



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# VÝVOJ OBOHACENÝCH BEZLEPKOVÝCH CEREÁLIÍ PRO ZVLÁŠTNÍ VÝŽIVU

DEVELOPMENT OF FORTIFIED GLUTEN-FREE CEREALS FOR SPECIFIC NUTRITION

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Radka Dohnalová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2023

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1799/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Radka Dohnalová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Chemie a analýza přírodních látek  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

### Název bakalářské práce:

Vývoj obohacených bezlepkových cereálií pro zvláštní výživu

### Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše – přehled cereálií se zvláštním zaměřením na bezlepkové produkty
- 2) charakterizace složení cereálií – pohanka, amaranth, quinoa
- 3) výběr vhodných kvasinek a řas a stanovení biologicky aktivních látek – vitaminů, antioxidantů a PUFA
- 4) příprava směsných cereálních produktů, jejich charakterizace a biologické účinky

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

-----  
Radka Dohnalová  
studentka

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá vývojem obohacených bezpečných cereálií pro zvláštní výživu. Součástí obohaceného cereálního výrobku byla zpracovaná mikrobiální biomasa, buď jako lyofilizovaný prášek nebo jako extrakt, u nichž byl stanoven obsah fenolických látek, antioxidantů a bílkovin.

Teoretická část obsahuje poznatky z odborné literatury o bezpečných cereáliích, pseudocereáliích a jejich chemickém složení. Následně byl zpracován přehled o mikrořasách a kvasinkách zahrnující výčet jejich metabolitů. V rámci literární rešerše byl největší důraz kladen na zelené mikrořasy a karotenogenní kvasinky.

V rámci výzkumné části byla nejprve provedena charakterizace vybraných pseudocereálií a optimalizace připravených extraktů z vybrané mikrořasy a karotenogenní kvasinky. Zvolenými pseudocereáliemi byly amaranth, pohanka a quinoa. Pro obohacení pseudocereálií byl vybrán kmen zelené mikrořasy *Chlamydomonas reinhardtii* a kmen karotenogenní kvasinky *Cystofilobasidium macerans*.

V pseudocereáliích byly stanoveny sacharidy, bílkoviny, mastné kyseliny,  $\beta$ -glukany, lepek, vitaminy, fenolické látky, flavonoidy a antioxidanty. V mikrobiální biomase byl zjištěn obsah celkových mastných kyselin, lipofilních látek, fenolických látek a celkové antioxidační aktivity. Na závěr byly připraveny směsné cereální produkty z pseudocereální mouky, mikrobiální biomasy a mikrobiálního extraktu. U zvolených extraktů byla stanovena cytotoxicita pomocí MTT testu.

Bylo zjištěno, že přidáním samotné řasové biomasy nebo řasového extraktu k cereálním moukám, došlo k výraznému navýšení množství bílkovin. Díky kvasinkovému ethanolovému extraktu vzrostl obsah fenolických a antioxidačních látek v cereálních produktech.

## KLÍČOVÁ SLOVA

cereálie, pseudocereálie, amaranth, pohanka, quinoa, mikrořasy, kvasinky, fenolické látky, antioxidanty, bílkoviny, karotenoidy, chlorofyly

## ABSTRACT

The bachelor thesis was focused on the development of enriched gluten-free cereals for special nutrition. The fortified cereal product included processed microbial biomass, either as a freeze-dried powder or as an extract, for which the phenolic content, antioxidant content and protein content were determined.

The theoretical part includes findings from professional literature on gluten-free cereals, pseudocereals and their chemical composition. Subsequently, a review on microalgae and yeasts was prepared including a list of their metabolites. The literature search focused on green microalgae and carotenogenic yeasts.

In the experimental part, the characterization of the selected pseudocereals and optimization of the prepared extracts of the selected microalgae and carotenogenic yeast were firstly carried out. The selected pseudocereals were amaranth, buckwheat and quinoa. The green microalgae strain *Chlamydomonas reinhardtii* and the carotenogenic yeast strain *Cystofilobasidium macerans* were selected for enrichment of the pseudocereals.

Carbohydrates, proteins, fatty acids,  $\beta$ -glucans, gluten, vitamins, phenolic substances, flavonoids and antioxidants were determined in the pseudocereals. Total fatty acids, lipophilic substances, phenolic substances and total antioxidant activity were detected in the microbial biomass. Finally, mixed cereal products were prepared from pseudocereal flour, microbial biomass and microbial extract. The cytotoxicity of the selected extracts was determined by MTT assay.

It was found that the addition of algal biomass alone or algal extract to cereal flours resulted in a significant increase in protein. The yeast ethanol extract increased the phenolic and antioxidant content of the cereal products.

## KEYWORDS

cereals, pseudocereals, amaranth, buckwheat, quinoa, microalgae, yeasts, phenolic substances, antioxidants, proteins, carotenoids, chlorophylls

DOHNALOVÁ, Radka. *Vývoj obohacených bezlepkových cereálií pro zvláštní výživu* [online]. Brno, 2023. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149207>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....

podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce prof. RNDr. Ivaně Márové, Csc za odborné vedení a rady, které mi při vypracování bakalářské práce poskytla. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Agátě Bendové a Ing. Janě Blažkové za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu při jejím řešení. Na závěr bych chtěla poděkovat Fakultě chemické za vytvoření podmínek a možností pro realizaci této práce.

# OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Cereálie.....	10
2.2	Chemické složení obilného zrna.....	10
2.2.1	Sacharidy .....	10
2.2.2	Bílkoviny .....	10
2.2.3	Lipidy .....	11
2.2.4	Vitaminy a minerální látky .....	11
2.3	Vybrané bezlepkové cereálie.....	11
2.3.1	Jáhly.....	11
2.3.2	Čirok.....	12
2.3.3	Teff .....	12
2.3.4	Kukuřice .....	12
2.4	Pseudocereálie .....	12
2.5	Chemické složení zrn pseudocereálií .....	12
2.5.1	Bílkoviny pseudocereálií .....	13
2.5.2	Sacharidy pseudocereálií .....	14
2.5.3	Lipidy pseudocereálií .....	14
2.5.4	Minerály .....	15
2.5.5	Vitaminy.....	15
2.5.6	Bioaktivní sloučeniny pseudocereálií.....	15
2.6	Vybrané pseudocereálie.....	16
2.6.1	Amaranth .....	16
2.6.2	Pohanka .....	16
2.6.3	Quinoa .....	17
2.7	Celiakie.....	17
2.7.1	Celiakie u dětí.....	18
2.8	Mikroorganismy .....	18
2.8.1	Mikrořasy .....	18
2.8.2	Kvasinky.....	20
2.9	Používané analytické metody .....	22
2.9.1	UV-VIS spektrofotometrie .....	22
2.9.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	23
2.9.3	Plynová chromatografie.....	23
2.9.4	Stanovení antioxidační aktivity .....	23
2.9.5	Imunochemické stanovení lepku (RIDASCREEN® Gliadin competitive).....	24

2.9.6	Testování cytotoxicity <i>in vitro</i> .....	24
3	CÍLE PRÁCE .....	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	26
4.1	Použité chemikálie .....	26
4.1.1	Chemikálie použité pro kultivaci mikrořasy .....	26
4.1.2	Chemie použité pro kultivaci kvasinek .....	26
4.1.3	Chemikálie pro stanovení fenolických sloučenin a flavonoidů.....	26
4.1.4	Chemikálie pro stanovení antioxidační aktivity .....	26
4.1.5	Chemikálie pro stanovení $\beta$ -glukanů a lepku .....	26
4.1.6	Chemikálie pro MTT test .....	26
4.1.7	Chemikálie použité pro extrakce a analýzu (HPLC, GC).....	27
4.2	Použité přístroje.....	27
4.3	Seznam použitých vzorků vybraných pseudocereálií.....	28
4.4	Použité kmeny řas a kvasinek.....	28
4.5	Kultivace mikroorganismů .....	28
4.5.1	Kultivace mikrořas .....	28
4.5.2	Kultivace kvasinek .....	29
4.6	Optimalizace extrakcí z karotenogenních kvasinek a mikrořas .....	30
4.7	Charakterizace vzorků.....	31
4.7.1	Příprava vzorků vybraných druhů mouk pro spektrofotometrické stanovení.....	31
4.7.2	Stanovení sacharidů dle Duboise.....	31
4.7.3	Stanovení obsahu celkových fenolických látek.....	31
4.7.4	Stanovení flavonoidů.....	32
4.7.5	Stanovení celkové antioxidační aktivity .....	32
4.7.6	Stanovení rozpustných bílkovin dle Hartree-Lowryho.....	32
4.7.7	Stanovení lepku .....	33
4.7.8	Celková výtěžnost mikrobiální extrakce .....	33
4.7.9	Měření absorpčních spekter extraktů na UV-VIS spektrofotometrii.....	33
4.7.10	Stanovení celkových karotenoidů a chlorofylů v extraktech z mikrořas.....	33
4.7.11	Stanovení celkových karotenoidů v extraktech z karotenogenních kvasinek.....	33
4.7.12	Enzymatické stanovení $\beta$ -glukanů v moukách a řase.....	34
4.7.13	Enzymatické stanovení k $\beta$ -glukanů v kvasinkách.....	34
4.7.14	Stanovení lipofilních látek v extraktech metodou HPLC .....	35
4.7.15	Stanovení mastných kyselin (GC).....	35
4.7.16	Testování cytotoxicity .....	36
4.8	Příprava směsných cereálních produktů.....	37
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39

5.1	Stanovení celkových sacharidů dle Duboise .....	39
5.2	Stanovení celkových fenolických látek .....	39
5.3	Stanovení flavonoidů.....	41
5.4	Stanovení antioxidační aktivity .....	41
5.5	Stanovení rozpustných bílkovin dle Hartree-Lowryho .....	43
5.6	Stanovení lepku .....	43
5.7	Celková výtěžnost mikrobiální extrakce .....	44
5.8	Měření absorpčních spekter extraktů na UV-VIS spektrofotometrii.....	45
5.9	Stanovení celkových karotenoidů a chlorofylů v extraktech z mikrořas.....	46
5.10	Stanovení celkových karotenoidů v extraktech z karotenogenních kvasinek .....	47
5.11	Stanovení lipofilních látek.....	47
5.12	Stanovení mastných kyselin .....	49
5.13	Stanovení $\beta$ -glukanů.....	54
5.14	Testování cytotoxicity .....	54
5.15	Směsné cereální produkty.....	56
6	ZÁVĚR.....	60
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	62
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	71



# 1 ÚVOD

Cereálie neboli obiloviny jsou nejstarší pěstované rostliny člověkem. Staly se nejrozšířenějšími plodinami na Zemi díky své schopnosti adaptovat se na dané podmínky prostředí. Jsou označovány jako funkční potraviny, obsahují nutriční a biologické látky, jako jsou vitaminy, minerální látky. Součástí běžných cereálií je speciální protein zvaný lepek, na který může vznikat intolerance a alergie. Způsobuje nemoc celiakii, jedná se o chronické autoimunitní onemocnění tenkého střeva a postihuje přibližně 1 % světové populace. Tato nemoc se může projevit v jakémkoli věku, v současnosti neexistuje žádná léčba, přísná bezlepková dieta je jedinou účinnou terapií. Nicméně tuto dietu je obtížné dodržovat kvůli nezamýšlené kontaminaci, nesprávnému označování a všudypřítomnosti lepkových proteinů v syrových nebo vařených potravinách a lécích. Mnohdy však dostupné bezlepkové potraviny neobsahují stejné množství mikroživin jako je thiamin, riboflavin, niacin, folát, vitamin D, vápník a železo. Většina bezlepkových produktů se vyrábí z kukuřice a rýže, které nejsou dobrým zdrojem mikroživin. Některé bezlepkové potraviny obsahují více tuku včetně nasycených kyselin a solí a méně minerálů a vitaminů. Dlouhodobá nevyvážená strava může způsobit závažná chronická a civilizační onemocnění. Předějit tomuto nutričnímu deficitu by mohly pseudocereálie.

Pseudocereálie jsou slibné plodiny budoucnosti nejen pro celiaky, ale i pro lidi zájímající se o zdravý životní styl. Mezi pseudocereálie patří amaranth, quinoa a pohanka. Tyto netradiční cereálie mají mnoho potenciálních zdravotních výhod, jsou nutričně bohatší především ve zdroji bílkovin a mají vyváženější obsah aminokyselin než klasické obiloviny a přirozeně se vyskytují bez lepku. Tyto potraviny by mohly zlepšit nutriční slabiny komerčně prodávaných bezlepkových výrobků. Jejich nevýhoda je vyšší cena v porovnání s jinými bezlepkovými obilovinami.

Při hledání alternativních plodin představují mikroorganismy nové perspektivy pro vývoj nových inovativních bezlepkových potravin. Zelené mikrořasy a karotenogenní kvasinky jsou stále více zkoumány v oblasti biotechnologického průmyslu, protože jsou cennými zdroji látek se širokým spektrem využití [1]. Řasy se konzumují už po mnoha let a jsou jedny z nejstarších mikroorganismů na Zemi a ukázaly se jako vynikající kandidáti pro konstrukci nových potravinářských produktů nebo napodobování živočišných produktů, aby byly splněny nutriční a environmentální potřeby. Akumulují vysoce stravitelné bílkoviny, lipidy a sacharidy a jsou bohaté na esenciální mastné kyseliny, vitaminy a minerály [2]. Nicméně použití mikrořas často brání nepříjemná barva a chuť. Aby se však mikrořasy staly potravou budoucnosti, mělo by být vynaloženo více úsilí na nalezení správného předběžného ošetření, které umožní využití celé biomasy a bude nákladově efektivní. V současnosti je konzumace mikrořas zastoupena především v doplňcích stravy ve formě kapslí či prášku [3]. Karotenogenní kvasinky jsou známými producenty biotechnologicky významných karotenoidních pigmentů: astaxanthinu, karotenu, torulenu a torularhodinu. Zejména jsou široce využívány v průmyslovém měřítku jako přísady do farmaceutických, chemických, potravinářských a krmivářských produktů, většinou jako prekurzory vitamínu A [4]. Navíc během posledního desetiletí došlo k odmítání syntetických potravinářských barviv. Některé byly dokonce zakázány z důvodu jejich hyperalergenity, karcinogenity a dalších toxikologických problémů. V souladu s tím roste poptávka po barvivech přírodního původu, které lze extrahovat z různých rostlin, řas a mikroorganismů [5].

Cílem této bakalářské práce je představit nový způsob obohacení bezlepkových cereálií pro zvláštní výživu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Cereálie

Cereálie neboli obilniny patří do čeledi lipnicovité (*Poaceae*), do jednoděložných rostlin. Botanicky jsou řazeny mezi trávy (*Gramineae*). Každá z obilovin má několik botanických druhů a řadu odrůd [6]. Hlavní části obilnin jsou lodyhy s uzly, ze kterých klíčí poupata a listy. Pěstují se primárně pro svá zrna, která se běžně nazývají „obilky“. Zrno se skládá z otrub, endospermu a klíčku. Otruby představují vnější část, endosperm je považován za hlavní část a klíček představuje nejmenší část zrna. Zrna všech obilovin mají zhruba stejnou morfologickou stavbu, ale liší se především tvarem, velikostí a podílem jednotlivých vrstev. Zrna jsou zásobárnou životně důležitých živin [7] [8].

Obiloviny patří k nejstarším zdrojům potravy pro lidstvo. Poskytují potřebné bílkoviny, vitaminy skupiny B a minerály. Dle Organizace pro potravinářské hospodářství (FAO) přesáhla produkce obilovin 2,3 miliardy tun ročně. Obiloviny jsou základní surovinou pro více než 6 500 milionů obyvatel světa a také hlavní surovinou pro výrobu krmiv. Především jsou využívány v méně rozvinutých zemích z důvodu nižší ceny ve srovnání s živočišnými potravinami [9]. Dále se využívají k technickému zpracování na škrob a lín [10].

Tradiční cereálie se dělí na hlavní a vedlejší podle objemu jejich produkce, využití a nutriční hodnoty antioxidantů. Antioxidantní látky obsahují především minoritní cereálie, jsou užitečné v prevenci škály onemocnění spojených s oxidačním poškozením. Mezi hlavní obiloviny je řazena pšenice, kukuřice, rýže a ječmen. Čirok, proso, oves, žito, špalda a jiné primitivní a divoké druhy pšenice jsou klasifikovány mezi vedlejší obiloviny [9].

### 2.2 Chemické složení obilného zrna

Obsah chemických látek závisí na oblasti pěstování, odrůdě, hnojení, doby setí, agrotechniky, klimatických podmínkách a dalších faktorech. Důležitou složkou obilného zrna je voda, bez které by nemohly probíhat biochemické a fyziologické procesy. Z technologického hlediska mluvíme podle obsahu vody o zrnu mokřím (nad 17 %), vlhkém (nad 15,5 %), středně suchém (nad 14 %) a suchém (do 14 %) [6].

#### 2.2.1 Sacharidy

Sacharidy jsou organické sloučeniny a jsou základní složkou všech živých organismů. Společně s tuky a bílkovinami formují hlavní část lidské potravy. Sacharidy tvoří převážnou část obilného zrna, především škrob, který je zde nejvíce zastoupen. Ve zdravém zrnu se vyskytují v nepatrném množství monosacharidy a oligosacharidy (1–3 %). Nejen škrob, ale i jiné polysacharidy jsou součástí obilného zrna, například hemicelulózy vyskytující se v podobalových vrstvách, jež tvoří nestravitelnou vlákninu potravy. Hlavní složkou hemicelulóz jsou pentozany heterogenního složení, s převahou arabinózy a xylózy. Důležitá je rozpustná část hemicelulóz, která svojí schopností vázat vodu je schopná tvořit vysoce viskózní roztoky. Součástí polysacharidů je i celulóza nacházející se v obalových vrstvách a je součástí vlákniny. Význam nestravitelných, tzv. balastních látek v poslední době neustále vzrůstá. Kromě pentozanů a  $\beta$ -glukanů obsažených v cereáliích se k těmto látkám řadí rovněž pektiny. V celozrnných moukách (resp. pekařských výrobcích) vykazuje celulóza příznivé účinky na fyziologii trávení. Dietní vláknina podporuje fyziologické účinky, snížení hladiny cholesterolu a váže na sebe minerály [6] [9].

#### 2.2.2 Bílkoviny

Bílkoviny neboli proteiny jsou biopolymery tvořeny dlouhými řetězci aminokyselin spojeny tzv. peptidovou vazbou. V endospermu se nachází největší podíl technologicky významných bílkovin. Bílkoviny v obilovinách lze rozdělit podle morfologického původu, biologické funkce a podle chemického složení. Na základě morfologického původu rozlišujeme bílkoviny endospermu, aleuronové a zárodečné vrstvy. Podle biologické funkce v rostlině lze rozdělit bílkoviny na metabolicky aktivní tzn. cytoplazmatické s funkcemi v buňce a zásobní, které můžeme rozdělit na nízkomolekulární

a vysokomolekulární. Bílkoviny lze rozdělit na základě jejich rozpustnosti v různých rozpouštědlech na: albuminy (rozpuštěné ve vodě), globuliny (rozpuštěné v roztocích solí), prolamininy (rozpuštěné v 70% ethanolu) a gluteliny (zčásti rozpustné ve zředěných roztocích kyselin a zásad). Toto rozdělení bylo publikováno roku 1907 W. K. Osbornem [8].

**Lepék** je trojrozměrný proteinový komplex, jehož hlavními determinanty jsou prolamininy a gluteninové proteiny vyskytující se v některých obilných moukách. Představuje směs proteinů (prolaminů), která je zastoupena v endospermu pšenice (gliadiny) a dalších obilovinách jako je ječmen (hordeiny) a žito (sekaliny). Teprve po navlhčení a prohnětení mouky vodou se projeví vlastnosti technologického lepku, které dávají těstu viskozitu a pružnost a ovlivňují tak strukturní, senzorické a nutriční vlastnosti [8] [10].

### 2.2.3 Lipidy

Lipidy jsou estery glycerolu a vyšších mastných karboxylových kyselin hydrofobního charakteru, které jsou nerozpustné ve vodě nebo omezeně rozpustné. Jedná se o organické kyseliny s uhlíkatým řetězcem o délce 4 až 26 atomů s různým stupněm nenasycenosti. Z chemické podstaty tvoří skupinu látek, do které patří tzv. neutrální lipidy, což jsou tuky, oleje, fosfolipidy, steroidy, vosky, lipofilní pigmenty a některé vitaminy. Obiloviny také obsahují tzv. vázané lipidy (lipoproteiny a glykolipidy), jež mohou být extrahovány až po hydrolyze. Nejrozšířenější přírodní tuky jsou triacylglyceroly. Obilná zrna jsou obecně chudá na lipidy, po extrakci polárním rozpouštědlem se získává kolem 2,2 % a po kyselé hydrolyze přibližně 2,5 % lipidů. Vyšší obsah lipidů se nachází v klíčcích, které jsou z výživového hlediska velmi cenným zdrojem, proto se z některých obilovin lisuje olej. K nejhojnějším stolním olejům patří kukuřičný olej. Z mastných kyselin převládá kyselina linolová. Lipidy i přes jejich malý obsah, hrají důležitou roli při tvorbě těsta. Součástí zrn jsou karotenoidy, lipofilní pigmenty žluté až oranžové barvy [7] [8].

### 2.2.4 Vitaminy a minerální látky

Vitaminy se nachází především v obalových vrstvách a klíčku. Obiloviny jsou zdrojem vitaminů skupiny B. Minerální látky se souhrnně nazývají popel, jež představuje anorganický zbytek po spálení rostlinného materiálu. Obsah popele se pohybuje v rozmezí 1,25–2,5 %, nejvyšší obsah je v obalových vrstvách a nejméně v endospermu. Obsah popele v mouce vzrůstá se stupněm vymletí. Nejhojnějšími minerály jsou hořčík, vápník a železo, ale zrna často obsahují i minerální kontaminanty a těžké kovy. Zrna obsahují v minimálním množství kyseliny fytovou, cholin a kyseliny *p*-aminobenzoovou. Cholin je důležitý pro neuromotorickou činnost lidského organismu a kyselina *p*-aminobenzoová je významným růstovým faktorem [8].

## 2.3 Vybrané bezlepkové cereálie

### 2.3.1 Jáhly

Proso se řadí do řádu *Poales*, čeledi *Gramineae* a kmenu *Paniceae*, který zahrnuje 80 rodů. Nejpěstovanější obilovinou je perlové proso (*Pennisetum glaucum*) a proso liščí (*Setaria italica*). Proso seté je jednoletá travní plodina světle zelené barvy rostoucí v polosuchém a subvlhkém podnebí. Zajímavostí je, že ke svému růstu potřebuje mnohem méně vody než kterákoli jiná plodina. Vyžaduje pouze malé množství dusíkatých hnojiv a je poměrně odolná vůči rostlinným nemocem. Proso je jednou z nejstarších plodin, které bylo pěstováno v období neolitu (8 000–2 000 př. n. l.) v Číně. Ve střední a východní části Evropy bylo šlechtěno v období keramiky (asi 5 000 př. n. l.). Začátkem 20. století v západní části Evropy došlo k vytlačení prosa bramborami. Pěstování prosa hraje velkou roli v severozápadní Číně, Kazachstánu, východní Evropě a také v USA. Oloupaná semena se nazývají jáhly a mají krémově bílou, žlutou, oranžovou nebo hnědou barvu [11].

Jáhly jsou lehce stravitelné a podporují střevní mikroflóru, díky čemuž jsou srovnatelné s probiotiky. Využívají se pro výrobu mnoha funkčních potravin bez lepku: nudlí, těstovin, sušenek, snídaňových cereálií, kváskového chleba, nekynutého chleba a náhražek tuku [10].

### 2.3.2 Čirok

Čirok se řadí do čeledi *Gramineae*, podčeledi *Panicoideae*. Pochází z rovníkové Afriky, kde se pěstuje více než 3 000 let. Jedná se o obilovinu s vysokou genetickou variabilitou. Existuje 30 000 výběrů uložených ve světové sběrné bance sídlící v Indii. Světová produkce čiroku činí cca 26 milionů tun ročně. Oblíbenost si získal i z hlediska pěstování, čirok je odolný vůči suchu, proto se stal preferovanou obilovinou v polopouštních oblastech [11] [12].

Konzumace čiroku podporuje trávení a pomáhá při zácpě. Používá se jako krmivo pro zvířata nebo jako surovina v průmyslových výrobcích. Nejčastěji je součástí tortill, kuskusu, pečiva. V tropických oblastech se čirok využívá k přípravě kojenecké výživy, kde se přidává do kukuřičné kaše [11].

### 2.3.3 Teff

Teff patří do čeledi *Poaceae*, podčeledi *Eragrostoidea* a rodu *Eragrostis*. Existuje asi 300 druhů. Ve východní Africe se pěstuje již tisíce let. Teff je jemná stopkatá trsovitá jednoletá tráva, která se dobře přizpůsobuje široké škále podmínek včetně změnám teploty a půdním režimům. Běžně je pěstován v suchém podnebí, je považován za odolnou plodinu vůči suchu. Má vláknitý kořenový systém se vzpřímenými stonky a velmi drobná semena. V Etiopii a Eritrei se zpracovává do kynutých placek [11].

### 2.3.4 Kukuřice

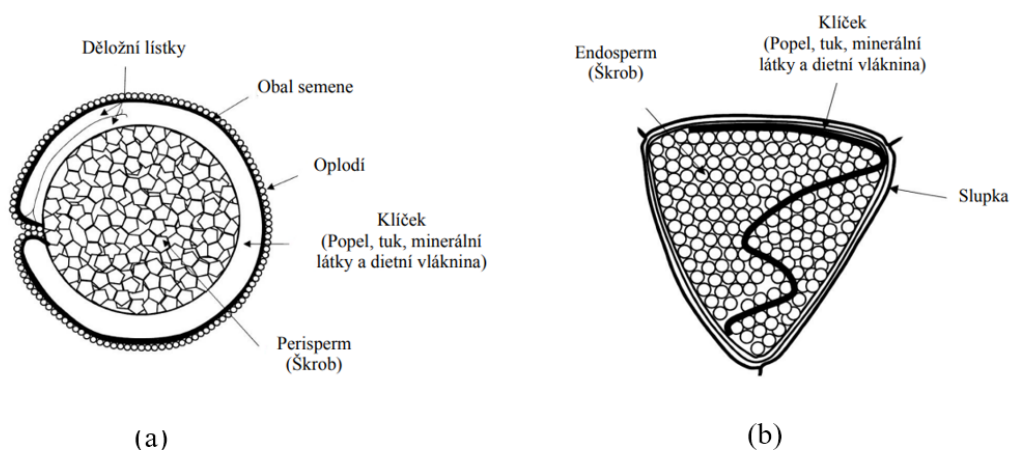
Jedná se o extenzivně pěstovanou obilninu spolu s rýží, pšenicí, jež představuje klíčový zdroj potravy, krmiva, paliva a vlákniny. V mexických oblastech byla kukuřice domestikována nejméně před 8 700 lety. Je to jednoletá vysoká rostlina patřící do čeledi trávovitých *Poaceae*. Kukuřice je vysoce fotosynteticky aktivní tráva, jde o široce pěstovanou travinu od jihu Chile až po Kanadu [11].

## 2.4 Pseudocereálie

Pseudocereálie představují skupinu netrav, dvouděložných rostlin, které se využívají stejně jako běžné obiloviny (např. pšenice). Na rozdíl od jednoděložných rostlin jsou bohaté na škrob [13]. Mají podobný vzhled, ale do obilovin se neřadí. Oproti hlavním obilným zrnům mají menší semena, ale využívají se stejným způsobem. Semena lze rozemlít na mouku a často se používají jako náhrada obilovin. Zrna pseudocereálií jsou označována jako „zrna jednadvacátého století“. V posledních letech vzrostla celosvětová poptávka, což má za následek zvýšení jejich produkce, ale i zvýšení jejich ceny. Nicméně, pseudoobiloviny jsou v celosvětovém měřítku považovány za vedlejší plodiny, i když jsou široce uznávány po mnoho let díky své nutriční hodnotě. Obsahují vysoce kvalitní bílkoviny, velké množství škrobu a také mikroživiny jako jsou minerály, vitaminy, bioaktivní látky. Pseudocereálie vykazují jednu důležitou vlastnost, jsou přirozeně bez lepku, díky čemuž jsou vhodné pro osoby trpící nesnášenlivostí lepku. Mezi hlavní představitelé je řazen amaranth, quinoa a pohanka. Amaranth a quinoa byly hlavní plodiny používané v předkolumbovských kulturách v latinské Americe. Pohanka pochází ze střední Asie a do střední a východní Evropy ji přinesly kočovné kmény [14] [15]. Dále se mezi pseudocereálie řadí chia (*Salvia hispanica L.*) a merlík bílý (*Chenopodium album*) [16].

## 2.5 Chemické složení zrn pseudocereálií

Pseudocereálie jsou v lidské stravě významným zdrojem bílkovin, lipidů, sacharidů, minerálů, a bioaktivních složek, jako jsou fenolické kyseliny, flavonoidy, vitaminy a mastné kyseliny, které souvisí a protirakovinovou, antioxidační, protizánětlivou a antihypertenzní aktivitou [17]. Tyto cereálie díky svému nutričnímu profilu mohou sloužit jako nejlepší náhrada obilovin především pro jedince trpící alergií na lepek a mohou být nápomocné při prevenci podvýživy [18]. Ve srovnání s běžnými obilovinami obsahují pseudocereálie méně sacharidů a více bílkovin a tuků. To je způsobeno fyzikálními vlastnostmi, pseudocereální zrno má méně endospermu, ve kterém dochází především k ukládání škrobu a více klíčku, kde jsou uloženy proteiny a lipidy [17]. Na Obrázek 1 je zobrazeno schéma struktury zrna amaranthu, pohanky a quinoay [19].



Obrázek 1: Struktura zrna amaranthu a quinoj (a) a pohanky (b) [19]

### 2.5.1 Bílkoviny pseudocereálií

Výživová hodnota pseudocereálií je dána především obsahem bílkovin s vyváženým obsahem esenciálních aminokyselin. Právě vyvážený obsah aminokyselin přispívá ke kvalitě rostlinného proteinu. Oproti běžným obilovinám mají více lysinu a aminokyselin s obsahem síry. Obsah bílkovin je jako u všech rostlin závislý na genotypu a podmínkách pěstování. V pseudocereáliích se obsah proteinů pohybuje od 10 do 18 g/100 g sušiny [14] [17].

Hlavními složkami těchto proteinů jsou albuminy a globuliny, které tvoří 60–70 % proteinových frakcí. Dále obsahují malý podíl glutelinu a prolaminu, jež převažují v běžných obilovinách. Z hlediska distribuce proteinových frakcí se obecně podobají více luštěninám než obilným proteinům [20]. Díky tomuto složení vykazují nízkou rozpustnost ve vodě [21]. Index rozpustnosti ve vodě pseudocereálií se pohybuje mezi 6,22 a 10,22 g/100 g [20]. Nízká rozpustnost při neutrálním pH nebo ve vodě byla zjištěna u izolátu amarantového proteinu (API), což může souviset s přítomností globulinu-P a 11S-globulinu [21].

Obsah bílkovin v amaranthu se pohybuje mezi 13,5–15,7 g/100 g sušiny. Podle rozpustnosti se proteiny amaranthu skládají z 11–52 % albuminů, 16–51 % globulinů a 7–36 % glutelinů a 0–13 % prolaminů [20]. Mezi dva hlavní zásobní proteiny amaranthu patří amaranthin (11S-globulin) a konaamantin (7S-globulin). Aminokyselinové složení tvoří především izoleucin, lysin, tryptofan, threonin [22]. U amarantu je obsah lysinu (67 mg/g proteinu) dvakrát vyšší než u pšenice a třikrát než u kukuřice. Tato vysoká hladina lysinu dělá z amarantu vysoce kvalitní zdroj bílkovin. Leucin je limitující aminokyselinou amarantu. Navíc vysoký obsah argininu a histidinu, jež jsou důležité esenciální aminokyseliny především pro děti a kojence, činí tak z amaranthu cennou složku pro dětskou výživu. [23]. Biologická dostupnost amarantového proteinu je omezena hlavně kvůli přítomnosti antinutričních složek, mezi které patří fenolické sloučeniny, saponiny, taniny a kyselina fytová. Fenolické sloučeniny mohou ovlivňovat metabolismus bílkovin vazbou na trávicí enzymy jako proteinové substráty. Saponiny mohou snižovat biologickou dostupnost minerálů tvorbou komplexů se železem a zinkem. Taniny získané ze syrového a vařeného amaranthu mohou zabránit aktivitě  $\alpha$ -amylázy a  $\alpha$ -glukosidázy, čímž vykazují antidiabetické vlastnosti. Hlavní koncentrace taninů je přítomna ve slupce, která se odstraňuje při průmyslovém loupání [24].

