú typickou súčasťou intestinálneho traktu ľudí a zvierat a v prírode sa primárne vyskytujú vo fekálne kontaminovaných substrátoch. Právě baktérie mliečného kvasenia tvoria veľkú skupinu nepohyblivých, nesporulujúcich, grampozitívnych kokov a tyčínok, ktoré fermentujú sacharidy za fakultatívne anaeróbných podmienok a tvoria pri tom hlavne kyselinu mliečnu.

Mliečne baktérie je možné deliť podľa hlavných a vedľajších terminálnych fermentačných produktov na homofermentatívne, ktoré fermentovaný sacharid premenia skoro výhradne

na kyselinu mliečnu a heterofermentatívne, ktoré premieňajú fermentovaný sacharid na kyselinu mliečnu, kyselinu octovú, oxid uhličitý a za určitých podmienok aj etanol.

Baktérie mliečneho kvasenia sa používajú ako výrobné prostriedky pri fermentačných procesoch v technológií kvasených potravín a pochutín živočíšneho a rastlinného pôvodu, pričom fermentáciou sacharidov na kyselinu mliečnu a octovú a vedľajšími produktami metabolizmov prispievajú k typickej chuti a aróme príslušného fermentovaného produktu [14].

2.2.3.1. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* patrí do kmeňa *Firmicutes*, triedy *Bacilli*, rádu *Lactobacillales* a čeľade *Lactobacillaceae*. Zástupcovia rodu *Lactobacillus* sú baktérie tvaru pravidelných tyčínok, ktoré sú obvykle dlhšie, občas kokovité, usporiadané v palisádach alebo krátkych reťazcoch. Sú fakultatívne anaeróbne alebo mikroaerofilné, teda ich rast je silnejší pri redukovanej koncentrácii kyslíka. Všeobecne platí, že prítomnosť 5 % oxidu uhličitého podporuje rast laktobacilov.

Nachádzajú sa v syroch či v kyslých mliečnych výrobkoch, kde si svoju funkciu plnia v závislosti na druhu, kmeni, výrobných podmienkach a produktoch. Najčastejšie sú v potravinárstve používané ako štartovacie kultúry alebo už vyššie spomínané probiotické kultúry. Okrem týchto vlastností niektoré laktobacily produkujú bakteriocíny a exopolysacharidy. Za určitých podmienok môžu spôsobiť vady chuti a textúry potravín [15].

Rod *Lactobacillus* je najrozsiahlejší rod mliečnych baktérií s viac ako 100 druhmi a poddruhmi. Napriek tomu, že väčšina z nich je nepatogénna, u jedincov s oslabenou imunitou môžu byť zdrojom novorodeneckej meningitídy, baktériemií a pľúcnych ochorení [16].

Najvýznamnejším druhom je *L. acidophilus*. Využíva sa na výrobu acidofilného mlieka a sušeného acidofilného mlieka za účelom kŕmenia. Z farmaceutického hľadiska sa využíva na obnovu prirodzeného zloženia črevnej mikroflóry po aplikácii antibiotík. Tento druh využíva glykogén, ktorý sa uvoľňuje z rozpadajúcich sa epitelov, za vzniku kyseliny mliečnej [17].

Ďalšími príkladmi mliečnych kultúr používajúcich sa ako probiotiká sú: *L.casei*, *L.rhamnosus*, *L.plantarum*, *L.lactis*, *L.delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L.helveticus*, *L.reuteri*, *L.brevis*, *L.johnsoni*, *L.paracasei* a *L.salivarius* [16].

2.2.3.2. Rod *Bifidobacterium*

Bifidobaktérie boli vyizolované v roku 1900 Tissierom zo stolice dojčených detí a nazvané ako *Bacillus bifidus*, pretože mali charakteristický tvar písmena Y, boli grampozitívne a počas rastu neprodukovali plyn. Počas nasledujúcich 50 rokov vedci navrhovali nové pomenovanie

pre bifidobaktérie. Neskôr boli zaradené do samostatného rodu *Bifidobacterium*. Patria do kmeňa *Actinobacteria* [18].

Bifidobaktérie majú významnú úlohu v intestinálnom trakte novorodencov, u ktorých tvoria väčšinu črevnej mikroflóry. Nachádzajú sa v tráviacom trakte dospelého človeka, kde z fermentovaných sacharidov produkujú kyselinu mliečnu a kyselinu octovú, ktoré inhibujú nežiaduce baktérie a zlepšujú peristaltiku čriev [19].

Všetky doposiaľ popísané druhy sa dajú rozdeliť do šiestich skupín podľa miesta výskytu: črevá človeka, ústna dutina, strava, trakt zvierat, trakt hmyzu a odpadné vody. Do skupiny ľudských bifidobaktérií zaraďujeme nasledujúce druhy: *B.pseudocatenulatum*, *B.catenulatum*, *B.adolescentis*, *B.longum*, *B.infantis*, *B.breve*, *B.angulatum*, *B.bifidum* a *B.dentium*. Medzi najdôležitejšie probiotické druhy patria *B.longum*, *B.bifidum*, *B.breve* a *B.infantis*. Využívajú sa aj ako prídavky do mliečnych výrobkov a potravinových výrobkov [20].

2.2.3.3. Rod *Enterococcus*

Jedná sa o grampozitívne koky, kultivačne nenáročné. Sú pomerne rezistentné k vonkajšiemu prostrediu. Vyskytujú sa vo dvojiciach alebo v krátkych reťazcoch, pričom nehomolyzujú na krvnom agare. Enterokoky sú fakultatívne anaeróbne, odolné voči vysokému pH (9,6), rastú v hypertonickom roztoku NaCl, prežijú polhodinové zahriatie na 60 °C sú schopné rásť aj za prítomnosti 40% žlči. Sú odolné voči soliam, detergentom, ťažkým kovom, ethanolu, azidom a vysychaniu. Primárne sa nachádzajú v čreve, iný výskyt je veľmi vzácny. Spôsobujú močové infekcie, gynekologické zápaly, pooperačné komplikácie a urosepsu. Sú značne rezistentné k antibiotikám. Najznámejšími zástupcami sú *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* a *Enterococcus faecium*, ktoré bývajú radené medzi probiotické mikroorganizmy [21].

Enterococcus faecalis ako fakultatívny anaerób kvasí glukózu bez produkcie plynu na kyselinu mliečnu a neprodukuje katalytickú reakciu s peroxidom vodíka. Na neutrálnom bujone môže fermentáciou tvoriť aj väčšie množstvo kyseliny mravčej, octovej a ethanolu. Katabolizujú glycerol, laktát, malát, arginín a ketokyseliny pričom uvoľňujú do okolia energiu. *E.faecalis* môže spôsobiť zápal mozgových blán [22].

2.2.3.4. Rod *Lactococcus*

Lactococcus je rod mliečnych baktérií, ktorý kvasí glukózu na kyselinu mliečnu, ktorá je ich hlavným a zároveň jediným produktom. Sú to grampozitívne koky, ktoré sa nachádzajú buď jednotlivo, v pároch alebo reťazcoch. Tieto organizmy sa bežne využívajú v mliekarenskom priemysle pri výrobe fermentovaných mliečnych výrobkov. Môžu sa využívať ako samotná kultúra alebo ako zmiešané kultúry s rodom *Lactobacillus* a *Streptococcus*. Tieto baktérie majú

úlohu aj v dochutení konečného produktu. Osobitná pozornosť sa venuje druhu *Lactococcus lactis subs. cremoris*, *Lactococcus lactis subs. lactis* a druhu *Lactococcus plantarum*. Využívajú sa ako štartovacie kultúry v priemyselných mliečnych kvaseniach, pričom ich účelom je produkcia mlieka a mliečnych výrobkov rýchlym okyslením, čo spôsobí pokles pH fermentovaného produktu, čo zabráni kazeniu [23].

L.lactis subs. lactis je prvým geneticky modifikovaným organizmom, ktorý ako živý môže byť použitý na liečenie ľudských chorôb. Pridaním do mlieka využíva enzýmy k tvorbe ATP z laktózy. Produkovaná kyselina mliečna zráža proteíny za vzniku tvarohu. Využíva sa aj pri výrobe nakladanej zeleniny, piva, vína, niektorých druhov chleba, sójového mlieka, kefíru a ďalších [24].

2.2.3.5. Rod *Leuconostoc*

Leuconostoc je rod grampozitívnych baktérií majúcich tvar ovoidných kokov, ktoré tvoria dlhé reťazce. Všetky druhy v rámci tohto rodu sú heterofermentatívne a sú schopné produkovať zo sacharózy dextrans. Všeobecne sú považované za nepatogénne, odolávajúce kyselinám a rastú pri teplote 18 až 25 °C. Spolu s ďalšími rodmi ako je *Pediococcus* a *Lactobacillus* sú zodpovedné za kvasenie kapusty. Ďalej sa podieľa na fermentácii kefíru.

L.carnosum je anaeróbna baktéria vyskytujúca sa v zle zabalenom mäse. Optimálna teplota pre rast je 2 °C. Táto baktéria je schopná inhibovať rast iných baktérií, preto sa využíva ako biologicky konzervačný prostriedok [25].

2.2.3.6. Rod *Streptococcus*

Bunky streptokokov majú guľatý alebo vajcovitý tvar, sú usporiadané do párov, krátkych alebo dlhších reťazcov a obyčajne sú nepohyblivé. Netvorí spóry, sú grampozitívne a fakultatívne anaeróbne mikroorganizmy, ktoré fermentujú sacharidy na kyselinu mliečnu [26].

Streptococcus thermophilus patrí do termofilnej skupiny baktérií mliečneho kvasenia. Je to grampozitívny mikroorganizmus vajcovitého tvaru s veľkosťou od 0,7 až do 0,9 μm. Tento mikroorganizmus má optimálnu teplotu rastu 40 až 50 °C a vybrané kmene rastú v mlieku bez prístupu vzduchu a vytvárajú bielu zrazeninu. Vzhľadom na svoje fyziologické, ekologické a metabolické vlastnosti sa využíva spolu s druhmi *Lactobacillus* ako štartovacia kultúra pri výrobe jogurtov a iných mliečnych výrobkov (švajčiarsky alebo taliansky syr). *S. thermophilus* nie je schopný metabolizovať galaktózu, čo môže mať za následok zlé textúru a chuť syru. Exopolysacharid vybraných kmeňov má rozhodujúci význam pre konečnú štruktúru jogurtu [27].

2.2.3.7. Rod *Pediococcus*

Pediococcus je rod grampozitívnych baktérií mliečného kvasenia, ktoré sa zvyčajne vyskytujú v pároch alebo tetradách. Sú homofermentatívne a spolu s ostatnými baktériami sú zodpovedné za kvasenie kapusty. Sú zodpovedné za kontamináciu piva a vína, ale v niektorých druhoch piva je ich prítomnosť dôležitá. Produkujú diacetyl, ktorý dodáva maslovú alebo karamelovú príchuť niektorým vínam ako je napríklad Chardonnay. Niektoré druhy sa využívajú ako očkovacie kultúry v silážnych jamách.

Ako príklad baktérie rodu *Pediococcus* je *P.pentosaceus*. Je to nepohyblivá a nesporulujúca baktéria so striktno fermentatívnym metabolizmom, ktorej hlavným produktom je kyselina mliečna. Rastie pri teplote 40 °C, v rozmedzí pH 4,5 až 8, v 9 až 10% roztoku NaCl a je schopná využívať maltózu. Môže byť izolovaná z rastlinného materiálu alebo zo syra. Využíva sa ako štartovacia kultúra na fermentáciu klobás, kukurice, zelenej fazule, sójového mlieka a na siláž [27].

2.2.4. Probiotické produkty pre deti

Probiotické a prebiotické produkty sa na českom trhu vyskytujú ako doplnky stravy, čo zhoršuje prehľadnosť a kontrolovateľnosť trhu. Situácia by bola omnoho prehľadnejšia, keby sa jednalo o registrované liečivá [28,29].

V súčasnosti sa na trhu vyskytuje nespočetne veľa výrobkov obsahujúcich probiotické kultúry, avšak väčšina z nich nie je určená pre malé deti či dojčatá. Probiotické produkty pre deti sa na trhu vyskytujú v rôznych formách. Existujú tabletky, žuvacie kapsule či kvapky. Výrobky obsahujú rôzne množstvá probiotík, pohybujú sa v odlišných cenových reláciách a sú určené pre deti v rôznych fázach života. Súčasťou probiotických produktov môžu byť aj iné, zdraviu prospešné látky [30].

Pre deti od troch rokov sú na trhu dostupné probiotické produkty väčšinou vo forme cukríkov, žuvacích tabliet alebo perorálnych roztokov ako napríklad probiotické produkty od firmy BioGaia alebo tablety na cmúľanie Dr.Max Probiomaxík (viz. Obrázok 1 a 2). Tieto produkty môžu mať rôznu príchuť.



Obrázok 1: Tablety Dr. Max ProbioMaxik [31]



Obrázok 2: Perorálny rehydratačný roztok BioGaia ProTectis Plus [32]

Aby boli probiotické produkty a teda aj samotné probiotiká bezpečné, musia spĺňať mnoho kritérií. Musia byť nepatogénne, netoxické a zároveň priaznivo pôsobiť na hostiteľa. V tráviacom trakte musia byť schopné prežiť, metabolizovať, priľnúť sa k epitelovým bunkám, rýchlo sa množiť a dočasne kolonizovať. Tiež musia obsahovať veľké množstvo životaschopných buniek, nakoľko behom skladovania dochádza k úbytku živých buniek. Musia byť odolné voči nízkemu pH, žalúdočným šťavám, žlči a pankreatickej šťave [33].

2.2.5. Riziká užívania probiotík

Okrem pozitívneho vplyvu probiotík na ľudský organizmus môžu probiotické mikroorganizmy spôsobiť aj rôzne zdravotné ťažkosti. Stáva sa tak najmä vtedy, keď sa množstvo užívaných probiotík nezhoduje s predpísaným množstvom či dávkou.

Najčastejšími vedľajšími účinkami je tvorba plynu a nadúvanie. Vo vážnejších ale zároveň zriedkavejších prípadoch môžu probiotiká spôsobiť rôzne infekcie. Ohrozenou skupinou sú deti s oslabenou imunitou alebo deti s nesprávne vyvinutou črevnou bariérou. Ďalším rizikom

nesprávneho užívania probiotických výrobkov je ich reaktivita s určitým druhom liečiv ako je napríklad sulfasalazín, ktorý sa používa práve na liečbu ulceróznej kolitídy či Crohnovej choroby. Probiotiká spôsobujú rýchlejšiu látkovú premenu týchto liečiv, čím sa zvyšuje ich obsah v tele [34].

2.3. Prebiotiká

Primárnou funkciou prebiotík je priaznivé ovplyvňovanie rastu probiotík v tráviacom trakte. Sú to polyméry na báze karbohydrátov. Vo všeobecnosti sa za prebiotikum považuje rastlinná vláknina prítomná v zelenine či ovocí [35].

Uskutočnilo sa niekoľko štúdií, ktoré dokazujú zníženie rizika vzniku ekzému u dojčiat práve vďaka konzumácii počiatočnej dojčenskej výžive doplnenej nestráviteľnými oligosacharidmi [36].

Polysacharidy morských rias je možno nájsť ako zložky ich bunkovej steny. Patrí sem celulóza, hemicelulóza a lignín, ktoré pôsobia v ľudskom organizme ako nerozpustná vláknina [37].

Polysacharidy morských rias odolávajú žalúdočným kyselinám, tráviacim enzýmom a gastrointestinálnej absorpcií, preto môžu slúžiť ako fermentačné substráty pre špecifické črevné mikrobiálne populácie. Zistilo sa, že alginátové oligosacharidy podporujú rast *Bifidobacterium bifidum* či *Bifidobacterium longum*. Preukázalo sa, že prítomnosť laminarínu spôsobuje nárast bifidobaktérií [38]. Laminarín môže pôsobiť ako imunomodulátor stimulovaním B-lymfocytov a T-lymfocytov a regulujú hladinu cholesterolu v pečeni a v krvi [37]. Fukoidan zasa pozitívne vplýva na rast laktobacilov a bifidobaktérií [38].

