

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ**  
**AGRONOMICKÁ FAKULTA**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**BRNO 2017**

**BC. ZLATA HRAZDILOVÁ**

**Mendelova univerzita v Brně**

**Agronomická fakulta**

**Ústav technologie potravin**

---



**Agronomická  
fakulta**

**Mendelova  
univerzita  
v Brně**



**Analýza mastných kyselin ve vybraných tkáních prasat  
po aplikaci rybího tuku do krmné dávky**

Diplomová práce

*Vedoucí práce:*

prof. MVDr. Ing. Tomáš Komprda, CSc.

*Vypracovala:*

Bc. Zlata Hrazdilová

---

Brno 2017

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci Analýza mastných kyselin ve vybraných tkáních prasat po aplikaci rybího tuku do krmné dávky vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla (jinou osobou subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....  
podpis

### **Poděkování:**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu prof. MVDr. Ing. Tomáši Komprdovi, CSc. a své konzultantce Ing. Veronice Rozíkové, PhD. za cenné rady, konzultace, komentáře a odborný dohled, který mi během vypracovávání diplomové práce poskytovali.

## ABSTRAKT

Literární přehled teoretické části diplomové práce se zaměřuje na všeobecnou klasifikaci lipidů, jejich rozdělení, charakteristiku mastných kyselin, zejména polynenasycených mastných kyselin řady n-3, kyselině  $\alpha$ -linolenové, eikosapentaenové a dokosahexaenové a kyselinám řady n-6. Je popsán jejich metabolismus – odbourávání pomocí  $\beta$ -oxidace, biosyntéza a konverze nenasycených mastných kyselin na eikosanoidy, jejich funkci, následný účinek na organismus a zdravotní stav, zastoupení nenasycených mastných kyselin ve výživě, fortifikace potravinových zdrojů a krmiv za účelem zlepšení zdravotního stavu a tvorbu funkčních potravin. Praktická část je zaměřena na analýzu mastných kyselin ve vzorcích svalové, tukové a jaterní tkáně prasat po aplikaci 2,5 % rybího oleje a 2,5 % palmového oleje do krmné dávky. Lyofilizované vzorky tkání byly derivatizovány, následně stanoveny pomocí plynové chromatografie a výsledky byly statisticky vyhodnoceny.

**Klíčová slova:** mastné kyseliny, PUFA, EPA, DHA, rybí olej, prase, fortifikace, plynová chromatografie

## ABSTRACT

Literar review of thesis is focused on clasification of lipids, fatty acids characteristics, particularly polyunsaturated acids n-3 -  $\alpha$ -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid; and polyunsaturated acids n-6. There is description of metabolic reactions – degradation by  $\beta$ -oxidation, biosynthesis and conversion to eicosanoids. Function and effect of eicosanoids to organism and health, nutritional representation of this fatty acids, fortification of food sources, feed in interest of improvement health condition and functional foods producing. The practical part is focused on fatty acids analysis in muscular, liver and adipose tissue of pigs after feed fortification by 2,5 % fish oil and 2,5 % palm oil in the diet. Lyofilized samples were derivatized and determinated by gas chromatography method. Results were evaluated by statistics program.

**Key words:** fatty acids, PUFA, EPA, DHA, fish oil, pig, fortification, gas chromatography

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	9
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	10
3.1	Lipidy .....	10
3.2	Mastné kyseliny .....	11
3.2.1	Nasyčené mastné kyseliny .....	12
3.2.2	Nenasycené mastné kyseliny .....	12
3.3	Metabolismus lipidů a MK.....	15
3.3.1	Odbourávání mastných kyselin.....	16
3.3.2	Biosyntéza mastných kyselin.....	18
3.3.3	Metabolismus a konverze PUFA n-6 a n-3.....	18
3.3.4	Eikosanoidy .....	21
3.4	PUFA ve výživě a jejich vliv na organismus .....	24
3.5	Obohacování potravin .....	30
3.6	Analytika mastných kyselin .....	36
3.6.1	Plynová chromatografie .....	37
3.6.2	Stanovení MK pomocí GC .....	39
4	MATERIÁL A METODIKA.....	44
4.1	Materiál .....	44
4.2	Metodika .....	45
4.2.1	Příprava vzorku.....	45
4.2.2	Stanovení .....	47
4.2.3	Statistické vyhodnocení .....	48
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	49
6	ZÁVĚR .....	60
7	ZDROJE.....	62
8	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	70

9	SEZNAM TABULEK .....	71
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	72

# 1 ÚVOD

Tuky jsou nezbytnou a základní součástí stravy člověka a krmiva zvířat. Nejen z hlediska bohatého zdroje energie, ale také z důvodu vlivu na zdravotní stav organismu. V současnosti se populace vyspělých zemí potýká zejména s obezitou a civilizačními onemocněními (metabolický syndrom, kardiovaskulární choroby, diabetes mellitus II. typu, rakovina), proto je nutné dbát na optimální přísun energie dle výživových doporučení, upřednostnění kvalitních tuků ve stravě, jejich správný poměr a dostatečnou fyzickou aktivitu. Problematice nadměrné konzumace nasycených mastných kyselin a nedostatečné konzumace nenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem (PUFA n-3) je věnována značná pozornost. Vhodný poměr PUFA řady n-6 a n-3 (5:1) patří mezi základní požadavky racionální výživy, má významný vliv na zdravotní stav a na potlačení vzniku a rozvoje kardiovaskulárních onemocnění. Potravinové zdroje obsahující PUFA n-6 jsou veřejností oblíbené, zdroje PUFA n-3 bývají opomíjené a nejsou konzumovány v požadované míře. Nedostatečný příjem se týká zejména kyseliny eikosapentaenové a dokosahexaenové, jejichž procento konverze z kyseliny  $\alpha$ -linolenové není v organismu vysoké. Je proto důležité čerpat tyto kyseliny z jiných zdrojů. Zdrojem těchto kyselin jsou ryby a jejich tuk. Míra konzumace ryb mnohdy není taková, aby pokryla doporučený příjem daných mastných kyselin. Z tohoto důvodu se nabízí pojmout fortifikaci tradičních potravin o uvedené mastné kyseliny jako vhodný směr výzkumu v rámci obohacení oblíbených potravních zdrojů a rozšíření sortimentu funkčních potravin. Při obohacování potravin (resp. krmiv) o tyto mastné kyseliny je ovšem podstatné dbát na omezení úrovně oxidace a zajistit co možná nejmenší možné ovlivnění sensorických vlastností potravin. Z důvodu rozšíření znalostí o fortifikaci krmiv a následný zisk nutričně bohatšího produktu se praktická část zaměřuje na analýzu vybraných tkání prasat po aplikaci rybího oleje do krmné dávky.



## **2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Cílem mé diplomové práce bylo teoreticky nastudovat a vypracovat literární rešerši, zabývající se problematikou mastných kyselin a jejich ukládáním v živočišných tkáních. Dané téma již dlouhodobě podléhá vědeckým výzkumům ze zdravotních důvodů a také z hlediska vývoje funkčních potravin. U mastných kyselin bylo cílem se konkrétně zaměřit na polynenasycené mastné kyseliny řady n-3 (ALA, EPA, DHA), jejich metabolické přeměny a konverzi. Dále bylo cílem praktické seznámení s metodou extrakce mastných kyselin z tkání prasat, kterým byl do krmné dávky zakomponován rybí olej jako zdroj polynenasycených mastných kyselin řady n-3. Seznámení s derivatizací mastných kyselin, s jejich stanovením pomocí metody plynové chromatografie a následné vyhodnocení zjištěných hodnot adekvátními statistickými metodami.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Lipidy

Lipidy jsou široká škála organických sloučenin, které jsou složeny z esterově vázaných mastných kyselin (MK) a jejich derivátů, dále zahrnují steroidy, terpeny, karotenoidy a žlučové soli. Jsou to sloučeniny nerozpustné ve vodě a rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Jejich molekuly se skládají z dlouhých řetězců uhlovodíků a jsou přítomny ve většině živých organismů nebo jsou jimi syntetizovány (Akoh et al., 2008). Nejzákladnější klasifikace struktur lipidů je z hlediska jejich fyzikálních vlastností při pokojové teplotě na oleje a tuky, podle jejich polaritu na polární lipidy (fosfolipidy, steroly) a neutrální lipidy (triacylglyceroly). Dále z hlediska jejich esenciality pro člověka (esenciální a neesenciální MK; Velíšek et al., 2009). V biologických systémech slouží lipidy zejména jako významné zdroje energie a dále jako součást buněčných membrán. U savců a v lidském organismu jsou lipidy zejména soustředěny ve tkáni mozkové (bílá a šedá kůra), v periferním nervovém systému (glykolipidy, fosfolipidy a steroly), jsou tedy nezbytné pro jejich správnou funkci. V případě nadbytku energie se tuky přijímané ve stravě ukládají ve formě adipocytů do tukové tkáně, případně v okolí orgánů. Ve střevě napomáhají tuky vstřebávání vitaminů rozpustných v tucích a působí jako nositelé chuti a vůně potravin.

Tuky se vyznačují vysokou sytostí a energetickou výtěžností. Oxidace MK je vysoce exotermní reakce, z 1 g tuku se uvolní až 39,1 kJ, zatímco z téhož množství proteinů a sacharidů zhruba 17,2 kJ. Tímto jsou lipidy pro organismus nejvýznamnějším zdrojem energie a zásobního výživného materiálu při zvýšených potřebách. Tuková tkáň ve formě depotního tuku tvoří největší energetickou rezervu organismu. Tukové obaly některých viscerálních orgánů (např. játra, ledviny) i tuk podkožní představují ochranu před mechanickým a tepelným poškozením. Tato tkáň je špatným vodičem tepla, čímž organismus izoluje před tepelnými výkyvy a ztrátami.

## 3.2 Mastné kyseliny

Základem a zároveň nejdůležitější složkou lipidů jsou mastné kyseliny, kterých je známo více než 100 druhů. Poprvé byly izolovány v roce 1818 francouzským chemikem M. E. Chevreulem. Z chemického hlediska se jedná o monokarboxylové kyseliny, většinou se sudým počtem uhlíků a lineárním nerozvětveným řetězcem. Volné se nevyskytují, pouze v esterifikované formě jako součást jiných lipidů (Velíšek, 2009). Jejich strukturu tvoří uhlovodíkový řetězec, na kterém je na jednom konci vázána hydroxylová funkční skupina (-COOH) a na druhém konci řetězce skupina methylová (-CH<sub>3</sub>). Atomy uhlíku v řetězcích mastných kyselin jsou číslovány od karboxylového uhlíku. Označení polohy dvojné vazby je od konce methylového uhlíku, který je označován jako n-uhlík, případně ω-uhlík.

*Mastné kyseliny se dělí dle nejrůznějších kritérií na další skupiny a podskupiny:*

*Podle délky řetězce*

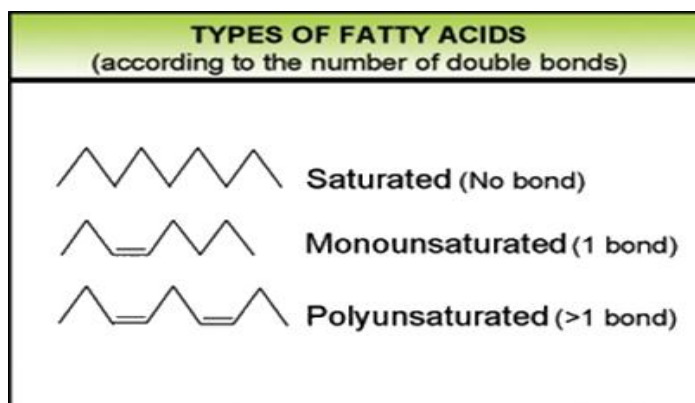
- a. Krátký řetězec (*short-chain fatty acid - SCFA*) – obsahující méně než 6 C
- b. Středně dlouhý řetězec (*medium-chain fatty acid – MCFA*) – obsahující 6 – 12 C
- c. Dlouhý řetězec (*long-chain fatty acid – LCFA*) – obsahující 14 - 20 C
- d. Velmi dlouhý řetězec (*very long-chain fatty acid – VLCFA*) – obsahující více než 20 C

*Podle stupně nasycení (viz. obrázek č. 1)*

- a. Nasycené (saturované, SFA)
- b. Nenasycené (nesaturované)
  - i. Mononenasycené (MUFA)
  - ii. Polynenasycené (PUFA)

### **Obrázek č. 1: Typy mastných kyselin**

Zdroj: <http://faculty.scf.edu/>



#### **3.2.1 Nasycené mastné kyseliny**

Z hlediska fyziologie výživy a funkčních vlastností je dělení mastných kyselin dle stupně nasycení spolu s délkou řetězce nejvýznamnější. Nasycené MK ve svém řetězci neobsahují žádnou dvojnou vazbu a tvoří přímé řetězce. Nepřítomnost dvojných vazeb má zároveň vliv na fyzikální vlastnosti. Obsah SFA je vysoký zejména v živočišných tucích, jelikož jsou součástí triacylglycerolu (TAG), který slouží jako hlavní energetická rezerva organismu v tukové tkáni. V TAG jsou nasycené MK vázané na molekulu glycerolu na jeho třech hydroxylových skupinách. Délka řetězců nasycených se pohybuje od 2 do 26 uhlíků. Z nasycených mastných kyselin se v potravinách nejčastěji vyskytuje kyselina stearová, která svou desaturací umožňuje vznik mononenasycené kyseliny olejové, a kyselina palmitová (Nettleton, 1995). Nadbytek některých satureovaných mastných kyselin nepříznivě ovlivňuje cholesterolémii a hladinu lipoproteinů podporující vývoj aterosklerózy (Mourek, 2007).

#### **3.2.2 Nenasycené mastné kyseliny**

Nenasycené mastné kyseliny v energetickém metabolismu nezastupují velkou roli, jejich podstata tkví ve funkčních vlastnostech, které jsou pro organismus nenahraditelné. Klasifikují se podle počtu přítomných dvojných vazeb na mono

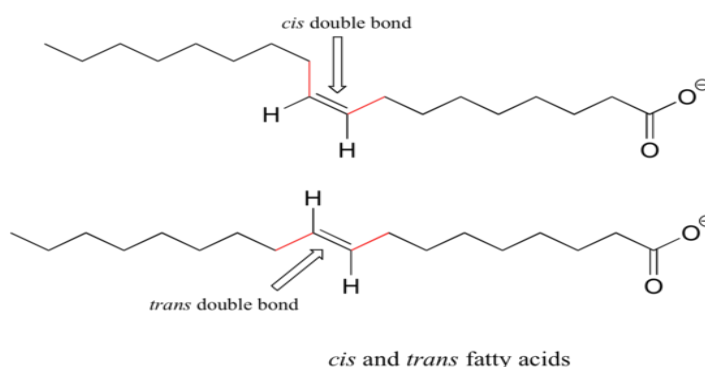
a polynenasycené MK. Z mononenasycených mastných kyselin (MUFA) se v přírodě vyskytuje přes 100 identifikovaných druhů (Nettleton, 1995). Z nich se nejčastěji vyskytuje kyselina olejová (18:1). Ta je součástí energetických rezerv a patří mezi doporučované MK v tukové složce potravy. Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) jsou velmi významné z důvodu esenciality pro člověka a další živočichy. Jejich organismy tyto kyseliny syntetizovat nedokáží a v potravinách živočišného původu jsou zastoupeny nízkým obsahem. Ne všechny PUFA jsou však esenciální (Akoh et al., 2008).

*Nenasycené MK dělí podle geometrické isomerie:*

- a. Cis isomery (většina přítomných nenasycených MK; prostorová konformace obou ramen řetězce směřující od dvojné vazby na tutéž stranu)
- b. Trans isomery (prostorová konformace obou ramen řetězce směřující vzájemně na opačnou stranu)

**Obrázek č. 2: Konformace cis a trans mastných kyselin**

Zdroj: <http://chem.libretexts.org>



U přirozených sloučenin se setkáváme zejména s konformací cis, konformace trans jsou v menším množství přítomny v některých druzích semen a dále v tuku a mléku přežvýkavců, kde vznikají metabolickými přeměnami a enzymatickými reakcemi v bacheru. Nejvíce trans mastných kyselin (TMK) vzniká při průmyslové hydrogenaci tuků a při tepelné úpravě pokrmů za vysokých teplot (nad 200 °C).

Ze zdravotního hlediska je vliv TMK na hladinu LDL cholesterolu významnější než vliv saturevaných MK.

Mastné kyseliny se rozlišují podle počtu dvojných vazeb v řetězci na MUFA a PUFA (viz. výše). Podle umístění první dvojně vazby od metylového konce se rozlišují řady n-6, n-3 a n-9. Kromě těchto uvedených existují i méně běžné mastné kyseliny s trojnými vazbami, větvenými vazbami, respektive mastné kyseliny cyklické (Komprda, 2003).

Z hlediska obsahu PUFA tvoří v živočišných tucích jedinou výjimku rybí oleje, které obsahují MK se 4 – 6 dvojnými vazbami. Ryby tyto tuky samy nesyntetizují, pouze je přijímají v potravě v planktonu, korýších a řasách (Velíšek, 2009) a z tohoto důvodu jsou významným zdrojem PUFA ve výživě. Význam PUFA n-6 začal být vědecky zkoumán od 20. let 20. století. Tyto rané studie ovšem neposkytovaly jasný důkaz esenciality PUFA n-3, důkazy jejich esenciálního významu se začaly kumulovat až v průběhu 70. let (Akoh et al., 2008).

Syntézu PUFA umožňují zejména rostlinná pletiva pomocí *de novo* syntézy a vzájemnými konverzemi MK řady n-3 a n-6 pomocí desaturáz se specifícností v  $\Delta^{12}$  a  $\Delta^{15}$  pozici, které v organismu člověka a zvířat nejsou přítomny. Organismus zvířat disponuje desaturázami  $\Delta^5$ ,  $\Delta^6$ ,  $\Delta^9$ , s kterými *de novo* syntéza PUFA n-3 a n-6 není možná (Akoh et al., 2008; Komprda, 2003; Nettleton, 1995). *De novo* syntéza rostlin je podobná živočišné, v rostlinách probíhá v chloroplastech fotosynteticky aktivních buněk. V živočišných buňkách probíhá v cytoplasmě a endoplasmatickém retikulu (ER).

Běžné rozdělení PUFA je udáváno podle polohy první dvojně vazby (Velíšek, 2009). Podle toho rozlišujeme PUFA na n-3, n-6 a n-9 (případně n-7, metabolizující se z kyseliny palmitoolejové; Das, 2006). Často se lze také setkat s komerčním označením omega-3, omega-6 a omega-9. Číselné označení určuje, z jakého atomu uhlíku vychází první dvojná vazba. Toto rozdělení je stěžejní z hlediska výživy a fyziologických účinků (Komprda, 2009). Přehled a názvy významných PUFA n-3 a n-6 je uveden v následující tabulce č. 1.

**Tabulka č. 1: Přehled a názvy vybraných PUFA n-3 a n-6**

*Zdroj: Mourek et al., 2007*

<b>Polyenové n-3 (PUFA)</b>	
C 18:3 $\omega$ -3	kyselina $\alpha$ -linolenová (ALA)
C 18:4 $\omega$ -3	kyselina stearidonová
C 20:3 $\omega$ -3	kyselina eikosatrienová
C 20:4 $\omega$ -3	kyselina eikosatetraenová
C 20:5 $\omega$ -3	kyselina eikosapentaenová (EPA)
C 22:5 $\omega$ -3	kyselina dokosapentaenová (DPA)
C 22:6 $\omega$ -3	kyselina dokosaheptaenová (DHA)
<b>Polyenové n-6 (PUFA)</b>	
C 18:2 $\omega$ -6	kyselina linolová (LA)
C 18:3 $\omega$ -6	kyselina $\gamma$ -linolenová (GLA)
C 20:2 $\omega$ -6	kyselina eikosadienová
C 20:4 $\omega$ -6	kyselina arachidonová (AA)
C 22:2 $\omega$ -6	kyselina dokosadienová
C 22:4 $\omega$ -6	kyselina dokosatetraenová
C 22:5 $\omega$ -6	kyselina dokosapentaenová

### **3.3 Metabolismus lipidů a MK**

Lipidy jsou přijímány zejména v podobě TAG, fosfolipidů a esterů cholesterolu. Po příjmu potravy (resp. krmiva) dochází primárně k produkci lingválních lipáz, které produkují Ebnerovy žlázy na kořeni jazyka. Následně probíhá trávení lipidů v žaludku,

kde se připojují žaludeční lipázy. Zbytek lipidů je štěpen pankreatickou lipázou. Z lipidů se hydrolýzou ve střevě stávají monoacylglyceroly a MK a za účasti solí žlučových kyselin vznikají micely, které přestupují difúzí do enterocyty. Do délky řetězce 10 C se MK dostávají přímo do krve přes portální oběh. MK s delším řetězcem musí být v enterocytech reesterifikovány na TAG a v endoplasmatické retikulu vestavěny do tzv. chilomiker (Ledvina, 2004; Komprda, 2003). Ty se po prostoupení střevní sliznice dostávají do lymfatického oběhu a odtud do oběhu krevního.