Pohanka je zdrojem bílkovin (8,5–18,8 %), obsah bílkovin se liší v závislosti na kultivaci, zdroji a klimatických podmínkách. Pohankové frakce proteinů jsou složeny z 18–44 % albuminů, 5–70 % globulinů, 4–37 % glutelinů a 0–11 % prolaminů [20]. Mezi hlavní globulinové proteiny patří zásobní

protein 13S s hexamerní strukturou s kyselými a bazickými polypeptidovými podjednotkami vázanými disulfidovou vazbou. V menším množství se nachází 8S-globulin. Pohanka je bohatá na arginin, lysin a kyselinu asparagovou [25].

Z hlediska kvality je quinoa považována za jeden z nejlepších rostlinných proteinů [20]. Obsah bílkovin v quinoe se pohybuje mezi 15,6 a 18,7 %. Protein v semenech quinoy se skládá především z 11S-globulinu (37 %) a 2S-albuminu (35 %), jež jsou stabilizovány disulfidovými vazbami [26]. Semena quinoy obsahují lunasin, jedná se o nový protirakovinný peptid, který se vyskytuje především v sóji a kukuřici, ale byl také detekován v quinoe. Bylo prokázáno, že quinoa je bohatá na lysin a může podporovat vstřebávání vápníku v těle [27].

### 2.5.2 Sacharidy pseudocereálií

Sacharidy jsou hlavní nutriční složkou pseudocereálních zrn, jejich obsah se pohybuje mezi 60–80 % suché hmotnosti semen. Zrna pseudocereálií obsahují monosacharidy jako je glukóza, fruktóza, arabinóza a xylóza, a také obsahují důležité disacharidy sacharózu a maltózu. Obsah disacharidů a monosacharidů je u pseudocereálií vyšší než u běžných obilovin, i přesto jsou minoritními sloučeninami sacharidů. Vyšší obsah jednoduchých sacharidů lze pozorovat u quinoy a amaranthu (3–5 %), zatímco u pohanky (0,8 %) pozorujeme výrazně nižší obsah ve srovnání s běžnými obilovinami. [14].

Škrob je hlavní sacharid, jeho obsah v amaranthu se pohybuje v průměru od 55 do 65 %, v quinoy od 52,2 do 72 % a v pohance od 54,5 do 78 %. Škrobové granule amaranthu patří mezi nejmenší známé škrobové granule. Poměr amylozy a amylopektinu, jež jsou polymery škrobu, se u pseudocereálií ve srovnání s obilovinami liší. Amylóza je malý lineární polymer vyskytující se v malém množství a amylopektin je vysoce rozvětvený glukonový polymer organizovaný do klastrových struktur. Délka právě tohoto větveného řetězce a jeho distribuce jsou hlavní parametry ovlivňující fyzikálně-chemické vlastnosti a stravitelnost škrobu. Díky tomu quinoový a amaranthový škrob, jenž obsahuje větší množství krátkých řetězců s polymeračním stupněm 6–12, má vysokou stravitelnost a je rychle hydrolyzován na glukózu (90 %) ve srovnání například s pšenicí (79,5 %) [20]. Nabízí tak možnosti pro potravinářský, farmakologický a kosmetický průmysl [23].

Výborným zdrojem vlákniny jsou pohanková zrna, obsahují nejvyšší množství ze všech pseudocereálií (17,8 %). Pohanková dietní vláknina se skládá z 6,8 % ligninu, 2,2 % hemicelulózy a 10,6 % celulózy. Quinoa obsahuje 7,0–26,5 % a amaranthu 2,7–17,3 % vlákniny. Dietní vláknina obsažená v quinoe a amaranthu je většinou tvořena nerozpustnými polysacharidy (78 % z celkového obsahu vlákniny) včetně homogalakturonany, rhamnogalakturonany s araninanovým řetězcem nebo s vysoce rozvětvenými xyloglukany a celulózou [14].

### 2.5.3 Lipidy pseudocereálií

Pseudocereálie jsou bohaté na nenasycené mastné kyseliny, které mají velký potenciál v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, jako je ateroskleróza a infarkt myokardu. Obsah nenasycených mastných kyselin v amaranthu je 61,0–87,3 %, v quinoe 71,0–84,5 % a v pohance 80,1–80,9 %. Nejvíce je zastoupena kyselina linolová a olejová. Obsah lipidů v quinoe a amaranthu je dvakrát až třikrát vyšší než u pohanky a tradičních obilovinách [17]. Celkový obsah lipidů v quinoy je v rozmezí 4,0–7,6 %, amaranthu 5,6–10,9 % a v pohance 0,75–7,4 % [14].

Nejvyšší obsah lipidů je tedy u amaranthu, který zároveň obsahuje skvalen, což je nenasycený triterpen s otevřeným řetězcem, který se využívá ve farmaceutickém průmyslu. Nachází se pouze v amaranthu a v játrech mořských druhů [20]. Semeno quinoy je považováno za alternativní olejnaté semeno díky jeho kvalitě a množství lipidové frakce. Olej z quinoy má vysoký stupeň nenasycení, je bohatý na esenciální mastné kyseliny, jako je  $\alpha$ -linolenová ( $\omega$ -3) a linolová ( $\omega$ -6) kyselina. Obsahuje významný přírodní antioxidant tokoferol. Vzhledem k jeho lipofilní povaze a nestabilitě bioaktivních sloučenin brání jeho použití v potravinářském průmyslu [28].

#### 2.5.4 Minerály

V otrubách se nachází většina minerálních sloučenin, proto jsou celá zrna pseudocereálií dobrým zdrojem minerálů. Hlavními makroprvky jsou draslík, fosfor a hořčík. Obecně vysoký obsah vápníku lze pozorovat u amaranthu, který může mít význam u celiaků, kteří jsou náchylnější k osteopenii a osteoporóze. Amaranth obsahuje nejvyšší množství vápníku, následuje quinoa a nakonec pohanka. Jsou také dobrým zdrojem železa, zinku, manganu a mědi. Obsah minerálních látek je vyšší než v běžných obilovinách [14].

#### 2.5.5 Vitaminy

Pseudocereálie obsahují vysoké množství vitaminů skupiny B a vitamínu E. Vitamin E představuje skupinu osmi sloučenin rozpustných v tucích: tokoferoly ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$  izomery) a tokotrienoly ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$  izomery). Tyto látky vykazují antioxidační účinky, díky kterým chrání buněčné membrány před poškozením volnými radikály a jsou nutričně esenciální. Izomer  $\alpha$ -tokoferol vykazuje nejvyšší aktivitu vitamínu E [14].

Také jsou bohatým zdrojem kyseliny listové, vitamínu C a riboflavinu. Obsah kyseliny listové je 102  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  v amaranthu a 78,1  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  v quinoe, což je 2,5 krát více než u pšenice (40  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) [18]. Dalšími významnými látkami jsou karotenoidy. Lutein je hlavní karotenoid přítomný v semenech quinoe, amaranthu a pohanky [14].

#### 2.5.6 Bioaktivní sloučeniny pseudocereálií

Bioaktivní sloučeniny představují nevýživné rostlinné složky se zdravotními přínosy. Bioaktivní složky zahrnují fenolické sloučeniny, fytosteroly, fytoekdsteroidy, polysacharidy, betalainy, bioaktivní proteiny a peptidy [14]. Především vnější vrstvy quinoe a amaranthu obsahují bioaktivní fotochemikálie. Tyto sloučeniny mohou být hydrofilní nebo lipofilní a fungují jako ochranný prostředek proti mikroorganismům a hmyzu [18].

##### 2.5.6.1 Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny přispívají k prevenci chronických onemocnění a udržují střevní mikrobiální rovnováhu. Pomáhají při tvorbě sekundárních metabolitů rostlin a jsou zodpovědné za mnoho fyziologických účinků v rostlině. Pseudocereální mouky obsahují škálu flavonoidů (anthokyaniny, flavony, flavanony, isoflavonoidy, flavonoly a flavanoly) a fenolických kyselin (patřících mezi hydroxyskořicové, hydroxybenzoové a hydroxyfenyloctové deriváty). Spektrofotometricky bylo zjištěno, že v pseudocereáliích se obsah fenolů pohybuje v rozmezí od 12,4 do 678,1 mg GAE/ 100 g [29].

Mezi pseudocereáliemi má amaranth nejnižší celkový obsah fenolů (21,2–57,0 mg GAE/100 g sušiny), složený především z fenolových kyselin, jako jsou např. kyselina ferulová, flavonoidy a dalšími fenolickými sloučeninami, jako je sesamin, tyrosol a cardol [14]. Mezi důležité fotochemikálie obsažené v amaranthu patří betalainy, jsou třídou červených a žlutých pigmentů odvozených od indolu [30].

V quinoe se vyskytuje většina fenolických sloučenin ve volné formě v rozmezí od 167,2 do 308,3 mg GAE/100 g sušiny. V quinoe bylo detekováno 23 polyfenolů zejména kyselina vanilová, kyselina ferulová a jejich deriváty, kempferol, kvercetin a glykosidy [14]. Obsah polyfenolů je ovlivněn faktory prostředí pěstování. Tmavší semena quinoe mají vyšší koncentraci polyfenolů a vykazují vyšší antioxidační aktivitu. Mezi hlavní identifikované flavonoidy v quinoe patří flavonoly, kvercetin a keampferolové glykosidy. Celkový obsah flavonoidů se pohybuje od 177,49 do 407,75 mg ekvivalentu rutinu (RE)/100 g v bílé, červené a černé quinoe [26].

Pohanka mezi pseudocereáliemi obsahuje nejvyšší obsah fenolických sloučenin (275,5–532,0 mg GAE/100 g), složených z tyrosolu, alkyfenolu a fenolických kyselin. Hojně je zastoupena kyselina benzoová a deriváty kyseliny skořicové. Mezi obsažené fenolové kyseliny patří kyselina hydroxybenzoová, syringová, protokatechová, vanilová, ferulová, *p*-kumarová, gallová, kávová a salicylová [31]. Flavonoidy identifikované z pohankových krup a slupek jsou rutin, orientin,

vitexin, isovitexin, kvercin, isoorientin. Rutin je důležitou flavonoidní sloučeninou, která se mezi pseudoobilovinami vyskytuje pouze v pohance. Terapeutické a biologické aktivity spojené s obsahem rutinu zvyšují elasticitu cév, pomáhají proti ateroskleróze, mají antioxidační, protizánětlivé, antihypertenzní, vasokonstrikční, spasmolytické vlastnosti. Dalšími flavonoidy kromě rutinu v pohance jsou hyperosid, kvercitrin a katechiny [14].

### 2.5.6.2 Bioaktivní proteiny a peptidy

Pseudocereální proteiny se ukázaly jako důležitý zdroj bioaktivních peptidů. Peptidy z proteinů amaranthu, pohanky a quinoj byly identifikovány v hydrolyzátech, gastrointestinálních digestech a fermentovaných produktech. Multifunkční vlastnosti, včetně antihypertenzních, protizánětlivých, antidiabetických a chemopreventivních aktivit prokázaných u některých z těchto peptidů způsobily, že pseudocereální proteiny získaly na významu jako složky potravin pro prevenci a zvládnání chronických onemocnění souvisejících s oxidačním stresem [14]. Bioaktivní peptidy v pohance se svým složením aminokyselin podobají složení mléka a sušeně vajec. Obecně bioaktivní peptidy mají farmakologickou aktivitu a mají antioxidační, antimikrobiální vlastnosti. Také snižují hladinu cholesterolu a vykazují hypoglykemický účinek a protinádorovou aktivitu [32].

## 2.6 Vybrané pseudocereálie

### 2.6.1 Amaranth

Z botanického hlediska je amaranth (*Amaranthus*) řazen do čeledi mokřadních *dycotyledonous Amaranthaceae*, které jsou řazeny do čeledi jednoděložných trav (*Pomaceae*). Je jednou z nejstarších plodin pocházející z Jižní Ameriky a Mexika, jež byla objevena před asi 6 700 lety. Existuje přibližně 70 druhů a vyskytuje se po celém světě, v podobě okrasných rostlin, zeleniny, divokých a plevelných rostlin nebo také jako druh obilí [13]. Kultivované druhy mají světlá semena na rozdíl od jejich předků, kteří mají tmavá semena. Pěstují se tři druhy: *Amaranthus caudatus L.*, *Amaranthus cruentus L.* a *Amaranthus hypochondriacus L.* Amaranth ve srovnání s jinými plodinami je méně omezován edafickými podmínkami, je odolný vůči suchu a horku. Vyskytuje se v mírných, tropických a subtropických oblastech. Pro sklizeň malých semen amaranthu jsou příznivější suché podmínky. Zrna amaranthu mají velký potenciál, díky toleranci vůči herbicidům. Zrno i listy jsou vynikajícími zdroji bílkovin a dalších živin. Semena obsahují komerčně žádoucí olej skvalen [24] [23] [33].

Z amaranthových zrn se vyrábí celá řada tradičních potravin, např. „alegria“ a „atole“ v Mexiku, „alboroto“ v Guatemale, „bolos“ v Peru, „chapati“ v Himalájích, „laddoos“ v Indii a „sattoo“ v Nepálu [34]. Semena některých druhů amaranthu jsou tradičně loupaná k výrobě různých svačinových produktů. Amaranth nabízí širokou škálu využití od těstovin, tortil až po snídaně cereálie, knedlíky, sušenky. Využívá při přípravě příkrmů pro kojenče [35] [33].

### 2.6.2 Pohanka

Pohanka je dvouděložná rostlina z řádu *Caryophyllales*, čeledi rdesnovitých (*Polygonaceae*). Pohanka pochází z Číny, kde se začala pěstovat nejméně před 1 500 lety [13]. V posledních letech pohanka získala post jako alternativní plodina pro ekologické pěstování a jako surovina pro „zdravé jídlo“. Nejčastěji se vyskytuje pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum Moensch*), mezi pěstovanými druhy tvoří 90 % světové produkce. Mezi hlavní pěstované druhy patří pohanka tatarská (*Fagopyrum tataricum*), která je dostupná v horských oblastech Asie. Obvykle se pěstuje ve vyšších nadmořských výškách kvůli své mrazuvzdornosti [26]. Po celém světě pěstuje pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum*) [36].

Pohankové jádro pyramidového tvaru s ostrými úhly obsahuje jedno semeno zabalené uvnitř oplodí. Jádro je obklopeno tvrdou vrstvou, která má světle žlutou až zelenou barvu [13]. Je dokázáno, že semena pohanky mají dobře vyváženou nutriční hodnotu, ale její stravitelnost je ve srovnání s ostatními obilovinami nižší. Nižší stravitelnost je dána kvůli vysokému obsahu vlákniny [36]. Bílkovinný komplex nažek je charakteristický velmi nízkým obsahem prolaminů a glutelinů, využívá se k výrobě



mouky vhodné pro bezlepkovou dietu. Pohanka je rovněž zdrojem řady dalších bioaktivních látek působících příznivě na kardiovaskulární soustavu a gastrointestinální trakt [31]. Obsahuje značné množství antioxidantů, zejména typu flavonoidů. Přítomný rutin má vynikající antimitogenní, antikarcinogenní a protizánětlivé účinky, zvyšuje pružnost cévních stěn, reguluje srážlivost krve a posiluje imunitní systém organismu [11] [17].

Pohanka se běžně mele na kamenném nebo válcovém mlýně k výrobě celozrnné mouky. Běžná pohanka se v různých zemích konzumuje na různé způsoby. Například v Evropě a v Severní Americe se pohanková mouka obecně mísí s pšeničnou moukou na přípravu palačinek, sušenek a nudlí, zatímco v Rusku a Polsku se krupice a mouka používá k přípravě kaší a polévek, v Japonsku jsou oblíbené pohankové knedlíky a nudle [17].

### 2.6.3 Quinoa

Quinoa neboli merlík čilský je rostlina z rodu *Chenopodiaceae*, do téhož rodu je řazen také například špenát nebo cukrová řepa. Jedná se o endemickou rostlinu Jižní Ameriky domestikovanou lidmi žijících v Andách. Nejstarší archeologické pozůstatky quinoey spadají do roku 5 000 před naším letopočtem. Během domestikace prodělala quinoa mnoho morfologických změn, tj. kompaktnější květenství, větší velikosti semena a stonku a také větší množství pigmentů. Quinoa roste v horkém a suchém podnebí, dobře roste jak v kyselé, tak v zásadité půdě. Quinoa může růst v extrémních podmínkách, snáší teploty od  $-4$  do  $38$  °C [13]. Roční spotřeba quinoey v Bolívii a Peru činí 2,37 kg/osobu a 1,15 kg/osobu. Nejen andské obyvatelstvo našlo potenciál v této rostlině, v posledních letech byla zavedena i do USA a Evropy, i když produkce je ve srovnání s andskými zeměmi nízká [33].

Quinoa je jediná potravina, která je Organizací OSN pro výživu a zemědělství (UNFAO) uznána jako rostlina splňující nutriční a dietní potřeby lidí. Mezi původními Inků byla známá jako „matka obilí“. Bylo zjištěno, že semena quinoey mají větší biologickou hodnotu než jiná obilná zrna. Biologická hodnota, jež udává množství biologicky důležitých složek v potravine, je pro quinou 73 %, zatímco rýže, pšenice a kukuřice mají 56 %, 49 % a 36 %. Hodnota 73 % je téměř stejná jako u masných výrobků, např. biologická hodnota hovězího masa je 74 % [36].

Quinoa je vhodná především pro rizikové skupiny spotřebitelů jako jsou děti, senioři, výkonní sportovci, jedinci s intolerancí na laktózu nebo s osteoporózou, lidé s anémií, cukrovkou, obezitou, dislipidemií a celiakií [37]. Byla provedena studie týkající se dětské podvýživy v Ekvádoru. Měsíčním chlapcům byla podávána dvakrát denně po dobu 15 dnů dětská výživa s přidanou quinou. Bylo zaznamenáno zvýšení plazmatického růstového faktoru. Na základě této studie bylo zjištěno, že kojenecká výživa obohacená o quinou poskytuje dostatek bílkovin a potřebných nutričních prvků a hraje roli v prevenci podvýživy u dětí. Jedna denní porce quinoey (40 g) splňuje denní doporučenou dávku se všemi důležitými základními živiny a sloučeninami zlepšující zdraví [37].

## 2.7 Celiakie

Celiakie (glutenová enteropatie, CD) je chronické onemocnění sliznice tenkého střeva způsobené citlivostí na lepek (gluten) u predisponovaných osob, dětí i dospělých. Jedná se o celoživotní autoimunitní, gastrointestinální onemocnění vyvolané glutenem, směsí strukturních proteinů vyskytujících se v pšenici a dalších jiných obilovinách. Dochází k nedostatečnému vstřebání živin, jež zůstávají nestrávené ve střevě, resp. gluten je natráven žaludečním a pankreatickými peptidázami na nestravitelné oligomery složené z 30–40 aminokyselin [38]. Genetická predispozice k celiakii je spojená s genem na 6. chromozomu. U geneticky vnímavých jedinců je charakterizována různou kombinací klinických příznaků za přítomnosti specifických protilátek, HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 haplotypů a enteropatií. Haplotyp HLA-DQ2 se vyskytuje u 90 % pacientů s celiakií, zbylá část pacientů trpících celiakií nese HLA-DQ8 [39].

Mezi symptomy patří nechutenství, průjmy, ztráta hmotnosti, únava, ovšem závisí na genetickém podkladu, věku, množství glutenu ve stravě. Jedinou známou léčbou celiakie je přísné dodržování bezlepkové diety [39] [40].

Současný výzkum ukazuje, že mnoho komerčně zpracovaných bezlepkových potravin nemá dostatek mikroživin a obsahuje vyšší množství cukru a tuku oproti běžným potravinám. Bylo také zjištěno, že děti i dospělí na bezlepkové dietě mají podstatně nižší příjem folátu než je doporučená dávka. To vystavuje děti a starší dospívající ve fertlním věku s CD zvýšenému riziku nedostatku této kyseliny. To je zvláště důležité vzít v úvahu, protože kyselina listová představuje mikroživinu, která je nezbytná pro syntézu DNA, enzymové reakce, tvorbu myelinu a vývoj mozku v průběhu životního cyklu. Nedostatek vede k narušení růstu a neurologického vývoje u dětí, který začíná již při vývoji plodu během těhotenství. Nízké hladiny kyseliny listové jsou např. v bílé rýži, kukuřičné mouce [38] [40].

### 2.7.1 Celiakie u dětí

Neléčená celiakie může být spojena s vážnými zdravotními komplikacemi. Mezi nejvýraznější příznaky celiakie u dětí patří gastrointestinální symptomy, neprospívání, porucha růstu a anémie z deficitu železa [41]. Mezi onemocnění jednoznačně asociované s celiakií v dětském věku patří diabetes mellitus 1. typu, juvenilní idiopatická artritida, IgA nefropatie, deficit sérového IgA, autoimunitní thyroditida, autoimunitní hepatitida, Downův syndrom, Turnerův syndrom a Williamsův syndrom [40].

## 2.8 Mikroorganismy

V potravinářském či farmaceutickém průmyslu by měly být používány mikroorganismy disponující statusem GRAS (Generally Recognized As Safe), které nepředstavují toxikologické či zdravotní riziko. Mikroorganismy označené jako GRAS jsou považovány obecně za bezpečné. Ve Spojených státech jsou potraviny a látky používané v potravinách regulovány podle zákona Food, Drug and Cosmetic Act (1958), ve kterém byl zaveden status GRAS (FDA, 2010). V souladu s tím je látka GRAS mezi kvalifikovanými odborníky obecně uznávána jako látka, u níž bylo prokázáno, že je bezpečná za podmínek jejího zamýšleného použití [42].

V Evropské unii jsou mikrobiální kultury považovány za přísady, které musí splňovat zákonné požadavky nařízení ES č. 178/2002. V roce 2007 zavedl Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) „Kvalifikovaný předpoklad bezpečnosti“ (QPS) pro hodnocení bezpečnosti mikroorganismů používaných při výrobě potravin a krmiv před uvedením na trh [42].

Použitá mikrořasa *Chlamydomonas reinhardtii* je uznána jako GRAS mikroorganismus, jehož vysušená biomasa je vhodná pro potravinářské použití [43]. V Evropě tato řasa byla hodnocena v roce 2021 poprvé a kvůli omezenému množství znalostí nezískala status QPS, tudíž není doporučována pro potravinářské a krmné účely [44].

### 2.8.1 Mikrořasy

Řasy jsou jednobuněčné nebo mnohobuněčné organismy různých velikostí a tvarů, zahrnující skupiny mikrořasy a makrořasy. Tyto fotosyntetické druhy mohou dosahovat délky až 60 m, nazývají se makrořasy. Mikrořasy představují skupinu o velikosti pouhých 0,2  $\mu\text{m}$  [26].

Mikrořasy jsou považovány za jedny z nejstarších rostlin na světě. Jejich první výskyt se datuje asi před 3,5 miliardami lety [45]. Jedná se o fotosyntetické mikroorganismy, které přeměňují světelnou energii a oxid uhličitý na biomasu a několik sloučenin. Mikrořasy nemají kořeny, listy, stonky ani cévní tkáň. Biologové rozdělili mikrořasy do řady skupin, které se obecně rozlišují na základě jejich buněčné struktury, životního cyklu a pigmentace. Mikrořasy lze klasifikovat jako rozsivky (*Bacillariophyceae*), zelené (*Chlorophyceae*), modré a modrozelené sinice (*Cyanophyceae*), zlaté (*Chrysophyceae*) a červené (*Rhodophyceae*) řasy. Mezi široce používané druhy mikrořas patří *Spirulina plantesis*, *Chlorella sp.*, *Dunaliella terticola*, *Dunaliella salina* a *Aphanizomenon flos-aquae*, a to zejména kvůli jejich vysokému obsahu bílkovin a nutriční hodnotě [46].

Mikrořasy se konzumují jako doplněk stravy prostřednictvím pilulek, tablet, prášku nebo kapslí. V posledních letech byly proteiny pocházející z mikrořas začleněny do sušenek, sladkostí, chleba, nudlí, nápojů a piva [45]. Mikrořasy jako organismy mají klíčovou roli ve vodních ekosystémech kvůli jejich fotosyntetické kapacitě, mohou za aerobních podmínek stejně dobře fixovat oxid uhličitý jako rostliny. Díky tomu jsou vhodnou alternativou k výrobě biopaliv a nutraceutických látek [47].

### **2.8.1.1 Vybrané metabolity mikrořas**

Mikrořasy mohou akumulovat více jak 60 % bílkovin, sacharidů a lipidů za různých podmínek kultivace. Výzkum ukázal, že mezi četnými kultivačními podmínkami je světlo a obsah uhlíku a dusíku zásadními faktory, které modulují růst a biochemické složení, jako je produkce pigmentu v mikrořasách [42, 48].

#### ***Bílkoviny***

Mikrořasy jsou identifikovány jako alternativní zdroj s vysokým obsahem bílkovin, který může splnit požadavky podvyživené populace. Suchá biomasa obsahuje od 27 do 70 % bílkovin [2]. Bylo zjištěno, že aminokyseliny jako isoleucin, valin, lysin, tryptofan, methionin, threonin a histidin jsou v mikrořasách přítomny v množstvích, která jsou srovnatelná nebo větší ve srovnání se zdroji bohatými na bílkoviny, jako jsou vejce a sója [45]. Protein je jednou z nejcennějších složek řas, ale nutriční hodnota řasového proteinu závisí na typu zpracování [49]. S výjimkou sinic *Spirulina* a *Aphanizomenon flos-aquae*, většina ostatních typů mikrořas má poměrně silné buněčné stěny, což může být problémem při nevhodném zpracování biomasy. Pro zpracování řasové biomasy se využívají různé destrukční metody. V současné době se využívá vysokorychlostní homogenizace, kuličkového mlýna, mikrofluidizace, vysokotlaké homogenizace, mikrovlnné trouby, ultrazvuku, pulzního elektrického pole a autokláv. Pomocí těchto metod dochází k enzymatické lýze a chemickému narušení buněk [50].

#### ***Sacharidy mikrořas***

Mikrořasy se liší množstvím a složením sacharidů, nacházejí se hlavně jako rezervní polysacharidy v plastidech a strukturálních složkách, jako jsou buněčné stěny. Zelené řasy obecně obsahují 20 % sacharidů. Sacharidy z řas mohou plnit funkci vlákniny [51]. Hlavním rezervním polysacharidem syntetizovaným a skladovaným mikrořasami je škrob, zatímco sinice obvykle akumulují glykogen. Vnitřní vrstva buněčné stěny obsahuje celulózu. Škrob a celulóza mohou být přeměněny na fermentovatelné cukry, jež umožňuje rychlou a účinnou hydrolýzu a uvolňování cukru. Obsah neutrálního cukru závisí na druhu mikrořas, kmene a fázi růstu. Hlavními monosacharidy jsou glukóza, manóza, rhamnóza, xylóza, galaktóza, fukóza a arabinóza [46].

Mezi mikrořasovými polysacharidy se do popředí zájmu dostaly exopolysacharidy (EPS), a to především díky svým bioaktivním vlastnostem; antioxidačním, protizánětlivým, protinádorovým a antimikrobiálním vlastnostem [52].

#### ***Lipidy mikrořas***

Obsah lipidů v mikrořasách se obvykle pohybuje v rozmezí 20–50 % sušiny, za určitých podmínek může být až 80 % [53]. Teplota, světlo a koncentrace dusíku jsou kultivační faktory, které přímo ovlivňují obsah lipidů a mastných kyselin v mikrořasách. Koncentrace dusíku kriticky ovlivňuje akumulaci lipidů, omezení dusíku zvyšuje obsah lipidů. Lipidy mikrořas se dělí do dvou skupin podle uhlíkového čísla. Pro výrobu bionafty jsou používány mastné kyseliny se 14–20 atomy uhlíku v řetězci, pro výrobu doplňků zdravé výživy se využívají polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) s více než 20 atomy uhlíku, zejména kyselina dokohexaenová (DHA) a kyselina eikosapentaenová (EPA) [53]. Oleje z mikrořas jsou vynikajícími zdroji pro výrobu bioenergie a biomateriálů. V závislosti na druhu a podmínkách pěstování mikrořas může produkce oleje dosahovat až 75 % jejich biomasy [54].

#### ***Antioxidační sloučeniny***

Mikrořasy produkují různé pigmenty v závislosti na druhu o různých barvách. Například zelené mikrořasy obsahují chlorofyl, červené a modré mikrořasy mají fykobiliproteiny a žluté, oranžové

a červené mikrořasy syntetizují karotenoidy [45]. Mezi známými karotenoidy mikrořas má v současnosti nejvyšší tržní potenciál  $\beta$ -karoten, astaxanthin a lutein [53].

Mikrořasy obsahují vysokou koncentraci čtyř vitaminů; provitamin A, vitamin E, vitamin B<sub>1</sub> a kyselina listová ve srovnání s konvenčními zdroji potravy. Potravinu získané z mikrořas poskytují základní zdroj vitamínu B<sub>12</sub> pro jedince, kteří dodržují vegetariánskou nebo veganskou stravu [48].

Biomasa mikrořas je považována za vynikající zdroj nutričních antioxidantů. Mikrořasy jsou také schopny produkovat více složek v jednom druhu. Například analýza složení na *Chlorella sorokiniana* odhalila, že celkový obsah karotenoidů byl 0,69 % sušiny. Obsah  $\alpha$ - tokoferolu,  $\beta$ -karotenu a luteinu byl 112, 600 a 4 300  $\mu\text{g/g}$  sušiny. Tyto sloučeniny mají vysokou schopnost pohlcovat radikály. Uvádí se, že antioxidant astaxanthin extrahovaný z mikrořas, má vyšší antioxidační aktivitu ve srovnání s  $\alpha$ -karotenem,  $\beta$ -karotenem, lykopenem, luteinem a vitamínem E [45].

### **Stabilita mikrořas**

Zvláštní pozornost by měla být věnována dlouhodobému skladování nebo nadměrnému tepelnému zpracování (140–165 °C) biomasy řas, která může vyvolat tzv. Maillardovu reakci mezi aminokyselinami a snížení sacharidů, což by mohlo vést k nedostupnosti esenciálních aminokyselin. Mohlo by tak dojít ke snížení biologických funkcí, jako jsou antioxidační, protirakovinové, antihypertenzní, antiaterosklerotické a imunomodulační účinky [55].

Dalším problémem může být kontaminace znečištěného životního prostředí. Do biomasy se tak mohou dostat nežádoucí organické a anorganické sloučeniny, jako jsou neesenciální prvky, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), pesticidy a další. To představuje riziko pro lidské zdraví. V literatuře je však dosud uvedeno jen málo informací o výskytu těchto kontaminantů v produktech a doplňcích z mikrořas. Jednou z hlavních výzev v systémech kultivace mikrořas je právě kvalita vody, zejména mořské vody ve velkovýrobě [46].

#### **2.8.1.2 Rod *Chlamydomonas***

Rod *Chlamydomonas* je jedním z největších rodů zelených řas [56]. Taxonomické studie odhalily přítomnost více než 500 druhů patřících do tohoto rodu, přičemž *Chlamydomonas reinhardtii* je jedním z nejlépe prostudovaných [57].

*Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) je zelená mikrořasa s morfologií vícevrstvé buněčné stěny. Uvádí se, že původ *C. reinhardtii* pochází z jedné zygoty izolované z bramborového pole v Massachusetts v roce 1945. Po desetiletích laboratorní domestikace (např. akumulace mutací) se však její současné genetické rysy vzdalovaly divokému typu a pravděpodobně ztratily schopnost žít v přírodě. Množství pozoruhodných sloučenin produkovaných *C. reinhardtii* jako primární nebo sekundární metabolity z ní učinilo atraktivní zdroj karotenoidů, chlorofylových lipidů, polysacharidů a rekombinantních proteinů. Food and Drug Administration (FDA) uznává *C. reinhardtii* jako GRAS organismus. Schopnost *C. reinhardtii* syntetizovat několik metabolitů např. sírné polysacharidy vykazující silnou antibiotickou aktivitu proti řadě patogenních mikroorganismů. Suchá biomasa obsahuje 22–48 % proteinů, 15–50 % sacharidů a 18–29 % lipidů. V současnosti je široce využívána k maximalizaci výtěžků bioproduktů [57]. Kromě toho bylo v jedné studii zjištěno, že *C. reinhardtii* obsahovala 10  $\mu\text{g/g}$  selenu, mohlo by se jednat o nový zdroj vzácného a životně důležitého prvku [51].

#### **2.8.2 Kvasinky**

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotické houby, jejichž nepohlavní růst je převážně výsledkem pučení nebo štěpení. Nepohlavní endospory (endokonidie) se běžně netvoří, ale byly pozorovány u kmenů rodů *Trichosporon*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium* a *Leucosporidium*. Kvasinky jsou chemoorganotrofy využívající anorganické látky jako zdroj energie [58]. Kvasinky mají eukaryotický typ buňky a obsahují téměř stejné orgány jako zralé eukaryotické buňky (jádro, Golgiho aparát, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, vakuola, cytoskelet) [58]. Vnější část každé kvasinkové buňky se skládá z odlišné buněčné stěny a plazmatické membrány [59].