2.4. Fruktooligosacharidy a ich vplyv na zdravie dieťaťa

Fruktooligosacharidy alebo fruktány sú oligo- a polysacharidy zložené z fruktózových jednotiek. Fruktooligosacharidy sú známe svojimi prebiotickými vlastnosťami a mnohými zdravotnými benefitmi. Vhodným zdrojom týchto sacharidov je inulín, najčastejšie extrahovaný z koreňa čakanky. Fruktooligosacharidy sú pre človeka prospešné kvôli pozitívnemu pôsobeniu na probiotické baktérie, znižujú hladinu glukózy v krvi, zlepšujú absorpciu minerálov, stimulujú imunitný systém a inhibujú rast patogénnych mikroorganizmov [39].

Jednou z možností stanovenia fruktooligosacharidov je použitie enzymatickej hydrolýzy a následné spektrofotometrické stanovenie, prípadne stanovenie pomocou metódy HPLC [40].

2.5. β -glukány a ich vplyv na zdravie diet'at'a

β -glukány sú polysacharidy, homopolyméry β -glukózy, ktoré sa v prírode vyskytujú v rôznych konfiguráciách. Tieto polysacharidy majú pozitívne účinky na imunitný systém, pričom táto schopnosť sa zvyšuje s ich molekulovou hmotnosťou. β -glukány sú štruktúrnou jednotkou bunkových stien baktérií, rias či siníc [41].

2.6. Riasy

Riasy predstavujú skupinu veľmi rôznorodých sladkovodných a morských organizmov, do ktorej je zahrnutých viac ako 30 tisíc druhov. V súčasnej dobe sú systematicky zaradené do štyroch ríš [42].

Radia sa medzi nižšie rastliny. Jedná sa o autotrofné, jednobunkové aj mnohobunkové rastliny bez diferenciácie pletív. Nadobúdajú mikroskopické ale aj niekoľkometrové rozmery. Ich farba je daná rôznymi pigmentami, vďaka ktorým môžu z anorganických látok za účasti svetla vytvárať organickú hmotu a kyslík. Ich farba sa taktiež podieľa na taxonomickom rozdelení [43,44,45].

Ich chemické zloženie sa líši v závislosti na druhu, miesta výskytu, období zberu alebo na podmienkach okolia [46].

Riasy sa vyznačujú rozmanitosťou pohlavného aj nepohlavného rozmnožovania, ktoré je podmienené vodným prostredím. Jednobunkové riasy sa často rozmnožujú delením buniek. Pri pohlavnom rozmnožovaní sa tu vyskytuje izogamia, anizogamia a oogamia. Jedinou diploidnou bunkou je väčšinou zygota. Iba u niektorých červených, hnedých a zelených rias sa vyskytuje diploidná generácia, teda sporofyt ako samotná rastlina. Nepohlavne sa riasy rozmnožujú spórmi. Vegetatívny spôsob rias spočíva vo fragmentácii stielok (napr. u červených rias), prípadne sa vytvára špecializované rozmnožovacie teliesko [47].

2.6.1. Nutričné zloženie rias

Morské riasy, často konzumované v Číne či Japonsku, majú vysokú nutričnú hodnotu. Obsahujú vitamíny, proteíny, minerály, vlákninu a esenciálne mastné kyseliny. Skladajú sa z 80–90 % vody a ich sušina obsahuje približne 50 % sacharidov, 1–3 % lipidov a 7–38 % minerálov. Kvôli nízkemu obsahu tukov sa môžu konzumovať počas rôznych diét. Avšak chemické zloženie a podiel látok sa medzi jednotlivými druhmi líši [48].

2.6.1.1. Proteíny a aminokyseliny

Ako bolo už spomenuté vyššie, riasy sú významným zdrojom dusíkatých látok, najmä proteínov a aminokyselín. Obsahujú aj malé množstvo neproteínového dusíku, ktorého zdrojom sú voľné aminokyseliny, chlorofyl, dusičnanový a dusitanový dusík, amónne ióny a nukleové kyseliny [49].

Kvalita proteínu je posudzovaná podľa aminokyselinového zloženia. Pokiaľ obsahuje všetky esenciálne aminokyseliny v určitom množstve, je považovaný za plnohodnotný. Nutričná hodnota každého proteínu je určená limitujúcou esenciálnou aminokyselinou, ktorá je obsiahnutá v najmenšej koncentrácii vzhľadom k vaječnému proteínu, ktorého aminokyselinové zloženie je považované za ideálne a slúži pre posúdenie kvality proteínov ostatných potravín, u ktorých sa niektoré aminokyseliny vyskytujú v limitujúcej koncentrácii [50]. U rias je najčastejšou limitujúcou aminokyselinou tryptofán [51].

2.6.1.2. Minerálne látky

Minerálne látky v riasach sú zaujímavé nielen svojím obsahom, ale aj formou koloidných roztokov, v ktorých sú prítomné. Chemická forma je veľmi dôležitá pre využiteľnosť esenciálnych prvkov, pretože určuje mieru absorpcie a ich distribúciu v organizme [52].

Obsah minerálnych látok v konečnom produkte môže byť ovplyvnený aj kuchynskou úpravou rias [53].

Negatívnou vlastnosťou rias je ich schopnosť viazať olovo, kadmium, ortuť a arzén. Je to spôsobené zložením ich bunkových stien, ktoré sú bohaté na sulfatované polysacharidy, ktorých hydroxylové, síranové a karboxylové skupiny sú dôležitými väzbovými miestami pre kovové kationy [54]. Morské riasy sú taktiež významným zdrojom vápnika, čo môže byť prínosné pre deti, ktoré sú vystavené riziku nedostatku vápnika [48].

2.6.1.3. Lipidy a mastné kyseliny

Lipidy sú v riasach prítomné iba vo veľmi malom množstve, predstavujú asi iba 1–5 % sušiny. Veľký podiel však tvoria polynenasýtené ω -3 a ω -6 mastné kyseliny, ktoré slúžia ako prevencia proti kardiovaskulárnym chorobám alebo osteoporóze [51].

2.6.1.4. Vlákna

Morské aj sladkovodné riasy sú považované kvôli veľkému množstvu polysacharidov za dobrý zdroj vlákniny. Typy polysacharidov sa medzi jednotlivými druhmi líšia. Hlavnými energetickými rezervami väčšiny živých organizmov sú polysacharidy α -glukánového typu ako sú škrob a glykogén. Škrob je tvorený lineárnou amylozou a vetveným amylopektínom v rôznych stupňoch polymerizácie. Hlavnou zásobnou látkou zelených rias je škrob. Hnedé

riasy škrob nikdy netvorí, ich zásobným polysacharidom je laminaran (β -1,3- glukán) a manitol. Zásobným polysacharidom červených rias je florideový škrob (α -1,4-glukán), ktorý sa od škrobu zelených rias a rastlín líši absenciou amylózy [55,56] .

2.6.2. Pozitíva a negatíva konzumácie rias

Riasy sú bohaté na bioaktívne látky, ktoré nie sú prítomné v suchozemskej strave. Medzi tieto látky patria rôzne proteíny, polyfenoly či polysacharidy. Prídavok rias do potravinových výrobkov, či konzumácia samotných rias je spojená s nižším výskytom chronických ochorení ako sú rakovina, hyperlipidémia alebo ischemická choroba srdca. Ako prevencia pred kardiovaskulárnymi chorobami slúžia látky fukoidan a laminarín, ktoré sa izolujú z hnedých rias ako je napríklad *Laminaria* alebo *Ascophyllum nodosum*. Majú antioxidačné, protizápalové a antikoagulačné účinky. Riasy hrajú svoju rolu aj pri liečbe a prevencii metabolického syndrómu. Vďaka vysokému obsahu vlákniny sú riasy vhodným riešením pri obezite. Vláknina napomáha chudnutiu a zlepšuje vyprázdňovanie. Uvádza sa, že alginát izolovaný z bunkových stien morských rias znižuje chuť do jedla a tým pozitívne vplyva na kontrolu váhy. Okrem zníženia telesnej hmotnosti má vláknina získaná z rias dobrý vplyv na stav čriev. Existujú dohady o tom, že alginát, laminarín, xantánová guma či agar sú zdrojom prebiotických sacharidov a teda zvyšujú možnosti prežitia probiotických mikroorganizmov [57].

Avšak konzumácia rias má aj svoje negatíva. Tie sú spojené najmä s ich schopnosťou viazať ťažké kovy. Vodné prostredie (teplota vody, pH vody, salinita, zákal, obsah kyslíka a živín vo vode, kontaminácia vody ťažkými kovmi), v ktorom riasy rastú, ovplyvňuje ich schopnosť akumulovať ťažké kovy [58]. Ortuť, arzén, olovo či kadmium sa potom následne môže ukladať v pečeni, kostiach alebo obličkách a spôsobovať rôzne nervové alebo imunitné problémy [59].

2.6.3. Wakame

Patrí medzi najviac rozšírené hnedé riasy a pochádza z Japonska. Táto riasa je známa najmä kvôli jej vysokému obsahu vlákniny a alginátom, ktoré ovplyvňujú krvný tlak, krvný cukor a hladinu inzulínu [60].

Táto makroriasa je bohatá na fukoxantín, čo je xantofyl charakteristický pre hnedé morské riasy. Fukoxantín a jeho metabolity majú antioxidačné, antirakovinové a protizápalové vlastnosti [61].

2.6.4. Hijiky

Hnedá morská riasa Hijiky rastie v Japonsku a má orechovú chuť. Obsahuje 12,2 % bielkovín a 1,8 % lipidov. Obsah celkovej vlákniny je 11,4 %, čo má pozitívny vplyv na tráviacu sústavu [62]. Hijiky obsahuje ale veľké množstvo arzénu, ktorý spôsobuje rôzne ochorenia ako napríklad rakovinu, poškodenie reprodukcie a počet spermií u mužov [63].

2.6.5. Arame

Arame je hnedá riasa, ktorá sa nachádza pozdĺž pobrežia Tichého oceánu pri Japonsku. Chuťou je podobná hijiky ale arame je menej slaná [64].

V surovom stave obsahuje alginát sodný. Obsahuje mnoho bioaktívnych zlúčenín ako napríklad florotaníny alebo floroglucinové deriváty, ktoré majú protizápalové a antidiabetické vlastnosti [65]. Florotaníny sú najviac preštudovanou skupinou fenolických látok u rias. Z chemického hľadiska sú florotaníny polymérne štruktúry floroglucinolu s veľmi variabilnou molekulovou hmotnosťou [66].

2.6.6. Kombu

Hnedé riasi Kombu patria do čeľade *Laminariaceae*. Sú cenené najmä kvôli vysokému obsahu minerálov ako je vápnik, draslík, jód a železo. Taktiež obsahuje pomerne veľké množstvo vlákniny [67].

2.7. Produkty s riasovými extraktmi

V prípade detí od 3 rokov sa jedná o práškové, žuvacie formy produktov. Na slovenskom a českom trhu sa vo väčšine nachádzajú produkty s obsahom *Chlorelly vulgaris* alebo riasy Spiruliny. Obsah morských rias v sebe zahŕňajú aj produkty značky Terranova health (viz. Obrázok 3). Ďalším produktom, ktorý obsahuje riasu Spirulinu sú gumové cukríky od značky Haribo (viz. Obrázok 4). Morské riasy sú v súčasnosti známe najmä vďaka sushi a často sa používajú ako príloha k jedlu namiesto klasickej zeleniny. Stále častejšie sa využívajú aj mimo ázijských krajín, na prípravu polievok, čajov, šalátov prípadne usušené riasy sa môžu použiť ako korenie, či ako zdroj jódu do soli.



Obrázok 3: Multivitamín Terranova Health [68]



Obrázok 4: Haribo-želé [69]

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo vybrať a vhodne nakombinovať probiotickú kultúru spolu s riasovými výťažkami do detských príkrmov. V rámci práce bol vypracovaný rešerš na danú tému. Ďalšími cieľom bola charakterizácia jednotlivých riasových zložiek, na základe ktorej bola vybraná vhodná kombinácia probiotickej kultúry a riasového výťažku. Posledným cieľom bol návrh optimálneho zloženia detského príkrmu.

4 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

4.1. Použité chemikálie

- Kyselina sírová 96 % p.a., Lach:Ner (ČR)
- Hydroxid sodný p.a., Lach:Ner (ČR)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Vínan sodno – draselný tetrahydrát p.a., Lach:Ner (ČR)
- Hydrogénuhličitan sodný p.a., Lach:Ner (ČR)
- Uhličitan sodný bezvodý p.a., Lach:Ner (ČR)
- Síran meďnatý pentahydrát p.a., Lach:Ner (ČR)
- Síran sodný bezvodý, Lach:Ner (ČR)
- Molybdénan amónny p.a., Lach:Ner (ČR)
- Hydrogénarzeničnan sodný heptahydrát 98%, Sigma-Aldrich (IND)
- Fenol p.a., Lach:Ner (ČR)
- Chloroform pre HPLC, PENTA (ČR)
- Kyselina maleínová, Sigma-Aldrich (D)
- Hovädzí sérový albumín, Sigma-Aldrich (USA)
- Kyselina octová ľadová 98 % p.a., Lach:Ner (ČR)
- 4-Hydroxybenzhydrazide, Sigma-Aldrich
- Kyselina chlorovodíková 35 % p.a., Lach:Ner (ČR)
- Chlorid vápenatý p.a., Lachema (ČR)
- Borohydrid sodný, Sigma-Aldrich
- Dihydrogénfosforečnan sodný dihydrát p.a., Lach:Ner (ČR)
- Hydrogénfosforečnan disodný dodekahydrát, Lach:Ner (ČR)
- Azid sodný, Sigma-Aldrich
- Pepsin, Sigma-Aldrich (D)
- Pankreatin (vepřový pankreas), Sigma-Aldrich (D)
- Bile salts, Sigma-Aldrich (D)
- MRS Broth médium, Himedia (IND)
- Fructan Assay Kit, Megazyme
- β -Glucan Assay Kit (Mixed Linkage), Megazyme

- Methanol pre HPLC, Lach:Ner (ČR)
- Etylacetát pre HPLC, Lach:Ner (ČR)
- Acetonitril pre HPLC, Lach:Ner (ČR)

4.2. Použité prístroje a pomôcky

Analytické váhy: Ohaus (USA)

Predvážky: Ohaus ScoutPro (USA)

ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (SRN)

Centrifuga MiniSpin plus (Nemecko)

Magnetická miešačka: Lavat (ČR)

Spektrofotometer Helios γ (GB)

Vortex :Ohaus (USA)

Cytek NL 2000 (USA)

Centrifuga HERMLE Z 36 HK

Inkubátor INCU-Line

Trepačky Heidolph Unimax 1010

Ultimate 3000 HPLC, Thermo Fischer Scientific (USA)

HPLC zostava:

- Dionex Ultimate Series 3000 Pump
- Dionex Ultimate Series 3000 Autosampler
- Thermo Fisher Vanquish detector
- Vyhodnocovací systém Chromeleon

4.3. Charakteristika vybraných rastlinných materiálov

V rámci experimentálnej časti tejto bakalárskej práce boli použité komerčne dostupné morské riasy, bližšie popísané v kapitole 4.3.1. Ako porovnávacia zložka, bežne používaná ako prebiotikum v detských probiotických produktoch, bol použitý inulín, vláknina z čakanky. Použitá vzorka inulínu mala bielu farbu, práškovú konzistenciu a pri kontakte s vodou sa ihneď rozpustila.

4.3.1. Vzorky použitých rias

Na nasledovné analýzy boli použité riasy kombu, hijiky, arame a wakame. Morské riasy arame a hijiky sa svojim tvarom a farbou výrazne podobali. Obe boli čierne, podlhovasté a tenké. Riasa kombu mala tmavo zelenú farbu a riasa wakame bola farbou podobná riasam hijiky a arame. Vyššie spomenuté morské riasy boli zakúpené ako sušená morská zelenina.

