



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VÝVOJ CEREÁLNÍCH VÝROBKŮ PRO ZVLÁŠTNÍ VÝŽIVU S PŘÍDAVKEM LUŠTĚNIN, ŘAS A KVASINEK

DEVELOPMENT OF CEREAL PRODUCTS FOR SPECIFIC NUTRITION WITH THE ADDITION OF LEGUMES,
ALGAE AND YEASTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Nela Pavlišťíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1963/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Nela Pavlišťíková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Vývoj cereálních výrobků pro zvláštní výživu s přidavkem luštěnin, řas a kvasinek

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. Literární rešerše – přehled bezpečných cereálií, možnosti obohacení cereálních výrobků
2. Výběr cereálií, luštěnin, řas a kvasinek pro přípravu obohacených cereálních produktů
3. Optimalizace metod stanovení základních nutričních složek cereálií a luštěnin a speciálních složek řas a kvasinek
4. Příprava směsných cereálních produktů a jejich charakterizace

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

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

Bc. Nela Pavlišťíková
studentka

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na vývoj cereálních výrobků pro zvláštní výživu s přídavkem luštěnin, řas a kvasinek.

V teoretické části jsou vypracovány odborné poznatky o bezpečkových cereáliích, jejich chemickém složení, lepku a obohacování potravin. Poté byl zpracován přehled o luštěninách, řasách a kvasinkách, které byly v této práci testovány. V rámci literární rešerše byl kladen důraz na chemické složení analyzovaných produktů.

V experimentální části byla provedena charakterizace vybraných bezpečkových cereálií a luštěnin. Testovanými cereáliemi byly pohanka, quinoa a bezpečkové ovesné vločky. Z řad luštěnin byly vybrány hrách, červená čočka a černá čočka Beluga. Dále byly připraveny různé druhy extraktů z řas a kvasinek, jež následně byly optimalizovány. Pro obohacení pseudocereálií byly vybrány řasy *Dulse*, *Chlorella* a *Spirulina*. Ze zástupců kvasinek bylo zvoleno sušené pekařské droždí a *Saccharomyces cerevisiae*. V bezpečkových cereáliích a luštěninách byly stanoveny polyfenoly, flavonoidy, antioxidační aktivita, sacharidy, bílkoviny, mastné kyseliny, lipidy a lipofilní pigmenty. U cereálií byl navíc ještě stanoven obsah β -glukanů a lepek. V extraktech z řas a kvasinek bylo zjištěno množství fenolických látek, flavonoidů, antioxidantů, celkových mastných kyselin, lipofilních látek, pigmentů a β -glukanů. Vybrané vzorky byly také podrobeny antimikrobiálním testům a testům cytotoxicity.

Na závěr byly připraveny směsné cereální produkty z vybrané bezpečkové cereálie, luštěniny, zvolených extraktů z řas a kvasinek a z biomasy řas. Ze získaných výsledků byly vybrány extrakty, které byly podrobeny MTT testům cytotoxicity. Bylo zjištěno, že přidáním hrachu, extraktů z řas a kvasinek nebo samotné řasové biomasy došlo k navýšení obsahu proteinů v připravených směsích. Dále bylo prokázáno, že v extraktech z řas *Chlorella* a *Spirulina* či jejich biomasy připravených pomocí směsi rozpouštědel hexan:ethanol vzrostlo množství antioxidantů. Ze získaných výsledků vyplývá, že kombinace cereálií s luštěninami je vhodná pro navýšení obsahu proteinů v bezpečkových výrobcích. Dále bylo také zjištěno, že vybrané mikrořasy a kvasinka mají potenciál pro obohacení bezpečkových výrobků o bioaktivní látky, a to při použití biomasy či extraktů z nich vyrobených.

KLÍČOVÁ SLOVA

cereálie, lepek, bezpečkové cereálie, luštěniny, mikrořasy, kvasinky, bioaktivní látky, obohacování potravin

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the development of cereal products for special nutrition with the addition of legumes, algae and yeast.

In the theoretical part, expert knowledge about gluten-free cereals, their chemical composition, gluten and food fortification is developed. Then an overview of the legumes, algae and yeasts tested in this work was elaborated. As a part of the literature review, emphasis was placed on the chemical composition of the analysed products.

In the experimental part, the characterization of selected gluten-free cereals and legumes was carried out. The tested cereals were buckwheat, quinoa and gluten-free oatmeal. Pea, red lentil and Beluga black lentil were selected from among legumes. Furthermore, various types of algae and yeast extracts were prepared, which were subsequently optimized. Algae of the genera *Dulse*, *Chlorella* and *Spirulina* were selected for enrichment of pseudocereals. Dried baker's yeast and *Saccharomyces cerevisiae* were chosen as yeast representatives. Phenolics, flavonoids, antioxidant activity, carbohydrates, proteins, fatty acids, lipids and lipophilic pigments were determined in gluten-free cereals and legumes. The content of β -glucans and gluten were determined for in cereals as well. Some content of phenolic substances, flavonoids, antioxidants, total fatty acids, lipophilic substances, pigments and β -glucans were found in extracts from algae and yeast. Selected samples were also subjected to antimicrobial and cytotoxicity tests.

Finally, mixed cereal products were prepared from selected gluten-free cereals, legumes, selected algae and yeast extracts and algae biomass. Extracts were selected based on obtained results and subjected to MTT cytotoxicity tests. It was found that the addition of pea, extracts from algae and yeast or the algae biomass itself increased the protein content of the prepared mixtures. Furthermore, in hexane:ethanol extracts from *Chlorella* and *Spirulina* or their biomass, the amount of antioxidants has been increased. The obtained results show that the combination of cereals with addition of algae and yeast extracts is suitable for increasing the protein content in gluten-free products. It was also found that selected microalgae and yeast have the potential to enrich gluten-free products with bioactive substances, when using biomass or extracts produced from them.

KEYWORDS

cereals, gluten, gluten-free cereals, legumes, microalgae, yeast, bioactive compounds, food enrichment

PAVLIŠTÍKOVÁ, Nela. Vývoj cereálních výrobků pro zvláštní výživu s přidavkem luštěnin, řas a kvasinek [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-04-26]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156957>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení, trpělivost a energii, kterou mi věnovala při vypracování mé práce. Ráda bych také poděkovala mé konzultantce Ing. Agátě Bendové za veškerou pomoc v laboratoři, inspiraci, trpělivost a věnovaný čas. Velký dík také patří mé rodině, příteli a kamarádům za veškerou pomoc a podporu i během studia.

OBSAH

1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 Cereálie.....	11
2.2 Obilné zrna	11
2.3 Pseudocereálie	11
2.4 Bezlepkové cereálie.....	12
2.4.1 Lepek	12
2.4.2 Celiakie.....	12
2.5 Chemické složení bezlepkových cereálií	13
2.5.1 Sacharidy.....	13
2.5.2 Lipidy.....	13
2.5.3 Proteiny	13
2.5.4 Vitamíny a minerály.....	14
2.6 Studované bezlepkové cereálie	14
2.6.1 Bezlepkové ovesné vločky	14
2.6.2 Pohanka.....	15
2.6.3 Quinoa	16
2.7 Obohacování potravin	17
2.7.1 Obohacování cereálních výrobků	17
2.8 Luštěniny	18
2.9 Studované luštěniny	18
2.9.1 Hrách	18
2.9.2 Čočka.....	19
2.9.2.1 Červená čočka	20
2.9.2.2 Černá čočka Beluga	20
2.10 Studované řasy a kvasinky	21
2.10.1 Chlorella.....	21
2.10.2 Spirulina	22
2.10.3 Dulse.....	23
2.10.4 Saccharomyces cerevisiae	24
2.11 Bezpečnost látek přidávaných do potravin.....	25
2.12 Používané analytické metody	26
2.12.1 UV-VIS spektrofotometrie	26
2.12.2 Extrakce.....	26

2.12.3 Chromatografie.....	27
2.12.4 Stanovení antioxidační aktivity	27
2.12.5 Imunochemické stanovení lepku (RIDASCREEN® Gliadin competitive)	27
2.12.6 Antimikrobiální testy	28
2.12.7 Stanovení cytotoxicity	29
3 CÍLE PRÁCE	30
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1 Materiál	31
4.1.1 Použité cereálie	31
4.1.2 Použité luštěniny	31
4.1.3 Použité řasy a kvasinky	31
4.2 Seznam použitých chemikálií.....	32
4.3 Seznam použitých přístrojů	32
4.4 Buněčné kmeny	33
4.4.1 Použité bakterie k testování antimikrobiální aktivity.....	33
4.4.2 Použité linie humánních buněk	33
4.5 Metody	33
4.5.1 Příprava vzorků pro analýzy	33
4.5.1.1 Příprava vzorků cereálií a luštěnin	33
4.5.1.2 Příprava extraktů z řas.....	34
4.5.1.3 Příprava extraktů z kvasinek	34
4.5.1.4 Optimalizace přípravy extraktů z řas a kvasinek	34
4.5.1.5 Příprava směsí.....	35
4.5.2 Metody charakterizace různých typů materiálu	36
4.5.2.1 Kultivace <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
4.5.2.2 Stanovení celkových polyfenolů	37
4.5.2.3 Stanovení flavonoidů	37
4.5.2.4 Stanovení antioxidační aktivity	38
4.5.2.5 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise	38
4.5.2.6 Stanovení rozpustných proteinů dle Hartree-Lowryho.....	39
4.5.3 Speciální analytické metody.....	39
4.5.3.1 Stanovení mastných kyselin pomocí GC.....	39
4.5.3.2 Stanovení pigmentů a lipofilních metabolitů pomocí HPLC.....	40
4.5.3.3 Měření absorpčních (UV-VIS) spekter	41
4.5.3.4 Spektrofotometrické stanovení pigmentů.....	41

4.5.3.5 Stanovení lepku	41
4.5.3.6 Stanovení β -glukanů v cereáliích a řasách	42
4.5.3.7 Stanovení β -glukanů v kvasinkách	42
4.5.4 Stanovení antimikrobiální aktivity	43
4.5.4.1 Resazurin test	44
4.5.5 MTT test cytotoxicity	44
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	45
5.1 Charakterizace vybraných cereálií	45
5.1.1 Stanovení celkových polyfenolů	45
5.1.2 Stanovení flavonoidů.....	45
5.1.3 Stanovení antioxidační aktivity	46
5.1.4 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise	47
5.1.5 Stanovení rozpustných proteinů dle Hartree-Lowryho	48
5.1.6 Stanovení mastných kyselin pomocí GC	48
5.1.7 Stanovení pigmentů a lipofilních metabolitů v cereáliích pomocí HPLC	50
5.1.8 Stanovení lepku v cereáliích	50
5.1.9 Stanovení β -glukanů v cereáliích	51
5.2 Charakterizace vybraných luštěnin	51
5.2.1 Stanovení celkových polyfenolů v luštěninách.....	51
5.2.2 Stanovení flavonoidů.....	52
5.2.3 Stanovení antioxidační aktivity	53
5.2.4 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise	53
5.2.5 Stanovení rozpustných proteinů dle Hartree-Lowryho	54
5.2.6 Stanovení mastných kyselin pomocí GC	55
5.2.7 Stanovení pigmentů a lipofilních metabolitů pomocí HPLC	56
5.3 Charakterizace extraktů z řas	57
5.3.1 Stanovení celkových polyfenolů u řas	57
5.3.2 Stanovení flavonoidů u řas	58
5.3.3 Stanovení antioxidační aktivity	59
5.3.4 Stanovení mastných kyselin u řas pomocí GC	59
5.3.5 Stanovení pigmentů a lipofilních metabolitů řas pomocí HPLC	61
5.3.6 Stanovení β -glukanů v řasách	61
5.3.7 Spektrofotometrické stanovení pigmentů.....	62
5.4 Charakterizace extraktů z kvasinek	63
5.4.1 Stanovení celkových polyfenolů u kvasinek	63

5.4.2 Stanovení flavonoidů.....	64
5.4.3 Stanovení antioxidační aktivity kvasinek.....	64
5.4.4 Stanovení mastných kyselin pomocí GC	65
5.4.5 Stanovení pigmentů a lipofilních metabolitů kvasinek pomocí HPLC.....	66
5.4.6 Stanovení β -glukanů u kvasinek	67
5.4.7 Spektrofotometrické stanovení pigmentů u kvasinek	67
5.5 Stanovení antimikrobiální aktivity	69
5.5.1 Resazurinový test	72
5.6 MTT test cytotoxicity	75
5.7 Charakterizace připravených směsí.....	77
5.7.1 Stanovení celkových polyfenolů u směsí	78
5.7.2 Stanovení flavonoidů.....	79
5.7.3 Stanovení antioxidační aktivity	80
5.7.4 Stanovení rozpustných proteinů dle Hartree-Lowryho	81
6 ZÁVĚR.....	82
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	84
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	91

1 ÚVOD

Cereálie, taktéž zvané obilniny, zastupují rostliny, které patří mezi nejstarší zdroje lidské potravy. Díky své přizpůsobivosti na dané prostředí jsou považovány za nejrozšířenější pěstované plodiny na světě. Jsou zdrojem potřebných nutričních složek jako jsou bílkoviny, sacharidy nebo vitamíny. Právě z tohoto důvodu je můžeme řadit mezi funkční potraviny, jež jsou součástí každodenní stravy. Kromě již zmíněných bioaktivních složek obsahují cereálie také speciální protein zvaný lepek. Ten je v současnosti hodně diskutovaným tématem, jelikož na něj může vznikat alergie a intolerance. U lidí lepek způsobuje chronické autoimunitní onemocnění zvané celiakie. Jedná se o nemoc tenkého střeva, které nedokáže lepek vstřebat. V současné době celiakii trpí přibližně 1% populace. Celiakie se může projevit jak v dětství, tak v dospělosti. Bohužel je toto onemocnění nevyléčitelné. Lidé trpící celiakií musejí dodržovat přísnou bezlepkovou dietu. Bezlepkové produkty neindisponují pouze lepkem, ale také potřebnými živinami. Jedná se zejména o vitamíny a minerální látky, které jsou v každodenní stravě potřebné. Z dlouhodobého hlediska příjmu nevyvážené stravy pak může docházet k závažným onemocněním.

Pseudocereálie, neboli přirozeně bezlepkové cereálie, by mohly těmto špatným stravovacím návykům předejít. Jsou vhodné nejen pro celiaky, ale také pro lidi, kteří si potrpí na zdravý životní styl. Jsou totiž bohatým zdrojem bílkovin a aminokyselin oproti klasickým cereáliím. Mezi pseudocereáliemi můžeme zařadit například pohanku, quinou či amaranth. Tyto bezlepkové pseudocereálie a produkty z nich jsou sice celosvětově dostupné, ovšem jejich cena je oproti potravinám obsahujícím lepek mnohem vyšší. Proto by bylo vhodné vytvořit cenově dostupný obohacený produkt, jež neobsahuje lepek a zároveň disponuje všemi potřebnými živinami.

Luštěniny jsou dobrým zdrojem bílkovin. Řadíme mezi ně fazole, hrách, čočku či sójové boby. Bylo prokázáno, že pravidelná konzumace je spojována se snížením rizik onemocnění. Obsahují také sacharidy, tuky bychom u nich našli pouze v malém množství. Z řad vitamínů disponují skupinou B a co se týče minerálních látek, jsou bohaté na železo a fosfor. Z těchto důvodů jsou vhodné na obohacování potravin za účelem zvýšení obsahu nutričních složek.

Existují mikroorganismy, u kterých bylo prokázáno, že obsahují významné nutriční složky a speciální bioaktivní látky. V současnosti se setkáváme čím dál více s mikrořasou *Chlorella* a sinicí *Spirulina*. Jedná se o zelené fotosyntetizující organismy, jež jsou označovány jako superpotraviny, a to díky svým prokazatelným antioxidačním účinkům, vysokému obsahu bílkovin, vitamínů či minerálů. Tyto řasy jsou komerčně dostupné po celém světě v různých formách. Mezi mikroorganismy, jež mohou obohacovat potravinové produkty díky svým bioaktivním látkám, patří také kvasinky. *Saccharomyces cerevisiae* hraje významnou roli v potravinářském průmyslu. Kvasinka obsahuje spoustu významných bioaktivních látek, které mají zajímavý přínos pro lidské zdraví, především vitamíny, minerální látky a aminokyseliny. Přidání aktivních složek z řas a kvasinek vede ke zvýšení nutričních hodnot obohacovaných potravin.

Cílem této diplomové práce je připravit nový cereální produkt obohacený o bioaktivní složky z luštěnin, řas a kvasinek, jenž bude určen ke zvláštní výživě. Z důvodu zajištění bezpečnosti těchto látek budou vybrané navržené produkty podrobeny testům cytotoxicity.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Cereálie

Cereálie, jinak nazývané obilniny, lze botanicky zařadit mezi trávy (*Gramineae*). Jedná se tedy o jednoděložné rostliny spadající do čeledě lipnicovité (*Poaceae*). Cereálie jsou řazeny mezi potraviny poskytující důležité nutriční aspekty, které mají dobrý dopad na zdravotní stav lidského těla. Jedná se tedy o potraviny obsahující potřebné množství živin a také některé další důležité sloučeniny, které mají pozitivní vliv na člověka. Lze je tedy považovat za základní složku lidské stravy. Cereálie jsou používány ve dvou formách, buď jako celá zrna nebo jako mouka. Celá zrna mohou být reprezentována vločkami nebo rýží. Mletá forma (mouka) se pak rozděluje podle velikostí částic (zrn) [1].

Obiloviny lze zařadit mezi nejstarší zdroje lidské potravy. Poskytují potřebné biokomponenty jako jsou bílkoviny, vitamíny nebo minerály. Jsou základní surovinou pro více než 6 miliard obyvatel. Hojně jsou používány jako surovina pro výrobu krmiv. Nejvíce využívány jsou v chudých zemích z důvodu levného pořízení a pěstování – lze je využít také na výrobu škrobu nebo lihu [2].

Tradiční cereálie lze rozdělit podle objemu jejich produkce, využití nebo nutriční hodnoty na hlavní a vedlejší. Mezi hlavní obiloviny patří kukuřice, rýže, pšenice nebo ječmen. Mezi vedlejší například oves, žito, špalda či proso [1; 2].

2.2 Obilné zrno

Jelikož všechny obilniny patří do stejné čeledi, je zcela zřejmé, že si budou zrna jednotlivých obilovin dost podobná. Liší se však velikostí nebo tvarem zrn či barvou. Tyto vlastnosti zrna závisí také na vnějších podmínkách, jako je teplota, roční období, místo pěstování nebo podnebí. Tato semena jsou většinou bohatá na škrob, což poskytuje značné množství energie.

Morfologicky je zrno podobné u všech druhů obilnin. První vrstvou je perikarp. Jeho funkcí je chránit zrno před škodlivými látkami a mechanickým poškozením. Vrstva je tvořena nerozpustnými celulózy, hemicelulózy a ligninem. Lze v ní najít také vitamíny a minerální látky. Pod perikarpem se nachází osemení, jež je tvořeno hemicelulózy. Při procesu mletí tyto dvě svrchní vrstvy přecházejí do otrub. Mezi těmito vrstvami a endospermem se nachází aleuronová vrstva. Podle toho, o jakou obilninu se jedná, může být tvořena jednou až třemi vrstvami buněk. Například kukuřice, oves nebo pšenice mají aleuronovou vrstvu tvořenou jednou linií buněk, kdežto ječmen nebo rýže mají tři linie buněk. Uvnitř zrna se nachází již zmíněný endosperm, který tvoří asi 85 % obilného zrna. Skládá se z tenkostěnných buněk. Uvnitř je klíček, který je významným zdrojem bílkovin. Obsahuje ale vysoký podíl tuků, proto se tento blok klíčku odstraňuje, aby se zabránilo výskytu oxidačních změn [1].

2.3 Pseudocereálie

Jelikož jsou pseudocereálie botanicky klasifikovány jako dvouděložné rostliny, jejich chemické, fyzikální a zpracovatelské vlastnosti se výrazně liší od jednoděložných obilovin. Mezi nejvýznamnější pseudoobiloviny patří amarant, pohanka, quinoa a méně známá canihua [3]. Jejich vysoká nutriční hodnota je dobře známá. Stále více se používají pro vývoj široké škály potravin na bázi škrobu, k čemuž přispěly intenzivnější výzkumy provedené v posledních letech. Kromě zdravotní motivace jsou důležitým stimulem pro opětovné zvýšení zemědělské biodiverzity také environmentální aspekty, jako je probíhající změna klimatu. Nejdůležitější

faktory, které je třeba při zpracování zohlednit, jsou jejich menší velikost jádra semen, jejich specifická struktura škrobu a architektura granulí, jejich bezlepkový protein, ale také složení vlákniny a sekundárních rostlinných metabolitů [3].

2.4 Bezlepkové cereálie

Pojem bezlepkové cereálie se používá pro obilniny, které vůbec neobsahují lepek, nebo cereálie, které jej obsahují v množství nižším než 20 ppm. Mezi bezlepkové cereálie můžeme zařadit rýži, kukuřici, proso, pohanku, quinou nebo amarant. Jelikož postupem času roste počet lidí s intolerancí lepku, zvyšuje se na trhu zájem o bezlepkové potraviny a bezlepkové produkty [4].

2.4.1 Lepek

Lepek je komplexní směs stovek proteinů, především gliadinu a gluteninu. Lze jej považovat za hlavní zásobní bílkovinu pšeničných zrn. Různé odrůdy pšenice se liší v obsahu bílkovin a ve složení a distribuci lepkových proteinů. Souhrnně se proteiny gliadin a glutenin označují jako prolaminy, které představují proteiny semen nerozpustné ve vodě, ale extrahovatelné ve vodném roztoku ethanolu, a jsou charakteristické vysokým obsahem glutaminu (38 %) a prolinových zbytků (20 %). Gliadin obsahuje peptidové sekvence, které jsou vysoce odolné vůči žaludečnímu, pankreatickému a střevnímu proteolytickému trávení v gastrointestinálním traktu.

Lepkové proteiny lze klasifikovat do podskupin v závislosti na klíčových rozdílech včetně obsahu síry a molekulové hmotnosti, a poté dále klasifikovat podle jejich různých primárních struktur na α , β , γ a ω gliadiny. Jednotlivé lepkové proteiny jsou vázány silnými kovalentními i nekovalentními silami, které spolu se strukturou a interakcí těchto proteinů přispívají k jedinečným vlastnostem lepku [5]. Gluten je tepelně stabilní a má schopnost působit jako pojivo a rozšiřující činidlo, a běžně se používá jako přísada do zpracovaných potravin pro zlepšení textury, chuti a zadržování vlhkosti. Lepková matrice a její výsledné funkce jsou zásadní pro určování kvality těsta různých pekařských výrobků. Průměrný denní příjem lepku v západní stravě se považuje za 5–20 g za den. Obiloviny obsahující lepek (pšenice, žito, ječmen a oves) jsou řazeny mezi důležité základní potraviny. Neobvyklé reologické a funkční vlastnosti lepku jsou závislé na poměru gluteninů ke gliadinům a na interakcích těchto struktur. Každá složka má mírně odlišné funkce rozhodující při určování viskoelastických vlastností a kvality konečného produktu. Například purifikované hydratované gliadiny přispívají více k viskozitě a roztažitelnosti těsta, zatímco hydratované gluteniny jsou soudržné a přispívají k pevnosti a pružnosti těsta. Existují podobné proteiny jako gliadin nacházející se v pšenici, jedná se o sekalin v žitu, hordein v ječmeni a aveniny v ovsu, a jsou souhrnně označovány jako „lepek“ [5; 6].

2.4.2 Celiakie

Celiakie (intolerance lepku) představuje celoživotní autoimunitní onemocnění, které je způsobeno nesnášenlivostí lepku. Lidem s touto intolerancí lepek způsobuje autoimunitní zánět sliznice tenkého střeva. Působením glutenu může docházet až k destrukci slizničních klků, jež vede ke zmenšování povrchu tenkého střeva. Díky tomu je u jedinců trpících celiakií pozorována snížená schopnost trávení a vstřebávání živin. Nedodržováním předepsané bezlepkové diety může u nemocného postupně dojít až k rozvratu metabolismu [7].

Mezi typické projevy celiakie se řadí bolesti břicha, průjmy, nadýmání, nechutenství, zvracení, zácpa nebo únava. Co se týče mimostřevních, ojedinělých příznaků, může docházet k úzkostem až depresím, neplodnosti, předčasnému řídnutí kostí nebo chudokrevnosti. Tyto ojedinělé případy se projevují nejčastěji v dospělosti. Neléčená celiakie je často doprovázena poklesem hmotnosti, u některých jedinců až podvýživou, a ztrátou vitální energie [8].

To, jestli daný jedinec trpí celiakií se může projevit jak v dětství, tak v dospělosti. V dětství se příznaky choroby objevují ihned po požití potravy obsahující lepek. Děti začnou trpět průjmy, které mohou být doprovázeny bolestmi břicha postupně nabývajících na intenzitě. Také přicházejí stavy nechutenství, což vede ve většině případů ke ztrátě hmotnosti [9]. U dospělých jedinců se nemoc neprojevuje ihned, ale až po výrazné zátěži, kterou může představovat nemoc nebo těhotenství. Ženy trpící celiakií mohou trpět nástupem menstruace v pozdějším věku, v nejhorších případech dochází až k neplodnosti nebo spontánním potratům. Existují případy, kdy daní jedinci nemají žádné projevy nemoci. Celiakie jim může být diagnostikována při pátrání po chorobě u rodinných příslušníků již ověřeného celiaka. Celiakie může být doprovázena i jinými onemocněními, jako je například diabetes 1. typu nebo poruchy štítné žlázy. Jak už bylo zmíněno, u celiaků dochází k narušení sliznice tenkého střeva. To může být spojeno i s nedostatkem enzymu laktázy. Proto může u lidí s neléčenou celiakií nastat laktózová intolerance [8; 9].

2.5 Chemické složení bezlepkových cereálií

2.5.1 Sacharidy

Sacharidy jsou řazeny mezi hlavní nutriční složku zrn. Semena obsahují monosacharidy, zejména fruktózu, glukózu a arabinózu. Disponují také disacharidy, například sacharózou či maltózou. Vyšší obsah monosacharidů lze pozorovat u quinoe (až 5 %). Z hlediska polysacharidů obsahují cereálie také škrob. Co se týče vlákniny, výborným zdrojem je pohanka, tedy její zrna. Vláknina je složena z celulózy, hemicelulózy a ligninu. Naopak vláknina obsažená v quinoe je tvořena nerozpustnými polysacharidy, jako jsou homogalakturonany a rhamnogalakturonany s arabinanovým řetězcem nebo s vysoce rozvětvenými xyloglukany a celulózou. Cereálie disponují také skupinou zvanou β -glukany. Jedná se o polysacharidy, které jsou rozpustné ve vodě a přirozeně se vyskytují v buněčných stěnách rostlin. V cereáliích jsou zastoupeny ve formě β -1,3-1,4-D-glukanů [10].

2.5.2 Lipidy

Bezlepkové cereálie jsou dobrým zdrojem nenasycených mastných kyselin. Obsah nenasycených mastných kyselin v quinoe a pohance se udává až na 80 %. Nejvíce zastoupenými mastnými kyselinami jsou olejová a linolová. Obsah lipidů v quinoe je vyšší než v tradičních obilovinách. Olej z quinoe je bohatý na esenciální mastné kyseliny. Jedná se o linolovou a α -linolenovou kyselinu [10].

2.5.3 Proteiny

Bezlepkové cereálie disponují vyváženým obsahem aminokyselin, který přispívá ke kvalitě rostlinného proteinu. Narozdíl od běžných obilovin obsahují zejména lysin, methionin a cystein. Za hlavní složky bílkovin můžeme považovat albuminy a globuliny. V menším množství také prolamin a glutelin, jež jsou převažující bílkoviny v běžných obilovinách (například pšenice). Co se týče kvality, můžeme quinoe považovat za jeden z nejlepších zdrojů

rostlinného proteinu. Obsah proteinu byl stanoven okolo 16 %. Semena obsahují peptid lunasin, jež se vyskytuje také v kukuřici nebo sóji [11].

2.5.4 Vitamíny a minerály

Cereálie neobsahující lepek jsou významným zdrojem vitamínů, zejména vitamínů skupiny B jako je thiamin, riboflavin nebo kyselina listová, vitamínu C a tokoferolu (vitamín E). Tokoferol a kyselina askorbová mají vysoké antioxidační účinky, díky kterým chrání buňky před oxidačním stresem způsobeným volnými radikály. Quinoa a pohanka obsahují karotenoid lutein [10].

Bezlepková zrna jsou plná minerálních sloučenin. Mezi nejběžnější patří fosfor, hořčík, draslík nebo vápník. Z mikroprvků obsahují železo, zinek, měď nebo mangan [10].

2.6 Studované bezlepkové cereálie

Cílem této diplomové práce bylo obohatit cereálie o nutriční složky luštěnin a speciální složky řas a kvasinek. Jelikož je celá práce zaměřena na bezlepkové produkty, byly vybrány pseudocereálie neobsahující lepek, konkrétně pohanka a quinoa. Dále byly vybrány bezlepkové ovesné vločky.