Buněčná stěna kvasinkových buněk je poměrně silná a tuhá (100–200 nm), představuje 15–25 % celkové suché hmoty buněk. Hlavními složkami buněčné stěny jsou polysacharidy, které tvoří 80–90 % stěny. Jedná se především o glukany a mannany s nízkým podílem chitinu. Některé vláknité kvasinky mají vyšší obsah chitinu, zatímco jiné chitin zcela postrádají. Pevnost stěny zajišťují glukánové složky, které jsou částečně uspořádány do mikrofibrilární sítě. Přítomny jsou  $\beta$ -1,6- a  $\beta$ -1,3- vázané glukany. Mezi další složky buněčných stěn kvasinek patří různé podíly proteinů, lipidů a anorganických fosfátů v závislosti na kmeni kvasinek, stáří buněk a podmínkách růstu. Buněčná stěna je multifunkční organela, která určuje buněčný tvar a integritu organismu během růstu a buněčného dělení. Také chrání buňky před mechanickým poškozením a před vnějšími vlivy [60].

Kvasinky lze izolovat ze slupek ovoce, bobulí, rostlinných šťáv nebo kaktusů. Některé kvasinky se nacházejí ve spojení s půdou nebo hmyzem. Agar, sladový agar, bramborová dextróza, kvasnicový pepton-dextrózový agar nebo kvasnicový plísňový agar jsou příklady několika růstových médií používaných pro izolaci kvasinek. Optimální teplota pro růst kvasinek je v rozmezí 20–28 °C a při pH 3,5–4,0 [61]. Kvasinky adaptované na chlad produkují aktivní pektinázy při mírných a nízkých teplotách, což je velmi výhodné pro potravinářský průmysl, jelikož se uplatňují při čiření ovocné šťávy a během fermentace vína. Kmeny izolované z trvalých chladných stanovišť jsou z rodů *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula*, *Mrakia* a *Tausonia* [62].

### **2.8.2.1 Vybrané metabolity kvasinek**

Kvasinky jsou chráněny sloučeninami jako jsou pigmenty (karotenoidy a melaniny), mykospotiny, antioxidanta a některými vitaminy [63].

#### ***Karotenoidy***

Karotenoidy jsou uhlovodíky, které obsahují 40 atomů uhlíku. Tyto tetraterpenoidy (C<sub>40</sub>) se skládají z osmi izoprenových jednotek. V přírodě jsou široce rozšířeny a bylo jich identifikováno přes 600 typů. Karotenoidy lze rozdělit do dvou skupin na karoteny a xantofyly. Mezi karoteny patří  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, torulen, lykopen, jsou to čisté uhlovodíky. Mezi xantofyly se řadí lutein, zeaxantin, violaxanthin a neoxantin, jedná se o oxidované deriváty uhlovodíků [64].

Karotenoidy ve spojení s membránovými lipidy chrání kvasinkové buňky před zářením a oxidací, umožňují účinnou adsorpci záření od 400 do 500 nm [63]. Antioxidační vlastnosti karotenoidů pomáhají vychytávat reaktivní formy kyslíku, snižovat neurologické poruchy a hladinu diabetu. Některé mohou být přeměňovány na vitamin A. Těchto vlastností se využívá ve farmacii, potravinářském, chemickém či kosmetickém průmyslu. Nedávná studie potvrdila, že suplementace karotenů po dobu 8 týdnů zmírnila oxidační stres u cílových skupin, do které patřili zdraví jedinci, sportovci či těhotné ženy [65]. Za neoptimalizovaných podmínek bylo zjištěno, že karotenogenní kvasinky produkovaly karotenoidy v rozmezí 0,25–10,33 mg/l [66].

#### ***Lipidické látky kvasinek***

Kvasinky syntetizují převážně mastné kyseliny se sudým počtem uhlíku. Kvasinky, které tvoří 20 % lipidů své biomasy jsou označovány jako olejnaté. Většina olejnatých kvasinek může akumulovat lipidy ve větším množství než 40 % jejich suché hmotnosti. Obsah lipidů a mastných kyselin se liší mezi druhy [67]. Mikrobiální lipidy se skládají převážně z triacylglycerolů (TAG), volných mastných kyselin a neutrálních lipidů (monoacylglyceroly, siacylglyceroly a sterylestery), sterolů a polárních frakcí (fosfolipidy, sfingolipidy a glykolipidy). Jako zdroje uhlíku se využívají širokou škálu substrátů většinou na bázi cukrů [68].

#### ***Steroly a ergosterol***

Steroly tvoří velkou skupinu organických sloučenin v rostlinných a živočišných buňkách. Jejich spektrum je poměrně široké a charakteristické pro různé skupiny mikroorganismů. Ergosterol a 7-dehydrocholesterol (7-DHC) jako typické steroly jsou důležitými prekurzory vitaminu D<sub>2</sub> a vitaminu D<sub>3</sub> [69]. Vitamin D<sub>2</sub> podporuje vstřebávání Ca<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> iontů v lidském těle [70].

## **Ubichinon**

Ubichinon známý jako CoQ (koenzym Q) je esenciální lipid vyskytující se téměř ve všech organismech. CoQ se skládá z benzochinonové skupiny a isoprenoidního postranního řetězce. Primárně funguje jako elektronový přenašeč při respiraci a oxidativní fosforylaci v dýchacím řetězci. V lidských a kvasinkových buňkách se syntéza CoQ odvozuje z aromatických kruhových prekurzorů a izoprenové biosyntetické dráhy. CoQ funguje jako antioxidant rozpustný v lipidech v buněčných biomembránách, kde zachycuje reaktivní formy kyslíku. [71]. Koenzym Q má příznivý vliv na kardiovaskulární systém, plodnost a kosterní svalstvo [72].

## **$\beta$ -glukany**

$\beta$ -glukany jsou polysacharidy, homopolysacharidy  $\beta$ -glukózy. Molekuly tvoří 1,3-D-glukózovou kostru s glykosidickými můstky v pozicích  $\beta(1\rightarrow3)$  a  $\beta(1\rightarrow6)$ , na které jsou navázány různě dlouhé postranní řetězce 1,6-D-glukózy.  $\beta$ -glukany tvoří komponenty buněčných stěn bakterií, sinic, řas, kvasinek a hub. V hojné míře se nacházejí v obilných zrnech.  $\beta$ -glukany stimulují imunitní systém [51].

### **2.8.2.2 Karotenogenní kvasinky**

Karotenogenní kvasinky jsou nekonvenční olejnaté mikroorganismy, někdy označované jako „červené kvasinky“ představující skupinu různých druhů bazidiomycetových kvasinek (*Rhodotorula sp.*, *Sporidiobolus sp.*, *Cystofilobasidium sp.*). Tyto druhy významně intracelulárně produkují značné množství karotenoidních pigmentů a lipidů, díky nimž mají kolonie oranžovou, narůžovělou nebo červenou barvu [73]. V mnoha případech mají extracelulární lipázovou aktivitu, která má za následek jejich schopnost rozkládat triacylglyceroly na glycerol a mastné kyseliny a využívat je jako zdroj uhlíku pro propagaci a produkci metabolitů [64] [74].

## **Rod *Cystofilobasidium***

Kvasinky rodu *Cystofilobasidium* se řadí do řádu *Cystofilobasidiales* a patří do třídy *Basidiomycetes*, jež je skupinou psychrofilních bazidiomycet [75]. Kultury kvasinek rodu *Cystofilobasidium* mají oranžovou až narůžovělou barvu, která stárnutím tmavne. U některých druhů jsou známy nepigmentované varianty. Buňky mají vejčitý nebo elipsoidní tvar [58]. Charakteristikou rodu je tvorba teliospor a viditelných karotenoidních pigmentů. Všechny druhy *Cystofilobasidiales* obsahují xylózu v buněčné stěně [75]. Mezi nejznámější kmeny patří *Cystofilobasidium capitatum*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* *Cystofilobasidium lacus-mascardii* a *Cystofilobasidium macerans* [76].

*Cystofilobasidium macerans* (*C. macerans*) a *Cystofilobasidium lacus-mascardii* jsou kmeny, které jsou schopny růstu s erythritolem, tato vlastnost chybí ostatním druhům rodu. Tyto dva druhy sdílejí také několik stejných fyziologických vlastností. Rozlišují se od sebe osmi nukleotidovými substitucemi. *C. macerans* se izoluje ze suchozemského prostředí, zejména vázaného na rostlinné složky. *C. macerans* je druh adaptovaný na chlad, protože byl nalezen v ledovcích na Islandu, v Norsku a Argentíně. Také byl tento druh hojný v zimních měsících na slámě v Dánsku. Byla prokázána produkce enzymů, přítomnost polygalakturonázy, pektinlyázy, pektátlyázy a pektinesterázy [58] [76]. Bylo zjištěno, že *Cystofilobasidium macerans* měla mimořádnou celulólytickou aktivitu při 22 °C ( $66,23 \pm 0,15 \mu\text{mol/mg protein} \cdot \text{min}$ ) [77].

## **2.9 Používané analytické metody**

### **2.9.1 UV-VIS spektrofotometrie**

Podstatou ultrafialového a viditelné spektrofotometrie je absorpce ultrafialového a viditelného záření roztoků molekul v rozmezí vlnových délek 200–800 nm. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, jež jsou součástí molekulových orbitalů. Absorpční přechod je charakterizován hodnotou vlnové délky pro maximum pásu  $\lambda_{\text{max}}$  a intenzitou pásu. Nejčastěji se tato intenzita vyjadřuje hodnotou molárního absorpčního koeficientu  $\epsilon_{\text{max}}$ , který charakterizuje míru absorpce při určité vlnové délce. Pro zředěné roztoky do koncentrací  $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a monochromatické záření platí Lambertův-Beerův zákon [78];

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

kde  $A$  je absorbance,  $\varepsilon_{\max}$  je molární absorpční koeficient,  $l$  je délka optické dráhy a  $c$  je koncentrace analytu v roztoku [78].

### 2.9.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografické metody jsou separační metody, které fungují na principu dělení složek mezi mobilní a stacionární fázi a lze je rozdělit podle skupenství použité mobilní fáze. Pokud je mobilní fáze v plynném skupenství, jedná se o plynovou chromatografii (GC – Gas Chromatography), pokud je mobilní fáze kapalného charakteru nazývá se kapalinová chromatografie (LC – Liquid Chromatography) [79].

HPLC je separační instrumentální metoda, kde dělené látky migrují kolonou naplněnou mikročásticemi stacionární fáze rychlostmi na základě jejich afinit pro mobilní a stacionární fázi [80]. Jedná se o vysoce účinnou a náročnou techniku kapalinové chromatografie. Pořadí rozdělení jednotlivých složek závisí na chemickém charakteru separovaných látek a na polaritě obou fází. K separaci polárních látek se nejčastěji používá HPLC s reverzní fází, kde má stacionární fáze nepolární charakter a mobilní fáze polární charakter. Při normální fázové separaci je stacionární fáze polárnější než mobilní. Separační kolony pro HPLC tvoří náplň s vysokou hustotou a homogenitou stacionární fáze. Pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze je nutné aplikovat vysoký tlak o velikosti až desítek MPa. Mezi hlavní části chromatografu patří: zásobník mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, dávkovač, kolona uložená v termostatu, detektory a vyhodnocovací systém [81].

HPLC se využívá při analýzách netěkavých látek v komplexních maticích. Těto metody se využívá v řadě aplikací – v potravinářství a krmivářství, při analýze životního prostředí např. při sledování různých typů organických i anorganických polutantů vod a půdy nebo při farmaceutické analýze pro identifikaci a hodnocení čistoty léčiv [81].

### 2.9.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je separační metoda, která využívá k separaci plynů dvě heterogenní fáze. Mobilní fázi tvoří inertní plyn a stacionární fází je nejčastěji kapalina, jež je zakotvena na inertním nosiči. Výhodou oproti jiným chromatografickým metodám je mobilní fáze, kterou tvoří zmíněný inertní plyn. Tento plyn je málo viskózní a stlačitelný. Afinita složek v plynech je mnohem větší než v kapalinách a interakce molekul v plynu jsou podstatně menší než v kapalně fázi [79]. Mezi hlavní části plynového chromatografu patří: zdroj nosného plynu, dávkovač, kolona, termostat a řídicí a vyhodnocovací zařízení [81].

Metoda je vhodná především pro analýzu těkavých složek, které je možno převést do plynného stavu. Metoda je využívána v organické chemii, biochemii, chemické technologii, v petrochemickém, chemickém a potravinářském průmyslu. Plynovou chromatografií lze měřit fyzikálně-chemické veličiny, jako jsou tlaky par, bod varu, směšovací tepla a aktivní koeficienty [79] [81].

### 2.9.4 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidanty jsou molekuly, které mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci látek, která by mohla být způsobena volnými radikály. Volné radikály vznikající *in vivo* a mají řadu fyziologických funkcí (např. účastní se v protizánětlivých reakcích), které negativně působí na organismu při řadě onemocnění. Jedná se především o reaktivní kyslíkové radikály a dusíkové radikály. Tyto radikály působí na biologické sloučeniny, jako jsou lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, pozměňují tak těmto sloučeninám strukturu a modifikují jejich funkci. Dochází ke změnám ve struktuře buněk, k poškození tkání a ke změně funkce v organismu. V souvislosti s analýzou potravin byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita (total antioxidant activity – TAA). Tento parametr kvantifikuje kapacitu biologického vzorku eliminovat radikály [82].

Nejčastěji se pro stanovení antioxidační aktivity používá metoda TEAC. Metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) testuje schopnost vzorku zhaset kation-radikál ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis(3-etylbenzothiazolin-6-sulfonátu)). Výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnatelná s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Antioxidanty, jež zhasíjí radikál ABTS<sup>+</sup>, se sledují spektrofotometricky na základě absorpčního spektra ABTS<sup>+</sup>. Nejčastěji se měří absorbance při 734 nm [82]. Tato metoda je závislá na mnoha faktorech jako je koncentrace ABTS<sup>+</sup>, kvantita vzorku nebo čas [83].

### **2.9.5 Imunochemické stanovení lepku (RIDASCREEN® Gliadin competitive)**

Nejpoužívanější metodou ke stanovení lepku je enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Imunochemické metody jsou založeny na specifické interakci protilátky s antigenem. ELISA testy jsou obecně vysoce specifické, jež se využívají k detekci specifických proteinů nebo toxinů. Při této metodě jsou proteiny adsorbovány na povrch jamek destičky ELISA a detekovány pomocí vhodných protilátek [84] [85].

Kit RIDASCREEN® Gliadin competitive se používá především pro analýzu fermentovaných a hydrolyzovaných potravin. Kompetitivní enzymová imunoanalýza, na které je založen tento kit, kvantifikuje prolaminu z pšenice, žita a ječmene za použití monoklonální protilátky R5. Mimo jiné tato protilátka rozpoznává potenciálně toxickou sekvenci QQFP gliadinu. Jedná se o alergický lineární peptidový epitop degradovaný surovými proteázami z naklíčených semen pšenice [86].

### **2.9.6 Testování cytotoxicity *in vitro***

Cytotoxicita je schopnost buněk či chemických látek ničit jiné buňky a je jednou z nejdůležitějších ukazatelů pro biologické hodnocení *in vitro*. Pojem *in vitro* znamená v překladu mimo lidské tělo tzv. „ve skle“. Toxicita představuje míru působení toxických látek na živý organismus [87]. Test cytotoxicity využívá tkáňové kultury nebo buněčné linie *in vitro* k pozorování buněčného růstu, reprodukce a morfologických změn, mezi které patří destrukce buněčných membrán, změna syntézy proteinů nebo nevratné vazby na receptor [88].

#### **2.9.6.1 MTT test cytotoxicity**

MTT test je test metabolické aktivity využívající MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) činidlo. Stanovení je založeno na redukci této monotetrazoliové soli, kdy dojde k narušení tatrazolového kruhu, čímž dojde k tvorbě fialovomodré nerozpustné molekuly zvané formazan. MTT činidlo může procházet buněčnou membránou i vnitřní mitochondriální membránou životoschopných buněk pravděpodobně díky svému kladnému náboji a lipofilní struktuře. Metabolicky aktivními buňkami je redukováno na formazanový derivát, který zůstává uvnitř buněk ve formě nerozpustných granulí. Přidáním SDS detergentu dojde k uvolnění a rozpuštění barviva z buněk. Vzniklý modrofialový roztok se měří spektrofotometricky většinou při 570 nm pomocí ELISA metody [89].



### **3 CÍLE PRÁCE**

Cílem této práce je vývoj obohacených bezlepkových cereálií pro zvláštní výživu. V rámci práce byly řešeny jednotlivé následující body:

- 1) Literární rešerše - přehled cereálií se zvláštním zaměřením na bezlepkové produkty
- 2) Charakterizace složení cereálií - pohanka, amaranth, quinoa
- 3) Výběr vhodných kvasinek a řas a stanovení biologicky aktivních látek - vitaminů, antioxidantů a PUFA
- 4) Příprava směsných cereálních produktů, jejich charakterizace a biologické účinky

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

#### 4.1.1 Chemikálie použité pro kultivaci mikrořasy

Dusičnan kobaltnatý hexahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)

Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)

Močovina p.a., Lach:ner, S.r.o. (ČR)

Na<sub>2</sub>-EDTA·2H<sub>2</sub>O p.a., Sigma-Aldrich (SRN)

Oxid molybdenový p.a., p.a., Lach:Ner, S.r.o. (ČR)

Peroxid vodíku 30%., Sigma-Aldrich (SRN)

Selenan sodný p.a., Lach:ner, S.r.o. (ČR)

Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lach:Ner, S.r.o. (ČR)

Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Lach:Ner, S.r.o. (ČR)

Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach:Ner, S.r.o. (ČR)

#### 4.1.2 Chemie použité pro kultivaci kvasinek

Agar, Roth (SRN)

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)

D-glukóza monohydrát p.a., Lach:ner s r.o. (ČR)

Síran amonný p.a., Lachema (ČR)

Glycerol, Lach:ner (ČR)

Bakteriologický pepton, Himedia (India)

#### 4.1.3 Chemikálie pro stanovení fenolických sloučenin a flavonoidů

Dusitan sodný, p.a., Lachema (ČR)

Folin-Ciocalteuovo činidlo (VWR Chemicals, ČR)

Chlorid hlinitý, p.a., Lach:ner (ČR)

Katechin, Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (SRN)

Uhličitan sodný bezvodý p.a. - LachNer (ČR)

#### 4.1.4 Chemikálie pro stanovení antioxidační aktivity

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfuric acid) diammonium salt), Sigma- Aldrich (DEU)

Ethanol pro UV/VIS 99%,

Hexan p. a., Lach:ner (ČR)

Peroxodisíran draselný, Sigma Aldrich (SRN)

TROLOX, Sigma-Aldrich (SRN)

Chemikálie pro stanovení rozpustných bílkovin

Tetrahydrát vínanu sodno-draselného (p.a), Lach:ner, s.r.o. (ČR)

#### 4.1.5 Chemikálie pro stanovení β-glukanů a lepku

Kit pro stanovení lepku, RIDASCREEN® Gliadin competitive, R-Biopharm (SRN)

Kit pro stanovení β-glukanů, Enzymatic Yeast β-Glucan Assay Kit, Megazyme (IRL)

Kit pro stanovení β-glukanů, Mixed-linkage β-glucan assay kit, Megazyme (IRL)

#### 4.1.6 Chemikálie pro MTT test

Antibiotic 100X (Biosera), BioTech (SRN)

FBS, HyClone (USA)  
PBS, Sigma (SRN)  
NEAA, Sigma (SRN)  
MEM médium, Sigma Aldrich (SRN)  
MTT, Duchefa Biochemie (NL)  
SDS dodecylsírán sodný, Serva (SRN)  
Trypanová modř, Biotech (SRN)  
Trypsin, Versene EDTA, P-Lab (ČR)

#### **4.1.7 Chemikálie použité pro extrakce a analýzu (HPLC, GC)**

Acetonitril pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)  
Dusík 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem  
Ethanol 96% p.a., PENTA s.r.o, (ČR)  
Ethylacetát pro HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)  
Hexan pro HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)  
Chloroform pro HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)  
Kyselina heptadekanová GC kvality, Sigma Aldrich (SRN)  
Methanol pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)  
Skleněné kuličky 0,25–0,5 mm, Carl Roth (SRN)  
Tris-HCl, Penta (ČR)  
Vodík 5.5 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem  
Vzduch 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem  
Běžné chemikálie jsou uvedeny viz dále součástí návodů u jednotlivých stanovení.

#### **4.2 Použité přístroje**

Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)  
GKB Color Digital CCD kamera (Tchaiwan)  
Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s r.o. (ČR)  
Třepačka Yellow line, (SRN)  
Centrifuga Sigma Laborzentrifugen (SRN)  
Box Aura mini BioTech (ČR)  
Fermentor Sartorius Biostat  
Analytické váhy, Boeco (SRN)  
Automatické pipety, Biohit (DE) a Discovery  
Centrifuga vysokorychlostní chlazená Z 36 HK, HERMLE Labortechnik  
Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)  
Optický mikroskop a Software Dino –Capture 2.0 (ČR)  
Předvážky Scout Pro, OHAUS  
Rotační vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)  
Topná lázeň HB4 basic, HBA Labortechnik  
Spektrofotometr UV/VIS, Boeco  
HPLC filtry, PRE-CUT, Alltech (GB)  
HPLC/PDA sestava:

- Sestava HPLC (Thermo Fischer Scientific, USA)

- Dionex ultimate series 3000 pump

- Dionex ultimate series 3000 autosampler

- Thermo fisher Vanquish detector

- Vyhodnocovací systém Chromeleon

Termoblok, OHAUS

TRACE GC/FID (Thermo Fischer Scientific, USA)

- Kapilární kolona Zebron ZB-FAME, 30 m délka

Běžné laboratorní sklo

### 4.3 Seznam použitých vzorků vybraných pseudocereálií

V rámci bakalářské práce byly analyzovány vzorky mouk pseudocereálií. Vybranými vzorky byla amarantová, pohanková a quinoová mouka.

Tabulka 1: Nutriční složení analyzovaných vzorků muk na 100 g výrobku

Mouka	Značka	Energie [kJ/kcal]	Sacharidy [g]	Cukry [g]	Bílkoviny [g]	Tuky [g]
Amaranth	NATURAL Jihlava	1517/362	58,2	0	15,80	1,50
Pohanka	NATURAL Jihlava	1401/330	70,80	0,64	11,83	2,95
Quinoa	NATURAL Jihlava	1541/386	64,00	0	14,00	6,00

### 4.4 Použité kmeny řas a kvasinek

- *Chlamydomonas reinhardtii* CCALA 928
- *Cystofilobasidium macerans* CCY 10-1-2

### 4.5 Kultivace mikroorganismů

Pro tuto práci byl vybrán kmen zelené mikrořasy z důvodu produkce chlorofylů, proteinů a dalších aktivních látek. Zároveň byl kultivován zástupce karotenogenní kvasinky s produkcí lipidů a lipofilních aktivních látek jako jsou karotenogenní barviva, ergosterol a tokoferoly.

#### 4.5.1 Kultivace mikrořas

Pro účely této bakalářské práce byl zvolen kmen mikrořasy *Chlamydomonas reinhardtii*. Tento kmen byl pořízen ze sbírky autotrofních organismů z Botanického ústavu AV ČR v Třeboni (CCALA). Mikrořasy byly očkované ze zásobních kultur do BBM média (Bold Basal Medium) o složení uvedeném v následujících tabulkách. (Tabulka 2 a Tabulka 3). Řasová média se připravují ze zásobních roztoků solí a jsou zároveň inokulační i produkční. Po dostatečném nárůstu biomasy byla část přeočkována do provzdušňovací Pyrex láhve s produkčním BBM médiem. Kultivace probíhala za laboratorní teploty a stálého vzdušnění a osvětlení. Výsledná absorbance roztoku média byla  $A_{680} = 0,1-0,15$ . Média byla vždy sterilována v autoklávu při 120 °C po dobu dvou hodin. V laboratoři během kultivace byly zajištěny a dodržovány sterilní podmínky, aby nedošlo ke kontaminaci, na kterou jsou řasy extrémně náchylné.

Po dostatečném nárůstu řasové biomasy byla biomasa stočena v centrifuze při 8 000 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl následně opatrně vylit a získaná biomasa byla promyta nejméně dvakrát

destilovanou vodou, aby došlo k přečištění. Následně byla znovu vložena do centrifugy na stejnou dobu se stejnými otáčkami. Supernatant byl opět opatrně odstraněn a biomasa byla vložena do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do mrazničky. Na závěr byla biomasa vložena do lyofilizátoru. Po lyofilizaci byly vzorky biomasy uchovávány při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Tabulka 2: Složení BBM média.

Složka	Zásobní roztok (g/l dH <sub>2</sub> O)	Množství na 1 l
NaNO <sub>3</sub>	25,00	10
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,50	10
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7,50	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,50	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,50	10
NaCl	2,50	10
EDTA	-	1
Acidified iron	-	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42	1
Trace metals	-	1

Tabulka 3: Složení části média

Roztok	Složka	Množství [g/l]
EDTA	EDTA	50,00
	KOH	31,00
Acidified iron	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,98
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96%)	1,00 ml
Trace metals	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,82
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,44
	MoO <sub>3</sub>	0,71
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,57
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,49

#### 4.5.2 Kultivace kvasinek

Kmen *Cystofilobasidium macerans* byl očkovan na sterilní pevné YPD médium v Petriho miskách. Kmen byl před kultivací uchováván z kryozkumavkách při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Složení média je zobrazeno v

Po ukončení kultivace byla biomasa stočena v centrifuze při 9 000 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl následně opatrně vylit a získána biomasa byla promyta nejméně dvakrát destilovanou vodou. Následně byla znovu vložena do centrifugy po stejnou dobu za stejných otáček. Supernatant byl opět opatrně odstraněn a biomasa byla vložena do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na závěr byla biomasa vložena do lyofilizátoru. Po lyofilizaci byly vzorky biomasy uchovávány při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zaočkovaná kultura byla ponechána růstu při laboratorní teplotě po dobu 72–96 hodin. Kultivace probíhala ve dvou stupních. Nejprve byla jedna klička narostlé kultury přeočkovaná na 10 ml tekutého YPD média (inokulum I). Takto naočkovaná kultura byla kultivována na třepačce při 100 rpm po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě.

Následně bylo připraveno inokulum II, tím, že bylo přeočkováno inokulum I do nového tekutého YPD média v poměru 1 : 5. Kultivace probíhala za laboratorních podmínek po dobu 24 hodin v Erlenmeyerových baňkách na třepačce. Po 24 hodinách bylo inokulum II přeočkováno v poměru 1 : 20 do sterilního minerálního produkčního média ve fermentoru. Po celou dobu se pracovalo v očkovacím boxu za sterilních podmínek.

Kultivace probíhala 96 hodin ve fermentoru, který obsahoval 5 l minerálního média při teplotě 25 °C. Bylo kontrolováno pH, které bylo udržováno na 6,5 pomocí peristaltických čerpadel napojených do zásobníky hydroxidu sodného a kyseliny sírové. Po čas celé kultivace bylo udržováno 30 % rozpuštěného kyslíku. Podmínky během kultivace byly sledované pomocí kyslíkové, teplotní a pH sondy.

Po ukončení kultivace byla biomasa stočena v centrifuze při 9 000 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl následně opatrně vylit a získána biomasa byla promyta nejméně dvakrát destilovanou vodou. Následně byla znovu vložena do centrifugy po stejnou dobu za stejných otáček. Supernatant byl opět opatrně odstraněn a biomasa byla vložena do -80 °C. Na závěr byla biomasa vložena do lyofilizátoru. Po lyofilizaci byly vzorky biomasy uchovávané při teplotě -20 °C.

Tabulka 4: Složení použitého YPD média

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

Tabulka 5: Složení použitého minerálního produkčního média

Složka	navážka [g/l]
glycerol	92,46
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,30
KNO <sub>3</sub>	10,12
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8,00
voda	1000,00 ml

#### 4.6 Optimalizace extrakcí z karotenogenních kvasinek a mikrořas

Z mikrořasy *Chlamydomonas reinhardtii* a kvasinky *Cystofilobasidium macerans* byly připraveny extrakty s různými rozpouštědly.

Pro každou extrakci z kvasinek byl připraven vzorek, kdy do centrifugační zkumavky bylo naváženo 0,1 g lyofilizované kultury karotenogenních kvasinek, jež byl ponechán rehydratovat po dobu 1 hodiny ve tmě. Následně byl přes noc zamražen s cílem narušení buněčné stěny. Nakonec byl vzorek rozmražen, odstředěn a byla odstraněna přebytečná voda nad sedimentem. K získanému sedimentu bylo přidáno 10 ml extrakčního činidla. Byla provedena extrakce do 96% ethanolu, hexanu, do směsi 96% ethanolu a hexanu v poměru 1 : 1. Ke směsi byly přidány skleněné kuličky. Připravené vzorky byly umístěny na vortex po dobu 10 minut. Následně byly umístěny na 24 hodin na třepačku. Po uplynutí byl vzorek

odstředěn a získaný supernatant byl odpařen na vakuové rotační odparce. Následně byl film extraktu rozpuštěn v 96% ethanolu, tak aby byla zachována původní koncentrace a uchován ve tmě a chladu pro další charakterizaci.

Pro charakterizaci řasové biomasy byl připraven vodný, ethanolový, směs ethanol a voda (1 : 1), hexanový a směs ethanol a hexan (1 : 1) extrakt. Vždy bylo naváženo 0,1 g řasové biomasy a 10 ml rozpouštědla. Extrakce proběhla stejným způsobem jako v případě kvasinkové biomasy. Získané extrakty byly použity pro charakterizaci.

### **Extrakce dle Folche**

Extrakce dle Folche byla použita jako srovnávací metoda. Do zkumavek bylo naváženo po 0,1 g řasové a kvasinkové biomasy. Ke vzorku byla přidána směs chloroformu a methanolu v poměru 2 : 1 o objemu 10 ml [82]. Ke kvasinkovému vzorku byly přidány skleněné kuličky pro narušení buněčné integrity. Vzorek byl umístěn na vortex po dobu 30 minut. Dále byly přidány 3 ml destilované vody na promytí extraktu. Vzorek byl promíchán a odstředěn při 4 500 rpm po dobu 6 minut. Po oddělení fází byla odpipetována spodní chloroformová fáze s extraktem, ten byl odpařen. Film extraktu z kvasinky byl rozpuštěn v 96% ethanolu. Získané extrakty byly použity pro analýzu.

## **4.7 Charakterizace vzorků**

### **4.7.1 Příprava vzorků vybraných druhů mouk pro spektrofotometrické stanovení**

Pro analýzu byly použity vzorky mouk vybraných pseudocereálií, které jsou uvedeny v kapitole 4.3.

Před samotnou charakterizací byly připraveny vodné extrakty z amarantové, quinové a pohankové mouky. Byl navážen 1 g vzorku, ke kterému bylo přidáno 10 ml destilované vody. Směs byla promíchána na vortexu a po dobu 24 hodin byly vzorky extrahovány na třepačce při teplotě 37 °C. Po skončení extrakce byl vzorek v centrifugační zkumavce centrifugován při 9 000 rpm po dobu 10 minut při 25 °C. Odebraný supernatant byl následně použit pro analýzu.

### **4.7.2 Stanovení sacharidů dle Duboise**

Pro stanovení sacharidů ve vzorcích mouk byla použita metoda dle Duboise. Pro stanovení byla použita kyselá hydrolyza. Do centrifugační zkumavky byl navážen 1 g vzorku mouky, ke kterému bylo přidáno 10 ml 6M kyseliny chlorovodíkové. Připravené vzorky byly promíchány na vortexu a byly ponechány hydrolyzovat při teplotě 37 °C na třepačce. Hydrolyzované vzorky byly centrifugovány v centrifugační zkumavce při 9 000 rpm po dobu 10 minut při 25 °C. Získané vzorky byly 1 000x zředěny a použity pro analýzu.

Metoda je založena na dehydrataci sacharidů koncentrovanou kyselinou sírovou a následné kondenzaci vzniklých derivátů s reakčním činidlem. V této bakalářské práci bylo jako reakční činidlo použit fenol. Vzniklé barevné kondenzační produkty byly stanoveny spektrofotometricky.

Do zkumavky byl napipetován 1 ml roztoku vzorku a 1 ml 5% roztoku fenolu. Následně bylo velmi pomalu přidáno 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Směs byla protřepána a ponechána 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynuté době byla změřena absorbance při 450 nm proti slepému vzorku.

Obsah neutrálních sacharidů dle Duboise byl vypočten z rovnice kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla připravena pro vodný roztok glukosy o koncentraci 0,1 mg/ml v rozmezí 0,25–1,0 mg/ml. Každý vzorek byl analyzován třikrát a byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

### **4.7.3 Stanovení obsahu celkových fenolických látek**

Spektrofotometrickou metodou s Folin-Ciocaltauovým činidlem byly stanoveny celkové fenolické látky. Nejprve byl připraven zředěný vodný roztok Folin-Ciocaltauova činidla v poměru 1 : 9.