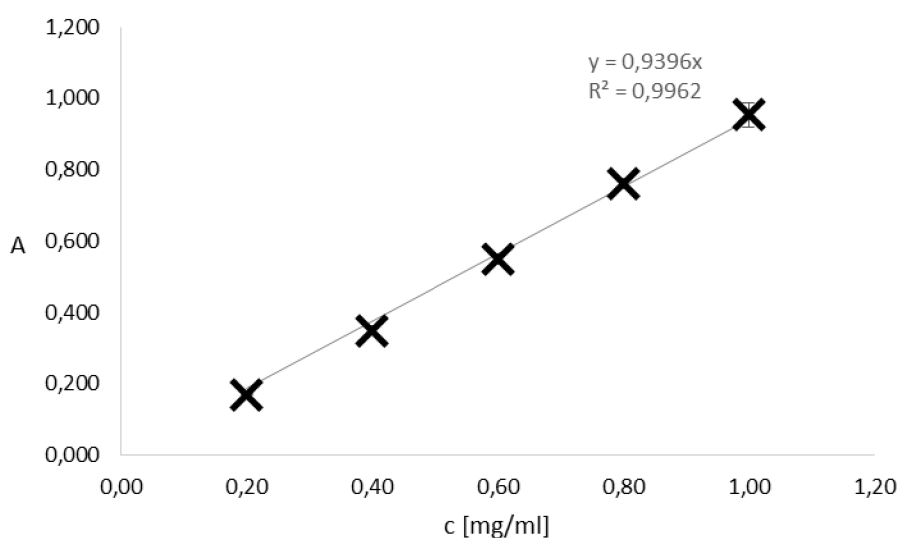
Po kontakte s vodou očividne zmenili svoju farbu a objem. Všetky riasy boli zakúpené cez internetový obchod, kvôli ich nízkej dostupnosti v kamenných obchodoch. Vzorky rias boli homogenizované pomocou elektrického mixéra na čo najmenšie časti.

4.3.2. Príprava extraktov k nasledujúcim analytickým metódam

Prvý rad vzoriek bol pripravený z 1 g rozomletého materiálu, do ktorého sa pridalo 20 ml destilovanej vody, pričom vzorka sa extrahovala 24 hodín na temperovanej trepačke pri 37 °C. Druhý rad vzoriek bol pripravený taktiež z 1 g rozomletého materiálu, ktorý bol zaliaty 20 ml horúcej vody, pričom vzorka bola extrahovaná 1 hodinu. Po uplynutí časových intervalov boli vzorky centrifugované 5 minút pri 8000 otáčkach za minútu. Supernatant bol zliaty a podrobený k nasledujúcim analýzám. Jednotlivé vzorky boli nariadené podľa potreby.

4.4. Stanovenie celkových sacharidov podľa Duboisa

K 1 ml vzorku bol pridaný 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Roztok bol riadne zamiešaný a následne inkubovaný 30 minút pri laboratórnej teplote. Bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 490 nm. Kalibračná krivka, v grafe 1, bola zostrojená pomocou roztoku glukózy s koncentráciou 0,02–1 g/l. Každá vzorka bola premeraná trikrát.



Graf 1: Kalibračná krivka celkových sacharidov, $\lambda = 490$ nm

4.5. Stanovenie redukujúcich sacharidov podľa Somogyi-Nelsona

K 1 ml vzorku bolo pridaných 0,5 ml Somogyi-Nelsonovho činidla I a II. Vzorku boli umiestnené do vriaceho kúpeľa na 10 minút. Po ochladení na laboratórnu teplotu bolo do vzoriek pridaných 0,5 ml Somogyi-Nelsonovho činidla III. Každá vzorka sa premiešala do rozpustenia zrazeniny oxidu medného. Vzorky sa doplnili na 10 ml destilovanou vodou.

Následne bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 720 nm. Kalibračná krivka, v grafe 2, bola zostrojená pomocou roztoku glukózy s koncentráciou 0,01–0,1 g/l.

- **Somogy-Nelsonovo činidlo I**

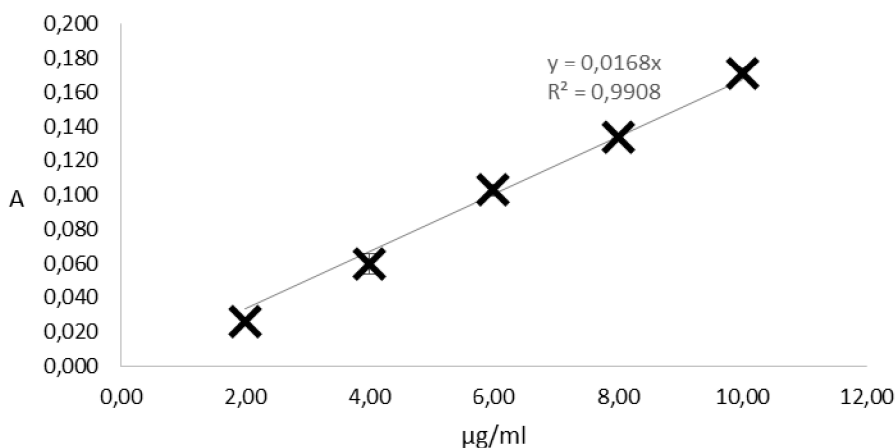
6 g uhličitanu sodného, 4 g hydrogénuhličitanu sodného a 3 g vínanu sodno-draselného bolo rozpustených v 50 ml destilovanej vody. 36 g síranu sodného bolo rozpustených v 150 ml destilovanej vody. Po rozpustení boli jednotlivé roztoky zmiešané

- **Somogy-Nelsonovo činidlo II**

4 g pentahydrátu síranu mednatého boli zmiešané s 24 g síranu sodného a s 200 ml destilovanej vody.

- **Somogy-Nelsonovo činidlo III**

25 g molybdénanu amónneho bolo rozpustených v 450 ml destilovanej vody. Následne bolo do roztoku pridaných 21 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. 3 g heptahydrátu hydrogénarzeničnanu sodného bolo rozpustených v 25 ml destilovanej vody. Oba roztoky boli zmiešané a výsledný roztok bol ponechaný 48 hodín v tme pri laboratórnej teplote.



Graf 2: Kalibračná krivka redukujúcich sacharidov, $\lambda = 720$ nm

4.6. Stanovenie sacharidov metódou HPLC

Do kadičiek boli navážené jednotlivé vzorky o hmotnosti 2,5 g. Následne bolo pridaných 25 ml destilovanej vody a obsah všetkých kadičiek bol zahrievaný na 50 °C po dobu 30 minút za stáleho miešania. Potom bolo pridaných 25 ml chloroformu, pričom obsah kadičiek bol ďalej zahrievaný na 50 °C po dobu 15 minút. Pripravené roztoky boli ochladené na laboratórnu teplotu do vytvorenia dvojfázového rozhrania. Pomocou dekantácie bola odobraná vrchná

vodná časť do centrifugačnej skúmavky. Vzorky boli centrifugované pri 6 000 otáčkach za minútu 5 minút. Všetky vzorky boli zdekantované do nových 20 ml sklenených vialiek a následne boli prefiltrované pomocou 0,45 µm nylonových filtrov do nových vialiek [70].

Tabuľka 1: Parametre merania

Mobilná fáza	acetonitril : voda 75 : 25
Kolóna	Luna Omega 3 µm, 200
Prietok mobilnej fázy [ml/min]	1
Detektor	refraktometrický
Doba analýzy [min]	15
Teplota [°C]	35
Dávkovaný objem [µl]	20

Najprv boli stanovené kalibračné krivky D-xylózy, D-glukózy, sacharózy, arabinózy a maltózy v rozmedzí koncentrácií 0,5–10 g/l, podľa podmienok zobrazených v tabuľke 1. Následne prebiehala analýza vybraných vzoriek v duplikátoch. Koncentrácia sledovaných sacharidov bola následne vypočítaná podľa vypočítaných hodnôt kalibračných rovníc v tabuľke 2.

Tabuľka 2: Kalibračné rovnice vybraných sacharidov

Stanovovaný sacharid	Kalibračná krivka	R ²
D-xylóza	$y = 2,1388 x$	0,9996
D-glukóza	$y = 2,6174 x$	0,8493
Sacharóza	$y = 2,6803 x$	0,9606
Maltoza	$y = 2,6851 x$	0,9584
Arabinóza	$y = 3,1255 x$	0,9874

4.7. Stanovenie vlákniny podľa Henneberga a Stohmana

Do 500 ml destilačnej banky boli navážené 2 g rozomletého vzorku. Pridalo sa 200 ml 5% roztoku kyseliny sírovej a obsah destilačnej banky sa varil pod spätným chladičom 30 minút. Potom bola zmes za tepla filtrovaná cez filtračný kelímok a bola premytá teplou vodou. Zbytok vzorku bol kvantitatívne prevedený späť do destilačnej banky pomocou 200 ml 5% roztoku hydroxidu sodného. Vzorka sa opäť varila pod spätným chladičom 30 minút. Po skončení varu sa roztok zfiltraval, premyl teplou vodou a etanolom. Obsah filtračného kelímku bol sušený pri 105 °C, po vychladnutí bol kelímok zvažovaný a následne vložený do muflovej pece, kde bol obsah spálený pri 650 °C. Po vychladnutí sa obsah kelímku zvažil. Obsah prítomnej

nerozpustnej vlákniny bol stanovený na základe rozdielu hmotnosti filtračného kelímku po vysušení a po vyžihaní.

4.8. Stanovenie obsahu fruktooligosacharidov

Meranie obsahu fruktooligosacharidov v jednotlivých vzorkách rias a inulínu bolo uskutočnené pomocou Fructan Assay Kit od spoločnosti Megazyme.

Na túto analýzu bolo do uzatvárateľných skúmaviek navážených 200 mg homogenizovaného vzorku rias. V prípade vzorky inulínu bola navážka 50 mg. Následne sa pridalo 12,5 ml destilovanej vody a skúmavky sa jemne privreli. Všetky skúmavky boli umiestnené do vriacej vody na 5 minút. Po uplynutí časového intervalu sa skúmavky úplne uzavreli, premiešali a dali sa do vriaceho kúpeľa na ďalších 5 minút. Potom sa skúmavky z vriaceho kúpeľa vybrali a opäť premiešali. Všetky vzorky boli ochladené na laboratórnu teplotu. Z každej vzorky boli odobrané 2 ml, ktoré boli následne centrifugované 5 minút pri 13 000 otáčkach za minútu. K 0,2 ml supernatantu bolo pridaných 0,2 ml roztoku sacharázy s amylázou a zmes sa inkubovala 30 minút pri 30 °C. Potom sa pridalo 0,2 ml alkalického roztoku borohydridu sodného, skúmavky sa prekryli parafilmom a inkubovali sa pri 40 °C 30 minút. Po ukončení inkubácie sa pridalo 0,5 ml roztoku kyseliny octovej a všetky skúmavky boli premiešané na vortexe. Takto pripravené roztoky sa rozdelili do troch nových skúmaviek po 0,2 ml. Do dvoch skúmaviek bolo pridaných 0,1 ml roztoku fruktanázy a do tretej, slepej vzorky, sa pridalo 0,1 ml acetátového pufru. Ďalej prebiehala inkubácia pri 40 °C 30 minút. Pridalo sa 5 ml PAHBAH reagentu, všetky skúmavky boli ponorené do studenej vody na 5 minút. Následne sa zmerala absorbancia pri 410 nm. Množstvo fruktánov bolo vypočítané podľa nasledujúcej rovnice:

$$fuktan = \Delta A \cdot F \cdot 5 \cdot 25 \cdot \frac{1,1}{0,2} \cdot \frac{100}{W} \cdot \frac{1}{1000} \cdot \frac{162}{180} \cdot D = \left(\% \frac{w}{w}\right)$$

Rovnica 1: Vzorec výpočtu obsahu fruktánov

- ΔA ...rozdiel absorbancie vzorku od absorbancie blanku
- F ... faktor premeny absorbancie na μg D-fruktózy rovný podielu 54,5 μg D-fruktózy a absorbancie 54 μg D-fruktózy
- 25.. objem extraktu v ml
- W ...hmotnosť vzorky v mg
- D ...riedenie

4.9. Stanovenie obsahu β -glukánov

Stanovenie bolo uskutočnené pomocou β -Glucan Assay Kit (Mixed Linkage), taktiež od spoločnosti Megazyme. Táto súprava sa používa na stanovenie β -glukánov v rôznych druhoch vzoriek, napríklad v mliečnych nápojoch, jogurtoch či alkoholických nápojoch. V rámci tejto bakalárskej práce sa však využil postup zo súpravy na stanovenie β -glukánov vo vzorkách ovsenej a jačmennej múky a vo vzorkách vlákniny.

Na analýzu bolo navážených 80–120 mg zhomogenizovaného vzorku do sklenených skúmaviek. Ku každej vzorke sa pridalo 0,2 ml etanolu a 4 ml fosfátového pufru. Jednotlivé zmesi boli premiešané na vortexe. Všetky skúmavky boli umiestnené do vriaceho kúpeľa na 60 sekúnd, potom sa obsah skúmaviek premiešal na vortexe a inkubovalo sa ďalej vo vriacom kúpeli po dobu 2 minút. Skúmavky sa opäť premiešali a ďalej sa inkubovali pri 50 °C po dobu 5 minút. Potom sa pridalo 0,2 ml lichenázy, skúmavky sa prekryli parafilmom a inkubovali sa 1 hodinu pri 50 °C za občasného premiešania. Následne sa pridalo 5 ml acetátového pufru a obsah skúmaviek sa opäť premiešal. Všetky vzorky sa nechali ochladiť na laboratórnu teplotu, boli centrifugované 10 minút pri 8 000 otáčkach za minútu a supernatanty boli rozdelené po 0,1 ml do troch skúmaviek. Do dvoch sa pridalo 0,1 ml β -glukozidázy a do tretej, slepej vzorky, sa pridalo 0,1 ml acetátového pufru. Tieto tri skúmavky sa inkubovali 10 minút pri 50 °C. Potom sa pridali 3 ml GOPOD reagentu do každej skúmavky a inkubovalo sa 20 minút pri 50 °C. Následne sa zmerala absorbancia pri 510 nm.

$$\beta - \text{glukány} = \Delta A \cdot F \cdot \frac{FV}{0,1} \cdot \frac{1}{1000} \cdot \frac{100}{W} \cdot \frac{162}{180} \cdot D$$

Rovnica 2: Vzorec výpočtu množstva β -glukánov

- ΔA ...rozdiel absorbancie vzorku od absorbancie blanku
- F... faktor premeny absorbancie na μg glukózy
- FV... konečný objem = 9,4 ml
- W... hmotnosť vzorky v mg
- D...riedenie

4.10. Stanovenie pigmentov pomocou metódy HPLC

K 15 mg vzorku bol pridaný 1 ml destilovanej vody. Vzorka bola centrifugovaná pri 10 000 otáčkach za minútu 5 minút. Voda bola zliata a k peletu bolo pridaných 300 mg sklenených guličiek a 1 ml metanolu. Skúmavky boli intenzívne miešané na vortexe po dobu 10 minút. Obsah bol kvantitatívne prevedený do sklenených skúmaviek pomocou 2 ml chloroformu a zmesi boli vortexované ďalších 10 minút. Následne bol pridaný 1 ml destilovanej vody na vytvorenie fázového rozhrania. Obsahy skúmaviek boli centrifugované pri 3 000 otáčkach za minútu po dobu 5 minút. Spodná chloroformová časť bola odseparovaná a odparená pod dusíkom pri 25 °C. Bol pridaný 1 ml zmesi etylacetátu : acetonitrilu v pomere 20:60. Zmes bola prefiltrovaná cez striekačkový filter do sklenených vialiek na analýzu HPLC.

Tabuľka 3: Podmienky analýzy

Kolóna	Kinetex, EVO 150 x 4,6 mm, 2,6 μm
Objem vzorku [μl]	20
Elúcia	gradientová
	0-13 min: od 100% A do 100% B
	13-19 min: 100% B
	19-20 min: od 100% B do 100% A
	20-25 min: 100% A
PDA [nm]	285, 435, 450 , 680
Teplota [°C]	25
Čas analýzy [min]	25

Tabuľka 4: Zloženie mobilnej fázy

A		B	
Acetonitril	840 ml	Metanol	680 ml
Metanol	20 ml	Etylacetát	320 ml
0,1M Tris-HCL	140 ml		

V tabuľkách 3 a 4 sú uvedené podmienky vykonania analýzy HPLC. Obsahy jednotlivých pigmentov boli vypočítané z kalibračných kriviek, ktoré sú uvedené v tabuľke 5.

Tabuľka 5: Kalibračné krivky pigmentov

β-karotén	$y = 3,9153 x$
Chlorofyl a	$y = 8,3273 x$
Chlorofyl b	$y = 4,4285 x$

4.11. Stanovenie vplyvu extraktov vybraných rastlinných materiálov na viabilitu probiotických kultúr

4.11.1. Použité probiotické kultúry

V experimentálnej časti tejto bakalárskej práce boli použité probiotické kultúry *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bifidobacterium breve* CCM 7825T. Spomenuté probiotické kultúry boli získané z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne.