2.6.1 Bezlepkové ovesné vločky

Bezlepkové ovesné vločky jsou cereální výrobky vyrobené z ovesných vloček, které jsou speciálně zpracovány tak, aby neobsahovaly lepek. Obvykle jsou vytvářeny z odrůd ova, které jsou geneticky méně náchylné k obsahu lepku. Nicméně, oves může být kontaminován lepkem během různých fází produkce nebo zpracování. Pro výrobu bezlepkových ovesných vloček se často používají metody, které minimalizují riziko kontaminace lepkem. To může zahrnovat separaci zařízení a výrobních linek pro oves, používání certifikovaných bezlepkových ovesných vloček nebo kontrolu na obsah lepku pomocí laboratorních testů. Bezlepkové ovesné vločky jsou oblíbenou volbou pro lidi s celiakií nebo lepkovou intolerancí, kteří hledají zdravou a vyváženou stravu. Jsou bohaté na vlákninu, obsahují důležité minerály a vitamíny, a mohou být používány ve stejných receptech jako běžné ovesné vločky. Je však důležité vždy pečlivě číst etikety výrobků a vybírat produkty označené jako bezlepkové nebo certifikované bezlepkové, aby se minimalizovalo riziko kontaminace lepkem [12].



Obrázek 1: Bezlepkové ovesné vločky [12]

Bezlepkové ovesné vločky jsou bohaté na různé bioaktivní látky, které přispívají k celkovému zdraví a výživě. Mezi hlavní bioaktivní látky obsažené v bezlepkových ovesných vločkách patří bílkoviny. Obsahují také všechny esenciální aminokyseliny. Dále se v nich nacházejí polyfenoly, jež jsou známé svými antioxidačními vlastnostmi. Bezlepkové ovesné vločky jsou zdrojem různých vitamínů, včetně vitamínu B, zejména B₁, B₂, B₃, B₅ nebo B₆, a vitamínu E. Z minerálních látek v nich můžeme hledat železo, zinek, fosfor, mangan, hořčík a měď. Jsou také zdrojem β -glukanů, které mohou přispívat k snižování cholesterolu v krvi a regulaci hladiny cukru v krvi. Díky této škále bioaktivních látek jsou bezlepkové ovesné vločky považovány za výživnou potravinu a mohou být součástí vyvážené stravy [12].

2.6.2 Pohanka

Pohanka je prastará pseudocereální plodina z čeledi *Polygonaceae*, která zaujímá zásadní část lidské stravy a je konzumována po celém světě. Široce se pěstuje v Asii, Evropě a Americe, ale původní zmínky o pěstování pocházejí z horských provincií jižní Číny. Pohanka má vysokou schopnost ekologické adaptability, takže ji lze pěstovat i ve vysokých nadmořských výškách s nízkými srážkami a teplotou. Pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum*) a pohanka tatarská (*Fagopyrum tataricum*) jsou celosvětově nejrozšířenějšími a nejkonzumovanějšími druhy. Světová produkce pohanky byla v roce 2018 více než 2,9 milionu tun. Mezi země s předními světovými producenty pohanky patří Čína, Rusko, Francie, Ukrajina, Polsko, Spojené státy americké a Kazachstán. V současnosti se navíc pohanka stává populárnější v USA, Kanadě a Evropě a v různých zemích, jako je Čína, Indie nebo Nepál. Pohanka byla potvrzena jako dobrý zdroj různých výživných a bioaktivních složek s různými zdravotními a farmaceutickými účinky, a proto přitáhla více pozornosti jako potenciálně cenný zdroj potravy [13].



Obrázek 2: Pohanka obecná [14]

Pohanka v posledních letech zvyšuje poptávku a přitahuje výzkumnou pozornost potravinářských vědců pro své ideální chemické složení. Lze ji považovat za vysoce účinnou funkční potravinu s léčebnými účinky na chronická onemocnění. Vyznačuje se zejména antioxidačními, kardioprotektivními, hepatoprotektivními, protinádorovými či protizánětlivými účinky. Tyto zdravotní účinky byly částečně nebo plně porovnány s několika bioaktivními sloučeninami, které v pohance existují. Jedná se hlavně o flavonoidy, polyfenoly, sacharidy, bílkoviny a aminokyseliny, mastné kyseliny, vitamíny a minerály [13].

Několik bioaktivních sloučenin bylo detekováno v různých částech rostlin, jako jsou listy, semena nebo kořeny. Tyto sloučeniny zahrnují flavonoidy, fenolové kyseliny a jejich deriváty, fagopyrin, triterpenoidy, steroidy, stilbeny a další [13].

Sacharidy jsou významnou složkou pohanky, tvoří až 73 % celkové suché hmotnosti. Pohanková mouka obsahuje 70–91 % sacharidů v závislosti na procesu mletí. V dnešní době se však díky své bezlepkové vlastnosti stává stále větším a mimořádně důležitým zdrojem potravy. Pohankové zrnko obsahuje malé množství redukujících cukrů, oligosacharidů a neškrobových polysacharidů. Je také dobrým zdrojem proteinů a aminokyselin, zejména leucinu, lysinu, valinu, fenylalaninu, methioninu, isoleucinu nebo threoninu. Mastné kyseliny tvoří malou část semen pohanky. Mastné kyseliny přítomné v pohance se skládají z kyseliny palmitové, stearové, olejové, linolové, linolenové a eikosaenové. Pohanka obecná a pohanka tatarská vykazují podobné složení mastných kyselin. Obsah lipidů v pohance tatarské se pohybuje od 2,5 do 2,8 %, zatímco obsah lipidů v běžné pohance se pohybuje od 1,6 do 2,9 %. Vysoký obsah nasyčených mastných kyselin obsahuje slupka, zatímco nenasycené mastné kyseliny jsou většinou přítomny v embryu. Obal semen pohanky obsahuje nejvyšší množství kyseliny linolové. Je bohatá na vitamíny skupiny B, včetně thiaminu, riboflavinu, niacinu a pyridoxinu, a vitamín E. Obsahuje také některé minerální látky, jako je sodík, draslík, fosfor, měď, zinek, hořčík, železo, vápník nebo mangan [13].

2.6.3 Quinoa

Quinoa neboli merlík chilský je letní jednoletá dvouděložná bylina z čeledi *Amaranthaceae*. Nejprve byla domestikována v andských zemích Jižní Ameriky asi před 7 000 lety. Andský lid začal pěstovat quinou pro její nutriční hodnoty, odolnost vůči suchu a schopnost růst v podmínkách s vysokým obsahem soli. Inkové považovali quinou za posvátnou plodinu a nazývali ji „mateří zrnko“. Přestože byla po tisíce let přehlížena, agrární a nutriční význam této plodiny byl znovu objeven během posledních 50 let, což vedlo k oživení její produkce. Země Jižní Ameriky, jmenovitě Bolívie, Ekvádor a Peru, vedou produkci, a ty dohromady tvoří více než 80 % světové produkce. Celosvětově existuje asi 250 druhů této rostliny. Zrna quinoj jsou hlavní jedlou částí, jsou bezlepková a obsahují vysoké množství bílkovin, esenciálních aminokyselin a esenciálních minerálů a vitamínů. Kvůli těmto nutričním vlastnostem a zdravotním přínosům je quinoa považována za novou zdravou potravinu, občas označovanou jako „superpotravina“ [15].



Obrázek 3: Merlík chilský (Quinoa) [16]

Jak už bylo zmíněno, quinoa obsahuje velké množství proteinů. Ze zástupců aminokyselin v ní můžeme hledat leucin, valin, izoleucin, fenylalanin, threonin, lysin, tryptofan nebo histidin. Škrob je hlavním zástupcem sacharidů a tvoří asi 60 % suché hmotnosti. Potraviny s vysokým obsahem bílkovin a nízkým obsahem sacharidů jsou prospěšné pro lidské zdraví, protože nepřispívají ke zvýšení hladiny glukózy v plazmě. Co se týče tuků, disponuje mastnými

kyselinami, a to kyselinou palmitovou, stearovou, olejovou, linolovou a linolenovou. Obsahuje také minerální látky, jako je vápník, měď, železo, hořčík, fosfor, draslík, sodík a zinek [15].

2.7 Obohacování potravin

Obohacování neboli fortifikace potravin je definována jako praxe přidávání vitamínů a minerálů do běžně konzumovaných potravin během zpracování za účelem zvýšení jejich nutriční hodnoty. Je to osvědčená, bezpečná a nákladově efektivní strategie pro zlepšení stravy a pro prevenci a kontrolu nedostatků mikroživin. V letech 2008 a 2012 zařadil Kodaňský konsensus obohacování potravin za jednu z nákladově nejefektivnějších rozvojových priorit [17]. Zatímco povinné obohacování potravin bylo používáno jako strategie k prevenci nedostatků mikroživin v zemích s vysokými příjmy (HIC), hlavně v Evropě a Severní Americe, v zemích s nízkými příjmy je stále méně běžná. V těchto zemích potravinové systémy neposkytují nutričně adekvátní stravu kvůli produkci a spotřebě pouze několika hlavních škrobových potravinářských plodin jako je kukuřice, rýže nebo pšenice. Tyto rostliny jsou sice běžně pěstovány a využívány, avšak obsahují nedostatek mikroživin. Existují silné důkazy, že obohacování potravin v HIC je účinné při řešení nedostatků mikroživin [17]. V zemích s nízkými a středními příjmy (LMICs) se důkazy stále zjišťují, ale výzkum potvrdil dopad obohacování na nutriční výsledky. Některé způsoby fortifikace, jako je obohacování základních potravin železem, však poskytly smíšené výsledky. Například bylo zjištěno, že obohacení pšeničné mouky železem mělo malý nebo žádný účinek na anémii, a mělo malý nebo žádný dopad na nedostatek železa ve srovnání s neobohacovanou pšeničnou moukou [17].

Účinnost fortifikačních programů však není určena pouze biologickou aktivitou obohacených potravin, ale také účinnou a udržitelnou implementací, která vyžaduje neustálé sledování, zajišťování kvality a kontrolu a nápravná opatření k zajištění vysoké shody [18].

Existuje mnoho způsobů, jak obohacovat potraviny. Řadíme mezi ně biofortifikace, domácí fortifikace, mikrobiální nebo komerční a průmyslové fortifikace. Biofortifikace používá k obohacování metody genového inženýrství a biotechnologické metody. Domácí obohacování potravin spočívá v konzumaci tablet obsahujících doplňky stravy. Mikrobiální fortifikace spočívá v obohacování potravin pomocí produktů mikrobiálního metabolismu, jako jsou lipidy, vitamíny nebo pigmenty. Lze také fortifikovat biomasou, nejčastěji ve formě mikrořas jako jsou *Chlorella* nebo *Spirulina*. Komerční a průmyslová fortifikace je založena na přidávání chemicky syntetizovaných mikroživin do potravin [19].

2.7.1 Obohacování cereálních výrobků

Co se týče fortifikace potravin, nejčastěji bývají obohacovány mouky a cereálie, dále pak například mléčné produkty. Jelikož bezlepkové cereálie a výrobky z nich nejsou zrovna vhodným zdrojem mikroživin (například vitamínů nebo minerálních látek), je zapotřebí je fortifikovat. Látky, které potraviny obohacují, nesmí závažně ovlivnit sensorické vlastnosti (barvu, vůni, chuť) původních cereálních výrobků. Cereální výrobky disponují nízkým obsahem mikroživin. Je to zapříčiněno mletím zrn, při technologickém procesu výroby muk o různé velikosti částic. Díky procesu mletí dochází k odstranění některých bioaktivních látek, což vede ke snížení jejich nutriční hodnoty [20].

2.8 Luštěniny

Luštěniny zahrnují skupinu rostlin a jejich plodů z botanické čeledi *Fabaceae*. Mezi běžné druhy luštěnin patří fazole, hrách, cizrna, čočka, arašídý a sójové boby. Luštěniny, bohaté na různé vitamíny a minerály, jsou ekonomickým zdrojem vlákniny, fytonutrientů a bílkovin důležitých pro rostlinnou nebo flexitariánskou stravu. Podle Organizace OSN pro výživu a zemědělství (“FAO”) jsou luštěniny důležitou součástí jídelníčku se známými přínosy pro lidské zdraví a zdraví planety. Bylo prokázáno, že pravidelná konzumace zlepšuje obsah živin ve stravě a je spojována se snížením rizika onemocnění, zejména ischemické choroby srdeční, při dávce 50 g za den. Konzumace sóji konkrétně souvisí se sníženým rizikem některých druhů rakoviny včetně rakoviny prostaty a prsu, kde populační studie ukazují, že konzumace sóji hraje roli jak v prevenci rakoviny prsu, tak ve snížení rizika opětovného výskytu u pacientů, kteří rakovinu prsu přežili, a to kvůli obsahu isoflavonů. Luštěniny také hrají cennou roli v udržitelné produkci potravin a mají dobré předpoklady k tomu, aby tvořily součást výživných a ekologicky udržitelných stravovacích návyků. Luštěniny jsou dobrým zdrojem bílkovin. Obsahují také sacharidy, zejména vlákninu. Tuky bychom u nich našli pouze v malém množství. Z řad vitamínů disponují skupinou B a co se týče minerálních látek, jsou bohaté na železo a fosfor [21].

2.9 Studované luštěniny

Jelikož je tato práce zaměřena na obohacování bezlepkových cereálií, byly vybrány luštěniny s vysokým obsahem proteinů, a to hrách, červená čočka a černá čočka Beluga.

2.9.1 Hrách

Hrách setý neboli *Pisum sativum* je řazen mezi významné rostliny spadající do čeledi bobovité (*Fabaceae*). Jedná se o hospodářsky významnou popínavou rostlinu, která může dorůst do výšky až 2 metrů. Listy má obvykle prorostlé a sbíhavé, u různých druhů mohou však vypadat odlišně. Květ je pětičetný, nejčastěji bílé, narůžovělé nebo namodralé barvy. Plody jsou označovány jako lusky. Obsahují dužnatá semena známá jako hrášky. Lusky a jejich nezralá semena jsou využívány jako zelenina, zralá semena (hrách) jako luštěnina [22].

První zmínky o pěstování hrachu pocházejí z Asie a Středomoří, nicméně i v Evropě je pěstován již od mladší doby kamenné. V současnosti se pěstuje téměř po celém světě. Také u nás je pěstován dlouhodobě. Lze jej pěstovat v různých podnebných pásmech, od tropů až po horské oblasti [23].



Obrázek 4: Rostlina hrachu setého [24]

Hrách obsahuje významné nutriční složky. Je zdrojem vysoce kvalitních rostlinných bílkovin v lidské stravě. Hrachový protein je považován za vysoce kvalitní protein a funkční složku v celosvětovém průmyslu díky své nízké alergenicitě a celosvětové dostupnosti. Hrachový protein lze rozdělit do čtyř hlavních skupin: albumin, globulin, prolamin a glutelin, kde většinu tvoří globuliny a albuminy. Kromě toho má hrachový protein vynikající funkční vlastnosti, jako je rozpustnost, kapacita zadržování vody a oleje, schopnost emulze, gelovatění a viskozity. Proto tyto funkční vlastnosti dělají z hrachového proteinu slibnou složku v potravinářském průmyslu. Z esenciálních aminokyselin lze dohledat leucin, lysin, izoleucin, fenylalanin, threonin nebo valin. Ze zástupců neesenciálních pak glutamová a asparagová kyselina, serin, prolin nebo tyrosin. Má však nedostatek aminokyselin obsahujících síru, tj. methioninu a cysteinu. Sacharidy jsou z většiny zastoupeny ve formě škrobu a vlákniny, rozpustné i nerozpustné. Podílejí se na nich také neškrobové sacharidy, včetně sacharózy, oligosacharidů a celulózy. Hrách je dobrým zdrojem vitamínů rozpustných ve vodě, zejména B₁, B₂ a B₃. Tyto vitamíny podporují nejen nervový systém, ale také krevní oběh, imunitní systém, vlasy nebo pokožku. Mezi minerální látky, které hrách obsahuje, můžeme zařadit draslík, fosfor, hořčík a vápník [25].

Je známo, že hrách představuje důležitou složkou lidské stravy také díky obsahu škrobu, bílkovin a dalších živin. V poslední době vzbudil velký zájem týkající se zdravotních přínosů pro lidské tělo. Vláknina z obalu semene a buněčných stěn přispívá ke správné funkci trávicího traktu a snižuje stravitelnost škrobu v hrachu. Amylóza v hrachovém škrobu přispívá k nižšímu glykemickému indexu a snížené stravitelnosti škrobu. Obsah vitamínů a minerálních látek v hrachu může hrát důležitou roli v prevenci proti různým onemocněním, které souvisejí například s nedostatkem selenu nebo folátu. Hrách obsahuje různé fytochemikálie, které byly dříve považovány pouze za antinutriční faktory. Patří mezi ně polyfenoly, které mohou mít antioxidační a antikarcinogenní aktivitu, saponiny, které mohou vykazovat hypocholesterolemickou a antikarcinogenní aktivitu, a galaktózové oligosacharidy, které mohou mít příznivé prebiotické účinky v tlustém střevě [26].

2.9.2 Čočka

Čočka, latinsky *Lens culinaris* je jednou z nejvýznamnějších obilných luštěnin patřící do čeledi *Fabaceae*. Je to přírodní funkční potravina bohatá na mnoho bioaktivních sloučenin, jako jsou polyfenoly, saponiny a fytosteroly. Několik studií prokázalo, že konzumace čočky je potenciálně důležitá při snižování výskytu řady chronických onemocnění díky jejím bioaktivním sloučeninám [27]. Pěstuje se neustále na různých typech půd včetně písku a jílu. Prvotní nálezy této jednoleté rostliny pocházejí z Blízkého východu. Od 19. století se rozšířila do Středomoří, Asie a Severní Ameriky. V roce 2010 byla produkce čočky až 4,58 milionů metrických tun vypěstovaných ve více než 48 zemích světa. Obecně lze čočku rozdělit do tří hlavních typů: hnědá, zelená a červená čočka. Podle kanadských průzkumů zabírá červená čočka 70 % celosvětové produkce, dále následuje zelená čočka (25 %) a nakonec hnědá a ostatní čočka (5 %) [28].

Čočka je jednou z nejstarších plodin na světě a používá se v různých kuchyních po celém světě, zejména ve Středomoří a v indických oblastech. Její jedlá semena obsahují důležité makro a mikroživiny. Co se týče nutričního složení, obsahuje asi 60 % sacharidů, z nichž je většina ve formě škrobu nebo vlákniny, a 25 % bílkovin. Má zvláště vysoký obsah

aminokyselin, jako je lysin, glutamová kyselina, asparagová kyselina, leucin, fenylalanin nebo arginin. Čočka také disponuje minerály, jako je železo, hořčík nebo zinek [27].

Pravidelný příjem čočky, podobně jako jiné luštěniny, nabízí řadu zdravotních výhod. Například přínosy konzumace čočky byly prokázány v několika biochemických procesech, jako je snížení hladiny cholesterolu v krvi, inhibice enzymu konvertujícího angiotenzin I (ACE) a působení jako antioxidant. Pravidelný příjem čočky nebo produktů na bázi čočky také poskytuje ochranný účinek proti různým chronickým chorobným stavům, například kardiovaskulárním onemocněním, vysokému krevnímu tlaku, vysokému cholesterolu a rakovině. Před moderním výzkumem prováděným během posledních několika desetiletí byly zdravotní přínosy čočky zmíněny také ve starověkých léčebných prostředcích. V rozvojových zemích jsou jak mikronutriční podvýživa, tak proteinová energetická podvýživa vážným zdravotním problémem zejména u dětí ve věku od 1 do 5 let. Rozšíření konzumace čočky a její začlenění do potravin po odstavení může pomoci zlepšit celkový nedostatek mikroživin a bílkovin [29].

2.9.2.1 Červená čočka

Červená čočka je nejčastěji pěstovanou odrůdou. Díky vysokému obsahu karotenoidů má oranžovou až červenou barvu. Po uvaření je zbarvena až dožluta. Je zbavená slupky, z tohoto důvodu nezpůsobuje nadýmání, jako například jiné luštěniny. Rostlina červené čočky dorůstá až do výšky 40 cm. Plodem je lusk, ve kterém se nacházejí semena. Konzumace je vhodná pro diabetiky, jelikož má schopnost rovnoměrně uvolňovat glukózu do krve. Červená čočka je užitečná také při redukci váhy, díky tomu, že obsahuje velké množství vlákniny. Také by měla, podle čínské medicíny, zvyšovat vitalitu ledvin a podporovat krevní oběh [28; 30; 31].



Obrázek 5: Červená čočka [27]

První skupinou bioaktivních látek, které můžeme v čočce dohledat, jsou sacharidy. Ty jsou zastoupeny hlavně vlákninou [29]. Jak už bylo zmíněno, čočka je bohatá na bílkoviny. Také je zdrojem všech esenciálních aminokyselin, kromě methioninu, cysteinu a tryptofanu [32]. Z hlediska fenolických látek vykazuje nejvyšší obsah ve slupce. V čočce jsou zastoupeny vitamíny, zejména obsahuje vitamín C a vitamín B₃. V malém množství u ní můžeme hledat také vitamíny A, B₁, B₂, B₆, B₉, B₁₂ a E. Z minerálních látek můžeme v čočce nalézt vápník, železo, hořčík, draslík, sodík nebo fosfor [29].

2.9.2.2 Černá čočka Beluga

Čočka Beluga, též přezdívaná čočkový kaviár, se řadí mezi netradiční druhy čočky. Disponuje malými semeny, která jsou na povrchu načernalá, kdežto uvnitř jsou bílá. Tato luštěnina je

považována za zdraví prospěšnou, je vhodná pro diabetiky díky nízkému glykemickému indexu [33].



Obrázek 6: Černá čočka Beluga [27]

Beluga se dá považovat za čočku s velmi vysokým obsahem proteinů, až 20 %. Z bioaktivních látek obsahuje také sacharidy, zejména vlákninu. Můžeme v ní hledat také malé množství tuků, hlavně polynenasycené (PUFA) a nasycené (SFA) mastné kyseliny, a β -karotenu. Z hlediska vitamínů obsahuje kyselinu askorbovou a vitamíny skupiny B. Minerální látky v čočce zastupují převážně železo a hořčík. Nalezneme v ní také pigmenty, které se nacházejí například i v borůvkách nebo ostružinách [33].

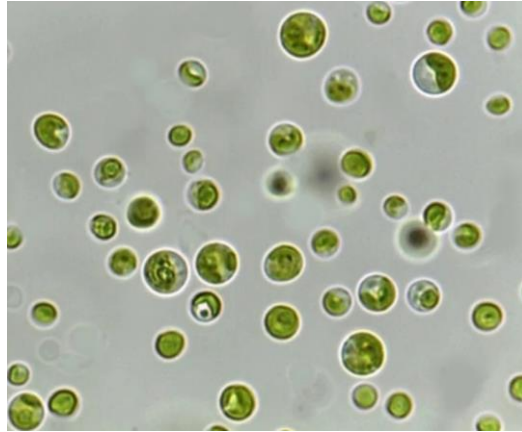
2.10 Studované řasy a kvasinky

V rámci této diplomové práce byly k analýzám vybrány 3 druhy řas a 1 druh kvasinky, jejichž složky by měly obohatit výsledné směsi, jež budou připravovány. Jedná se například o antioxidanty anebo fenolické látky. Z tohoto důvodu byly tedy vybrány *Dulse*, *Chlorella* a *Spirulina*. Z kvasinek byla vybrána *Saccharomyces cerevisiae*.

2.10.1 *Chlorella*

Chlorella se řadí mezi zelené jednobuněčné řasy, komerčně se vyrábí a distribuují po celém světě jako doplněk stravy. Jsou to fotosyntetické eukaryotické organismy, které obsahují chloroplasty a jádra, podobně jako rostliny. Tato sladkovodní řasa obsahuje četné živiny a vitamíny, které chybí v rostlinných zdrojích potravy. Mikrořasy, jako je *Chlorella*, efektivněji produkují biomasu než suchozemské rostliny díky jejich vyššímu výkonu při využívání slunečního záření a CO_2 , což vede k extrémně vysokým rychlostem růstu. Proto se mikrořasy používají v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu a jejich pigmenty, živiny, bioaktivní sloučeniny a celá biomasa se již používají po celém světě [34].

Různé druhy *Chlorella* lze masově pěstovat a jako doplňky stravy jsou komerčně dostupné po celém světě. Komerční pěstování jejich biomasy však začalo teprve před několika lety. *Chlorella vulgaris* byla objevena v roce 1890 slavným mikrobiologem a botanikem Dr. Martinusem Willem Beijerinckem. V roce 1903 byl identifikován další druh rodu *Chlorella*, který se vyznačoval přítomností pyrenoidů v chloroplastech, a podle toho byl pojmenován *C. pyrenoidosa*. Od té doby bylo charakterizováno více než 20 druhů rodu *Chlorella*, přičemž bylo popsáno více než 100 kmenů. V současnosti se druhy rodu *Chlorella* dělí na tři odrůdy: *C. vulgaris*, *C. lobophora* a *C. sorokiniana*. *Chlorella* příznivě působí na normální činnost srdce, cév, jater a střev; pročišťuje tělo a napomáhá imunitě [35].



Obrázek 7: *Chlorella* pod mikroskopem [36]

Chlorella obsahuje více než 50 % bílkovin. Co se týče esenciálních aminokyselin, je zdrojem lysinu, leucinu, valinu, fenylalaninu, threoninu nebo histidinu. Z řad neesenciálních aminokyselin vykazuje obsah kyseliny glutamové, kyseliny asparagové, alaninu, glycinu a argininu. Mezi sacharidy nacházející se v rodu *Chlorella* lze zařadit vlákninu a další polysacharidy, které převážně tvoří buněčnou stěnu řasy [35]. Obsahuje také mastné kyseliny, zejména kyselinu linolovou a α -linolenovou. Další významnou skupinou bioaktivních látek jsou vitamíny. V buňkách mikrořas rodu *Chlorella* můžeme hledat vitamíny skupiny B, jako je B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉ a B₁₂, dále pak vitamín C, D₂, E a K [37].

2.10.2 *Spirulina*

Arthrospira, také známá jako *Spirulina* pro svůj spirálovitý tvar, je zelená sinice patřící do čeledi *Microcoleaceae*. Co se týče potravinářského a farmaceutického průmyslu, *Spirulina* patří mezi nejvíce studovaný druh sinic. Sinice jsou gramnegativní bakterie, které sehrály důležitou roli ve vývoji primitivní Země a biosféry. Tyto mikroorganismy byly pro svou barvu klasifikovány jako modrozelené řasy díky produkci pigmentu fykocyaninu. Sinice byly nalezeny v různých prostředích, od sladkých vod po oceány, na půdách, horninách a v prostředích s extrémními fyzikálně-chemickými vlastnostmi. *Spirulina* je obligátní fotoautotrofní filamentózní druh a má charakteristický šroubovitý tvar. Tato sinice má prokaryotickou organizaci s vícevrstvou buněčnou stěnou, ribozomy, četnými inkluzemi a lamelárním fotosyntetickým systémem. Sinicím se přirozeně daří v alkalických vodách bohatých na minerály při teplotách od 35 do 40 °C. Velikost vláken buněk *Spirulina* dosahuje až do velikosti 0,5 mm. V přírodě se vyskytuje několik druhů *Spirulina*, ale nejvíce studovanými a používanými druhy jsou *Spirulina platensis* a *Spirulina maxima* [38]. Od 70. let je *Spirulina* považována za bohatý zdroj potravy díky vysokému obsahu makro a mikroživin. Ve skutečnosti je vynikajícím zdrojem bílkovin, vitamínů, mastných kyselin, minerálů, fotosyntetických pigmentů a několika sekundárních metabolitů [39].



Obrázek 8: *Spirulina* [40]

Spirulina může obsahovat až 60 % bílkovin skládajících se z esenciálních aminokyselin, jako je leucin, isoleucin, valin, tryptofan, methionin, fenylalanin, lysin a threonin. Obsah bílkovin je vysoce kvalitní, s vysokou stravitelností, protože buňky *Spirulina* mají místo celulóзовých stěn křehký a lehce stravitelný mureinový obal [38]. Asi 7–16 % sušiny tvoří lipidy. Patří mezi ně kyselina olejová, palmitová, arachidová a myristová. Z ω -6 polynenasycených mastných kyselin se v sinici nacházejí arachidonová a γ -linolenová kyselina. Mezi mastné kyseliny *Spirulina* patří také kyselina stearidonová, eikosapentaenová a dokosaheptaenová. Jsou zde přítomny i lipofilní pigmenty, které mají různé bioaktivní vlastnosti. Mezi nimi jsou nejhojnější chlorofyl-a a β -karoten. Co se týče vitamínů, obsahuje provitamin A, vitamíny B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ a B₁₂, také vitamíny C, D a E. *Spirulina* je také zdrojem několika minerálů, včetně železa, zinku, draslíku, mědi, manganu, hořčíku, fosforu a vápníku [39]. Bylo prokázáno, že kromě glukózy, fruktózy, sacharózy, glycerolu, sorbitolu a mannitolu, lze v buňkách *Spirulina* také nalézt myoinositol, zdroj sacharidů organického fosforu, dusíku, kalcium spirulan (Ca-SP) a polysacharidový imunomodulátor zvaný Immulina [38].

2.10.3 *Dulse*

Palmaria palmata, běžně označovaná jako *Dulse*, je známá a vysoce ceněná červená řasa rozšířená podél pobřeží severního Atlantiku. Jedná se o komerčně významný druh, u kterého se dochovaly historické zmínky, že řasa *Dulse* byla používána jako potrava již před několika stoletími. Řasa představuje charakteristický tvar rostliny sestávající ze zploštělých podlouhlých listů rozšiřujících se ze středu vějířku do tvaru ruky nebo dlaně. Listy vycházejí z diskovitého držení. Někteří jedinci mohou dorůst až do velikosti 50 cm, ale obvyklá výška bývá okolo 10–20 cm. Nové rostliny mají výraznou svěží červenou barvu, zatímco starší rostliny jsou červenohnědé až hnědé. Ve výjimečných situacích mohou během časných letních měsíců v důsledku vyšších teplot a zvýšeného vystavení slunečnímu záření zezelenat nebo dokonce vybělit, což způsobí změny ve složení pigmentů [41].