Do zkumavky bylo napipetováno 1 ml zředěného Folin-Ciocaltauova činidla, 1 ml destilované vody a 100 µl připraveného extraktu vzorku. Roztok ve zkumavkách byl promíchán a ponechán 5 minut při laboratorní teplotě. Následně byl do zkumavky přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného.

Roztok byl opět promíchán a ponechán 15 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byla změřena absorbance při 750 nm proti blanku.

Obsah celkových fenolických látek ve vzorku byl vypočten z rovnice kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla připravena pro roztok kyseliny gallové v rozmezí 0,1–0,5 mg/ml. Každý připravený vzorek byl analyzován v triplicátech, byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

#### **4.7.4 Stanovení flavonoidů**

Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml vodného extraktu, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného. Obsah ve zkumavce byl promíchán na vortexu a ponechán 5 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí 5 minut bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého a roztok byl opět promíchán a nechán dalších 5 minut při laboratorní teplotě. Na závěr bylo pipetováno 1,5 ml 5% roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Roztok ve zkumavce byl promíchán a ponechán 15 minut při laboratorní teplotě. Po 15 minutách byla změřena absorbance při 510 nm proti slepému vzorku.

Obsah flavonoidů ve vzorku byl zjištěn z kalibrační závislosti, která byla připravena pro roztok katechinu v rozmezí 0,05–0,3 mg/ml. Každý vzorek byl připraven v triplicátech a byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

#### **4.7.5 Stanovení celkové antioxidační aktivity**

Pro stanovení celkové antioxidační aktivity byla použita metoda TEAC. ABTS radikál byl připraven smícháním 7 mM ABTS a 2,45 mM peroxodisíranu sodného rozpuštěných v destilované vodě. Vznikl modrozelený roztok, který byl ponechán minimálně 15 hodin stát ve tmě při pokojové teplotě. Před samotnou analýzou byl roztok naředěn UV-VIS ethanolem na absorbanci  $A = 0,70 \pm 0,02$  při 734 nm. Jako byl použit UV-VIS ethanol. Nejprve byla zjištěna hodnota  $A_0$ , kdy byla změřena absorbance ihned po přidání 10  $\mu$ l destilované vody k 1 ml naředěného ABTS<sup>+</sup>. Následně už proběhla analýza vzorků. Do Eppendorf zkumavek byl napipetován 1 ml naředěného roztoku ABTS<sup>+</sup> a 10  $\mu$ l extraktu. Roztok byl protřepán a ponechán ve tmě. Po 10 minutách byla změřena absorbance při 734 nm proti blanku. Koncentrace byla zjištěna z kalibrační křivky, která byla sestrojena z koncentrací v rozmezí 0,025–0,4 mg/ml pomocí modelového roztoku antioxidantu Trolox. Každý připravený vzorek byl analyzován v triplicátech, byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

#### **4.7.6 Stanovení rozpustných bílkovin dle Hartree-Lowryho**

Pomocí Hartree-Lowryho metody byly stanoveny rozpustné proteiny ve vodných extraktech mouk a řas. Nejprve byly připraveny činidla A, B a C dle Hartree-Lowryho.

Činidlo A bylo připraveno z 50 ml NaOH o koncentraci 1 M, 10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,2 g tetrahydrátu vinanu sodnodraseného a 100 ml destilované vody. Činidlo B se skládalo z 10 ml NaOH o koncentraci 1 M, 1 g pentahydrátu síranu měďnatého, 2 g tetrahydrátu vinanu sodnodraselného a 100 ml vody. Činidlo C představovalo zředěný roztok Folin-Ciocalteauva činidla a destilované vody v poměru 1 : 15.

Pro samotné stanovení byl do zkumavky napipetován 1 ml vzorku a 0,9 ml činidla A. Zároveň byl připraven blank, kam místo vzorku byl pipetován 1 ml destilované vody. Roztok byl promíchán na vortexu a inkubován ve vodní lázni při teplotě 50 °C po dobu 10 minut. Následně byly zkumavky vyndány a byl přidán 0,1 ml činidla B, roztok byl opět promíchán a nechán stát 10 minut při laboratorní teplotě. Po 10 minutách byly přidány 3 ml činidla C a roztok ve zkumavce byl promíchán a vložen do vodní lázně, kde byl inkubován 10 minut při 50 °C. Po uplynuté době byl vzorek ochlazen na laboratorní teplotu a byla změřena absorbance při vlnové délce 650 nm proti blanku. Pro výpočet koncentrace byla sestrojena kalibrační křivka pomocí roztoku standardu albuminu v rozmezí 30–210  $\mu$ g/ml. Každý připravený vzorek byl analyzován v triplicátech, byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka.



#### 4.7.7 Stanovení lepku

Pro analýzu byly nejprve připraveny ethanolové extrakty vzorků. Do zkumavky byl navážen 1 g vzorku mouky, ke kterému bylo pipetováno 10 ml 60% roztoku ethanolu. Vzorky byly promíchány na vortexu a následně promíchány otáčením po dobu 10 minut. Po promíchání byly vzorky centrifugovány při 5 000 rpm po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Získaný supernatant byl 50x zředěn pufrům. Naředěný vzorek byl použit pro analýzu.

Do jamky destičky bylo vždy napipetováno 50  $\mu$ l vzorku a 50  $\mu$ l zředěného konjugátu. Stanovení bylo provedeno v duplikátech. Lehkým zatřepáním byl obsah jamek zamíchán a vzorky byly inkubovány po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po 30 minutách byla destička rychle otočena dnem vzhůru a oklepána o filtrační papír. Došlo tak k odstranění tekutiny ze všech jamek. Následně bylo do každé jamky napipetováno 250  $\mu$ l promývacího pufru a ihned byla tekutina odstraněna jako v předchozím případě. Tento krok byl zopakován minimálně dvakrát. Po posledním odstranění tekutiny bylo do každé jamky napipetováno 100  $\mu$ l substrátu. Obsah v jamkách byl opatrně promíchán. Destička byla inkubována po dobu 10 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po 10 minutách bylo přidáno 100  $\mu$ l zastavovacího roztoku do každé jamky v destičce. Obsah jamky byl opatrně promíchán a během 10 minut byla změřena absorbance při 450 nm. Pro stanovení obsahu gliadinu ve vzorcích byla proměřena kalibrační řada, která byla součástí kitu a její rozmezí bylo 0–30 ng/ml. Z kalibrační křivky byl vypočten obsah gliadinu ve vzorku. Hodnoty byly přepočítány na obsah lepku ve vzorku a byly vynásobeny faktorem 2, jež byl uveden v návodu použitého kitu.

#### 4.7.8 Celková výtěžnost mikrobiální extrakce

Celková výtěžnost extrakce byla určena z připravených extraktů před odpařením na vakuové odparce. Do zvážené mikrozkušavky byl napipetován 1 ml extraktu. Takto připravená zkumavka byla umístěna do tmy do digestoře, kde byla ponechána do opáření rozpouštědla. Následně byla zkumavka opět zvážena na analytických vahách a byla zjištěna výtěžnost dané extrakce.

#### 4.7.9 Měření absorpčních spekter extraktů na UV-VIS spektrofotometrii

V rozmezí vlnových délek 200–800 nm s krokem 1 byly změřeny veškeré připravené řasové a kvasinkové extrakty pomocí UV-VIS spektrofotometru.

#### 4.7.10 Stanovení celkových karotenoidů a chlorofylů v extraktech z mikrořas

Z naměřených spekter byl zjištěn obsah karotenoidů a chlorofylů v extraktech mikrořas. Koncentrace chlorofylu a byla zjištěna pomocí rovnice 2 a chlorofylu b z rovnice 3. Také byla zjištěna celková koncentrace karotenoidů podle rovnice 4. Rovnice byly převzaty Lichtenthalera et al. [90]. Byly použity hodnoty absorbancí při 470, 649 a 664 nm.

$$c_a = (13,36 \cdot A_{664} - 5,19 \cdot A_{649}) \mu\text{g/ml} \quad (2)$$

$$c_b = (27,43 \cdot A_{649} - 5,19 \cdot A_{664}) \mu\text{g/ml} \quad (3)$$

$$c_{kar.} = \frac{(1\,000 \cdot A_{470} - 2,13 \cdot c_a - 97,64 \cdot c_b)}{209} \mu\text{g/ml} \quad (4)$$

#### 4.7.11 Stanovení celkových karotenoidů v extraktech z karotenogenních kvasinek

Celkový obsah karotenoidů z extraktů kvasinek byl zjištěn z hodnoty absorbance vzorku při 474 nm. Celková koncentrace karotenoidů byla vypočtena podle rovnice 5 převzaté od od Martinéze et al. [91].

$$c_{kar} = \left( \frac{A_{474} \cdot 10}{\varepsilon} \right) \text{mg/ml} \quad (5)$$

Kde  $\varepsilon$  je molární extinkční koeficient  $\beta$ -karotenu a jeho hodnota v ethanolu je 2 592.

#### **4.7.12 Enzymatické stanovení $\beta$ -glukanů v moukách a řase**

Do zkumavky bylo naváženo cca 120 mg vzorku. Bylo přidáno 0,2 ml 50% roztoku ethanolu a 4 ml fosfátového pufru (20mM, pH 6,5). Vzorek ve zkumavce byl opatrně promíchán na vortexu a inkubován po dobu 60 s při 100 °C, následně byly vzorky promíchány a inkubovány dalších 120 s. Po uplynutí času byly zkumavky vloženy do vodní lázně, kde byly inkubovány po dobu 5 min při 50 °C. Následně byly přidány 0,2 ml lichenázy. Obsah zkumavky byl promíchán a vzorky byly inkubovány po dobu 1 hodiny opět ve vodní lázni při 50 °C. Během této doby byly vzorky 3–4 promíchány. Po 1 hodině byl přidán 0,5 ml acetátového pufru (200 mM, pH 4,0), obsah zkumavky byl důkladně promíchán. Až měly zkumavky laboratorní teplotu, byly zcentrifugovány při 5 000 rpm po dobu 10 minut. Na dno tří zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml supernatantu a byl přidán 0,1 ml  $\beta$ -glukosidázy do dvou zkumavek a do třetí bylo přidáno 0,1 ml acetátového pufru (50 mM, pH 4,0). Takto připravené vzorky byly inkubovány při teplotě 50 °C po dobu 10 minut. Následně k roztoku ve zkumavce byly přidány 3,0 ml GOPOD činidla (Glucose Determination Reagent). Zkumavky byly naposled inkubovány po dobu 20 minut při 50 °C, následně byla změřena absorbance při 510 nm proti blanku.

#### **4.7.13 Enzymatické stanovení k $\beta$ -glukanů v kvasinkách**

Enzymatické stanovení  $\beta$ -glukanů bylo provedeno dle návodu od výrobce kitu [68]. Metoda je založena na enzymatickém štěpení polysacharidů na jednotlivé D-glukózy a umožňuje izolaci a stanovení  $\beta$ -D-glukanů z kvasinek.

##### **4.7.13.1 Stanovení celkových glukanů**

Bylo naváženo 90 mg vzorku do reakční zkumavky se závitem a byly přidány 2 ml studené kyseliny sírové (12 M). Vzorek byl promíchán a složen do ledové lázně na 2 hodiny, během této doby byl vzorek několikrát promíchán. Po uplynutí této doby byly přidány 4 ml vody a vzorky byly promíchány na vortexu po dobu 10 s. Následně bylo přidáno 6 ml vody a vzorek byl opět promíchán na vortexu po dobu 10 s. Následně byly zkumavky umístěny na 2 hodiny do vodní lázně při 100 °C. Po 5 minutách byly zkumavky uzavřeny zátkami. Po 2 hodinách byly ochlazeny na pokojovou teplotu a obsah každé zkumavky byl kvantitativně pomocí 200 mM acetátového pufru převeden do 100 ml odměrných baněk. Do každé odměrné baňky bylo odpipetováno 6 ml 8,0 M roztoku NaOH a baňka byla doplněna po rysku 200 mM acetátovým pufrem (pH 4,5). Obsah byl promíchán a byl odebrána alikvotní část vzorku do mikrocentrifugačních zkumavek a byly zcentrifugovány při 13 000 rpm po dobu 5 minut.

Z každé alikvotní části bylo odpipetován 0,1 ml supernatantu na dno dvou skleněných zkumavek. Na dno zkumavek bylo přidáno 0,1 ml směsi exo-1,3-  $\beta$ -glukanázy +  $\beta$ -glukosidázy ve 200 mM acetátovém pufru. Obsah zkumavek se promíchal a inkuboval při teplotě 40 °C po dobu 60 minut. Po uplynutí dané doby byly přidány 3 ml činidla GOPOD a zkumavky se inkubovaly při teplotě 40 °C po dobu 20 minut. Zároveň byl připraven slepý vzorek a standardní roztok D-glukózy. Slepý vzorek byl připraven z 0,2 ml acetátového pufru (200 mM, pH 4,5) a 3 ml činidla GOPOD. Standardní vzorek D-glukózy byl připravený z 0,1 ml standardu D-glukózy, 0,1 ml acetátového pufru (200 mM, pH 4,5) a 3 ml činidla GOPOD. Slepý vzorek a standard D-glukózy byly inkubovaly 20 minut při 40 °C zároveň se vzorky. Následně byla změřena absorbance při 510 nm proti slepému vzorku.

##### **4.7.13.2 Stanovení $\alpha$ -glukanů**

Do reakční zkumavky se závitem bylo naváženo 100 mg vzorku a byly přidány 2 ml 1,7 M NaOH. Zkumavky byly vloženy do ledu na 20 minut a průběžně byly promíchány na vortexu. Následně ke každému vzorku bylo přidáno 8 ml 1,2 M acetátového pufru (pH 3,8). Okamžitě bylo přidáno 0,2 ml amyloglukocidázy a invertázy. Obsah ve zkumavkách byl promíchán a zkumavky byly vloženy do vodní lázně na 30 minut při 40 °C za občasného míchání. Následně byly 2 ml roztoku převedeny do centrifugační zkumavky a centrifugovány při 13 000 rpm po dobu 5 minut. Bylo odpipetováno 0,1 ml supernatantu do skleněné zkumavky a bylo přidáno 0,1 ml acetátového pufru (200 mM, pH 4,5), 3 ml činidla GOPOD a vzorky byly inkubovány 20 minut při 40 °C. Následně byla změřena absorbance při 510 nm proti slepému vzorku.

#### 4.7.14 Stanovení lipofilních látek v extraktech metodou HPLC

Extrakty z řas a kvasinek byly použity pro analýzu lipofilních látek metodou HPLC. Pro analýzu byly použity ethanolové, hexanové, směs ethanol a hexan extrakty a extrakty dle Folche. Do skleněných zkumavek byly napipetované 2 ml připraveného extraktu, který byl odpařený na termobloku v inertní dusíkové atmosféře. K získanému odparku byl napipetován 0,5 ml směsi HPLC rozpouštědel o složení ethylacetát a acetonitril (poměr 1 : 1). Směs byla důkladně promíchána a přefiltrována přes PTFE filtr do skleněné vialky pro HPLC. Připravený vzorek byl uskladněn do mrazničky pro analýzu.

##### 4.7.14.1 Analýza připravených vzorků na HPLC

Analýza lipofilních látek probíhala za podmínek uvedených v Tabulce 6, složení mobilní fáze je uvedeno v Tabulce 7. Detekce byla provedena při dvou vlnových délkách. Při 450 nm byly analyzované karotenoidy a při vlnové délce 280 nm ergosterol a tokoferol. Získané chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí programu Chromeleon™ Chromatography Data System. Množství bylo dopočítáno z kalibračních rovnic standardů.

Tabulka 6: Parametry analýzy na HPLC

<b>Přístroj</b>	HPLC Thermo Fischer Scientific
<b>Kolona</b>	EVO C18, KINETEX; 150 x 4,6 x 2,6 mm
<b>Detektor</b>	PDA
<b>Čas analýzy</b>	25 min
<b>Průtok mobilní fáze</b>	1,2 ml/min
<b>Typ eluce</b>	gradientová

Tabulka 7: Složení mobilní fáze

Mobilní fáze	Složka	Obj. %
A	Acetonitril	84
	Methanol	2
	100 mM tris HCl pufr o pH = 8	14
B	Methanol	60
	Ethylacetát	40

#### 4.7.15 Stanovení mastných kyselin (GC)

Ve vybraných moukách, lyofilizované biomase a extraktech byl stanoven obsah mastných kyselin pomocí plynové chromatografie. Na analytických vahách bylo naváženo cca 60 g vzorku mouky pro stanovení mastných kyselin a 10 mg lyofilizované biomasy a byl přidán 1,8 ml transesterifikační směsi, která obsahovala inertní standard o koncentraci 0,5 g/l v 15% kyselině sírové v HPLC methanolu. Pro analýzu mastných kyselin z extraktů byly nejprve 2 ml extraktu odpařeny ve skleněných zkumavkách v inertní dusíkové atmosféře. K získanému filmu bylo přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi a celý objem byl převeden do krimplovacích vialek. Všechny připravené krimplovací vialky byly ihned zakrimplovány a byly dány do termobloku vyhřátého na 85 °C k transesterifikaci na 2 hodiny. Po vychladnutí byl obsah převeden do 4 ml vialky, ke kterému byl napipetován 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH. Následně byl ke vzorku napipetován 1 ml HPLC hexanu. Následně byly vialky umístěny na vortex na 10 minut. Po oddělení fází bylo do skleněných vialek o objemu 1,8 ml odpipetováno 0,1 ml bezbarvé vrchní hexanové fáze. Objem byl doplněn na 1 ml přidáním 0,9 ml hexanu HPLC kvality. Takto připravené vzorky byly uschovány v mrazničce pro analýzu.

#### 4.7.15.1 Analýza připravených vzorků na GC

Vzorky připravené transesterifikací byly podrobeny analýze na GC. V Tabulce 8 jsou uvedeny údaje o podmínkách analýzy GC.

Tabulka 8: Parametry analýza na GC

<b>Přístroj</b>	Thermo Fisher TRACE
<b>Dávkování</b>	Autosampler Thermo Scientific A1 1310
<b>Kolona</b>	Lion column; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
<b>Detektor</b>	FID
<b>Průtok nosného plynu</b>	vodík; 1 ml/min
<b>Nástřík</b>	1 µl
<b>Průtok plynu</b>	vzduch – 350 ml/min; dusík – 30 ml/min; vodík 35 ml/min

#### 4.7.16 Testování cytotoxicity

Nejprve byly připraveny extrakty z kvasinkové a řasové biomasy. Byly přichystané vodné a ethanolové extrakty z mikrořasy a ethanolový z kvasinky dle postupu v kapitole 4.6. Ethanolový extrakt byl analyzován před odpaření ethanolu na vakuové odparce a po odpaření a znovu rozpuštěn v ethanolu. Takto připravené vzorky byly přes jehlu nasáty do stříkačky a na stříkačku byl nasazen bakteriologický filtr. Vzorek byl přefiltrován do jiné sterilní zkumavky. Sterilní vzorky byly následně naředěny médiem na požadovanou koncentraci.

Pro stanovení cytotoxicity byly použity střevní buňky CaCo-2. Během celého testování byl kladen velký důraz na sterilitu práce.

##### 4.7.16.1 Kultivace CaCo-2

Kultivace střevních buněk probíhala ve sterilním boxu, kde byla udržována teplota 37 °C. Jako kultivační médium bylo použito MEM médium, do kterého bylo přidáno NEAA. Médium bylo uchováváno v lednici při teplotě 4 °C. Před samotnou prací bylo předem ohřáto na 37 °C. Buňky byly pravidelně kontrolovány.

##### 4.7.16.2 MTT test cytotoxicity

Nejprve byly dostatečně narostlé buňky zcentrifugovány a byl slit supernatant. Buňky byly rozsuspenzované v 5 ml média. Do mikrozkuavky bylo napipetováno 100 µl suspenze buněk a 100 µl trypanové modři. Roztok byl důkladně promíchán a pomocí pipety byla směs napipetována pod krycí sklo Bürkerovy komůrky. Byl spočítán počet buněk v rohových čtvercích. Na základě této hodnoty byl vypočten počet buněk v 1 ml. Na základě této hodnoty byl roztok buněk dostatečně zředěn.

Ke stanovení cytotoxicity buněk byla použita 96-jamková destička. Do středových jamek bylo napipetováno 100 µl naředěné buněčné kultury a do krajních byl napipetován PBS, aby nedocházelo k vysychání. Destička byla vložena do inkubátoru vyhřátého na 37 °C na 24 hodin. Během této doby došlo k přichycení buněk na dno jamek. Po uplynutí 24 hodin bylo médium důkladně odpipetováno. K takto přichyceným buňkám byl napipetován 0,1 ml připravených extraktů z kvasinek a řas. Připravené destičky byly opět umístěny do inkubátoru, kde byly ponechány na 24 hodin při 37 °C. Po uplynutí 24 hodin byl z jamek odpipetovaný roztok vzorku, místo kterého bylo napipetováno 20 µl sterilního barviva MTT o koncentraci 2,5 mg/ml. Takto připravené destičky byly vloženy na 3 hodiny do inkubátoru a následně bylo barvivo nahrazeno 100 µl 10% roztoku SDS v PBS, díky kterému došlo k rozpuštění krystalů uvnitř buněk. Destičky byly zabaleny do alobalu a umístěny do tmy na 24 hodin. Po 24 hodinách byla změřena absorbance v jednotlivých buňkách pomocí ELISA readeru. Na stejné

destičce byla vždy provedena kontrola kultury (VC) a kontrola média (VM), která sloužila ke stanovení viability buněk.

#### 4.8 Příprava směsných cereálních produktů

Pro srovnání byly nejprve připraveny extrakty ze smíšeného vzorku mouky a mikrobiální biomasy nebo mikrobiálního extraktu. Bylo připraveno 5 vzorků a 1 srovnávací pouze z vybrané mouky, poměr byl zachován jako při přípravě moučných extraktů. Konečné množství sypkého materiálu bylo 1 g, které bylo zalito 10 ml rozpouštědla. Směs pro extrakci byla připravena podle Tabulky 9.

Jako základ směsi byla zvolena quinoová mouka z důvodu vyváženého složení všech živin. Byl použit vodný extrakt z mikrořasy a ethanolový kvasinkový extrakt. Extrakty byly připraveny dle návodu v kapitole 4.6. Obsah řasového a kvasinkového extraktu tvořil vždy 5 % kapalné směsi. Mikrobiální biomasa tvořila 2 % suché hmotnosti vzorku. Poměry byly zvoleny na základě článků o přijatelném množství řasové biomasy, která byla limitujícím faktorem [92] [93]. Před samotnou aplikací byla kvasinková biomasa imortilizována, aby byly podpořeny vlastnosti kvasinkové biomasy [94]. Připravené vzorky byly promíchány na vortexu a byly umístěny na třepačku na 24 hodin, kde byla teplota udržována na 37 °C. Po uplynutí 24 hodiny byly vzorky zcentrifugovány při 4 000 rpm po dobu 10 minut. Takto získané extrakty byly analyzovány, kde byly stanoveny bílkoviny, fenolické sloučeniny a antioxidační aktivita.

Tabulka 9: Složení pro přípravu směsí bez tepelné úpravy

Vzorek	Quinoová mouka [g]	Řasová biomasa [g]	Kvasinková biomasa [g]	Řasový extrakt [ml]	Kvasinkový extrakt [ml]	Destilovaná voda [ml]
0	1,00	-	-	-	-	10,0
1	0,98	0,02	-	-	-	10,0
2	0,98	-	0,02	-	-	10,0
3	0,98	-	-	0,5	-	9,5
4	1,00	-	-	-	0,5	9,5
5	0,98	-	0,02	0,5	-	9,5

Jako produkt pro zvláštní výživu byl připraven vzorek instantní kaše. Do kádinek bylo nejprve navážena dané množství quinoové mouky, která byla zalita příslušným množstvím horké vody. Postupně byly přidávány ostatní suroviny dle Tabulky 10. Takto připravená směs byla vyložena do 50 ml centrifugačních zkumavek. Zkumavky byly vloženy do -80 °C a následně lyofilizovány. Z lyofilizovaných vzorků byly připraveny extrakty, které byly analyzovány. Do centrifugační zkumavky byl navážen 1 g lyofilizované směsi a přidáno 10 ml destilované vody. Směs byla řádně promíchána a vložena na třepačku, kde byla ponechána 24 hodin při 37 °C. Po 24 hodinách byly vzorky centrifugovány a byl získán supernatant, který byl podroben analýze. Byl stanoven obsah bílkovin, fenolických sloučenin a byla stanovena antioxidační aktivita dle návodů, jež jsou uvedeny v kapitole 4.7.

Tabulka 10: Složení pro přípravu lyofilizovaných kaší

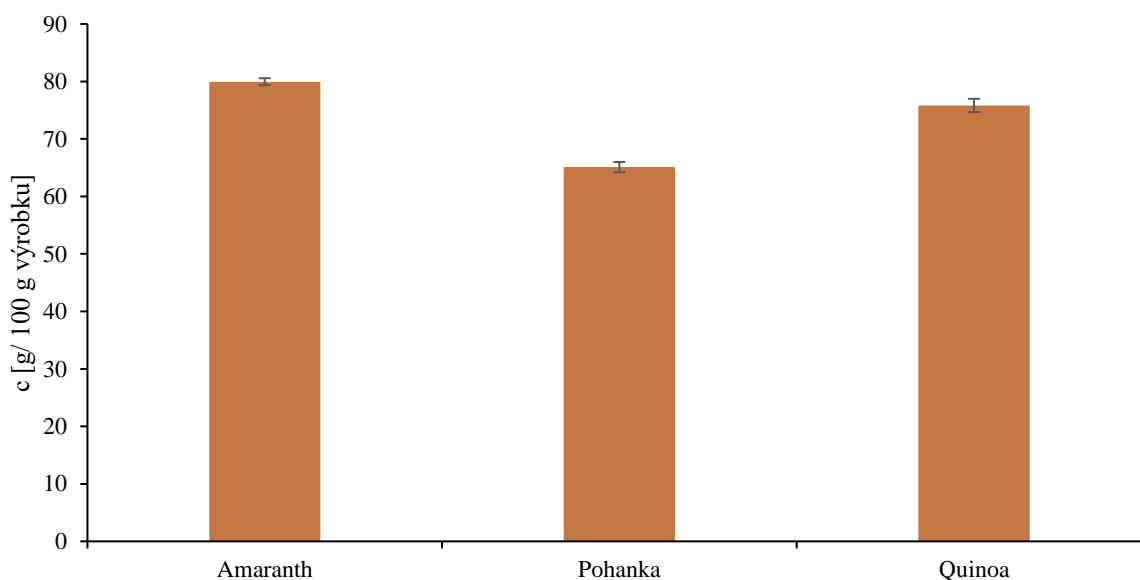
<b>Vzorek</b>	<b>Quinoová mouka</b> [g]	<b>Řasová biomasa</b> [g]	<b>Kvasinková biomasa</b> [g]	<b>Řasový extrakt</b> [ml]	<b>Kvasinkový extrakt</b> [ml]	<b>Destilovaná voda</b> [ml]
0	10,0	-	-	-	-	40
1	9,8	0,2	-	-	-	40
2	9,8	-	0,2	-	-	40
3	9,8	-	-	5	-	35
4	10,0	-	-	-	5	35
5	10,0	-	0,2	5	-	35

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Bakalářská práce byla zaměřena na vývoj obohacených bezlepkových cereálií pro zvláštní výživu. Byly charakterizovány vybrané pseudocereálie, vybraná kvasinka a mikrořasa. Z mikrobiální biomasy byly připraveny extrakty a produkty, které byly následně podrobeny analýze.

### 5.1 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise

Pro stanovení obsahu sacharidů byl použit postup dle Duboise (viz kapitola 4.7.2), kdy nejprve byly moučné vzorky hydrolyzovány, aby došlo ke štěpení sacharidů na jednotlivé monosacharidy. Obsah sacharidů ve vzorcích byl určen z kalibrační křivky, jejíž rovnice byla  $y = 9,5347 \cdot x$ , kde  $y$  je absorbance a  $x$  je koncentrace sacharidů ve vzorku. Výsledky jsou uvedeny v grafu (Obrázek 2) včetně odchylek jednotlivých měření.

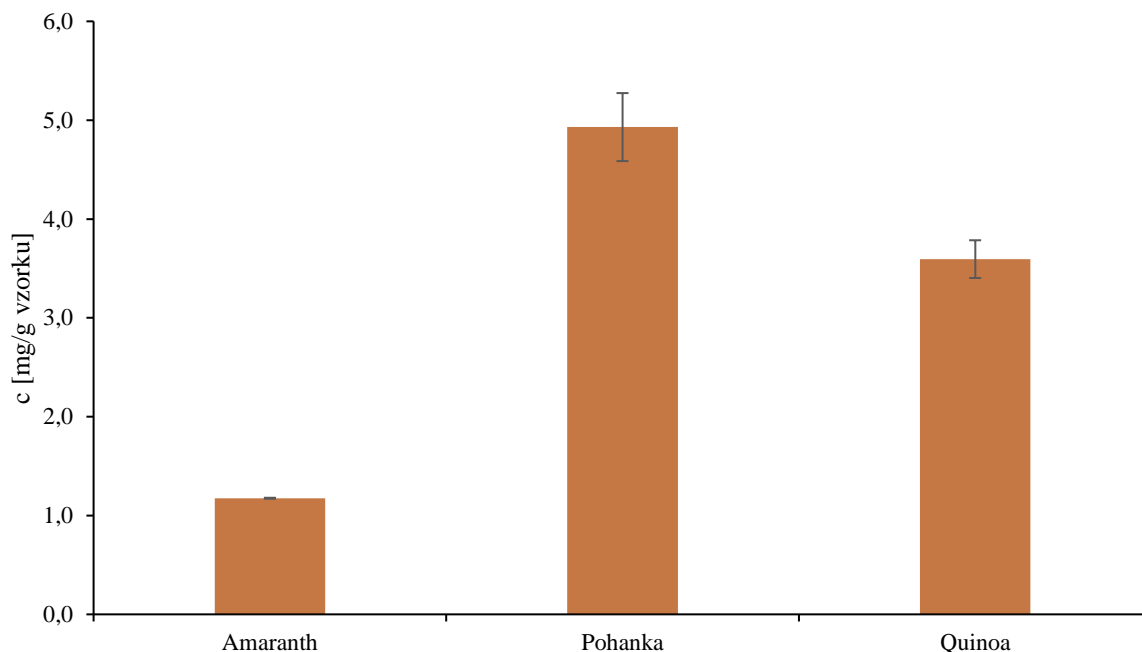


Obrázek 2: Obsah celkových sacharidů v jednotlivých vzorcích mouk

Metodou dle Duboise byl stanoven obsah sacharidů v pseudocereáliích v rozmezí od 65 do 80 %. Toto rozmezí je charakteristické pro pseudocereální zrna, která obsahují 60–80 % sacharidů jejich suché hmotnosti. Vyšší obsah sacharidů je pozorovatelný u amaranthu a quinoj, jejichž zrna oproti pohankovým obsahují obecně více jednoduchých sacharidů.

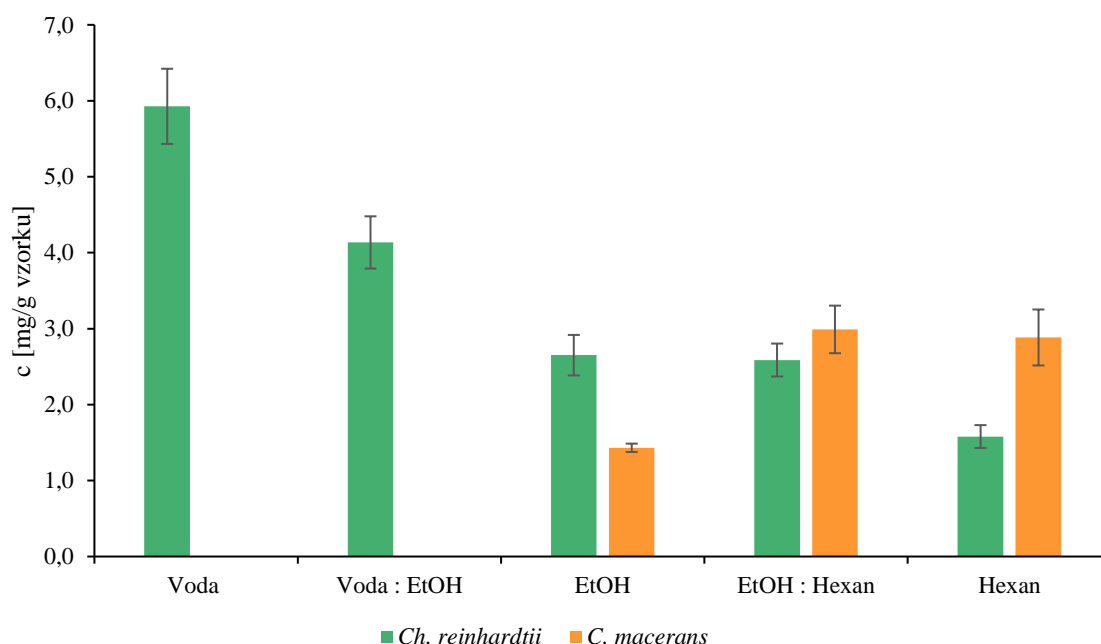
### 5.2 Stanovení celkových fenolických látek

Celkový obsah fenolických látek byl stanoven podle postupu v kapitole 4.7.3. Fenolické látky byly stanoveny v řasových a kvasinkových extraktech a ve směsných produktech dle kapitoly 4.6 a 4.8. Celkový obsah byl určen z lineární regrese kalibrační závislosti. Lineární regrese byla  $y = 3,1439 \cdot x$ , kde  $y$  je absorbance a  $x$  koncentrace fenolických látek ve vzorku. V grafu (Obrázek 3) jsou uvedeny výsledky pro vzorky mouk a v grafu (Obrázek 4) jsou zobrazeny výsledky pro jednotlivé extrakty vybraných mikroorganismů. Veškeré výsledky stanovení fenolických látek jsou uvedeny jako průměrné hodnoty ze tří měření včetně odchylek jednotlivých měření.