### ***3.3.1 Odbourávání mastných kyselin***

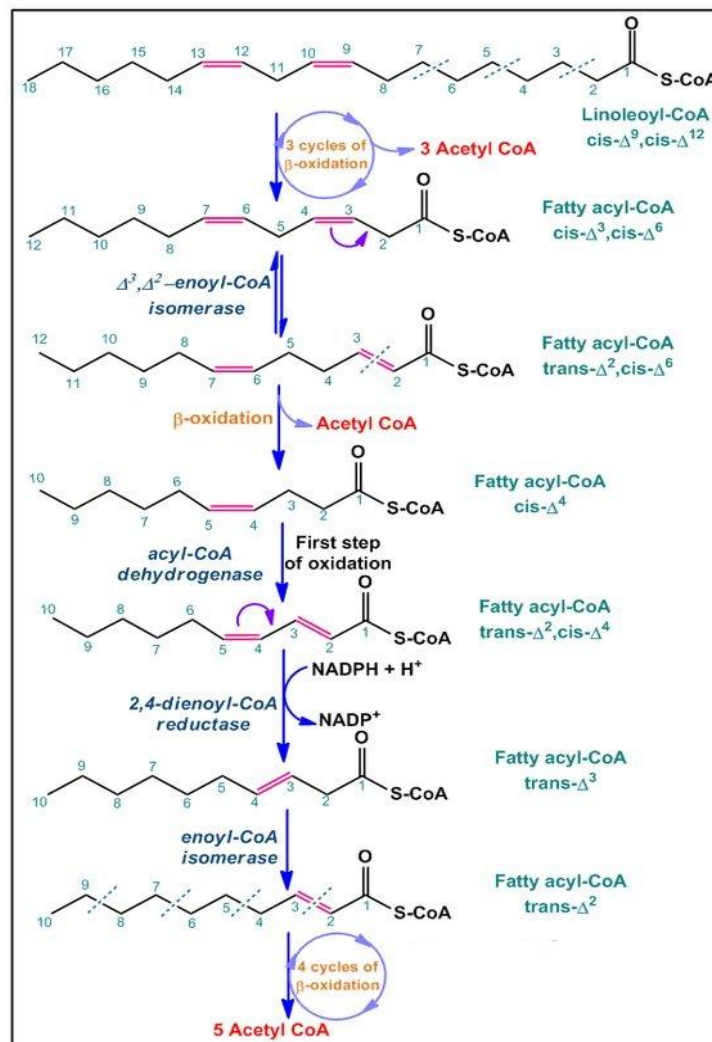
V organismu probíhá odbourávání MK zejména v játrech, srdečním svalu a v pomalu pracující svalové tkáni za pomoci mechanismu  $\beta$ -oxidace. Pochod  $\beta$ -oxidace je aerobní, neboť je vázán na chod dýchacího řetězce (Ledvina, 2004). Probíhá v matrix mitochondrií v závislosti na délce uhlíkatého řetězce za pomoci karnitinového přenašeče (od 12 C). Před katabolizováním musí být MK nejdříve aktivovány na acyl-CoA za pomoci acyl-CoA synthetasy (Koolman et al., 2012), která se v buňce vyskytuje v endoplasmatickém retikulu, peroxisomech a na vnější a vnitřní straně membrány mitochondrií. Z molekuly MK se postupně odštěpuje acetyl-CoA a řetězec se zkracuje o 2 atomy C. Z mastné kyseliny vázané na koenzym A se stává nejprve trans-*nenasycená* MK (alk-2-enová), z ní 3-hydroxykyselina a následně 3-oxokyselina (Murray et al., 2012). Ta je štěpena na kyselinu kratší o 2 atomy C a acetyl-CoA, který následně podlehně citrátovému cyklu. Každý krok oxidace katalyzují enzymy využívající nikotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) v oxidované formě a flavinadenindinukleotid (FAD) jako koenzymy a produkují ATP. Rychlost  $\beta$ -oxidace závisí na dostupnosti substrátů (neesterifikované mastné kyseliny, karnitin), na aktivitě karnitintransferázy a na rychlosti odstraňování acylu-CoA citrátovým cyklem (Ledvina, 2004). Méně běžné mechanismy pro odbourávání MK jsou  $\alpha$ -oxidace, která se zčásti uplatňuje v mozku a  $\omega$ -oxidace, během které začíná štěpení uhlíkem na konci řetězce (Velíšek, 2009; Ledvina, 2004). MK mohou být také esterifikovány s glycerolem za tvorby TAG jako hlavního zdroje zásobní formy energie v organismu (Murray, 2012).



Odbourávání nenasycených mastných kyselin probíhá pomocí modifikované  $\beta$ -oxidace v mitochondriích. Probíhat může také v peroxizomech. Téměř všechny PUFA obsahují dvojně vazby v poloze cis. Během metabolického rozkladu se musí PUFA z polohy cis transformovat do polohy trans pomocí izomerázy. Poté následuje běžná  $\beta$ -oxidace až k další dvojně vazbě. Zde musí být D-izomer  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA pomocí epimerázy převeden na L-izomer, který může být dehydrogenován (Ledvina, 2004). Schéma  $\beta$ -oxidace PUFA je popsáno na obrázku č. 3.

**Obrázek č. 3: Schéma  $\beta$ -oxidace PUFA**

Zdroj: <http://pharmaxchange.info/>



### 3.3.2 Biosyntéza mastných kyselin

Biosyntéza mastných kyselin je podobná u rostlin i živočichů. Probíhá pomocí *de novo* syntézy z acetyl-CoA v cytosolu pomocí extramitochondriálního systému. U většiny savců je při syntéze lipidů a MK hlavním substrátem glukóza. *De novo* syntéza probíhá zejména v játrech a tukové tkáni, může probíhat i v jiných tkáních, včetně mozku, plic a laktující mléčné žláze (Ledvina, 2004). Je to cyklický děj, během jednoho cyklu se vznikající řetězec prodlouží o 2 C. Pro *de novo* syntézu je vyžadována přítomnost kofaktorů (biotin, NADPH, ATP,  $Mn^{2+}$  a  $HCO_3^-$ ), které jsou zdrojem  $CO_2$  (Murray et al., 2012). Výchozí molekulou je acetyl-CoA a jednotlivé kroky katalyzuje multifunkční enzymový systém syntáza mastných kyselin, která obsahuje variabilní počet identických podjednotek. Syntéza enzymů v komplexu je kódovaná jedním genem, je tedy vzájemně koordinována. V průběhu syntézy jsou meziprodukty vázány přes SH-skupinu proteinu ACP (*acyl carrier protein*). Klíčovým enzymem syntézy je acetyl-CoA-karboxyláza, která vyžaduje přítomnost biotinu (vitamin B) a její aktivita je stimulována inzulinem. Acetyl-CoA je pomocí tohoto enzymu karboxylován na malonyl-CoA za přítomnosti ATP (Koolman et al., 2012). Následně dochází ke kondenzaci malonylu-ACP s acylem-ACP a vzniká acetoacetyl-ACP. Tato čtyřuhlíkatá sloučenina se transformuje dějem opačným k  $\beta$ -oxidaci. Zdrojem vodíku pro hydrogenaci je zde  $NADPH+H^+$  (Ledvina, 2004). Výsledkem celé *de novo* syntézy je kyselina palmitová nebo stearová. Nenasycené MK se tvoří modifikací ze SFA. V organismu se syntetizují z důvodu zachování a udržení optimálního stupně fluidity fosfolipidové dvojvrstvy membrán a udržení tukové kapénky v kapalné konzistenci při normální tělesné teplotě.

### 3.3.3 Metabolismus a konverze PUFA n-6 a n-3

Typické reakce pro MK jsou desaturace a elongace, reakce specifické buněčně, tkáňově a druhově dle typů organismů. Díky desaturázám  $\Delta^{12}$  a  $\Delta^{15}$  mohou rostliny, řasy a fytoplankton z MUFA syntetizovat PUFA (Akoh et al., 2002; Velíšek, 2009). Rostliny syntetizují kyselinu linolenovou pomocí desaturázy  $\Delta^{12}$  z kyseliny hexadekatrienové

v membránách chloroplastů (Nettleton, 1995). Živočichové disponují desaturázami  $\Delta^9$ ,  $\Delta^6$ ,  $\Delta^5$  a  $\Delta^4$ . Aktivity desaturáz  $\Delta^6$ ,  $\Delta^5$  jsou regulovány pomocí dvou transkripčních faktorů - SREB-1 (*sterol regulatory element binding protein-1*) a PPAR- $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$* ). Jako inhibitory desaturáz  $\Delta^6$  a  $\Delta^5$  působí SFA, cholesterol, TMK, alkohol, adrenalin a glukokortikoidy. Jako kofaktory běžné aktivity desaturázy  $\Delta^6$  působí pyridoxin (vitamin B6), zinek, kyselina nikotinová a hořčík. Aktivita desaturázy  $\Delta^6$  zároveň klesá s věkem a u osob postižených onemocněním diabetes mellitus (DM), hypertenzí, hyperlipidemií a metabolickým syndromem (Das, 2006).

MUFA jsou u člověka desaturovány přes desaturázový systém  $\Delta^9$ , z palmitoylu-CoA nebo stearoylu-CoA vzniká palmitoleoyl-CoA, resp. oleoyl-CoA (Murray et al., 2012). Lidské desaturázy MK mohou vytvořit dvojnou vazbu mezi 9. a 10. uhlíkem. Tímto způsobem vznikají PUFA n-9, zastoupené kyselinou olejovou vznikající z kyseliny stearové (Velíšek, 2009). V organismu živočichů dochází k elongaci nenasycené mastné kyseliny linolové a  $\alpha$ -linolenové za katalytického působení elongáz o 2 až 6 C. V metabolické dráze PUFA n-6 dochází k vytvoření kyseliny arachidonové (AA) z kyseliny linolové (LA) přes  $\gamma$ -linolovou (GLA; Das, 2006; Velíšek, 2009). V dráze PUFA n-3 dochází k tvorbě biologicky a funkčně významné kyseliny eikosapentaenové (EPA) a kyseliny dokosahexaenové (DHA) pomocí elongačních a desaturačních reakcí z kyseliny  $\alpha$ -linolenové (ALA). V metabolismu ALA vznikají dvojně vazby pomocí odštěpení vodíku a řetězec je prodlužován o dva atomy uhlíku. Desaturace probíhá pomaleji než elongace a obě tyto reakce probíhají v ER (Morris, 2015). Jeden cyklus  $\beta$ -oxidace při tvorbě DHA probíhá také v peroxisomech (Barceló-Coblijn et al., 2009). Desaturační a elongační reakce probíhají zejména v jaterní a mozkové tkáni, v srdeční svalovině naopak neprobíhají vůbec. V mozkové tkáni je konverze ALA vyšší z důvodu její přímé infuze do mozkových komor, tím tedy podlehne  $\beta$ -oxidaci pouze menší množství ALA než v jiných tkáních (Barceló-Coblijn et al., 2009). Vyšší hladiny DHA jsou v srdeční svalovině přítomny pouze po její přímé suplementaci či příjmu v potravě (Brenna et al., 2009). Metabolické dráhy PUFA n-6 a n-3 jsou popsány v tabulce č. 2.

**Tabulka č. 2: Biosyntéza PUFA n-6 a n-3**

Zdroj: Velíšek, 2009

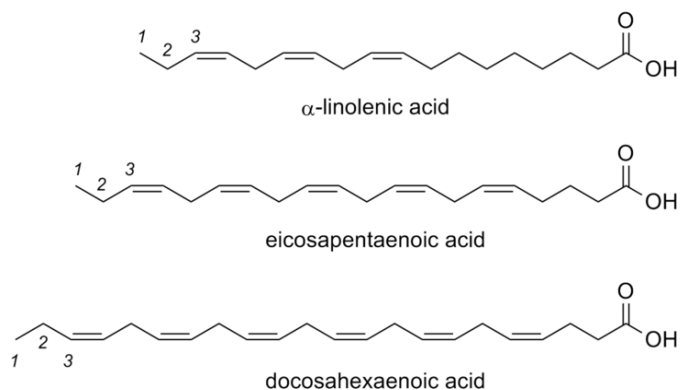
n-6 kyselina	n-3 kyselina
linolová (18:2 Δ9, 12) ↓ <i>Δ<sup>6</sup>-desaturáza</i>	α-linolenová (18:3 Δ9, 12, 15) ↓ <i>Δ<sup>6</sup>-desaturáza</i>
γ-linolenová (18:3 Δ6, 9, 12) ↓ <i>elongáza</i>	stearidonová (18:4 Δ6, 9, 12, 15) ↓ <i>elongáza</i>
dihomo-γ-linolenová (20:3 Δ5, 8, 11, 14) ↓ <i>Δ<sup>2</sup>-desaturáza</i>	eikosatetraenová (20:4 Δ8, 11, 14, 17) ↓ <i>Δ<sup>2</sup>-desaturáza</i>
arachidonová (20:4 Δ5, 8, 11, 14)	eikosapentaenová (EPA) (20:5 Δ5, 8, 11, 14, 17) ↓ <i>elongáza</i>
	dokosapentaenová (DPA) (22:5 Δ7, 10, 13, 16, 19) ↓ <i>elongáza</i>
	tetrakosapentaenová (24:5 Δ9, 12, 15, 18, 21) ↓ <i>Δ<sup>6</sup>-desaturáza</i>
	tetrakosahexaenová (24:6 Δ6, 9, 12, 15, 18, 21) ↓ <i>β-oxidace</i>
	dokosahexaenová (DHA) (22:6 Δ4, 7, 10, 13, 16, 19)

Jelikož není z důvodu enzymatického vybavení možné PUFA n-3 a n-6 v organismu syntetizovat, je nutné zajistit jejich dostatečný příjem potravou. Funkce desaturačního a elongačního metabolismu jsou značně omezeny a konverze ALA na EPA a DHA je velmi nízká (Komprda, 2011; Mourek, 2007). Odhaduje se zhruba na 1 % (Komprda et al., 2016). Může se ovšem pohybovat od 0,2 – 9 % (Burdge et al., 2002; Morris, 2015). Vyšší schopností konverze těchto MK disponují zejména ženy v reprodukčním věku v souvislosti potenciální biologické potřeby plodu a následně pro syntézu EPA a DHA a jejich uvolňování do mateřského mléka (Morris, 2015). Za schopnost vyšší konverze těchto PUFA u žen zodpovídá hormon estrogen (Burdge et al., 2002). Schopnost desaturace, elongace a konverze je omezena při hladovění, při nadbytku SFA ve stravě, při nedostatku inzulínu u onemocnění DM I. typu, případně při podávání hormonů a u kuřáků (Murray et al., 2012; Koolman et al., 2012; Morris, 2015). Strava s vyšším množstvím PUFA n-6 může snížit schopnost konverze ALA

až o 40 – 50 %. Na obrázku č. 4 jsou významné PUFA n-3 zobrazeny ve formě jejich strukturních vzorců.

**Obrázek č. 4: Strukturní vzorec ALA, EPA a DHA**

Zdroj: <http://thenutritionexpress.com>



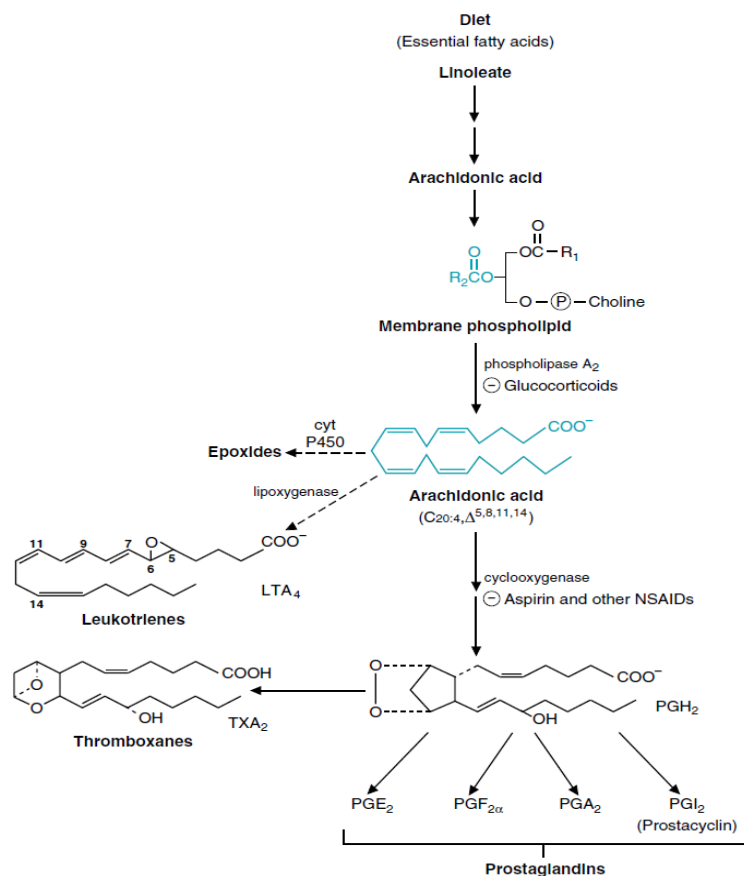
### 3.3.4 Eikosanoidy

PUFA jsou z hlediska esenciality podobné vitaminům, jejich účinek a vliv na organismus je rozsáhlejší a zasahuje do více odlišných procesů. Jedna ze stěžejních funkcí esenciálních MK je konverze na metabolicky aktivní eikosanoidy pomocí oxidativního metabolismu. Eikosanoidy jsou rozsáhlá skupina důležitých cyklických sloučenin, působící v organismu jako biologicky aktivní látky, signální látky, tkáňové hormony a mediátory ovlivňující značný počet fyziologických procesů (Koolman et al., 2012; Velíšek, 2009; Mourek, 2007; Nettleton, 1995). Jejich biologický poločas je velice krátký, většina z nich zmizí během několika málo minut po vzniku (Heinrich, 2015). Eikosanoidy působí také jako modulační složky biologických membrán, neboť ovlivňují jejich fluiditu a flexibilitu (Velíšek, 2009). V organismu vznikají téměř ve všech somatických buňkách kromě erytrocytů z PUFA (kyseliny linolové a linolenové) působením enzymů cyklooxygenázy a lipoxygenázy (Akoh et al., 2002; Koolman et al., 2012).

Hlavní místa produkce eikosanoidů v organismu jsou endoteliální buňky, leukocyty, trombocyty a ledviny. Pochází z kyseliny arachidonové (AA), která je produktem biosyntézy z LA (n-6) a z EPA a DHA, které jsou produktem biosyntézy

z ALA (n-3). Metabolismus vzniku eikosanoidů je schematicky zobrazen na obrázku č. 5.

**Obrázek č. 5: Metabolismus eikosanoidů**  
Zdroj: <http://www.antibody-antibodies.com/>



Vzájemně mají eikosanoidy z metabolických drah PUFA n-6 a n-3 rozdílné fyziologické účinky. Jsou zapojeny do různých biologických procesů jako je modulace zánětu, agregace krevních destiček, imunitních reakcí, růstu buněk a proliferace, kontrakce a dilatace hladkosvalových buněk (Rozíková, 2014). Mezi eikosanoidy patří prostaglandiny (PG), prostacykliny (PGI), tromboxany (TX), lipoxiny (LX), leukotrieny (LT), kyselina hydroperoxytetraenová (HPETE) a kyselina hydroperoxyeikosatetraenová (HETE).