Obrázek 9: Řasa *Dulse* [42]

Sacharidy tvoří až 74 % suché hmotnosti. Prvním zástupcem jsou xylany, které jsou primární složkou buněčné stěny tohoto druhu. Jsou v podstatě složeny z β -(1-4) a β -(1-3) vázaných D-xylózových jednotek v poměru asi 4:1. Vzhledem k tomu, že jsou xylany nestravitelné, jsou považovány za hlavní zdroj vlákniny a jsou přítomny v rozpustné i nerozpustné formě. Dále se v *Dulse* vyskytuje menší množství celulózy, floridosidu (α -D galaktopyranosyl-(1-2)-glycerol) a floridského škrobu (glukan podobný amylopektinu). Floridosid je spojen s imunostimulační aktivitou v reakci na antigeny s potenciálními terapeutickými aplikacemi [42].

Obsah bílkovin v *P. palmata* je jedním z hlavních důvodů komerčního zájmu o tento druh pro potraviny. Obsahuje také bílkovinné ve vodě rozpustné pigmenty, tj. hlavně fykoerythrin a v menší míře fykocyanin. Disponuje relativně vysokým podílem esenciálních aminokyselin, jako jsou glutamát, aspartát, alanin, arginin, glycin, serin, leucin nebo valin, a také esenciální AMK, které jsou často limitujícími zdroji rostlinné potravy, tj. methionin, lysin, threonin a tryptofan. Je třeba poznamenat, že cca 10 % celkového obsahu aminokyselin v *Dulse* je ve formě volných aminokyselin [43]. I přes nízký celkový obsah lipidů ve srovnání s typickými rostlinnými zdroji tuků jsou mono a polynenasycené mastné kyseliny (MUFA a PUFA) vysoce zastoupeny. *Dulse* je bohatá na ω -3 PUFA s dlouhým řetězcem, konkrétně na kyselinu eikosapentaenovou (EPA). Neobsahuje však žádné významné množství kyseliny dokosahexaenové (DHA), díky čemuž je *P. palmata* zajímavou surovinou pro výrobu vysoce čistých koncentrátů EPA. Co se týče vitamínů, *Dulse* je považována za dobrý zdroj vitamínu B, zejména B₁, B₂ a B₁₂. Z vitamínů rozpustných v tucích je *P. palmata* zvláště bohatá na β -karoten, známý jako provitamin A, a také vitamín K [42].

2.10.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae je kvasinka, která hraje významnou roli v potravinářském průmyslu a farmacii. Jedná se o kvasinku spadající do kategorie jednobuněčné houby, které mají strukturní vlastnosti podobné vlastnostem vyšších eukaryotických buněk. To znamená, že obsahují buněčnou stěnu, jádro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, vakuoly a sekreční vāčky spolu s komplexní extracelulární a intracelulární membránovou sítí. *S. cerevisiae* má obecně elipsoidní tvar o velikosti 5–10 μ m [44].

Tabulka 1: Klasifikace *S. cerevisiae* [45]

Klasifikace	
Doména	<i>Eukarya</i>
Kmen	<i>Ascomycota</i>
Třída	<i>Saccharomycetes</i>
Řád	<i>Saccharomycetales</i>
Čeleď	<i>Saccharomycetaceae</i>
Rod	<i>Saccharomyces</i>
Druh	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Kvasinka obsahuje spoustu významných bioaktivních látek, které mají zajímavý přínos pro lidské zdraví. První skupinou bioaktivních látek jsou vitamíny. Kvasinka *S. cerevisiae* disponuje vitamíny skupiny B, jako jsou thiamin (B₁), kyselina panthothénová (B₅), pyridoxin (B₆), biotin (B₇) a kobalamin (B₁₂). Tyto vitamíny skupiny B napomáhají lepšímu trávení, podporují činnost nervové soustavy, imunitu, vedou k tvorbě červených krvinek a zlepšují funkci pokožky a sliznic [46]. Mezi minerální látky, které se v kvasince nacházejí, patří

například draslík, vápník, hořčík, železo nebo selen. Další skupinou bioaktivních látek, jež kvasinka obsahuje jsou esenciální aminokyseliny, které jsou nepostradatelné pro správné fungování lidského těla [44].

S. cerevisiae je základní složkou při fermentaci potravin a nápojů, ve kterých má vysoký komerční význam. V evropském kvasnicovém průmyslu se ročně vyrobí 1 milion tun, z čehož asi 30 % se vyváží do celého světa. Pokud jde o nápojový průmysl, *S. cerevisiae* se využívá pro výrobu mnoha kvašených nápojů, jako je víno, pivo a cider; destilované nápoje, jako je rum, vodka, whisky, brandy a saké. Fermentace může probíhat buď samovolným vývojem mikroflóry suroviny nebo přidáním čisté kultury kvasinek. *S. cerevisiae* je také nejběžnějším druhem kvasnic v chlebu a v kvásku. Od 19. století se používá jako startovací kultura, kde se pekařské kvasnice získávaly ze zbytků výroby piva. V roce 1792 byly v Anglii vyrobeny první lisované kvasnice pro pečení a vaření piva a v roce 1800 byly dostupné v severní Evropě, zatímco v USA v roce 1868 byly zavedeny lisované kvasnice vylepšeného kmene a usnadnily výrobu chleba ve velkém měřítku [47].

2.11 Bezpečnost látek přidávaných do potravin

Jakékoliv látky, kterou jsou záměrně, za účelem zlepšení nebo cílené úpravy vlastností, přidávány do potravin, se souhrnně nazývají potravinové přísady (aditiva). Upravují fyzikální, chemické, biologické nebo senzorycké vlastnosti potravin. Potravinářské přísady mohou působit jako alergeny a vyvolávat imunitní reakce. Takové reakce mohou vytvářet různé klinické obrazy nebo mohou zhoršit různá onemocnění, jako je eozinofilní ezofagitida, bronchiální astma, atopická dermatitida, kontaktní dermatitida, chronická kopřivka nebo anafylaxe [48]. Z tohoto důvodu musí být aditiva schválena americkou společností FDA (Food and Drug Administration). Aditiva jsou všechny látky, které se stávají součástí potravin, ať už přímo nebo nepřímo, a tím pádem ovlivňují jejich vlastnosti. Přísady by při zpracování potravin měly být potravinářské kvality a neměly by vykazovat toxicitu a reaktivnost. Mezi nejznámější aditiva, která jsou přímou součástí potravin, můžeme zařadit konzervanty a barviva. Látky, jež nejsou přímou součástí potravin, se do nich dostanou až po procesu výroby [49].

Existují látky, které schválení od FDA nepotřebují, protože jsou podle GRAS (Generally Recognized As Safe) považovány za bezpečné [50]. Podle GRAS se tedy jedná o látky, které by neměly vykazovat žádné nežádoucí účinky na zdraví člověka při určitém použití. Systém pro přezkoumání a schvalování přísad pro přidávání do potravin, byl vytvořen, v době, kdy byla kritická potřeba méně doktrinářského přezkumu přísad do potravin. Schvalovací proces GRAS pro potravinářskou přísadu se opírá o úsudek „odborníků kvalifikovaných vědeckým školením a zkušenostmi pro hodnocení její bezpečnosti“, jehož konečný produkt není o nic lepší nebo horší než produkt FDA, ale často je rychlejší [50]. Aby látka mohla získat status GRAS, musí se poskytnout údaje o podrobném popisu látky, v jakém množství bude daná látka přidána do potravin a prokázání o bezpečnosti za určitých podmínek. Dále se provádějí testy bezpečnosti z hlediska chemického, toxikologického nebo environmentálního. V rámci evropské komise byly mikrořasy *Chlorella* a *Spirulina* stejně jako kvasinka *S. cerevisiae* v roce 2020 zařazeny do kategorie bezpečných potravin. Lze je používat jako doplněk stravy (ve formě prášku) [50; 51].

2.12 Používané analytické metody

2.12.1 UV-VIS spektrofotometrie

UV/VIS spektrofotometrie je fyzikálně-chemická metoda, která se řadí mezi molekulovou absorpční spektrometrii. Rozsah vlnových délek, při kterých UV/VIS spektrofotometrie pracuje je v rozmezí 200–800 nm. UV/VIS spektrofotometrie pracuje na principu měření energie pohlcené vzorkem (látkou) při průchodu záření. Měřením jsou získána absorpční spektra, která jsou graficky vyjádřena jako závislost absorbance na vlnové délce. Absorpcí elektromagnetického záření molekulou dojde ke změně elektronového stavu dané látky (molekuly) – dojde k elektronovým přechodům. Jinými variantami spekter jsou závislosti transmitance nebo extinkčního koeficientu na vlnové délce. Nejčastěji se využívá měření absorbance, přičemž závislost absorbance na koncentraci a tloušťce kyvety je popsána matematicko-fyzikální rovnicí plynoucí z Bouguerova–Lambertova–Beerova zákona (Rovnice 1). Platnost zákona je omezena na zředěné roztoky, protože tvrzení, že extinkční koeficient je nezávislý na koncentraci látky při dané vlnové délce, se vztahuje pouze na zředěné roztoky do koncentrace 10^{-2} mol/dm³. U roztoků s koncentrací nad 10^{-2} mol/dm³ je extinkční koeficient závislý na indexu lomu roztoku, a tudíž není koeficientem. Extinkční koeficient je pro různé látky charakteristický.

Rovnice 1. Rovnice Bouguerova–Lambertova–Beerova zákona

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

kde A = absorbance, ε = molární absorpční (extinkční) koeficient, c = látková koncentrace a l = délka kyvety [52].

2.12.2 Extrakce

Extrakce se řadí mezi jednoduché separační metody, při které přechází složka ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze. Jejím principem je izolace požadovaných bioaktivních látek z matrice, kde se za normálních podmínek vyskytují. Aktivní látka se během extrakce extrahuje do určitého rozpouštědla, tedy do kapalného extrahovadla. Díky tomu je extrahovaná látka lépe rozpustná. Mezi nejvíce využívané extrakce můžeme zařadit extrakce do kapalných organických rozpouštědel. Nejčastěji se extrahuje do ethanolu, hexanu, ethylacetátu, methanolu a acetonu. Na rozdíl od destilace, krystalizace a sublimace je extrakce velmi výhodná pro izolaci tepelně nestálých látek, protože se může provádět i za laboratorní teploty nebo za chladu. Obecně platí, že opakovaná extrakce několika menšími dávkami rozpouštědla je účinnější než jediná extrakce celým množstvím rozpouštědla [53].

Mezi další typy můžeme zařadit přetlakovou fluidní extrakci, superkritickou fluidní extrakci, extrakci pomocí ultrazvuku nebo pomocí mikrovln [54]. Optimální metoda extrakce by měla být jednoduchá, bezpečná, reprodukovatelná, nenákladná a vhodná pro průmyslové aplikace. Účinnost však závisí na správně připraveném vzorku, na dobře zvoleném rozpouštědle a vhodných podmínkách, jako je například teplota nebo čas a rychlost třepání. Ke zvýšení výtěžnosti lze také použít mechanické vlivy, jako je přidání skleněných kuliček do extraktu, zmrazení extraktu nebo použití ultrazvuku. Z biochemického hlediska lze použít také detergenty a enzymy [55].

2.12.3 Chromatografie

Chromatografie zahrnuje širokou škálu fyzikálních metod pro analýzu nebo separaci komplexních směsí. Tato metoda využívá vysoké rozlišení komponent, což vede k usnadnění separací velmi složitých směsí. Principem chromatografie je dělení složek směsi mezi dvěma fázemi, tzv. mobilní a stacionární, někdy také označovány jako pohyblivá a nepohyblivá fáze. Mobilní fáze může být plynná nebo kapalná, zatímco stacionární fáze může nabývat pouze kapalně nebo pevně skupenství. Kapalnou stacionární fází tvoří vrstva kapaliny nanesená na tuhých částicích nebo na vnitřní stěně kapilární kolony, zatímco pevnou stacionární fází představují malé porézní částice o průměru jednotek až stovek mikrometrů. Podle skupenství mobilní a stacionární fáze se dělí různé chromatografické techniky. Při průchodu separačním systémem přejde každá složka vzorku mnohokrát z mobilní fáze do stacionární a zpět. V každém okamžiku musí být systém velmi blízko rovnováze, kdy počet částic nově vázaných na stacionární fází je roven počtu, které v daném okamžiku přejdou ze stacionární do mobilní fáze. Tuto rovnováhu popisuje distribuční konstanta K_D , která je definovaná pro rovnováhu analytu mezi mobilní a stacionární fází. Časový záznam signálu detektoru, kterým protéká mobilní fáze za kolonou se označuje jako chromatogram. Protože se zóny jednotlivých složek během své cesty kolonou rozšiřují, záznam má tvar chromatografických píků [52; 56].

2.12.4 Stanovení antioxidační aktivity

Pojmem antioxidanty se rozumí molekuly, které chrání naše tělo před nadbytečným množstvím volných radikálů. Měly by omezovat či zabránovat jejich oxidační destrukci. Mezi přírodní látky s antioxidačními účinky, které přijímáme v potravě, můžeme zařadit vitamíny C a E, karotenoidy a polyfenolické látky, kde patří například flavonoidy, katechiny nebo fenolické kyseliny. Tyto látky jsou obsaženy v ovoci a zelenině, vláknině, vínu, čaji nebo v aromatických a léčivých rostlinách. Existuje několik metod stanovení antioxidační aktivity. Princip spočívá v různých mechanismech, nejčastěji však jde o přímou reakci s radikály, a to formou zhasnutí nebo vychytávání, nebo reakci s přechodnými kovy. Obecně se metody stanovení charakterizují do dvou skupin: metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a metody posuzující redoxní vlastnosti látek [57].

Ke stanovení antioxidační aktivity se nejčastěji využívá metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) využívající ABTS. Tato metoda testuje, zda je vzorek či látka schopná zhasnout kation-radikál $ABTS^{•+}$ (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Principem je srovnání výsledné antiradikálové aktivity vzorku nebo látky s antiradikálovou aktivitou Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Antioxidanty působí jako donory vodíku, které zhasnejí radikál $ABTS^{•+}$. Metoda se provádí spektrofotometricky, funguje na základě změn absorpčního spektra $ABTS^{•+}$, při vlnové délce 734 nm. Metoda TEAC je považována za nenáročnou a rychlou metodu se širokým spektrem uplatnění [57; 58].

2.12.5 Imunochemické stanovení lepku (RIDASCREEN® Gliadin competitive)

Ke stanovení lepku v potravinách jsou nejčastěji využívány testy ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Jedná se o molekulárně biologický test běžně používaný pro detekci a kvantifikaci různých molekul, včetně peptidů, proteinů nebo protilátek. Základní molekulární složky testu ELISA typicky zahrnují použití protilátky konjugované s enzymem, imobilizovanou molekulou zájmu a detekční substrát. Kritický aspekt, který určuje úspěšnost

a kvalitu dat získaných z ELISA testů, je závislý na afinitě a specificitě interakcí protilátka-antigen. Tyto interakce jsou ovlivněny řadou faktorů, včetně pH, teploty a iontové síly. Obvykle se ELISA provádí ve vícejamkových mikrotitračních destičkách. Většina komerčních testovacích souprav ELISA je založena na monoklonálních protilátkách. Metoda je však velmi nákladná a reprodukovatelnost výsledků se liší v závislosti na typu testovací soupravy ELISA [59].

RIDASCREEN® Gliadin Competitive je metoda, která se používá pro analýzu fermentovaných a hydrolyzovaných potravin jako je například škrob, škrobový sirup, pivo, zákvas, sladový extrakt, sójová omáčka a další, které jsou deklarovány jako bezlepkové. Lze tedy tuto metodu využít na vybrané cereálie v této práci. Funguje na bázi monoklonální protilátky R5, která rozpoznává mimo jiné potenciálně toxickou sekvenci QQFPF, jež se vyskytuje v molekulách prolaminu [59; 60].

2.12.6 Antimikrobiální testy

K hodnocení nebo screeningu *in vitro* antimikrobiální aktivity extraktu nebo čisté sloučeniny lze použít různá laboratorní stanovení. Testování antimikrobiální citlivosti lze použít pro objevování léků, epidemiologii a predikci terapeutického výsledku. Základními, a hlavně nejznámějšími, jsou difúzní a diluční metody. Jiné typy metod se používají zejména pro antimykotické testování. Pro další hloubkové studium antimikrobiálního účinku látky se doporučují metody „time-kill“ test a průtokové cytometrické metody, které poskytují informace o povaze inhibičního účinku. Vzhledem k tomu, že roste zájem o rozšíření vlastností nových antimikrobiálních produktů, je důležité lépe porozumět i současným dostupným metodám pro screening nebo kvantifikaci antimikrobiálního účinku extraktu nebo čisté sloučeniny pro jeho aplikace v oblasti lidského zdraví, zemědělství a životním prostředí [61].

Agarové diskové difúzní testy, vyvinuté v roce 1940, jsou oficiální metodou používanou v mnoha klinických mikrobiologických laboratořích pro rutinní testování antimikrobiální citlivosti. V současné době je mnoho akceptovaných a schválených standardů publikováno Institutem klinických a laboratorních standardů (CLSI) pro testování bakterií a kvasinek [62]. Ačkoli ne všechny náročné bakterie mohou být touto metodou přesně testovány, byla provedena standardizace pro testování určitých náročných bakteriálních patogenů, jako jsou streptokoky, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* a *Neisseria meningitidis*, a to pomocí specifických kultivačních médií a různých inkubačních podmínek pro inhibiční zóny. Při tomto dobře známém postupu se agarové plotny naočkují standardizovaným inokulem testovaného mikroorganismu. Potom se na povrch agaru umístí kolečka filtračního papíru (o průměru asi 6 mm), obsahující testovanou sloučeninu v požadované koncentraci. Petriho misky se inkubují za vhodných podmínek. Obecně antimikrobiální činidlo difunduje do agaru a inhibuje klíčení a růst testovaného mikroorganismu a poté se měří průměry inhibičních růstových zón [61; 62].

Diluční metody jsou nejvhodnější pro stanovení hodnot minimální inhibiční koncentrace, protože nabízejí možnost odhadnout koncentraci testovaného antimikrobiálního činidla v agaru nebo bujónu. Zaznamenaná hodnota minimální inhibiční koncentrace je definována jako nejnížší koncentrace testovaného antimikrobiálního činidla, která inhibuje viditelně růst testovaného mikroorganismu, a obvykle se vyjadřuje v $\mu\text{g/ml}$ nebo mg/l . Existuje mnoho schválených pokynů pro testování citlivosti na ředění náročných nebo nenáročných bakterií, kvasinek a vláknitých hub. Nejuznávanější normy poskytuje CLSI a Evropský výbor pro

testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST). Jak bylo doporučeno, tyto pokyny poskytují jednotný postup testování, který je praktické provádět ve většině laboratoří klinické mikrobiologie. Vývoj metodických standardů sice nezaručuje klinickou relevanci takového testování, nicméně umožňuje provádět biologickou zkoušku standardizovaným přístupem za účelem srovnávacího vyhodnocení klinické relevance výsledků [61].

2.12.7 Stanovení cytotoxicity

Cytotoxicita je nejdůležitějším parametrem bezpečnosti při testování potravinových doplňků, kosmetických přípravků nebo léčiv. Jedná se o schopnost dané sloučeniny způsobovat buněčnou smrt, a to pomocí změn v buněčném chování nebo v buněčných procesech. *In vitro* testy cytotoxicity jsou založeny na sledování viability buněk, které jsou vystaveny dané testované látce. Existuje několik různých parametrů, podle kterých se posuzuje stav buňky. Patří mezi ně proliferace buněk, sledování mitochondriální aktivity, integrita buněčné membrány a další. Tyto metody jsou zařazovány mezi metody jednoduché, díky tomu, že umožňují otestovat větší množství vzorků za poměrně krátký čas. Výsledky těchto testů jsou důležitým prvkem pro vývoj nových léčiv a doplňků. Testy mohou probíhat za pomoci redukce tetrazoliových solí, redukce resazurinu, měření množství laktátdehydrogenázy, měření množství ATP nebo barvení trypanovou modří. Buněčné kultury, které se využívají k testování cytotoxicity materiálů, se získávají izolací z těla laboratorního zvířete nebo člověka. Pro *in vitro* testování toxicity se využívá několik tisíc sbírkových buněčných kultur, které jsou izolovány z různých zdrojů. Každá buněčná kultura se vyznačuje specifickým stupněm složitosti a příbuznosti se související *in vivo* situací [63].

MTT test se řadí mezi nejpoužívanější metody stanovení cytotoxicity. Principem tohoto testu je stanovení metabolické aktivity buňky. Metoda využívá žlutě zbarvené MTT (monotetrazoliová sůl), která má schopnost pronikat buněčnou a vnitřní mitochondriální membránou; z důvodu jejího lipofilního charakteru. Mitochondriální enzymy oxidoreduktázy a dehydrogenázy metabolicky aktivních buněk jsou schopny redukce MTT na formazan (modrofialová barva). Při MTT testu nejprve dochází k inkubaci buněk se solí MTT. Jelikož je formazan nerozpustný ve vodě, přidává se k buňkám SDS. Díky působení SDS dochází ke změně zbarvení, která je pomocí spektrofotometru zachycena při vlnové délce 540 nm. Výsledky mohou být ovlivněny několika faktory, jako jsou například podmínky inkubace buněk, jejich počet nebo koncentrace MTT [64; 65].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce, která se zabývá vývojem cereálních výrobků pro zvláštní výživu s přídavkem luštěnin, řas a kvasinek, je vypracování a shrnutí těchto bodů:

- přehledná literární rešerše o přehledu bezlepkových cereálií a možnostech obohacení cereálních výrobků
- výběr cereálií, luštěnin, řas a kvasinek pro přípravu obohacených cereálních produktů
- optimalizace metod stanovení základních nutričních složek cereálií a luštěnin a speciálních složek řas a kvasinek
- příprava směsných produktů a jejich charakterizace.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Použité cereálie

Pro tuto diplomovou práci byly k analýze vybrány tři druhy bezlepkových cereálií, konkrétně pohanka, quinoa a bezlepkové ovesné vločky. Tyto vybrané vzorky byly komerčně zakoupeny. Údaje o nutričním složení komerčně zakoupených cereálií jsou uvedeny v Tabulka 2.

Tabulka 2: Nutriční složení analyzovaných cereálií vztahované na 100 g produktu

	Značka	Energetická hodnota [kcal]	Sacharidy [g]	Bílkoviny [g]	Tuky [g]	Sůl [g]
Pohanková krupice	Šmajstrla	350	73,8	7,4	1,8	0,01
Quinoa bílá	PROVITA	355	58	15	5,5	0,02
Bezlepkové ovesné vločky	PROVITA	366	61	12	6,2	0,02

4.1.2 Použité luštěniny

V rámci této diplomové práce byly vzorky cereálií obohacovány mimo jiné i luštěninami. K analýze byly vybrány hrách, červená čočka a černá čočka Beluga. Tyto luštěniny byly vybírány z důvodu vysokého obsahu bílkovin. Nutriční složení vybraných luštěnin znázorňuje Tabulka 3.

Tabulka 3: Nutriční složení analyzovaných luštěnin vztahované na 100 g produktu

	Značka	Energetická hodnota [kcal]	Sacharidy [g]	Bílkoviny [g]	Tuky [g]	Sůl [g]
Hrách žlutý	PROBIO	338	59	24	0,8	0,01
Červená čočka	PROBIO	315	39,2	24,7	1,3	0,01
Černá čočka Beluga	COUNTRY LIFE	353	60	26	1,1	0,02

4.1.3 Použité řasy a kvasinky

Co se týče řas, v rámci této diplomové práce bylo pracováno celkem se třemi druhy. Byly vybrány komerčně dostupné řasy, konkrétně makrořasa *Dulse* a mikrořasy *Chlorella* a *Spirulina*. Řasa *Dulse* byla zakoupena ve formě vloček, *Chlorella* a *Spirulina* ve formě prášku. Informace o nutričním složení řas uvádí Tabulka 4.

Tabulka 4: Nutriční složení analyzovaných řas vztahované na 100 g produktu

	Značka	Energetická hodnota [kcal]	Sacharidy [g]	Bílkoviny [g]	Tuky [g]	Sůl [g]
<i>Dulse</i>	Zdravý den	227	22	17	1,3	4,1
<i>Chlorella</i>	Allnature	343	13,8	60,7	2,3	0,2
<i>Spirulina</i>	Allnature	336	13,1	65,9	1,0	0,9

Z hlediska kvasinek bylo v této diplomové práci pracováno se dvěma druhy. Prvním typem byly kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ve formě sušeného pekařského droždí, které bylo komerčně zakoupeno v obchodní síti Lidl. Jedno balení váží 7 gramů a odpovídá 21 gramům čerstvého droždí. Jako druhý typ kvasinky byla použita *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-102, která byla kultivována na Fakultě chemické VUT v Brně.

4.2 Seznam použitých chemikálií

ABTS p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Acetonitril, Penta (ČR)
Dodecylsírán sodný, Serva (SRN)
Dusitan sodný p.a., Lachema (ČR)
Dusík 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
Ethanol 96 % p.a., Penta (ČR)
Ethylacetát, Penta (ČR)
Fenol p.a., Lach-Ner (ČR)
Folin-Ciocalteuovo činidlo, VWR Chemicals (USA)
Glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner (ČR)
Hexan p.a., Lach-Ner (ČR)
Hovězí sérový albumin (BSA), VWR Chemicals (USA)
Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Chlorid hlinitý p.a., Lach-Ner (ČR)
Chloroform p.a., Penta (ČR)
Katechin, Sigma-Aldrich (SRN)
Kit pro stanovení β -glukanů, β -Glucans Assay Kit (Mixed Linkage), Megazyme (IRL)
Kit pro stanovení β -glukanů, β -Glucans Assay Kit (Yeast and Mushroom), Megazyme (IRL)
Kit pro stanovení lepku, RIDASCREEN® Gliadin competitive, R-Biopharm (SRN)
Kyselina gallová monohydrát, Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina chlorovodíková, Lach-Ner (ČR)
Kyselina sírová p.a., Lach-Ner (ČR)
Methanol p.a., Penta (ČR)
MTT, Duchefa Biochemie (NL)
PBS, Sigma (SRN)
Peroxodisírán draselný, Sigma-Aldrich (SRN)
Sírán měďnatý pentahydrát p.a., Lach-Ner (ČR)
Skleněné kuličky, průměr 0,25-0,5 mm, Carl Roth (SRN)
Trolox p.a., Sigma-Aldrich (SRN)
Trypanová modř, Biotech (SRN)
Trypsin, Versene EDTA, P-Lab (ČR)
Uhlíčan sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Vinan sodno-draselný tetrahydrát p.a., Lach-Ner (ČR)

4.3 Seznam použitých přístrojů

Analytické váhy Pioneer, Ohaus (USA)
Automatické pipety, Biohit (DE), Discovery
Box Aura mini, BioTech (ČR)
Centrifuga MIKRO 120, Hettich (SRN)
Centrifuga Z 366, Hermle (SRN)
ELISA Reader Synergy HTX, BioTek (SRN)
GC sestava se detektorem FID (Thermo Fischer Scientific, USA)

HPLC sestava s detektorem PDA (Thermo Fischer Scientific, USA)
Kávový mlýnek Sencor SCG 1050BK
Laminární box Airstream, ESCO (SRN)
Lyofilizátor FreeZone 4.5 Freeze Dry Systém, Labconco (USA)
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
Předvážky, Ohaus (USA)
Temperovaná třepačka-Heidolph Inkubator 1000 (DE)
Termoblok Dry Block Heater, Ohaus
Topná lázeň HB4 basic, HBA Labortechnik
Třepačka Unimax 1010, Heidolph (SRN)
Ultrazvuk, EMAG, Emmi H60, (DE)
Ultrazvuková lázeň bez ohřevu, Ultrasonic Compact Cleaner 1,25 l, Powersonic
UV-VIS spektrofotometr 1600PC, VWR (BE)
UV-VIS spektrofotometr, Boeco (SRN)
UV-VIS spektrofotometr, NanoPhotometer IMPLLEN, (DE)
Vodní lázeň TW 2, Julabo GmbH (SRN)
Vortex-Fixed speed vortex mixer, Ohaus (USA)
Vortex Genie, Scientific Industries, Inc. (USA)

4.4 Buněčné kmeny

4.4.1 Použité bakterie k testování antimikrobiální aktivity

K antimikrobiálním testům byly použity dva kmeny bakterií. Ze zástupců gram pozitivních bakterií byla vybrána bakterie *Micrococcus luteus* CCM 1569. Z gram negativních kmenů byla vybrána *Serratia marcescens* CCM 8587.

4.4.2 Použité linie humánních buněk

K testování cytotoxicity na vybraných analyzovaných vzorcích byla použita buněčná linie CaCO-2 Human Colon Adenocarcinoma cell line, permanent cell line. Tyto buňky byly izolovány z primárního nádoru tlustého střeva 72letého dárce mužského pohlaví, ze sbírky buněčných kultur Cell Lines Service, Eppelheim (Německo). Jedná se o heterogenní řadu buněk lidského epitelálního kolorektálního adenokarcinomu. Tato buněčná linie je široce využívána k analýzám *in vitro*.