Obrázek 3: Obsah celkových fenolických látek ve vybraných moukách

Nejvyšší obsah celkových fenolických látek byl naměřen u pohanky ( $4,93 \pm 0,34$  mg/g vzorku), dále pak u quinoj ( $3,60 \pm 0,19$  mg/g vzorku). Nejmenší obsah fenolický látek byl u amaranthu ( $1,17 \pm 0,01$  mg/g vzorku). Naměřené hodnoty pro pohankovou a quinoovou mouku jsou srovnatelné s hodnotami uvedenými v článku [14]. Hodnota u amaranthové mouky se liší téměř o 50 %, rozdíl mohl být způsoben použitím jiného druhu amaranthu nebo amaranthu, jež byl pěstován při jiných klimatických podmínkách.



Obrázek 4: Obsah celkových fenolických látek v extraktech mikroorganismů

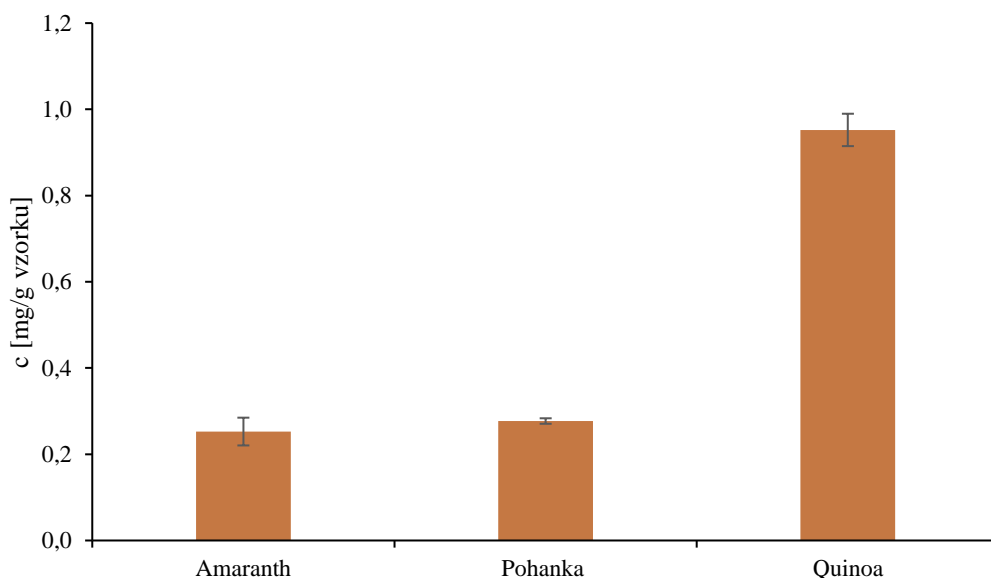
Mezi testovanými mikroorganismy lze pozorovat, že vybraná mikrořasa obsahuje vyšší obsah fenolických sloučenin oproti vybrané kvasince. Obecně řasy jsou bohaté na fenolické látky, kvasinky nikoliv. V případě řasových extrakcí do různých druhů extrakčních rozpouštědel bylo nejvíce



vyextrahováno fenolických látek do vody, následně do směsi voda a ethanol v poměru 1 : 1. Fenolické látky jsou polární molekuly, tudíž se dalo předpokládat, že dojde k vyextrahování fenolických látek do nejpolarnějšího rozpouštědla, mezi které právě patří voda a alkoholy. Obsah vyextrahovaných látek do ethanolu ( $2,65 \pm 0,27$  mg/g vzorku) a do směsi ethanol a hexan v poměru 1 : 1 ( $2,59 \pm 0,22$  mg/g vzorku) byl srovnatelný. To mohlo být způsobeno vypařením hexanu během celé přípravy extraktů, protože hexan je těkavá látka a odpařuje se i za běžných laboratorních podmínek. Nejméně získaných fenolických sloučenin bylo při použití hexanu, jenž je nepolární rozpouštědlo. Z grafu (Obrázek 4) je pozorovatelné, že se snižující polaritou se snižuje extrakce fenolických látek z mikrořasy. V případě kvasinky *C. macerans* bylo nejvíce získáno fenolických látek při použití směsi ethanol a hexan v poměru 1 : 1 ( $2,99 \pm 0,31$  mg/g vzorku).

### 5.3 Stanovení flavonoidů

Flavonoidy byly stanoveny ve vodných extraktech vybraných mouk dle postupu v kapitole 4.7.4. Obsah flavonoidů byl určen z kalibrační křivky, jejíž kalibrační rovnice byla  $y = 3,140 \cdot x$ , kde  $y$  je absorbance a  $x$  je koncentrace fenolických látek ve vzorku. V grafu (Obrázek 5) je vyneseno obsah flavonoidů ve vybraných moukách jako průměrná hodnota ze tří měření.



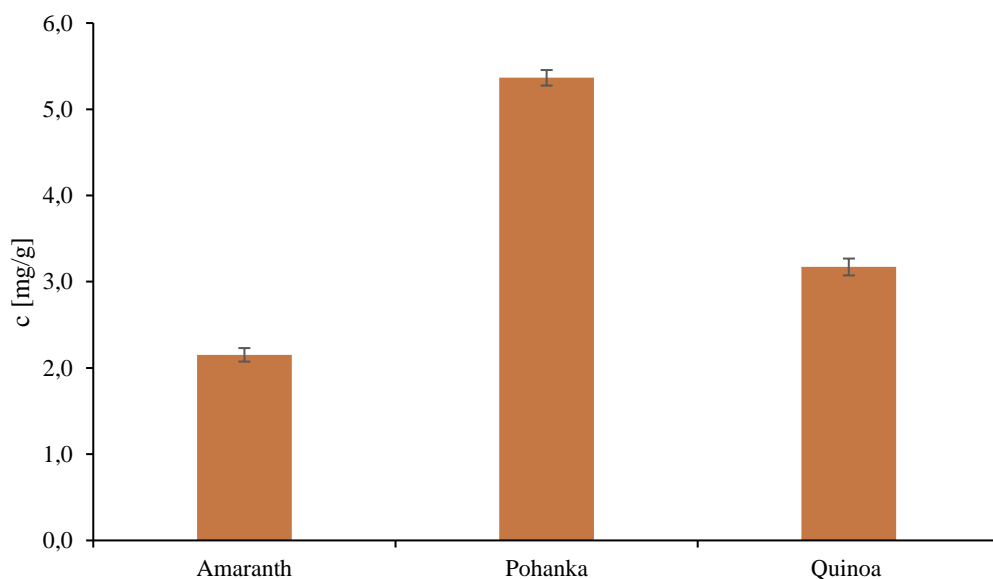
Obrázek 5: Obsah flavonoidů ve vzorcích mouk

Nejvyšší obsah flavonoidů byl u quinoové mouky ( $0,92 \pm 0,04$  mg/g vzorku). Obsah v pohankové ( $0,28 \pm 0,01$  mg/g vzorku) a amarantové ( $0,25 \pm 0,03$  mg/g vzorku) mouce byl velmi podobný. Na základě srovnání s grafem s celkovými fenolickými látky (Obrázek 3) vyplývá, že flavonoidy z celkového obsahu fenolických sloučenin tvoří v pohance cca 6 %, přičemž amarant obsahuje cca 21 % flavonoidů a quinoa 25 % flavonoidů z celkového množství fenolických sloučenin. Nižší zastoupení flavonoidů mohlo být způsobeno špatnou rozpustností některých flavonoidů ve vodě. Flavonoidy ve formě aglykonu (anthokyanidiny) jsou více rozpustnější v polárních rozpouštědlech, ale glykosidy (anthokyaniny), mezi které například patří rutin, jenž je flavonoidem pohanky, jsou více rozpustné v nepolárních rozpouštědlech [95].

### 5.4 Stanovení antioxidační aktivity

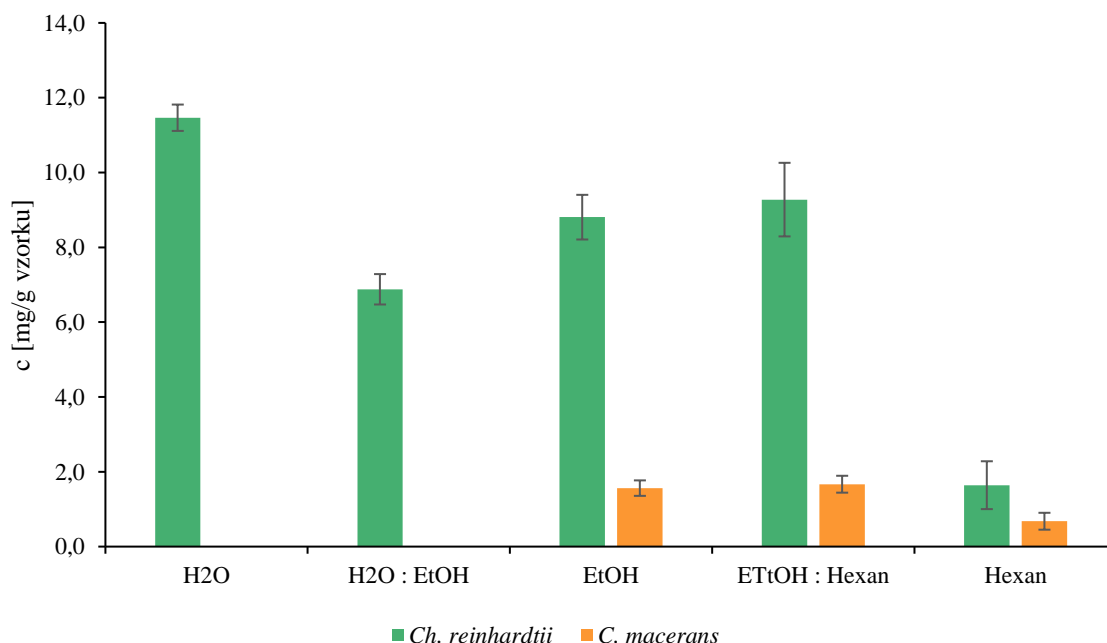
Celková antioxidační aktivita byla stanovena dle postupu v kapitole 4.7.5. u vodných extraktů z mouk a extraktů vybraných mikroorganismů. Antioxidační aktivita byla vyjádřena jako parametr TEAC, jež definuje antioxidační aktivitu vztahenou na ekvivalent Troloxu v mg/g vzorku. Přesné množství antioxidačních látek bylo zjištěno z rovnice kalibrační křivky. Kalibrační rovnice byla  $y = 1,2793 \cdot x$ , kde  $y$  je absorbance a  $x$  je koncentrace antioxidantů ve vzorku. V grafech (Obrázek 6) a (Obrázek 7)

jsou uvedené průměrné hodnoty celkové antioxidační aktivity ve vybraných vzorcích a extraktech včetně odchylek jednotlivých měření.



Obrázek 6: Obsah antioxidantů ve vzorcích pseudocereálií

Z grafu (Obrázek 6) vyplývá, že nejvyšší antioxidační aktivita byla u pohanky ( $5,37 \pm 0,09$  mg/g vzorku), dále pak u quinoy ( $3,17 \pm 0,10$  mg/g vzorku), nejmenší obsah antioxidantů byl u amaranthu ( $2,15 \pm 0,08$  mg/g vzorku). Pořadí antioxidační aktivity u vzorků je shodný s pořadím obsahu fenolických látek. S výjimkou quinoy množství antioxidantů je vždy vyšší než fenolických sloučenin. U quinoy bylo naměřeno o  $0,43$  mg/g méně antioxidantů, což mohlo být způsobeno manipulací při stanovení, protože metoda je citlivá na světlo, množství použité látky a reakční dobu.



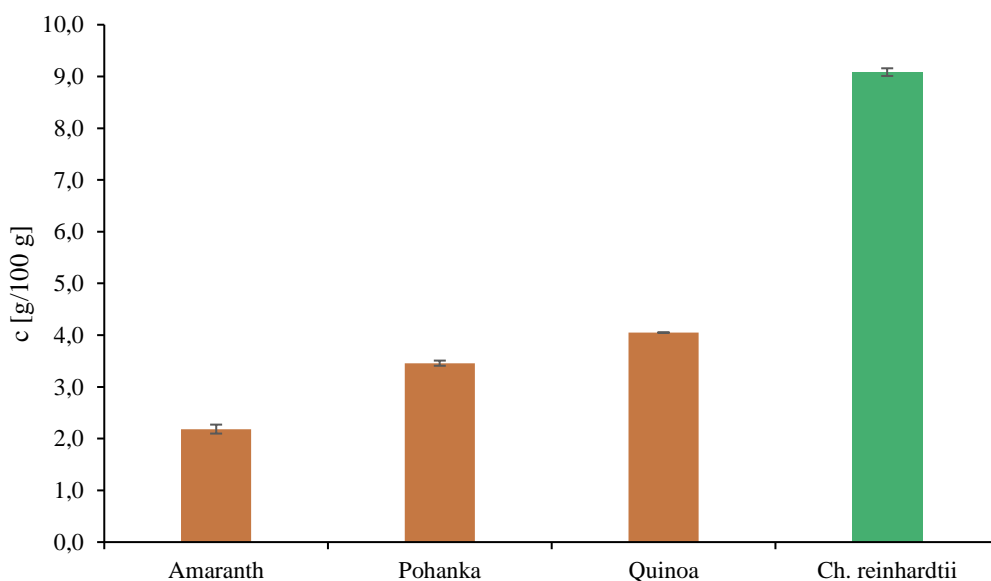
Obrázek 7: Obsah vyextrahovaných antioxidantů z mikrobiálních extraktů

Z grafu (Obrázek 7) vyplývá, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval vodný extrakt z mikrořasy ( $11,47 \pm 0,35$  mg/g vzorku), z důvodu stejného jako v případě fenolických látek (viz kapitola 5.2). Nejnížší koncentrace antioxidačních látek byla získána v případě hexanového extraktu. Podle získaných

dat, extrakty z mikrořas měly různou schopnost vychytávání radikálů. Směs ethanol a hexan (1 : 1) vykazovala vyšší antioxidační aktivitu než směs voda a ethanol a 96% ethanol. Antioxidační sloučeniny mikrořas mohou mít různou polaritu, tedy obsah vyextrahovaných antioxidantů může být rozdílný při použití různých druhů rozpouštědel. V případě kvasinkových extraktů byl obsah antioxidantů nízký ve srovnání s řasovými.

### 5.5 Stanovení rozpustných bílkovin dle Hartree-Lowryho

Byly stanoveny rozpustné bílkoviny ve všech vodných extraktech dle postupu 4.7.6. Koncentrace bílkovin byla zjištěna z kalibrační křivky, jejíž kalibrační rovnice byla  $y = 2,0513 \cdot x$ , kde  $y$  je absorbance a  $x$  je koncentrace bílkovin ve vzorku. V grafu (Obrázek 8) jsou vyneseny výsledky obsahu bílkovin pro vybrané mouky a mikrořasu *Chlamydomonas reinhardtii*. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ze tří měření včetně odchylek jednotlivých měření.



Obrázek 8: Obsah rozpustných bílkovin z vodných extraktů pseudocereálií a mikrořasy

Na grafu (Obrázek 8) lze pozorovat, že mikrořasa obsahuje výrazně větší množství rozpustných bílkovin. Z vybraných mouk nejvyšší obsah rozpustných bílkovin byl u quinoové mouky, následně u pohankové mouky a nejnižší obsah je pozorovatelný u amarantové mouky. Ve srovnání obsahu bílkovin uvedených na obale (viz Tabulka 1) je obsah bílkovin výrazně nižší. To je způsobeno tím, že Hartree-Lowryho metoda je určena pro stanovení bílkovin rozpustných ve vodě a těmi jsou především albuminy. V Tabulce 11 jsou uvedeny přepočítané hodnoty na rozpustný albumin, tím pádem získané hodnoty spadají do rozmezí rozpustných bílkovin.

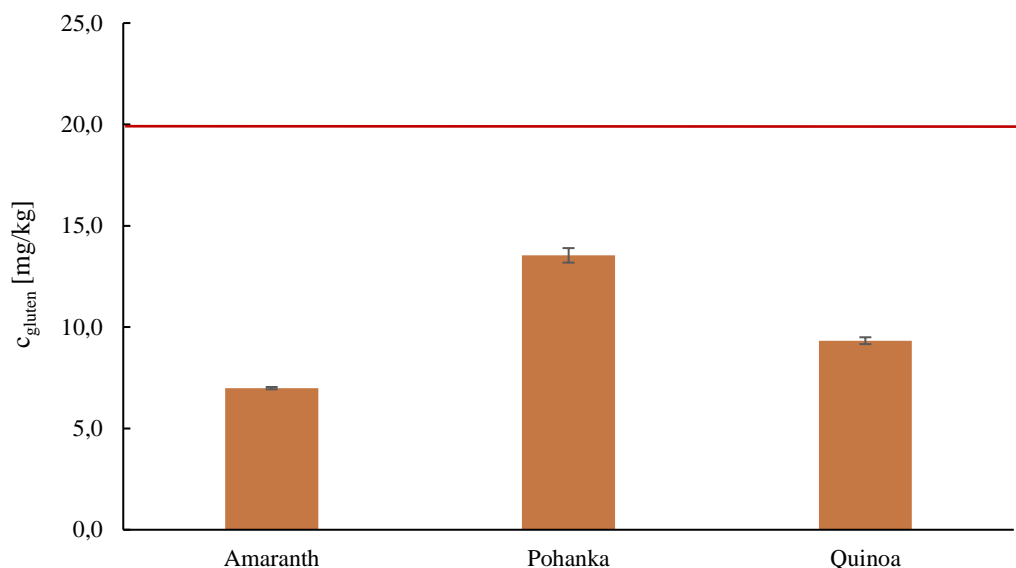
Tabulka 11: Obsah albuminu přepočtených na 100 g výrobku

Vzorek	Obsah albuminu z celkových bílkovin [%]	Obsah albuminu [g/100 g]
Amarantová mouka	18–44	2,13–5,20
Pohanková mouka	13–29	1,82–4,06
Quinoová mouka	11–52	1,74–8,22

### 5.6 Stanovení lepku

Stanovení obsahu lepku ve vzorcích pseudocereálií bylo provedeno dle postupu v kapitole 4.7.7. Obsah lepku byl stanoven pomocí kalibrační křivky, jejíž rovnice byla  $y = -0,0419x + 2,944$ , kde  $y$  je absorbance a  $x$  je koncentrace gliadinu. Následně byl obsah přepočten na obsah glutenu. Obsah lepku v jednotlivých

moukách je zobrazen na grafu (Obrázek 9), kde je rovněž znázorněna hranice 20 mg lepku na 1 kg výrobku. Pod hodnotu 20 mg/kg je výrobek označován jako bezpečný.

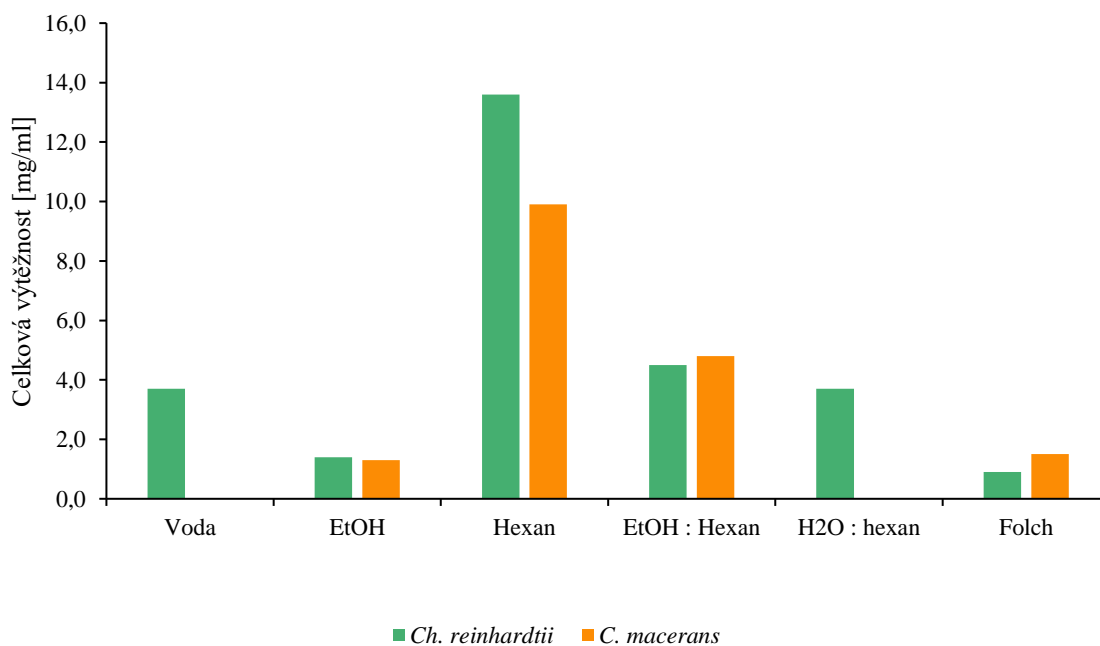


Obrázek 9: Obsah lepku ve vzorcích pseudocereálií

Nejvyšší obsah lepku byl zjištěn u pohankové mouky ( $13,54 \pm 0,36$  mg/kg), následně u quinoové mouky ( $9,33 \pm 0,17$  mg/kg). Nejnižší obsah byl stanoven u amarantové mouky ( $6,98 \pm 0,21$  mg/kg). Tímto bylo ověřeno, že pseudocereální mouky se vyskytují přirozeně bez lepku, žádná z vybraných cereálií neobsahovala více jak 20 mg/kg lepku.

### 5.7 Celková výtěžnost mikrobiální extrakce

Celková výtěžnost mikrobiální extrakce byla provedena dle postupu v kapitole 4.7.8 a byla vynesena do grafu (Obrázek 10).



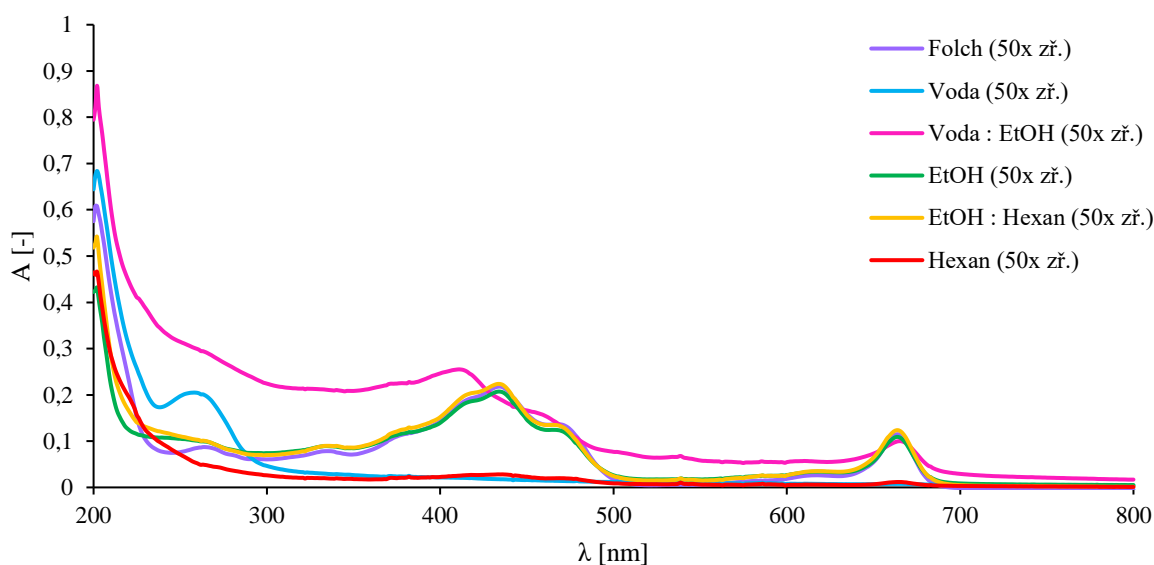
Obrázek 10: Celková výtěžnost mikrobiální extrakce

Z tohoto grafu (Obrázek 10) lze vyčíst, že nejvyšší výtěžnost byla získána za použití hexanu, ale tento výsledek přesahuje teoretickou hodnotu (10 mg/ml rozpouštědla). To bylo způsobeno tím, že během

extrahování na třepačce došlo k vypaření rozpouštědla. Došlo tak k zahuštění extraktu. Bylo vyextrahováno 13,6 mg/ml látek z řasové biomasy a 9,9 mg/ml látek z kvasinkové biomasy. Sice výtěžnost dosahovala vysokých hodnot, cílených látek (chlorofyly, karotenoidy) bylo vyextrahováno oproti ostatním rozpouštědlům menší množství. I přes to, že extrakce dle Folcha by měla být nejúčinnější, protože je cílena na lipofilní látky, v tomto případě to tak nebylo. Extrakcí dle Folcha došlo k vyextrahování 0,9 mg/ml látek z řasové biomasy a 1,5 mg/ml z kvasinkové biomasy. To mohlo být způsobené špatným rozrušením buněčné stěny, nedošlo tak k uvolnění cílených látek. Ani za použití ethanolu nebyla výtěžnost vysoká.

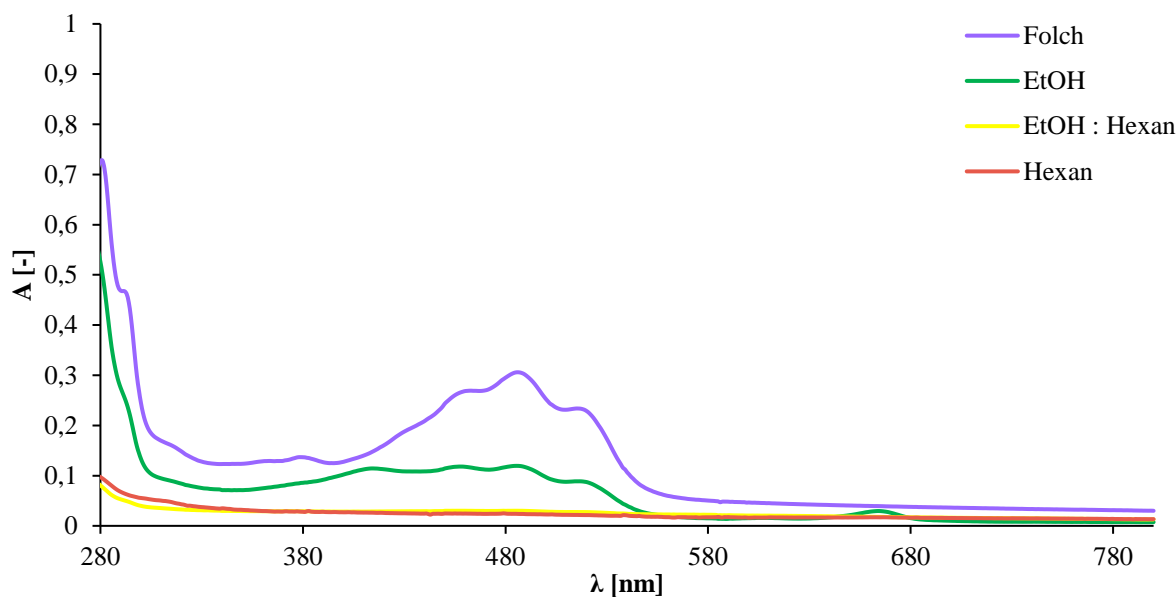
## 5.8 Měření absorpčních spekter extraktů na UV-VIS spektrofotometrii

Absorpční spektra extraktů byla změřena v intervale vlnových délek 200–800 nm. Řasové extrakty byly 50x naředěny.



Obrázek 11: Absorpční spektrum extraktů mikrořasy *Ch. reinhardtii*

V grafu (Obrázek 11) jsou pozorovatelné charakteristické píky pigmentů, jež se přirozeně vyskytují v řasách, jedná se například o stanovované chlorofyly (viz kapitola 5.9). Nejvyšší nárůst absorbance je pozorovatelný u směsi rozpouštědel voda a ethanol, kde ale píky nejsou tak dobře viditelné jako v případě použití ethanolu nebo směsi ethanol a hexan. Při použití těchto rozpouštědel došlo k nejúčinnější extrakci. Extrakcí dle Folcha bylo získáno spektrum podobné jako v případě ethanolu nebo směsi ethanol a hexan, s rozdílem, že při vlnové délce 280 nm je pozorovatelný malý pík. V případě vody byl pozorovatelný pík mezi 250–300 nm, ale ve sledovaných vlnových délkách (649, 664 a 470 nm) nebyly detekovány žádné odpovídající píky pigmentů. Použitím hexanu nebyly pozorovatelné žádné píky, z čehož plyne, že výtěžnost zkoumaných pigmentů bude minimální, i přes vysokou celkovou výtěžnost (viz kapitola 5.7). Tento fakt byl potvrzen v kapitole 5.9. Při použití hexanu došlo tedy primárně k vyextrahování nebarevných látek.

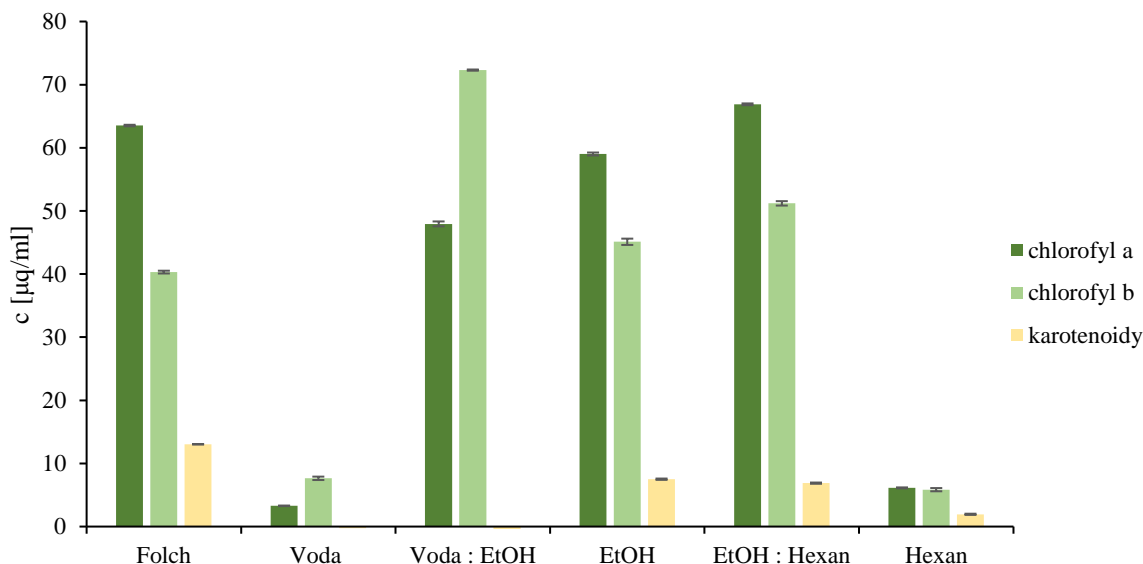


Obrázek 12: Absorpční spektrum extraktů kvasinky *C. macerans*

Absorpční spektrum bylo změřeno také i pro kvasinkové extrakty. Použitím extrakce dle Folcha došlo nejučinnější extrakci pigmentů, na grafu (Obrázek 12) lze pozorovat pík při vlnové délce 474 nm, jež je charakteristická pro karotenoidy. Patrné množství pigmentů bylo vyextrahováno při použití ethanolu, v případě hexanu není pozorovatelný žádný pík. Při použití směsi ethanol a hexan nebo samotného hexanu nebyl zaznamenán žádný pík pomocí UV-VIS spektrometru.

### 5.9 Stanovení celkových karotenoidů a chlorofylů v extraktech z mikrořas

Obsah celkových karotenoidů a chlorofylu v extraktech z mikrořas byl stanoven podle postupu v kapitole 4.7.10. Obsah chlorofylu a byl vypočten podle Rovnice (2), chlorofyl b podle Rovnice (3) a obsah karotenoidů dle Rovnice (4). Získané hodnoty pigmentů jsou vynesena v grafu (Obrázek 13).