Prostaglandiny spadají pod skupinu eikosanoidů a jsou metabolitem kyseliny arachidonové (20:4n-6), která je pomocí cyklooxygenázy (COX-2) – prostaglandin-endoperoxidcyklázy metabolizována do podoby cyklopentanového kruhu. Základní strukturou většiny prostaglandinů je kyselina prostanová. Její chemický název je trans-

7-2-oktyl-1-cyklopentyl-heptanová kyselina (Akoh et al., 2002). Prostaglandiny mají schopnost působit jako lokální hormony. Vyznačují se důležitou fyziologickou a farmakologickou aktivitou (Murray et al., 2012). Prostaglandiny jsou spolu s prostacykliny a tromboxany souhrnně označovány jako prostanoidy. Tromboxany mají cyklopentanový kruh přerušen atomem kyslíku (oxanový kruh). Leukotrieny a lipoxiny jsou metabolizovány z AA prostřednictvím 5-, 12- nebo 15-lipooxygenázy (LOX) na širokou škálu metabolicky aktivních molekul (Akoh et al., 2002). Leukotrieny vznikají pouze působením 5-lipooxygenázy, lipoxiny vznikají kombinovaným účinkem více lipooxygenáz. Jsou charakteristické přítomností tří až čtyř konjugovaných dvojných vazeb. Lipoxiny vznikají v leukocytech, leukotrieny navíc v mastocytech (žírných buňkách), trombocytech a makrofázích jako odpověď na imunitní a neimunitní podněty (Murray et al., 2012).

Eikosanoidy působí pomocí membránových receptorů v bezprostředním okolí svého vzniku jak na buňku, která je tvoří (autokrinní účinek), tak na buňky okolní (parakrinní účinek; Murray et al., 2012). Své účinky zprostředkovávají prostřednictvím G-proteinu (Koolman et al., 2012; Koláčková, 2016). Mnoho jejich účinků je zprostředkováno 7-helix-receptory a „druhými posly“ (*second messengers*), jako jsou cyklický adenosin monofosfát (cAMP),  $Ca^{2+}$  a inositolfosfát (Koolman et al., 2012). Mohou také ovlivňovat expresi genů a působit jako ligandy transkripčních faktorů.

Z eikosanoidů jsou nejvýznamnější leukotrieny, tromboxany a prostacykliny. Uplatňují se ve spánkovém cyklu, jako vasokonstrikční a vasodilatační látky při regulaci krevního tlaku, jako agregační a antiagregační látky regulují krevní srážlivost. Obecný přehled účinků významných eikosanoidů je uveden v tabulce č. 3.

**Tabulka č. 3: Obecný přehled účinků eikosanoidů**

*Zdroj: Komprda, 2003*

<b>Metabolity n-6 PUFA</b>	<b>Metabolity n-3 PUFA</b>
<i>PGE2, TA2, LT-B<sub>4</sub></i>	<i>PGE3, TA3, LT-B<sub>5</sub></i>
Prozánětlivé účinky	Protizánětlivé
Vasokonstrikční účinky	Vasodilatační
Agregační	Antiagregační
Bronchokonstrikční	Bronchodilatační

Prostacykliny jsou přítomny v buňkách cévních endotelií, tromboxany jsou přítomny v trombocytech a ovlivňují krevní srážlivost. Jejich důsledky mohou být negativní v rámci potenciální možnosti infarktu myokardu. Tento účinek mají prostaglandiny odvozené od AA, deriváty odvozené od EPA působí jako jejich antagonisté (Maděrová, 2011). Z tohoto důvodu je důležitý vhodný poměr přijímaných PUFA n-3 a n-6 maximálně 1:5 (Dostálová et al., 2012).

Prostaglandiny regulují funkci leukocytů - přitahují leukocyty do místa infekce a napomáhají tak průběhu zánětlivé reakce. Podle svého charakteru ovlivňují tlumivě nebo stimulačně kontrakce hladké svaloviny, dýchání (bronchokonstrikční účinky LT-B<sub>4</sub>) a střevní činnost. V žaludku inhibují sekreci HCl a stimulují sekreci mucinů. Významně se také podílejí na vzniku bolesti a horečky. Prostaglandiny také zasahují do metabolismu kostí, do činnosti sympatického nervového systému a ovlivňují reprodukci. Inhibici syntézy prostaglandinů lze ovlivnit nesteroidními protizánětlivými léky (Koolman et al. 2012; Murray et al., 2012).

### **3.4 PUFA ve výživě a jejich vliv na organismus**

Zdravá výživa a správný životní styl patří mezi nejvýznamnější faktory z hlediska prevence a dobrého zdravotního stavu organismu. Existuje odhad, že dospělý člověk může samostatně ovlivnit své zdraví až ze 70 % vyváženou a pestrou stravou, zdravým životním stylem včetně fyzické aktivity (Mourek, 2007).

Významný vliv mají PUFA zejména na kardiovaskulární choroby (KVO). Rizikové faktory těchto typů onemocnění mohou být u člověka přítomny již v raných fázích ontogenetického vývoje, genetické faktory podporující vznik KVO působí ještě před narozením. Vznik a důsledky aterosklerózy, ischemické choroby srdeční a dalších souvisejících onemocnění mohou být ovlivněny brzy po narození. Nesprávný životní styl, stres, kouření, nezdravá strava, obezita a další s tím spojené aspekty jako dislipoproteinémie (DLP), dislipidémie (hyperlipoproteinémie) a vysoký krevní tlak patří mezi nejrizikovější faktory KVO.

Obezita je jedním ze současných negativních trendů zejména ve vyspělých zemích. Světová zdravotnická organizace (WHO) ji označuje jako pandemií 21. století.



Její hlavní příčinou je nevhodný poměr mezi příjmem a výdejem energie. Z obecného pohledu je v ČR množství prodaných potravin na jednoho obyvatele téměř o polovinu vyšší, než je požadavek racionální výživy (Mourek, 2007). Často komentovaným faktem ve výživě je zejména stálá nadměrná spotřeba tuků, ale nedostatečný příjem PUFA n-3, které mají pro lidský organismus biomedicínský význam. Doporučovaný optimální poměr PUFA n-6:n-3 je dle WHO 5:1. Tato hodnota je spíše kompromisem mezi hodnotou běžnou v rámci současné stravy tzv. Západního typu (*Western Diet*) a hodnotou skutečně optimální, která by se měla co nejvíce blížit 1 (Komprda, 2003). Porovnání tzv. *Western Diet* a *Prudent Diet* je uvedeno v tabulce č. 4.

**Tabulka č. 4: Západní strava vs. doporučovaná vyvážená strava**

*Zdroj: Woods, 2007.*

<b>Západní strava (<i>Western Diet</i>)</b>	<b>Vyvážená strava (<i>Prudent Diet</i>)</b>
červené maso	zelenina
průmyslově zpracované maso	drůbeží maso, ryby
tučné mléčné výrobky	nízkotučné mléčné výrobky
rafinované obiloviny	celozrnné obiloviny
cukr	ovoce

V současnosti se v naší stravě poměr přijímaných PUFA pohybuje okolo hodnoty 10 - 30:1. V USA je u některých jedinců poměr přijímaných PUFA n-6:n-3 až na extrémní úrovni 40-50:1. Guyenet et al. (2008) uvádí, že se za posledních 50 let množství PUFA n-6 v tukových zásobách těla zvýšilo o více než 200 % (Gunnars, 2014). V důsledku metabolické přeměny ALA i LA stejnou sadou enzymů vede k výraznému zvýšení chronických degenerativních onemocnění (Komprda et al., 2016; Das, 2006). Zdroje LA jsou rozšířené a oblíbené, proto je její příjem většinou dostatečný až nadměrný. Příjem MK řady n-3, které jsou metabolickým podstupněm ALA, je ovšem nedostatečný. Nadbytečný nebo nedostatečný příjem esenciálních MK při současném neadekvátním přísunu vitamínu E, který působí jako významný antioxidant a napomáhá zabránit peroxidaci kyselin (Koolman et al., 2012), má nežádoucí důsledky na zdravotní stav organismu (Kopecký, 1995; Mourek, 2007).

V následující tabulce č. 5 je uvedeno zastoupení PUFA n-6 a n-3 ve vybraných potravinách.

**Tabulka č. 5: Zastoupení PUFA n-6 a n-3 v potravinách (g/100 g)**

*Zdroj: Mourek, 2007*

<b>Potraviny</b>	<b>n-6</b>	<b>n-3</b>
Lněný olej	4,9	20,3
Semena dýně	23,4	3,2
Losos	0,7	3,2
Vlašské ořechy	30,6	3,0
Sleď	0,4	2,0
Sójové boby	8,6	1,2
Máslo	1,8	1,2
Olivový olej	7,9	0,6
Pšeničné klíčky	5,5	0,5
Semena slunečnice	30,7	0,0
Mandle	9,2	0,0
Olivy	1,6	0,0

ALA (18:3 n-3) je výchozí MK řady n-3 a díky metabolickým procesům u ní dochází ke zvyšování počtu uhlíků z 18 na 20 až 22 v jedné molekule. Počet dvojných vazeb je zvyšován ze tří na pět až šest. Jak bylo již zmíněno, elongace a desaturace ALA nemusí probíhat v dostatečném rozsahu. Denní příjem kyseliny linolenové je doporučován mezi 1,1 – 1,6 g (Barceló-Coblijn et al., 2009). Přeměna ALA na vlastní účinné látky EPA a DHA je v lidském organismu velice nízká, proto má stěžejní význam dostatečný příjem EPA a DHA stravou. Již 30 – 40 g ryb, konzumovaných 2 x týdně působí pro organismus prospěšně (Simopoulos, 1991). Běžně jsou doporučovány dvě porce ryb týdně (Komprda, 2011), zahrnující jednu s vyšším obsahem tuku (např. makrela). Významnými zdroji EPA a DHA jsou zejména mořské a sladkovodní ryby, mořští savci a jiní mořští živočichové. Průměrný obsah těchto MK u vybraných druhů ryb je uveden v tabulce č. 6.

**Tabulka č. 6: Průměrný obsah EPA a DHA u vybraných druhů ryb (mg/100 g svaloviny)**

*Zdroj: Mourek, 2007*

<b>Druh ryby</b>	<b>EPA a DHA</b>
<b>mořské</b>	
Sleď	1700
Losos	1600
Makrela	1400
Platýz	500
Tuňák	300 - 500 (dle druhu)
Treska	200
<b>sladkovodní</b>	
Sumec	200
Kapr	200
Pstruh duhový	500

Tuk sladkovodních ryb se svým složením mastných kyselin liší od tuku ryb mořských (Velíšek, 2009). Základním článkem pro syntézu EPA a DHA je fytoplankton, který je potravou pro býložravé ryby a dravé ryby prostřednictvím jejich potravního řetězce (Kopecký, 1995). Nejvýznamnější potravní zdroje EPA a DHA jsou makrely, sardinky, sledi a lososi. Hodnota doporučeného příjmu EPA a DHA se pohybuje okolo 200 – 680 mg/den (Givens & Gibbs, 2008); WHO doporučuje rozsah od 200 do 1000 mg (Komprda, 2011). Pro dosažení snížení výskytu alergií, zánětů a snížení rizika náhlé srdeční příhody je doporučován optimální denní příjem 2 až 4 g EPA a DHA. U alternativních způsobů stravování (např. vegetariánství, veganství) může být z důvodu absence těchto PUFA ve stravě zdravotní stav člověka ohrožen.

PUFA a jejich vliv na zdravotní stav je neustále podrobován výzkumům, zejména na modelových organismech pro dosažení rychlejších výsledků. Díky těmto výzkumům se každoročně znalosti pozitivních a protektivních vlivů PUFA rozšiřují. Největší množství PUFA n-3 je spotřebováno zejména pro tvorbu buněčných a intracelulárních membrán. Mají vliv na jejich pružnost a tímto ovlivňují chování enzymů, vázaných na receptory membrány (Maděrová, 2011). Vliv konzumace PUFA se projevuje zejména v chronických onemocněních a na kardiovaskulárním systému. PUFA n-3

snižují riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění, snižují hladinu cholesterolu, mají vliv na imunitní systém, centrální nervový systém, kožních onemocnění a uplatňují se při správném vývoji organismu (Anderson, 2009; Das, 2006; Mourek, 2007; Nettleton, 1995). Mají také významný vliv na chronická onemocnění čítající DM II. typu a metabolický syndrom (Anderson, 2009). Je nutné poznamenat, že zatímco některé reakce a funkce esenciálních PUFA vyžadují jejich konverzi na eikosanoidy, ve většině případů jsou aktivní samy MK (Maděrová, 2011). První významnou studii zabývající se vlivem PUFA n-3 na zdravotní stav člověka vedl Bang & Dyerberg v 70. letech 20. století. Dánské vědce zaujal fakt, že grónští Eskymáci disponují lepším zdravotním stavem z hlediska nízkého výskytu rakoviny a koronárních srdečních onemocnění a dožívají se výrazně vyššího věku než západní populace v závislosti na vysoké konzumaci ryb bohatých na EPA a DHA (Simopoulos, 1991, Simopoulos, 2006; Givens & Gibbs, 2008; Koláčková, 2016).

Vliv na kardiovaskulární systém je jedním ze stěžejních účinků PUFA n-3 na organismus (Anderson, 2009). Dieta obohacená o EPA a DHA, odpovídající konzumaci mořských ryb 2-3x týdně, se pozitivně projeví na parametrech celého kardiovaskulárního systému. PUFA n-3 zlepšují parametry červených krvinek, jejich schopnost deformability, snižují viskozitu krve, snižují agregaci trombocytů. Na tyto rheologické vlastnosti krve navazovaly další výzkumy o pozitivním vlivu EPA a DHA na hypolipidémický efekt - dieta obohacená o EPA a DHA vede k průkaznému poklesu neesterifikovaných mastných kyselin v krvi (Mourek, 2007). EPA a DHA svým inhibičním vlivem také ovlivňuje produkci LDL cholesterolu a cholesterolémii (Simopoulos, 1991; Nettleton, 1995) a modulaci mírného chronického zánětu v cévních stěnách, které jsou charakteristickým projevem aterosklerózy (Komprda, 2011; Hyblerová, 2014, Chow et al., 2008). Konzumace PUFA n-3 dále vede ke zlepšení stavu glukózové tolerance, inzulinové rezistence, potlačuje srdeční arytmií a vznik srdečních příhod a reguluje genovou expresi pomocí PPAR (receptory aktivované proliferátory peroxizomů; Anderson, 2009).

O možném pozitivním vlivu PUFA n-3 na stav imunitního systému byly první zmínky uvedeny v 80. letech autory Meade & Martin (1978) a De Wille (1979). Studie zabývající se vlivem PUFA v souladu s imunitními reakcemi prokázaly jejich pozitivní vliv již od dětského věku v průběhu kojení, a to v závislosti na jejich obsahu

v mateřském mléce (Das, 2006; Mourek, 2007). Dlouhodobá aplikace rybího oleje, případně koncentráту PUFA n-3, vede ke zlepšení imunitního systému i u zcela zdravých jedinců (Henryk et al., 2005; Mourek, 2007). Pozitivní vliv EPA se projevuje protizánětlivými účinky a zkrácením průběhu zánětlivých procesů. EPA také prokazatelně inhibuje uvolňování AA z fosfolipidů pomocí fosfolipázy A2, čímž je redukováno množství substrátu pro vznik potenciálně prozánětlivých eikosanoidů. Vliv EPA je také velmi významný ve vývoji a remodelaci kostní hmoty (Anderson, 2009). PUFA n-3 snižují riziko vzniku autoimunitních onemocnění (např. artritida, psoriáza). Při aplikacích n-3 mastných kyselin v dietě kojících matek výsledky prokázaly snížení výskytu autoimunitních projevů u jejich potomků (Mourek, 2007).

Ve tkáních centrálního nervového systému (CNS) zastupují lipidy značnou část (40 – 60 %) a vyskytují se zde přirozeně v podobě glykolipidů (cerebrosidy, gangliosidy), glycerolfosfolipidů (lecitiny), sfingofosfolipidů (sfingomyeliny; Murray et al., 2012; Koolman et al., 2012). V šedé hmotě mozku je vysoké zastoupení PUFA n-3 a n-6. DHA představuje v mozku savců 30-50 % MK a je přítomna především v membránách fosfolipidů (Maděrová, 2011). Hemoencefalitická bariéra, existující např. pro cholesterol, je pro PUFA dobře prostupná. Mozek dospělého jedince může využívat MK z krevního řečiště a MK vznikající pomocí *de novo* syntézy, která v CNS probíhá. Biosyntéza zde probíhá za využití acetyl-CoA nebo malonyl-CoA (Mourek, 2007; Murray, 2012). Obohacení diety o rybí olej má všeobecně příznivý účinek v oblasti funkcí CNS – paměť, vybavování si informací, dyskineze (porucha souhry pohybů). Suplementace PUFA n-3 má pozitivní vliv na psychické poruchy jako je schizofrenie, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba a na psychické funkce osob postižených fetálním alkoholovým syndromem (Das, 2006; Kyle, 1999; Mourek, 2007). Podávání ALA je méně účinné než aplikace přímo EPA nebo DHA z důvodu nízké schopnosti konverze. Nedostatek EPA, DHA, resp. AA během perinatálního období oslabuje růst mozku a vývoj synaptických spojů, což může vést k vývojovým vadám a neuropsychologickým změnám (Maděrová, 2011). Dostatečný příjem DHA zvyšuje porodní hmotnost, ostrost zraku, řešení problémů a zpracování informací u kojenců (Komprda et al., 2013). DHA navíc zastupuje významnou roli v biochemii vidění v rámci fluidity rhodopsinových disků v buňkách tyčinek v oku, ve správné funkci spermíí a v mozkových axonech (Anderson, 2009; Gerster, 1998).

PUFA n-3 disponují inhibičním vlivem na syntézu cytokinů se silnou protizánětlivou aktivitou, přítomnost EPA a DHA snižuje plasmatickou hladinu interleukinu-6 (IL-6), faktoru nádorové nekrózy- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferonu- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), C-reaktivního proteinu (CRP) se současně zvyšující se hladinou protizánětlivých faktorů IL-10 a transformující růstový faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ; Das, 2006; Komprda, 2011). Při suplementaci stravy o ALA, EPA a DHA je monocytární syntéza prozánětlivých cytokinů IL-1 i TNF- $\alpha$  potlačena (Mourek, 2007).

Chronický zánět nevede pouze ke vzniku inzulínové rezistence, ateroskleróze a dalším kardiovaskulárním chorobám, ale potenciálně ke vzniku karcinomů (Anderson, 2009). Současné epidemiologické, klinické a laboratorní studie poukazují na množství a druh konzumovaných tuků v příčině vzniku a přetrvávání některých druhů nádorů. Zatímco SFA mohou vyvolat a stimulovat karcinogenezi, PUFA n-3 mohou působit prospěšně proti jeho rozvoji (Mourek, 2007), mohou snížit počet a velikost nádorů a prodloužit čas, než se nádor objeví (Maděrová, 2011). Epidemiologické studie předpokládají, že nízkotučná dieta v kombinaci s vhodným množstvím PUFA n-6 a n-3 souvisí s nižší mortalitou nádoru prsu a kolonu (Hofmanová, 2013). Rakovina prostaty byla zkoumána v pozitivní korelaci s příjmem ALA. Denmark-Wahnefried et al. (2001, 2004, 2008) ve svých studiích, zaměřující se na obohacování stravy lněným semenem o 30 g/den v závislosti na rakovinu prostaty u mužů prokázali protektivní efekt s vlivem na snížení proliferace buněk a zvýšení buněčné apoptózy. Mimo to bylo také prokázáno snížení hodnoty prostatického specifického antigenu (PSA), který indikuje zdravotní potíže týkající se této žlázy. Při fortifikaci krmiva o ALA byl u pokusné skupiny hlodavců inhibován vývoj karcinomu prsu (Mourek, 2007), vliv EPA a DHA na rozvoj tohoto typu karcinomu naopak potvrzen nebyl (Anderson, 2009).