4.11.2. Kultivácia probiotických kultúr

Kultivácia probiotických kultúr spomenutých v kapitole 4.11.1 prebiehala v tekutom médiu, ktoré bolo pripravené zmiešaním 55,15 g MRS média s 1 l destilovanej vody. Takto pripravené médium bolo sterilizované v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 20 minút pri 121 °C. Sterilné médium bolo zaočkované 10% inokulom danej probiotickej kultúry v sterilnom boxe do plastových skúmaviek. Kultivácia prebiehala anaeróbne pri 37 °C 24 hodín.

4.11.3. Interakcia extraktov rias a inulínu s probiotickými kultúrami

Stanovenie vplyvu jednotlivých rastlinných extraktov na probiotické baktérie bolo vykonané pomocou merania optickej hustoty prístrojom ELISA Reader-om a následne pomocou prietokového cytometru. Na analýzu boli použité riasy kombu, hijiky, arame, wakame a inulín.

4.11.3.1. Stanovenie optickej hustoty probiotických buniek v kombinácii s rastlinnými extraktami

Probiotické kultúry, nakultivované podľa postupu v kapitole 4.11.2, boli riadne nariadené tak, aby absorbanca blanku, teda čistej kultúry, vykazovala hodnotu 0,1 pri vlnovej dĺžke 630 nm. Následne bolo do 96-jamkových doštičiek pipetovaných 300 µl nariadenej kultúry a 30 µl vzorky extraktu podľa zvolenej koncentračnej rady, a to v triplikátoch. Zvýšenie počtu

probiotických buniek bol stanovovaný z rozdielu zákalu nameraného ELISA Reader-om pri 630 nm v čase 0 hodín a v čase 24 hodín.

4.11.3.2. Stanovenie viability probiotických buniek pomocou prietokovej cytometrie

Vzorky buniek s rastlinnými extraktami boli vhodne nariadené sterilnou destilovanou vodou. K 1 ml takto nariadenej vzorky bolo pridaných 5 μ l fluorescenčného farbiva propidiumjodidu s koncentráciou 1 g/l. Všetky vzorky boli odložené na 5 minút do tmy, potom boli vzorky analyzované pomocou prietokového cytometra.

4.12. Modelové trávenie probiotických buniek s prídavkom prebiotík

Na simuláciu modelového trávenia probiotických buniek s prídavkom riasových extraktov a inulínu a k stanoveniu ich viability po trávení boli pripravené nasledovné modelové tráviace šťavy.

4.12.1. Modelová žalúdočná šťava

V 100 ml destilovanej vody bolo rozpustených 0,25 g pepsínu. Potom bolo pridaných 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkovej. Výsledné pH roztoku bolo upravené na hodnotu 0,9.

4.12.2. Modelová pankreatická šťava

Pankreatická šťava bola pripravená rozpustením 0,25 g pankreatínu a 1,5 g hydrogénuhličitanu sodného v 100 ml destilovanej vody. Výsledný roztok bol upravený na hodnotu pH 8,9.

4.12.3. Modelová žľčová šťava

Do 200 ml fosfátového pufru o pH 8 bolo pridaných 0,8 g žľčových solí.

4.12.4. Stanovenie viability probiotických buniek počas modelového trávenia

Probiotické kultúry boli najskôr scentrifugované pri 5 000 otáčkach za minútu po dobu 5 minút. Supernatant bol zliaty a pelet buniek bol rozsuspendovaný v 10 ml sterilnej vody. Postup premytia bol ešte raz zopakovaný. Bunkové suspenzie boli po 0,5 ml pridané k 4,5 ml jednotlivých extraktov rias a inulínu. Na prípravu slepej vzorky bolo použitých 4,5 ml vody. Jednotlivé zmesi boli premiešané a inkubované 15 minút pri laboratórnej teplote. K roztokom bolo pridaných 5 ml žalúdočnej šťavy. Po 30 minútach na temperovanej trepačke pri 37 °C bol z jednotlivých zmesí odobraný 1 ml na analýzu a k zvyšku bolo pridaných 4,5 ml pankreatickej a 4,5 ml žľčovej šťavy. Pripravená zmes bola 90 minút inkubovaná na temperovanej trepačke pri 37 °C. Vzorky boli po ukončení modelového trávenia centrifugované pri 5 000 otáčkach za minútu po dobu 5 minút. Supernatant bol zliaty a pelet rozsuspendovaný v 1 ml sterilnej

vody a pripravený na ďalšie stanovenia. Všetky vzorky, ktoré boli podrobené analýze boli v triplikátoch nanosené na 96-jamkové mikrotitračné doštičky. Použilo sa 30 μ l vzorky a 300 μ l čistého MRS média. Zvýšenie počtu probiotických buniek bol stanovovaný z rozdielu zákalu nameraného ELISA Reader-om pri 630 nm v čase 0 a 24 hodín. Následne sa vykonalo stanovenie počtu buniek pomocou prietokovej cytometrie podobne ako v kapitole 4.11.3.2.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Predložená bakalárska práca je zameraná nielen na charakterizáciu vybraných riasových extraktov z hľadiska ich sacharidového profilu ale aj na vplyv jednotlivých riasových extraktov na viabilitu probiotických buniek pri štandardných kultivačných podmienkach a potom pri podmienkach modelového trávenia. Na základe vyhodnotených výsledkov bolo nakoniec navrhnuté optimálne zloženie detského príkrmu s dôrazom na prínos zdravotných benefitov pre dieťa.

5.1. Výsledky stanovenia množstva celkových sacharidov

Stanovenie celkových sacharidov bolo vykonané pomocou spektrofotometrickej metódy podľa Duboise, podľa postupu uvedeného v kapitole 4.4. Každé meranie bolo zopakované trikrát, následne bol vypočítaný priemer a smerodatná odchylka. Všetky namerané výsledky celkových sacharidov boli porovnané s hodnotami udávanými na etikete výrobku pomocou percentuálneho rozdielu.

Tabuľka 6: Namerané množstvá celkových sacharidov

Výrobok	Množstvo celkových sacharidov [g/100g]				
	Namerané hodnoty		Tabelované hodnoty	Rozdiel [%]	
	24h	1h		24h	1h
Kombu	22,37 ± 2,54	21,59 ± 2,17	55,90	59,98	61,38
Wakame	7,70 ± 0,38	8,10 ± 0,52	39,70	80,60	79,60
Hijiky	9,55 ± 1,32	11,00 ± 1,85	<0,1	98,95	99,09
Arame	8,10 ± 1,54	7,64 ± 1,04	0,50	93,83	93,46
Inulín	87,31 ± 0,38	84,26 ± 0,72	97,00	9,99	13,13

V tabuľke 6 sú uvedené množstvá celkových sacharidov, ktoré boli vypočítané z rovnice kalibračnej krivky uvedenej v grafe 1 a následne prepočítané na navážku 100 g.

Najvyšší obsah celkových sacharidov bol stanovený vo vzorke inulínu. Experimentálne stanovené množstvo celkových sacharidov sa od deklarovanej hodnoty najviac líšilo u vzorky hijiky a arame, ktoré zároveň obsahovali aj najväčšie množstvo nerozpustnej vlákniny (viz Tabuľka 9). V prípade rias a ich pomerne vysokého obsahu nerozpustnej vlákniny nemuselo dôjsť k dostatočnej extrakcii sacharidov a teda nemuseli byť všetky detekované. Najmenej sa líšilo u vzorky inulínu, kde rozdiel dosahoval približne 10 %. Na meranie boli použité dva rady extraktov ako je spomenuté v kapitole 4.3.2. Z nameraných hodnôt dvoch radov extraktov je

vidieť, že jednotlivé hodnoty sa príliš nelíšia a sú porovnateľné. Avšak zaliat' riasu horúcou vodou a následne ju ponechať extrahovať po dobu 1 hodiny sa preukázalo ako vhodný spôsob na extrakciu sacharidov, čo je zrejmé z tabuľky 6. V prípade 24 hodinovej extrakcie studenou vodou nemuselo dôjsť k dostatočnému vyextrahovaniu sacharidov. V prípade vzorky inulínu, wakame a hijiky je obsah celkových sacharidov vyšší pri 1 hodinovej inkubácii po zaliatí vzorky horúcou vodou. Podľa informácií uvedených na obale jednotlivých riasových produktov, by sa mali použité morské riasy najprv extrahovať vo vlažnej vode a následne variť v horúcej vode po dobu približne 30 minút.

Zrejmé odchýlky experimentálnej hodnoty od hodnoty uvedenej na obale môžu byť spôsobené uvedením vyššej hodnoty ako sa v danej potravine nachádza. V prípade hijiky a arame experimentálne stanovené množstvo prevyšuje tabelovanú hodnotu. Tento významný rozdiel môže byť taktiež spôsobený nesprávne uvedeným množstvom sacharidov na obale výrobku. Pri porovnaní sušených rias hijiky a arame od iného výrobcu bolo množstvo celkových sacharidov očividne vyššie a bolo porovnateľné s nameranými hodnotami uvedenými v tabuľke 6.

5.2. Výsledky stanovenia množstva redukujúcich sacharidov

Stanovenie množstva redukujúcich sacharidov bolo vykonané pomocou spektrofotometrickej metódy podľa Somogyi-Nelsona. Všetky merania boli prevedené trikrát, z čoho bol vypočítaný priemer a smerodatná odchylka. Následne boli namerané výsledky porovnané s hodnotami uvedenými na obale výrobku podobne ako u celkových sacharidov.

Tabuľka 7: Spracované výsledky merania redukujúcich sacharidov

Výrobok	Množstvo redukujúcich sacharidov [g/100g]				
	Namerané hodnoty		Tabelované hodnoty	Rozdiel [%]	
	24h	1h		24h	1h
Kombu	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,00	100,00	100,00
Wakame	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,06	0,20	70,00	50,00
Hijiky	0,17 ± 0,03	0,28 ± 0,15	<0,2	41,18	64,29
Arame	0,43 ± 0,27	0,40 ± 0,05	0,20	53,49	50,00
Inulín	1,80 ± 0,73	2,00 ± 0,83	7,00	74,29	71,43

V tabuľke 7 sú uvedené hodnoty množstiev redukujúcich sacharidov, ktoré boli vypočítané z rovnice kalibračnej krivky uvedenej v grafe 2 a následne prepočítané na navážku 100 g.

Namerané hodnoty redukujúcich cukrov boli porovnané s deklarovými hodnotami uvedenými na etikete výrobku, konkrétne s hodnotou, ktorá je na obale označená ako cukry. Hodnota cukrov na obale produktu pravdepodobne zahŕňa mono- a oligosacharidy, z ktorých

ale nie všetky môžu byť redukujúce, čo mohlo následne spôsobiť väčšie percentuálne rozdiely medzi nameranými a deklarovanými hodnotami. Doplňujúce informácie ohľadom sacharidov boli získané pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie.

Najmenší rozdiel bol zaznamenaný u riasy hijiky a arame. Najviac redukujúcich cukrov obsahuje podľa nameranej aj deklarovanej hodnoty inulín. Najväčší percentuálny rozdiel bol u riasy kombu, ktorá má na obale uvedený nulový obsah cukrov.

5.3. Charakterizácia vybraných vzoriek z hľadiska obsahu sacharidov pomocou metódy HPLC

Premeraním koncentračných rád sacharidov v rozmedzí 0,5-5 mg/ml boli získané kalibračné rovnice, uvedené v tabuľke 2, ktoré boli následne použité na výpočet koncentrácie jednotlivých sacharidov vo vybraných extraktoch. Vzorky boli premerané dvakrát, bol vypočítaný priemer a smerodatná odchylka.

V tabuľke 8 sú uvedené výsledky analýzy sacharidov rastlinných produktov. Ako je zrejmé z tabuľky 8, významný obsah sacharidov mala vzorka inulínu, pričom najväčšie množstvo činila zmes D-glukózy a fruktózy podobne ako u vzorky arame. Zmes D-glukózy a fruktózy bola detegovaná v chromatograme každej vzorky. Disacharid sacharóza sa vyskytovala jedine u vzorky wakame, kde sa vyskytovala v pomerne veľkom množstve. Arabinóza bola zistená u riasy kombu, wakame a inulínu v menších množstvách. Ani u jednej vzorky nebola detegovaná maltóza.

Tabuľka 8: Vypočítané hodnoty obsahov jednotlivých sacharidov

Produkt	Koncentrácia sacharidu [mg/g]				
	Zmes D-glukózy a fruktózy	D-xylóza	Sacharóza	Maltóza	Arabinóza
Arame	21,03	—	—	—	—
Hijiky	3,50	—	—	—	—
Kombu	4,21	—	—	—	3,07
Wakame	2,81	—	97,02	—	1,01
Inulín	26,48	2,68	—	—	2,41

Metóda HPLC na stanovenie jednotlivých sacharidov bola použitá na doplnenie metód spomenutých v kapitolách 5.2 a 5.1.

5.4. Stanovenie množstva nerozpustnej vlákniny

Stanovenie nerozpustnej vlákniny bolo uskutočnené v štyroch vzorkách rias a vo vzorke inulínu, ktorý bol braný ako referenčná vzorka, podľa postupu v kapitole 4.7. Navážka každej vzorky

bola 2 g. Obsah experimentálne zistenej nerozpustnej vlákniny bol prevedený na navážku 100 g a následne boli výsledky porovnané s množstvami vlákniny, ktoré boli teoreticky zistené z obalu použitého výrobku (viz. Tabuľka 9).

Tabuľka 9: Výsledky merania obsahu vlákniny v uvedených vzorkách

Výrobok	Množstvo nerozpustnej vlákniny [g/100g]		
	Namerané hodnoty	Tabelované hodnoty	Rozdiel [%]
Kombu	31,14	23,30	25,18
Wakame	1,81	5,00	63,80
Hijiky	50,14	66,80	24,94
Arame	64,00	72,60	11,85

Najväčší obsah nerozpustnej vlákniny bol stanovený vo vzorke riasy arame. U tejto riasy sa taktiež najmenej líši množstvo nameranej nerozpustnej vlákniny od tabelovanej hodnoty. V prípade riasy wakame bolo na výrobku udané pomerne malé množstvo nerozpustnej vlákniny, čo bolo aj experimentálne dokázané. Nerozpustná vláknina stanovená vo vybraných vzorkách rias by mohla v prípade použitia v detských príkrmoch pomôcť proti vzniku zápchy, či obezity u detí, keďže sa v žalúdku nerozpúšťa a zvyšuje pocit nasýtenosti. Vzorka inulínu bola výrobcom označená ako vláknina rozpustná, čo sa pomocou tejto metódy potvrdilo.

5.5. Výsledky stanovenia množstva fruktooligosacharidov vo vzorkách rias a inulínu

Meranie fruktooligosacharidov bolo vykonané podľa postupu uvedeného v súprave Fructan Assay Kit od spoločnosti Megazyme, pričom výsledné meranie prebiehalo spektrofotometricky podľa postupu v kapitole 4.8. Následne sa pomocou vzorca uvedeného v súprave vypočítalo množstvo fruktooligosacharidov v jednotlivých vzorkách. Vzorky boli premerané trikrát, z čoho bol vypočítaný priemer a smerodatná odchylka. Táto analýza bola vykonaná z dôvodu priaznivých účinkov fruktooligosacharidov na viabilitu probiotických buniek a pozitívnych účinkov na tráviacu sústavu dieťaťa.

Tabuľka 10: Vypočítané množstvá obsahu fruktooligosacharidov v jednotlivých vzorkách

Produkt	Množstvo fruktooligosacharidov [mg/g]
Arame	0,948 ± 0,342
Hijiky	0,714 ± 0,052
Wakame	1,394 ± 0,843
Kombu	—
Inulín	749,938 ± 3,071

V tabuľke 10 sú vidieť jednotlivé obsahy množstiev fruktooligosacharidov. Najväčšie množstvo bolo detegované vo vzorke inulínu, následne vo vzorke wakame. Vo vzorke riasy kombu bol obsah fruktooligosacharidov nedetekovateľný. Z nameraných a vypočítaných výsledkov je zrejmé, že jediným vhodným zdrojom fruktooligosacharidov je inulín. Morské riasy arame, wakame a hijiky obsahujú porovnateľné množstvá fruktooligosacharidov. Uvedené morské riasy nie sú dostačujúcim zdrojom fruktooligosacharidov pre probiotické baktérie.

5.6. Výsledky stanovenia množstva β -glukánov vo vzorkách rias a inulíne

Meranie β -glukánov bolo vykonané podľa postupu uvedeného v súprave β -Glucan Assay Kit (Mixed Linkage) od spoločnosti Megazyme, pričom výsledné meranie prebiehalo spektrofotometricky (postup uvedený v kapitole 4.9), podobne ako pri stanovení fruktooligosacharidov. Následne bolo pomocou vzorca uvedeného v súprave vypočítané množstvo β -glukánov v jednotlivých vzorkách. Vzorky boli premerané trikrát, bol vypočítaný priemer a smerodatná odchýlka.