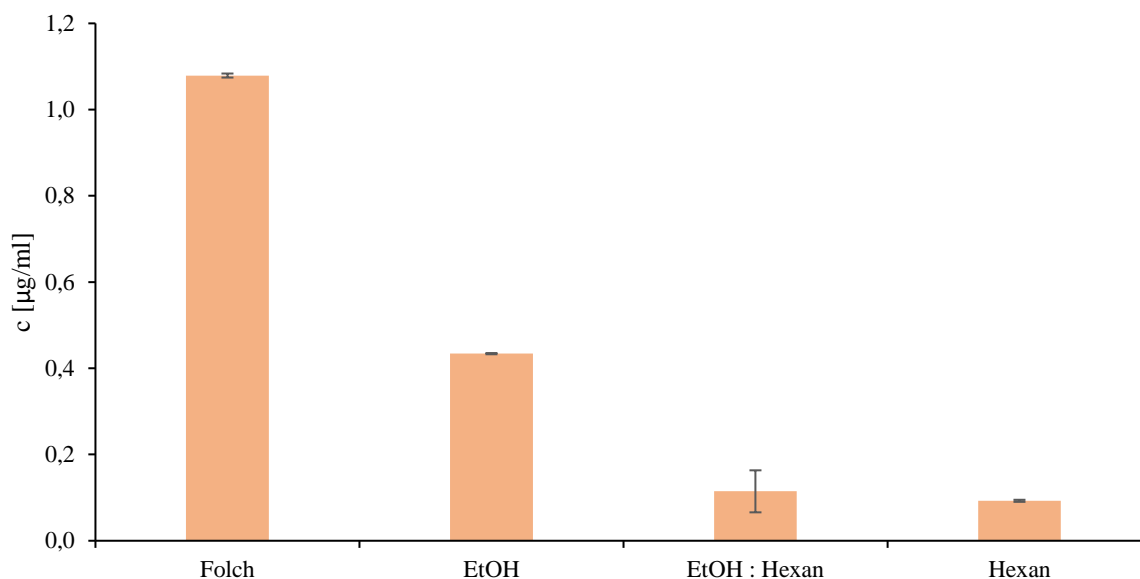
Obrázek 13: Obsah celkových karotenoidů a chlorofylů v extraktech z *Ch. reinhardtii*

Chlorofyly jsou rostlinná barviva rozpustná v tucích, patří mezi lipochromy a nejsou tedy rozpustná ve vodě, proto v případě vody byla extrakce neúspěšná. K účinné extrakci došlo při použití polárních rozpouštědel z důvodu polárního charakteru pigmentů. Ale voda jako extrakční činidlo nebylo účinné, jednalo se především o pigmenty nerozpustné ve vodě. Nejvyšší obsah chlorofylu a byl u směsi ethanol

a hexan ( $66,88 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$ ). Podobné hodnoty přinesla extrakce dle Folcha ( $63,52 \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$ ). Z toho vyplývá, že chlorofyl a je rozpustnější v rozpouštědle s nižší polaritou. Kombinací voda a ethanol bylo vyextrahováno nejvíce chlorofylu b ( $72,30 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ ). Extrakcí dle Folcha bylo získáno nejvyšší množství karotenoidů ( $13,03 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$ ). Při použití vody anebo směsi voda a ethanol nebyl zaznamenán žádný obsah karotenoidů z důvodu hydrofobního charakteru karotenoidů a nižší polarity oproti chlorofylům.

### 5.10 Stanovení celkových karotenoidů v extraktech z karotenogenních kvasinek

Obsah karotenoidů byl stanoven z naměřených absorpčních spekter, ze kterých byla vzata hodnota absorbance při vlnové délce 474 nm a vložena do Rovnice (5). Získané hodnoty byly vyneseny do grafu (Obrázek 14).

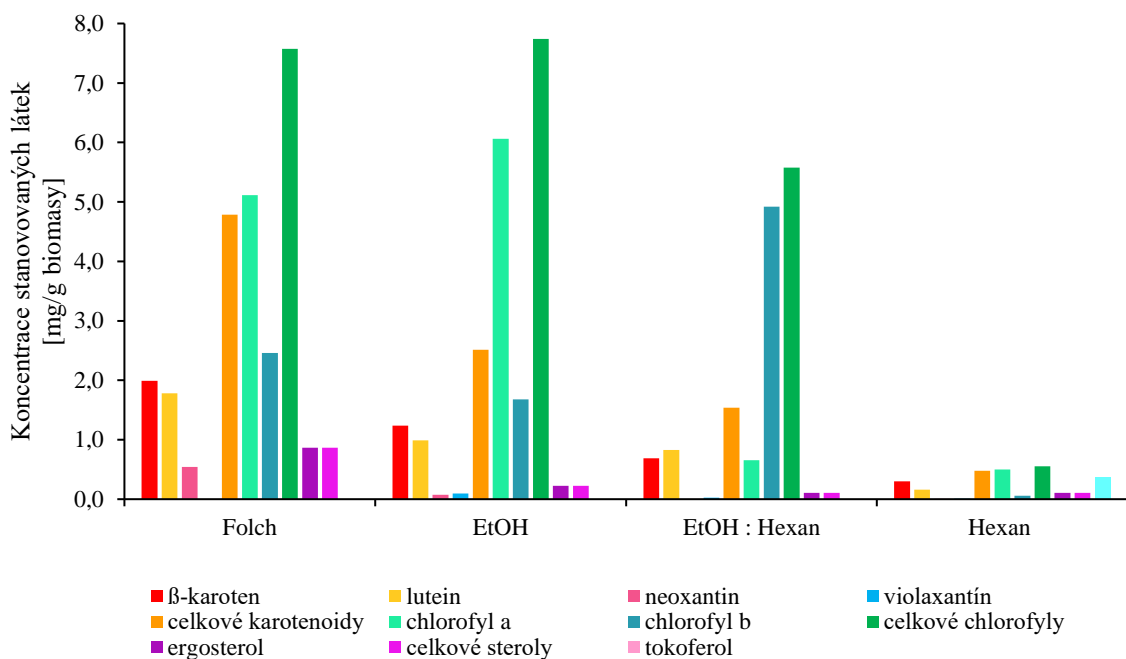


Obrázek 14: Celkový obsah karotenoidů v extraktech z *C. macerans*

Při stanovení karotenoidů z *C. macerans* byla efektivní extrakce dle Folcha, pomocí které bylo získáno ( $1,079 \pm 0,005$ ) µg/ml karotenoidů. Z grafu je zřejmá závislost rozpustnosti karotenoidů na typu rozpouštědla. Extrakce dle Folcha je cílena na lipofilní látky, mezi které patří karotenoidy.

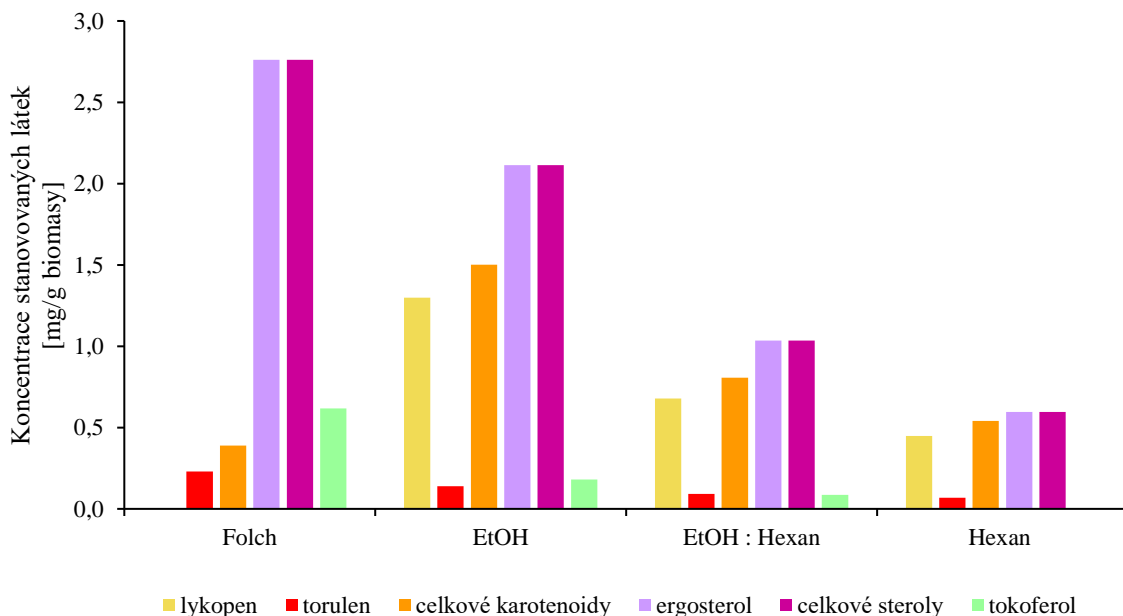
### 5.11 Stanovení lipofilních látek

Lipofilní látky byly stanoveny dle postupu v kapitole 4.7.14. Metodou HPLC byly stanoveny chlorofyly, karotenoidy, steroly a tokoferol. V grafu (Obrázek 15) a (Obrázek 16) jsou vyneseny všechny detekované lipofilní látky v řasových a kvasinkových extraktech jako průměrné hodnoty ze dvou paralelních stanovení.



Obrázek 15: Obsah lipofilních látek v Ch. reinhardtii

Podle předpokladu bylo nejvíce lipofilních látek získáno extrakcí dle Folcha. Při této extrakci bylo získáno 4,78 mg/g celkových karotenoidů, 7,57 mg/g celkových chlorofylů a 0,86 mg/g sterolů. Došlo k vyextrahování β-karotenu v koncentraci 1,99 mg/g. Z pohledu zisku chlorofylu byla zdařilá extrakce s použitím 96% ethanolu, bylo získáno 7,74 mg/g celkových chlorofylů. Značné množství chlorofylu b přešlo do směsi ethanol a hexan (4,92 mg/g biomasy) ve srovnání s ostatními extrakcemi. Při použití hexanu bylo získáno zanedbatelné množství lipofilních látek, jejich celkový obsah byl do 1 mg/g biomasy, přičemž 0,37 mg/g tvořil tokoferol (vitamin E).



Obrázek 16: Obsah lipofilních metabolitů v extraktech C. macerans

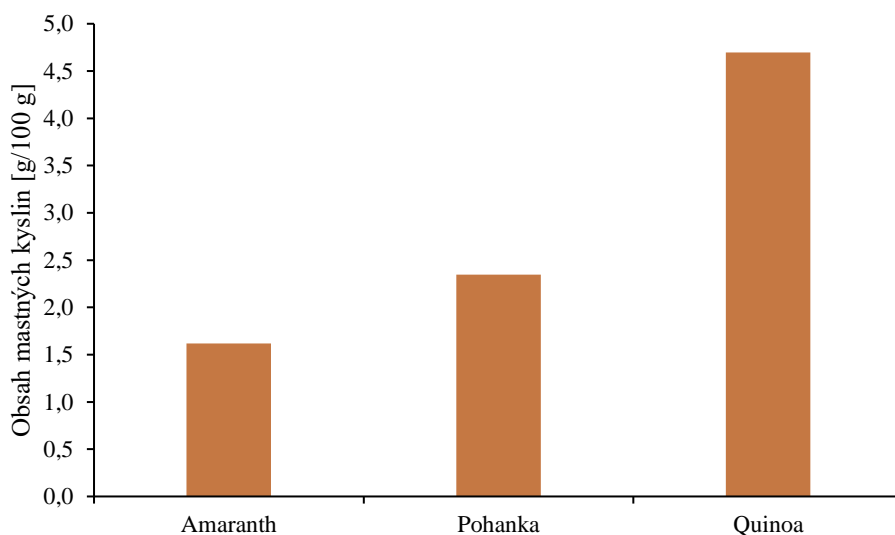
Z karotenogenní kvasinky bylo pomocí metody HPLC získáno množství karotenoidů, sterolů a tokoferolu. Nejvyšší obsah těchto látek byl získán extrakcí dle Folcha. Bylo získáno 2,76 mg/g sterolů



a 0,62 mg/g tokoferolu (vitamin E). Při použití ethanolu byl vyextrahován červený pigment lykopen (1,30 mg/g biomasy), čímž došlo ke zvýšení obsahu karotenů oproti extrakci dle Folcha.

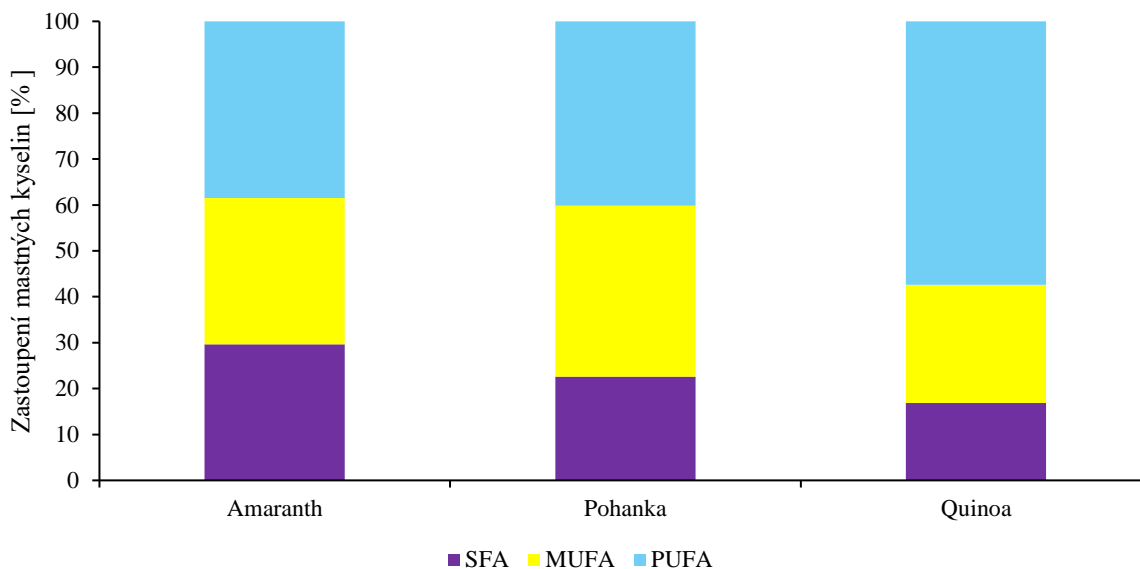
### 5.12 Stanovení mastných kyselin

Pomocí plynové chromatografie byly stanoveny mastné kyseliny a celkové lipidy ve vybraných moukách, v řasové a kvasinkové biomase a v extraktech připravených podle postupu v kapitole 4.6. V grafech níže je vždy uveden graf s celkovým obsahem mastných kyselin, graf s procentuálním zastoupením jednotlivých skupin mastných kyselin, jako jsou nasycené mastné kyseliny (SFA), mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) a graf se zastoupením vybraných mastných kyselin, mezi které patří kyselina palmitová, stearová, olejová, linolová,  $\alpha$ -linolenová a arachidová. Kyselina palmitová a stearová jsou nasycené mastné kyseliny, kyselina olejová je zástupcem mononenasycených mastných kyselin a kyselina linolová s kyselinou  $\alpha$ -linolenovou patří mezi polynenasycené mastné kyseliny. V grafu (Obrázek 17) je zobrazen celkový obsah mastných kyselin ve vybraných pseudocereáliích. Všechny parametry jsou uvedeny jako průměrné hodnoty ze dvou paralelních měření.



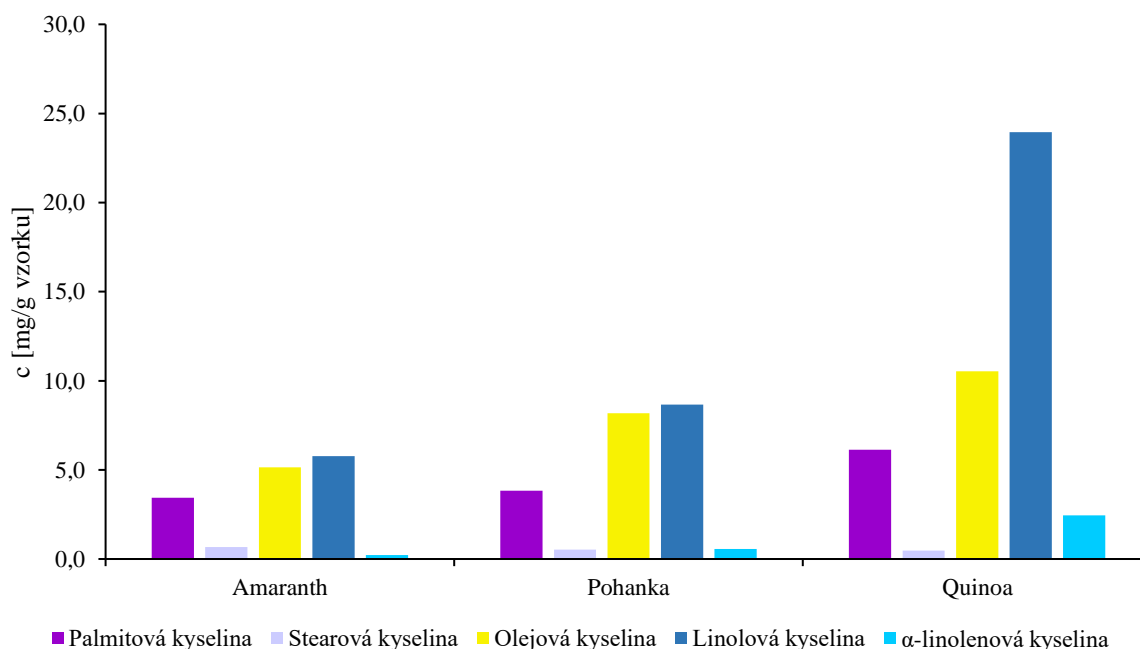
Obrázek 17: Obsah mastných kyselin ve vybraných moukách

Nejvyšší obsah mastných kyselin byl detekován u quinoj (4,70 g/100 g výrobku), dále pak u pohanky (2,35 g/100 g výrobku) a nejméně u amaranthu (1,62 g/100 g výrobku). Obsah mastných kyselin je téměř shodný s obsahem lipidů uvedeným na obale (viz Tabulka 1). Odchylka od hodnoty na obale je dána, tím že mastné kyseliny jsou součástí lipidů, ale existují i volné mastné kyseliny.



Obrázek 18: Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vybraných moukách

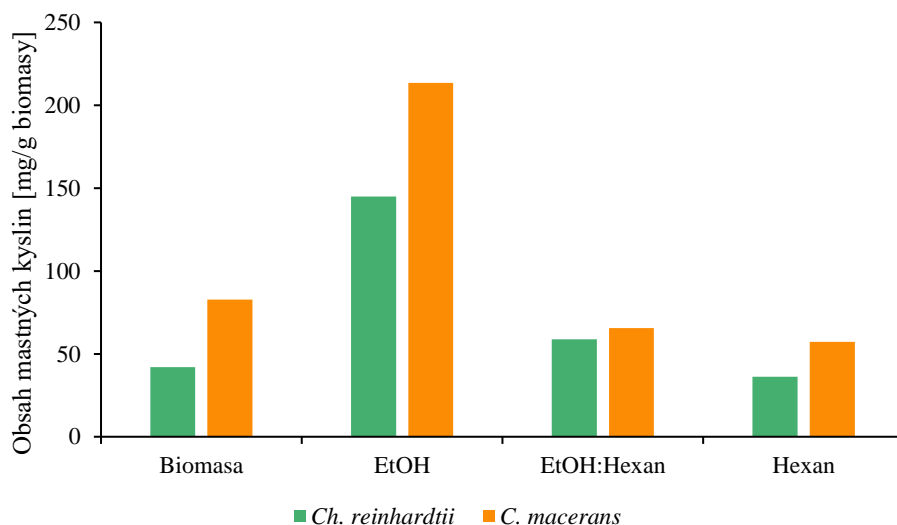
Z grafu (Obrázek 18) je viditelné, že obsah mastných kyselin v amaranthu je téměř vyvážený (29,67 % SFA, 31,81 % MUFA a 38,52 % PUFA). V pohankové mouce byl nižší obsah nasycených mastných kyselin (22,61 %), obsah MUFA (37,24 %) byl téměř shodný s obsahem PUFA (40,15 %). V quinoové mouce byla převaha PUFA (57,36 %), pak MUFA (25,76 %) a nejméně SFA (16,88 %).



Obrázek 19: Obsah vybraných mastných kyselin ve vzorcích pseudocereálii

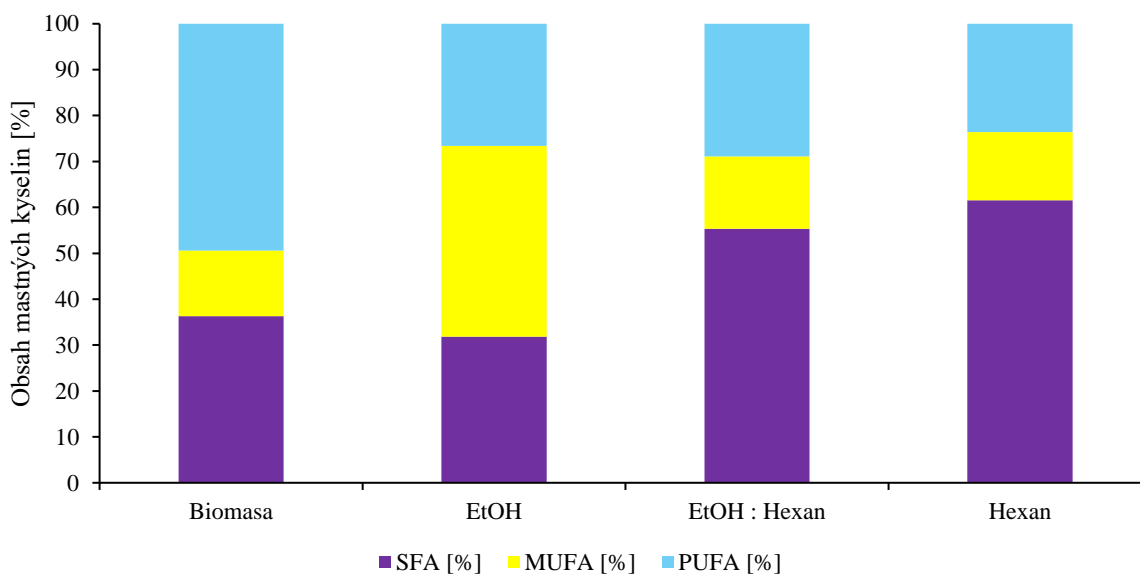
Z grafu (Obrázek 19) je patrné, že nejvyšší obsah vybraných mastných kyselin obsahuje quinoová mouka, kde převažuje kyselina linolová (23,94 mg/g vzorku). Právě tato kyselina je důležitá ve výživě člověka, je silným antioxidantem s antirakovinovou aktivitou [96]. V nižším množství je zastoupena kyselina olejová (10,54 mg/g vzorku) a kyselina palmitová (6,13 mg/g vzorku). Obsah kyseliny linolové (8,67 mg/g vzorku) a olejové (8,17mg/g vzorku) je v pohance vyrovnaný. Z grafu je pozorovatelné, že kyselina palmitová je převažující kyselinou mezi SFA. Obsah palmitové kyseliny v pohance (3,83 mg/g vzorku) byl srovnatelný s obsahem v amaranthové mouce (3,44 mg/g vzorku). Obsah kyseliny stearové

byl ve vybraných pseudocereáliích nízký. Amaranth obsahoval 0,68 mg/g, pohanka 0,52 mg/g a quinoa 0,47 mg/g kyseliny stearové. Obsah kyseliny  $\alpha$ -linolenové byl velmi nízký, vyšší obsah byl u quinoové mouky (2,44 mg/g vzorku).



Obrázek 20: Obsah vyextrahovaných mastných kyselin z mikrobiální biomasy

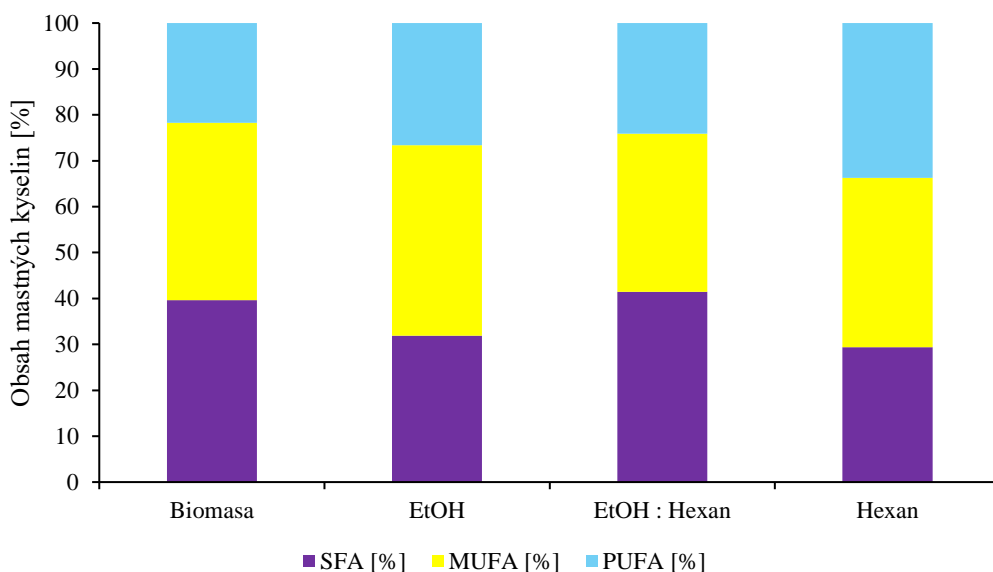
Nejúčinnější extrakce mastných kyselin byla za použití 96% ethanolu. Došlo tak převážně k rozpuštění polárních lipidů, mezi které patří fosfolipidy a glykolipidy, jež jsou hlavními strukturálními lipidy buněčných stěn [97]. Tímto rozpouštědlem bylo získáno 144,88 mg/g mastných kyselin z mikrořasy a 213,51 mg/g mastných kyselin z kvasinky. Nejnížší obsah mastných kyselin byl získán za použití hexanu, pomocí kterého bylo získáno 36,12 mg/g mastných kyselin z mikrořasy a 57,21 mg/g mastných kyselin z kvasinky. Ze samotné řasové biomasy, která nebyla nijak upravena před samotnou analýzou, bylo získáno 42,00 mg mastných kyselin a z kvasinkové 82,67 mg mastných kyselin na 1 g biomasy.



Obrázek 21: Procentuální zastoupení mastných kyselin v *Ch. reinhardtii*

Z grafu (Obrázek 21) vyplývá, že samotná biomasa obsahuje převážně PUFA (49,42 %), dále pak je tvořena 36,29 % SFA a pouze 14,29 % MUFA. Pomocí ethanolu došlo k vyextrahování převážně MUFA (41,52 %). V případě použití méně polárních extrakčních směsí byly získány převážně nasycené

masné kyseliny, vysoký obsah těchto kyselin ve stravě má negativní účinky na zdraví. Bylo zjištěno, že nadměrná konzumace nasycených mastných kyselin je jednou z příčin vzniku rakoviny prostaty [98].

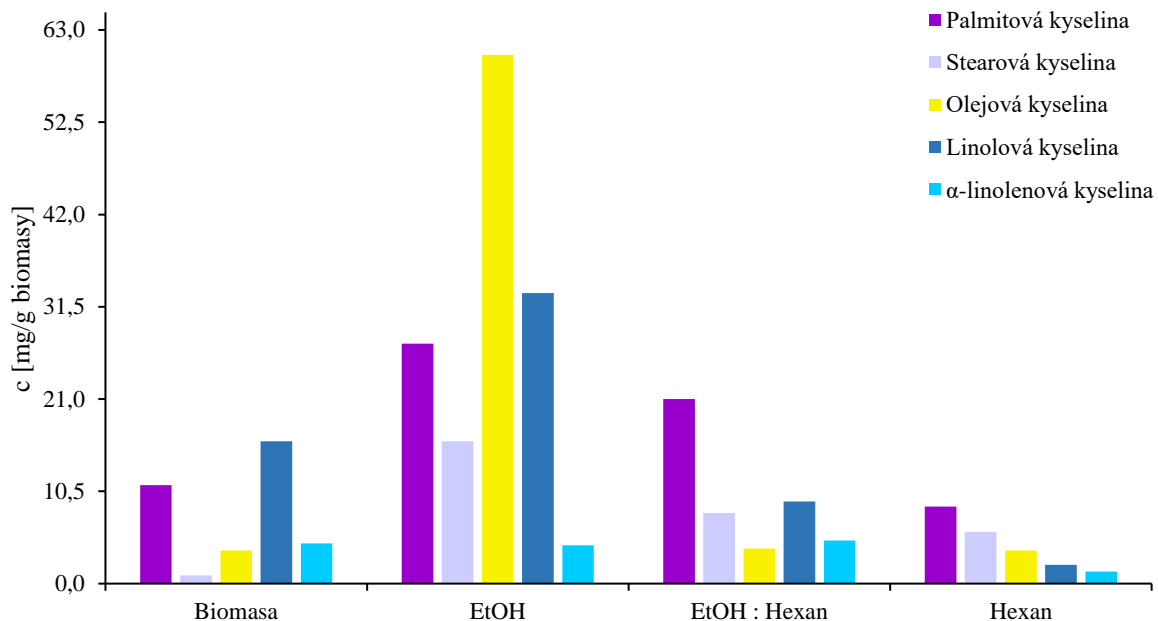


Obrázek 22: Procentuální zastoupení mastných kyselin v *C. macerans*

Co se týče zastoupení mastných kyselin ve vybrané neupravené kvasinkové biomase (39,61 % SFA, 38,65 % MUFA, 21,74 % PUFA) je téměř identické se zastoupením mastných kyselin při použití směsi ethanol a hexan (41,46 % SFA, 34,47 % MUFA, 24,07 % PUFA). Při použití 96% ethanolu bylo získáno nejvíce MUFA (41,52 %).

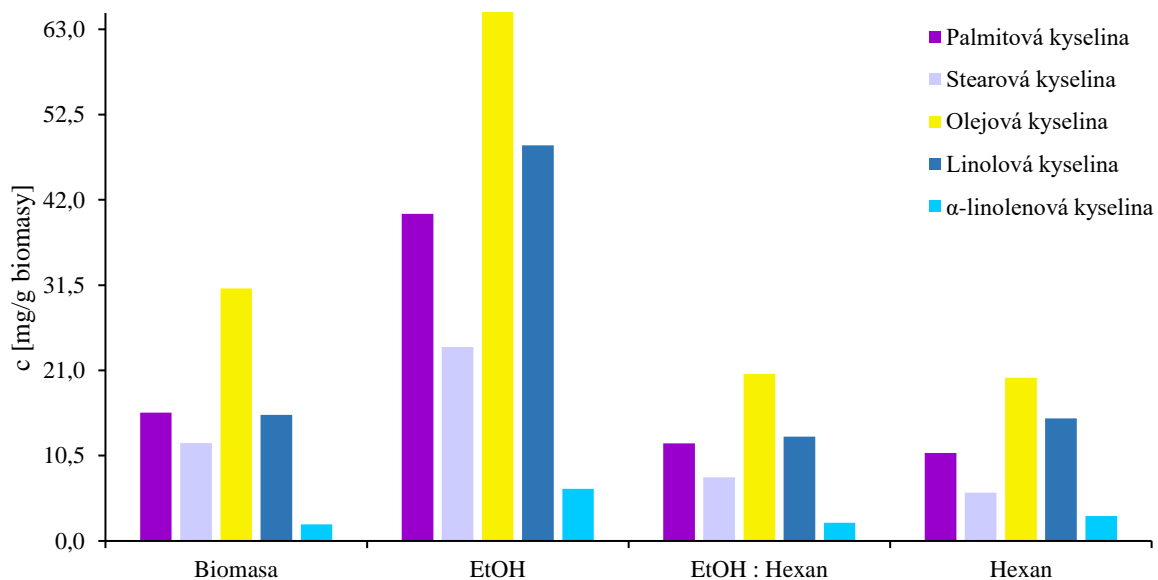
Z grafů (Obrázek 21) a (Obrázek 22) je tedy zřejmé, že množství a složení mastných kyselin je závislé na polaritě rozpouštědla. Díky použití vhodného rozpouštědla lze získat prospěšné mastné kyseliny.

V grafech (Obrázek 23) a (Obrázek 24) jsou vyneseny koncentrace vybraných mastných kyselin detekovaných v mikrobiální biomase jako průměrné hodnoty ze dvou paralelních stanovení.



Obrázek 23: Vybrané mastné kyseliny v *Ch. reinhardtii*

Z grafu (Obrázek 23) je zřejmé, že jako účinné rozpouštědlo působil ethanol, díky kterému došlo k vyextrahování 60,16 mg/g kyseliny olejové. Poměrně velké množství bylo získáno u kyseliny linolové (33,06 mg/g biomasy) a kyseliny palmitové (27,32 mg/g biomasy). Z grafu je také pozorovatelné, že s klesající polaritou klesá množství mastných kyselin, k markantnímu poklesu došlo především u kyseliny olejové. Tato kyselina patří mezi MUFA.