### **3.5 Obohacování potravin**

V současné době je na výrobce potravin kladen velký důraz a tlak nejen ohledně zkvalitňování výroby potravin, ale také ohledně produkce co nejvíce nutričně hodnotných komponentů (Jacobsen et al., 2013). Z tohoto důvodu je v současnosti lukrativní výzkum, výroba a produkce tzv. funkčních potravin, případně také potravinových suplementů. Potravina může být označena jako funkční, jestliže obsahuje

složku, která cíleně pozitivním způsobem ovlivňuje jednu nebo více funkcí lidského organismu nebo má fyziologický nebo psychologický účinek nad rámec tradičního nutričního účinku (Komprda, 2003). Z důvodu nízkého příjmu ALA, EPA a DHA ve prospěch PUFA n-6 je dlouhodobě věnován důraz na výzkumy fortifikace živočišných a rostlinných potravních zdrojů o tyto biologicky prospěšné sloučeniny. Cílem obohacování o PUFA n-3 jsou potraviny, které jsou konzumovány ve značném množství velkou částí populace – např. obiloviny, vepřové maso, drůbeží maso, vejce, mléko a výrobky z těchto surovin. Další možností je jedlý hmyz, jehož konzumace v hospodářsky vyspělých zemích v poslední době vzrůstá (Komprda et al., 2013).

Ashes et al. (1992) přispěl zajímavým poznatkem ohledně obohacování krmiv skutečností, že při obohacování krmiva přežvýkavců o EPA a DHA byly tyto MK přítomny v produkovaném mléce, ale nikoliv v tukové tkáni (Nettleton, 1995). U polygastrů ovšem dochází k biochemickým změnám v batoru, které představují přímou překážku při snaze získání mléka obohaceného o EPA a DHA (Komprda, 2011; Jacobsen et al., 2013). Vhodnou cestou k fortifikaci mléčných výrobků o ALA, případně EPA a DHA je obohacení surovin. Překážkou se zde stává zejména zachování původních sensorických vlastností a vyloučení nežádoucích vlivů (Jacobsen et al., 2013; Ganesan et al., 2014). Při výrobě sýru Cheddar se sníženým obsahem tuku a obohacným o EPA a DHA byly nevhodné sensorické vlastnosti (zatuchlá, rybí pachut') ovlivněny zejména množstvím MK, o něž byl sýr obohacen. Při vhodné kombinaci množství PUFA a délky zrání je ovšem možné produkovat mléčný výrobek, který bude vhodným zdrojem esenciálních PUFA n-3 (Martini et al., 2009). Fortifikace potravin o PUFA n-3 se uplatňuje také u pekárenských, případně pečivářských výrobků. Máslové sušenky obohacené o 1 % a 3 % biomasy řasy *Isochrysis galbana*, bohaté na tyto nenasycené MK, byly v zachování původních sensorických vlastností a oxidační stability hodnoceny pozitivně a obsah PUFA n-3 byl zvýšen na 100 mg, resp. 320 mg/100 g (Gouveia et al., 2008). Z dalších sacharidových výrobků je významné také obohacení špaget a extrudovaných výrobků z obilovin.

Obohacování živočišných krmiv představuje vhodnou cestu k přirozenému zisku nutričně hodnotnějších potravin, případně ke zlepšení zdravotního stavu hospodářských zvířat. Významně napomáhá také při analýze biochemických procesů, probíhající

v modelových organismech a při aplikaci poznatků na výzkum nemoci a zdraví člověka. Obohacování krmiv o PUFA je zkoumán již od 90. let 20. století (Nettleton, 1995). Ukládání mastných kyselin do živočišných tkání závisí zejména na druhu zvířete, jeho genetických predispozicích a na složení lipidů krmné dávky. Již rané studie (Ellis & Isbell, 1926) potvrdily, že při aplikaci sójových bobů do krmné dávky lze obsah PUFA n-6 zvýšit až na 30 % z celkového obsahu tuku (Wood et al., 2008). Při obohacování krmiv je nejčastěji uplatňováno lněné semeno, lněný olej, konopné semeno, semeno šalvěje hispánské, rybí olej, rybí moučka nebo mořské řasy (Raes et al., 2004; Piotrowska et al., 2012). Nejvýznamnějším zdrojem ALA je lněné semeno (*Linum usitatissimum L.*) a nejvýznamnějším zdrojem EPA a DHA je rybí olej, extrahovaný z těl, svaloviny, jater nebo jiných orgánů ryb. K získání oleje je nejčastěji využíván herink (sled'), tuňák, menhaden, huňáček, sardinky, ančovičky a treska. Ryby tyto tuky nesyntetizují, přijímají je v potravě prostřednictvím řas a PUFA se v tělech ryb inkorporují a akumulují (Koolman et al., 2012; Velíšek, 2009; Yildiz, 2010). Obsah PUFA také závisí na pozici daného druhu ryb v potravním řetězci, predátoři se mírně liší obsahem PUFA od herbivorů. Obohacování krmiv o rybí olej (případně rybí moučku) se ukázalo jako mnohem efektivnější cesta než obohacování o lněné semeno nebo o lněný olej vzhledem ke zvýšení obsahu EPA a DHA (Komprda, 2011; Lemahieu et al., 2015). V potravinářství se rybí olej po částečné hydrogenaci využívá jako součást pomazánkových tuků, které se obohacením o tuto složku stávají nutričně vhodnějšími nebo je rybí olej složkou potravinových suplementů. Tuk snadno podléhá oxidaci, při použití rybího oleje v krmivech nebo potravinách je nutné počítat také s obohacením o antioxidant (Yildiz, 2010; Jacobsen et al., 2013). Nízká oxidační stabilita produktů, obohacených o EPA a DHA může být preventivně ovlivněna přidávkem antioxidantů, například  $\alpha$ -tokoferolu, vysokou antioxidační aktivitou disponuje také epigallokatechin gallát (Zhong & Shahidi, 2011; Rymer & Givens, 2005; Komprda, 2011).

Obohacování krmiv a výzkum vlivu takového krmiva na živočišné tkáně a živočišné produkty pomáhá prohlubovat znalosti o funkcích ALA, EPA a DHA v biochemických drahách různých druhů zvířat, nejprve po využití pokusných živočišných modelů. Tyto znalosti umožňují jejich následnou aplikaci u hospodářsky využitelných zvířat. Na modelech hlodavců bylo při testování krmné směsi obohacené o ALA zjištěno, že většina podlehla katabolickým procesům (78 %) a do tkáně



se inkorporovalo pouze 16 % z původní dávky. Pouze 6 % ALA podlehl elongaci a desaturaci (Lin & Salem, 2007; Komprda, 2011). Kumulace DHA z krmiva obohaceného o ALA závisí na druhu zkoumané tkáně, do níž se ukládá. Při testování pokusné skupiny křečků s krmivem obsahujícím 4 % ALA byla zvýšena hladina EPA a DHA v tkáních na stejnou hodnotu, jako hladina EPA u skupiny křečků s krmivem obohaceným o 0,2 % rybího oleje (Aziz et al., 2010; Komprda, 2011). Skupina potkanů krmena krmivem obohaceným o 5 % rybího oleje vykazovala při analýze jaterní tkáně významnější hodnoty EPA a DHA, než skupina potkanů, která byla krmena krmivem s 5 % přídatkem oleje ze světlice barvířské (*Carthamus tinctorius*; Komprda et al., 2015). Tato studie potvrdila nízkou úroveň konverze ALA na EPA a DHA.

Komprda et al. (2005) během výzkumu vlivu krmiva obohaceného o zdroj PUFA n-3 u modelových skupin kuřat, krůt a pstruhů duhových konstatoval zvýšení obsahu PUFA n-3 v prsní i stehenní svaloviny drůbeže, snížení hladiny AA v kuřecí prsní i stehenní svalovině a krůtí prsní svalovině. Také další výzkumy potvrdily, že se stoupající dávkou ALA v krmivu stoupá i hodnota ALA ve tkáních kuřat (Rymer & Givens, 2005). U pstruhů duhových však nebyl v tomto výzkumu zaznamenán podstatný rozdíl v obsahu PUFA n-3 (Komprda et al., 2005, Komprda, 2011). Následující výzkum poukázal během testování obohaceného krmiva o lněný olej u skupin pstruhů duhových, že v případě obohacování krmné dávky o 8,5 % nebo 15 % nedošlo ke změně celkového obsahu tuku. Došlo ovšem ke změnám poměrů jednotlivých mastných kyselin. Skupina s krmivem fortifikovaným o 15 % lněného oleje vykazovala nejnižší obsah SFA. Obsah SFA klesal v závislosti na stoupajícím obsahu lněného oleje, obsah ALA byl zvýšen, obsah EPA a DHA naopak klesal. Při obohacování krmiva o PUFA n-3 průkazně dochází ke zlepšování poměru PUFA n-6:n-3 (Chen et al., 2006; Komprda et al., 2005; Komprda et al., 2015). Mohou být ovšem postiženy technologické vlastnosti masa. Při 16 denním období zkrmování krmiva fortifikovaného o lněné semeno bylo zaznamenáno snížení pH masa z původní hodnoty 5,93 na hodnotu 5,65, což signalizuje větší ztráty během tepelné úpravy. Zároveň byla snížena oxidační stabilita v přímé závislosti na délce zkrmování obohacené směsi (Betti et al., 2009). Při náhradě sójového oleje za rybí olej v krmivu brojlerů s cílem obohacení výsledné suroviny nebyly zaznamenány sensorické změny pouze do množství 0,75 %. Krmivo fortifikované o větší množství rybího oleje vedlo

ke snížené údržnosti masa a nepříznivě ovlivnilo také senzorické vlastnosti (Aispuro et al., 2016).

U drůbeže je také významné obohacování krmiva za účelem získání nutričně obohacených vajec a vaječných produktů. Obohacení o rybí olej může být vhodnou cestou k produkci vajec, bohatých na EPA a DHA (Komprda, 2011). Inkorporace PUFA n-3 ve vejcích se ovšem odvíjí od účinnosti metabolismu nosnice a ukládání PUFA do jiných tkání. Při fortifikaci o lněný olej nebyly zaznamenány tak výrazné změny, jako při obohacení krmiva mořskými řasami nebo rybím olejem (Neijat et al., 2016; Lemahieu et al., 2015). Zvýšení obsahu PUFA n-3 ve vejcích se projevilo v celkové skladbě MK při aplikaci významného zdroje ALA - semen šalvěže španělské (tzv. chia semen) do krmné směsi křepelek japonských (*Coturnix japonica*; Komprda et al., 2013).

Hospodářsky využívání polygastři (skot, ovce, koza, jelen) během trávicího procesu ve svém bachoru pomocí škály trávicích enzymů PUFA naruší a zmenší tím množství, které by mohlo být inkorporováno do tkání. U monogastrů (prasat) během trávení nedochází k tak rozsáhlému metabolizování PUFA jako u polygastrů a po prostoupení do krve je umožněn jejich transport do tkání a orgánů (Wood et al., 2008), v kterých mohou být ukládány a potenciálně tak mohou být nápomocny ke zvýšení dietetické hodnoty živočišných produktů. Obohacování krmné dávky o PUFA n-3 má vliv na celkový obsah tuků, zejména na jejich vyšší obsah v tkáních (Cherian et al., 1995). Fortifikace krmiv o zdroje PUFA n-3 vede ke snížení obsahu PUFA n-6 a zlepšení poměru PUFA n-6:n-3. Při vyšším příjmu PUFA n-3 jsou pomocí desaturázy  $\Delta^6$  přednostně metabolizovány právě kyseliny řady n-3 před kyselinami řady n-6 a tato skutečnost vede ke zvýšení hladiny PUFA n-3 v krvi (De Tonnac et al., 2017).

Při obohacení krmiva rybím oleje je nárůst obsah EPA a DHA v tkáni prasat pozorovatelný již po 1. týdnu. Na barvu tuku prasat nemá fortifikace o rybí olej vliv, mění se ovšem jeho fyzikální parametry a ztrácí původní tuhost (Chow et al., 2008). Obsah EPA a DHA je odlišný v závislosti na anatomické části (Irie et al., 1992). Ve svalovině prasat stejně jako u jiných výše zmíněných testovaných druhů zvířat po aplikaci lněného oleje dochází ke snížení vzájemného poměru PUFA n-6:n-3 a současně poklesu obsahu MUFA ve prospěch PUFA (Brestensky et al., 2016).

Obohacená krmná dávka má významný vliv na vznikající koncové produkty metabolismu PUFA řady n-3 a n-6 (Skiba et al., 2015). Kompletní obsah PUFA n-3 v tkáních prasat pochází z krmiva, jelikož v nezměněné podobě projde žaludkem a v tenkém střevě dojde ke vstřebání do krve a díky tomu dochází ke kumulaci v tkáních. Při obohacení krmiv prasat o tuňákový olej došlo ke zvýšení PUFA n-3 v tkáních a při následném využití těchto částí pro výrobu masných výrobků (slaniny, klobás a párků) došlo k výraznému obohacení výživové hodnoty těchto produktů, ale současně byla zvýšena jejich náchylnost k oxidaci (Khiaosa-ard et al., 2011). Při fortifikaci krmiva o ALA ve formě lněného oleje vykazovala tkáň prasat zvýšení obsahu ALA, EPA, obsah DHA významně zvýšen nebyl (Fontanillas et al., 1997). Při aplikaci rybího oleje naopak došlo k pozitivnímu nárůstu obsahu DHA a poklesu obsahu ALA (Raes et al., 2004). Turner et al., 2014 oproti tomu uvádí, že při aplikaci lněného oleje do krmiva prasat naopak došlo v tukové a svalové tkáni k významnému zvýšení obsahu jak EPA, tak DHA. Zvýšení výživové hodnoty svaloviny nebo výrobků z vepřového masa může být ovšem také dosaženo během technologické úpravy (Piotrowska et al., 2012).

Obohacování krmné dávky PUFA n-3 ukázalo u prasat také vliv na jejich genovou expresi, konkrétně zvýšení exprese růstového hormonu IGF-1, který je zapojen do signálních drah inzulinu a metabolismu aminokyselin. Obohacení krmné dávky může potenciálně stimulovat růst svaloviny (Wei et al., 2016). Během testování exprese genů transportérů mastných kyselin a transportérů aminokyselin byl u skupiny prasat s poměrem PUFA n-6:n-3 1:1 zaznamenán největší objem bederního svalstva v porovnání se skupinami krmenými poměrem 2,5:1, 5:1 a 10:1 a tlumivý vliv na transportéry mastných kyselin krmenými poměry až do poměru 5:1. Díky tomuto pokusnému modelu lze tedy konstatovat, že při udržování PUFA n-6:n-3 v poměru blízkém se co nejvíce 1:1 lze usnadnit absorpci a využití mastných kyselin a volných aminokyselin a zlepšit svalovou a tukovou kompozici těla (Li et al., 2015).

Jelikož mají PUFA n-3 vliv na vývoj plodu, je vhodné obohacování krmiva gravidních prasnic, což může mít pozitivní vliv na jejich reprodukční schopnosti. Při obohacování stravy gravidních samic o rybí olej, anebo lněný olej byla u novorozenech selat pozorována zvýšená hladina EPA v játrech. Vyšších hodnot EPA dosahovala zejména selata, jejichž matky zkrmovaly krmivo s přidaným rybím olejem

(Tanghe et al., 2015). U potomků prasnic krmených krmivem obohaceným o rybí oleje byla také pozorována lepší socializace ve skupině (Clouard et al., 2015).

Obohacování krmiv o PUFA n-3 je vhodnou cestou ke zvýšení celkového příjmu těchto kyselin a vyrovnaní poměru PUFA n-6:n-3. Konzumace 100 g svaloviny prasat s dietou obohacenou o 2,5 % rybího oleje by pokryla zhruba 15 % doporučeného příjmu EPA a DHA a 100 g jater dokonce 92 % (Komprda et al., 2013). Obohacování konvenčních a hojně konzumovaných potravin o nutričně prospěšné látky je v současnosti s ohledem na zdravotní stav západní populace velice lukrativní, i přes nutriční a zdravotní benefity je nicméně poměrně nákladné (Dugan et al., 2015). Výroba a uvádění těchto potravin na trh vyžadují pečlivý výzkum, musí podstoupit schválení a po závěrečné kalkulaci nákladů na výrobu se může významně promítnout do ceny výsledného produktu či potraviny.

### **3.6 Analytika mastných kyselin**

Za účelem stanovení mastných kyselin nebo pro posouzení jejich ukládání v metabolicky aktivních tkáních se jako metoda stanovení nabízí zejména chromatografie. Chromatografie je fyzikálně-chemická metoda separace, během které jsou složky vnášeny mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze a jsou mezi nimi distribuovány a separovány (Wilxom, 2010). Fáze stacionární je nepohyblivá a fáze mobilní pohyblivá (Klouda, 2003). Nejčastěji je využívána pro analýzu přírodních i syntetických sloučenin a zejména těkavých mastných kyselin. Tato metoda se vyvíjí již několik desítek let a její hlavní přínos je v moderní vědě v mnoha oblastech. Za zakladatele a zároveň průkopníka chromatografie je považován ruský botanik Michail Semionovič Cvet, který svou práci poprvé publikoval ve studii Chromatografická adsorpční analýza v roce 1906 (Wilxom, 2010). Cvet poprvé metodu chromatografie použil v roce 1903 k rozdělení listových barviv, chlorofylů a karotenoidů na sloupci sorbentu uhličitanu vápenatého a jako mobilní fázi použil směs organických rozpouštědel (Sobotníková *et al.*, 2010).

Chromatografické metody se dělí:

*Podle fyzikálně chemického principu dělení*

- a. Rozdělovací chromatografie
- b. Adsorpční chromatografie
- c. Iontově-výměnná chromatografie
- d. Gelová chromatografie
- e. Afinitní chromatografie

*Podle skupenství mobilní fáze*

- a. Kapalinová chromatografie (*Liquid Chromatography* - LC)
- b. Plynová chromatografie (*Gas Chromatography* - GC)

*Podle uspořádání stacionární fáze*

- a. Kolonová (sloupcová) chromatografie
- b. Tenkovrstvá chromatografie (*Thin Layer Chromatography* – TLC)
- c. Papirová chromatografie (*Paper Chromatography* – PC)

*Podle účelu použití*

- a. Analytická chromatografie
- b. Preparativní chromatografie

### **3.6.1 Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie (GC) je jedna z nejvíce využívaných analytických separačních metod, během které dochází k získání informací o kvalitativním a kvantitativním obsahu směsí stanovovaných látek. V roce 1952 byl britský chemik A. J. P. Martin spolu s R. Syngem oceněn Nobelovou cenou za chemii za práci v oboru plynové chromatografie (Sobotníková et al., 2010). V roce 1956 byly vyrobeny první nástroje pro komerční použití. A. T. James a A. J. P. Martin separovali mastné kyseliny pomocí plynové chromatografie z frakce shromážděné v chromatografické koloně a následně tyto jednotlivé mastné kyseliny titrovali za účelem kvantitativního stanovení (Nielsen, 2010). Od těchto dob rozvoj plynové chromatografie značně pokročil a v současnosti je GC významnou analytickou metodou a má stěžejní postavení

v analýzách těkavých látek. Další pozitiva této metody jsou jednoduchost, rychlost provedení analýzy, účinnost separace látek a malé množství stanovovaného vzorku (Mráček et al., 2009).

GC je velmi citlivá analytická metoda. Druhy analýz, k nimž je využívána, jsou velmi široké a rozmanité. Užívá se zejména k vymezení druhů mastných kyselin, triacylglycerolů, cholesterolu a jiných sterolů. Dále je také využívána k analyzování plynů, rozpouštědel, vody, alkoholů a jednoduchých cukrů, stejně tak oligosacharidů, aminokyselin, peptidů, vitaminů, pesticidů, herbicidů, přídatných látek, antioxidantů, nitrosoaminů, polychlorovaných bifenyly, veterinárních i humánních léčiv, návykových látek a aromatických složek (Nollet, 2004). GC není použitelná pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí (Klouda, 2003). Její využití se uplatňuje zejména pro stanovení látek těkavých a tepelně stabilních, které mají dostatečný tlak syté páry a mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1000 (Quintin, 2010; Klouda, 2003). I přes vhodné vlastnosti některých stanovovaných látek (polarita, termocitlivost) je u části z nich nutné provedení derivatizace pro zkvalitnění jejich stanovení (Quintin, 2010).