Tabuľka 11: Výsledky analýzy β -glukánov vo vzorkách rias a inulíne

Produkt	Množstvo β -glukánov [mg/g]
Arame	980,60 ± 4,26
Hijiky	—
Wakame	—
Kombu	923,92 ± 5,83
Inulín	—

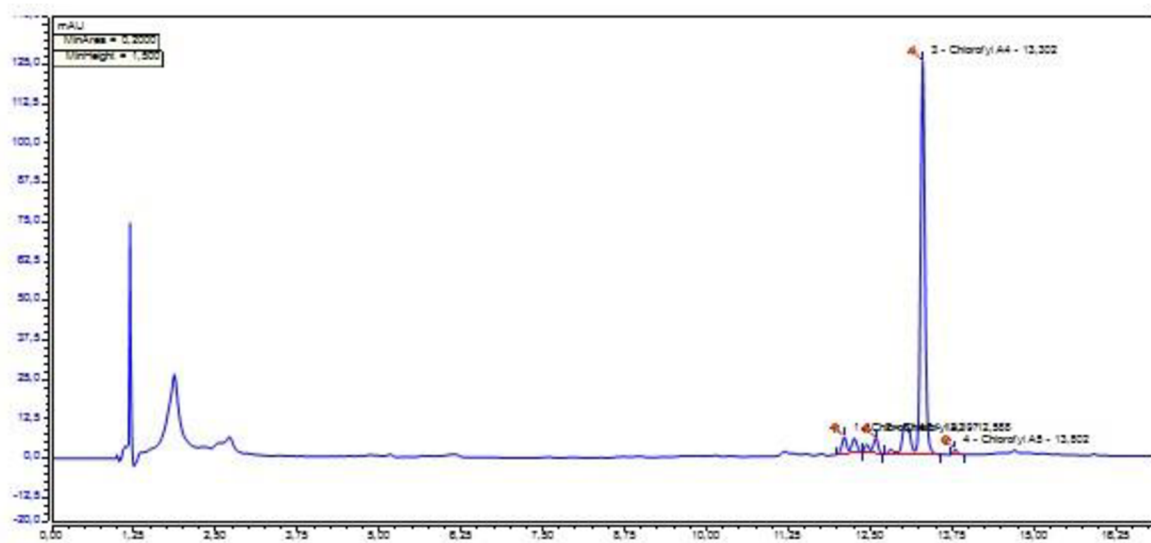
Množstvo β -glukánov bolo detegované iba vo vzorke riasy arame a vo vzorke riasy kombu. V prípade ostatných vzoriek bolo pravdepodobne množstvo β -glukánov príliš nízke na detekciu pomocou použitej metódy. Na stimuláciu imunitného systému dieťaťa by na základe nameraných dát mohla byť použitá jedine riasa arame alebo kombu.

5.7. Výsledky stanovenia pigmentov metódou HPLC

Postup analýzy stanovenia pigmentov bol vykonaný podľa postupu uvedeného v kapitole 4.10. V rámci tejto analýzy bolo zisťované množstvo zmesi chlorofylov a+b a množstvo β -karoténu.

Tabuľka 12: Vypočítané množstvá stanovovaných pigmentov

Vzorek	Množstvo pigmentov $\mu\text{g/g}$	
	β -karotén	Chlorofyly a+b
Arame	$160,66 \pm 3,21$	$95,90 \pm 1,92$
Hijiki	$46,26 \pm 0,93$	$50,60 \pm 1,01$
Kombu	$6,46 \pm 0,13$	$88,20 \pm 1,76$
Wakame	$9,38 \pm 0,19$	$110,42 \pm 2,21$



Obrázok 5: Príklad chromatogramu vzorky

Najväčšie množstvo β -karoténu bolo zistené vo vzorke riasy arame, ktorá obsahovala taktiež pomerne vysoké množstvo chlorofylov a+b. Z hľadiska zdravotných benefitov majú tieto pigmenty najmä antioxidantné vlastnosti. Najmenšie množstvo β -karoténu obsahovala vzorka riasy kombu. Všetky riasy obsahovali vysoké množstvá chlorofylov, pričom najvyšší obsah mala riasa wakame.

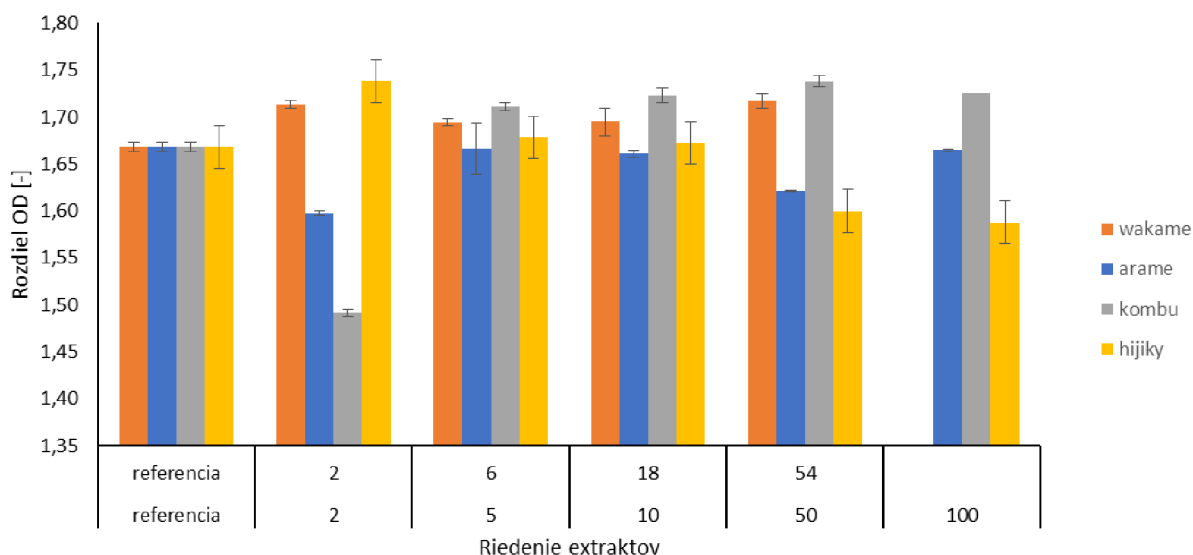
5.8. Stanovenie viability probiotických buniek v kombinácii s vybranými prebiotikami

Viabilita probiotických buniek bola skúmaná s prídavkom extraktov z riasy arame, kombu, hijiky, wakame a na porovnanie sa využila vzorka inulínu. Príprava jednotlivých extraktov pozostávala z navážky 1 g vzorky a 10 ml destilovanej vody. Vzorky boli centrifugované pri 8 000 otáčkach za minútu 5 minút. Supernatant bol zliaty, následne bola vykonaná kultivácia probiotík s vybranými extraktami za štandardných podmienok podľa postupu

v kapitole 4.11.3.1., a taktiež modelové trávenie probiotických baktérií v kombinácií s vybranými extraktami podľa postupu v kapitole 4.12.4. Použité probiotické kultúry sú spomenuté v kapitole 4.11.1.

5.8.1. Výsledky analýzy vplyvu vybraných extraktov na viabilitu probiotických baktérií

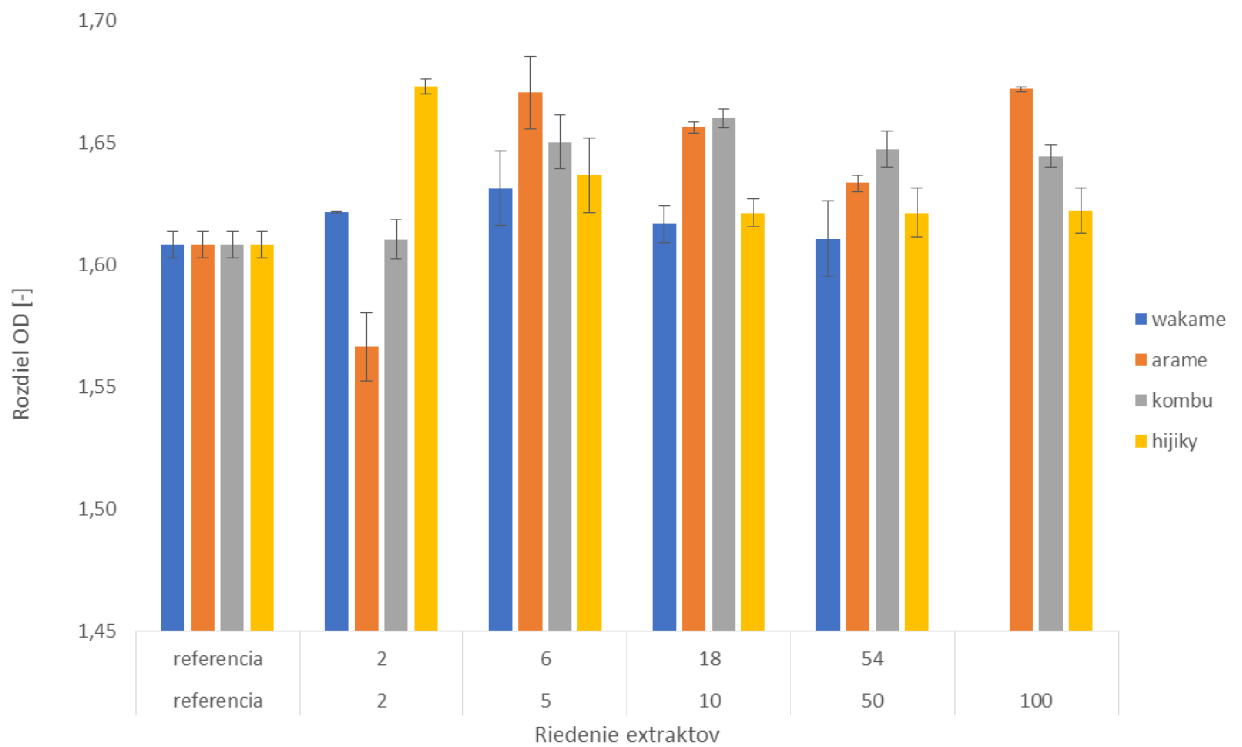
Ako prvá bola uskutočnená analýza zameraná na vplyv riasových extraktov na viabilitu probiotických buniek bez tráviacich štiav podľa postupu v kapitole 4.11.3.1. Meranie zákalu bolo vykonané v čase 0 hodín a potom po 24 hodinách. Na analýzu boli využité extrakty spomenuté v kapitole 5.8., ktoré boli následne vhodne zriedené. Potom sa stanovil rozdiel optickej hustoty za uvedený časový interval 0 a 24 hodín, vypočítal sa rozdiel od referenčnej hodnoty a smerodatnej odchýlky.



Obrázok 6: Graf zobrazujúci nárast probiotickej kultúry *Lactobacillus casei* za 24 hodín v kombinácií s riasovými extraktami

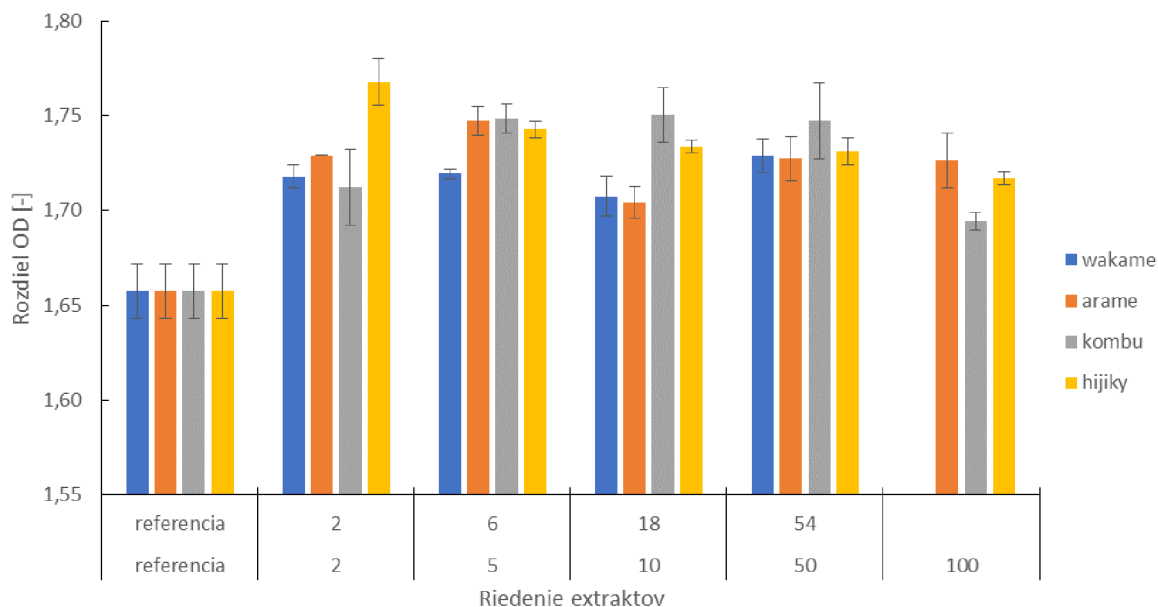
Z obrázka 6 sú vidieť jednotlivé zmeny optickej hustoty, pričom najväčší nárast kultúry *Lactobacillus casei* bol zaznamenaný v kombinácií s riasou hijiky a to presne o 4,22 % viac ako u referenčnej, slepej vzorky pri koncentracii extraktu 0,05 g/ml. Najmenší nárast kultúry bol zaznamenaný pri kombinácií probiotických buniek s riasou kombu pri koncentracii extraktu 0,05 g/ml. Pri kombinácií riasy hijiky s probiotickou kultúrou rozdiel optickej hustoty za 24 hodín so znižujúcou sa koncentraciou extraktu klesal. V prípade riasy wakame sa rozdiel optickej hustoty v závislosti na koncentracii príliš nelíšil. Probiotická kultúra

Lactobacillus casei v kombinácii s riasou arame nevykazovala nárast optickej hustoty ale naopak vykazovala pokles optickej hustoty pri porovnaní so slepou vzorkou.



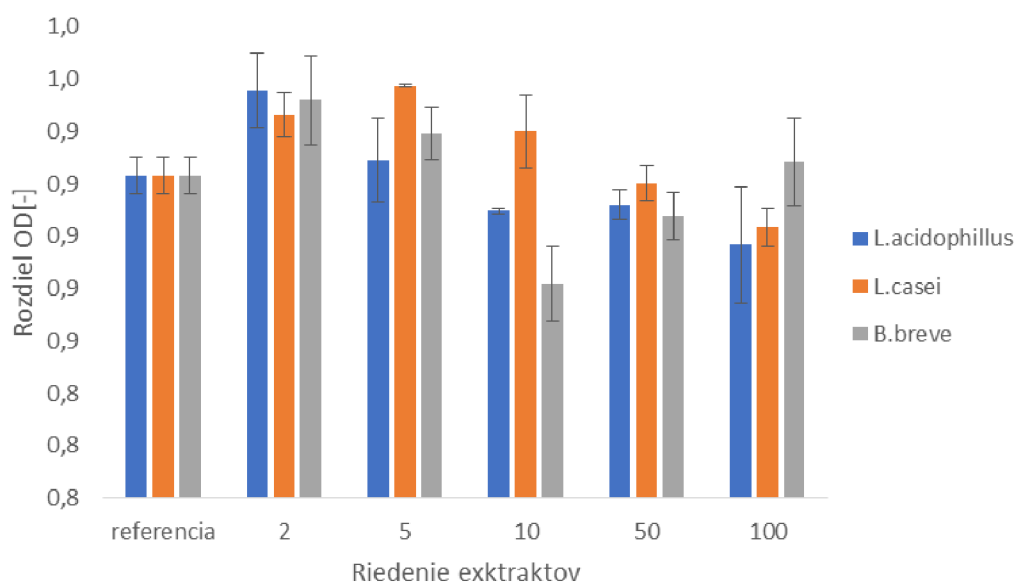
Obrázok 7: Graf zobrazujúci nárast probiotickej kultúry *Lactobacillus acidophilus* za 24 hodín v kombinácii s riasovými extraktami

V prípade probiotickej kultúry *Lactobacillus acidophilus* bol zaznamenaný najväčší nárast optickej hustoty opäť pri extrakte riasy hijiky a následne pri riase kombu a arame (Obrázok 7). Pri menších koncentráciách extraktov boli namerané väčšie nárasty optickej hustoty.