4.5 Metody

4.5.1 Příprava vzorků pro analýzy

4.5.1.1 Příprava vzorků cereálií a luštěnin

Vzorky komerčně zakoupených cereálií a luštěnin byly nejprve pomocí kávového mlýnku rozemlety na mouky. Následně byly připraveny vodné extrakty sloužící k analýzám cereálií a luštěnin, přičemž byl navážen vždy 1 g mouky, který byl zalit 10 ml destilované vody. Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu, poté byly zkumavky se vzorky přemístěny na třepačku, kde probíhalo pravidelné míchání 24 hodin při 37 °C a otáčkách 150 rpm. Po skončení extrakce byl obsah zkumavek zcentrifugován (10 min při 9000 rpm) a supernatant byl přepipetován do čistých zkumavek. Vzorky byly před použitím na další stanovení uchovány v chladicím boxu při 4 °C.

4.5.1.2 Příprava extraktů z řas

Extrakt byly připraveny z komerčně zakoupených řas *Dulse*, *Chlorella* a *Spirulina*. Do malých šroubovacích zkumavek bylo naváženo 25–30 mg vzorku řasy. K biomase byl přidán 1 ml rozpouštědla. K přípravě extraktů z řas byla vybrána tato rozpouštědla:

- destilovaná voda
- 96 % ethanol
- hexan
- ethylacetát
- hexan a 96 % ethanol v poměru 1:1
- ethylacetát a 96 % ethanol v poměru 1:1.

Takhle připravené extrakt byly promíchány na ručním vortexu a umístěny do ultrazvukové lázně vyhřáté na 60 °C na 30 minut. Po uplynutí této doby byl obsah zkumavek opět promíchán na ručním vortexu. Dále byly extrakt umístěny do mrazáku na dobu 10 minut. Poté byly vzorky zcentrifugovány při otáčkách 4500 rpm na 10 minut. Následně byl do čistých plastových zkumavek odpipetován supernatant. Tento postup byl opakován celkem třikrát.

Pro každý extrakt z *Dulse*, *Chlorella* či *Spirulina* byla provedena také extrakce s přidavkem skleněných kuliček, které byly přidány za účelem zvýšení účinnosti extrakce v důsledku rozrušení buněčné stěny. Extrakt byly připraveny stejným postupem, kdy na začátku extrakce bylo k biomase přidáno stejné množství skleněných kuliček. Takhle připravené extrakt byly před dalšími analýzami uchovány v mrazáku při -18 °C.

4.5.1.3 Příprava extraktů z kvasinek

Kvasinkové extrakt byly připraveny ze sušeného pekařského droždí a *Saccharomyces cerevisiae*. Do malých šroubovacích zkumavek bylo naváženo 25–30 mg vzorku kvasinek. K biomase byl přidán 1 ml rozpouštědla. K přípravě extraktů byla použita tato rozpouštědla:

- 96 % ethanol
- hexan
- ethylacetát
- hexan a 96 % ethanol v poměru 1:1
- ethylacetát a 96 % ethanol v poměru 1:1.

Dále bylo postupováno stejným způsobem jako v kapitole 4.5.1.2.

4.5.1.4 Optimalizace přípravy extraktů z řas a kvasinek

Při přípravě různých extraktů bylo zjištěno, že přidáním skleněných kuliček do extraktů řas a kvasinek docházelo k vyšší účinnosti extrakce. Jak už bylo zmíněno v kapitole 4.5.1.2, skleněné kuličky narušují buněčnou stěnu biomasy, a tím pádem dochází k vyššímu uvolnění analyzovaných bioaktivních látek do rozpouštědla. Dále bylo zjištěno, že přidáním nižší navážky biomasy do rozpouštědla docházelo díky skleněným kuličkám k efektivnější extrakci. Ke zvýšení efektivnosti extrakce byl použit automatický vortex namísto ručního. Dle těchto poznatků byl navržen nový postup přípravy extraktů z řas a kvasinek.

Do malých šroubovacích zkumavek bylo naváženo 10–20 mg vzorku řasy nebo kvasinky a stejné množství skleněných kuliček. K biomase byl přidán 1 ml rozpouštědla. K přípravě extraktů z řas byla vybrána tato rozpouštědla:

- destilovaná voda
- 96 % ethanol
- hexan
- ethylacetát
- hexan a 96 % ethanol v poměru 1:1
- ethylacetát a 96 % ethanol v poměru 1:1.

K přípravě extraktů z kvasinek byla použita tato rozpouštědla:

- 96 % ethanol
- hexan
- ethylacetát
- hexan a 96 % ethanol v poměru 1:1
- ethylacetát a 96 % ethanol v poměru 1:1.

Takhle připravené extrakty byly promíchány na automatickém vortexu po dobu 10 minut a umístěny do ultrazvukové lázně vyhřáté na 60 °C na 30 minut. Po uplynutí této doby byl obsah zkumavek opět promíchán na automatickém vortexu po dobu 10 minut. Dále byly extrakty umístěny do mrazáku na dobu 10 minut. Poté byly vzorky zcentrifugovány při otáčkách 4500 rpm na 10 minut. Následně byl do čistých plastových zkumavek odpipetován supernatant. Tento postup byl opakován celkem třikrát. Extrakty byly před dalšími analýzami uchovány v mrazáku při -18 °C.

Před samotnou charakterizací extraktů z řas a kvasinek byly hexanové, ethylacetátové a směsné extrakty (hexan:ethanol a ethylacetát:ethanol v poměru 1:1) odpařeny na termobloku při 50 °C za pomoci inertního dusíku. Po odpaření byla sraženina rozpuštěna v ethanolu, ve stejném objemu jako představoval původní extrakt. Sraženina byla rozpuštěna pomocí ultrazvuku a následně byla připravena k dalším analýzám.

4.5.1.5 Příprava směsí

V rámci této diplomové práce byly připraveny směsi cereálií obohacené o přídavky luštěnin, řas a kvasinek. Jako základ byla vybrána quinoa, která z analyzovaných cereálií v této práci vykazovala nejlepší výsledky. Na základě dalších získaných výsledků byly k přípravě směsí vybrány tyto vzorky:

- hrách
- hexanový a ethanolový (96 %) extrakt *Chlorella* v poměru 1:1
- hexanový a ethanolový (96 %) extrakt *Spirulina* v poměru 1:1
- hexanový a ethanolový (96 %) extrakt *Saccharomyces cerevisiae* v poměru 1:1
- ethanolový (96 %) extrakt *Saccharomyces cerevisiae*
- biomasa *Chlorella*
- biomasa *Spirulina*.

Směsi byly zality horkou destilovanou vodou o teplotě 80 °C. Celkem bylo připraveno 11 cereálních kaší a 1 kontrolní, která obsahovala pouze základ, tedy quinou. Složení připravených směsí je uvedeno v Tabulka 5 a Tabulka 6.

Tabulka 5: Složení připravených cereálních kaší 1

Složka	Základ	Směs A	Směs B	Směs C	Směs D	Směs E
Quinoa [g]	10	5	10	10	10	10
Hrách [g]	–	5	–	–	–	–
Extrakt <i>Chlorella</i> [ml]	–	–	1	–	–	–
Extrakt <i>Spirulina</i> [ml]	–	–	–	1	–	–
Extrakt <i>Sc</i> [ml]	–	–	–	–	1	–
EtOH extrakt <i>Sc</i> [ml]	–	–	–	–	–	1
<i>Chlorella</i> biomasa [g]	–	–	–	–	–	–
<i>Spirulina</i> biomasa [g]	–	–	–	–	–	–
Destilovaná voda [ml]	15	15	14	14	15	15

Tabulka 6: Složení připravených cereálních kaší 2

Složka	Směs F	Směs G	Směs H	Směs I	Směs J	Směs K
Quinoa [g]	5	10	5	10	10	10
Hrách [g]	5	–	5	–	–	–
Extrakt <i>Chlorella</i> [ml]	0,5	0,5	–	–	–	–
Extrakt <i>Spirulina</i> [ml]	0,5	0,5	–	–	–	–
Extrakt <i>Sc</i> [ml]	–	–	0,5	0,5	–	–
EtOH extrakt <i>Sc</i> [ml]	–	–	0,5	0,5	–	–
<i>Chlorella</i> biomasa [g]	–	–	–	–	1	–
<i>Spirulina</i> biomasa [g]	–	–	–	–	–	1
Destilovaná voda [ml]	12	12	12	12	15	15

Připravené cereální kaše byly po vychladnutí ponechány v mrazáku při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 24 hodin. Po uplynutí této doby byly vzorky směsí zlyofilizovány. Po lyofilizaci byly vzorky až do dalších analýz uchovány v mrazáku při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Následně byly z lyofilizovaných vzorků připravených cereálních kaší připraveny vodné extrakty podle kapitoly 4.5.1.5. Tyto vodné extrakty byly použity k dalším stanovením.

4.5.2 Metody charakterizace různých typů materiálu

4.5.2.1 Kultivace *Saccharomyces cerevisiae*

Z kryoizolatů uchovávaných při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly zaočkovány na sterilní YPD médium v Petriho miskách vybrané kvasinky. Zaočkováná kultura byla po dobu 3–4 dní inkubována při laboratorní teplotě. Kultivace *Saccharomyces cerevisiae* probíhala ve dvou stupních, kdy byla připravena inokula I a II. Obě inokula byla kultivována v YPD médium o složení uvedeném v Tabulka 7.

Tabulka 7: Složení používaného YPD média

Složka	Množství
glukóza	2 g
pepton	2 g
kvasničný autolyzát	1 g
voda	100 ml

Inokulum I bylo namícháno v množství 50 ml YPD média do 250 ml Erlenmeyerovy baňky. Inokulum II bylo připraveno namícháním 100 ml YPD média do 500 ml Erlenmeyerovy baňky. Byla provedena sterilace v tlakovém hrnci po dobu 40 minut při teplotě 120 °C. Po ochlazení média v inokulu I byla baňka zaočkována v očkovacím boxu za sterilních podmínek z připravených zaočkovaných Petriho misek. Očkovací poměr činil 1 klička s kulturou na 10 ml YPD média. Poté byla baňka umístěna na recipročnou třepačku po dobu 24 hodin. Další den bylo stejným způsobem zaočkováno inokulum II. Očkovací poměr z inokula I do inokula II byl 1:5. Poté byla opět provedena kultivace po dobu 24 hodin na třepačce. Po uplynutí této doby byla kultura přeočkována do vysterilovaného produkčního média (složení viz Tabulka 8) v poměru 1:10 do 500 ml Erlenmeyerovy baňky. Kultivace probíhala při laboratorní teplotě po dobu 96 hodin na horizontální třepačce. Po uplynutí této doby byla kultura s médiem zcentrifugována po dobu 5 minut při otáčkách 9000 rpm. Supernatant byl odlit a získaná biomasa kvasinky byla promytá destilovanou vodou a následně znovu zcentrifugována. Opět proběhlo promytí destilovanou vodou a získaná biomasa byla zmrazená při teplotě - 80 °C a následně lyofilizována. Po procesu lyofilizace byla vysušená biomasa až do dalších analýz uchována v mrazáku při -18 °C.

Tabulka 8: Složení produkčního média C/N 25

Složka	Množství
glukóza	46,46 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,696 g
KH ₂ PO ₄	4 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g
voda	1000 ml

4.5.2.2 Stanovení celkových polyfenolů

Ke stanovení celkových polyfenolů ve vzorcích cereálií, luštěnin, řas, kvasinek a jejich směsí byly použity extrakty připravené dle kapitoly 4.5.1. Do skleněné zkumavky byl napipetován 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla zředěného destilovanou vodou v poměru 1:9. K němu byl přidán 1 ml destilované vody a 50 µl vzorku. Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu a ponechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byl do zkumavek napipetován 1 ml nasyceného roztoku uhličitánu sodného. Vzorky byly opět promíchány na vortexu a ponechány stát 15 minut při laboratorní teplotě. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm proti blanku. Ve slepém vzorku bylo použito 50 µl destilované vody namísto 50 µl extraktu. Stanovení probíhalo v triplicátech.

K sestavení kalibrační křivky byl použit stejný postup, akorát místo 50 µl vzorku bylo použito 50 µl roztoku kyseliny gallové v koncentračním rozmezí 0,1–0,7 mg/ml. Ze získaných dat byla vytvořena kalibrační závislost (Rovnice 2) sloužící k následujícím stanovením.

Rovnice 2. Rovnice kalibrační křivky pro stanovení celkových polyfenolů s koeficientem R^2

$$A = 1,2726 \cdot c \quad (2a)$$

$$R^2 = 0,9946 \quad (2b)$$

4.5.2.3 Stanovení flavonoidů

Ke stanovení flavonoidů byly opět použity připravené extrakty cereálií, luštěnin, řas, kvasinek a jejich směsí viz 4.5.1. Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml extraktu, dále 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5 % roztoku dusitanu sodného. Zkumavky byly promíchány na vortexu a nechány stát 5 minut při laboratorní teplotě. Dále bylo do zkumavek napipetováno

0,2 ml 10 % chloridu hlinitého a obsah zkumavek byl ponechán stát dalších 5 minut. Po uplynutí této doby bylo přidáno 1,5 ml 1 M roztoku NaOH a 1 ml destilované vody. Obsah byl opět promíchán na vortexu a ponechán stát 15 minut při laboratorní teplotě. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 510 nm oproti blanku, jež představovala destilovaná voda. Stanovení bylo provedeno v triplicátech.

K sestavení kalibrační závislosti byl použit roztok katechinu rozpuštěném v ethanolu v koncentračním rozmezí 0,05–0,3 mg/ml. Získanou kalibrační závislost vyjadřuje Rovnice 3.

Rovnice 3. Rovnice kalibrační křivky pro stanovení flavonoidů s koeficientem R^2

$$A = 3,4114 \cdot c \quad (3a)$$

$$R^2 = 0,9997 \quad (3b)$$

4.5.2.4 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita cereálií, luštěnin, řas, kvasinek a jejich směsí byla stanovena roztokovou metodou za pomoci Troloxu (TEAC). Nejprve byl připraven roztok radikálového kationtu ABTS⁺ za pomoci 7 mM roztoku ABTS⁺⁺ rozpuštěného v destilované vodě a 2,45 mM roztoku peroxidisíranu draselného. Tento roztok byl ponechán stát minimálně 12 hodin ve tmě při laboratorní teplotě před samotnou analýzou vzorků. Před měřením antioxidační aktivity byl připravený roztok ABTS⁺⁺ naředěn pomocí ethanolu na výslednou absorbanci $0,700 \pm 0,020$ oproti blanku, kterým byl v tomto případě ethanol, při vlnové délce 734 nm. Následně byl do Eppendorfových zkumavek napipetován 1 ml naředěného roztoku ABTS⁺⁺ a bylo přidáno 10 μ l extraktu analyzovaného vzorku. Zkumavky byly promíchány a ihned uchovány do tmy na dobu 10 minut. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance A_{10} v zúžené křemenné kyvetě. Hodnota absorbance A_0 byla zjištěna přidáním 1 ml roztoku ABTS⁺⁺ a 10 μ l destilované vody, přičemž byla absorbance změřena ihned po promíchání. Výsledná absorbance byla získána odečtením $A_0 - A_{10}$. Vzorky byly analyzovány v triplicátech.

Kalibrační křivka byla stanovena stejným postupem. Pro zjištění kalibrační závislosti byl použit roztok Troloxu, jež byl rozpuštěn v 60 % ethanolu. Výsledná analyzovaná koncentrace v Troloxu byla v rozmezí 50–400 μ g/ml. Rovnice 4 znázorňuje zjištěnou kalibrační závislost.

Rovnice 4. Rovnice kalibrační křivky pro stanovení antioxidační aktivity s koeficientem R^2

$$A = 1,0794 \cdot c \quad (4a)$$

$$R^2 = 0,9950 \quad (4b)$$

4.5.2.5 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise

Celkové sacharidy byly ve vzorcích cereálií a luštěnin stanoveny metodou dle Duboise. Byly připraveny kyselé hydrolyzáty, kdy byl navážen vždy 1 g vzorku, který byl zalit 10 ml 6 M kyseliny chlorovodíkové. Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu a zkumavky byly přemístěny na třepačku, kde byly ponechány 1,5 hodiny při 37 °C. Poté byly zkumavky zcentrifugovány po dobu 10 minut a otáčkách 9000 rpm. Následně byl odebrán supernatant, který byl 1000x zředěn.

K 1 ml naředěného vzorku byl přidán 1 ml 5 % roztoku fenolu a pomalu bylo přidáno 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Směs byla promíchána a ponechána stát 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při vlnové délce 490 nm oproti blanku, který obsahoval 1 ml destilované vody, 1 ml 5 % fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové.

K sestavení kalibrační křivky byl použit roztok glukózy v koncentračním rozmezí 10–100 µg/ml. Tuto kalibrační závislost vyjadřuje Rovnice 5.

Rovnice 5. Rovnice kalibrační křivky pro stanovení celkových sacharidů s koeficientem R^2

$$A = 11,7080 \cdot c \quad (5a)$$

$$R^2 = 0,9970 \quad (5b)$$

4.5.2.6 Stanovení rozpustných proteinů dle Hartree-Lowryho

Celkové rozpustné proteiny ve vodě byly ve vzorcích cereálií, luštěnin a směsí analyzovány metodou dle Hartree-Lowryho. K 1 ml vzorku vodného extraktu vzorku bylo přidáno 0,9 ml roztoku A. Směs byla inkubována 10 minut ve vodní lázni vyhřáté na 50 °C. Po uplynutí této doby byly zkumavky ochlazeny na laboratorní teplotu a bylo přidáno 0,1 ml roztoku B. Směs byla protřepána na vortexu a inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byly přidány 3 ml roztoku C a vzorky byly inkubovány po dobu 10 minut ve vodní lázni vyhřáté na 50 °C. Po inkubaci byla směs ochlazená na laboratorní teplotu a byla změřena absorbance při vlnové délce 650 nm oproti blanku, kterým byla v tomto stanovení destilovaná voda.

Jako kalibrační roztok byl použit albumin (BSA) o koncentračním rozmezí 30–300 µg/ml. Kalibrační závislost je vyjádřena pomocí Rovnice 6.

Rovnice 6. Rovnice kalibrační křivky pro stanovení celkových proteinů s koeficientem R^2

$$A = 2,9371 \cdot c \quad (6a)$$

$$R^2 = 0,9927 \quad (6b)$$

Roztok A: 0,5 g tetrahydrátu vinanu sodno-draselného, 25 g uhličitanu sodného, 125 ml 1 M hydroxidu sodného, a to celé doplnit destilovanou vodou do objemu 250 ml.

Roztok B: 2 g tetrahydrátu vinanu sodno-draselného, 1 g pentahydrátu síranu měďnatého, 10 ml 1 M hydroxidu sodného, a to celé doplnit destilovanou vodou do objemu 100 ml.

Roztok C: Folin-Ciocalteuovo činidlo zředěné destilovanou vodou v poměru 1:15.

4.5.3 Speciální analytické metody

4.5.3.1 Stanovení mastných kyselin pomocí GC

Obsah mastných kyselin ve vzorcích cereálií, luštěnin, kvasinek a řas byl analyzován pomocí plynové chromatografie. Nejprve bylo do krimpovacích vialek naváženo 50–60 mg analyzované látky a bylo napipetováno 1,8 ml transesterifikační směsi s obsahem interního standardu C17 o koncentraci 0,5 g/ml, rozpuštěného v 15 % roztoku kyseliny sírové v methanolu. Vialky byly následně zakrimpovány a umístěny do termobloku na 2 hodiny při 85 °C za účelem transesterifikace. Po uplynutí této doby byly vialky ochlazeny na laboratorní teplotu a jejich obsah byl kvantitativně převeden do skleněných vialek o objemu 4 ml, které obsahovaly 0,5 ml 0,05 M hydroxidu sodného. Do vialky byl přidán 1 ml hexanu HPLC kvality. Vialky byly uzavřeny a byly promíchány na vortexu po dobu 6 minut. Díky tomu došlo k oddělení fází. Následně bylo z horní hexanové vrstvy odpipetováno 0,1 ml do čisté skleněné vialky a bylo přidáno 0,9 ml hexanu HPLC kvality. Takto připravené vzorky byly uloženy do mrazáku, kde byly ponechány při -18 °C až do jejich analýzy na GC.

Ve vzorcích byly pomocí plynového chromatografu analyzovány methylestery mastných kyselin, které vznikly během procesu esterifikace. Parametry analýzy na GC jsou obsaženy v Tabulka 9.

Tabulka 9: Parametry analýzy na GC

Přístroj	Thermo Fischer TRACETM GC
Dávkování	Autosampler Thermo Scientific A1 1310
Kolona	Zebron ZB-FAME, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Detektor	FID
Nosný plyn, průtok	Vodík, 1 ml/min
Objem nástřiku	1 µl
t _{injektoru} , t _{detektoru}	250 °C/260 °C
Průtok vzduchu	350 ml/min
Průtok dusíku	30 ml/min
Průtok vodíku	35 ml/min

4.5.3.2 Stanovení pigmentů a lipofilních metabolitů pomocí HPLC

Pigmenty a lipofilní metabolity byly ve vzorcích cereálií, luštěnin, řas a kvasinek analyzovány za pomoci kapalinové chromatografie. K 1 g vzorku bylo přidáno 10 ml směsi chloroform:methanol v poměru 2:1. Ke směsi byly přidány skleněné kuličky. Zkumavky byly umístěny na vortex, kde byly intenzivně promíchávány po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byly přidány 3 ml destilované vody a obsah byl promíchán a zcentrifugován po dobu 6 minut při otáčkách 4500 rpm, přičemž došlo k oddělení fází. Následně byla spodní chloroformová vrstva odpipetována do skleněných zkumavek a zkumavky byly umístěny do termobloku, kde došlo k odpaření za pomoci dusíku. Pevný podíl, který byl získán odpařením, byl rozpuštěn v 0,5 ml směsi rozpouštědel ethylacetát:acetonitril v poměru 1:1. Tato směs představovala mobilní fázi. Rozpuštěné vzorky byly přefiltrovány přes PTFE filtr do skleněných vialek pro analýzu HPLC. Vzorky byly před samotným stanovením uchovány v mrazáku při -18 °C.

Získané chromatogramy byly vyhodnoceny za pomoci programu ChromeleonTM Chromatography Data System. Obsah jednotlivých pigmentů a lipofilních metabolitů byl získán za pomoci kalibračních křivek. Parametry analýzy pomocí HPLC jsou uvedeny v Tabulka 10 a

Tabulka 11.

Tabulka 10: Parametry analýzy na HPLC

Přístroj	HPLC Thermo Fisher Scientific
Kolona	EVO C18, KINETEX, 150 x 4,6 x 2,6 mm
Detektor	PDA
Čas analýzy	25 min
Průtok MF	1,2 ml/min
MF A	MeOH:acetonitril:100 mM tris HCL pufr (2:84:14 obj. %)
MF B	MeOH:ethylacetát (60:40 obj. %)
Typ eluce	Gradientová

Tabulka 11: Složení mobilních fází v různých časech analýzy na HPLC

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

4.5.3.3 Měření absorpčních (UV-VIS) spekter

Pomocí UV-VIS spektrofotometru byla změřena absorpční spektra všech připravených extraktů řas a kvasinek. Absorpční spektra byla měřena v rozmezí 200–800 nm s krokem 1 nm. Každé absorpční spektrum daného extraktu bylo měřeno celkem třikrát. Získaná spektra byla využita pro další charakterizace daných extraktů.

4.5.3.4 Spektrofotometrické stanovení pigmentů

Pro spektrofotometrické stanovení pigmentů v extraktech byly použity průměrné hodnoty absorbancí při vybraných vlnových délkách, které byly získány z naměřených absorpčních spekter extraktů (kapitola 4.5.3.3). Pro výpočet obsahu chlorofylu a, chlorofylu b a karotenoidů v extraktech z řas byly použity vztahy uvedené níže Rovnice 7. Získané koncentrace byly vyjádřeny v µg/ml, následně byly přepočítány na koncentrace vyextrahovaných pigmentů v mg na g biomasy, kdy bylo zohledněno i ředění extraktů.

Rovnice 7. Rovnice pro spektrofotometrické stanovení pigmentů v připravených extraktech

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

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

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

V připravených kvasinkových extraktech byly pro výpočet chlorofylů použity vztahy z Rovnice 7. Pro stanovení karotenoidů v kvasinkových extraktech byl použit vztah, který vyjadřuje Rovnice 8. Veličina ϵ představuje molární absorpční koeficient β -karotenu. Pro ethanol je tato hodnota rovna 2620 dm³/mol·cm. Získané koncentrace byly přepočítány na mg na g biomasy.

Rovnice 8. Rovnice pro spektrofotometrické stanovení karotenoidů v kvasinkových extraktech

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

4.5.3.5 Stanovení lepku

Množství lepku ve vybraných cereáliích bylo stanoveno za pomoci komerčně zakoupeného kitu RIDASCREEN® Gliadin Competitive. Postup byl prováděn dle instrukcí výrobce. Nejprve byly připraveny ethanolové extrakty vybraných cereálií. Do zkumavky byl navážen 1 g vzorku, který byl zalit 10 ml 60 % ethanolu. Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu po dobu 30 sekund a následně byly zkumavka umístěna na vortex po dobu 10 minut. Po uplynutí doby extrakce byla směs zcentrifugována po dobu 10 minut při otáčkách 4500 rpm. Následně byl získaný supernatant 50x zředěn puřem. Takhle připravené extrakty byly použity k následné analýze.

Každý vzorek byl stanovován v triplicátech. Do jamek testovací destičky, která byla součástí kitu, bylo napipetováno vždy 50 μ l ethanolového extraktu vzorku. Dále bylo do každé jamky napipetováno 50 μ l naředěného konjugátu a destička byla lehce promíchána. Destička byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byl obsah jamek vylit a do každé jamky bylo napipetováno 250 μ l promývacího pufru. Tento krok byl proveden celkem třikrát. Následně bylo do každé jamky napipetováno 100 μ l chromogenu (substrátu), destička byla lehce promíchána a následně byla inkubována 10 minut ve tmě. Po inkubaci bylo do všech jamek napipetováno 100 μ l stop roztoku, destička byla promíchána a pomocí přístroje Elisa reader byla změřena absorbance při vlnové délce 450 nm.

Současně byla proměřena kalibrační řada v koncentračním rozmezí 0–270 ng/ml, která byla součástí kitu. Koncentrace gliadinu byla získána za pomoci dosazení absorbance do kalibrační křivky a přepočítána na obsah lepku dle návodu výrobce kitu.

4.5.3.6 Stanovení β -glukanů v cereáliích a řasách

β -glukany byly ve vzorcích cereálií a řas stanoveny za pomoci komerčně dostupného kitu β -Glucan Assay Kit (Mixed Linkage). Do skleněných zkumavek bylo naváženo 40–60 mg vzorku cereálie, řasy nebo standardu muk (oves a ječmen), které byly součástí kitu. Dále bylo přidáno 0,1 ml 50 % ethanolu a 2 ml fosfátového pufru (20 mM, pH 9,5). Směs byla promíchána na vortexu a dána inkubovat na 60 sekund do vroucí vodní lázně. Následně byly zkumavky opět promíchány na vortexu a inkubovány další 2 minuty ve vroucí lázni. Po následném promíchání byla směs dána inkubovat do vodní lázně vyhřáté na 50 °C. Po skončení inkubace bylo ke směsi přidáno 50 μ l enzymu lichenázy, zkumavky byly promíchány a dány inkubovat opět do vodní lázně vyhřáté na 50 °C na dobu 1 hodinu. Během inkubace byl obsah zkumavek několikrát promíchán. Po inkubaci bylo do zkumavek přidáno 2,5 ml acetátového pufru (200 mM, pH 4,0). Směs byla promíchána a zcentrifugována po dobu 10 minut při otáčkách 10000 rpm). Do celkem šesti Eppendorfových zkumavek bylo odpipetováno 50 μ l supernatantu, přičemž do tří zkumavek bylo přidáno 50 μ l enzymu β -glukozidázy a do dalších tří zkumavek 50 μ l acetátového pufru (50 mM, pH 4,0). Zkumavky byly po dobu 10 minut inkubovány při 50 °C. Následně bylo do každé z Eppendorfových zkumavek přidáno 1,5 ml GOPOD reagentu a zkumavky byly opět dány inkubovat dalších 20 minut při 50 °C. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při vlnové délce 510 nm oproti blanku, který obsahoval 0,1 ml destilované vody, 0,1 ml acetátového pufru a 3 ml GOPOD reagentu.

4.5.3.7 Stanovení β -glukanů v kvasinkách

Obsah β -glukanů v analyzovaných kvasinkách byl stanoven pomocí komerčně dostupného kitu β -Glucan Assay Kit (Yeast and Mushroom). Nejprve byl stanoven obsah celkových glukanů a následně obsah α -glukanů. Obsah β -glukanů byl získán odečtením obsahu α -glukanů od celkových glukanů.