### ***Princip plynové chromatografie***

Fyzikálně-chemická analytická metoda plynové chromatografie je založena na opakovaném ustanovení rovnovážného poměru koncentrace analytu mezi fází mobilní a stacionární (Pěkníková et al., 1999). Principem GC je nepřetržitý průchod nosného plynu kolonou stacionární fáze. Analyzovaný vzorek je vnesen pomocí nástřiku do temperovaného injektoru, v kterém dojde ke změně jeho skupenství z kapalného na plynné a ve formě par je vzorek dále unášen do kolony. K sorpci složek vzorků dochází na začátku kolony ve stacionární fázi a ty se následně desorbují čerstvým nosným plynem. Nosný plyn nese složky vzorku ke konečné části chromatografické kolony a dělicí proces je neustále opakován. K separaci složek dochází na základě jejich různé schopnosti vázat se na stacionární fázi (Klouda, 2003). Interakce mezi molekulou plynu a stacionární fází je dána určitým druhem mezimolekulárních sil a difuzí (Rozíková, 2010). Na detektoru dochází k indikaci

okamžité kvantity separovaných složek vzorku a signál detektoru je vyhodnocen pomocí výstupu (chromatogramu) kvantitativně i kvalitativně výškou a plochou píků.

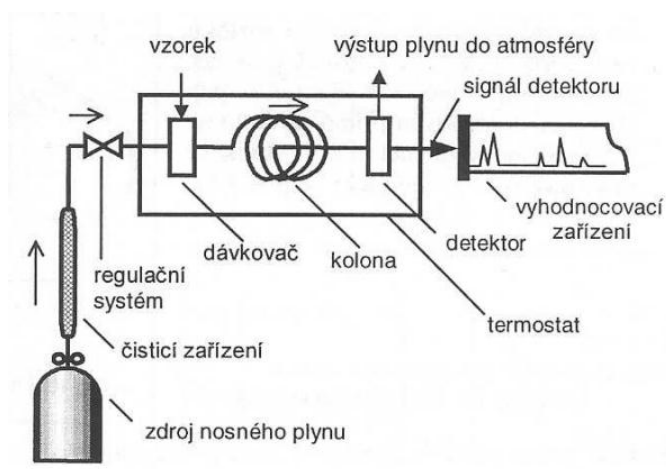
### ***Instrumentace plynové chromatografie***

Plynový chromatograf je složen z následujících částí:

- a. *Zdroj mobilní fáze (nosného plynu)*
- b. *Dávkovací vstup*
- c. *Separační systém (kolona se stacionární fází)*
- d. *Detektor*
- e. *Zařízení na zpracování signálů detektoru*

**Obrázek č. 6: Schéma plynové chromatografie**

*Zdroj: Klouda, 2003*



### **3.6.2 Stanovení MK pomocí GC**

Pro přesné a spolehlivé stanovení mastných kyselin, např. za účelem srovnání nutriční hodnoty potravin nebo pro posouzení depozice v metabolicky aktivních tkáních v rámci biomedicínského výzkumu se jako metoda stanovení nabízí v první řadě plynová chromatografie (Komprda et al., 2015). Stanovení nenasycených mastných

kyselin pomocí plynové chromatografie bylo poprvé provedeno v 60. letech 20. století a od té doby je užíváno jako stěžejní metoda stanovení těchto sloučenin. Před analýzou GC je potřeba mastné kyseliny extrahovat a derivatizovat. Krátké mastné kyseliny (do 10 C) mohou být analyzovány přímo, ostatní musí být derivatizovány. Jejím účelem byl převod málo těkavých mastných kyselin na těkavé estery a zároveň snížení jejich polarity. Methylestery mastných kyselin (FAME) jsou nejrozšířenějším způsobem derivatizace. FAME byly získávány pomocí záhřevu volných mastných kyselin s nadbytkem bezvodého methanolu v přítomnosti kyselého či basickeho činidla. K derivatizaci FAME v roztoku methanolu byla využívána zejména basicky katalyzovaná reesterifikace pomocí Lewisových kyselin ( $\text{BF}_3$ ). Během kyselě katalyzované reesterifikace došlo k esterifikaci volných MK a potenciálně mohlo také dojít k posunu dvojných vazeb MK. Odpaření rozpouštědla může snižovat výtěžnost MK s počtem uhlíků méně než 14. Samotná analýza pomocí GC probíhá v několika krocích – nástřik vzorku, separace složek, detekce složek a vyhodnocení.

Mobilní fázi je v GC nosný plyn. Zdrojem nosného je tlaková lahev obsahující inertní plyn (vodík, dusík, helium nebo argon, výjimečně páry organických rozpouštědel). Nosný plyn nesmí mít přímý vliv na separaci, musí být netoxický a vyhovovat bezpečnosti práce. Volba nosného plynu je často určena druhem kolony a detektoru (Klouda, 2003).

Dávkovač umožňuje zavádění vzorku do systému a smísení s mobilní fází. Musí zajistit co nejrychlejší odpaření vzorku. Dávkování probíhá pomocí injektorů o malém objemu (0,1 – 10  $\mu\text{l}$ ). Nástřikování se může provádět několika různými metodami dle požadavků kolony, koncentrace vzorků nebo metody stanovení (nástřik do kolony, nástřik pomocí děliče vzorků, nástřik bez děliče toku).

Nástřik vzorku pomocí dávkovače může být prováděn různými metodami. Při nástřiku do kolony (*on column*) u kolon náplňových je dávkováno 1 – 10  $\mu\text{l}$  vzorku. Během vstřikování je horní část kolony zahřívána na teplotu o 10 – 30  $^{\circ}\text{C}$  nižší než teplota rozpouštědla. Nástřiknutí vzorku musí být rychlé a musí být vytvořen kapalný film na stěně kolony. Po 30 – 60 s je teplota kolony prudce zvýšena a dochází k odpaření vzorku. Dalším typem je nástřik pomocí děliče toku (*split injection*). V tenčích kapilárních kolonách s malou kapacitou je zejména u koncentrovanějších



vzorků nutné oddělit část nástřiku s nosným plynem pomocí děliče toku (*splitter*). Do kolony se dostává jen definovaná část nastřikovaného množství (0,1 – 10 %) v intervalu 0,1 – 2  $\mu$ l. Množství aplikovaného vzorku je vyjádřeno pomocí rozdělovacího koeficientu (*split ratio*). Homogenní odpařování a promísení vzorku před vstupem do kolony zajišťuje skleněná vata v odpařovací trubici. Nástřik s děličem toku je užíván nejčastěji. Nástřik bez děliče toku (*splitless injection*) je vhodný pro větší objemy (0,5 – 5  $\mu$ l), užívané pro stopovou analýzu. Zařízení je obdobné jako s děličem toku, dělič je zde ovšem uzavřen.

Po nastříknutí vzorku začíná v koloně probíhat opakovaný transport složek do fáze stacionární a zpět do fáze mobilní. Separace probíhá na základě rozdílné schopnosti poutat se na stacionární fázi (Klouada, 2003). U kapilárních kolon, využívaných pro detekci MK, jsou stacionární fázi vnitřní stěny skleněné, plastové nebo křemenné s tloušťkou filmu od 0,25 do 5  $\mu$ m a délkou 15 – 60 m. Jsou chráněné vrstvou polyimidu nebo hliníku. Podle uložení mobilní fáze jsou rozlišovány tři typy kapilárních kolon:

- WCOT (*Wall Coated Open Tubular*) jsou úzké kolony, kde na vnitřních stěnách kapilár tvoří kapalná fáze tenký film.
- SCOT (*Support Coated Open Tubular*) jsou kolony s kapalinou, zakotvenou na vnitřní stěně nosiče.
- PLOT (*Porous Layer Open Tubular*) jsou kolony s tenkou vrstvou pórovitého materiálu (př. Aluminy, molekulová síta), sloužící jako absorbent.

K analyzování změn složení mobilní fáze dochází na detektoru. Jedná se o citlivý snímač, který zaznamenává v mobilní fázi přítomnost složky, která opouští kolonu chromatografu (Maděrová, 2011). Detektor musí mít dostatečnou citlivost (nízký detekční limit) a jeho odezva by měla být lineární funkcí obsahu analytu. Dalším důležitým požadavkem je vysoká selektivita pro stanovované analyty (Klouada, 2003). Nejpoužívanější druhy detektorů jsou tepelně vodivostní detektory (TCD), plamenově ionizační detektory (FID) a detektory elektronového záchyty (ECD).

Pro potvrzení, že metoda zodpovídá určitému druhu použití je nutnost ověření pomocí validace. Mezi nejdůležitější validační parametry sloužící k ověření

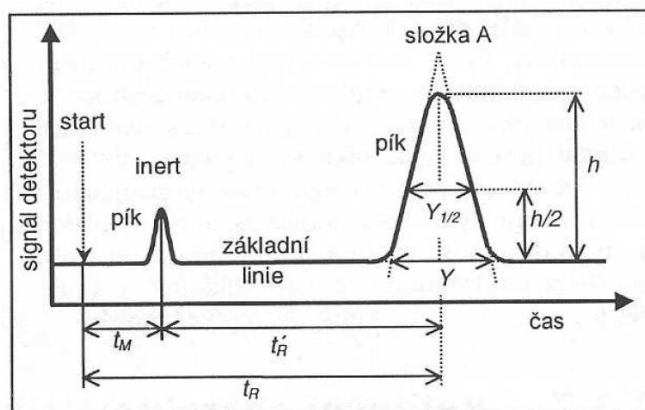
analytických postupů a přesnosti měření patří přesnost, výtěžnost, selektivita, opakovatelnost, reprodukovatelnost, mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ), linearita a rozsah.

### ***Vyhodnocení GC***

Vyhodnocení stanovení pomocí GC probíhá pomocí chromatografické křivky – chromatogramu, zaznamenaném pomocí výpočetní techniky, napojené na chromatograf a zaznamenávající jeho signály. Z chromatogramu jsou jednotlivé složky vzorku identifikovány a kvantifikovány pomocí zaznamenaných elučních křivek – tzv. píků. Schéma chromatogramu je znázorněno na obrázku č. 7.

**Obrázek č. 7: Schéma chromatogramu**

*Zdroj: Klouda, 2003*



$A$  – plocha piku,  $h$  - výška piku,  $Y$  - šířka piku,  
 $Y_{1/2}$  - šířka piku v polovině výšky,  $t_M$  – mrtvý retenční čas,  
 $t_R$  – retenční čas,  $t'_R$  – redukovaný retenční čas.

Zadržováním rozpuštěné látky stacionární fází je způsobena menší rychlost migrace, než je průměrná rychlost fáze mobilní. Molekula tak stráví v koloně určitou dobu, nazývanou retenční čas ( $t_R$ ). Tato doba se dělí na čas, který molekula setrvá v mobilní fázi – tzv. mrtvý retenční čas ( $t_M$ ) a čas strávený ve fázi stacionární – tzv. redukovaný retenční čas ( $t'_R$ ).

Pro inertní nosný plyn, který se na stacionární fázi nepoutá a putuje stejnou rychlostí jako fáze mobilní je  $t_R$  totožný s  $t_M$  (Klouda, 2003). Retenční charakteristiky jsou užívány ke kvalitativní analýze vzorků, jelikož můžeme konkrétní složku vzorku charakterizovat jejím retenčním nebo redukovatelným retenčním časem. Pro identifikaci látky je podstatné umístění maxima výšky píku v chromatogramu. Výšku píku lze změřit snadněji než plochu, ale je mnohem více ovlivnitelná malými změnami podmínek během stanovení. Plocha píku ( $A$ ) a jeho výška ( $h$ ) roste s obsahem složky ve vzorku a je určována výpočetní technikou, šířka píku v základně ( $Y$ ) a šířka píku v polovině výšky ( $Y_{1/2}$ ) souvisí s účinností separace složek. Při stanovení MK pomocí GC je nejsnazší způsob identifikace srovnávání retenčních časů a retenčních indexů se standardy, které obsahují směsi MK a jsou komerčně dostupné, případně spojení GC s hmotnostním detektorem, který porovná hmotnostní spektra MK s počítačovou databází a identifikuje MK (Klouda, 2003; Koláčková, 2016).

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Materiál

Materiálem ve výzkumu bylo prase, které sloužilo jako modelový organismus. Pro výzkum byly využity dvě skupiny prasat, z toho každá o 16 kusech zvířat. Počáteční hmotnost mladých prasat byla v rozmezí 30-35kg. První skupina byla krmena stravou fortifikovanou o 2,5 % rybího oleje jako vhodného zdroj EPA a DHA. Konkrétně se jednalo o komerční *oleum jecoris aselli*, čistý olej získaný z druhů ryb čeledi *Gadidae*, z jater tresky obecné (*Gadus morhua L.*). Druhá (kontrolní) skupina prasat byla krmena stravou obohacenou o 2,5 % palmového oleje z palmy olejné (*Elaeis guineensis*) jako zdroje bohatého na SFA a MUFA. Jako označení těchto skupin bude v následujícím textu užíváno zkratk RO (rybí olej) a PO (palmový olej).

Výkrm skupin prasat trval 75 dnů, po uplynutí této doby byla zvířata porážena. Před usmrcením byla uvedena do bezvědomí pomocí injekční intramuskulární aplikace anesteziologické směsi TKX (12,5 mg/ml ketamin, 12,5 mg/ml xylazin, 12,5 mg/ml tiletamin, 12,5 mg/ml) v celkovém objemu 0,2 ml/kg živé hmotnosti. Porážka proběhla pomocí vykrvení a následně byla odebrána svalová tkáň z čtyřhlavého stehenního svalu (*musculus quadriceps femoris*), jaterní tkáň z levého laloku jater (*lobus sinister*), tuková a plicní tkáň. Odebrané vzorky tkáně pro analýzu mastných kyselin byly uchovávány při -20 °C.

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Příprava vzorku

Vzorky odebrané modelovým organismům byly následně upraveny pro výsledné chromatografické stanovení. Metodika se skládala ze čtyř kroků: lyofilizace, extrakce, derivatizace a stanovení pomocí plynové chromatografie. Pro minimalizování změn složení původního vzorku bylo podstatné včasné provedení extrakce, resp. zajištění vhodného skladování při nízkých teplotách pro zabránění degradace vzorku. Odejmutím vody ze vzorku bylo dosaženo kratší doby extrakce a vyššího výtěžku lipidů z materiálu.

#### *Lyofilizace*

Vysušovaný vzorek byl v zmrzlém stavu vložen do vakuové komory, kde se za vakua uvolňovala vodní pára a zachytávala se na silně chlazeném ledovém kondenzátoru (čerpadle vodních par). Po odejmutí veškeré chemicky nevázané vody bylo možné za vysokého tlaku a vakua zbavit vzorek také vody krystalické (tzv. dosušování). Po dosušování materiál obsahoval zhruba 1 – 4 % vody. Lyofilizace je využívána pro šetrné odstranění veškeré vody v potravině za současného zachování ostatních látek v minimálně porušeném stavu.

Vzorek svaloviny prasat byl nakrájen na kostky o váze cca 15 g, vložen v hliníkových miskách do lyofilizátoru ALPHA 1-2 LO plus (Christ, LABIKOM), u kterého byl nastaven program v délce 48 hodin. Tento program umožnil vysušení zmrazených vzorků 40 hodin při teplotě  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následně dosušování 8 hodin při teplotě  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  za podtlaku 35mPa.

## *Extrakce*

Cílem extrakce byl převod lipidů do rozpouštědla, které bylo následně odstraněno. Díky tomu byl izolován pouze čistý tuk, který se stanovil pomocí gravimetrie. Pro extrakci jednoduchých nepolárních lipidů jsou vhodná nepolární rozpouštědla (hexan, petrolether), pro extrakci komplexních lipidů a fosfolipidů jsou nutná rozpouštědla polární (methanol, acetonitril). Proto jsou pro získání celkových lipidů nejčastěji používány směsi polárních a nepolárních rozpouštědel (Koláčková, 2016). Po lyofilizaci byly vzorky svaloviny o váze cca 5 g homogenizovány pomocí 20 desintegrátoru Moulinex model D56. K homogenizovanému vzorku bylo přidáno 1 ml pentadekanové kyseliny o koncentraci 10 mg/ml z účelem zjištění výtěžnosti extrakce. Homogenizovaný vzorek byl převeden do 150 ml Erlenmeyerovy baňky, k vzorku přidáno 30 ml HIP 1 a sonifikováno ultrazvukovou lázní PS 1000 po dobu 15 minut. Pomocí ultrazvuku došlo k narušení buněčných membrán a uvolnění jejich obsahu. Extrakt byl následně zfiltrován přes Büchnerovu nálevku, díky filtraci byly odstraněny nelipidové složky. K filtrátu bylo přidáno 24 ml vodného roztoku síranu sodného (koncentrace 66,6 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1000 ml H<sub>2</sub>O) a jemně protřepáváno (30x). Po ustanovení dvou fází byla oddělena vodná a organická fáze v dělicí baňce a k vodné fázi bylo přidáno 10 ml HIP 2, protřepáno a opět oddělena fáze vodná a organická. Organické fáze byly zfiltrovány do odměrné baňky o objemu 50 ml přes 0,5 g bezvodého síranu sodného, objem byl doplněn po rysku n-hexanem. Na vakuové odparce (RV 05-ST 1P-B model; IKA Labortechnik, Germany) bylo při 50 °C a 50 otáčkách za minutu odpařeno rozpouštědlo a odpaření bylo zakončeno pod N<sub>2</sub> atmosférou na přístroji EVATERM. Veškerý získaný tuk byl následně zvážen. Extrakce celkových lipidů, kterou popsali Hara a Radin (1978), využívá směs hexanu a 2-propanolu (HIP) v poměru objemů 3:2 (HIP 1) a 7:2 (HIP 2), které jsou využívány pro stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie.

### *Derivatizace*

Navážka vzorku 50 mg byla rozpouštěna ve 3 ml isooktanu p.a. ( $M=114,23$  g/mol). Poté bylo přidáno 3 ml methanolátu sodného (11,5 g/l Na v  $\text{CH}_3\text{OH}$ ), navozující alkalické prostředí, způsobující tvorbu solí mastných kyselin. Pod zpětným chladičem byla směs zahřívána při 60 °C po dobu 5 minut. Přes zpětný chladič byly napipetovány 3 ml 14% fluoridu boritého v  $\text{CH}_3\text{OH}$  a proběhlo další zahřívání po dobu 5 minut. Tímto způsobem se v kyselém prostředí zesterifikovala do té doby nezesterifikovaná organická část ve směsi. Poté byla směs odstavena a byly přidány 2 ml isooktanu. Po protřepání byl vzorek ponechán 1 minutu v klidu. Po následném přidání 5 ml nasyceného roztoku NaCl byla směs vystavena protřepávání, trvající zhruba 15 sekund. Tímto došlo ke spojení glycerinu s NaCl a vzniklá sůl byla vysrážena. Tato vysrážená část byla od zbytku organické části oddělena a převedena do vialky, z níž byl následně odebrán 1  $\mu\text{l}$  pro nástřík na chromatografickou kolonu. Pro stanovení mastných kyselin byly využity metody popsané Komprdou et al. (1999), které vychází z postupů Morrison a Smith (1964), Banon et al. (1982), Ichihara et al. (1996) a Satter et al. (1996).

### **4.2.2 Stanovení**

Stanovení extrahovaných a derivatizovaných vzorků bylo provedeno na plynovém chromatografu Fison GC 8000 Series s plamenově ionizačním detektorem (FID) a autosamplerem HT300A. Na kapilární koloně DB-23 (60 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA) byla provedena separace FAME. Nosným plynem byl v tomto případě dusík o čistotě 99,999%. Nastavení plynového chromatografu bylo provedeno dle pokynů a doporučení výrobce standardů a bylo upraveno dle příslušných výsledků se zaměřením na mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Pro vyhodnocení methylesterů mastných kyselin bylo užito standardu 16 FAME GLC 455 (Chromservis, ČR). Nastavení parametrů chromatografu bylo následující.

### *Nastavení chromatografu:*

Teplotní režim injektoru: 250 °C

Teplotní režim detektoru: 260 °C

Teplotní program: 140 °C/ 1 min

Teplotní gradient: 5 °C/ 1 min do 200 °C (zádrž 2 minuty)

3 °C/ 1 min do 240 °C (zádrž 15 minut)

Nosný plyn: N<sub>2</sub> (99,999 % p.a.); průtok plynu 1 ml/ min

Tlak na kolonu: 200 kPa

Objem nástřiku vzorku: 1 µl

Nástřik vzorku: split 20:1

Kvantitativní a kvalitativní zpracování analýzy bylo provedeno v počítačovém programu Clarity. Hodnoty byly naměřeny jako procenta sumy MK a přepočítány na hmotností jednotky mg/100 g tkáně za předpokladu, že 100 g tuku obsahuje 85 g MK.