Obrázek 24: Vybrané mastné kyseliny v *C. macerans*

Z grafu je očividné, že kyselina olejová je dominantní mastnou kyselinou v kvasinkové biomase obecně. Nejúčinnějším extrakčním činidlem byl opět ethanol, došlo k vyextrahování 88,66 mg/g kyseliny olejové, 48,73 mg/g kyseliny linolové a 40,26 mg/g kyseliny palmitové.

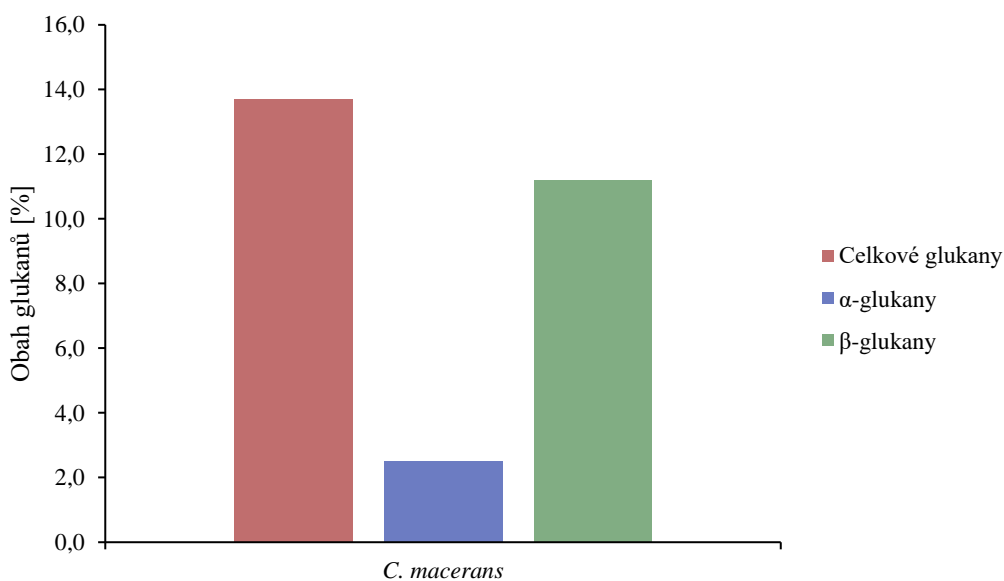
### 5.13 Stanovení $\beta$ -glukanů

$\beta$ -glukany byly stanoveny dle postupu v kapitolách 4.7.12 a 4.7.13. Součástí kitu byl připravený Excel Megazyme Mega-Calc™. Pomocí tohoto kitu byl stanoven obsah  $\beta$ -glukanů v jednotlivých vzorcích. Obsah  $\beta$ -glukanů je uveden v Tabulce 12 jako průměrná hodnota ze dvou paralelních stanovení.

Tabulka 12: Stanovený obsah  $\beta$ -glukanů ve vzorcích

Vzorek	Obsah $\beta$ -glukanů ve vzorku [g/100 g výrobku]
Amaranth	0,0574
Pohanka	0,0466
Quinoa	0,0357
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,0574
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	0,1119

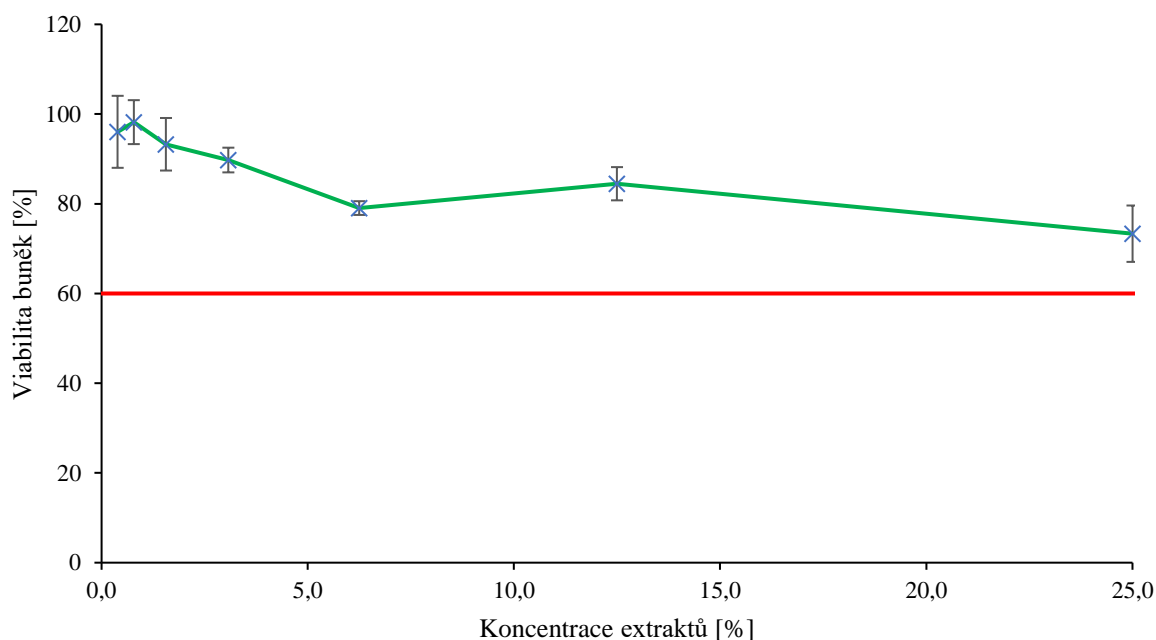
Byly zjištěny nízké hladiny  $\beta$ -glukanů v pseudocereáliích. Nejvyšší obsah  $\beta$ -glukanů byl stanoven u kvasinky *C. macerans* (0,1119 g/100 g výrobku). Buněčná stěna kvasinek zaujímá 15–25 % z celkové hmotnosti suché biomasy, kterou tvoří především glukany a mannany. Tento fakt byl potvrzen, protože množství glukanů v kvasinkové biomase bylo 13,71 % s převládajícím zastoupením  $\beta$ -glukanů, což je patrné z grafu (Obrázek 25).



Obrázek 25: Zastoupení glukanů v *C. macerans*

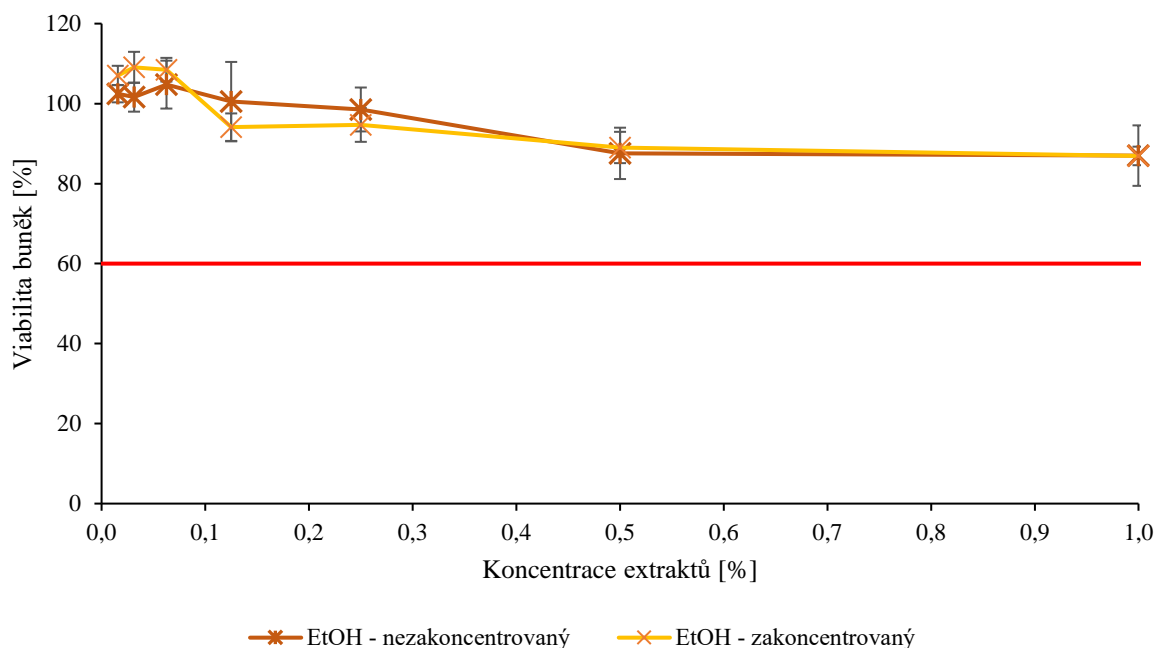
### 5.14 Testování cytotoxicity

Testování cytotoxicity bylo provedeno dle postupu v kapitole 4.7.16. Cytotoxicita byla testována na vodném řasovém extraktu a ethanolovém kvasinkovém extraktu nezakoncentrovaném a zakoncentrovaném znovu ethanolom. Pro testování byly použity střevní buňky CaCo-2. Výsledky testování pro vodný extrakt jsou uvedeny v grafu (Obrázek 26) jako hodnoty závislosti viability buněk na koncentraci vodného extraktu. Každá hodnota viability byla získána vyhodnocením triplicátů a je uvedena jako průměr ze tří měření.



Obrázek 26: Závislost viability buněk CaCo-2 na koncentraci extraktů *Ch. reinhardtii*

V grafu (Obrázek 26) je zobrazena hranice cytotoxicity (60 %), pod kterou by neměla klesnout viabilita buněk. Z grafů vyplývá, že žádná z koncentrací řasového extraktu nepůsobila toxicky na buňky CaCo-2. Nejvyšší pokles viability byl zaznamenaný při nejvyšší zvolené koncentraci řasového extraktu (25%).



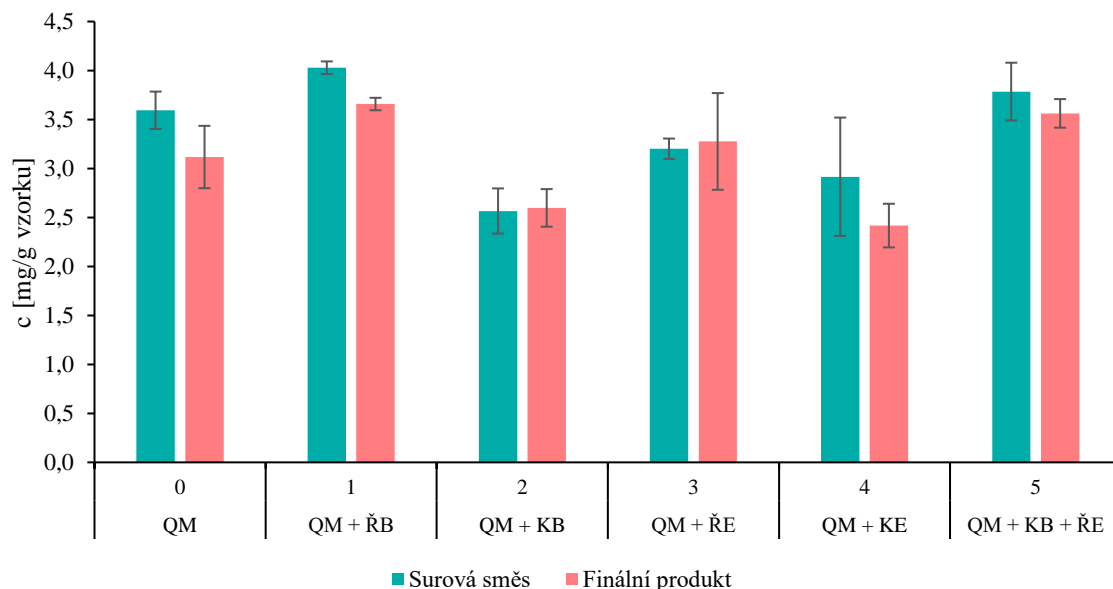
Obrázek 27: Závislost viability buněk na koncentraci extraktů z *C. macerans*

Na grafu (Obrázek 27) je vyneseno výsledky z testování cytotoxicity pro kvasinkový extrakt a hranice cytotoxicity (60 %). Nad touto hranicí buňky nejsou považované za cytotoxické pro lidský organismus. Při nízkých koncentracích došlo v obou případech k nárůstu viability, u zakcentrovaného extraktu byl nárůst viability ztelnější. Z toho lze usuzovat, že koncentrace 0,0156%, 0,0313% a 0,0625% extraktu má na buňky CaCo-2 pozitivní účinky. Pravděpodobně nízký obsah kvasinkového extraktu podporoval metabolismus buněk.

Při koncentraci 0,125% extraktu došlo k mírnému poklesu viability buněk v obou případech, pokles byl výraznější opět u zakonzentrovaného extraktu. Z grafu je pozorovatelné, že se zvyšující koncentrací extraktu klesá viabilita buněk. Avšak 1% koncentrace jakéhokoli extraktu působila na buňky stejnou mírou.

### 5.15 Směsné cereální produkty

Směsné cereální produkty byly připraveny dle návodu v kapitole 4.8. Byl stanoven obsah fenolických látek v jednotlivých vzorcích dle postupu v kapitole 4.7.3. Dále bylo stanoveno množství antioxidantů dle postupu v kapitole 4.7.5 a obsah rozpustných bílkovin dle postupu v kapitole 4.7.6. Všechny vzorky byly analyzované třikrát, byla vypočtena průměrná hodnota a stanovena směrodatná odchylka.



Obrázek 28: Obsah fenolických sloučenin ve směsných produktech

Tabulka 13: Legenda zkratk ke grafům (Obrázek 28, Obrázek 29, Obrázek 30, Obrázek 31)

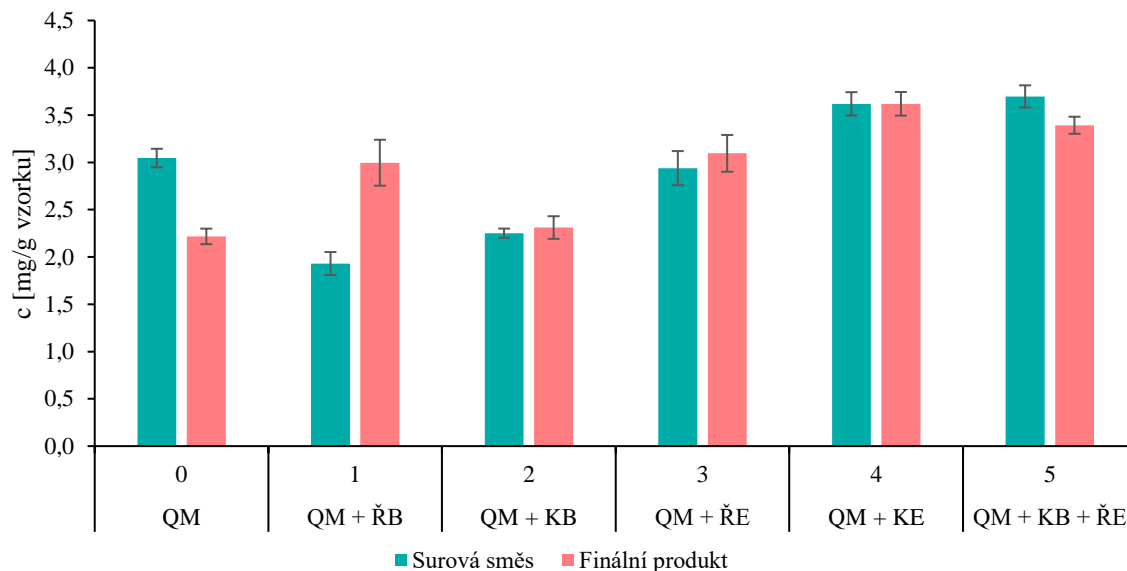
Č. vzorku	Zkratka	Složení
0	QM	Quinoová mouka
1	QM + ŘB	Quinoová mouka a řasová biomasa
2	QM + KB	Quinoová mouka a kvasinková biomasa
3	QM + ŘE	Quinoová mouka a řasový extrakt
4	QM + KE	Quinoová mouka a kvasinkový extrakt
5	QM + KB + ŘE	Quinoová mouka, kvasinková biomasa a řasový extrakt

Z připravených produktů byl celkově vyšší obsah fenolických látek u surových směsí bez tepelné úpravy. V kaších, jež byly zalaty horkou vodou a lyofilizovány, byl obsah nižší. Snížení bylo nejspíše způsobeno horkou vodou, protože některé fenolické kyseliny jsou náchylné k teplu, zvýšená teplota může způsobit jejich degradaci. Mezi termolabilní fenolické kyseliny patří například kyselina *p*-kumarová, u které působením vyšších teplot dochází k rozkladu glykosidických vazeb [99].

Nejvyšší obsah fenolických látek byl ve vzorku č. 1, kde řasová biomasa tvořila 2 % z celkového obsahu quinoové mouky. Podobné množství fenolických látek bylo i ve vzorku směsi č. 5. I přesto, že vlivem teploty došlo k mírnému poklesu obsahu fenolických látek v cereální kaši, došlo k nárůstu

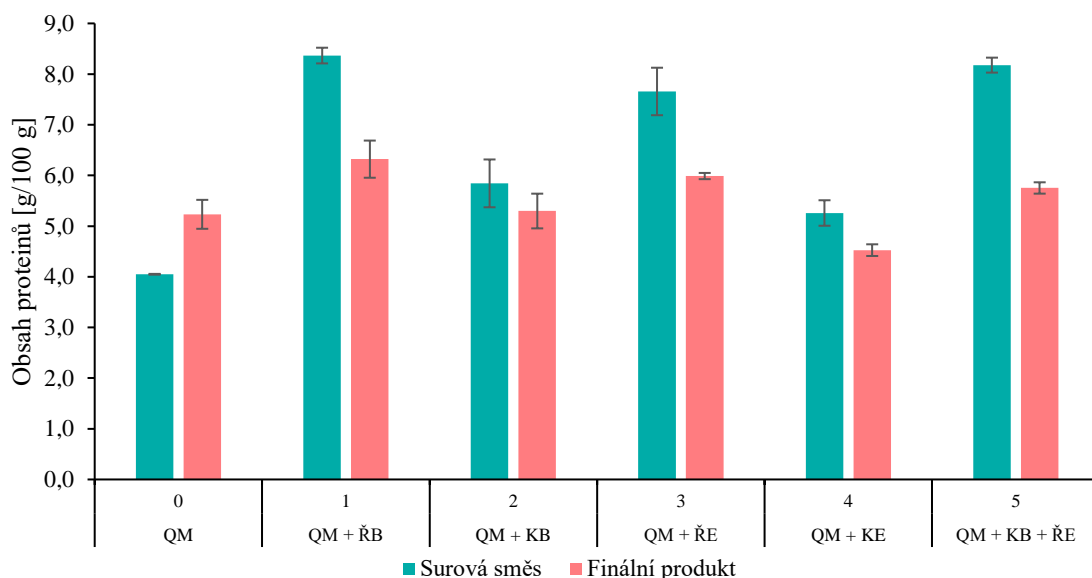


obsahu fenolických látek ve srovnání se samotnou quinoovou moukou (vzorek č. 0). Snížený obsah fenolických látek byl u vzorku č. 2, kde nahrazením kvasinkovou biomasou došlo k poklesu fenolických látek. Obsah v surové směsi a finálním produktu se téměř nelišil. Nižší obsah fenolických látek je také pozorovatelný v případě, kdy kvasinkový extrakt tvořil 5 % vodného obsahu, čímž bylo potvrzeno, že kvasinky nejsou bohatým zdrojem fenolických látek.



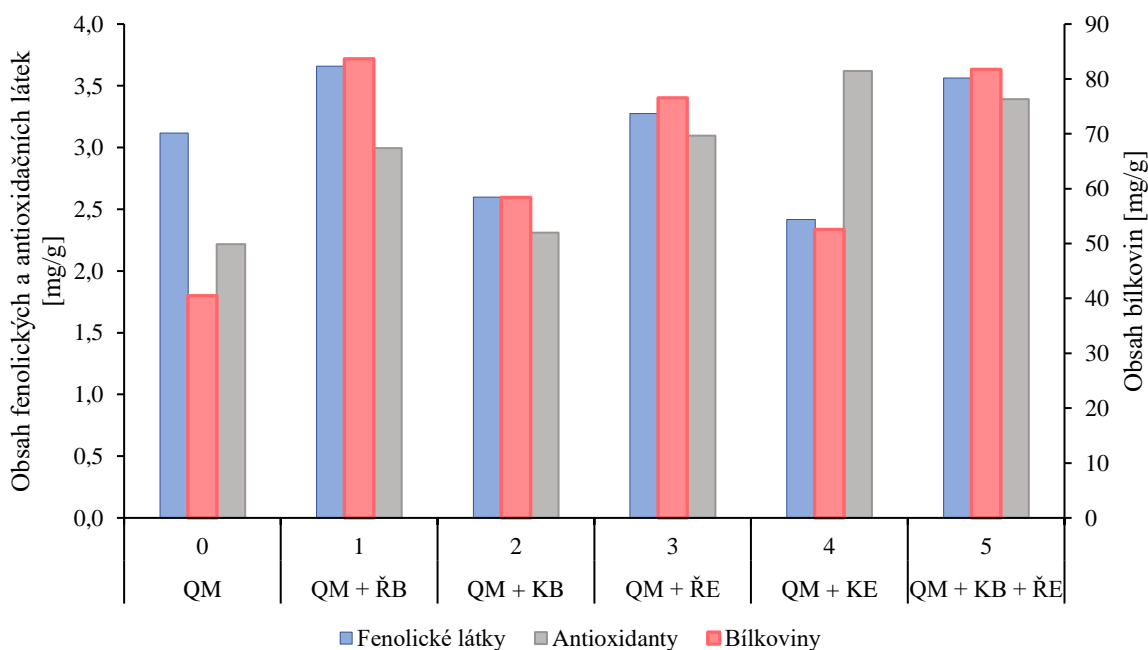
Obrázek 29: Obsah antioxidantů ve směsných produktech

Na grafu (Obrázek 29) lze pozorovat, že přidáním samotné biomasy do směsi došlo k poklesu antioxidantů, i přesto, že řasy jsou bohaté na antioxidanty. To bylo nejspíše způsobeno tím, že nedošlo k dostatečnému narušení buněčných stěn během extrakce společně s quinoovou moukou. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovala směs č. 5, ve které byla smíchána quinoová mouka, kvasinková biomasa a řasový extrakt. V případě kaší, kde byl vzorek zalit horkou vodou a lyofilizován, došlo k nárůstu antioxidantů ve všech případech, a to i v případě samotné biomasy. To bylo způsobeno vlivem teplotních změn, v případě biomasy došlo k rozrušení stěn buněk a uvolnění antioxidantů. Nejnižší hodnotu antioxidační aktivity vykazovala kaše č. 2, což se dalo předpokládat, protože kvasinky nejsou bohatým zdrojem antioxidantů, ale na druhou stranu u kvasinkového extraktu došlo k nárůstu antioxidační aktivity, což mohlo být způsobeno přítomností ethanolu v extraktu, díky kterému mohlo dojít k uvolnění antioxidantů rozpustných v ethanolu v quinoové mouce.



Obrázek 30: Obsah rozpustných bílkovin ve směsných produktech

V grafu (Obrázek 30) je vyneseno obsah rozpustných bílkovin ve směsných produktech přepočtený na 100 g vzorku. Přidáním jakékoli suroviny došlo k navýšení obsahu v surových směsích oproti samotné quinoové mouce (vzorek č. 0). K výraznému navýšení došlo ve směsi s řasovou biomasou a také v případě přidáním řasového extraktu ve vzorku č. 3 a vzorku č. 5. V případě připravených lyofilizovaných kaší nedošlo k žádnému velkému navýšení bílkovin, při použití kvasinkového extraktu došlo k mírnému poklesu oproti srovnávacímu vzorku (vzorek č. 0). Je tedy patrné, že vlivem teploty, ať už zalitím horkou vodou nebo sušením mrazem, dochází ke snížení obsahu bílkovin. V tomto případě by bylo lepší přidávat mikrobiální suroviny do kaší těsně před samotnou konzumací například ve formě kapsulí.



Obrázek 31: Obsah stanovovaných látek ve finálních produktech

Obrázek 31 je shrnujícím grafem, ve kterém jsou vyneseny obsahy fenolických a antioxidačních látek a obsah bílkovin ve výsledných cereálních produktech, které měly přibližovat instantní kaše.

Z grafu je patrné, že nejlepší zdroj fenolických látek, antioxidantů a bílkovin byl produkt č. 5. Přidáním kvasinkové biomasy a řasového extraktu do quinoové mouky došlo k výraznému zvýšení všech uvedených látek. Produkt č. 1 dosahoval podobných hodnot, i když hodnota antioxidantů byla nižší. Potenciálním zdrojem fenolických látek a antioxidantů by mohl být produkt č. 4, kde byl použit kvasinkový extrakt v ethanolu, který měl pravděpodobně vliv na zvýšení obsahu těchto látek (nebo jejich uvolnění z vázaných struktur v mouce), protože samotná kvasinková biomasa není bohatá na fenolické látky. Nejlepším produktem by mohla být kaše z quinoové mouky obohacená o řasovou biomasu, čímž by došlo k výraznému navýšení bílkovin a současně s přidavkem kvasinkového extraktu v ethanolu, příspěvkem něhož by vzrostl obsah antioxidantů. Touto kombinací by došlo k významnému navýšení všech tří sledovaných skupin nutričních látek.

## 6 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na vývoj obohacených bezlepkových cereálií pro zvláštní výživu. Mezi běžné bezlepkové cereálie patří jáhly, čirok, teff nebo také kukuřice. Vybranými cereáliemi pro tuto práci byly netradiční cereálie amaranth, pohanka a quinoa. Souhrnným názvem označovány jako pseudocereálie. Obohacující složkou byla mikrobiální biomasa z mikrořasy a kvasinky. Pro tuto práci byla vybrána zelená mikrořasa *Chlamydomonas reinhardtii* a karotenogenní kmen kvasinky *Cystofilobasidium macerans*, jež byly kultivovány na FCH VUT. Mikrobiální biomasa byla podrobena analýze, byly v ní stanoveny biologicky aktivní látky: fenolické látky, antioxidanty, vitaminy a mastné kyseliny. Následně byly připraveny směsné cereální produkty a stanoveny jejich biologické účinky na zdraví člověka.

Nejprve byla vypracována literární rešerše, ve které byly charakterizovány bezlepkové cereálie a pseudocereálie, které jsou alternativami běžných cereálií. V rámci teoretické části byl sepsán přehled o mikroorganismech využívaných v potravinářském průmyslu. Na základě údajů zjištěných v literatuře byla realizována experimentální část.

V experimentální části byly nejprve analyzované vybrané pseudocereální mouky, které jsou běžně dostupné v obchodech se zdravou výživou. Byly v nich stanoveny sacharidy, bílkoviny, mastné kyseliny, fenolické sloučeniny, antioxidanty,  $\beta$ -glukany a lipidické látky. Nejvyšší obsah sacharidů obsahoval amaranth ( $79,95 \pm 0,61$  g/100 g vzorku), dále pak quinoa ( $75,83 \pm 1,15$  g/100 g vzorku) a nejnižší obsah sacharidů byl stanoven v pohance ( $65,10 \pm 0,89$  g/100 g vzorku). Pro stanovení bílkovin byla zvolena metoda dle Hartree-Lowrhyo, pomocí které byly zjištěny rozpustné bílkoviny. Quinoa obsahovala nejvyšší obsah rozpustných bílkovin ( $9,08 \pm 0,07$  g/100 g vzorku). Naopak nejnižší hodnota získaných bílkovin byla naměřena u amaranthu ( $2,18 \pm 0,09$  g/100 g vzorku).

Dále byl stanoven obsah antioxidantů a fenolických látek. Nejvyšších hodnot dosáhla pohanková mouka, naopak nejnižší obsah těchto aktivních látek u amaranthu. V rámci analýzy aktivních látek byly stanoveny dále flavonoidy. Nejvyšší zastoupení flavonoidů obsahuje quinoa, kde flavonoidy představují přibližně 26 % z celkového obsahu fenolických látek. Hodnoty flavonoidů u pohanky a amaranthu byly téměř identické, takže s ohledem na hodnoty celkových fenolických látek lze usoudit, že v pohance převažuje zastoupení jiných fenolických sloučenin, než jsou flavonoidy.

Součástí charakterizace vybraných mouk bylo stanovení lepku, čímž bylo ověřeno, že vybrané pseudocereálie jsou bezlepkové. Žádná z vybraných mouk nepřesáhla hodnoty 20 mg/kg lepku, jeho množství bylo pouze stopové.

Pomocí GC metody byly stanoveny mastné kyseliny ve vybraných moukách. Z vybraných pseudocereálií měla nejvyšší hodnoty quinoová mouka, kde převažovalo zastoupení polynenasycených mastných kyselin, ve kterém dominovala kyselina linolová. Nejmenší obsah mastných kyselin byl detekován ve vzorku amaranthu.

Následně byla provedena optimalizace extrakce aktivních látek z mikrořasy *Ch. reinhardtii*. Extrakce byla provedena do vody, do směsi voda a ethanol (1 : 1), ethanolu, směsi ethanol a hexan (1 : 1) a hexanu (vesměš rozpouštědla kategorie GRAS). Pro stanovení fenolických látek a antioxidantů byla nejúčinnější extrakce do vody. Pomocí ethanolu a kontrolní extrakce dle Folcha bylo vyextrahováno nejvyšší množství chlorofylů, lipidických látek a mastných kyselin.

V případě kvasinkové biomasy byla nejúčinnější kontrolní extrakce dle Folcha a rovněž extrakce do ethanolu. Pomocí těchto rozpouštědel byl získán nejvyšší obsah lipidických látek, jako jsou karotenoidy, vitaminy a steroly a mastných kyselin. Vyšších hodnot fenolických a antioxidačních látek bylo dosaženo pomocí hexanu. V kvasinkové biomase byly stanoveny  $\beta$ -glukany, které tvořily 12 % buněčné-biomasy.

Pro finální produkt byl vybrán vodný řasový extrakt a ethanolový kvasinkový extrakt. Tyto extrakty byly nejprve podrobeny testu cytotoxicity, aby byly ověřeny biologické účinky na lidských buňkách

adenokarcinomu tlustého střeva – linie CaCo-2. Ani jeden z testovaných extraktů nepůsobil cytotoxicky, jelikož nebyla překročena hranice poklesu viability pod 60 %. Použití extraktů k obohacení cereálních výrobků lze tedy považovat za bezpečné.

V poslední části byly připraveny směsné obohacené bezlepkové cereální produkty. Pro finální produkt byla vybrána quinoová mouka, která měla jedny z nejlepších výsledků, pokud jde o obsah nutričních látek. Bylo připraveno 5 směsí, jež byly složeny z mikrobiální biomasy a otestovaných extraktů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s přidavkem kvasinkové biomasy a řasového extraktu, kde došlo k nárůstu obsahu fenolických látek o 0,44 mg/g, o 1,18 mg/g antioxidantů a o 41,28 mg/g bílkovin oproti samotné mouce. Mezi vysoce kvalitní produkty patří vzorky č. 1 a 3, kde byla použita k obohacení quinoové mouky řasová biomasa a řasový extrakt. Z experimentálního stanovení lze vyvodit, že nejlepší kombinací by byla kaše složená z quinoové mouky, řasové biomasy a kvasinkového extraktu, byly tak zajištěny všechny potřebné látky ve vysokém množství.