Celkové glukany byly ve vzorcích kvasinek stanoveny následujícím způsobem. Nejprve bylo do skleněných zkumavek naváženo cca 90 mg biomasy kvasinek nebo kvasinkového standardu. Byly přidány 2 ml vychlazené 12 M kyseliny sírové a zkumavky byly umístěny na 2 hodiny do ledové lázně za občasného míchání. Následně byly do každé zkumavky přidány 4 ml destilované vody, směs byla promíchána na vortexu a bylo přidáno dalších 6 ml destilované vody, přičemž obsah zkumavek byl opět promíchán na vortexu. Dále byly zkumavky s uvolněnými víčky umístěny do vroucí vodní lázně. Po uplynutí 5 minut byla víčka dotáhnuta a obsah zkumavek byl ponechán inkubovat ve vroucí vodní lázni po dobu 2 hodin. Po skončení

inkubace byly zkumavky ochlazeny na laboratorní teplotu a jejich obsah byl kvantitativně převeden do odměrných baněk o objemu 100 ml za pomoci acetátového pufru (200 mM, pH 4,5). Do odměrné baňky bylo přidáno 6 ml 8 M NaOH a objem baňky byl doplněn acetátovým pufrem (200 mM, pH 4,5) na 100 ml. Baňky byly důkladně promíchány a do Eppendorfových zkumavek byl odebrán 1 ml alikvot, který byl zcentrifugován po dobu 5 minut při otáčkách 13000 rpm. Do dvou čistých skleněných zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml supernatantu a na dno zkumavek bylo přidáno 0,1 ml směsi enzymů (exo-1,3- β -glukanáza a β -glukozidáza) v acetátovém pufru (200 mM, pH 4,5). Směs byla důkladně promíchána na vortexu a ponechána inkubovat při 40 °C po dobu 60 minut. Po inkubaci byly do každé zkumavky přidány 3 ml GOPOD reagentu a zkumavky byly inkubovány dalších 20 minut při 40 °C. Po uplynutí této doby byly zkumavky ochlazeny na laboratorní teplotu a byla změřena absorbance při vlnové délce 510 nm proti blanku. Vzorky byly analyzovány v duplikátech a výsledná hodnota absorbance byla zprůměrována.

Obsah α -glukanů byl stanoven tak, že do skleněných zkumavek bylo naváženo 100 mg biomasy kvasinek nebo kvasinkového standardu a byly přidány 2 ml 1,7 M NaOH. Směs byla promíchána na vortexu a zkumavky byly inkubovány v ledové lázni po dobu 20 minut za občasného míchání. Následně bylo přidáno 8 ml acetátového pufru (1,2 M, pH 3,8). Dále bylo přidáno 0,2 ml směsi enzymů (amylglukozidáza a invertáza) a směs byla promíchána na vortexu a ponechána inkubovat 30 minut při 40 °C. Po skončení inkubace byly do Eppendorfových zkumavek napipetovány 2 ml směsi a obsah byl zcentrifugován (5 minut, 13000 rpm). Do čistých skleněných zkumavek bylo odpipetováno 0,1 ml supernatantu a bylo přidáno 0,1 ml acetátového pufru (200 mM, pH 4,5). Následně byly přidány 3 ml GOPOD reagentu a zkumavky byly dány inkubovat na 20 minut do 40 °C horké lázně. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při vlnové délce 510 nm proti blanku. Každý vzorek byl stanovován v duplikátech a pro výpočet obsahu α -glukanů byla použita průměrná hodnota absorbancí.

4.5.4 Stanovení antimikrobiální aktivity

U vybraných extraktů z cereálií, luštěnin, řas a kvasinek byly provedeny antimikrobiální testy. K testům byly použity dva kmeny bakterií, grampozitivní *Micrococcus luteus* a gramnegativní *Serratia marcescens*. Stanovení bylo provedeno pomocí bujónového dilučního testu na 96-jamkových mikrotitračních destičkách a analýza probíhala celkem tři dny ve sterilní místnosti. První den bylo připraveno 100 ml média Nutrient Broth (NB) a médium bylo rozděleno do dvou Erlenmayerových baněk po 50 ml. Dále bylo připraveno do pyrexové nádoby 200 ml téhož média. Tato média a potřebný materiál na testování byly dány k sterilaci. Tento proces probíhal po dobu 35 minut při 120 °C. Po uplynutí této doby byly do dvou Erlenmayerových baněk s médiem zaočkovány bakterie *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens*. Poté byly tyto zaočkované baňky kultivovány 24 hodin na třepačce při teplotě 37 °C. Druhý den bylo před použitím nakultivovaných bakterií provedeno ředění čistým médiem tak, aby kultury odpovídaly hodnotě 0,5 McFarlandově zákalové stupnici. Následně bylo provedeno ředění, aby výsledné kultury byly zředěny celkem 2 000x. Dalším krokem bylo napipetování vody, vzorků, kultur a kontrol na destičku dle předem připraveného schématu. Výsledný objem v jamkách představoval 200 μ l. Následně byla změřena na Elisa readeru absorbance při vlnové délce 630 nm. Poté byly destičky umístěny na 24 hodin na třepačku. Třetí den byla opět změřena absorbance při vlnové délce 630 nm.

4.5.4.1 Resazurin test

Dále byl proveden resazurin test, kdy do každé jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 20 μ l roztoku resazurinu v PBS o koncentraci 0,15 mg/ml. Destičky byly inkubovány po dobu 30 minut a byla změřena absorbance na Elisa readeru při vlnové délce 530 nm. Každý vzorek byl analyzován v triplicáttech. Výsledná antimikrobiální aktivita byla získána zprůměrováním absorbancí.

4.5.5 MTT test cytotoxicity

Pro testování cytotoxicity vybraných extraktů byla použita buněčná linie CaCO-2. Testovány byly vodné extrakty quinoi a hrachu vyrobené podle postupu v kapitole 4.5.1.1, hexan:ethanolové extrakty *Chlorella*, *Spirulina* a *Saccharomyces cerevisiae* v poměru 1:1 a ethanolový extrakt *Saccharomyces cerevisiae*. Během celého procesu testování cytotoxicity bylo pracováno ve sterilním boxu, jehož plochy byly za pomoci 70 % ethanolu dezinfikovány. Před samotnou analýzou byl box také sterilizován UV zářením po dobu 20 minut.

Buněčná linie byla před samotným testováním kultivována v inkubačním boxu při teplotě 37 °C, přičemž byl obsah CO₂ udržován na 5 %. Buňky byly pravidelně kontrolovány pod inverzním mikroskopem, kde byla sledována konfluence buněk. Jestliže byla vyšší než 80 %, buňky mohly být podrobeny testování. Obsah lahvičky s buňkami byl třikrát pomocí PBS pufru promyt, aby došlo k odstranění vápenatých iontů. Následně byl do lahvičky přidán enzym trypsin, díky němuž byly buňky odděleny z dna lahvičky. Po přidání trypsinu byla lahvička inkubována 5 minut v inkubačním boxu a následně byl její obsah pomocí média převeden do čisté zkumavky a zcentrifugován (300 rcf, 5 minut). Po uplynutí této doby byl odstraněn supernatant a buňky byly rozsuspendovány v novém EMEM médiu.

Před začátkem testování byly buňky spočítány v Bürkerově komůrce a byly naředěny do média na koncentraci 2–5·10⁵ buněk/ml. Takto naředěné buňky byly napipetovány na sterilní destičku (96 jamek), kdy do každé jamky bylo pipetováno 100 μ l média s buňkami. Do krajních jamek bylo pipetováno 100 μ l PBS pufru, aby nedošlo k vyschnutí destičky při testování. Takhle připravená destička byla dána inkubovat na 24 hodin do inkubačního boxu. Po uplynutí této doby bylo z každé jamky důkladně odpipetováno médium, které bylo nahrazeno připravenými a vhodně naředěnými vzorky v médiu. Připravené extrakty byly před pipetováním na destičku přefiltrovány přes sterilní filtr. Na každé destičce byla uskutečněna také pozitivní kontrola (CC–cell control), kontrola média (VC–vehicule control) a negativní kontrola (40 % EtOH). Takto připravená destička byla znovu uložena do inkubačního boxu na 24 hodin. Po 24 hodinách byla ze všech jamek odpipetována veškerá tekutina. Do každé jamky bylo přidáno 20 μ l sterilního roztoku MTT v PBS pufru o koncentraci 2,5 mg/ml. Destička byla na dobu 3 hodiny umístěna do inkubačního boxu, aby mohla proběhnout reakce. Po uplynutí této doby bylo do každé jamky přidáno 100 μ l 10 % roztoku SDS v PBS pufru. Destička byla zabalena do hliníkové fólie a ponechána ve tmě do dalšího dne, kdy bylo změřena absorbance v jednotlivých jamkách při vlnové délce 540 nm.

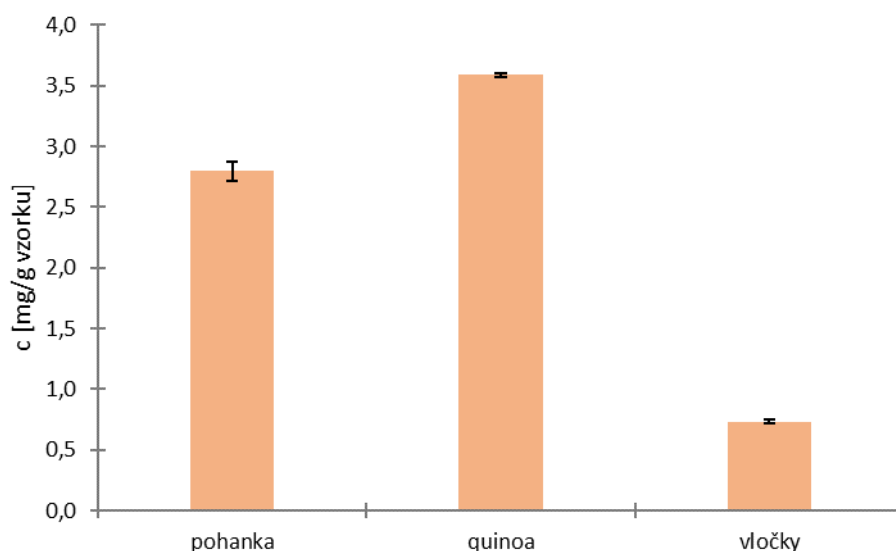
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce byla zaměřená na vývoj cereálních produktů pro zvláštní výživu s přidavkem luštěnin, řas a kvasinek. Na základě získaných výsledků stanovení nutričních složek cereálií a luštěnin, a bioaktivních komponent nacházejících se ve vybraných řasách a kvasinkách byly připraveny směsi cereálií obohacené o vybrané luštěniny, extrakty a biomasu z řas a extrakty z kvasinek. V rámci této práce bylo připraveno celkem 12 cereálních směsí, které byly dále charakterizovány.

5.1 Charakterizace vybraných cereálií

5.1.1 Stanovení celkových polyfenolů

Celkový obsah fenolických látek ve vybraných vzorcích cereálií byl stanoven spektrofotometricky podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2.2. Každý vzorek cereálie byl stanoven celkem třikrát a průměrná hodnota naměřených absorbancí byla dosazena do Rovnice 2, čímž byla získána koncentrace fenolických látek. Ta byla poté vztažena na navážku cereálie. Výsledný obsah celkových fenolických látek, včetně odchylek jednotlivých měření, znázorňuje graf (Obrázek 10).

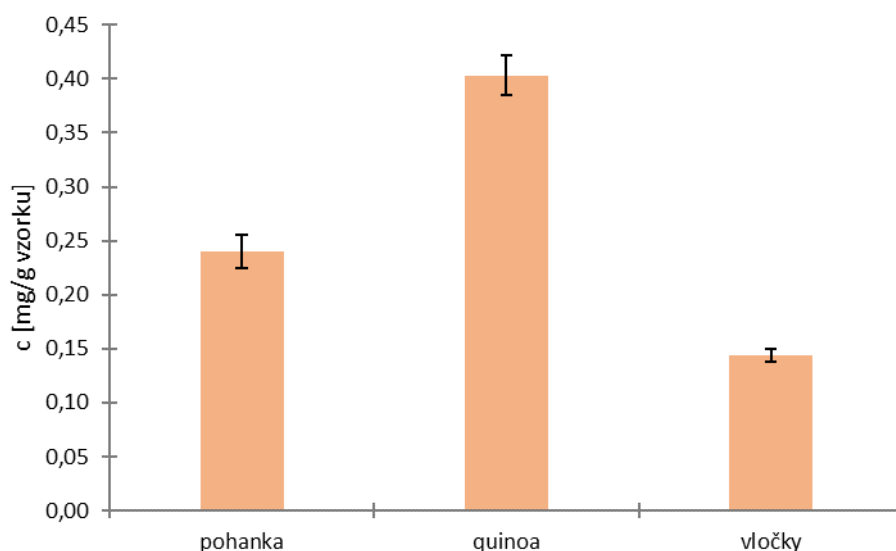


Obrázek 10: Obsah celkových fenolických látek ve vybraných cereáliích

Nejvyšší koncentrace fenolických látek byla naměřena ve vzorku quinoi ($3,59 \pm 0,02$ mg/g vzorku), dále u pohanky ($2,80 \pm 0,08$ mg/g vzorku). Naopak nejnižší obsah fenolických látek, jak bylo předpokládáno, byl zjištěn u bezlepkových vloček ($0,73 \pm 0,02$ mg/g vzorku). Získané hodnoty koncentrací quinoi a pohanky jsou srovnatelné s hodnotami v článku [10], kde quinoa vykazovala koncentraci $3,49 \pm 0,35$ mg/g vzorku a pohanka $2,71 \pm 0,01$ mg/g vzorku.

5.1.2 Stanovení flavonoidů

Obsah flavonoidů byl ve vzorcích vybraných cereálií analyzován spektrofotometricky pomocí metody, která je podrobně popsána v kapitole 4.5.2.3. Koncentrace flavonoidů byla získána dosazením průměrných hodnot absorbancí do kalibrační křivky (Rovnice 3) a následným přepočtem na navážku vzorku. Graf (Obrázek 11) zobrazuje výsledný obsah flavonoidů ve vybraných vzorcích cereálií včetně odchylek.



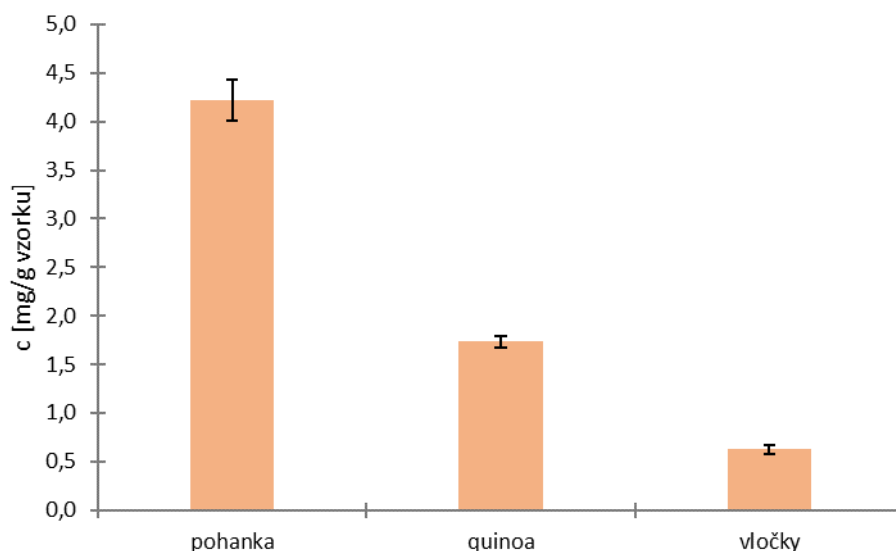
Obrázek 11: Obsah flavonoidů ve vybraných cereáliích

Z grafu (Obrázek 11) lze vyčíst, že nejvyšší koncentraci flavonoidů vykazuje quinoa ($0,40 \pm 0,02$ mg/g vzorku), druhá nejvyšší koncentrace byla zjištěna u pohanky ($0,24 \pm 0,02$). Obsah flavonoidů ve vločkách ($0,14 \pm 0,01$) byl nejnižší, stejně jako u obsahu fenolických látek. Jak bylo předpokládáno, v porovnání s fenolickými látkami (Obrázek 10) byl obsah flavonoidů u vybraných cereálií výrazně nižší než obsah fenolických látek, i když se flavonoidy řadí mezi fenolické komponenty. Ze získaných dat bylo zjištěno, že flavonoidy tvoří 8,59 % celkových fenolických látek u pohanky; 11,25 % u quinoi a 19,63 % u bezlepkových vloček.

5.1.3 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita vybraných cereálií byla stanovena spektrofotometricky dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2.4. Získaná antioxidační aktivita byla vyjádřena jako parametr TEAC, který určuje antioxidační aktivitu jako ekvivalent Troloxu v mg/g vzorku. Výsledný obsah antioxidantů byl získán dosazením průměrných hodnot naměřených absorbancí do rovnice kalibrační přímky (Rovnice 4), jež byl následně vztažen na navážku vzorku cereálie. V grafu níže (Obrázek 12) je znázorněna získaná antioxidační aktivita jednotlivých cereálií včetně odchylek měření.

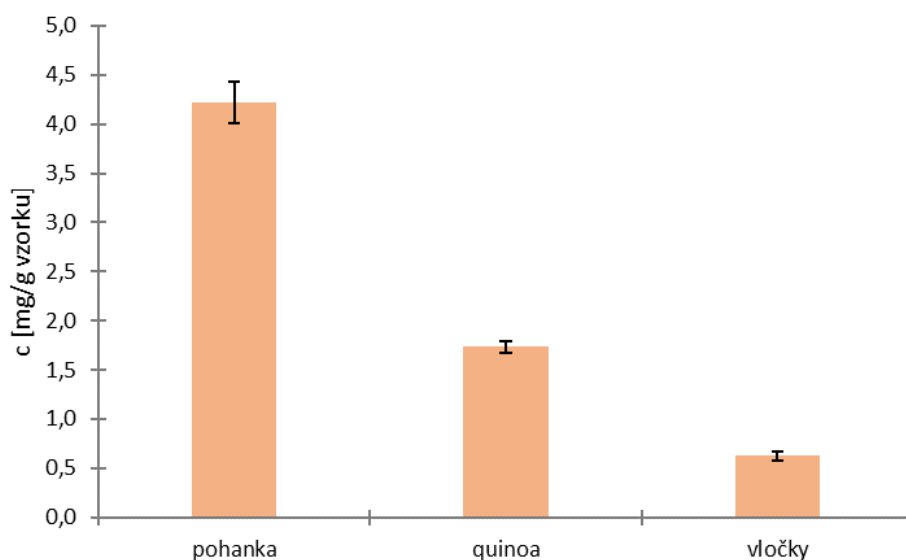
Z grafu níže je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u pohanky ($4,22 \pm 0,21$ mg/g vzorku), a dále u quinoi ($1,7 \pm 0,06$ mg/g vzorku). Nejnižší antioxidační aktivitu z vybraných cereálií vykazovaly bezlepkové vločky ($0,63 \pm 0,05$ mg/g vzorku). Hodnoty antioxidační aktivity jednotlivých testovaných cereálií jsou srovnatelné s hodnotami z literatury [66], přičemž obsah antioxidantů u pohanky je mírně vyšší, kdežto u quinoi se shoduje. K hodnotě antioxidační aktivity přispívají zřejmě i jiné látky než fenolické sloučeniny, protože nebyla prokázána žádná korelace mezi jejich hodnotami.



Obrázek 12: Stanovená antioxidační aktivita ve vybraných cereáliích

5.1.4 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise

Koncentrace celkových sacharidů ve vybraných cereáliích byla stanovena spektrofotometricky pomocí metody dle Duboise, jejíž postup uvádí kapitola 4.5.2.5. Vzorky analyzovaných cereálií byly nejprve podrobeny kyselé hydrolýze, aby došlo ke štěpení složitějších sacharidů na jednodušší monosacharidy. Výsledný obsah celkových sacharidů byl získán dosazením průměrných hodnot naměřených absorbancí do kalibrační křivky (Rovnice 5), jež byl následně přepočítán na navážku vzorku. Získané koncentrace jsou zaznamenány v grafu (Obrázek 13), včetně odchylek jednotlivých měření.



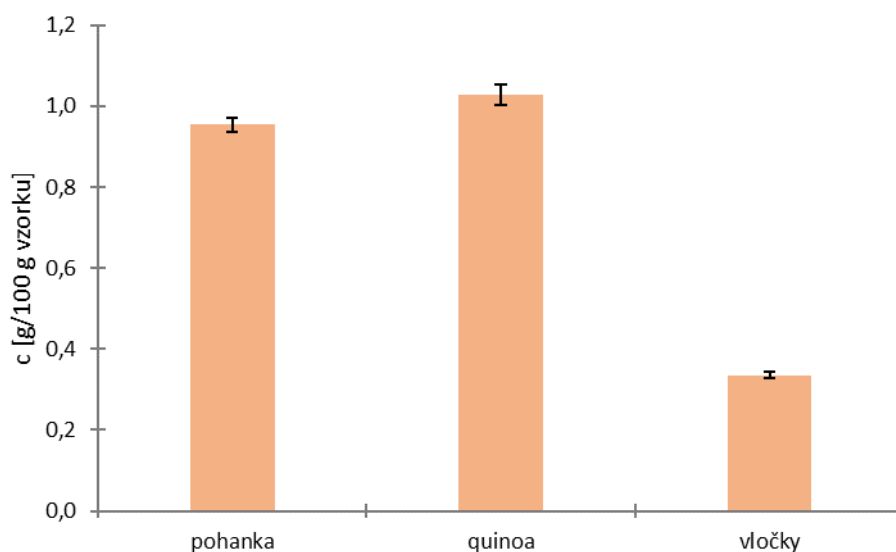
Obrázek 13: Obsah celkových sacharidů ve vybraných cereáliích

Stanovený obsah celkových sacharidů u pohanky ($49,19 \pm 2,04$ g/100 g vzorku) a quinoj ($47,23 \pm 1,90$ g/100 g vzorku) byl zcela shodný. Množství celkových sacharidů obsažených v quinoi se zcela shoduje s naměřeným množstvím sacharidů v článku [10]. Naměřené množství sacharidů v pohance se však liší oproti hodnotám uváděných v literatuře. To mohlo

být způsobeno nedostatečným rozštěpením složitějších sacharidů při hydrolyze nebo špatnou homogenizací vzorku při přípravě kyselých extraktů. Nejnižší naměřené množství celkových sacharidů opět vykazovaly bezlepkové vločky ($39,65 \pm 2,18$ g/100 g vzorku). Co se týče porovnání koncentrací ve vybraných cereáliích, získané hodnoty celkových sacharidů byly nižší, než udávají obaly výrobců (4.1.1), což může být způsobeno neúplnou extrakcí nebo chybou metody.

5.1.5 Stanovení rozpustných proteinů dle Hartree-Lowryho

Ve vybraných cereáliích byly stanoveny celkové rozpustné bílkoviny podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2.6. Obsah proteinů byl získán dosazením průměrných hodnot naměřených absorbancí do kalibrační křivky (Rovnice 6), jež byl následně přepočítán na navážku vzorku jednotlivých cereálií. Získané koncentrace jsou zaznamenány v grafu (Obrázek 14), včetně odchylek jednotlivých měření.

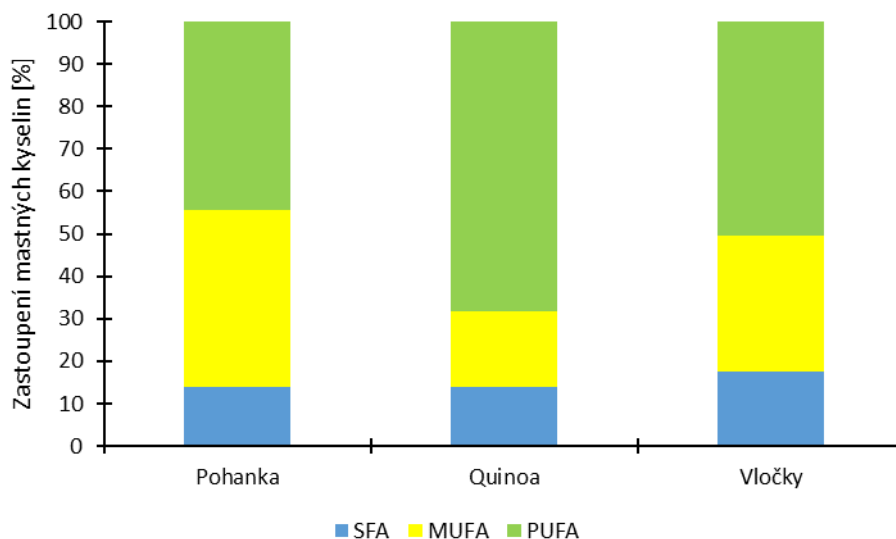


Obrázek 14: Obsah rozpustných proteinů ve vybraných cereáliích

Z grafu lze vyčíst, že nejvyšší obsah rozpustných bílkovin byl naměřen u quinoi ($1,03 \pm 0,02$ g/100 g vzorku), dále pak u pohanky ($0,95 \pm 0,02$ g/100 g vzorku) a bezlepkových vloček ($0,34 \pm 0,01$ g/100 g vzorku). Z grafu je také patrné, že naměřený obsah bílkovin u quinoi a pohanky je velmi podobný. V porovnání s nutričními hodnotami uváděnými výrobcí (viz 4.1.1) jsou naměřené hodnoty mnohem nižší. To je způsobeno tím, že Hartree-Lowryho metoda je určena ke stanovení rozpustných proteinů ve vodě, nikoliv celkových bílkovin. K rozpustným bílkovinám ve vodě můžeme zařadit například albumin.

5.1.6 Stanovení mastných kyselin pomocí GC

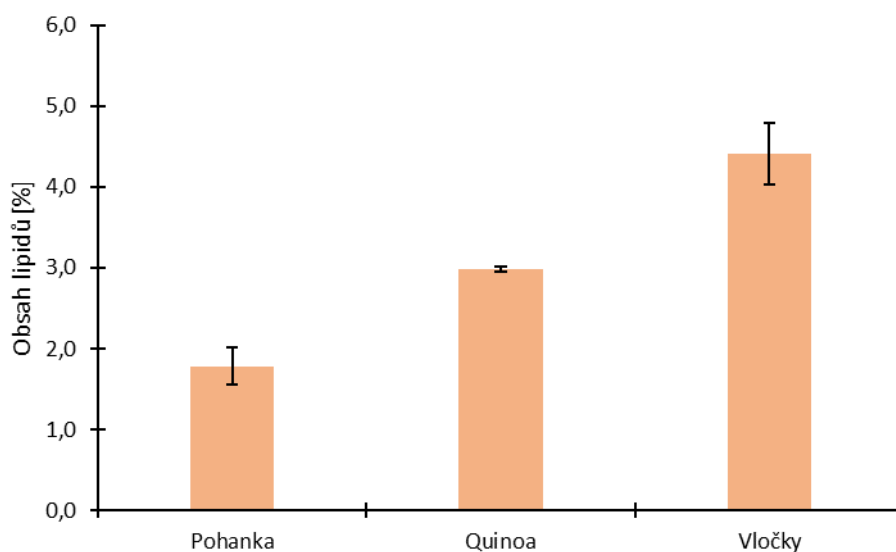
Ve vybraných cereáliích byly pomocí plynové chromatografie stanoveny mastné kyseliny a celkové lipidy pomocí postupu, jenž je detailně popsán v kapitole 4.5.3.1. V následujícím grafu (Obrázek 15) je znázorněno procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vybraných vzorcích cereálií, a to konkrétně nasycené mastné kyseliny (SFA), mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Uvedená procentuální zastoupení mastných kyselin byla získána z průměrných hodnot dvou měření.



Obrázek 15: Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vybraných cereáliích

Z grafu je patrné, že u všech testovaných cereálií nasycené mastné kyseliny (SFA) zastupují zhruba desetinu všech mastných kyselin. U všech vybraných cereálií převažují polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). U pohanky (44,24 %) a bezlepkových vloček (50,29 %) se jejich obsah téměř neliší. Za to u quinoi (68,18 %) jejich obsah převažuje. Nejnížší obsah MUFA (s převahou kyseliny olejové) byl zjištěn u quinoi (17,75 %). Tato hodnota se s obsahem SFA v quinoi (14,07 %) téměř shoduje. Nejvyšší zastoupení MUFA bylo zjištěno u pohanky (41,78 %).

Následující graf (Obrázek 16) obsahuje procentuální zastoupení celkových lipidů ve vybraných cereáliích, které bylo získáno vyhodnocením z hodnot obsahu mastných kyselin získaných pomocí plynové chromatografie. Opět jako u zastoupení mastných kyselin ve vybraných cereáliích, byla výsledná data získána pomocí zprůměrovaných hodnot dvou měření.



Obrázek 16: Procentuální zastoupení lipidů ve vybraných cereáliích

Z grafu (Obrázek 16) je patrné, že nejvyšší obsah lipidů byl zjištěn u bezlepkových vloček (4,42 g/100 g vzorku). V porovnání s nutriční hodnotou uváděnou výrobcem (viz 4.1.1) je tento obsah téměř shodný se získanou naměřenou hodnotou pomocí GC. U vzorku quinoi byl stanoven obsah lipidů na 2,98 g/100 g vzorku, jenž se lehce liší od hodnoty uváděné výrobcem. Nejnižší obsah lipidů vykazovala pohanka (1,78 g/100 g vzorku). V případě pohanky se nutriční hodnota uváděná výrobcem prakticky zcela shoduje, protože výrobce uvádí obsah lipidů jako 1,8 g/100 g vzorku.

5.1.7 Stanovení pigmentů a lipofilních metabolitů v cereáliích pomocí HPLC

Pomocí kapalinové chromatografie byly ve vybraných cereáliích stanoveny lipofilní metabolity a pigmenty dle postupu, jež je uveden v kapitole 0. V následující tabulce (Tabulka 12) jsou znázorněny výsledné koncentrace lipofilních metabolitů a pigmentů, které byly získány za pomoci programu Chromeleon™ Chromatography Data System. Obsah jednotlivých pigmentů a lipofilních metabolitů byl poté vypočítán pomocí kalibračních křivek standardů.