### **4.2.3 Statistické vyhodnocení**

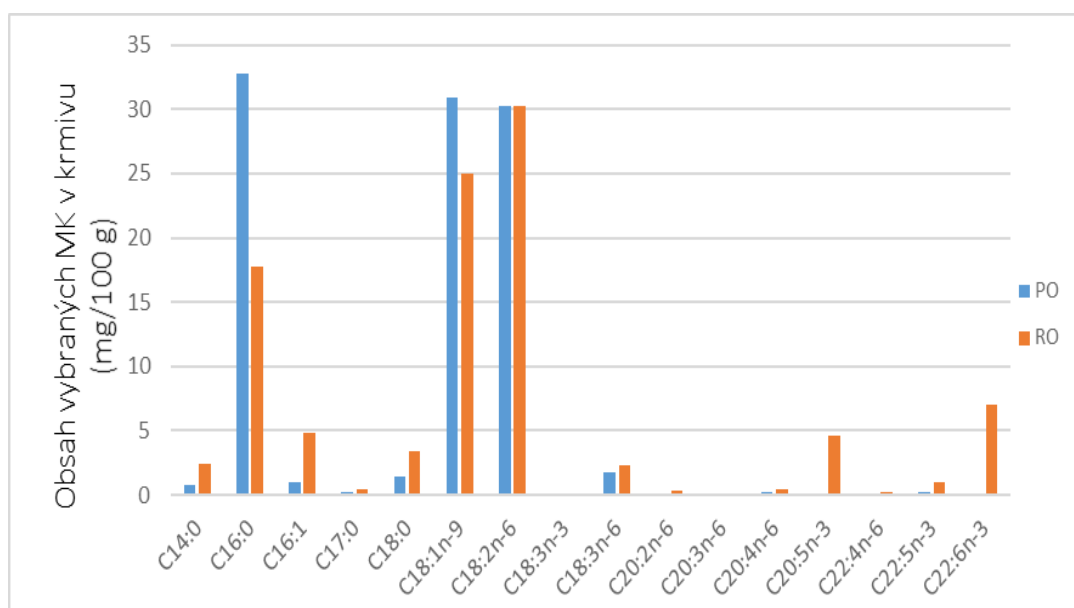
Ke statistickému vyhodnocení byl využit program Statistica 12 a ze získaných hodnot bylo pracováno se základními statistickými charakteristikami - průměr hodnot pro vzorky palmového oleje (PO) a pro vzorky rybího oleje (RO), směrodatné odchylky (PO, RO) a p-hodnota za účelem stanovení průkaznosti výsledků na hladině  $P < 0,05$ . Soubory hodnot byly porovnány pomocí párového t-testu.



## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Zastoupení vybraných MK a zastoupení PUFA n-6 a n-3 v krmivu je uvedeno na obrázku č. 8.

**Obrázek č. 8: Obsah vybraných MK v krmivu (v mg/100 g hmoty)**

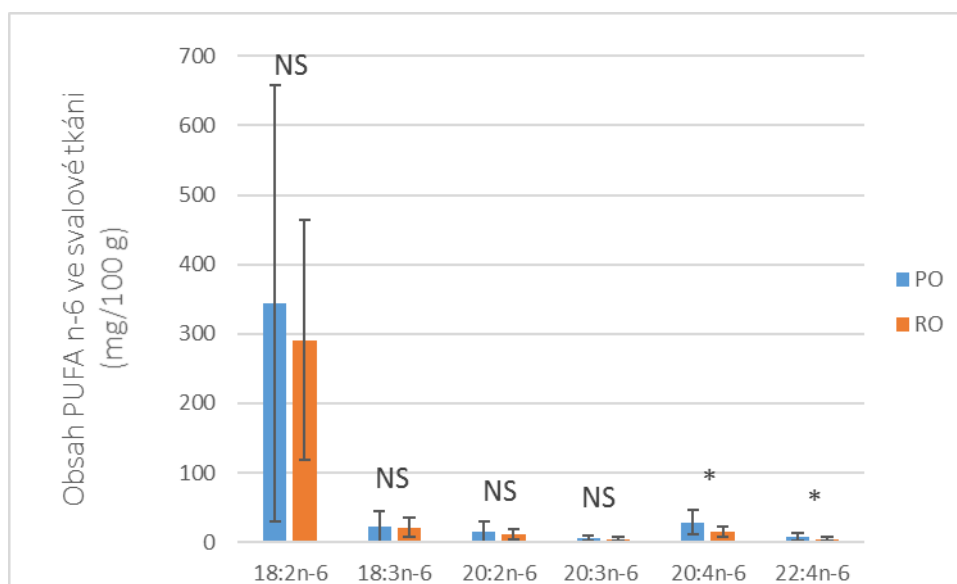


PO – krmivo s přísávkem 2,5 % palmového oleje; RO – krmivo s přísávkem 2,5 % rybího oleje; C14:0 - kyselina myristová; C16:0 – kyselina palmitová; C16:1 – kyselina palmitolejová; C17:0 – kyselina heptadekanová; C18:0 – kyselina stearová; C18:1 n-9 – kyselina olejová; C18:2 n-6 – kyselina linolová; C18:3 n-3 – kyselina  $\alpha$ -linolenová; C18:3 n-6 - kyselina  $\gamma$ -linolenová; C20:2 n-6 – kyselina eikosadienová; C20:3 n-6 – kyselina homo- $\gamma$ -linolenová; C20:4 n-6 – kyselina arachidonová; C20:5 n-3 – kyselina eikosapentaenová; C22:4 n-6 - kyselina dokosatetraenová; C22:5 n-3 - kyselina dokosapentaenová; C22:6 n-3 - kyselina dokosahehexaenová

U krmiva obohaceného o 2,5 % RO byl v porovnání s krmivem obohaceným o 2,5 % PO vyšší obsah EPA a DHA a kyseliny palmitolejové (16:1). U RO byl zároveň také nižší obsah kyseliny olejové (18:1). U PO byl vyšší obsah kyseliny palmitové (16:1).

Svalová tkáň je složena zejména z vody a bílkovin, určité procento zastoupení tvoří lipidy. Obsah lipidů je závislý na typu svalové tkáně, respektive výsekové části. V našem výzkumu bylo pracováno se svalovou tkání, odebranou ze čtyřhlavého stehenního svalu, který je z potravinářského hlediska součástí kýty. Ta se všeobecně vyznačuje nižším obsahem tuku a vyšším podílem bílkovin. Menší část tuku je uložena přímo uvnitř svalových buněk (tuk intracelulární) a mezi jednotlivými svalovými vlákny (tuk intramuskulární; Trnka, 2010). Tuk je v tomto typu svaloviny zastoupen 3 - 5 %, malá část je tvořena PUFA n-6, obsah PUFA n-3 je minimální (Chow et al., 2008).

**Obrázek č. 9: Obsah PUFA n-6 ve svalové tkáni prasat (mg/100 g tkáně)**



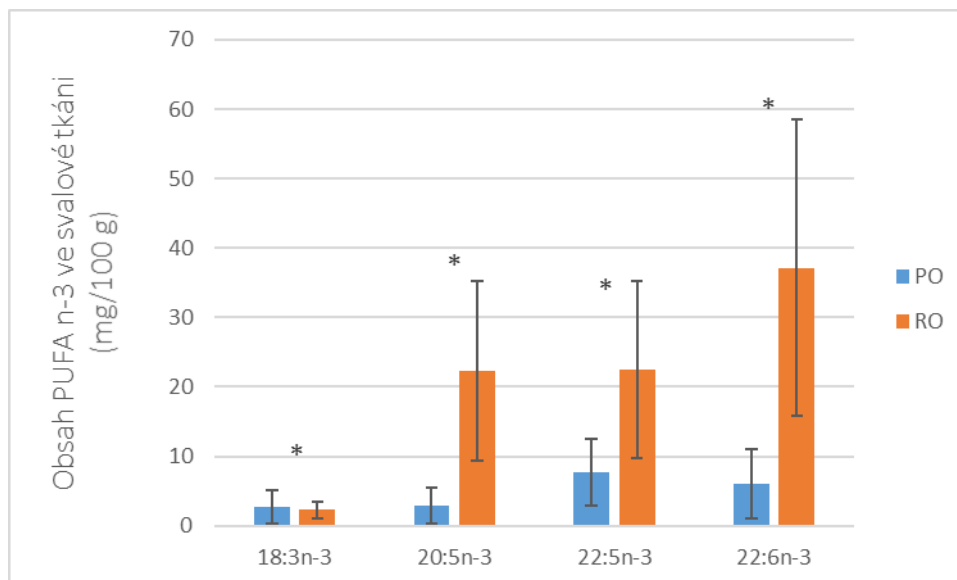
PO – krmivo s přidavkem 2,5 % palmového oleje; RO – krmivo s přidavkem 2,5 % rybího oleje; 18:2 n-6 - k. linolová, 18:3 n-6 - k.  $\gamma$ -linolenová, 20:2 n-6 – kyselina eikosadienová, 20:3 n-6 – kyselina homo- $\gamma$ -linolenová, 20:4 n-6 – kyselina arachidonová, 22:4 n-6 – kyselina dokosatetraenová; n = 32;

\* - statisticky průkazný rozdíl mezi skupinami PO a RO ( $P < 0,05$ ); NS - statisticky neprůkazný rozdíl ( $P > 0,05$ )

Graf na obrázku č. 9 se zaměřuje na zastoupení PUFA n-6 ve svalové tkáni. Nejvýznamnější část tvořil zejména obsah LA. U skupiny PO se jednalo průměrně 344 mg/100 g tkáně, u skupiny RO byl její obsah průměrně 291 mg/100 g. V porovnání skupiny RO s PO nebyl v obsahu LA statisticky průkazný rozdíl ( $P > 0,05$ ). Statisticky

významné ( $P < 0,05$ ) snížení obsahu AA a DTA bylo zaznamenáno u skupiny RO v porovnání se skupinou PO.

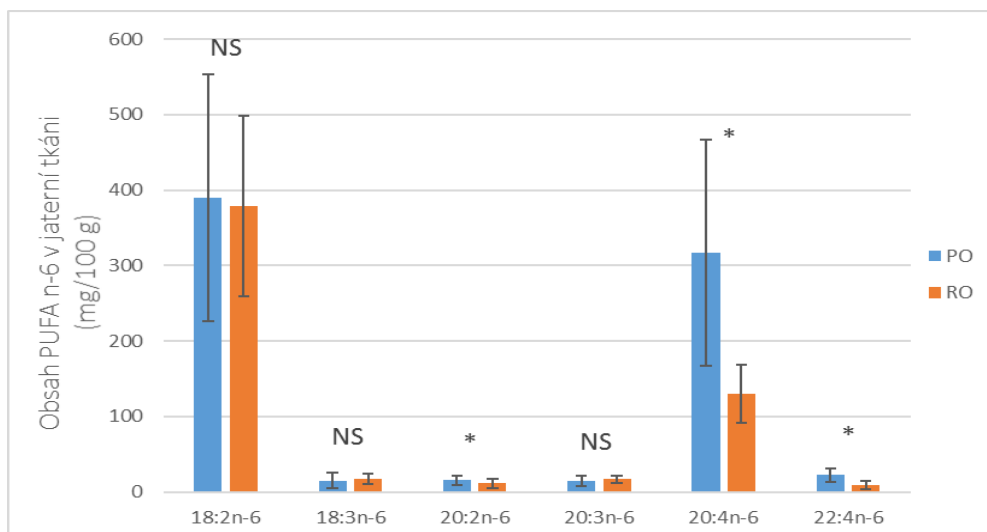
**Obrázek č. 10: Obsah PUFA n-3 ve svalové tkáni prasat (mg/100 g tkáně)**



PO – krmivo s přidavkem 2,5 % palmového oleje; RO – krmivo s přidavkem 2,5 % rybiho oleje; 18:3 n-3 – kyselina  $\alpha$ -linolenová, 20:5 n-3 – kyselina eikosapentaenová, 22:5 n-3 – kyselina dokosapentaenová, 22:6 n-3 kyselina dokosahexaenová;  $n = 32$ ; \* - statisticky průkazný rozdíl mezi skupinami PO a RO ( $P < 0,05$ ).

Graf na obrázku č. 10 znázorňuje obsahu PUFA n-3 ve svalové tkáni. Skupina RO vynikala statisticky průkazným ( $P < 0,05$ ) zvýšeným obsahem kyselin EPA (22 mg/100 g), DPA (23 mg/100 g) a DHA (37 mg/100 g) oproti skupině PO. Významnější zvýšení hladiny EPA, DPA a DHA ve svalové tkáni po aplikaci RO (3 %) do krmné dávky potvrzuje ve svém výzkumu také Øverland et al. (1996; 2009). Jonsdottir et al. (2003) během experimentu s krmivem fortifikovaným o 0,9 % RO rovněž potvrdil prokazatelné zvýšení hladiny EPA na 17 mg/100 g a hladiny DHA na 25 mg/100 g svalové tkáně. Haak et al. (2007) ve výsledcích svého výzkumu uvádí, že obohacení krmiva o RO hladinu DPA ve svalové tkáni prasat u svalu *longissimus thoracis* neovlivnila, potvrzuje ovšem průkazné zvýšení obsahu EPA a DHA ( $P < 0,05$ ) v porovnání se skupinou prasat s krmivem neobohaceným.

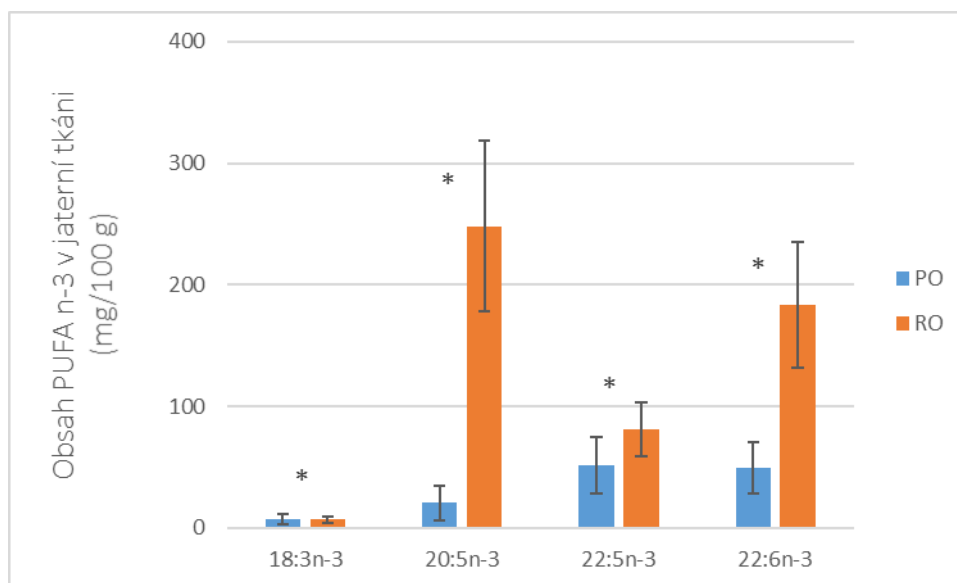
**Obrázek č. 11: Obsah PUFA n-6 v jaterní tkáni prasat (mg/100 g tkáně)**



PO – krmivo s přidavkem 2,5 % palmového oleje; RO – krmivo s přidavkem 2,5 % rybího oleje; 18:2 n-6 - kyselina linolová, 18:3 n-6 - k.  $\gamma$ -linolenová, 20:2 n-6 – kyselina eikosadienová, 20:3 n-6 – kyselina homo- $\gamma$ -linolenová, 20:4 n-6 – kyselina arachidonová, 22:4 n-6 - kyselina dokosatetraenová; n = 32; \* - statisticky průkazný rozdíl mezi skupinami PO a RO ( $P < 0,05$ ); NS - statisticky neprůkazný rozdíl ( $P > 0,05$ )

Graf na obrázku č. 11 znázorňuje obsah PUFA n-6 v jaterní tkáni. Jaterní tkáň prasat obsahuje zhruba 4 – 5 % lipidů. V porovnání s jaterní tkání jiných druhů hospodářských zvířat připadá vyšší podíl na MUFA (Chow et al., 2008). Ve vzorku analyzované tkáně byl obsah PUFA n-6 zastoupen zejména LA a AA. U skupiny s podávaným krmivem obohaceným o 2,5 % PO byl průměrný obsah LA 390 mg/100 g, skupina s krmivem obohaceným o 2,5 % RO měla průměrný obsah LA 379 mg/100 g, statisticky významný rozdíl mezi nimi zaznamenán nebyl ( $P > 0,05$ ). Snížení množství AA v jaterní tkáni v porovnání RO (130 mg/100 g) s PO (317 mg/100 g) bylo statisticky významné ( $P < 0,05$ ). Jednalo se o rozdíl téměř 60 %. Statisticky průkazné snížení ( $P < 0,05$ ) bylo zaznamenáno také u obsahu kyseliny eikosadienové a DTA v experimentální skupině RO oproti PO.

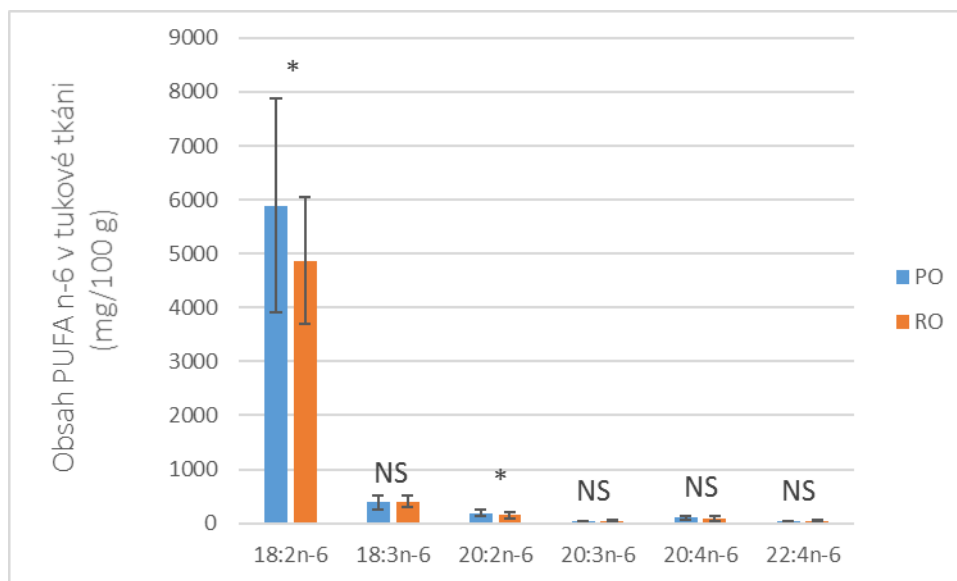
**Obrázek č. 12: Obsah PUFA n-3 v jaterní tkáni prasat (mg/100 g tkáně)**



PO – krmivo s přidavkem 2,5 % palmového oleje; RO – krmivo s přidavkem 2,5 % rybího oleje; 18:3 n-3 – kyselina  $\alpha$ -linolenová, 20:5 n-3 – kyselina eikosapentaenová, 22:5 n-3 – kyselina dokosapentaenová, 22:6 n-3 – kyselina dokosahexaenová; n = 32; \* - statisticky průkazný rozdíl mezi skupinami PO a RO ( $P < 0,05$ )

Graf na obrázku č. 12 znázorňuje obsah PUFA n-3 v jaterní tkáni. Statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi PO a RO byl zaznamenán u všech čtyř vybraných PUFA n-3. U skupiny RO došlo k statisticky průkaznému ( $P < 0,05$ ) snížení obsahu ALA v porovnání se skupinou PO. Zvýšení obsahu ALA může být dosaženo při obohacení krmiva např. o lněné semeno (Juaréz et al., 2010; Haak et al., 2007). U skupiny RO bylo významné zvýšení hladiny EPA (248 mg/100 g), DPA (81 mg/100 g) a DHA (184 mg/100 g) oproti skupině PO. Komprda et al. (2016) v experimentu zabývajícím se obohacením krmné dávky o 2,5 % RO potvrdil významné ( $P < 0,01$ ) zvýšení obsahu EPA a DHA v porovnání s krmivem neobohaceným.