Obrázok 8: Graf zobrazujúci nárast probiotickej kultúry *Bifidobacterium breve* za 24 hodín v kombinácii s riasovými extraktami

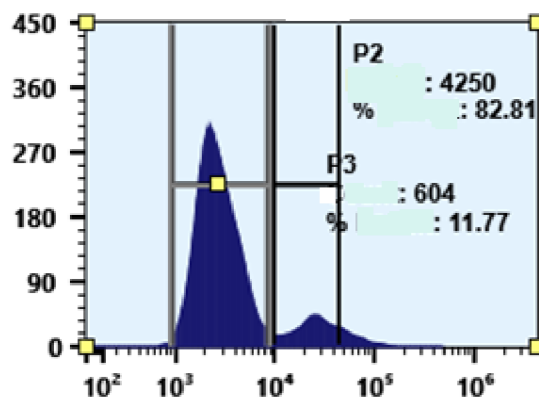
Na obrázku 8 je vidieť, že v prípade kultúry *Bifidobacterium breve* spolu s riasovými extraktami bola zaznamenaná najväčšia zmena optickej hustoty od referenčnej hodnoty. Zmena optickej hustoty probiotickej kultúry *Bifidobacterium breve* v kombinácii s riasovými extraktami je podobná vyššie uvedeným grafom, ktoré sú znázornené na obrázku 6 a na obrázku 7.



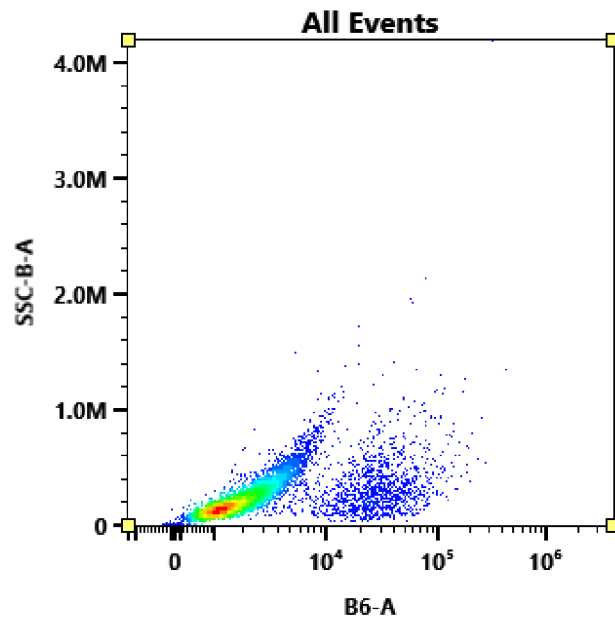
Obrázok 9: Graf zobrazujúci nárast probiotických kultúr za 24 hodín v kombinácii s inulínovými extraktami

Na obrázku 9 sú znázornené rozdiely optických hustôt jednotlivých probiotických kultúr v závislosti na riedení extraktov inulínu. Pri použití kombinácie probiotickej kultúry *Lactobacillus casei* s extraktom inulínu bol zaznamenaný nárast optickej hustoty pri koncentráciách extraktu 0,05 g/ml, 0,02 g/ml a 0,01 g/ml. Pri ďalších koncentráciách extraktu inulínu bol zaznamenaný pokles optickej hustoty od slepej vzorky najviac o 2,17 %. V prípade kombinácie probiotickej kultúry *Lactobacillus acidophilus* v kombinácii s inulínovým extraktom bol kladný percentuálny rozdiel od slepej vzorky zaznamenaný iba u koncentrácií extraktov 0,05 g/ml a 0,02 g/ml. Z nameraných dát by sa teda dalo usúdiť, že v prípade použitia inulínu je potrebná vyššia koncentrácia extraktu.

Táto spektrofotometrická analýza bola kvôli presnejším výsledkom doplnená o prietokovú cytometriu, ktorej výsledky sú uvedené v tabuľkách 13, 14 a 15. Na prietokovú cytometriu sa vždy použila vzorka probiotických buniek kultivovaných s extraktom 24 hodín za štandardných podmienok kultivácie. Postup prietokovej cytometrie je uvedený v kapitole 4.11.3.2. Na obrázkoch 10 a 11 sú vidieť počty probiotických buniek, pričom prvý pík znázorňuje živé bunky, druhý pík znázorňuje mŕtve bunky.



Obrázok 10: Príklad histogramu z prietokového cytometra kombinácie probiotickej kultúry *Lactobacillus acidophilus* s riasou hijiky



Obrázok 11: Výstup z prietokového cytometra kombinácie probiotickej kultúry *Lactobacillus acidophilus* s riasou hijiky

Tabuľka 13: Namerané hodnoty vplyvu rastlinných extraktov na viabilitu probiotických buniek kultúry *Lactobacillus casei*

Vzorka	Rozdiel optickej hustoty slepej vzorky za 24 hodín	Koncentrácia extraktu [g/ml]	Rozdiel optickej hustoty za 24 hodín	Rozdiel optickej hustoty extraktu za 24 hodín od slepej vzorky [%]	Počet probiotických buniek [CFU/ml]	
					Živé	Mŕtve
<i>Lactobacillus casei</i> CMM 4798						
Wakame	1,668	0,050	1,713	2,830	1,90·10 ⁷	4,65·10 ⁶
		0,020	1,695	1,799		
		0,006	1,695	1,419		
		0,002	1,717	3,189		
Arame	1,668	0,050	1,598	-4,217	1,52·10 ⁷	4,31·10 ⁶
		0,020	1,666	-0,140		
		0,010	1,661	-0,440		
		0,002	1,622	-2,788		
		0,001	1,665	-0,210		
Kombu	1,668	0,050	1,492	-10,582	1,46·10 ⁷	8,84·10 ⁶
		0,020	1,711	2,558		
		0,010	1,723	3,297		
		0,002	1,738	4,177		
		0,001	1,725	3,417		
Hijiky	1,668	0,050	1,738	4,217	1,97·10 ⁷	3,2·10 ⁶
		0,020	1,679	0,629		
		0,010	1,672	0,240		
		0,002	1,600	-4,077		
		0,001	1,588	-4,796		
Inulín	0,923	0,050	0,946	2,491	1,74·10 ⁷	2,42·10 ⁶
		0,020	0,957	3,682		
		0,010	0,940	1,805		
		0,002	0,920	-0,325		
		0,001	0,903	-2,166		

Tabuľka 14: Namerané hodnoty vplyvu rastlinných extraktov na viabilitu probiotických buniek kultúry *Lactobacillus acidophilus*

Vzorka	Rozdiel optickej hustoty slepej vzorky za 24 hodín	Koncentrácia extraktu [g/ml]	Rozdiel optickej hustoty za 24 hodín	Rozdiel optickej hustoty extraktu za 24 hodín od slepej vzorky [%]	Počet probiotických buniek [CFU/ml]	
					Živé	Míttve
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833						
Wakame	1,609	0,050	1,622	0,808	5,05 · 10 ⁷	1,87 · 10 ⁷
		0,020	1,631	1,420		
		0,006	1,617	0,508		
		0,002	1,611	0,135		
Arame	1,609	0,050	1,566	-2,621	1,83 · 10 ⁷	1,46 · 10 ⁷
		0,020	1,671	3,865		
		0,010	1,656	2,974		
		0,002	1,633	1,544		
		0,001	1,672	3,948		
Kombu	1,609	0,050	1,610	0,114	2,1 · 10 ⁷	9,3 · 10 ⁶
		0,020	1,650	2,601		
		0,010	1,660	3,202		
		0,002	1,647	2,414		
		0,001	1,644	2,228		
Hijiky	1,609	0,050	1,673	4,010	4,05 · 10 ⁷	5,8 · 10 ⁶
		0,020	1,637	1,751		
		0,010	1,621	0,798		
		0,002	1,621	0,798		
		0,001	1,622	0,839		
Inulín	0,923	0,050	0,956	3,502	3,5 · 10 ⁷	8,03 · 10 ⁶
		0,020	0,929	0,614		
		0,010	0,910	-1,480		
		0,002	0,912	-1,227		
		0,001	0,897	-2,888		

Tabuľka 15: Namerané hodnoty vplyvu rastlinných extraktov na viabilitu probiotických buniek kultúry *Bifidobacterium breve*

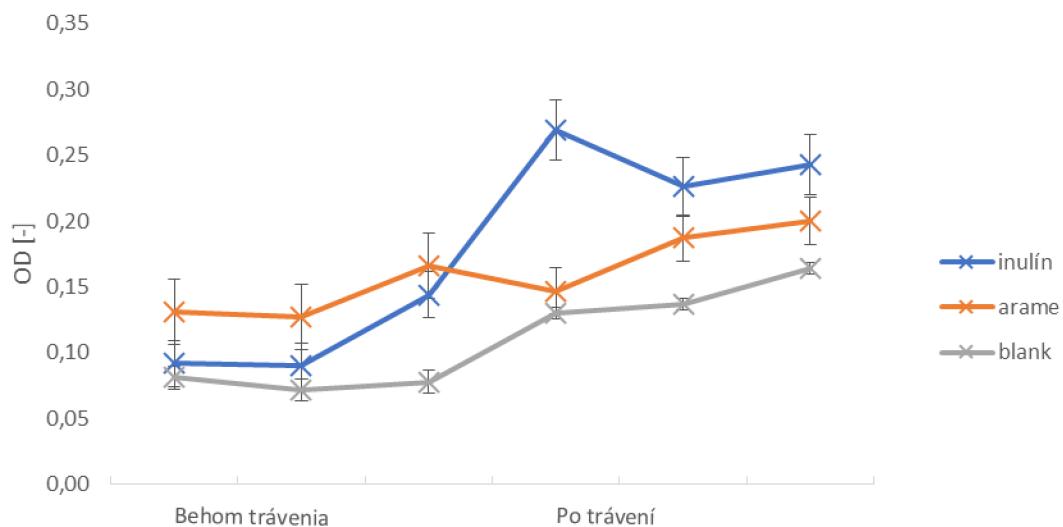
Vzorka	Rozdiel optickej hustoty slepej vzorky za 24 hodín	Koncentrácia extraktu [g/ml]	Rozdiel optickej hustoty za 24 hodín	Rozdiel optickej hustoty extraktu za 24 hodín od slepej vzorky [%]	Počet probiotických buniek [CFU/ml]	
					Živé	Mŕtve
<i>Bifidobacterium breve</i> CCM 7825						
Wakame	1,658	0,050	1,718	3,650	5,1·10 ⁷	1,5·10 ⁷
		0,020	1,720	3,741		
		0,006	1,708	3,017		
		0,002	1,729	4,314		
Arame	1,658	0,050	1,729	4,314	1,9·10 ⁷	1,5·10 ⁷
		0,020	1,747	5,420		
		0,010	1,704	2,826		
		0,002	1,727	4,213		
		0,001	1,726	4,153		
Kombu	1,658	0,050	1,712	3,288	2,2·10 ⁷	1,2·10 ⁷
		0,020	1,749	5,490		
		0,010	1,751	5,611		
		0,002	1,747	5,400		
		0,001	1,695	2,232		
Hijiky	1,658	0,050	1,768	6,647	4,8·10 ⁷	5,7·10 ⁶
		0,020	1,743	5,138		
		0,010	1,734	4,595		
		0,002	1,731	4,454		
		0,001	1,717	3,610		
Inulín	0,923	0,050	0,952	3,105	2,8·10 ⁷	6,9·10 ⁶
		0,020	0,939	1,733		
		0,010	0,882	-4,477		
		0,002	0,908	-1,697		
		0,001	0,928	0,542		

V tabuľkách 13, 14 a 15 sa nachádzajú hodnoty optických hustôt jednotlivých kombinácií probiotických kultúr a riasových výťažkov, pričom dôraz sa kládol na zistenie rozdielu optickej hustoty extraktu za 24 hodín od slepej vzorky, čo bolo vyjadrené percentuálne. V prípade kladného rozdielu, teda nárastu optickej hustoty za 24 hodín, mohlo ale dôjsť k rýchlemu úhynu probiotických buniek. Naopak v prípade zápornej hodnoty rozdielu optickej hustoty za 24 hodín od slepej vzorky sa mohol počet buniek navýšiť predĺžením kultivácie. Najviac záporných hodnôt percentuálneho rozdielu optickej hustoty extraktu za 24 hodín od slepej

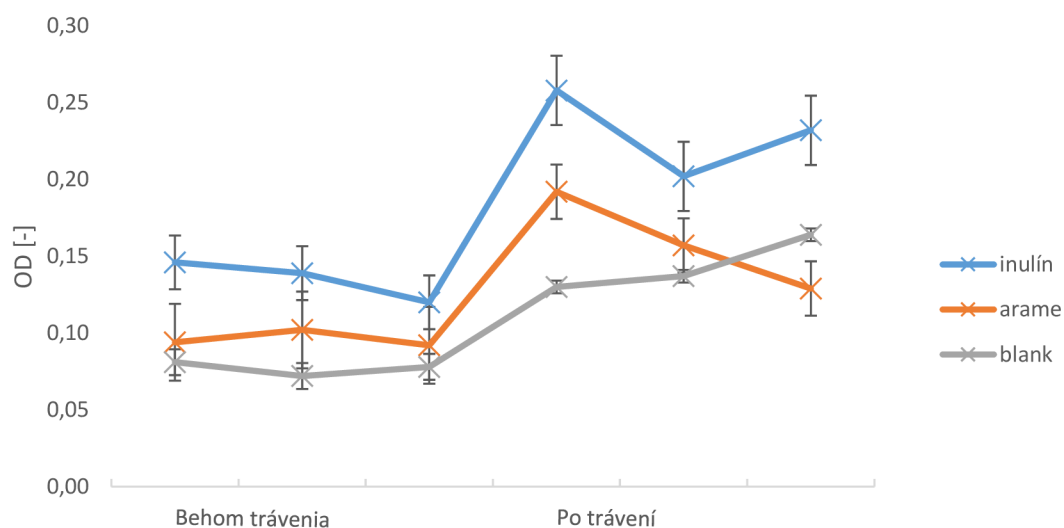
vzorky bolo zaznamenaných pri použití probiotickej kultúry *Lactobacillus acidophilus*, najmenej bolo zaznamenaných u kultúry *Bifidobacterium breve*.

5.8.2. Výsledky stanovenia viability a počtu probiotických buniek počas modelového trávenia

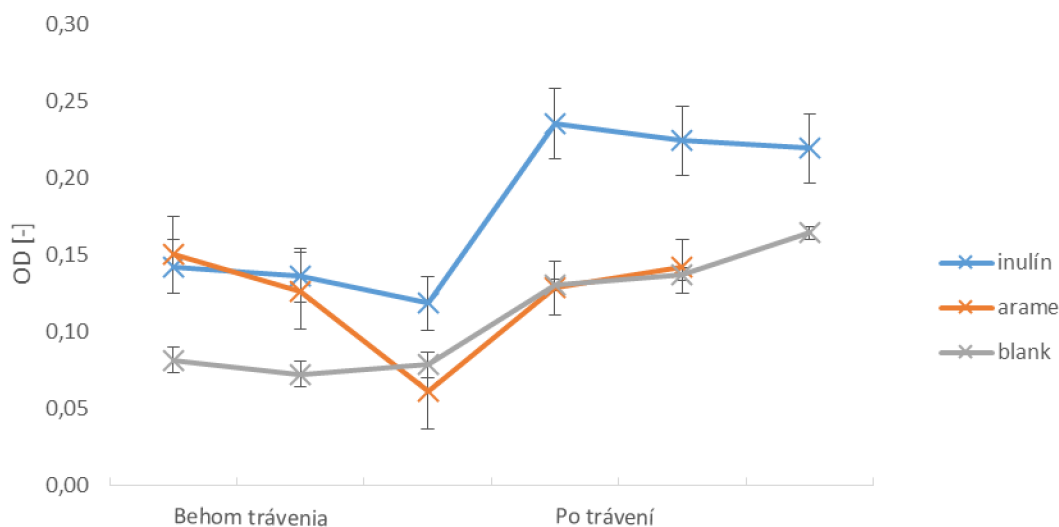
Postup a modelové tráviace šťavy, ktoré boli použité v priebehu simulácie modelového trávenia sú uvedené v kapitolách 4.12.1., 4.12.2., 4.12.3, 4.12.4. Na modelové trávenie bola ako prebiotická zložka použitá riasa arame. Dôvodom je najvhodnejšie nutričné zloženie, ktoré by probiotickým bunkám mohlo poskytovať dostatočnú výživu počas simulácie ľudského trávenia. Z hľadiska sacharidov obsahovala vzorka arame pomerne vysoké množstvo celkových aj redukujúcich sacharidov a z doplnujúcej HPLC analýzy je zrejmé, že z použitých rias obsahovala najvyššie množstvo zmesi D-glukózy a fruktózy, ktoré sú vhodným zdrojom energie pre probiotické baktérie. Ďalším dôvodom bol obsah fruktooligosacharidov a β -glukánov a taktiež vhodný obsah nerozpustnej vlákniny. Na porovnanie bola použitá vzorka inulínu. Zloženie slepej vzorky, blanku je uvedené v kapitole 4.12.4.