Tabulka 12: Stanovené koncentrace pigmentů ve vybraných cereáliích pomocí HPLC

	Pohanka	Quinoa	Bezlepkové vločky
Tokoferol [$\mu\text{g/g}$]	$71,71 \pm 0,13$	$43,86 \pm 0,31$	$38,56 \pm 0,27$
Ubichinon [$\mu\text{g/g}$]	$68,69 \pm 1,01$	$140,64 \pm 0,74$	$13,05 \pm 0,34$
Chlorofyl B [$\mu\text{g/g}$]	$10,37 \pm 0,71$	–	–
Lutein [$\mu\text{g/g}$]	$0,60 \pm 0,04$	$1,73 \pm 0,07$	$0,17 \pm 0,03$
Lykopen [$\mu\text{g/g}$]	–	$7,50 \pm 0,03$	$8,92 \pm 0,14$

Z tabulky výše vyplývá, že u všech testovaných cereálií byl zjištěn poměrně vysoký obsah tokoferolu (vitamín E) a ubichinonu (koenzym Q). Nejvyšší obsah tokoferolu vykazovala pohanka ($71,71 \pm 0,13 \mu\text{g/g}$ vzorku), nejnižší naopak bezlepkové vločky ($38,56 \pm 0,27 \mu\text{g/g}$ vzorku). Nejvyšší množství ubichinonu vykazovala quinoa ($140,64 \pm 0,74 \mu\text{g/g}$ vzorku). U všech vybraných cereálií byl také stanoven lutein, jehož největší množství bylo zjištěno u quinoi ($1,73 \pm 0,07 \mu\text{g/g}$ vzorku). Barvivo chlorofyl B obsahovala pouze pohanka, a to v koncentraci $10,37 \pm 0,71 \mu\text{g/g}$ vzorku. Z hlediska lykopenu, který vykazovala quinoa a bezlepkové vločky, byl nejvyšší obsah stanoven právě u vloček ($8,92 \pm 0,14 \mu\text{g/g}$ vzorku).

5.1.8 Stanovení lepku v cereáliích

Ve vybraných cereáliích byl stanoven obsah lepku pomocí postupu, který je podrobně popsán v kapitole 4.5.3.5. Nejprve byla zjištěna koncentrace gliadinu ve vzorcích. Ta byla následně podle instrukcí výrobce kitu přepočítána na koncentraci glutenu. Výsledné koncentrace jsou uvedeny v tabulce níže (Tabulka 13).

Tabulka 13: Stanovená koncentrace lepku ve vybraných cereáliích

Vzorek	c _{gluten} [mg/kg]
pohanka	$11,14 \pm 6,01$
quinoa	$34,22 \pm 4,74$
bezlepkové vločky	$0,81 \pm 3,96$

Vzorek, jež vykazuje koncentraci lepku nižší než 20 mg/kg je považován za bezpečný. Takový trend splňují pohanka ($11,14 \pm 6,01$) a bezpečné ovesné vločky ($0,81 \pm 3,96$). U těchto cereálií bylo tedy potvrzeno, že se vyskytují přirozeně bez lepku. U quinoi byl lepek stanoven nad hranicí 20 mg/kg, konkrétně na $34,22 \pm 4,74$ mg/kg. Dle informací výrobce kitu vzorky v rozmezí obsahu lepku 20–100 mg/kg jsou označovány jako potraviny s velmi nízkým obsahem lepku. To, že quinoa nespadá do kategorie potravin vyskytující se přirozeně bez lepku, mohlo být v tomto případě způsobeno kontaminací testovaných vzorků při analýze, popřípadě kontaminací při balení produktu. Také mohlo jít o komerční produkt s nízkým obsahem lepku

5.1.9 Stanovení β -glukanů v cereáliích

Celkový obsah β -glukanů ve vybraných cereáliích byl stanoven pomocí komerčně dostupného kitu dle postupu, který je detailně popsán v kapitole 4.5.3.6. Výsledná koncentrace β -glukanů v jednotlivých cereáliích byla zjištěna pomocí výpočtového programu Excelu od výrobce kitu, do kterého byly vždy dosazeny naměřené hodnoty absorbancí, jednotlivé navážky a objemy testovaných vzorků. Získaný obsah β -glukanů je uveden v Tabulka 14.

Tabulka 14: Stanovená koncentrace β -glukanů ve vybraných cereáliích

Vzorek	C β -glukanů [g/100 g]
pohanka	$0,173 \pm 0,012$
quinoa	$0,265 \pm 0,044$
bezpečné vločky	$7,778 \pm 0,405$

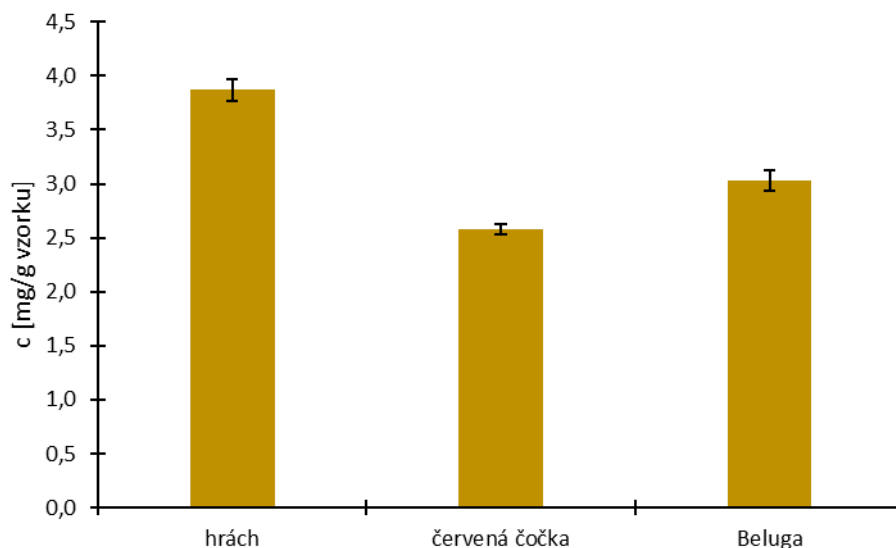
Z tabulky výše je patrné, že obsah β -glukanů v pohance ($0,173 \pm 0,012$ g/100 g) a quinoi ($0,265 \pm 0,044$ g/100 g) je téměř shodný. Oproti tomu obsah β -glukanů v bezpečných vločkách byl stanoven na hodnotu $7,778 \pm 0,405$ g/100 g, což je přibližně 30x větší obsah než u pohanky a quinoi. Toto mohlo být způsobeno nedostatečnou hydrolyzou či enzymatickou reakcí. Avšak vysoký obsah β -glukanů v bezpečných ovesných vločkách je pochopitelný, protože oves je obecně dobrým zdrojem β -glukanů. V použitém kitu se dokonce využívá ovesná mouka jako standard.

5.2 Charakterizace vybraných luštěnin

5.2.1 Stanovení celkových polyfenolů v luštěninách

Obsah celkových fenolických látek ve vybraných luštěninách byl stanoven podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2.2. Každý vzorek luštěniny byl stanoven celkem třikrát a průměrná hodnota naměřených absorbancí byla dosazena do Rovnice 2, čímž byla získána koncentrace fenolických látek. Ta byla poté vztažena na navážku jednotlivých luštěnin. Výsledný obsah celkových fenolických látek, včetně odchylek jednotlivých měření, znázorňuje graf (Obrázek 17).

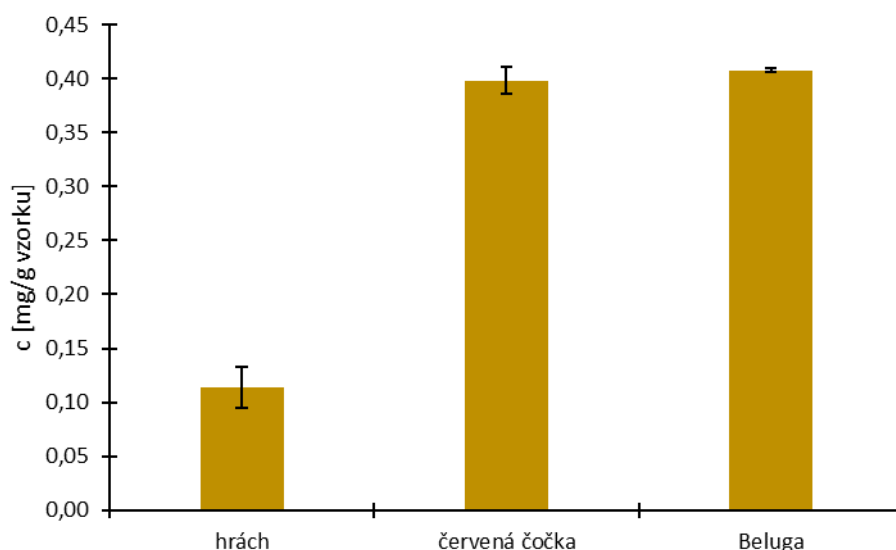
Z grafu níže vyplývá, že nejvyšší obsah fenolických látek v testovaných luštěninách byl zjištěn u hrachu ($3,87 \pm 0,10$ mg/g vzorku), dále pak u černé čočky Belugy ($3,03 \pm 0,10$ mg/g vzorku). Nejnižší obsah fenolických látek byl stanoven u červené čočky ($2,56 \pm 0,04$ mg/g vzorku). V porovnání s cereáliemi lze konstatovat, že hodnoty naměřených koncentrací fenolických látek v luštěninách jsou o něco vyšší než u cereálií.



Obrázek 17: Obsah celkových fenolických látek ve vybraných luštěninách

5.2.2 Stanovení flavonoidů

Obsah flavonoidů byl ve vybraných vzorcích luštěnin stanoven spektrofotometricky pomocí metody, která je podrobně popsána v kapitole 4.5.2.3. Koncentrace flavonoidů byla získána dosazením průměrných hodnot absorbancí do kalibrační křivky (Rovnice 3) a následným přepočtem na navážku vzorku. Graf (Obrázek 18) zobrazuje výsledný obsah flavonoidů ve vybraných luštěninách včetně odchylek.



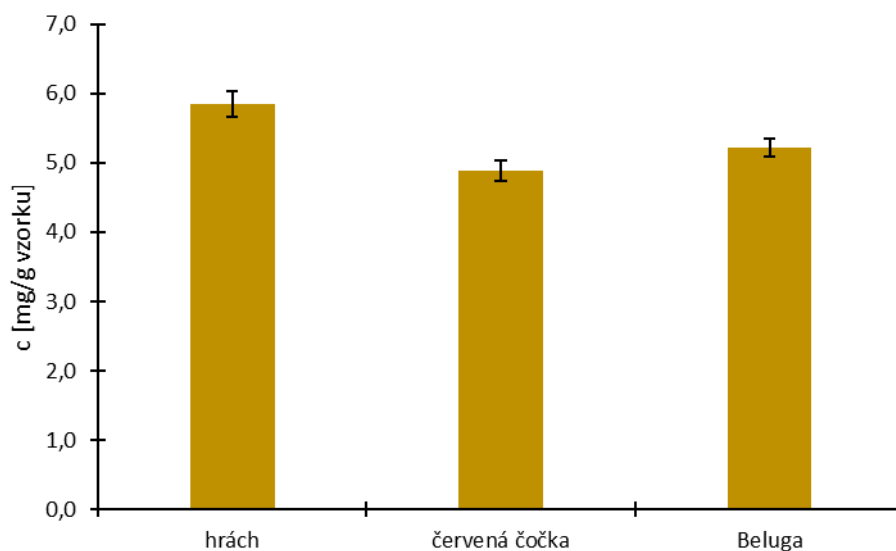
Obrázek 18: Obsah flavonoidů ve vybraných luštěninách

Graf výše znázorňuje naměřené hodnoty koncentrací flavonoidů ve vybraných luštěninách. Z grafu (Obrázek 18) lze pozorovat, že nejvyšší obsah flavonoidů byl stanoven u černé čočky Belugy ($0,41 \pm 0,01$ mg/g vzorku) a červené čočky ($0,40 \pm 0,01$ mg/g vzorku), jejichž hodnoty jsou zcela shodné. Naopak u hrachu ($0,11 \pm 0,02$ mg/g vzorku) byla zjištěná koncentrace přibližně čtyřnásobně menší než u obou druhů čoček. Ve srovnání s fenolickými látkami

naměřenými u vybraných luštěnin lze konstatovat, že hodnoty koncentrací flavonoidů jsou nižší než u fenolických látek, přestože flavonoidy jsou podskupinou fenolických látek. Co se týče procentuálního zastoupení, tak flavonoidy stanovené u hrachu tvoří pouze 2,94 % jeho fenolických látek, u červené čočky až 15,44 % a u Belugy 13,47 %. Z toho vyplývá, že největší podíl flavonoidů se nachází v červené čočce.

5.2.3 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita testovaných luštěnin byla analyzována spektrofotometricky dle postupu, který uvádí kapitola 4.5.2.4. Získaná antioxidační aktivita byla vyjádřena jako parametr TEAC, který určuje antioxidační aktivitu jako ekvivalent Troloxu v mg/g vzorku. Výsledná koncentrace antioxidantů byla získána dosazením průměrných hodnot naměřených absorbancí do rovnice kalibrační přímky (Rovnice 4), jež byla následně vztažena na navážku vzorku luštěniny. V grafu níže (Obrázek 19) je znázorněna získaná antioxidační aktivita jednotlivých luštěnin včetně odchylek měření.



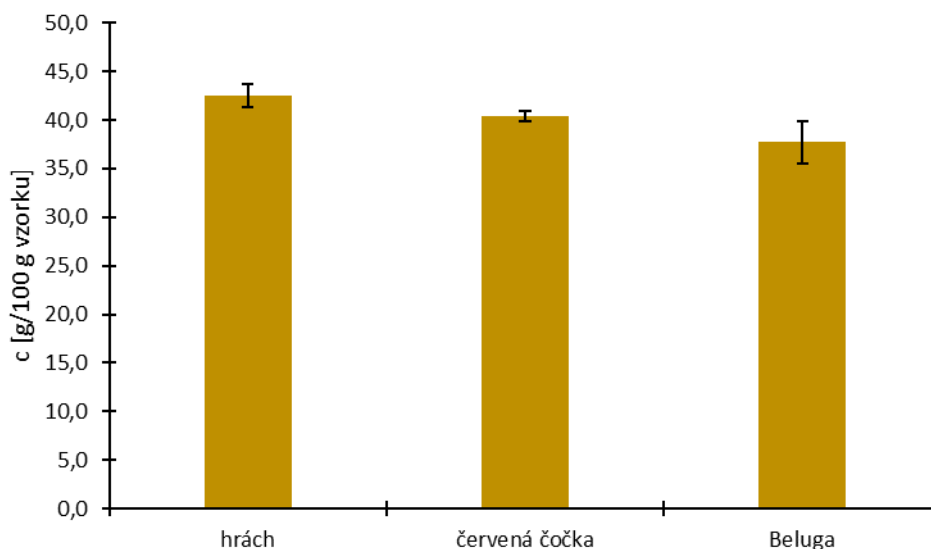
Obrázek 19: Stanovená antioxidační aktivita ve vybraných luštěninách

Z grafu vyplývá, že zjištěná antioxidační aktivita u analyzovaných luštěnin je srovnatelná a její obsah se pohybuje v rozmezí 4,88–5,85 mg/g vzorku. Nejvyšší obsah antioxidantů vykazoval hrách (5,85 ± 0,18 mg/g vzorku), dále pak černá čočka Beluga (5,21 ± 0,13 mg/g vzorku). Nejnižší stanovená antioxidační aktivita byla naměřena u červené čočky (4,88 ± 0,15 mg/g vzorku). U hrachu byla naměřena nejvyšší koncentrace antioxidantů, tak i fenolických látek. Poněvadž fenolické látky patří mezi sloučeniny s významnými antioxidačními účinky, lze předpokládat jejich významný podíl na antioxidační aktivitě luštěnin. To z toho důvodu, že fenolické látky patří mezi sloučeniny s významnými antioxidačními účinky. Stejný trend byl pozorován i u dalších testovaných luštěnin. V porovnání s cereáliemi je naměřená antioxidační aktivita jednotlivých luštěnin vyšší.

5.2.4 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise

Obsah celkových sacharidů ve vybraných luštěninách byl stanoven spektrofotometricky pomocí metody dle Duboise, která je popsána v kapitole 4.5.2.5. Vzorky testovaných luštěnin byly nejprve podrobeny hydrolýze, z důvodu štěpení složitějších sacharidů na jednodušší

monosacharidy. Výsledný obsah celkových sacharidů byl získán dosazením průměrných hodnot naměřených absorbancí do kalibrační křivky (Rovnice 5), jež byl následně přepočítán na navážku vzorku. Získané koncentrace jsou zaznamenány v grafu (Obrázek 20), včetně odchylek jednotlivých měření.



Obrázek 20: Obsah celkových sacharidů ve vybraných luštěninách

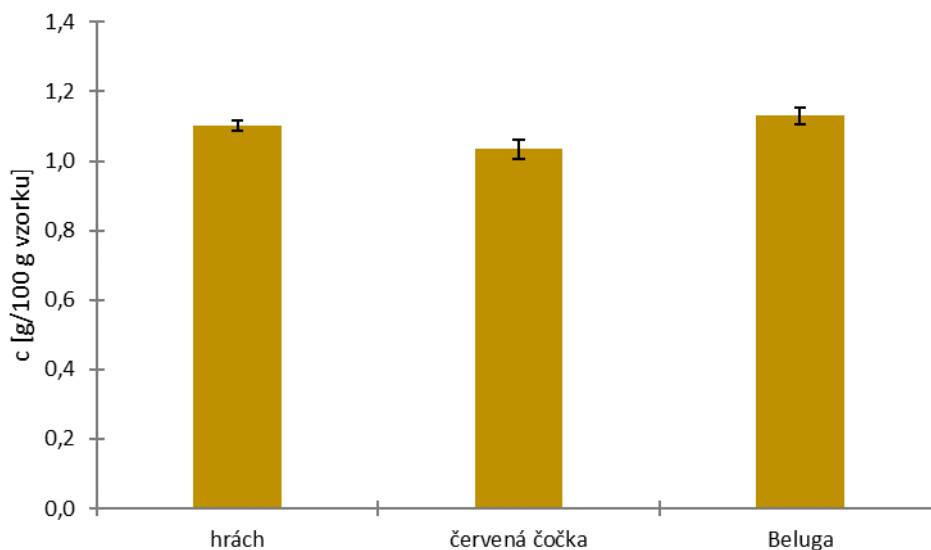
Z grafu je patrné, že výsledné koncentrace celkových sacharidů vybraných luštěnin jsou velmi podobné. Nejvyšší obsah celkových sacharidů byl stanoven u hrachu (42,48 g/100 g vzorku), dále u červené čočky (40,41 g/100 g vzorku) a černé čočky Belugy (37,71 g/100 g vzorku). Ze srovnání nutričních hodnot sacharidů v červené čočce uváděné výrobcem (kapitola 4.1.2) a získaných hodnot je patrné, že se obsah sacharidů prakticky zcela shoduje. U hrachu a černé čočky Belugy byl stanovený obsah sacharidů o něco nižší, než uvádí výrobce. To mohlo být způsobeno nedostatečnou hydrolyzou, kdy nebyly rozštěpeny všechny složitější sacharidy, popřípadě špatnou homogenizací vzorku.

5.2.5 Stanovení rozpustných proteinů dle Hartree-Lowryho

Ve vybraných vzorcích luštěnin byly stanoveny rozpustné bílkoviny ve vodě podle postupu, který je popsán v kapitole 4.5.2.6. Obsah proteinů byl získán dosazením průměrných hodnot naměřených absorbancí do kalibrační křivky (Rovnice 6), jež byl následně přepočítán na navážku vzorku vybraných luštěnin. Získané koncentrace jsou zaznamenány v grafu (Obrázek 21), včetně odchylek jednotlivých měření.

Z grafu výše lze vyčíst, že se výsledná koncentrace rozpustných proteinů ve vodě ve všech testovaných luštěninách pohybovala okolo 1 %. Nejvyšší obsah vykazovala černá čočka Beluga ($1,13 \pm 0,02$ g/100 g vzorku), dále pak hrách ($1,10 \pm 0,02$ g/100 g vzorku) a červená čočka ($1,03 \pm 0,03$ g/100 g vzorku). Ze získaných výsledků je patrné, že se obsah proteinů v hrachu a černé čočce téměř neliší. Naměřená data byla porovnána s nutričními hodnotami uváděnými výrobcem (4.1.2). Opět jako u cereálií bylo zjištěno, že naměřené koncentrace rozpustných bílkovin jsou mnohonásobně nižší. Jak už bylo zmíněno výše, Hartree-Lowryho metoda

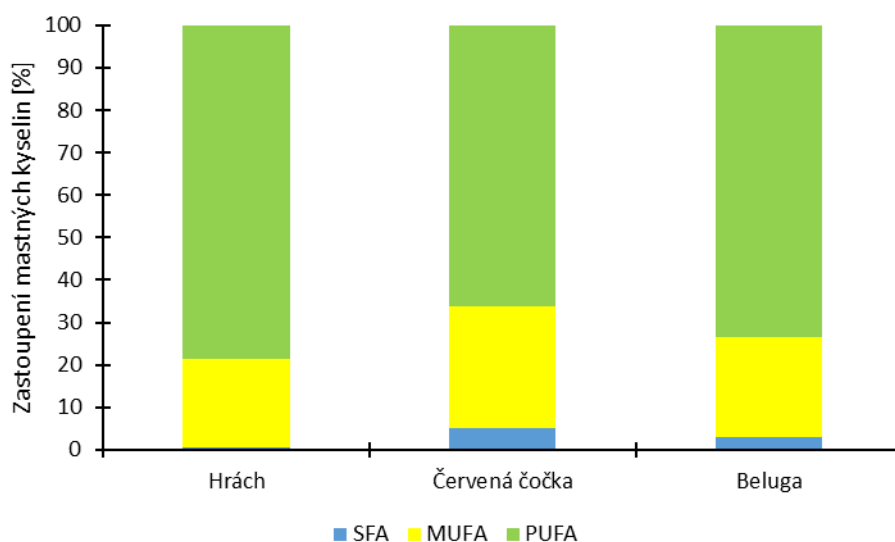
neslouží ke stanovení celkových proteinů, ale pouze bílkovin rozpustných ve vodě, proto jsou hodnoty nižší, než uvádí výrobce.



Obrázek 21: Obsah rozpustných proteinů ve vybraných luštěninách

5.2.6 Stanovení mastných kyselin pomocí GC

V analyzovaných luštěninách byly pomocí plynové chromatografie stanoveny mastné kyseliny a celkové lipidy pomocí postupu, který je uveden v kapitole 4.5.3.1. V grafu níže (Obrázek 22) je znázorněno procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vybraných vzorcích luštěnin, a to nasycené mastné kyseliny (SFA), mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Uvedená procentuální zastoupení mastných kyselin byla získána z průměrných hodnot dvou měření.

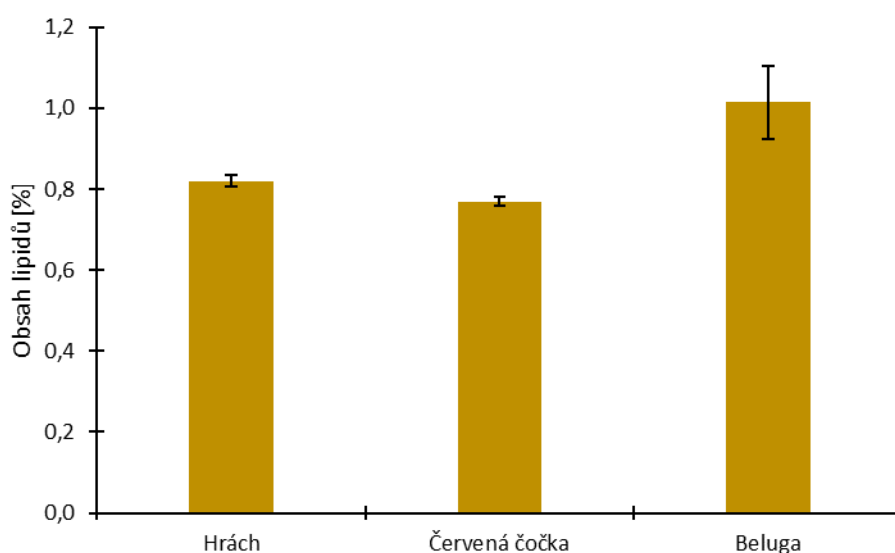


Obrázek 22: Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vybraných luštěninách

Z grafu výše vyplývá, že testované luštěniny nevykazovaly skoro žádný obsah nasycených mastných kyselin. Polynenasycené mastné kyseliny naopak měly ve všech analyzovaných luštěninách největší zastoupení. První místo s nejvyšším obsahem PUFA zaujímá hrách

(78,66 %), následně černá čočka Beluga (73,41 %) a červená čočka (66,15 %). Obsah MUFA všech luštěnin byl lehce odlišný. Nejvyšší podíl byl naměřen u červené čočky (28,68 %), pak u Belugy (23,68 %) a hrachu (20,74 %).

V následujícím grafu (Obrázek 23) je znázorněno procentuální zastoupení celkových lipidů ve vybraných luštěninách, jež bylo získáno z naměřených dat pomocí plynové chromatografie. Opět jako u zastoupení mastných kyselin ve vybraných luštěninách, byla výsledná data získána pomocí zprůměrovaných hodnot dvou měření.



Obrázek 23: Procentuální zastoupení lipidů ve vybraných luštěninách

Z grafu (Obrázek 23) lze vyčíst, že stanovený obsah lipidů v jednotlivých luštěninách nepřekročil hranici 1,2 g/100 g vzorku. Nejvyšší koncentrace byla stanovena u černé čočky Belugy (1,01 g/100 g vzorku). Naměřená hodnota byla porovnána s nutriční hodnotou uváděnou výrobcem (viz 4.1.2). Bylo zjištěno, že tyto dvě hodnoty se s odchylkou 0,09 g/100 g vzorku zcela shodují. Získané hodnoty u hrachu (0,82 g/100 g vzorku) a červené čočky (0,77 g/100 g vzorku) se od sebe téměř neliší. Co se týče hrachu, výrobcem uváděná hodnota lipidů je 0,8 g/100 g vzorku, lze tedy tuto hodnotu považovat za prakticky shodnou. U červené čočky se obsah lipidů uváděný výrobcem od naměřené hodnoty liší pouze o 0,53 g/100 g vzorku.

5.2.7 Stanovení pigmentů a lipofilních metabolitů pomocí HPLC

Pomocí kapalinové chromatografie byly ve vybraných vzorcích luštěnin analyzovány lipofilní metabolity a pigmenty dle postupu, jenž je uveden v kapitole 0. V následující tabulce (Tabulka 15) jsou znázorněny výsledné koncentrace lipofilních metabolitů a pigmentů, které byly získány za pomoci programu ChromeleonTM Chromatography Data System. Obsah jednotlivých pigmentů a lipofilních metabolitů v testovaných luštěninách byl poté vypočítán pomocí kalibračních křivek standardů.

Tabulka 15: Stanovené koncentrace pigmentů ve vybraných luštěninách pomocí HPLC

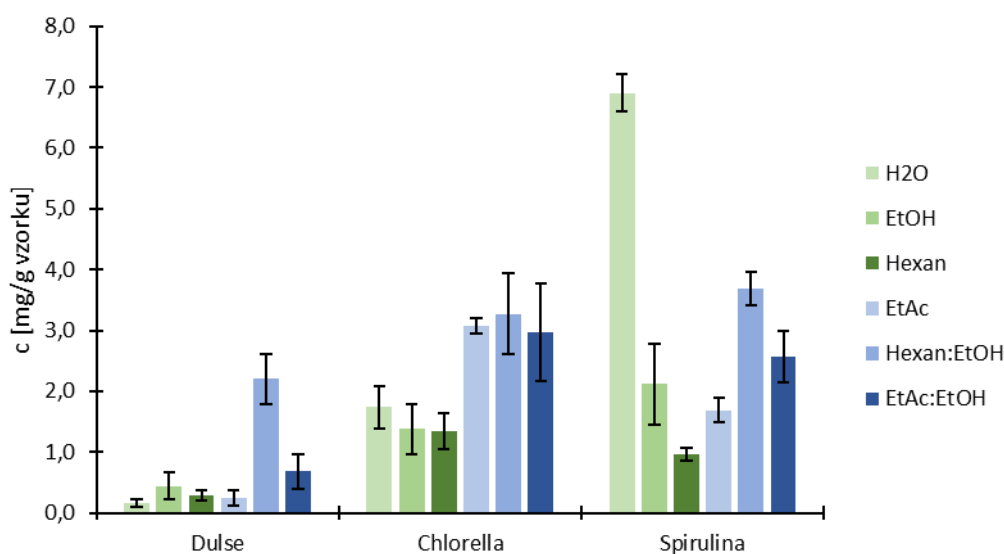
	Hrách	Červená čočka	Černá čočka Beluga
Egosterol [$\mu\text{g/g}$]	$3,25 \pm 0,17$	$4,63 \pm 0,31$	$3,98 \pm 0,27$
Tokoferol [$\mu\text{g/g}$]	$64,21 \pm 0,11$	$53,40 \pm 0,91$	$58,64 \pm 1,32$
Ubichinon [$\mu\text{g/g}$]	$18,79 \pm 0,07$	$18,44 \pm 0,67$	$18,12 \pm 0,57$
Chlorofyl A [$\mu\text{g/g}$]	$3,22 \pm 0,36$	$4,27 \pm 0,27$	$1,77 \pm 0,09$
Chlorofyl B [$\mu\text{g/g}$]	$3,98 \pm 0,16$	$5,64 \pm 0,39$	$1,39 \pm 0,24$
Lutein [$\mu\text{g/g}$]	$7,46 \pm 0,08$	$9,84 \pm 0,15$	$8,44 \pm 0,18$
Neoxanthin [$\mu\text{g/g}$]	$2,87 \pm 0,03$	$3,94 \pm 0,34$	$4,02 \pm 0,09$

Z tabulky výše vyplývá, že obsah pigmentů a lipofilních metabolitů byl ve všech testovaných luštěninách zcela shodný. Nejvyšší naměřená koncentrace byla stanovena u tokoferolu a ubichinonu. Tokoferol a ubichinon byl nejvíc obsažen v hrachu ($64,21 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$ vzorku a $18,79 \pm 0,07 \mu\text{g/g}$ vzorku). Dále můžeme konstatovat, že oproti testovaným cereáliím (Tabulka 12) byl u luštěnin zjištěn i ergosterol. Nejnižším zastoupeným pigmentem byl u všech luštěnin chlorofyl.