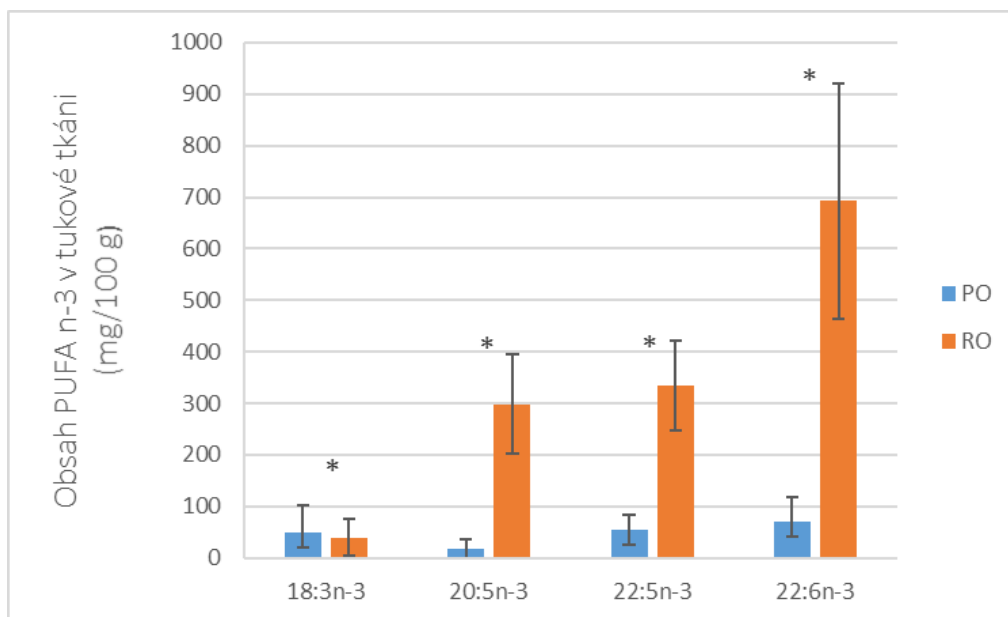
**Obrázek č. 13: Obsah PUFA n-6 v tukové tkáni prasat (mg/100 g tkáně)**



PO – krmivo s přidavkem 2,5 % palmového oleje; RO – krmivo s přidavkem 2,5 % rybího oleje; 18:2 n-6 - k. linolová, 18:3 n-6 - k.  $\gamma$ -linolenová, 20:2 n-6 – kyselina eikosadienová, 20:3 n-6 – kyselina homo- $\gamma$ -linolenová, 20:4 n-6 – kyselina arachidonová, 22:4 n-6 – kyselina dokosatetraenová; n = 32; \* - statisticky průkazný rozdíl mezi skupinami PO a RO ( $P < 0,05$ ); NS – statistický neprůkazný rozdíl ( $P > 0,05$ )

Graf na obrázku č. 13 znázorňuje obsah PUFA n-6 v tukové tkáni. U obou skupin (PO, RO) je patrný vyšší obsah LA. Skupina RO vykazovala průkazné snížení ( $P < 0,05$ ) obsahu LA v tukové tkáni oproti skupině PO. Došlo ke snížení obsahu LA z 5 885 mg/100 g (PO) na 4 867 mg/100 g (RO). Bryhni et al. (2002) ve výsledcích výzkumu rovněž uvádí snížení obsahu LA v tukové tkáni (o téměř 50 %) při aplikaci 0,4 % RO do krmné dávky prasat v porovnání se skupinou s krmivem neobohaceným. U skupiny RO zároveň došlo k statisticky průkaznému snížení ( $P < 0,05$ ) obsahu kyseliny eikosadienové oproti skupině PO. Ovlivnění obsahu ostatních vybraných PUFA n-6 statisticky průkazné nebylo ( $P > 0,05$ ).

**Obrázek č. 14: Obsah PUFA n-3 v tukové tkáni prasat (mg/100 g tkáně)**

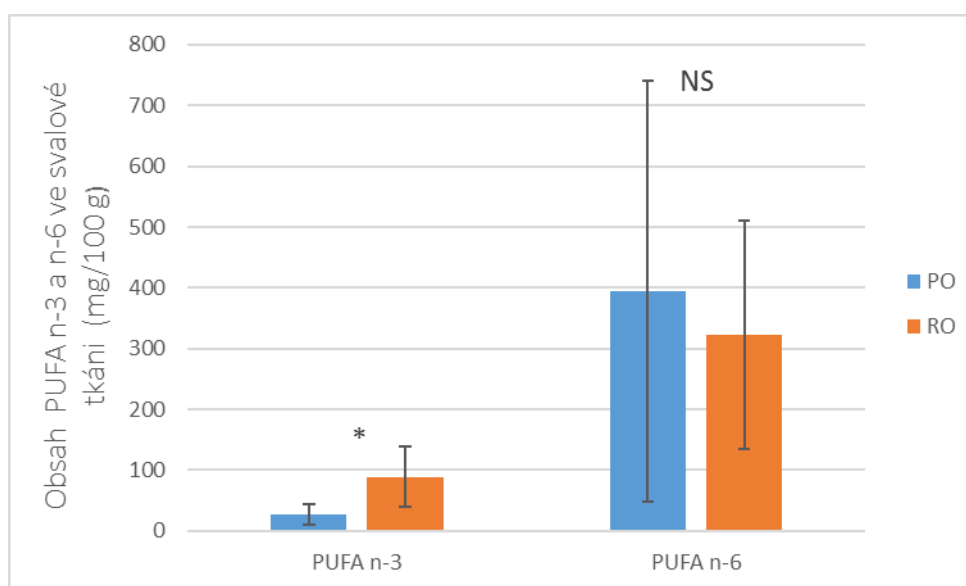


PO – krmivo s přidavkem 2,5 % palmového oleje; RO – krmivo s přidavkem 2,5 % rybího oleje; 18:3 n-3 – kyselina  $\alpha$ -linolenová, 20:5 n-3 – kyselina eikosapentaenová, 22:5 n-3 – kyselina dokosapentaenová, 22:6 n-3 – kyselina dokosahexaenová; n = 32; \* - statisticky průkazný rozdíl mezi skupinami PO a RO ( $P < 0,05$ )

Graf na obrázku č. 14 je zaměřen na obsah PUFA n-3 v tukové tkáni. Skupina RO vykazovala průkazné snížení ( $P < 0,05$ ) obsahu ALA v tukové tkáni v porovnání se skupinou PO. U skupiny RO byl také v porovnání se skupinou PO průkazně zvýšený ( $P < 0,05$ ) obsah kyselin EPA (298 mg/100 g), DPA (335 mg/100 g) a DHA (692 mg/100 g). Oproti tomu u skupiny PO činil obsah uvedených MK průměrně 17 mg/100 g (EPA), 55 mg/100 g (DPA), 70 mg/100 g (DHA). Oproti skupině PO byl tento nárůst u skupiny RO velmi vysoký (u EPA až o 94 %). Bryhni et al. (2002) ve výzkumu vlivu ukládání PUFA do tukové tkáně zaznamenal podobný výsledek, zejména vyšší procento EPA (200 mg/100 g MK) po aplikaci 0,4 % rybího oleje do krmné dávky jatečných prasat oproti skupině se standardní krmnou směsí. Potvrdil tedy, že při fortifikaci krmiva o RO dojde k lineárnímu zvýšení těchto mastných kyselin v tukové tkáni. Wojtasik et al. (2012) při aplikaci 2 % RO potvrzuje zvýšení EPA a DHA v tukové tkáni, ve srovnání s tukem podkožním analyzoval vyšší procento těchto MK v tuku intramuskulárním. Jonsdottir et al. (2003) také uvádí prokazatelné

zvýšení hladiny EPA, DPA a DHA v tukové tkáni po aplikaci RO (9 g/1 kg krmiva). Zvýšení těchto PUFA n-3 na 1,9 % je významné, nicméně při zvýšení obsahu DPA a DHA nad 0,5 % je výrazné riziko nízké oxidační stability, žluknutí a vzniku rybí pachuti. Irie & Sakimoto (1992) při aplikaci diety s obohacením o 6 % RO pozorovali změnu profilu MK a zvýšení hladiny EPA a DHA oproti standardnímu krmivu již po 1 týdnu, po 4 týdnech byl obsah těchto MK v tukové tkáni až 1,39 %.

**Obrázek č. 15: Porovnání celkového obsahu PUFA n-3 a n-6 ve svalové tkáni**

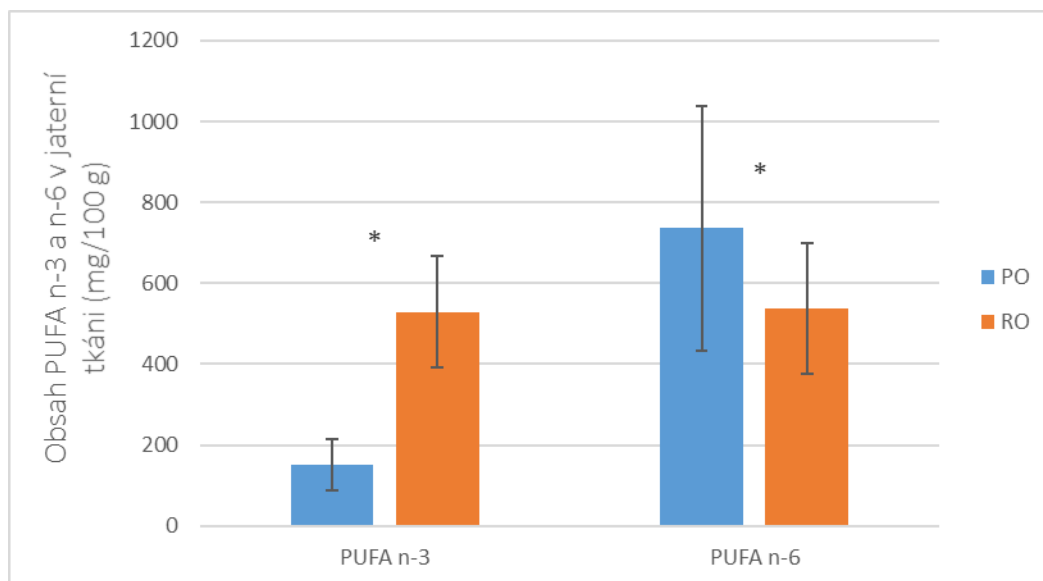


( $n=32$ ); PO – krmivo s přidávkou 2,5 % palmového oleje; RO – krmivo s přidávkou 2,5 % rybího oleje; \* - statisticky průkazný rozdíl mezi skupinami PO a RO ( $P < 0,05$ ); NS – statisticky neprůkazný rozdíl ( $P > 0,05$ )

Graf na obrázku č. 15 znázorňuje porovnání celkového obsahu PUFA n-3 a n-6 ve svalové tkáni. Po aplikaci 2,5 % RO do krmné dávky došlo k prokazatelnému zvýšení ( $P < 0,05$ ) obsahu vybraných PUFA n-3 ve svalové tkáni, významné ovlivnění ( $P > 0,05$ ) obsahu vybraných PUFA n-6 mezi skupinami PO a RO v našem experimentu zaznamenáno nebylo. Aplikace 2 % rybího oleje do krmné dávky prasat měla pozitivní vliv na obsah PUFA n-3 ve svalové tkáni, což potvrzuje Wojtasik et al., (2012). V jeho experimentu byl zároveň také ovlivněn obsah PUFA n-6.



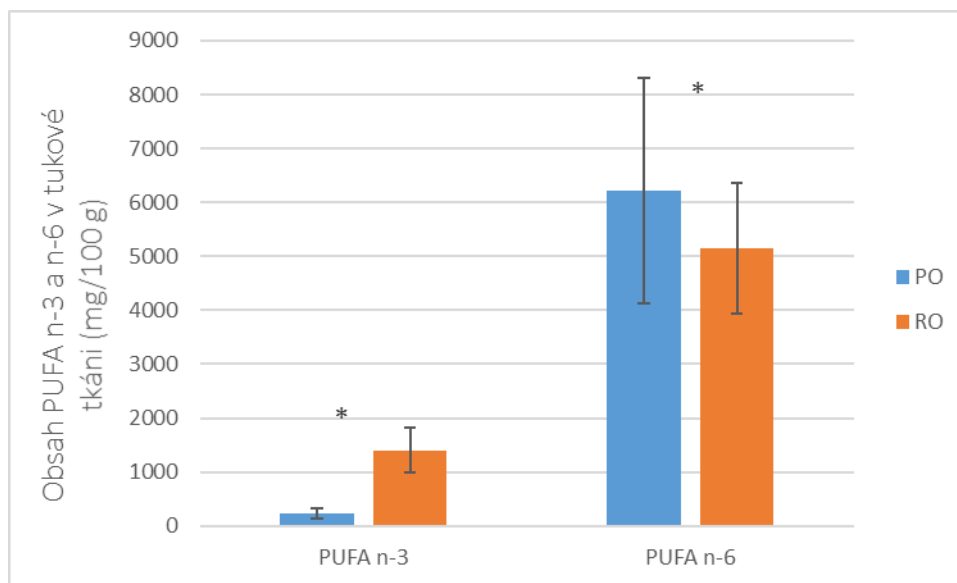
**Obrázek č. 16: Porovnání celkového obsahu PUFA n-3 a n-6 v jaterní tkáni**



(n=32); PO – krmivo s přidavkem 2,5 % palmového oleje; RO – krmivo s přidavkem 2,5 % rybího oleje;  
\* - statisticky průkazný rozdíl mezi skupinami PO a RO(P <0,05)

Graf na obrázku č. 16 znázorňuje porovnání celkového obsahu PUFA n-3 a n-6 v jaterní tkáni. V jaterní tkáni skupiny RO došlo po fortifikaci krmiva k výraznému průkaznému zvýšení PUFA n-3 (P <0,05) oproti obsahu PUFA n-3 u skupiny PO. Tento rozdíl tvořil zejména obsah EPA, DPA a DHA. Statisticky významné (P <0,05) bylo také snížení obsahu PUFA n-6 u skupiny RO v porovnání se skupinou PO.

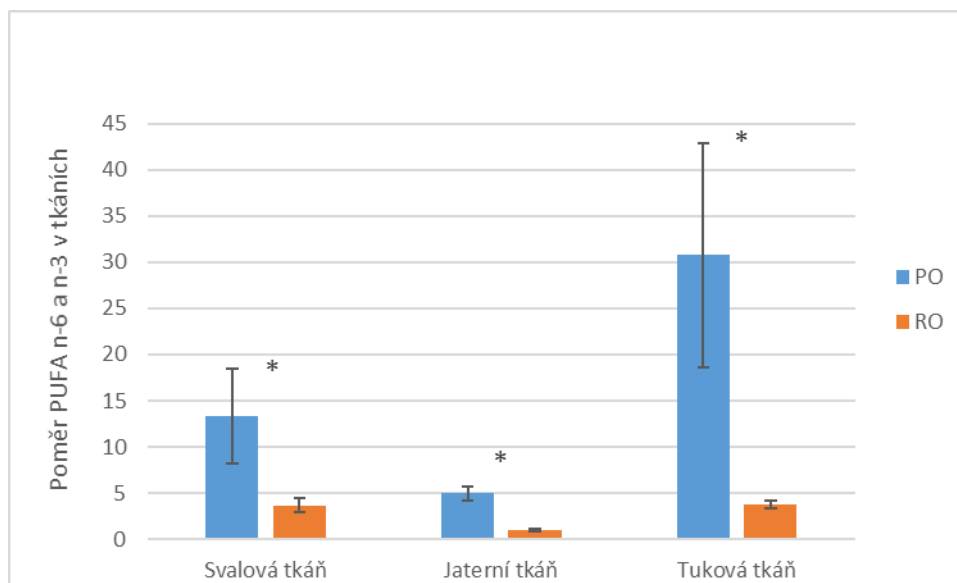
**Obrázek č. 17: Porovnání celkového obsahu PUFA n-3 a n-6 v tukové tkáni**



( $n=32$ ); PO – krmivo s přidavkem 2,5 % palmového oleje; RO – krmivo s přidavkem 2,5 % rybího oleje;  
\* - statisticky průkazný rozdíl mezi skupinami PO a RO ( $P < 0,05$ )

Graf na obrázku č. 17 znázorňuje porovnání celkového obsahu PUFA n-3 a n-6 v tukové tkáni. U tukové tkáně byly zaznamenány statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) v obsahu PUFA n-3 a PUFA n-6 mezi experimentálními skupinami RO a PO. 2,5 % rybího oleje v krmné dávce vedly k výraznému nárůstu hladiny PUFA n-3. Došlo ke zvýšení z 227 mg/100 g tkáně (PO) na 1406 mg/100 g tkáně (RO).

**Obrázek č. 18: Poměr PUFA n-6/n-3 v analyzovaných tkáních prasat**



( $n=32$ ); PO – krmivo s přidavkem 2,5 % palmového oleje; RO – krmivo s přidavkem 2,5 % rybího oleje; \* - statisticky průkazný rozdíl mezi skupinami PO a RO ( $P < 0,05$ )

Graf na obrázku č. 18 zobrazuje poměr PUFA n-6/n-3 v třech typech analyzovaných tkání. Požadovaný poměr u racionálního stravování by se měl co nejvíce blížit 1:1. Při aplikaci 2,5 % rybího oleje do krmné dávky došlo u tkáně svalové, jaterní i tukové k prokazatelnému snížení ( $P < 0,05$ ) tohoto poměru. U skupiny RO byl výsledný poměr PUFA n-6/n-3 v svalové i tukové tkáni průměrně 4:1, v jaterní tkáni 1:1. Oproti poměru daných MK u skupiny PO, který byl 13:1 (svalová tkáň), 30:1 (tuková tkáň) a 5:1 (jaterní tkáň) se jednalo o výrazné zlepšení. Snížení poměru bylo výrazné zejména u tukové tkáně, i přes to je nutné brát v potaz vysoký obsah SFA a MUFA v této tkáni. Snížení poměru PUFA n-6/n-3 při obohacení krmné dávky o RO potvrzují také Øverland et al. (1996; 2009), Jonsdottir et al. (2003), Komprda et al. (2016) a Wojtasik et al., (2012). Z hlediska ovlivnění a vylepšení výživové hodnoty živočišného produktu (masa, jater, tuku) byl tento experiment žádoucí. Při fortifikaci o zdroje, bohaté na PUFA n-3 a zejména bohaté na EPA a DHA lze získat potravinu, která se slučuje s doporučením WHO (Wojtasik et al., 2012).

## 6 ZÁVĚR

Současný stav konzumace zdrojů bohatých na PUFA n-3 není u populace vyspělých zemí pozitivní, je proto na místě zkoumat a vylepšovat obohacování běžných typů potravin a potravinových surovin, které může vést ke zlepšení zdravotního stavu populace. Dalším důvodem obohacování je také nízká aktivita desaturačních enzymů, které umožňují konverzi ALA na EPA a DHA organismu. Tato konverze je navíc závislá na věku a zdravotním stavu organismu, pohlaví, návycích (kouření) a v neposlední řadě na celkovém příjmu tuků. Fortifikací krmiv a potravin umožníme snížení poměru přijímaných PUFA n-6/n-3 ve prospěch mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem, mezi které se řadí výše uvedené EPA a DHA. Produkty metabolických reakcí PUFA jsou výraznými indikátory zdravotního stavu a nevyvážený, resp. nedostatečný poměr těchto MK vede ke vzniku civilizačních onemocnění (zejména ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění) či k zvýšení možnosti zhoubného nádorového bujení. Zvýšením příjmu PUFA n-3 v souladu s dalšími zásadami zdravého životního stylu docílíme ke zlepšení zdravotního stavu a snížíme riziko vzniku těchto onemocnění, případně snížíme jejich následky.