Obrázok 12: Graf zobrazujúci nárast optickej hustoty jednotlivých probiotických kultúr za 24 hodín odobraných počas modelového trávenia za použitia probiotickej kultúry *Lactobacillus acidophilus*



Obrázok 13: Graf zobrazujúci nárast optickej hustoty jednotlivých probiotických kultúr za 24 hodín odobraných počas modelového trávenia za použitia probiotickej kultúry *Lactobacillus casei*

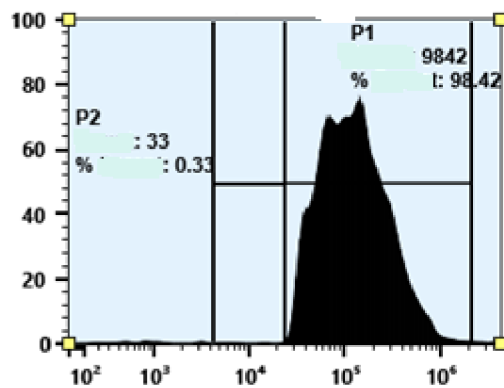


Obrázok 14: Graf zobrazujúci nárast optickej hustoty jednotlivých probiotických kultúr za 24 hodín odobraných počas modelového trávenia za použitia probiotickej kultúry *Bifidobacterium breve*

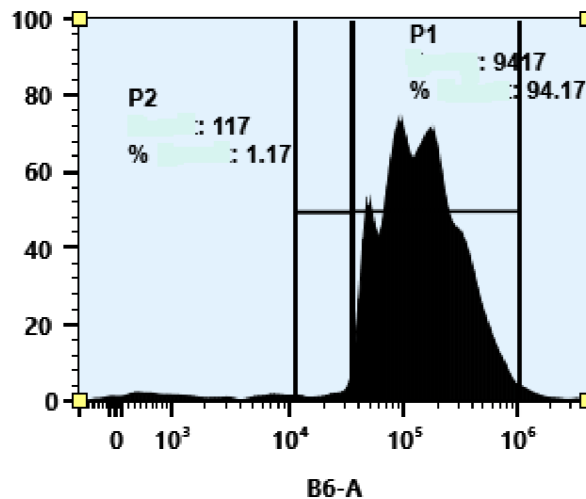
Na obrázkoch 12, 13 a 14 sú znázornené výsledky modelového trávenia, konkrétne nárast optickej hustoty odoberaných vzoriek zo zmesi probiotickej kultúry, extraktu a modelových štiav za 24 hodín. Prvé tri hodnoty na obrázkoch 12, 13 a 14 znázorňujú nárast optickej hustoty triplikátu odobraného a zmeraného v priebehu modelového trávenia, teda po pridaní žalúdočnej šťavy a pred pridaním žlčovej a pankreatickej šťavy. Ďalšie tri hodnoty zobrazujú optické hustoty triplikátu odobraného a zmeraného po ukončení modelového trávenia, teda po pridaní všetkých troch tráviacich štiav (viz kapitola 4.12.4.). Ako je zrejmé z obrázkov 12, 13 a 14 najväčší nárast optickej hustoty za 24 hodín bol zaznamenaný u vzorky inulínu. V porovnaní blanku s extraktami z riasy arame a inulínu je možné tvrdiť, že použité extrakty nemali negatívny, či antimikrobiálny vplyv na rast probiotických buniek. Pozitívum je, že aj u vzorky arame aj u vzorky inulínu došlo po ukončení modelového trávenia k zvýšeniu optickej hustoty, z čoho je možno usúdiť, že riasa arame by mohla byť použitá ako prebiotikum, spolu s inulínom, do detských príkrmov.

Pri porovnaní nárastu optickej hustoty bez tráviacich štiav a s tráviacimi šťavami je očividné, že tráviace šťavy spomaľujú množenie buniek a ich viabilitu. Táto spektrofotometrická analýza bola doplnená o prietokovú cytometriu, z ktorej bolo zistené, že viac ako 95 % probiotických buniek nevykazovalo ihneď po vykonaní modelového trávenia životaschopnosť. Prietoková cytometria bola pre kontrolu viability probiotických buniek zopakovaná opäť po 24 hodinách, pričom odobraná vzorka zmesi prebiotík, probiotík a tráviacich štiav bola inkubovaná s MRS médiom pri 37 °C. Postup prietokovej cytometrie je uvedený v kapitole 4.11.3.2. Ako je vidieť

aj z obrázkov 12, 13 a 14, nárast optickej hustoty bol iba mierny, čo sa potvrdilo aj po vykonaní prietokovej cytometrii.



Obrázok 15: Histogram znázorňujúci stav probiotických buniek *Lactobacillus acidophilus* v kombinácii s riasou arame ihneď po prevedení modelového trávenia



Obrázok 16: Histogram znázorňujúci stav probiotických buniek *Lactobacillus acidophilus* v kombinácii s riasou arame v čase 24 hodín modelového trávenia

Z obrázkov 15 a 16 je zrejmé, že počet viabilných buniek je v prípade kombinácie probiotickej kultúry *Lactobacillus acidophilus* s riasou arame zanedbateľný. Podobne tomu bolo aj u ostatných kombinácií rastlinného extraktu a probiotickej kultúry. Tráviace šťavy boli dostatočne silné na to, aby znížili viabilitu probiotických buniek.

5.9. Návrh optimálneho zloženia detského príkrmu s prídavkom prebiotík a probiotík

Posledným cieľom tejto bakalárskej práce bolo navrhnutie optimálneho zloženia detského príkrmu s dôrazom na prídavok riasových extraktov a probiotických kultúr. Na základe

nameraných a vyhodnotených dát bol uskutočnený výber vhodnej kombinácie riasy a probiotickej kultúry. Do úvahy sa bral sacharidový profil rias, ktorý bol vyhodnotený tromi rôznymi metódami, pričom dobre uspela riasa arame, ktorá obsahovala $8,10 \pm 1,54$ g/100 g celkových sacharidov pri 24 hodinovej inkubácii a $7,64 \pm 1,04$ g/100 g celkových sacharidov pri 1 hodinovej inkubácii po zalití horúcou vodou. Arame obsahovala porovnateľné množstvo zmesi D-glukózy a fruktózy ($21,03$ mg/g) so vzorkou inulínu, ktorá sa bežne používa ako prebiotická zložka do detských príkrmov. Riasa arame obsahovala aj vhodné množstvo fruktooligosacharidov ($0,948 \pm 0,342$ mg/g) a β -glukánov ($980,60 \pm 4,26$ mg/g). Z hľadiska pigmentov bolo v riasе arame stanovené najvyššie množstvo β -karoténu, ktorý je známy najmä vďaka svojim antioxidačným vlastnostiam. Riasa arame obsahovala taktiež aj vysoké množstvo nerozpustnej vlákniny, čo môže mať pre tráviaci systém detí viacero zdravotných benefitov. Ako je zrejmé z tabuľky 14 a 15, pri kombinácii extraktu zo vzorky arame spolu s probiotickou kultúrou *Bifidobacterium breve* a s kultúrou *Lactobacillus acidophilus* bol zaznamenaný pomerne vysoký nárast optickej hustoty za 24 hodín. Ako najvhodnejšia kombinácia riasy a probiotickej kultúry bola vybraná riasa arame a probiotický kmeň *Lactobacillus acidophilus*. Bolo tak uskutočnené taktiež na základe výsledkov modelového trávenia, kde táto kombinácia vykazovala nárast optickej hustoty aj napriek prítomnosti tráviacich štiav.

V rámci zlepšenia a udržania dlhšej viability probiotických buniek, počas ich prechodu tráviacim traktom, by sa mohla využiť enkapsulácia probiotických buniek, napríklad do alginátových častíc. Taktiež by sa mohla využiť lyofilizácia zmesi probiotík a prebiotík, teda rias a vybranej probiotickej kultúry. Takto pripravená zmes by sa mohla v lyofilizovanej forme pridávať do detských príkrmov ako sú napríklad detské kaše. V prípade nepríjemnej chuti niektorej zo zložiek samotného detského príkrmu by bolo potrebné pridať sladidlo, prípadne inú látku, ktorá by zlepšila senzorické vlastnosti produktu.

6 ZÁVER

Predložená práca sa zaoberala prídavkom probiotík a riasových výťažkov do detských príkrmov. Cieľom bolo výber vhodnej kombinácie riasového výťažku a probiotickej kultúry a následne navrhnuť zloženie detského príkrmu.

Morské riasy arame, wakame, kombu a hijiky boli najskôr charakterizované z hľadiska sacharidov troma rôznymi metódami. Sacharidový profil riasy bol dôležitý najmä z dôvodu výživy probiotických baktérií. V jednotlivých vzorkách boli stanovené celkové sacharidy a redukujúce sacharidy pomocou spektrofotometrických metód. Na doplnenie a upresnenie výsledkov bola použitá metóda HPLC, pomocou ktorej boli zistené množstvá už konkrétnych sacharidov. Ďalej bolo zistené, že vybrané riasové materiály obsahujú vysoké množstvá nerozpustnej vlákniny, ktorá je aj významnou zložkou ľudskej výživy. Obsah fruktooligosacharidov bol stanovený u všetkých vzoriek morských rias okrem riasy kombu. Množstvo β -glukánov bolo stanovené spektrofotometricky podobne ako pri fruktooligosacharidoch. Obsah β -glukánov bol stanovený iba u riasy kombu a arame, pričom v ostatných vzorkách bol nedetekovateľný. Následne sa opäť využila metóda HPLC na stanovenie pigmentov, pričom najväčšie množstvo β -karoténu bolo stanovené vo vzorke arame, ktorá bola navrhnutá aj do detských príkrmov. Okrem β -karoténu bola stanovená zmes chlorofylov a+b.

Po charakterizácii rias a ich zložiek bol sledovaný vplyv riasových výťažkov na viabilitu a rast probiotických buniek najprv za štandardných podmienok. Analýza bola vykonaná pomocou merania zákalu v čase 0 hodín a potom v čase 24 hodín, pričom sa do úvahy bral rozdiel optickej hustoty za uvedený časový interval. Ako porovnávaciu vzorku bol použitý inulín, ktorý sa často používa v detských príkrmoch. Následne boli výsledky zobrazené do grafov, ktoré sú zobrazené na obrázkoch 6,7,8 a 9 a do tabuliek 13,14 a 15, z ktorých sú vidieť jednotlivé optické hustoty a percentuálne rozdiely jednotlivých zmesí extraktov s probiotikami od slepej vzorky. Tieto hodnoty boli doplnené o prietokovú cytometriu, z ktorej sa získal presný počet buniek. Vďaka fluorescenčnému farbivu propidiumjodidu bolo možné stanoviť presný počet živých a mŕtvych buniek v jednotlivých zmesiach rias s probiotikami. Potom sa stanovil vplyv riasových výťažkov na viabilitu a rast probiotík za podmienok modelového trávenia. Z riasových extraktov bola vybraná riasa arame a ako porovnávaciu zložku inulín. Riasa arame bola vyhodnotená ako vzorka s najvhodnejšími vlastnosťami, či už z hľadiska sacharidového profilu, z hľadiska pigmentov, či z hľadiska vplyvu na probiotiká za

štandardných podmienok. V prípade modelového trávenia sa využilo stanovenie nárastu počtu buniek pomocou merania zákalu v dvoch fázach modelového trávenia. Prvý rad vzoriek bol zameraný behom trávenia, teda iba s použitím žalúdočnej šťavy. Druhý rad vzoriek predstavoval už aj prídavok žlčovej a pankreatickej šťavy. Oba rady boli zamerané v čase 0 hodín a potom v čase 24 hodín, z čoho bola určená zmena optickej hustoty. Z nameraných a vyhodnotených výsledkov bolo zistené, že optická hustota s časom mierne rástla. Výsledky tejto spektrofotometrickej analýzy boli doplnené o prietokovú cytometriu podobne ako pri analýze bez použitia tráviacich štiav. Z prietokovej cytometrie bolo taktiež zistené, že aj keď bol zaznamenaný nárast optickej hustoty, tak viac ako 95 % probiotických buniek bolo mŕtvych.

Posledným cieľom tejto bakalárskej práce bol návrh kombinácie probiotickej kultúry a riasového výťažku. Za vhodnú kombináciu riasy a probiotika bola na základe nameraných dát a vhodného nutričného zloženia vyhodnotená riasa arame spolu s probiotickou kultúrou *Lactobacillus acidophilus*. Táto kombinácia by sa tak mohla pridávať v podobe prášku do ovsených kaší, a tým by tak obohatila nutričnú hodnotu tohto príkrmu.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] BERKOVÁ, Kamila. Obecné zásady výživy dětí a dorostu. *Pediatric pro praxi*. 2002, roč. 2002, č. 6, s. 301-302.
- [2] NEVORAL, Jiří a Magdalena PAULOVÁ. *Výživa kojenců*. 2. vyd. Praha: Státní zdravotní ústav, 2007. ISBN 978-80-7071-286-3.
- [3] *Výživa kojenců v kontextu jejich optimálního růstu a vývoje*. *Zdravotnictví a medicína* [online]. ČR: PhDr. Iveta Ondriová, Ph. D, 2014 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/>
- [4] *Legislativa pro výrobky pro děti do 3 let. Právní požadavky SZÚ* [online]. Ing. Jitka Sosnovcová, 2008 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/pravni-pozadavky>
- [5] AND, C. Iyer a K. KAILASAPATHY. Effect of Co-encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Increasing the Viability of Encapsulated Bacteria under In Vitro Acidic and Bile Salt Conditions and in Yogurt. *Journal of Food Science* [online]. 2005, 70(1), M18-M23 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1111/j.1365- 2621.2005.tb09041.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/>
- [6] FIOCCO, Daniela, Angela LONGO, Mattia Pia ARENA, Pasquale RUSSO, Giuseppe SPANO a Vittorio CAPOZZI. How probiotics face food stress: They get by with a little help. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2020, 60(9), 1552-1580 [cit. 2020-10-21]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: [doi:10.1080/10408398.2019.1580673](https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1580673)
- [7] HUQ, Tanzina, a kol. Encapsulation of Probiotic Bacteria in Biopolymeric System. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2013, 53(9), 909-916 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1080/10408398.2011.573152. ISSN 1040- 8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/>
- [8] Vyhláška č. 397/2016 Sb. ze dne 12.12.2016, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. *Sbírka zákonů*, 2016
- [9] WILLIAMS, Toedter, 2010. Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy* [online]. Copyright © 2010 American Society of Health-System Pharmacists, Inc. All rights reserved, 67(6), 449-458 [cit. 2020-10-22]. ISSN 1079-2082. Dostupné z: [doi:10.2146/ajhp090168](https://doi.org/10.2146/ajhp090168)

- [10] TLÁSKAL, Petr. Historie a současnost počáteční dětské výživy. *Pediatric pro praxi*. 2008, roč. 2008, č. 9(2), s. 86-92.
- [11] HEMAISWARYA, S, R RAJA, R RAVIKUMAR, Isabel CARVALHO a S HEMAISWARYA. Mechanism of action of probiotics. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2013, 56(1), 113-119 [cit. 2020-11-16]. ISSN 1516-8913. Dostupné z: doi:10.1590/S1516-89132013000100015
- [12] SARKAR, S. Approaches for enhancing the viability of probiotics: a review. *British Food Journal* [online]. Emerald Group Publishing Limited, 2010, 112(4), 329-349 [cit. 2020-11-18]. ISSN 0007-070X. Dostupné z: doi:10.1108/00070701011034376
- [13] IACONELLI, Cyril, Guillaume LEMETAIS, Noura KECHAOU, Florian CHAIN, Luis G BERMÚDEZ-HUMARÁN, Philippe LANGELLA, Patrick GERVAIS a Laurent BENEY. Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *Journal of biotechnology* [online]. Elsevier B.V, 2015, 214, 17-26 [cit. 2020-11-18]. ISSN 0168-1656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2015.08.022
- [14] GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, TYPOSET, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [15] DE ANGELIS, M., GOBBETTI, M. *Lactobacillus spp.: General Characteristics*. Elsevier, 2011, vol. 3, p. 1479–1484.
- [16] BREUER, Uta. *Lactobacillus Molecular Biology. From Genomics to Probiotics*. *Biotechnology Journal*. 2009, vol. 4, issue 5, s. 769-769. DOI: 10.1002/biot.200900113. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200900113>
- [17] ANJUM, Nazia, Shabana MAQSOOD, Tariq MASUD, Asif AHMAD, Asma SOHAIL a Abdul MOMIN. *Lactobacillus acidophilus: Characterization of the Species and Application in Food Production*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014-02-05, vol. 54, issue 9, s. 1241-1251. DOI: 10.1080/10408398.2011.621169. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.621169>
- [18] SIEZEN, Roland J. a Greer WILSON. *Probiotics genomics*. *Microbial Biotechnology*. 2010, vol. 3, issue 1, s. 1-9. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2009.00159.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-7915.2009.00159.x>
- [19] MAYO, Baltasar a Douwe van SINDEREN. *Bifidobacteria: genomics and molecular aspects*. Norfolk, UK: Caister Academic, 2010, xii, 259 p., 2 p. of plates. ISBN 19-044-5568-9.