5.3 Charakterizace extraktů z řas

5.3.1 Stanovení celkových polyfenolů u řas

Celkový obsah fenolických látek v připravených extraktech z vybraných řas byl stanoven spektrofotometricky podle postupu uvedeném v kapitole 4.5.2.2. Pro každý extrakt testovaných řas bylo celkem třikrát provedeno měření a průměrná hodnota naměřených absorbancí byla dosazena do Rovnice 2, čímž byla získána koncentrace fenolických látek. Ta byla poté vztažena na navážku řasy. Výsledný obsah celkových fenolických látek, včetně odchylek jednotlivých měření, znázorňuje graf (Obrázek 24).

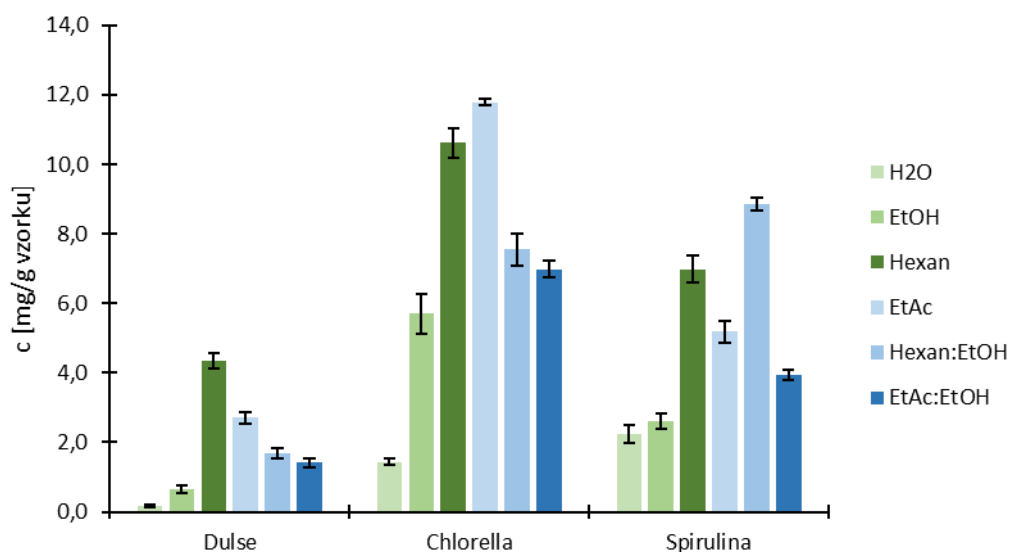


Obrázek 24: Obsah celkových fenolických látek v jednotlivých extraktech z vybraných řas

Na první pohled je z grafu patrné, že žádný z připravených extraktů řasy *Dulse* nevykazoval nijak zvlášť vysokou koncentraci fenolických látek. Co se týče *Dulse*, nejvyšší obsah byl stanoven u hexan:ethanolového extraktu ($2,20 \pm 0,41$ mg/g vzorku) v poměru 1:1, nejnižší u vodného extraktu ($0,16 \pm 0,06$ mg/g vzorku). V případě *Chlorella* byl pozorován stejný trend jako u *Dulse*. Ze všech připravených extraktů byl nejvyšší obsah fenolických látek zaznamenán opět u hexan:ethanolového extraktu ($3,27 \pm 0,67$ mg/g vzorku) v poměru 1:1. Stanovený obsah u ethylacetátového extraktu ($3,08 \pm 0,12$ mg/g vzorku) a ethyacetát:ethanolového extraktu ($2,96 \pm 0,80$ mg/g vzorku) v poměru 1:1 byl téměř srovnatelný s obsahem fenolických látek v hexan:ethanolovém extraktu. Naopak u řasy *Spirulina* byla nejvyšší koncentrace celkových fenolických látek stanovena u vodného extraktu ($6,90 \pm 0,31$ mg/g vzorku), nejnižší u hexanového extraktu ($0,96 \pm 0,10$ mg/g vzorku). V tomto případě byl naplněn trend, kdy obsah fenolických látek v extraktech klesá s polaritou rozpouštědla. Jelikož jsou fenolické látky polární molekuly, dalo se předpokládat, že nejnižší obsah bude vykazovat hexanový extrakt.

5.3.2 Stanovení flavonoidů u řas

Koncentrace flavonoidů byla v připravených extraktech jednotlivých řas analyzována spektrofotometricky dle postupu, který je uveden v kapitole 4.5.2.3. Koncentrace flavonoidů byla získána dosazením průměrných hodnot absorbancí do kalibrační křivky (Rovnice 3) a následným přepočtem na navážku biomasy řas. Graf (Obrázek 25) zobrazuje výsledný obsah flavonoidů v připravených extraktech z vybraných řas včetně odchylek.

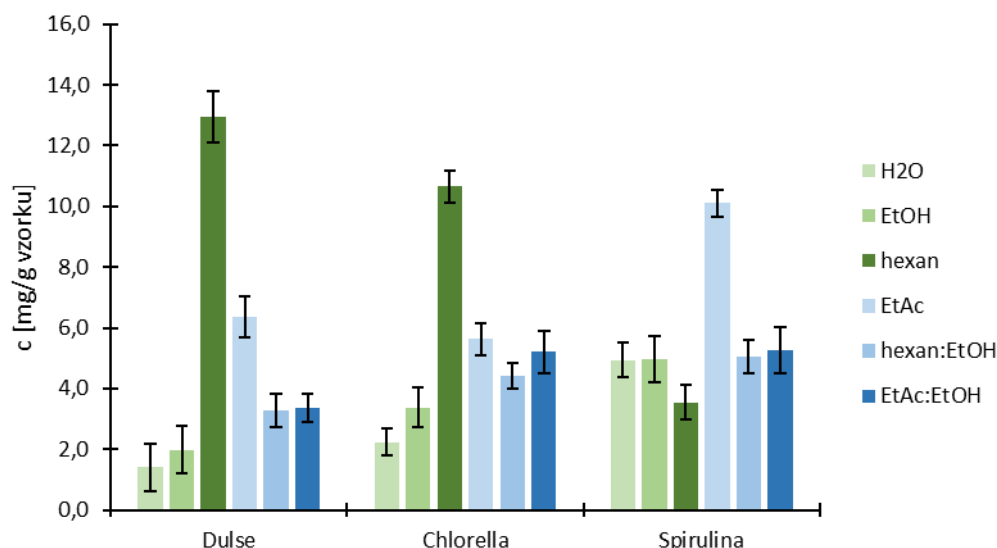


Obrázek 25: Obsah flavonoidů v jednotlivých extraktech z vybraných řas

Z vynesných dat lze konstatovat, že obsah flavonoidů připravených extraktů z řas byl velmi odlišný. Můžeme zde ale pozorovat trend, že vodné extrakty všech řas obsahovaly nejmenší množství flavonoidů. U *Dulse* se jedná o $0,18 \pm 0,03$ mg/g vzorku, u *Chlorelly* $1,44 \pm 0,10$ mg/g vzorku a u *Spiruliny* $2,24 \pm 0,25$ mg/g vzorku. U *Dulse* a *Chlorelly* byl nejvyšší obsah flavonoidů vyextrahován do hexanu, u *Spiruliny* naopak do hexan:ethanolového extraktu (1:1).

5.3.3 Stanovení antioxidační aktivity

Množství antioxidantů v připravených extraktech z vybraných řas bylo stanoveno spektrofotometricky dle postupu, který je popsán v kapitole 4.5.2.4. Získaná antioxidační aktivita byla vyjádřena jako parametr TEAC, který určuje antioxidační aktivitu jako ekvivalent Troloxu v mg/g vzorku. Výsledná antioxidační aktivita byla získána dosazením průměrných hodnot naměřených absorbancí do rovnice kalibrační přímky (Rovnice 4), jež byla následně vztažena na navážku biomasy řasy. V grafu níže (Obrázek 26) je znázorněna získaná antioxidační aktivita jednotlivých extraktů z vybraných řas včetně odchylek měření.

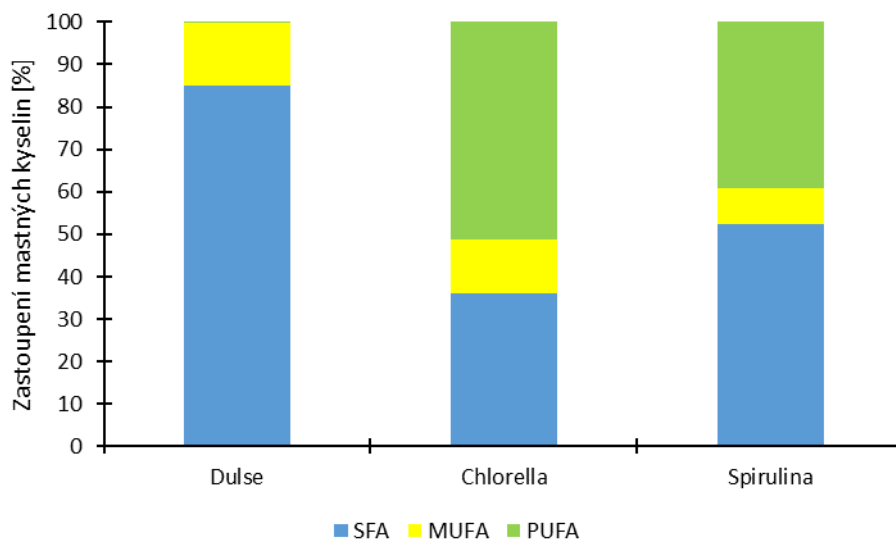


Obrázek 26: Stanovená antioxidační aktivita v jednotlivých extraktech z vybraných řas

Z grafu výše lze vypožorovat, že stanovená antioxidační aktivita se u připravených extraktů z řas velmi lišila. Co se týče *Dulce*, nejvyšší množství antioxidantů bylo vyextrahováno do hexanu ($12,96 \pm 0,85$ mg/g vzorku), nejmenší naopak do vody ($1,40 \pm 0,77$ mg/g vzorku). Z grafu lze konstatovat, že u extraktů z *Chlorella* můžeme pozorovat stejný trend, z hlediska množství antioxidantů. Naopak u *Spirulina* byl zaznamenán nejvyšší obsah antioxidantů u ethylacetátového extraktu ($10,11 \pm 0,44$ mg/g vzorku). V porovnání s fenolickými látkami (Obrázek 24) je zřejmé, že stanovená antioxidační aktivita neodpovídala u testovaných extraktů příliš obsahu fenolických látek, blížila se spíše obsahu flavonoidů a je zřejmé, že k celkové antioxidační aktivitě řas významně přispívají i jiné metabolity.

5.3.4 Stanovení mastných kyselin u řas pomocí GC

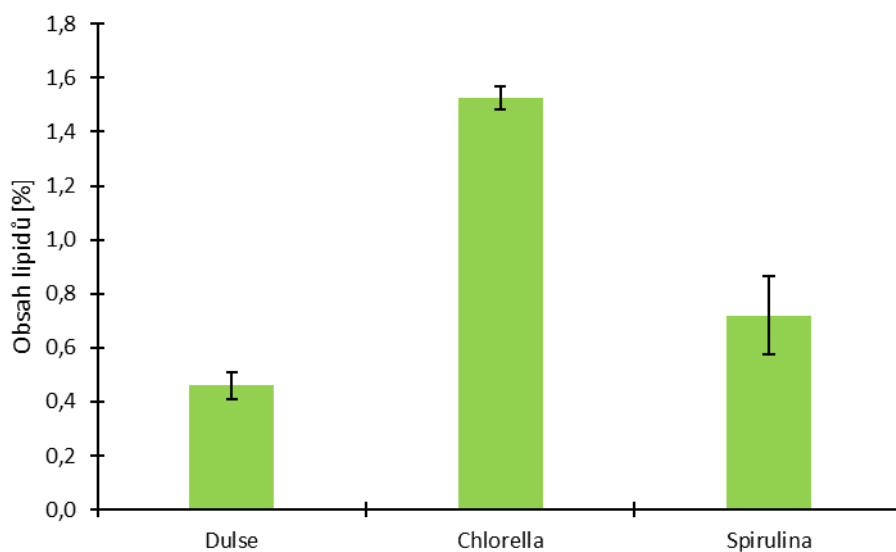
V analyzovaných řasách byly pomocí plynové chromatografie stanoveny mastné kyseliny a celkové lipidy pomocí metody, která je popsána v kapitole 4.5.3.1. V tomto stanovení nebyly testovány připravené extrakty řas, ale přímo biomasa. V následujícím grafu (Obrázek 27) je uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vybraných vzorcích řas, konkrétně nasycené mastné kyseliny (SFA), mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Uvedená procentuální zastoupení mastných kyselin byla získána z průměrných hodnot dvou měření.



Obrázek 27: Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vybraných řasách

Z grafu (Obrázek 27) vyplývá, že mastné kyseliny v řasách jsou nejvíce zastoupeny nasycenými mastnými kyselinami. Jejich obsah se však v jednotlivých řasách velmi liší. Nejvyšší obsah SFA byl zjištěn u *Dulce* (84,99 %). U *Spirulina* nasycené kyseliny zaujímaly 52,33 %; u *Chlorella* pouze 36,15 %. Procentuální zastoupení MUFA v *Dulce* (14,76 %), *Chlorella* (12,71 %) a *Spirulina* (8,45 %) se téměř shoduje. Z grafu lze také vyčíst, že řasa *Dulce* neobsahuje skoro žádné polynenasycené mastné kyseliny. Za to PUFA v *Chlorella* zaujímají 51,14 % a ve *Spirulina* 39,22 %.

V grafu níže (Obrázek 28) je znázorněno procentuální zastoupení lipidů ve vybraných řasách, jež bylo získáno z naměřených dat biomasy pomocí plynové chromatografie. Opět jako u zastoupení mastných kyselin ve vybraných řasách, byla výsledná data získána pomocí průměrovaných hodnot dvou měření.



Obrázek 28: Procentuální zastoupení lipidů ve vybraných řasách

Nejvyšší obsah lipidů byl stanoven u *Chlorella* (1,52 g/100 g vzorku). V porovnání s nutriční hodnotou uváděnou výrobcem (kapitola 4.1.3) je zjištěný obsah lipidů lehce nižší. Obsah lipidů ve *Spirulina* byl stanoven na 0,72 g/100 g vzorku. Tuto hodnotu můžeme s hodnotou uváděnou výrobcem považovat za shodnou. U *Dulse* byl obsah lipidů stanoven na 0,46 g/100 g vzorku, což se liší od hodnoty uváděné výrobcem (1,3 g/100 g vzorku). Chyba mohla nastat nedostatečnou homogenizací nebo transesterifikací při přípravě vzorků na analýzu GC.

5.3.5 Stanovení pigmentů a lipofilních metabolitů řas pomocí HPLC

Pomocí kapalinové chromatografie byly v biomase vybraných řas stanoveny lipofilní metabolity a pigmenty dle postupu, jenž je podrobně popsán v kapitole 0. V následující tabulce (Tabulka 16) jsou znázorněny výsledné koncentrace lipofilních metabolitů a pigmentů, které byly získány za pomoci programu Chromeleon™ Chromatography Data System. Obsah jednotlivých pigmentů a lipofilních metabolitů byl poté vypočítán pomocí kalibračních křivek.

Tabulka 16: Stanovené koncentrace pigmentů ve vybraných řasách pomocí HPLC

	<i>Dulse</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Spirulina</i>
Chlorofyl A [$\mu\text{g/g}$]	0,15 \pm 0,02	42,12 \pm 0,57	50,25 \pm 0,05
Chlorofyl B [$\mu\text{g/g}$]	–	48,36 \pm 0,39	56,13 \pm 0,81
Lutein [$\mu\text{g/g}$]	5,17 \pm 0,27	6,13 \pm 0,15	7,16 \pm 0,34
Neoxanthin [$\mu\text{g/g}$]	–	3,74 \pm 0,12	2,78 \pm 0,08
β -karoten [$\mu\text{g/g}$]	–	2,36 \pm 0,09	0,97 \pm 0,07
Astaxanthin [$\mu\text{g/g}$]	–	–	3,45 \pm 0,27

Z tabulky můžeme dedukovat, že řasa *Dulse* není bohatá na lipofilní metabolity a pigmenty. Ze stanovovaných látek obsahuje pouze malé množství chlorofylu A a luteinu. Jak bylo předpokládáno, můžeme u řas *Chlorella* a *Spirulina* pozorovat vysoké množství chlorofylů A i B. *Spirulina* navíc obsahuje v malém množství lipofilní metabolit astaxanthin (3,45 \pm 0,27 $\mu\text{g/g}$ vzorku).

5.3.6 Stanovení β -glukanů v řasách

Celková koncentrace β -glukanů ve vybraných řasách byla stanovena pomocí komerčně dostupného kitu dle postupu, který je uveden v kapitole 4.5.3.6. Výsledná koncentrace β -glukanů v jednotlivých biomasách studovaných řas byla zjištěna pomocí výpočtového Excelu od výrobce kitu, do kterého byly vždy dosazeny naměřené hodnoty absorbcí, jednotlivé navážky a objemy testovaných vzorků. Získaný obsah β -glukanů je uveden v Tabulka 17.

Tabulka 17: Stanovená koncentrace β -glukanů ve vybraných řasách

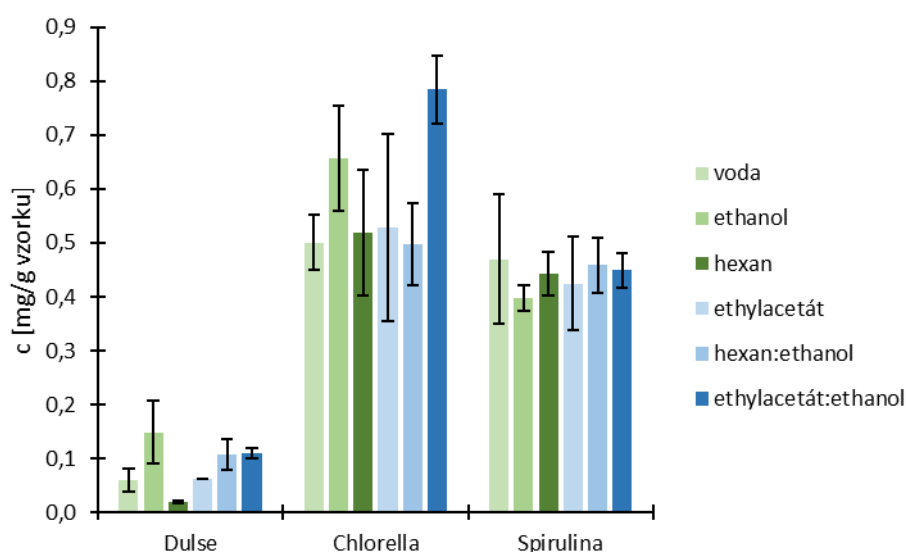
Vzorek řasy	$c_{\beta\text{-glukanů}}$ [g/100 g]
<i>Dulse</i>	0,091 \pm 0,021
<i>Chlorella</i>	0,036 \pm 0,006
<i>Spirulina</i>	0,072 \pm 0,024

β -glukany jsou pevně vázány v buněčných stěnách jednotlivých řas. Jelikož je složité je extrahovat, musí být analyzované vzorky podrobeny enzymatickým reakcím či hydrolyzám.

Z tabulky výše vyplývá, že obsah β -glukanů v testovaných řasách byl nižší než 0,1 %. Nejvyšší obsah byl zjištěn u *Dulse* ($0,091 \pm 0,021$ g/100 g), dále pak u *Spiruliny* ($0,072 \pm 0,024$ g/100 g) a *Chlorelly* ($0,036 \pm 0,006$ g/100 g). V porovnání s cereáliemi lze konstatovat, že řasy *Dulse*, *Chlorella* i *Spirulina* obsahovaly nižší zastoupení β -glukanů než pohanka, quinoa a bezlepkové vločky.

5.3.7 Spektrofotometrické stanovení pigmentů

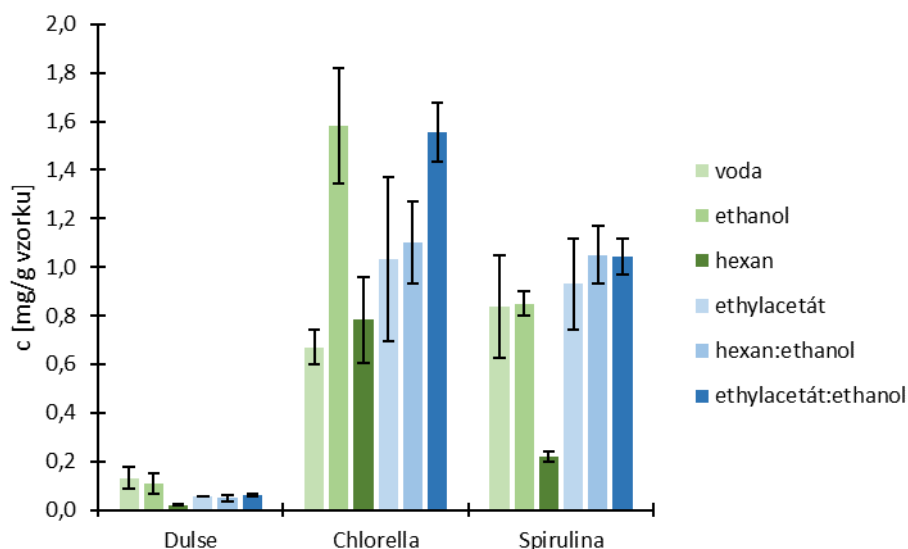
Díky naměřeným absorpčním spektrům byly v připravených extraktech z *Dulse*, *Chlorella* a *Spirulina* stanoveny pigmenty dle postupu popsaného v kapitole 4.5.3.4. Získané hodnoty absorbancí při potřebných vlnových délkách byly zprůměrovány a jejich průměrná hodnota byla dosazena do Rovnice 7. Výsledné koncentrace byly vyjádřeny jako mg/g biomasy řas. Následující grafy (Obrázek 29 a Obrázek 30) znázorňují získané koncentrace chlorofylů A a B.



Obrázek 29: Obsah chlorofylu A v jednotlivých extraktech z vybraných řas

Z grafu lze vypočítat, že připravené extrakty z řasy *Dulse* vykazovaly nejmenší obsah chlorofylu A ze všech testovaných extraktů. Koncentrace byla naměřena v rozmezí 0,06–0,15 mg/g vzorku. Řasa *Dulse* má přirozeně nachovou barvu, tudíž lze předpokládat, že bude disponovat velmi nízkým obsahem chlorofylů. Co se týče extraktů z *Chlorella*, nejvíce vyextrahovaných chlorofylů A bylo v případě směsi rozpouštědel ethylacetát:ethanol ($0,78 \pm 0,01$ mg/g vzorku) v poměru 1:1. V případě testovaných extraktů *Spirulina* lze pozorovat, že množství chlorofylu A bylo ve všech extraktech zcela shodné.

U připravených extraktů řasy *Dulse* je opět pozorován trend jako u chlorofylu A. Stanovený obsah nepřekročil hranici $0,13 \pm 0,05$ mg/g vzorku, tudíž lze předpokládat, že bude obsahovat jen stopové množství zeleného barviva. Jelikož jsou *Chlorella* a *Spirulina* zelené řasy, dalo se předpokládat, že množství chlorofylů bude vyšší než u *Dulse*. V případě *Chlorella* nejvyšší koncentraci chlorofylu B vykazoval ethanolový extrakt ($1,58 \pm 0,24$ mg/g vzorku), u *Spirulina* hexan:ethanolový extrakt ($1,05 \pm 0,17$ mg/g vzorku) v poměru 1:1.



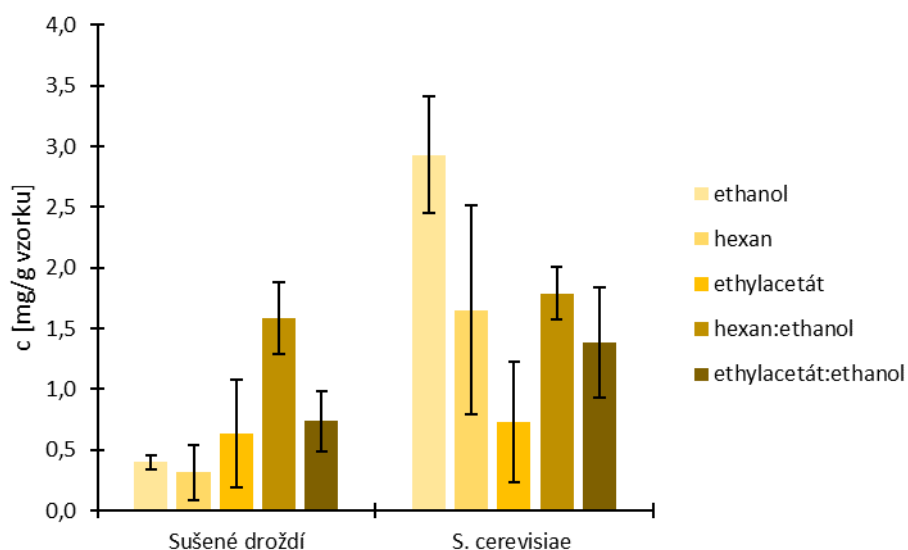
Obrázek 30: Obsah chlorofylu B v jednotlivých extraktech z vybraných řas

V připravených extraktech z řas byl také zkoumán obsah karotenoidů, avšak u všech extraktů byly karotenoidy stanoveny jako pod limitem detekce, tudíž lze předpokládat, že testovaná rozpouštědla nevyextrahovala jejich dostatečné množství.

5.4 Charakterizace extraktů z kvasinek

5.4.1 Stanovení celkových polyfenolů u kvasinek

Obsah celkových fenolických látek v připravených extraktech z vybraných kvasinek byl stanoven spektrofotometricky podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2.2. Pro každý extrakt jednotlivých kvasinek bylo celkem třikrát provedeno měření a průměrná hodnota naměřených absorbancí byla dosazena do Rovnice 2, čímž byla získána koncentrace fenolických látek. Ta byla poté vztažena na navážku kvasinky. Výsledný obsah celkových fenolických látek, včetně odchylek jednotlivých měření, znázorňuje graf (Obrázek 31).

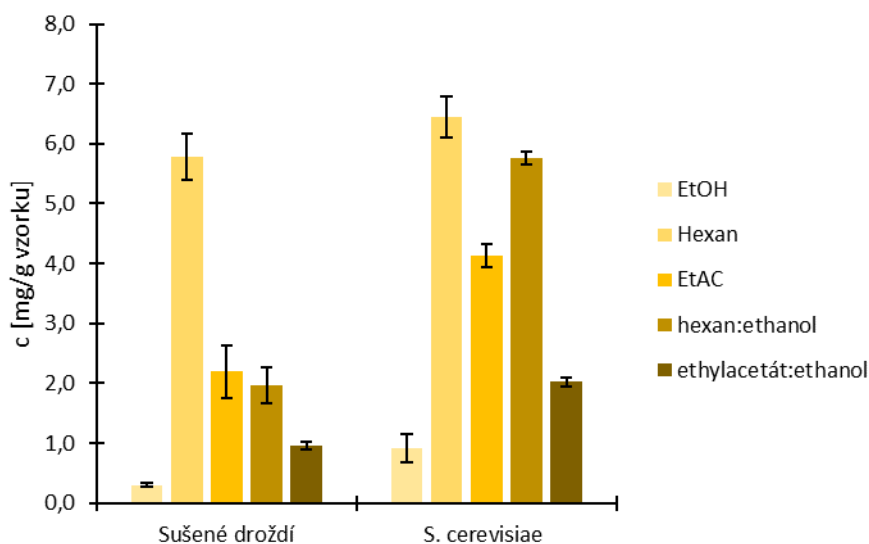


Obrázek 31: Obsah celkových fenolických látek v jednotlivých extraktech z vybraných kvasinek

Bylo připraveno 5 druhů extraktů ze sušeného pekařského droždí a *Saccharomyces cerevisiae*. Z grafu výše lze vyčíst, že v sušeném droždí byl nejvyšší obsah fenolických látek naměřen u hexan:ethanolového extraktu ($1,58 \pm 0,30$ mg/g vzorku) v poměru 1:1. Tento trend se opakuje, jelikož ve srovnání s řasami *Dulse* a *Chlorella* u tohoto typu extraktu tomu tak bylo stejně. Zato u *Saccharomyces cerevisiae* bylo u hexan:ethanolového extraktu ($1,79 \pm 0,22$ mg/g vzorku) stanoveno druhé největší množství fenolických látek. Nejvyšší obsah byl v tomto případě stanoven u ethanolového extraktu ($2,93 \pm 0,48$ mg/g vzorku). Co se týče porovnání obsahu fenolických látek v extraktech z řas a kvasinek, lze konstatovat, že stanovené koncentrace celkových fenolických látek byly podobné.