Experimentální část předkládané diplomové práce potvrdila, že při obohacení krmné dávky monogastrů o zdroj nenasycených mastných kyselin dojde ke zvýšení jejich obsahu v tkáních, které jsou běžně využívány jako surovina pro výrobu potravin. Při aplikaci 2,5 % rybího oleje jako zdroje PUFA n-3 s dlouhým řetězcem došlo k průkaznému zvýšení ( $P < 0,05$ ) jejich obsahu ve svalové, jaterní a tukové tkáni a zároveň průkaznému ( $P < 0,05$ ) snížení výsledného poměru PUFA n-6/n-3 na přijatelnou úroveň. U druhé skupiny bylo krmivo obohaceno o 2,5 % palmového oleje a tato skupina sloužila jako kontrola vedeného experimentu. Statistické údaje z naměřených hodnot výzkumu všeobecně vypovídají ve prospěch rybího oleje ve všech typech analyzovaných tkání. Významným zdrojem EPA a DHA by se po obohacení krmiva mohla stát zejména játra, a to i přes vysoký obsah cholesterolu. Při konzumaci 100 g takových jater by bylo přijato zhruba 400 mg EPA a DHA, což je téměř polovina doporučené dávky těchto MK. Podobné pozitivní údaje jsou také pro svalovou tkáň, která by se stala vhodným zdrojem těchto MK. Po aplikaci RO došlo k významnému zvýšení obsah EPA (298 mg/100 g tkáně), DPA (335 mg/100 g tkáně) a DHA (692

mg/100 g tkáně) v tukové tkáni. Oproti kontrolní skupině s 2,5 % palmového oleje byl tento nárůst téměř 90 %, u obsahu EPA se jednalo o 94 %. Nicméně je i přes tento výsledek nutné brát v potaz vyšší obsah nasycených a mononenasycených MK v tukové tkáni. I přes zjištěná pozitiva experimentu je nutné zajistit zejména údržnost a oxidační stabilitu fortifikovaných živočišných materiálů, resp. produktů, a udržení požadovaných sensorických vlastností, které mohou být při obohacení o rybí olej negativně ovlivněny.

## 7 ZDROJE

Aispuro, J. A. M., Alcorta, M. J. G., Romero, L. A. M., Dominguez, S. C., Dominguez, R. M. C., 2016: Substitution of soybean oil for tuna fish oil in broilers diet as an alternative for meat enrichment with n-3 PUFA. *Interciencia*, 41. 851-856.

Akoh, C., Min, D. B., 2002: Food lipids: chemistry, nutrition, and biochemistry. 2. vydání. New York: M. Dekker Inc. ISBN 08-247-0749-4.

Anderson, B. M., Ma, D. W. L., 2009: Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? *Lipids in Health and Disease*. 8.

Aziz, A. A., Cruz-Hernandez, C., Plouffe, U., Casey, V., Xiao, C. W., Ratnayake, W. M. N., 2010: Increasing dietary alpha-linolenic acid enhances tissue levels of long chain n-3 PUFA, when linoleic acid intake is low in hamsters. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 57. 50-58.

Barceló-Coblijn G., Murphy, E. J. 2009. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Progress in Lipid Research*. 48. 355 – 374.

Betti, M., Schneider, B. L., Wismer, W. V., Carney, V. L., Zuidhof, M. J., Renema, R. A., 2009: Omega-3-enriched broiler meat: 2. Functional properties, oxidative stability, and consumer acceptance. *Poultry Science*. 88. 1085–1095.

Brenna, J. T., Salem, N., Sinclair, A. J., Cunnane, S. C., 2009: Alpha-linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandines, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 80. 85-91.

Brestensky, M., Nitrayova, S., Patras, P., Heger, J., Nitray, J., 2016: Effect of the supplementation linseed oil, inulin and horse chestnut into a high fat diet on the fatty acid profile of pigs. *Ciencia Rural*. 46. 1992-1997.

Bryhni, E. A., Kjos, N. P., Ofstad, R., Hunt, M., 2002: Polyunsaturated fat and fish oil in diets for growing-finishing pigs: effects on fatty acid composition and meat, fat, and sausage quality. *Meat Science*. 62. 1 – 8.

- Burdge, G. C., Wootton, S. A. 2002. Conversion of  $\alpha$ -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *British Journal of Nutrition*. 88. 411-420.
- Chen, Y. C., Nguyen, J., Semmens, K., Beamer, S., Jaczynski, J., 2006: Enhancement of omega-3 fatty acids content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *Journal of Food Science*. 71. 383 – 389.
- Cherian, G., Sim, J. S., 1995: Dietary  $\alpha$ -linolenic acid alters the fatty acid composition of lipid classes in swine tissues. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 43. 2911–2916.
- Chow, C. K., 2008: Fatty acids in foods and their health implications. 3. vydání. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. ISBN 978-0-8493-7261-2.
- Clouard, C., Souza, A. S., Gerrits, W. J. J., Hovenier, R., Lammers, A., Bolhuis, J. E., 2015: Maternal Fish Oil Supplementation Affects the Social Behavior, Brain Fatty Acid Profile, and Sickness Response of Piglets. *Journal of Nutrition*. 145. 2176-2184.
- Das, U., 2006: Essential fatty acids – A review. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 7. 467-482.
- De Tonnac, A., Karim-Luisset, S., Mourot, J., 2017: Effect of different dietary linseed sources on fatty acid composition in pig tissues. *Livestock Science*. 200. 1 - 23.
- Dostálová, J., Dlouhý, P., Tláškal, P., 2012: Výživová doporučení pro obyvatelstvo České republiky. Společnost pro výživu [online; cit. 2017-02-17]. Dostupné z: <http://www.vyzivaspol.cz/vyzivova-doporuceni-pro-obyvatelstvo-ceske-republiky/>
- Dugan, M. E. R., Vahmani, P., Turner, T. D., Mapiye, C., Juárez, M., Prieto, N., Beaulieu, A. D., Zijlstra, R. T., Patience, J. F., Aalhus, J. L., 2015: Pork as a Source of Omega-3 (n-3) Fatty Acids. *Journal of Clinical Medicine*, 4. 1999–2011.
- Endres, S., Ghorbani, R., Kelley, V. E., Georgilis, K., Lonneymann, G., van der Meer, J. W., Cannon, J. G., Rogers, T. S., Klempner, M. S., Weber, P. C., 1989: The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *The New England Journal of Medicine*. 320. 265-281.

- Fialová, L., 2011: Mastné kyseliny: Charakteristika, třídění, význam. Ústav lékařské biochemie, 1. LF Univerzity Karlovy [online; cit. 2016-09-28]. Dostupné z: [http://che1.lf1.cuni.cz/html/Mastne\\_kyseliny\\_2sm.pdf](http://che1.lf1.cuni.cz/html/Mastne_kyseliny_2sm.pdf)
- Fontanillas, R., Barroeta, A., Baucells, M. D., Codony, R., 1997: Effect of feeding highly cis-monounsaturated, trans, or n-3 fats on lipid composition of muscle and adipose tissue of pigs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 45. 3070–3075.
- Ganesan, B., Brothersen, C., McMahon, D. J., 2014: Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Science and Nutrition*. 54. 98-114.
- Gerster, H. 1998. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 68. 159 -173.
- Givens, D. I., Gibbs, R. A., 2008: Current intakes of EPA and DHA in European populations and the potential of animal-derived foods to increase them. *Proceedings of the Nutrition Society*. 67. 273-280.
- Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonca, E., Batista, A. P., Sousa, I., Banderra, N. M., Raymundo, A., 2008: Functional biscuits with PUFA- $\omega$ 3 from *Isochrysis galbana*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88. 891–896.
- Gunnars, K., 2014: Tuky - jak optimalizovat poměr mastných kyselin Omega-6 a Omega-3? Tillmann Software, Školní a veřejné stravování [online; cit. 2017-02-06]. Dostupné z: <http://www.tillmann.cz/potraviny/209-tuky-jak-optimalizovat-pomr-mastnych-kyselin-omega-6-a-omega-3->
- Haak, L., Desmet, S., Fremaut, D., Van Walleggem, K., Raes, K., 2008: Fatty acids profile and oxidative stability of pork as influenced by duration and time of dietary linseed or fish oil supplementation. *Journal of Animal Science*. 86. 1418-1425.
- Hyblerová, D., 2014: Vliv PUFA n-3 na expresi genů kódujících proteiny řídící homeostázu cholesterolu. Brno. Diplomová práce. Mendelova Univerzita v Brně.
- Irie, M., Sakimoto, M., 1992: Fat characteristics of pigs fed fish oil containing eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Journal of Animal Science*. 70. 470–477.



Jacobsen, C., Nielsen, N. S., Frisenfeldt-Horn, A., Moltke-Sørensen, A. D., 2013: Food enrichment with omega-3 fatty acids. Cambridge: Woodhead Publishing. ISBN 978-085-7098-863.

Jonsdottir, R., Valdimarsdottir, T., Baldursdottir, B., Thorkelsson, G., 2003: Influence of low fat fishmeal on fatty acid composition and sensory quality of pork. *Journal of Muscle Foods*. 14. 51 – 65.

Kasper, H., 2015: Výživa v medicíně a dietetika. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4533-6.

Khiaosa-ard, R., Chungsirawat, P., Chommanart, N., Kreuzer, M., Jaturasitha, S., 2011: Enrichment with n-3 fatty acid by tuna oil feeding of pigs: changes in composition and properties of bacon and different sausages as affected by the supplementation period. *The Canadian Veterinary Journal*. 91. 87-95.

Klouda, P., 2003: Moderní analytické metody. 2. upravené a doplněné vydání. Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 978-80-86369-07-5.

Koláčková, M., 2016: Obsah PUFA n-6 a n-3 ve vybraných živočišných tkáních. Brno. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně.

Komprda, T., Zelenka, J., Fajmonová, E., Fialová, M., Kladroba, D., 2005: Arachidonic acid and long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid contents in meat of selected poultry and fish species in relation to dietary fat sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53. 6807-6812.

Komprda, T., 2011: Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as inflammation modulating a lipid homeostasis influencing nutraceuticals: A review. *Journal of Functional Foods*. 4. 25-38.

Komprda, T., Ansorgová, A., Rozíková, V., Němcová, B., 2015: Chromatografické stanovení polynenasycených mastných kyselin ve vybraných živočišných tkáních. *Chemické listy*. 109. 140–146.

Komprda, T., Zorníková, G., Rozíková, V., Borkovcová, M., Przywarová, A., 2013.: The effect of dietary *Salvia hispanica* seed on the content of n-3 longchain

polyunsaturated fatty acids in tissues of selected animal species, including edible insects. *Journal of Food Composition and Analysis* 32. 36-43.

Komprda, T., 2003: *Základy výživy člověka*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 978-807-1576-556.

Koolman, J., Röhm, K. H., 2012: *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada. ISBN 978-802-4729-770.

Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J., 2004: *Biochemie pro studující medicíny*. Praha: Karolinum. ISBN 978-802-4608-495.

Lemahieu, C., Bruneel, C., Ryckebosch, E., Muylaert, K., Buyse, J., Foubert, I., 2015: Impact of different omega-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) sources (flaxseed, *Isochrysis galbana*, fish oil and DHA Gold) on n-3 LC-PUFA enrichment (efficiency) in the egg yolk. *Journal of Functional Foods*. 19. 821-827.

Li, F. N., Duan, Y. H., Li, Y. H., Tang, Y. L., Geng, M. M., Oladele, O. A., Kim, S. W., Yin, Y. L., 2015: Effects of dietary n-6:n-3 PUFA ratio on fatty acid composition, free amino acid profile and gene expression of transporters in finishing pigs. *British Journal of Nutrition*. 113. 739-748.

Maděrová, P., 2011: *Plynová chromatografie mastných kyselin ve vzorcích vepřového masa*. Brno. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně.

Martini, S., Thurgood, J. E., Brothersen, C., Ware, R., McMahon, D. J., 2009: Fortification of reduce-fat Cheddar cheese with n-3 fatty acids: Effect on off-flavor generation. *Journal of Dairy Science*. 92. 1876-1884.

Morris, D. H., 2015: Metabolism of alpha-linolenic acid. *New Flax Facts*. Flax Council of Canada. [online; cit. 2017-03-15]. Dostupné z: [http://flaxcouncil.ca/wp-content/uploads/2015/03/Flax\\_FSht\\_Metabol08\\_R.pdf](http://flaxcouncil.ca/wp-content/uploads/2015/03/Flax_FSht_Metabol08_R.pdf)

Mourek, J., 2007: *Mastné kyseliny Omega-3: zdraví a vývoj*. Praha: Triton. ISBN 978-807-2549-177.

Mráček, A., 2009: *Metody separace přírodních látek: Chromatografie*. Ústav fyziky a materiálového inženýrství. Univerzita Tomáše Bati, Zlín [online, cit. 2016-09-28]. Dostupné z: [http://ufmi.ft.utb.cz/texty/separacni\\_metody/SM\\_05.pdf](http://ufmi.ft.utb.cz/texty/separacni_metody/SM_05.pdf)

Murray, R. K., 2012: Harperova ilustrovaná biochemie. 5. české vyd. Praha: Galén. ISBN 978-807-2629-077.

Neijat, M., Ojekudo, O., House, J. D., 2016: Effect of flaxseed oil and microalgae DHA on the production performance, fatty acids and total lipids of egg yolk and plasma in laying hens. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 115. 77-88.

Nettleton, J. A., 1995: Omega-3 fatty acids and health. New York: Chapman. 1995. ISBN 04-129-8861-5.

Nielsen, S. S., 2010: Food analysis. 4. vydání. Dordrecht: Springer. ISBN 978-144-1914-781.

Nollet, L. M. L., 2004: Handbook of food analysis. 2. vydání. New York, NY: Dekker. ISBN 08-247-5036-5.

Øverland, M., Taugbøl, O., Haug, A., Sundstøl, E., 1996: Effect of Fish Oil on Growth Performance, Carcass Characteristics, Sensory Parameters, and Fatty Acid Composition in Pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 46. 11 – 17.

Pěknicová, M., Krucinová, D., 1999: Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu. Český Těšín: Theta. ISBN 80-902-4329-0.

Piotrowska, A., Swiader, K., Waszkiewicz-Robak, B., Swiderski, F., 2012: Possibilities to produce pork meat and pork meat products with increase content of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Zywnosc-Nauka Technologia Jakosc*. 19. 5-19.

Poole, C. F., 2012: Gas chromatography. Amsterdam: Elsevier. ISBN 978-0-12-385540-4.

Quintin, T. J., 2010: Chromatography: types, techniques and methods. New York: Nova Science Publishers. ISBN 16-087-6316-1.

Raes, K., Desmet, S., Demeyer, D., 2004: Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 113. 199-221.

- Rozíková, V., 2014: Analýza vybraných zemědělských produktů z hlediska optimálního poměru n-3 a n-6 polynenasycených mastných kyselin. Brno. Disertační práce. Mendelova univerzita v Brně.
- Simopoulos, A. P., 2006: Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *American Journal of Clinical Nutrition*, 438 - 457.
- Skiba, G., Polawska, E., Sobol, M., Raj, S., Weremko, D., 2015: Omega-6 and omega-3 fatty acids metabolism pathways in the body of pigs fed diets with different sources of fatty acids. *Archives of Animal Nutrition*. 69. 1-16.
- Sobotníková, J., Bosáková, Z., Čabala, R., Coufal, P., Pacáková, V., Štulík, K., 2010: Historie, současnost a perspektivy analytických separačních metod na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. *Chemické listy*. 104. 1226-1231.
- Sousa, R. V., Fialho, E. T., Lima, J. A. F., Alvarez-Leite, J. I., Cortez, W. C., Ferreira, M. S. S., 2010: Effect of different oils in diets for finishing pigs: performance, carcass traits and fatty acid profile of the meat. *Animal Products Science*. 50. 863–868.
- Tanghe, S., Missotten, J., Raes, K., DeSmet, S., 2015: The effect of different concentrations of linseed oil or fish oil in the maternal diet on the fatty acid composition and oxidative status of sows and piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 99. 938-949.
- Trnka, M. 2010: Charakteristika svalových vláken u prasat ve vztahu k vybraným ukazatelům výkrmnosti a jatečné hodnoty. Praha. Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Turner, T. D., Mapive, C., Aalhus, J. L., Beaulieu, A. D., Patience, J. F., Zilstra, R. T., Dugan, M. E. R., 2014: Flaxseed fed pork: n3 fatty acid enrichment and contribution to dietary recommendations. *Meat Science*. 96. 541 – 547.
- Velíšek, J., Hajšlová, J., 2009: Chemie potravin. 3. vydání. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-17-6.

Wei, H., Zhou, Y., Jiang, S., Huang, F., Peng, J., Jiang, S., 2016: Transcriptional response of porcine skeletal muscle to feeding a linseed-enriched diet to growing pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 7. 1-10.

Wicom, R. L., Gehrke, C. W., 2010: Chromatography: a science of discovery. Hoboken, N. J.: Wiley. ISBN 978-0-470-28345-5.

Wojtasik, M., Raj, S., Skiba, D., Weremko, D., Czauderna, M., 2012: The effects of diets enriched in omega-3 fatty acids on carcass characteristics and the fatty acid profile of intramuscular and subcutaneous fat in pigs. *Journal of Animal and Feed sciences*. 21. 635-647.

Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., Hughes, S. I., Whittington, F. M., 2008: Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*. 78. 343 – 358.

Yildiz, F., 2010: Advances in food biochemistry. Boca Raton: CRC Press. ISBN 08-493-7499-5.

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1	Typy mastných kyselin. ....	12
Obrázek č. 2	Konformace cis a trans mastných kyselin.....	13
Obrázek č. 3	Schéma $\beta$ -oxidace PUFA.....	17
Obrázek č. 4	Strukturní vzorec ALA, EPA a DHA.....	21
Obrázek č. 5	Metabolismus eikosanoidů.....	22
Obrázek č. 6	Schéma plynové chromatografie.....	39
Obrázek č. 7	Schéma chromatogramu.....	42
Obrázek č. 8	Obsah vybraných MK v krmivu.....	49
Obrázek č. 9	Obsah PUFA n-6 ve svalové tkáni prasat.....	50
Obrázek č. 10	Obsah PUFA n-3 ve svalové tkáni prasat .....	51
Obrázek č. 11	Obsah PUFA n-6 v jaterní tkáni prasat.....	52
Obrázek č. 12	Obsah PUFA n-3 v jaterní tkáni prasat.....	53
Obrázek č. 13	Obsah PUFA n-6 v tukové tkáni prasat.....	54
Obrázek č. 14	Obsah PUFA n-3 v tukové tkáni prasat.....	55
Obrázek č. 15	Porovnání celkového obsahu PUFA n-3 a n-6 ve svalové tkáni..	56
Obrázek č. 16	Porovnání celkového obsahu PUFA n-3 a n-6 v jaterní tkáni.....	57
Obrázek č. 17	Porovnání celkového obsahu PUFA n-3 a n-6 v tukové tkáni...58	
Obrázek č. 18	Poměr PUFA n-6/n-3 v analyzovaných tkáních.....	59

## 9 SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1	Přehled a názvy vybraných PUFA n-3 a n-6.....	15
Tabulka č. 2	Biosyntéza PUFA n-6 a n-3 .....	20
Tabulka č. 3	Obecný přehled účinků eikosanoidů. ....	24
Tabulka č. 4	Západní strava vs. doporučená vyvážená strava .....	25
Tabulka č. 5	Zastoupení PUFA n-6 a n-3 v potravinách.....	26
Tabulka č. 6	Průměrný obsah EPA a DHA u vybraných druhů ryb.....	27

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AA – arachidonová kyselina
- ALA –  $\alpha$ -linolenová kyselina
- ATP – adenosintrifosfát
- cAMP - cyklický adenosin monofosfát
- COX – cyklooxygenáza
- DGLA – dihomogamma-linolenová kyselina
- DHA – dokosaheptaenová kyselina
- DLP - dislipoproteinémie
- DM – Diabetes mellitus
- DPA – dokosapentaenová kyselina
- DTA – dokosatetraenová kyselina
- EFA – esenciální mastné kyseliny
- EPA – eikosapentaenová kyselina
- ER – endoplasmatické retikulum
- FAD – flavinadenin dinukleotid
- FID – plamenově ionizační detektor
- FO – rybí olej
- GC – plynová chromatografie
- GLA –  $\gamma$ -linolenová kyselina
- HETE - kyselina hydroperoxyeikosatetraenová
- HPETE - kyselina hydroperoxytetraenová
- IL-1 – interleukiny-1



KVO – kardiovaskulární onemocnění

LA – linolová kyselina

LC – kapalinová chromatografie

LOD – mez detekce

LOQ – mez stanovitelnosti

LT – leukotrieny

LX – lipoxiny

MUFA – mononenasyčené mastné kyseliny

NAD – nikotinamidadenindinukleotid

PC – papírová chromatografie

PG - prostaglandin

PGI – prostacyklin

PPAR – peroxisome proliferator-activated receptor

PSA – prostatický specifický antigen

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

SFA – nasycené mastné kyseliny

SREBP - sterol regulatory element-binding protein

TAG - triacylglycerol

TNF – tumor necrosis factor

TLC – tenkovrstvá chromatografie

TX – tromboxany

WHO – Světová zdravotnická organizace