Studované pseudocereálie obohacené o řasovou a kvasinkovou biomasu, ať už ve formě prášku nebo extraktu, by mohly být slibnou alternativou pro vývoj bezlepkových potravin. Jde o potraviny nového typu a jejich výrobou by mohlo dojít mimo jiné i ke snížení emise skleníkových plynů a uhlíkové stopy, a to vlivem autotrofního metabolismu řas. Rostlinné produkty vyžadují pro svůj růst půdu a vodu, zajištění těchto podmínek je nákladné a časem dojde k jejich omezení. Jednobuněčné mikroorganismy svými nízkými nároky na kultivaci a celoroční produkcí tak představují nadějnou alternativu oproti klasickým zdrojům nutričních látek.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GAROFALO, Cristiana, Alessandra NORICI, Lorenzo MOLLO, Andrea OSIMANI a Lucia AQUILANTI. Fermentation of Microalgal Biomass for Innovative Food Production. *Microorganisms* [online]. 2022, **10**(10), 2069. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10102069
- [2] DIAZ, Crisandra J., Kai J. DOUGLAS, Kalisa KANG, Ashlynn L. KOLARIK, Rodeon MALINOVSKI, Yasin TORRES-TIJI, João V. MOLINO, Amr BADARY a Stephen P. MAYFIELD. Developing algae as a sustainable food source. *Frontiers in Nutrition* [online]. 2023, **9** [vid. 2023-04-20]. ISSN 2296-861X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.1029841>
- [3] VERNI, Michela, Chiara DEMARINIS, Carlo Giuseppe RIZZELLO a Erica PONTONIO. Bioprocessing to Preserve and Improve Microalgae Nutritional and Functional Potential: Novel Insight and Perspectives. *Foods* [online]. 2023, **12**(5), 983. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods12050983
- [4] MANNAZZU, Ilaria, Sara LANDOLFO, Teresa Lopes DA SILVA a Pietro BUZZINI. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, **31**(11), 1665–1673. ISSN 0959-3993, 1573-0972. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-015-1927-x
- [5] RAPOPORT, Alexander, Irina GUZHOVA, Lorenzo BERNETTI, Pietro BUZZINI, Marek KIELISZEK a Anna Maria KOT. Carotenoids and Some Other Pigments from Fungi and Yeasts. *Metabolites* [online]. 2021, **11**(2), 92. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo11020092
- [6] TAUFEROVÁ, Alexandra. *Technologie a hygiena potravin rostlinného původu I., II.* 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-692-6.
- [7] SERNA SALDÍVAR, Sergio R. Othón. *Cereal grains: properties, processing, and nutritional attributes*. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, 2010. Food preservation technology series. ISBN 978-1-4398-1560-1.
- [8] PŘÍHODA, Josef, Pavel SKŘIVAN a Marie HRUŠKOVÁ. *Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. Praha: VŠCHT, 2003. ISBN 80-7080-530-7.
- [9] POJIĆ, Milica a Uma TIWARI, ed. *Innovative Processing Technologies for Healthy Grains* [online]. 1. vyd. B.m.: Wiley, 2020 [vid. 2023-03-18]. ISBN 978-1-119-47016-8. Dostupné z: doi:10.1002/9781119470182
- [10] DIFONZO, Graziana, Giuditta DE GENNARO, Antonella PASQUALONE a Francesco CAPONIO. Potential use of plant-based by-products and waste to improve the quality of gluten-free foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2022, **102**(6), 2199–2211. ISSN 1097-0010. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.11702
- [11] ARENDT, Elke K. a Emanuele ZANNINI. *Cereal grains for the food and beverage industries* [online]. B.m.: Woodhead Publishing Limited, 2013 [vid. 2023-03-18]. ISBN 978-0-85709-413-1. Dostupné z: doi:10.1533/9780857098924
- [12] DE MORAIS CARDOSO, Leandro, Soraia Silva PINHEIRO, Hércia Stampini Duarte MARTINO a Helena Maria PINHEIRO-SANT'ANA. Sorghum (*Sorghum bicolor* L.): Nutrients, bioactive compounds, and potential impact on human health. *Critical Reviews in Food Science*

- and Nutrition* [online]. 2017, **57**(2), 372–390. ISSN 1040-8398, 1549-7852. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2014.887057
- [13] AHMED, A., Qua AKRAM, W. NAZ, S. AKHTAR, I. AMJAD, Ma ASHRAF, A. SHAKEEL, A. SAEED, S. SARFRAZ, F. SHAMIM, N. SHAHZADI, M. KASHIF a N. MAHMOOD. Possible revolutionary substitute to wheat: A review on nutrient rich and healthy diet development by pseudo cereals. *Biological and Clinical Sciences Research Journal* [online]. 2022, **2022**(1) [vid. 2023-04-29]. ISSN 2708-2261. Dostupné z: doi:10.54112/bcsrj.v2022i1.108
- [14] MARTÍNEZ-VILLALUENGA, Cristina, Elena PEÑAS a Blanca HERNÁNDEZ-LEDESMA. Pseudocereal grains: Nutritional value, health benefits and current applications for the development of gluten-free foods. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2020, **137**, 111178. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2020.111178
- [15] GRAZIANO, Sara, Caterina AGRIMONTI, Nelson MARMIROLI a Mariolina GULLÌ. Utilisation and limitations of pseudocereals (quinoa, amaranth, and buckwheat) in food production: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2022, **125**, 154–165. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2022.04.007
- [16] MALIK, Amanda Manoj a Awanish SINGH. Pseudocereals proteins- A comprehensive review on its isolation, composition and quality evaluation techniques. *Food Chemistry Advances* [online]. 2022, **1**, 100001. ISSN 2772-753X. Dostupné z: doi:10.1016/j.focha.2021.100001
- [17] WANNIARACHCHI, Piyumi Chathurangi, Dayani PAVALAKUMAR a Madhura Arunoda JAYASINGHE. Pseudocereals: Nutrition, Health Benefits, and Potential Applications in Gluten-free Food Product Developments. *Current Nutrition & Food Science* [online]. 2023, **19**(4), 377–385. ISSN 15734013. Dostupné z: doi:10.2174/1573401318666221010093914
- [18] THAKUR, Priyanka, Krishan KUMAR a Harcharan Singh DHALIWAL. Nutritional facts, bio-active components and processing aspects of pseudocereals: A comprehensive review. *Food Bioscience* [online]. 2021, **42**, 101170. ISSN 2212-4292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2021.101170
- [19] ALONSO-MIRAVALLÉS, Loreto a James O'MAHONY. Composition, Protein Profile and Rheological Properties of Pseudocereal-Based Protein-Rich Ingredients. *Foods* [online]. 2018, **7**(5), 73. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods7050073
- [20] BENDER, D. a R. SCHÖNLECHNER. Recent developments and knowledge in pseudocereals including technological aspects. *Acta Alimentaria* [online]. 2021, **50**(4), 583–609. ISSN 0139-3006, 1588-2535. Dostupné z: doi:10.1556/066.2021.00136
- [21] CONSTANTINO, Augusto Bene Tomé a Edwin Elard GARCIA-ROJAS. Proteins from pseudocereal seeds: solubility, extraction, and modifications of the physicochemical and techno-functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2022, **102**(7), 2630–2639. ISSN 1097-0010. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.11750
- [22] BALAKRISHNAN, Gayathri a Renée Goodrich SCHNEIDER. The Role of Amaranth, Quinoa, and Millets for the Development of Healthy, Sustainable Food Products—A Concise Review. *Foods* [online]. 2022, **11**(16), 2442. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11162442
- [23] MARTINEZ-LOPEZ, Alicia, Maria C. MILLAN-LINARES, Noelia M. RODRIGUEZ-MARTIN, Francisco MILLAN a Sergio MONTSERRAT-DE LA PAZ. Nutraceutical value of kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.). *Journal of Functional Foods* [online]. 2020, **65**, 103735. ISSN 1756-4646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2019.103735

- [24] RIVERO MEZA, Silvia Leticia, Adriano HIRSCH RAMOS, Lázaro CAÑIZARES, Chirle de Oliveria RAPHAELLI, Betina BUENO PERES, César Augusto GAIOSO, Isabel EGEEA, Yanira ESTRADA, Francisco Borja FLORES a Mauricio DE OLIVEIRA. A review on amaranth protein: composition, digestibility, health benefits and food industry utilisation. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2023, **58**(3), 1564–1574. ISSN 1365-2621. Dostupné z: doi:10.1111/ijfs.16056
- [25] DŽAFIĆ, Amela a Sanja ORUČEVIĆ ŽULJEVIĆ. The Importance of Buckwheat as a Pseudocereal: Content and Stability of Its Main Bioactive Components. In: [online]. 2022. ISBN 978-1-80355-180-7. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.102570
- [26] REN, Guixing, Cong TENG, Xin FAN, Shengyuan GUO, Gang ZHAO, Lizhen ZHANG, Zou LIANG a Peiyu QIN. Nutrient composition, functional activity and industrial applications of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Chemistry* [online]. 2023, **410**, 135290. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2022.135290
- [27] STIKIĆ, Radmila, Djordje GLAMOČLIJA, Mirjana DEMIN, Biljana VUCELIĆ-RADOVIĆ, Zorica JOVANOVIĆ, Dusanka MILOJKOVIĆ-OPSENICA, Sven-Erik JACOBSEN a Mirjana MILOVANOVIĆ. Agronomical and nutritional evaluation of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) as an ingredient in bread formulations. *Journal of Cereal Science* [online]. 2012, **55**(2), 132–138. ISSN 0733-5210. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcs.2011.10.010
- [28] LIRA, Keith Hellen Dias da Silva, Thaís Souza PASSOS, Heryka Myrna Maia RAMALHO, Karla Danielly da Silva Ribeiro RODRIGUES, Érica de Andrade VIEIRA, Angela Maria Tribuzy de Magalhães CORDEIRO, Bruna Leal Lima MACIEL, Karla Suzanne Florentino da Silva Chaves DAMASCENO, Francisco Canindé DE SOUSA JÚNIOR a Cristiane Fernandes DE ASSIS. Whey protein isolate-gelatin nanoparticles enable the water-dispersibility and potentialize the antioxidant activity of quinoa oil (*Chenopodium quinoa*). *PLoS ONE* [online]. 2020, **15**(10), e0240889. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0240889
- [29] ŠKROVÁNKOVÁ, Soňa, Dagmar VÁLKOVÁ a Jiří MLČEK. Polyphenols and antioxidant activity in pseudocereals and their products. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences* [online]. 2020, **14**, 365–370. ISSN 1337-0960. Dostupné z: doi:10.5219/1341
- [30] HOWARD, Jay E., Maria B. VILLAMIL a Chance W. RIGGINS. Amaranth as a natural food colorant source: Survey of germplasm and optimization of extraction methods for betalain pigments. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2022, **13** [vid. 2023-05-07]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.932440>
- [31] SOFI, Sajad Ahmad, Naseer AHMED, Asmat FAROOQ, Shafiya RAFIQ, Sajad Majeed ZARGAR, Fozia KAMRAN, Tanveer Ali DAR, Shabir Ahmad MIR, B. N. DAR a Amin MOUSAVI KHANEGHAH. Nutritional and bioactive characteristics of buckwheat, and its potential for developing gluten-free products: An updated overview. *Food Science & Nutrition* [online]. nedatováno, **n/a**(n/a) [vid. 2023-03-20]. ISSN 2048-7177. Dostupné z: doi:10.1002/fsn3.3166
- [32] LADDOMADA, Barbara a Weiqun WANG, ed. *Functional Cereal Foods for Health Benefits: Genetic and/or Processing Strategies to Enhance the Quali-Quantitative Composition of Bioactive Components* [online]. B.m.: MDPI, 2022 [vid. 2023-05-07]. ISBN 978-3-0365-4782-4. Dostupné z: doi:10.3390/books978-3-0365-4782-4
- [33] BRENNER, David M., Harold E. BOCKELMAN a Karen A. WILLIAMS. North American Wild Relatives of Grain Crops. In: Stephanie L. GREENE, Karen A. WILLIAMS, Colin K. KHOURY, Michael B. KANTAR a Laura F. MAREK, ed. *North American Crop Wild Relatives, Volume 2*



- [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019 [vid. 2023-03-18], s. 41–82. ISBN 978-3-319-97120-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-97121-6\_2
- [34] WRIGLEY, Colin, Harold CORKE, K. SEETHARAMAN a J. FAUBION. *Encyclopedia of Food Grains: Second Edition*. 2015.
- [35] DRUGULESCU, Manuel, Alina ORȚAN, Simona SPÎNU, Daniela IONESCU a Ionuț MORARU. SCREENING OF THE INFLUENCE OF DRYING METHODS ON THE TOTAL PHENOLIC CONTENT OF AMARANTHUS CAUDATUS. *Bulletin of the Transilvania University of Braşov. Series II, Forestry, wood industry, agricultural food engineering* [online]. 2020, **13(62)**(1), 99–106. ISSN 2065-2135. Dostupné z: doi:10.31926/but.fwiafe.2020.13.62.1.9
- [36] SHAHBAZ, Muhammad, Nighat RAZA, Mahad ISLAM, Muhammad IMRAN, Ishtiaque AHMAD, Arun MEYYAZHAGAN, Karthika PUSHPARAJ, Balamuralikrishnan BALASUBRAMANIAN, Sungkwon PARK, Kannan R. R. RENGASAMY, Tanweer Aslam GONDAL, Ahmed EL-GHORAB, Mohamed A. ABDELGAWAD, Mohammed M. GHONEIM a Chunpeng WAN. The nutraceutical properties and health benefits of pseudocereals: a comprehensive treatise. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2022, 1–13. ISSN 1040-8398, 1549-7852. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2022.2071205
- [37] NAVRUZ-VARLI, Semra a Nevin SANLIER. Nutritional and health benefits of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.). *Journal of Cereal Science* [online]. 2016, **69**, 371–376. ISSN 07335210. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcs.2016.05.004
- [38] MAGER, Diana R., Samantha CYRKOT, Christine LIRETTE, Herbert BRILL, Jenna DOWHANIUK, Heather MILESKI, Carlota BASUALDO-HAMMOND, Roseann NASSER, Esther ASSOR, Margaret MARCON a Justine M. TURNER. Nutritional considerations of a paediatric gluten-free food guide for coeliac disease. *British Journal of Nutrition* [online]. 2022, **127**(3), 421–430. ISSN 0007-1145, 1475-2662. Dostupné z: doi:10.1017/S0007114521000994
- [39] *Základy biologie a genetiky člověka - Karolinum* [online]. [vid. 2023-03-18]. Dostupné z: <https://karolinum.cz/en/books/otova-zaklady-biologie-a-genetiky-cloveka-24289>
- [40] SUÁREZ-GONZÁLEZ, Marta, Carlos BOUSOÑO-GARCÍA, Santiago JIMÉNEZ-TREVIÑO a Juan José DÍAZ-MARTÍN. Gluten-Free Diet: Nutritional Strategies to Improve Eating Habits in Children with Celiac Disease: A Prospective, Single-arm Intervention Study. *Nutrients* [online]. 2021, **13**(4), 1108. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu13041108
- [41] SAHIN, Yasin. Celiac disease in children: A review of the literature. *World Journal of Clinical Pediatrics* [online]. 2021, **10**(4), 53–71. ISSN 2219-2808. Dostupné z: doi:10.5409/wjcp.v10.i4.53
- [42] RAJ, Tirath, Raj MORYA, K CHANDRASEKHAR, Deepak KUMAR, Shveta SOAM, Ravindra KUMAR, Anil Kumar PATEL a Sang-Hyoun KIM. Microalgae biomass deconstruction using green solvents: Challenges and future opportunities. *Bioresource Technology* [online]. 2023, **369**, 128429. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2022.128429
- [43] *GRAS Notices* [online]. [vid. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=773>
- [44] KOUTSOUMANIS, Kostas, Ana ALLENDE, Avelino ALVAREZ-ORDÓÑEZ, Declan BOLTON, Sara BOVER-CID, Marianne CHEMALY, Robert DAVIES, Alessandra DE CESARE, Friederike HILBERT, Roland LINDQVIST, Maarten NAUTA, Luisa PEIXE, Giuseppe RU, Marion SIMMONS, Panagiotis SKANDAMIS, Elisabetta SUFFREDINI, Pier Sandro COCCONCELLI, Pablo Salvador FERNÁNDEZ ESCÁMEZ, Miguel PRIETO-

- MARADONA, Amparo QUEROL, Lolke SIJTSMA, Juan EVARISTO SUAREZ, Ingvar SUNDH, Just VLAK, Fulvio BARIZZONE, Michaela HEMPEN a Lieve HERMAN. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 15: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2021. *EFSA Journal* [online]. 2022, **20**(1) [vid. 2023-04-24]. ISSN 18314732, 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2022.7045
- [45] KOYANDE, Apurav Krishna, Kit Wayne CHEW, Krishnamoorthy RAMBABU, Yang TAO, Dinh-Toi CHU a Pau-Loke SHOW. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness* [online]. 2019, **8**(1), 16–24. ISSN 2213-4530. Dostupné z: doi:10.1016/j.fshw.2019.03.001
- [46] FERREIRA DE OLIVEIRA, Ana Paula a Adriana Pavesi Ariseto BRAGOTTO. Microalgae-based products: Food and public health. *Future Foods* [online]. 2022, **6**, 100157. ISSN 26668335. Dostupné z: doi:10.1016/j.fufo.2022.100157
- [47] DOLGANYUK, Vyacheslav, Daria BELOVA, Olga BABICH, Alexander PROSEKOV, Svetlana IVANOVA, Dmitry KATSEROV, Nikolai PATYUKOV a Stanislav SUKHIKH. Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules* [online]. 2020, **10**(8), 1153. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10081153
- [48] MOGANY, Trisha, Virthie BHOLA, Luveshan RAMANNA a Faizal BUX. Photosynthesis and pigment production: elucidation of the interactive effects of nutrients and light on *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* [online]. 2022, **45**(1), 187–201. ISSN 1615-7605. Dostupné z: doi:10.1007/s00449-021-02651-2
- [49] MATOS, Ângelo Paggi. Proteins: Sustainable Source, Processing, and Applications. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2020, **103**, 376–378. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2020.06.020
- [50] MCMILLAN, Jonathan R., Ian A. WATSON, Mehmood ALI a Weaam JAAFAR. Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. *Applied Energy* [online]. 2013, **103**, 128–134. ISSN 03062619. Dostupné z: doi:10.1016/j.apenergy.2012.09.020
- [51] DARWISH, Randa, Mohamed A. GEDI, Patchaniya AKEPACH, Hirut ASSAYE, Abdelrahman S. ZAKY a David A. GRAY. *Chlamydomonas reinhardtii* Is a Potential Food Supplement with the Capacity to Outperform *Chlorella* and *Spirulina*. *Applied Sciences* [online]. 2020, **10**(19), 6736. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app10196736
- [52] MOREIRA, Juliana Botelho, Bruna da Silva VAZ, Bruna Barcelos CARDIAS, Camila Gonzales CRUZ, Ana Claudia Araujo de ALMEIDA, Jorge Alberto Vieira COSTA a Michele Greque de MORAIS. Microalgae Polysaccharides: An Alternative Source for Food Production and Sustainable Agriculture. *Polysaccharides* [online]. 2022, **3**(2), 441–457. ISSN 2673-4176. Dostupné z: doi:10.3390/polysaccharides3020027
- [53] SUN, Xiao-Man, Lu-Jing REN, Quan-Yu ZHAO, Xiao-Jun JI a He HUANG. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 2018, **11** [vid. 2023-03-20]. Dostupné z: doi:10.1186/s13068-018-1275-9
- [54] UDAYAN, Aswathy, Ashutosh Kumar PANDEY, Ranjna SIROHI, Nidhin SREEKUMAR, Byoung-In SANG, Sung Jun SIM, Sang Hyoun KIM a Ashok PANDEY. Production of microalgae with high lipid content and their potential as sources of nutraceuticals. *Phytochemistry Reviews* [online]. nedatováno, 1. Dostupné z: doi:10.1007/s11101-021-09784-y

- [55] MATOS, Ângelo Paggi. Chapter 3 - Microalgae as a Potential Source of Proteins. In: Charis M. GALANAKIS, ed. *Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications* [online]. B.m.: Academic Press, 2019 [vid. 2023-03-18], s. 63–96. ISBN 978-0-12-816695-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816695-6.00003-9
- [56] PRÖSCHOLD, Thomas, Birger MARIN, Uwe Gert SCHLÖSSER a Michael MELKONIAN. Molecular Phylogeny and Taxonomic Revision of Chlamydomonas (Chlorophyta). I. Emendation of Chlamydomonas Ehrenberg and Chloromonas Gobi, and Description of Oogamochlamys gen. nov. and Loboichlamys gen. nov.\* \*In memory of Hanus Ettl (19311997), promoter of the systematics of thegenus. *Protist* [online]. 2001, **152**(4), 265–300. ISSN 1434-4610. Dostupné z: doi:10.1078/1434-4610-00068
- [57] MASI, Annalisa, Francesca LEONELLI, Viviana SCOGNAMIGLIO, Giulia GASPERUZZO, Amina ANTONACCI a Michael A. TERZIDIS. Chlamydomonas reinhardtii: A Factory of Nutraceutical and Food Supplements for Human Health. *Molecules* [online]. 2023, **28**(3), 1185. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28031185
- [58] KURTZMAN, C. P., J. W. FELL, Teun BOEKHOUT, C. P. KURTZMAN, J. W. FELL a Teun BOEKHOUT. *The Yeasts: A Taxonomic Study* [online]. Saint Louis, NETHERLANDS, THE: Elsevier Science & Technology, 2011 [vid. 2023-03-21]. ISBN 978-0-08-093127-2. Dostupné z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/vutbrno/detail.action?docID=630004>
- [59] STEWART, Graham G. The Structure and Function of the Yeast Cell Wall, Plasma Membrane and Periplasm. In: Graham G. STEWART, ed. *Brewing and Distilling Yeasts* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017 [vid. 2023-04-16], The Yeast Handbook, s. 55–75. ISBN 978-3-319-69126-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-69126-8\_5
- [60] WALKER, Graeme M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. B.m.: John Wiley & Sons, 1998. ISBN 978-0-471-96446-9.
- [61] PHALE, Sonali. Yeast: Characteristics and Economic Significance. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* [online]. 2018, **08**(05) [vid. 2023-03-19]. ISSN 21559821. Dostupné z: doi:10.4172/2155-9821.1000337
- [62] BEZUS, Brenda, Ivana CAVELLO, Juan Carlos CONTRERAS-ESQUIVEL a Sebastián CAVALITTO. Chapter 32 - Pectinases produced by extremophilic yeasts: from cold environments to the food industry. In: Mohammed KUDDUS a Cristobal Noe AGUILAR, ed. *Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology* [online]. B.m.: Academic Press, 2022 [vid. 2023-03-21], s. 437–452. ISBN 978-0-323-89929-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-89929-1.00010-X
- [63] BUZZINI, Pietro, Benedetta TURCHETTI a Andrey YURKOV. Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around? *Yeast* [online]. 2018, **35**(8), 487–497. ISSN 1097-0061. Dostupné z: doi:10.1002/yea.3314
- [64] MAOKA, Takashi. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines* [online]. 2020, **74**(1), 1–16. ISSN 1340-3443, 1861-0293. Dostupné z: doi:10.1007/s11418-019-01364-x
- [65] PAUL, Debarati, Panda Kusuma KUMARI a Nahid SIDDIQUI. Yeast Carotenoids: Cost-Effective Fermentation Strategies for Health Care Applications. *Fermentation* [online]. 2023, **9**(2), 147. ISSN 2311-5637. Dostupné z: doi:10.3390/fermentation9020147
- [66] BAEZA, Marcelo, Oriana FLORES, Jennifer ALCAÍNO a Víctor CIFUENTES. Yeast Thriving in Cold Terrestrial Habitats: Biodiversity and Industrial/Biotechnological Applications. In: Sonia

- M. TIQUIA-ARASHIRO a Martin GRUBE, ed. *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019 [vid. 2023-04-24], s. 253–268. ISBN 978-3-030-19030-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-19030-9\_13
- [67] THEVENIEAU, France a Jean-Marc NICAUD. Microorganisms as sources of oils. *OCL* [online]. 2013, **20**(6), D603. ISSN 2257-6614. Dostupné z: doi:10.1051/ocl/2013034
- [68] PAPANIKOLAOU, Seraphim a George AGGELIS. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2011, **113**(8), 1031–1051. ISSN 1438-9312. Dostupné z: doi:10.1002/ejlt.201100014
- [69] GU, Yuehao, Xue JIAO, Lidan YE a Hongwei YU. Metabolic engineering strategies for de novo biosynthesis of sterols and steroids in yeast. *Bioresources and Bioprocessing* [online]. 2021, **8**(1), 110. ISSN 2197-4365. Dostupné z: doi:10.1186/s40643-021-00460-9
- [70] RYCHTERA, Mojmir, Josef CERMAK, Jaroslav VOTRUBA, Jan NAHLIK, Karel MELZUCH, Christopher KENT a Waldir ESTELA-ESCALANTE. Optimization of feeding strategy for the ergosterol production by yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2010, **12**.
- [71] AWAD, Agape M., Michelle C. BRADLEY, Lucía FERNÁNDEZ-DEL-RÍO, Anish NAG, Hui S. TSUI a Catherine F. CLARKE. Coenzyme Q10 deficiencies: pathways in yeast and humans. *Essays in Biochemistry* [online]. 2018, **62**(3), 361–376. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20170106
- [72] CIRILLI, Ilenia, Elisabetta DAMIANI, Phiwayinkosi Vusi DLUDLA, Iain HARGREAVES, Fabio MARCHEGGIANI, Lauren Elizabeth MILLICHAP, Patrick ORLANDO, Sonia SILVESTRI a Luca TIANO. Role of Coenzyme Q10 in Health and Disease: An Update on the Last 10 Years (2010–2020). *Antioxidants* [online]. 2021, **10**(8), 1325. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox10081325
- [73] LI, Zhiheng, Chunji LI, Ping CHENG a Guohui YU. *Rhodotorula mucilaginosa*—alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon* [online]. 2022, **8**(11), e11505. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2022.e11505
- [74] HOLUB, Jiří, Martin SZOTKOWSKI, Oleg CHUJANOV, Dominika ŠPAČKOVÁ, Pavlína SNIEGOŇOVÁ a Ivana MÁROVÁ. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts Cultivated on by-Products of Poultry Processing—A Screening Study. *Microorganisms* [online]. 2023, **11**(2), 321. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms11020321
- [75] FELL, Jack W., Henri ROEIJMANS a T. BOEKHOUT. Cystofilobasidiales, a new order of basidiomycetous yeasts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 1999, **49**(2), 907–913. ISSN 1466-5026, 1466-5034. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-49-2-907
- [76] LIBKIND, Diego, Mário GADANHO, Maria VAN BROOCK a José Paulo SAMPAIO. *Cystofilobasidium lacus-mascardii* sp. nov., a basidiomycetous yeast species isolated from aquatic environments of the Patagonian Andes, and *Cystofilobasidium macerans* sp. nov., the sexual stage of *Cryptococcus macerans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2009, **59**(3), 622–630. ISSN 1466-5034. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.004390-0
- [77] CHREPTOWICZ, Karolina, Jolanta MIERZEJEWSKA, Jana TKÁČOVÁ, Mateusz MŁYNEK a Milan ČERTIK. Carotenoid-Producing Yeasts: Identification and Characteristics of

- Environmental Isolates with a Valuable Extracellular Enzymatic Activity. *Microorganisms* [online]. 2019, **7**(12), 653. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms7120653
- [78] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr.dopl. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [79] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [80] CHROMÝ, Vratislav. *Bioanalytika: analytické metody v klinické chemii a laboratorní medicíně*. 2. přeprac. a dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2011.
- [81] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 978-80-246-0553-1.
- [82] PAULOVA, H., H. BOCHORAKOVA a E. TABORSKA. In vitro Methods for Estimation of the Antioxidant Activity of Natural Compounds. *Chemické listy* [online]. 2004, **98**(4) [vid. 2023-04-21]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2144>
- [83] FRANKEL, Edwin N a Anne S MEYER. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2000, **80**(13), 1925–1941. ISSN 1097-0010. Dostupné z: doi:10.1002/1097-0010(200010)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4
- [84] HULÍN, P., P. DOSTÁLEK a I. HOCHÉL. Methods for Determination of Gluten Proteins in Food. *Chemické listy* [online]. 2008, **102**(5) [vid. 2023-05-08]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1650>
- [85] NAYAK, Balunkeswar, Zhenxing LI, Ishfaq AHMED a Hong LIN. Removal of Allergens in Some Food Products Using Ultrasound. In: *Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2023-05-08], s. 267–292. ISBN 978-0-12-804581-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804581-7.00011-7
- [86] BEHMANESH, Maryam, Saeed MIRDAMADI, Fariba KHODAGHOLI, Mohammad AZIZI a Reza DOUST. *QQPFP; The main allergic linear peptidic epitope derived from wheat gliadin: A Review*. 2019.
- [87] ASLANTÜRK, Özlem Sultan. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: Marcelo L. LARRAMENDY a Sonia SOLONESKI, ed. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World* [online]. B.m.: InTech, 2018 [vid. 2023-05-10]. ISBN 978-1-78923-418-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.71923
- [88] LI, Weijia, Jing ZHOU a Yuyin XU. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports* [online]. 2015, **3**(5), 617–620. ISSN 2049-9434, 2049-9442. Dostupné z: doi:10.3892/br.2015.481
- [89] GHASEMI, Mahshid, Tyron TURNBULL, Sonia SEBASTIAN a Ivan KEMPSON. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(23), 12827. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms222312827
- [90] LICHTENTHALER, Hartmut K. a Claus BUSCHMANN. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* [online]. 2001, **1**(1), F4.3.1-F4.3.8. ISSN 25725599. Dostupné z: doi:10.1002/0471142913.faf0403s01

- [91] MARTÍNEZ, Juan M., Carlota DELSO, Javier ANGULO, Ignacio ÁLVAREZ a Javier RASO. Pulsed electric field-assisted extraction of carotenoids from fresh biomass of *Rhodotorula glutinis*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [online]. 2018, **47**, 421–427. ISSN 14668564. Dostupné z: doi:10.1016/j.ifset.2018.04.012
- [92] VIEIRA, Marta V., Sara M. OLIVEIRA, Isabel R. AMADO, Luiz H. FASOLIN, Antonio A. VICENTE, Lorenzo M. PASTRANA a Pablo FUCIÑOS. 3D printed functional cookies fortified with *Arthrospira platensis*: Evaluation of its antioxidant potential and physical-chemical characterization. *Food Hydrocolloids* [online]. 2020, **107**, 105893. ISSN 0268-005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2020.105893
- [93] MATOS, Ângelo Paggi, Enrico NOVELLI a Giustino TRIBUZI. Use of algae as food ingredient: sensory acceptance and commercial products. *Frontiers in Food Science and Technology* [online]. 2022, **2** [vid. 2023-05-10]. ISSN 2674-1121. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/frfst.2022.989801>
- [94] VYSOKA, Marie, Martin SZOTKOWSKI, Eva SLANINOVA, Lucia DZURICKA, Paulina STRECANSKA, Jana BLAZKOVA a Ivana MAROVA. Oleaginous Yeast Extracts and Their Possible Effects on Human Health. *Microorganisms* [online]. 2023, **11**(2), 492. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms11020492
- [95] RODRÍGUEZ DE LUNA, Sara Luisa, R. E. RAMÍREZ-GARZA a Sergio O. SERNA SALDÍVAR. Environmentally Friendly Methods for Flavonoid Extraction from Plant Material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties. *The Scientific World Journal* [online]. 2020, **2020**, 6792069. ISSN 2356-6140. Dostupné z: doi:10.1155/2020/6792069
- [96] VIRSANGBHAI, Chaudhari Kalpeshkumar, Ankit GOYAL, Beenu TANWAR a Manvesh Kumar SIHAG. Potential Health Benefits of Conjugated Linoleic Acid: An Important Functional Dairy Ingredient. *European Journal of Nutrition & Food Safety* [online]. 2020, 200–213. ISSN 2347-5641. Dostupné z: doi:10.9734/ejnfs/2019/v11i430162
- [97] ZARRINMEHR, Mohammad Javad, Ehsan DANESHVAR, Subhasha NIGAM, Kannappan Panchamoorthy GOPINATH, Jayanta Kumar BISWAS, Eilhann E. KWON, Hailong WANG, Omidvar FARHADIAN a Amit BHATNAGAR. The effect of solvents polarity and extraction conditions on the microalgal lipids yield, fatty acids profile, and biodiesel properties. *Bioresource Technology* [online]. 2022, **344**, 126303. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.126303
- [98] WANG, Xiaoying, Bingqian SUN, Lengyun WEI, Xiao JIAN, Kai SHAN, Qingwen HE, Fengjiao HUANG, Xiaosong GE, Xiang GAO, Ninghan FENG a Yong Q CHEN. Cholesterol and saturated fatty acids synergistically promote the malignant progression of prostate cancer. *Neoplasia* [online]. 2022, **24**(2), 86–97. ISSN 14765586. Dostupné z: doi:10.1016/j.neo.2021.11.004
- [99] MAGHSOUDLOU, Yahya, Mohsen ASGHARI GHAJARI a Sedighe TAVASOLI. Effects of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of quince fruit and its tisane's sensory properties. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2019, **56**(5), 2365–2372. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-019-03644-6

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HPLC	Vysoko účinná kapalinová chromatografie
GC	Plynová chromatografie
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
UV	oblast ultrafialového záření
VIS	oblast viditelného záření
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
ABTS	2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
CaCO-2	Human Colon Adenocarcinoma cell line
MEM	Minimum Essential Medium
PBS	Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufr)
FBS	fetální bovinní sérum
$\varepsilon$	molární absorpční koeficient
QQFPF	celiakální toxický epiteton gliadinu
PUFA	polynenasyčené mastné kyseliny
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid)
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
CC	kontrola buněk
VC	kontrola rozpouštědla
GOPOD	Glucose Determination Reagent
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny
SFA	nasyčené mastné kyseliny
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
FID	Flame ionization detector
GAE	ekvivalent kyseliny gallové
OSN	Organizace spojených národů
UNFAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
CD	celiakie
HLA	Human Leucocyte Antigen
p.a	pro analýsi (lat), chemikálie analytickým účelům
BBM	Bold Basal Medium
NEAA	neesenciální aminokyseliny