- [20] BAFFONI, Loredana, Verena STENICO, Erwin STRAHSBURGER, Francesca GAGGIÀ, Diana DI GIOIA, Monica MODESTO, Paola MATTARELLI a Bruno BIAVATI. Identification of species belonging to the Bifidobacterium genus by PCR-RFLP analysis of a hsp60 gene fragment. BMC Microbiology. 2013, vol. 13, issue 1, s. 149-. DOI: 10.1186/1471-2180-13-149. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/13/149>
- [21] BEDNÁŘ, Marek. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6
- [22] AMYES, Sebastian G.B. Enterococci and streptococci. International Journal of Antimicrobial Agents. 2007, vol. 29, S43-S52. DOI: 10.1016/S0924-8579(07)72177-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857907721775>
- [23] JAY, James M. Modern food microbiology. 6th ed. Gaithersburg, Md: Aspen Publishers, 2000, xvi, 679 p. ISBN 08-342-1671-X.
- [24] MADIGAN, Michael T, John M MARTINKO a Thomas D BROCK. Brock biology of microorganisms. 11th ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2006, p. ISBN 01-314-4329-1.
- [25] KULWICHIT, Wanla, Sumanee NILGATE, Tanittha CHATSUWAN, Sunisa KRAJIW, Chudaachhara UNHASUTA a Anan CHONGTHALEONG. Accuracies of Leuconostoc phenotypic identification: a comparison of API systems and conventional phenotypic assays. BMC Infectious Diseases. 2007, vol. 7, issue 1. DOI: 10.1186/1471-2334-7-69. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/7/69>
- [26] FACKLAM, R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clinical Microbiology Reviews. 2002-10-01, vol. 15, issue 4, s. 613-630. DOI: 10.1128/CMR.15.4.613-630.2002. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.15.4.613-630.2002>
- [27] HAAKENSEN, M., C. M. DOBSON, J. E. HILL a B. ZIOLA. Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) Back 1978 (Approved Lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY. 2009-03-01, vol. 59, issue 3, s. 615-621. DOI: 10.1099/ijs.0.65779-0. Dostupné z: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.65779-0>

- [28] Místo probiotik v léčbě (nejen) gastrointestinálních chorob. *Interní medicína pro praxi*. 2009, (11), 25-29.
- [29] Problémy probiotické terapie. *Interní medicína pro praxi*. 2008, (10), 345-347.
- [30] TEREZIA Hlíva ústříčná + probiotika + vitamin C 50+ 10 kapslí ZDARMA - Lékárna.cz [online]. [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <https://www.lekarna.cz/hlivaustricna-probiotika-vitamin-c-cps-50-10/>
- [31] Dr.Max ProbioMaxík 30tbl. | Dr. Max lékárna. www.drmax.cz [online]. Brno: ČESKÁ LÉKÁRNA HOLDING, 2005 [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/dr-max-probiomaxik-30tbl>
- [32] BioGaia Protectis plus| Dr. Max lékárna. www.drmax.cz [online]. Brno: ČESKÁ LÉKÁRNA HOLDING, 2005 [cit.2021-17-02]. Dostupné z: <https://www.drmax.sk/biogaia-plus>
- [33] Salminen, S. Demonstration of safety of probiotics - a review. *International Journal Of Food Microbiology*, 44(1-2), 93-106. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00128-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00128-7).
- [34] GETAHUN, Alemayehu, Anteneh TESFAYE a Diriba MULETA. Investigation of the Potential Benefits and Risks of Probiotics and Prebiotics and their Synergy in Fermented Foods. *Singapore Journal of Chemical Biology* [online]. 2016, 6(1), 1-16 [cit. 2020-11-03]. ISSN 20100094. Dostupné z: <https://doi:10.3923/sjchbio.2017.1.16>
- [35] DELL'ACQUA, Giorgio. 2018.
- [36] WOPEREIS, Harm, Kathleen SIM, Alexander SHAW, John O WARNER, Jan KNOL a J. Simon KROLL. Intestinal microbiota in infants at high risk for allergy: Effects of prebiotics and role in eczema development. *Journal of allergy and clinical immunology* [online]. Elsevier, 2018, 141(4), 1334-1342.e5 [cit. 2020-11-20]. ISSN 0091-6749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2017.05.054
- [37] MORAIS, De a Rui SANTOS COSTA. Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae. *Marine Drugs* [online]. Basel: MDPI, 2016, 14(2), 27 [cit. 2020-12-20]. Dostupné z: doi:10.3390/md14020027
- [38] CHERRY, P, S YADAV, Cr STRAIN, Pj ALLSOPP, Em MCSORLEY, Rp ROSS a C STANTON. Prebiotics from Seaweeds: An Ocean of Opportunity? *Marine Drugs* [online]. MDPI, 2019, 17(6) [cit. 2020-11-20]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md17060327

- [39] DI BARTOLOMEO, Francesca a Wim VAN DEN ENDE. Fructose and Fructans: Opposite Effects on Health? Plant Foods for Human Nutrition [online]. New York: Springer US, 2015, 70(3), 227-237 [cit. 2021-7-10]. ISSN 0921-9668. Dostupné z: doi:10.1007/s11130-015-0485-6
- [40] LI, Xinguo, Colin CAVANAGH, Klara VERBYLA, et al. A modified Megazyme fructan assay for rapidly screening wheat starch synthase IIa mutation populations reveals high fructan accumulation in mature grains of triple null lines. Journal of cereal science [online]. Elsevier, 2017, 73, 143-150 [cit. 2021-7-10]. ISSN 0733-5210. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcs.2016.12.011
- [41] ŠÍMA, P., B. TUREK a V. BENCKO. Betaglukany - imunomodulační látky v prevenci a podpurné léčbě. Praktický Lekar [online]. Czech Medical Association J.E. Purkyne, 2015, 95(6), 244-248 [cit. 2021-7-10]. ISSN 00326739.
- [42] KALINA, V., VÁŇA, J.: Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. UK Praha, 2005. 606 s., ISBN 80-246-1036-1
- [43] MEYER, Barbara J., Neil J. MANN, Janine L. LEWIS, Greg C. MILLIGAN, Andrew J. SINCLAIR a Peter R.C. HOWE. Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. Lipids. Australia, 2003, 38(4), 391-398
- [44] Alga. Mikrobiologický ústav AV ČR [online]. Praha: inoWeb, 2014 [cit. 2019-02-02]. Dostupné z: <https://www.alga.cz/c-548-co-vite-o-rasach-.html>
- [45] Textbook of Algae. New Delhi: I.K. International Pvt., 2005. ISBN 81-88237-44-2
- [46] ERNÁNDEZ-SEGOVIA, Isabel, María Jesús LERMA-GARCÍA, Ana FUENTES a Jose M. BARAT. Characterization of Spanish powdered seaweeds: Composition, antioxidant capacity and technological properties. Food Research International. 2018, 111, 212-219. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.05.037. ISSN 09639969. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918304058>
- [47] ROSYPAL, Stanislav. Přehled biologie. Praha: Scientia, 1998. 644 s. ISBN 80- 7183-110-7.
- [48] EL-SAID, Ghada a Amany EL-SIKAILY. Chemical composition of some seaweed from Mediterranean Sea coast, Egypt. Environmental Monitoring and Assessment [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013, 185(7), 6089-6099 [cit. 2020-11-04]. ISSN 0167-6369. Dostupné z: doi:10.1007/s10661-012-3009-y

- [49] LOURENQO, S. O., BARBARINO, E., DE-PAULA, J. C., OTÁVIO da PEREIRA, L. S., MARQUEZ, U. M. L. Amino acid composition, protein 106 content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycol. Res.* 2002, 50, p. 233-241.
- [50] WHO Technical Report Series 935. Protein and Amino Acid requirements in Human Nutrition. WHO Press Geneva. 2002. ISBN 92 4 120935 6
- [51] DAWCZYNSKI, CH., SCHUBERT, R., JAHREIS, G.: Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem.* 2007, 103, p. 891-899.
- [52] KAFKA, Z., PUNČOCHÁŘOVÁ, J.: Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita. *Chem. Listy.* 2002, 96, p. 611-617
- [53] SANTOSO, J., GUNJI, S., YOSHIE-STARK, Y., SUZUKI, T.: Mineral contents of Indonesian seaweeds and mineral solubility affected by basic cooking. *Food Sci. Technol. Res.* 2006, 12, p. 59-66.
- [54] VASCONCELOS, M.T.S.D., LEAL, M.F.C., 2001: Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae. *Mar. Chem.* 2001, 74, p. 65-85.
- [55] ZEMKE-WHITE, W. L., CLEMENTS, K. D.: Chlorophyte and rhodophyte starches as factors in diet choice by marine herbivorous fish. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1999, 240, p. 137-149.
- [56] SHIMONAGA, T., FUJIWARA, S., KANEKO, M., IZUMO, A., NIHEI, S., FRANCISCO, P. B., SATOH, A., FUJITA, N., NAKAMURA, Y.: Variation in Storage α -Polyglucans of Red Algae: Amylose and Semi-Amylopectin Types in *Porphyridium* and Glycogen Type in *Cyanidium*. *Mar. Biotech.* 2007, 9, p. 192-202.
- [57] BROWN, Emma M, Philip J ALLSOPP, Pamela J MAGEE, Chris Ir GILL, Sonja NITECKI, Conall R STRAIN a Emeir M MCSORLEY. Seaweed and human health. *Nutrition Reviews* [online]. 2014, 72(3), 205-216 [cit. 2020-11-09]. ISSN 0029-6643. Dostupné z: doi:10.1111/nure.12091
- [58] INTAWONGSE, Marisa, Noodchanath KONGCHOUY a John R DEAN. Bioaccessibility of heavy metals in the seaweed *Caulerpa racemosa* var. *corynephora*: Human health risk from consumption. *Instrumentation science & technology* [online]. Taylor & Francis, 2018, 46(6), 628-644 [cit. 2020-11-09]. ISSN 1073-9149. Dostupné z: doi:10.1080/10739149.2018.1427105

- [59] DOLEŽALOVÁ WEISSMANNOVÁ, Helena, Silvie MIHOČOVÁ, Petr CHOVANEC a Jiří PAVLOVSKÝ. Potential Ecological Risk and Human Health Risk Assessment of Heavy Metal Pollution in Industrial Affected Soils by Coal Mining and Metallurgy in Ostrava, Czech Republic. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. MDPI, 16(22), 1-19 [cit. 2020-11-09]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph16224495
- [60] HATA, Y, K NAKAJIMA, J UCHIDA, H HIDAKA a T NAKANO. Clinical effects of brown seaweed, *Undaria pinnatifida* (wakame), on blood pressure in hypertensive subjects. *Journal Of Clinical Biochemistry And Nutrition* [online]. INST APPLIED BIOCHEMISTRY, 2001, 30, 43-53 [cit. 2020-11-11]. ISSN 0912-0009.
- [61] PRABHASANKAR, P, P GANESAN, N BHASKAR, A HIROSE, Nimishmol STEPHEN, Lalitha R GOWDA, M HOSOKAWA a K MIYASHITA. Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. *Food chemistry* [online]. Elsevier, 2009, 115(2), 501-508 [cit. 2020-11-11]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.047
- [62] ZHENG, Tao, Cheng Chu LIU, Jing Ya YANG, Qi Gen LIU a Jia Le LI. Hijiki Seaweed (*Hizikia fusiformis*): Nutritional Value, Safety Concern and Arsenic Removal Method. *Advanced Materials Research*. 2013, 634-638, 1247-1252. DOI: 75 10.4028/www.scientific.net/AMR.634-638.1247. ISSN 1662-8985. Dostupné také z: <https://www.scientific.net/AMR.634-638.1247>
- [63] YOKOI, Katsuhiko a Aki KONOMI. Toxicity of so-called edible hijiki seaweed (*Sargassum fusiforme*) containing inorganic arsenic. *Regulatory toxicology and pharmacology* [online]. Elsevier, 2012, 63(2), 291-297 [cit. 2020-11-11]. ISSN 0273-2300. Dostupné z: doi:10.1016/j.yrtph.2012.04.006
- [64] MOURITSEN, Ole G., Prannie RHATIGAN a José Lucas PÉREZ-LLORÉNS. World cuisine of seaweeds: Science meets gastronomy. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2018, 14, 55-65. DOI: 10.1016/j.ijgfs.2018.09.002. ISSN 1878450X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878450X18301173>
- [65] KIM, Kyung-a, Sang KIM, Suk KANG, Sang JEON, Byung UM a Sang JUNG. Edible Seaweed, *Eisenia bicyclis*, Protects Retinal Ganglion Cells Death Caused by Oxidative Stress. *Marine Biotechnology* [online]. New York: Springer-Verlag, 2012, 14(4), 383-395 [cit. 2020-11-11]. ISSN 1436-2228. Dostupné z: doi:10.1007/s10126-012-9459-y

- [66] CORONA, Giulia, Yang JI, Prapaporn ANEGBOONLAP, Sarah HOTCHKISS, Chris GILL, Parveen YAQOOB, Jeremy P. E SPENCER a Ian ROWLAND. Gastrointestinal modifications and bioavailability of brown seaweed phlorotannins and effects on inflammatory markers [online]. Cambridge University Press, 2016, 115(7), 1240-1253 [cit. 2020-11-12]. ISSN 0007-1145. Dostupné z: doi:10.1017/S0007114516000210
- [67] KATO, Kumiko, Masahiro HAYASHI, Shingo UMENE a Hiroaki MASUNAGA. A novel method for producing softened edible seaweed kombu. Food science & technology [online]. Elsevier, 2016, 65, 618-623 [cit. 2020-11-12]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2015.08.059
- [68] Terranova synergistic nutrition. <http://www.terranovahealth.com> [online]. [cit.2021-17-02]. Dostupné z: <http://www.terranovahealth.com/product/terranova-green-child-living-multivitamin/>
- [69] Haribo. <https://www.haribo.com/sk-sk/produkty/haribo> [online].[cit. 2021-17-02]. Dostupné z : <https://www.haribo.com/sk-sk/produkty/haribo>
- [70] <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/c5307b71-fdb1-48b6-900a-636b2d6f7756.pdf?fbclid=IwAR2IjcxR25r9aWyrBT2ACSIJ9VhxKnbtWHP3QkndnDirHX1a5Co6bT3thIk>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

Použité jednotky:

- g – gram
- mg – miligram
- µg – mikrogram
- ml – mililiter
- l – liter
- nm – nanometer
- µm – mikrometer
- µl – mikroliter
- °C – stupeň Celsia
- CFU – kolónie tvoriace jednotky
- min – minúta
- h – hodina
- OD – optická hustota

Použité skratky:

- ČR – Česká republika
- D – Nemecko
- FAO – Organizácia pre výživu a poľnohospodárstvo
- WHO – Svetová zdravotnícky organizácia
- USA – Spojené štáty americké
- HPLC – Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
- NaCl – chlorid sodný
- ATP – adenozintrifosfát
- IND – India
- SRN – Spolková republika Nemecko
- GB – Veľká Británia