5.4.2 Stanovení flavonoidů

Obsah flavonoidů v připravených extraktech z vybraných kvasinek byl stanoven pomocí metody, která je podrobně popsána v kapitole 4.5.2.3. Množství flavonoidů bylo získáno dosažením průměrných hodnot absorbancí do kalibrační křivky (Rovnice 3) a následným přepočtem na navážku biomasy kvasinek. Graf (Obrázek 32) zobrazuje výsledný obsah flavonoidů v připravených extraktech z jednotlivých kvasinek včetně odchylek.



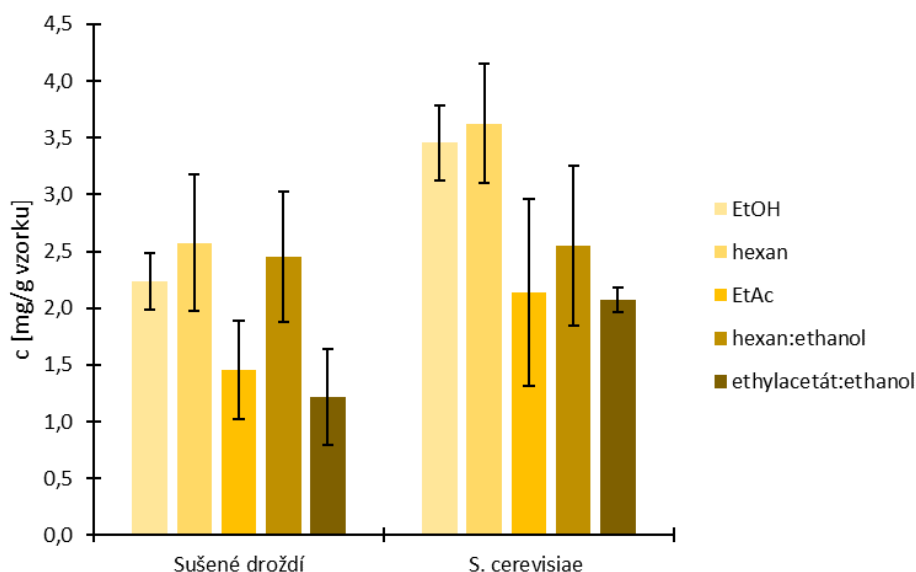
Obrázek 32: Obsah flavonoidů v jednotlivých extraktech z vybraných kvasinek

Z pohledu na graf (Obrázek 32) lze konstatovat, že obsah flavonoidů v testovaných kvasinkových extraktech byl velmi odlišný. Navíc v porovnání se stanovenými fenolickými látkami (Obrázek 31) lze usuzovat, že obsah flavonoidů skoro všech připravených extraktů byl vyšší než obsah fenolických látek. I když jsou flavonoidy podskupinou fenolických látek a lze předpokládat, že budou nižší, mohlo dojít k detekci nějakých dalších složek, případně při měření mohlo dojít ke kontaminaci vzorků či interferenci vzorků s roztoky použitými ke stanovení.

5.4.3 Stanovení antioxidační aktivity kvasinek

Antioxidační aktivita byla v připravených extraktech z testovaných kvasinek stanovena spektrofotometricky dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2.4. Získaná antioxidační aktivita byla vyjádřena jako parametr TEAC, který určuje antioxidační aktivitu jako ekvivalent Troloxu v mg/g vzorku. Výsledný obsah antioxidantů byl získán dosažením průměrných hodnot

naměřených absorbancí do rovnice kalibrační přímky (Rovnice 4), jež byl následně vztažen na navážku vzorku kvasinky. V grafu níže (Obrázek 33) je znázorněna získaná antioxidační aktivita jednotlivých extraktů z vybraných kvasinek včetně odchylek měření.



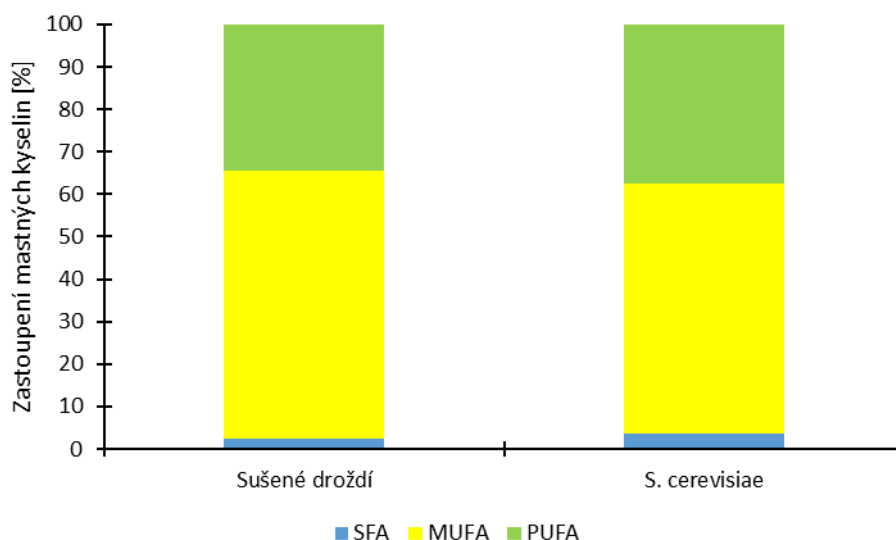
Obrázek 33: Stanovená antioxidační aktivita v jednotlivých extraktech z vybraných kvasinek

Z grafu (Obrázek 33) vyplývá, že antioxidační aktivita byla u připravených extraktů z kvasinek stanovená v rozmezí 1,22–3,63 mg/g vzorku. Jestliže porovnáme obsah antioxidantů u extraktů ze sušeného droždí a *Saccharomyces cerevisiae*, z grafu lze usuzovat, že nejvyšší množství antioxidantů bylo zjištěno u hexanových extraktů ($2,57 \pm 0,59$ mg/g vzorku a $3,63 \pm 0,52$ mg/g vzorku) a nejmenší u ethylacetát:ethanolových extraktů ($1,22 \pm 0,42$ mg/g vzorku a $2,08 \pm 0,11$ mg/g vzorku). Antioxidační aktivita poměrně dost odpovídá profilu flavonoidů ve vzorcích kvasinek.

5.4.4 Stanovení mastných kyselin pomocí GC

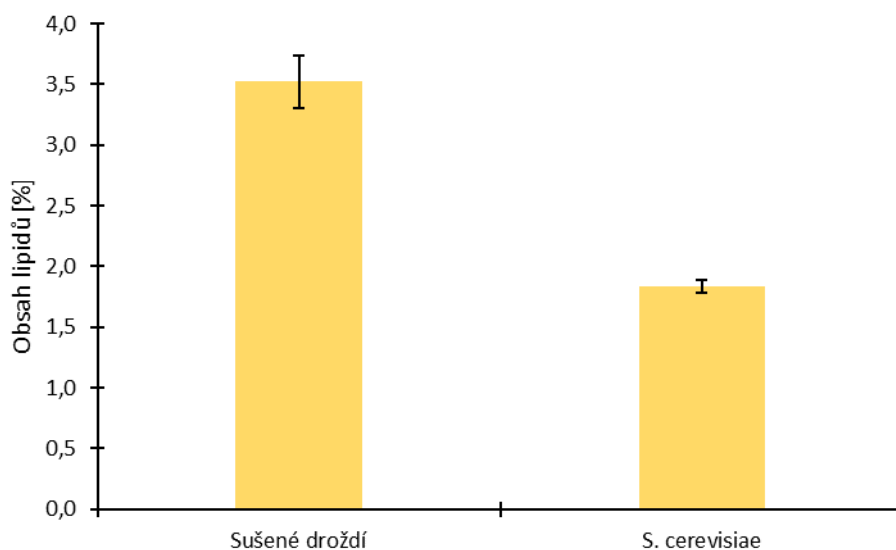
Ve vybraných kvasinkách byly pomocí plynové chromatografie stanoveny mastné kyseliny a celkové lipidy pomocí metody, jež je uvedena v kapitole 4.5.3.1. V tomto stanovení nebyly testovány připravené extrakty kvasinek, ale přímo biomasa. V následujícím grafu (Obrázek 34) je uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vybraných vzorcích kvasinek, konkrétně nasycené mastné kyseliny (SFA), mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Uvedená procentuální zastoupení mastných kyselin byla získána z průměrných hodnot dvou měření.

Z grafu je patrné, že testované kvasinky obsahují jen nevýznamné množství nasycených mastných kyselin (SFA). Naopak nejvýše zastoupeny jsou u obou zástupců kvasinek mononenasycené mastné kyseliny (MUFA), konkrétně 63,15 % u sušeného pekařského droždí a 58,66 % u *Saccharomyces cerevisiae*. Obsah PUFA se u droždí (34,33 %) a *S. cerevisiae* (37,59 %) zcela shoduje.



Obrázek 34: Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vybraných kvasinkách

V grafu níže (Obrázek 35) je znázorněno procentuální zastoupení lipidů ve vybraných kvasinkách, jež bylo získáno z naměřených dat biomasy pomocí plynové chromatografie. Opět jako u zastoupení mastných kyselin v kvasinkách, byla výsledná data získána pomocí zprůměrovaných hodnot dvou měření.



Obrázek 35: Procentuální zastoupení lipidů ve vybraných kvasinkách

Z grafu lze vyčíst, že obsah lipidů se u sušeného pekařského droždí (3,52 %) a *Saccharomyces cerevisiae* (1,83 %) skoro dvojnásobně liší. To mohlo být opět způsobeno nedostatečnou transesterifikací při přípravě vzorků kvasinek na analýzu pomocí GC, případně odlišnou kvalitou preparátů.

5.4.5 Stanovení pigmentů a lipofilních metabolitů kvasinek pomocí HPLC

Pomocí kapalinové chromatografie byly v biomase vybraných kvasinek stanoveny lipofilní metabolity a pigmenty dle postupu, který je uveden v kapitole 0. V následující tabulce (Tabulka 18) jsou znázorněny výsledné koncentrace lipofilních metabolitů a pigmentů, které byly

získány za pomoci programu Chromeleon™ Chromatography Data System. Obsah jednotlivých pigmentů a lipofilních metabolitů byl poté vypočítán pomocí kalibračních křivek

Tabulka 18: Stanovené koncentrace pigmentů ve vybraných kvasinkách pomocí HPLC

	Sušené pekařské droždí	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ergosterol [$\mu\text{g/g}$]	87,49 \pm 0,94	94,17 \pm 0,89
Ubichinon [$\mu\text{g/g}$]	250,49 \pm 3,64	239,14 \pm 5,13

Jak bylo očekáváno, u lipofilních metabolitů se u obou kvasinek vyskytovaly pouze ergosterol a ubichinon, a to ve vysokém množství. V tabulce (Tabulka 18) lze pozorovat, že koncentrace ergosterolu a ubichinonu byla v případě testovaných kvasinek téměř shodná, jelikož se kvasinka *Saccharomyces* používá při výrobě pekařského droždí, tudíž by měly být získané výsledky koncentrací lipofilních metabolitů a pigmentů velmi podobné.

5.4.6 Stanovení β -glukanů u kvasinek

Celkový obsah β -glukanů byl stanoven v biomase vybraných kvasinek pomocí komerčně dostupného kitu Megazyme dle postupu, který je detailně popsán v kapitole 4.5.3.7. Stanovení β -glukanů probíhalo ve dvou krocích, kdy byl nejprve zjištěn obsah celkových glukanů a následně obsah α -glukanů. Rozdílem těchto dvou koncentrací byl zjištěn obsah β -glukanů. Výsledná koncentrace β -glukanů ve studovaných kvasinkách byla zjištěna pomocí výpočtového Excelu od výrobce kitu, do kterého byly vždy dosazeny naměřené hodnoty absorbancí, jednotlivé navážky a objemy testovaných vzorků. Získané koncentrace β -glukanů jsou uvedeny v Tabulka 19.

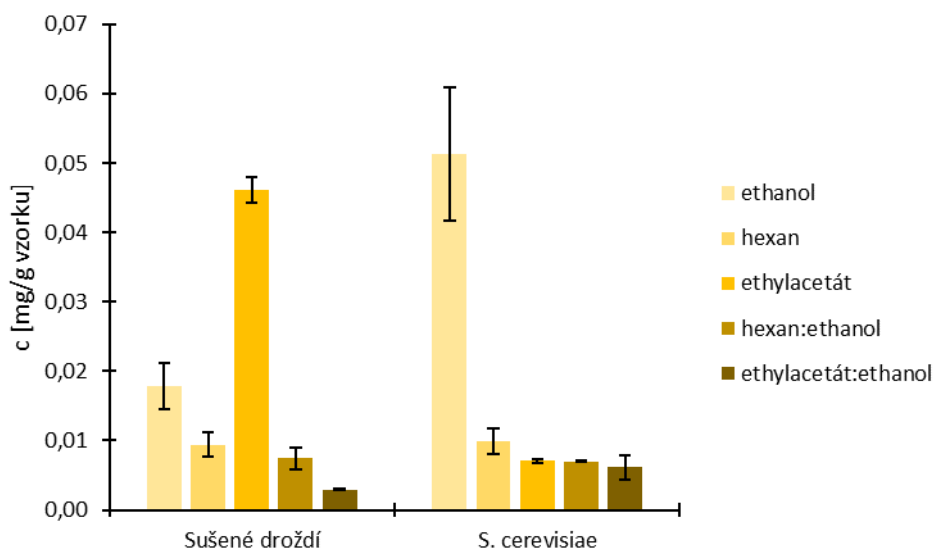
Tabulka 19: Stanovená koncentrace glukanů ve vybraných kvasinkách

Vzorek	$c_{\text{glukanů}}$ [g/100 g]	$c_{\alpha\text{-glukanů}}$ [g/100 g]	$c_{\beta\text{-glukanů}}$ [g/100 g]
Sušené pekařské droždí	8,876 \pm 1,853	1,593 \pm 0,222	7,283 \pm 2,075
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13,657 \pm 1,024	4,640 \pm 0,275	9,017 \pm 0,750

Ze získaných výsledků je patrné, že zjištěný obsah β -glukanů u sušeného pekařského droždí (7,283 \pm 2,075 g/100 g) a *Saccharomyces cerevisiae* (9,017 \pm 0,750 g/100 g) je poměrně podobný. Jelikož jsou β -glukany zastoupeny v buněčné stěně kvasinek, lze podle naměřených výsledků předpokládat, že pevnost buněčné stěny sušeného droždí a *Saccharomyces cerevisiae* je téměř shodná. Co se týče procentuálního zastoupení, β -glukany obsažené v sušeném droždí představovaly 82 % celkových glukanů, u *Saccharomyces cerevisiae* pouze 66 %. V porovnání s analyzovanými cereáliemi a řasami obsahovaly kvasinky nejvyšší zastoupení β -glukanů.

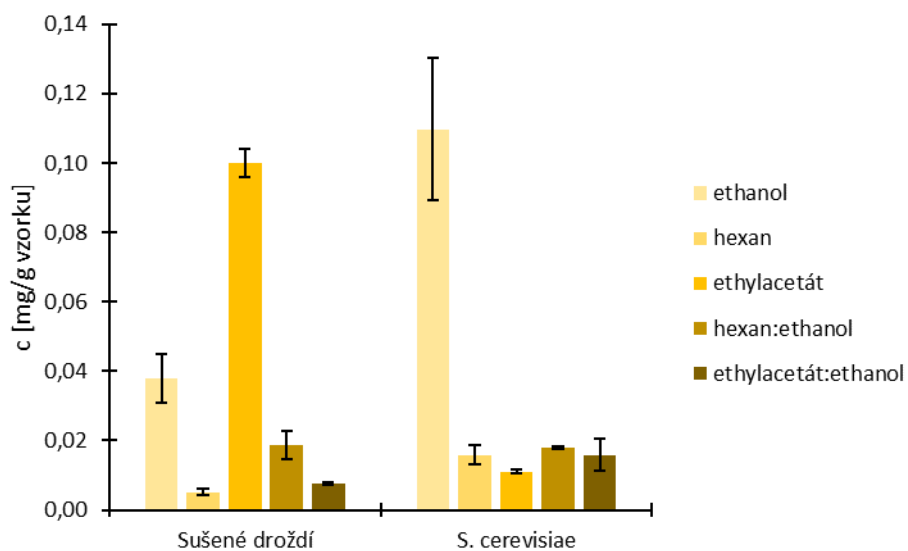
5.4.7 Spektrofotometrické stanovení pigmentů u kvasinek

Pomocí naměřených absorpčních UV-VIS spekter byly v připravených extraktech ze sušeného pekařského droždí a *Saccharomyces cerevisiae* stanoveny pigmenty dle postupu popsáno v kapitole 4.5.3.4. Získané hodnoty absorbancí při potřebných vlnových délkách byly zprůměrovány a jejich průměrná hodnota byla dosazena do Rovnice 7. Výsledné koncentrace byly vyjádřeny jako mg/g biomasy kvasinek. Následující grafy (Obrázek 36, Obrázek 37 a Obrázek 38) znázorňují získané koncentrace chlorofylů A, B a karotenoidů.



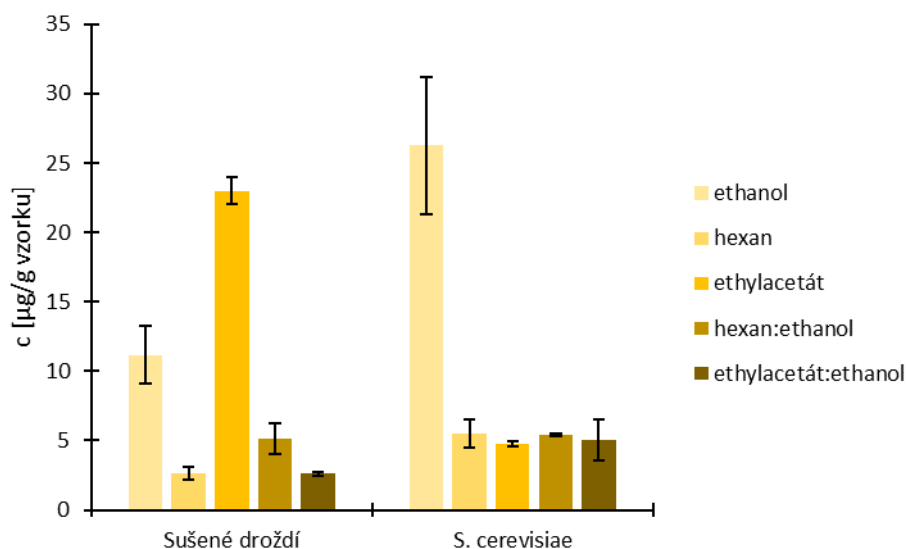
Obrázek 36: Obsah chlorofylu A v jednotlivých extraktech z vybraných kvasinek

Z grafu (Obrázek 36) lze vypočítat, že koncentrace chlorofylu A v připravených extraktech z kvasinek byla velmi nízká. Koncentrace všech připravených extraktů se pohybovala v rozmezí 0,01–0,05 mg/g vzorku. Lze tedy konstatovat, že chlorofyl A se v testovaných kvasinkách vyskytuje pouze ve stopovém množství. U sušeného droždí bylo nejvíce vyextrahovaných chlorofylů A v případě rozpouštědla ethylacetát ($0,046 \pm 0,010$ mg/g vzorku), u *Saccharomyces cerevisiae* vykazoval nejvyšší obsah ethanolový extrakt ($0,050 \pm 0,009$ mg/g vzorku).



Obrázek 37: Obsah chlorofylu B v jednotlivých extraktech z vybraných kvasinek

V porovnání s grafem (Obrázek 36) lze konstatovat, že množství vyextrahovaných chlorofylů B bylo v případě kvasinek o něco málo vyšší než množství vyextrahovaných chlorofylů A. Můžeme zde pozorovat stejný trend jako u chlorofylů A, kdy nejvyšší obsah chlorofylu B z extraktů sušeného droždí opět vykazoval ethylacetátový extrakt ($0,10 \pm 0,01$ mg/g vzorku), u *Saccharomyces cerevisiae* opět ethanolový extrakt ($0,11 \pm 0,02$ mg/g vzorku).



Obrázek 38: Obsah celkových karotenoidů v jednotlivých extraktech z vybraných kvasinek

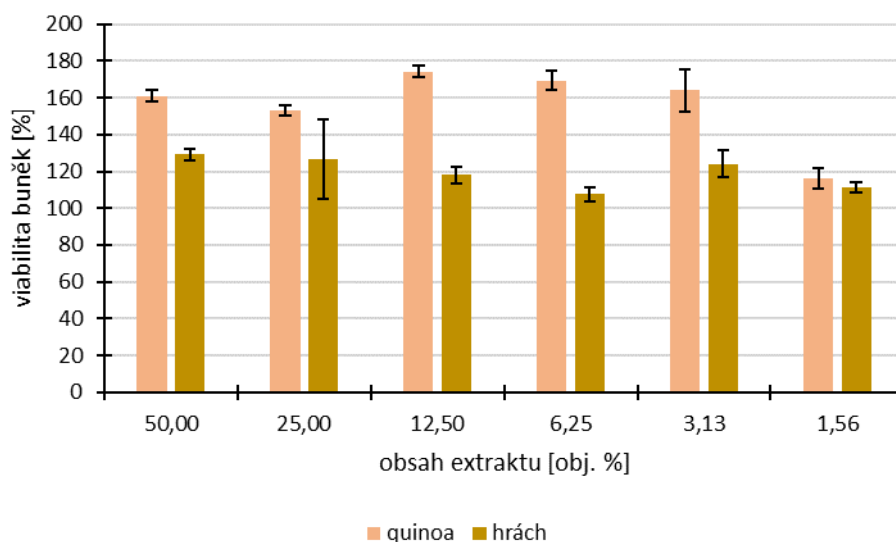
Obsah karotenoidů v kvasinkách byl získán dosazením zprůměrovaných hodnot naměřených absorbancí do Rovnice 8, jež byl dále přepočítán na navážku vzorku kvasinek. Z grafu (Obrázek 38) je patrné, že testované extrakty ze sušeného pekařského droždí a *Saccharomyces cerevisiae* vykazovaly pouze malé množství karotenoidů. Co se týče sušeného droždí, nejvyšší obsah karotenoidů byl stanoven u ethylacetátového extraktu ($23,00 \pm 0,94 \mu\text{g/g}$ vzorku), stejně jako u chlorofylů. Stejný trend byl pozorován u ethanolového extraktu *Saccharomyces cerevisiae*, kde byl obsah karotenoidů stanoven na $26,23 \pm 4,94 \mu\text{g/g}$ vzorku. Co se týče zbylých testovaných extraktů *Saccharomyces cerevisiae*, množství karotenoidů bylo stanoven v rozmezí 4,73–5,49 $\mu\text{g/g}$ vzorku.

V tomto případě můžeme předpokládat, že se jedná o interferenci, jelikož kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* neprodukuje karotenoidy.

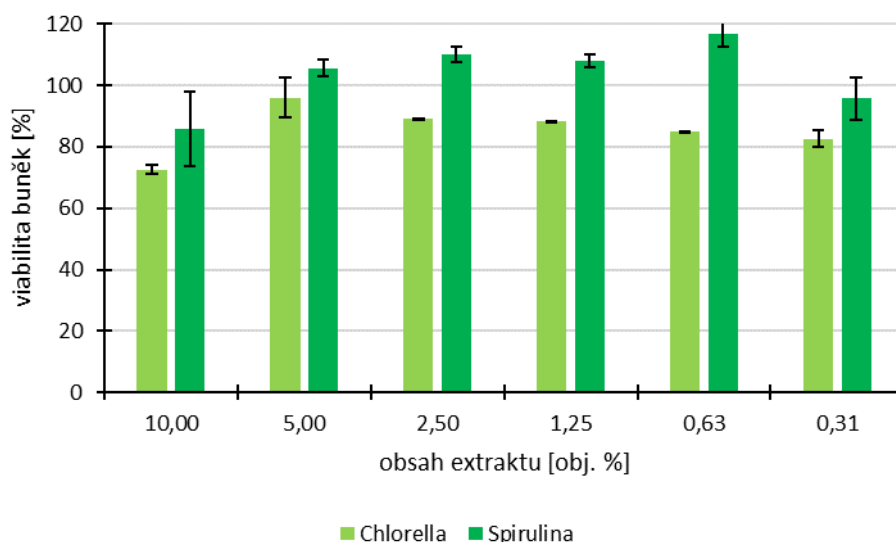
5.5 Stanovení antimikrobiální aktivity

Testy antimikrobiální aktivity byly provedeny na bakteriích *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens*. Postup testů je podrobně popsán v kapitole 4.5.4. Na základě získaných výsledků byly vybrány extrakty, které byly podrobené testu. Ze vzorků cereálií a luštěnin byly vybrány quinoa a hrách, z nichž byly připraveny vodné extrakty (viz 4.5.1.1). Z extraktů řas a kvasinek byly vybrány hexan:ethanolové extrakty *Chlorella*, *Spirulina* a *Saccharomyces cerevisiae* v poměru 1:1 a ethanolový extrakt *Saccharomyces cerevisiae*. Aby daný extrakt vykazoval antimikrobiální aktivitu vůči testovaným bakteriím, musí být nárůst buněk bakterií nižší než 100 %.

V grafu (Obrázek 39) jsou vynesena data antimikrobiální účinnosti vodních extraktů quinoi a hrachu na bakterii *Micrococcus luteus*. Bylo zjištěno, že ani jeden extrakt v testovaných koncentracích nevykazoval žádnou antimikrobiální aktivitu vůči testované bakterii; naopak extrakty (zejména extrakt quinoi) obsahovaly látky, které spíše podporovaly růst obou bakterií.



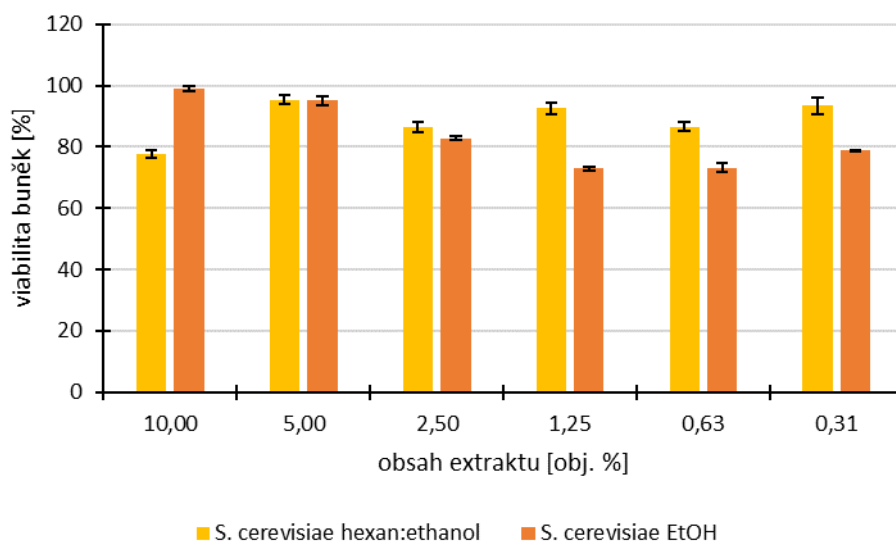
Obrázek 39: Stanovená antimikrobiální aktivita vodných extraktů–*Micrococcus luteus*



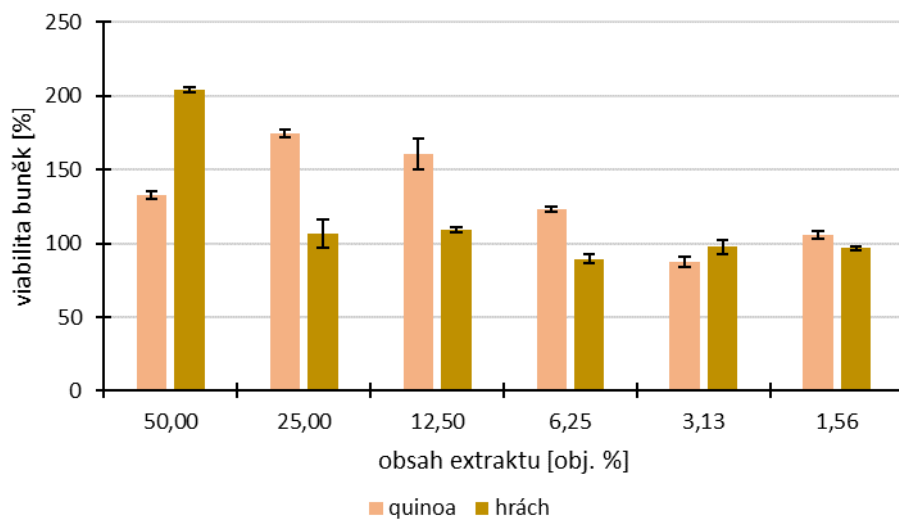
Obrázek 40: Stanovená antimikrobiální aktivita extraktů z řas–*Micrococcus luteus*

Co se týče extraktů z řas, z grafu (Obrázek 40) lze vypočítat, že všechny připravené extrakty z *Chlorella* vykazovaly proti bakterii *Micrococcus luteus* antimikrobiální aktivitu. Nejvyšší antimikrobiální účinnost měl 10 obj. % extrakt (72,60 %), nejnižší byla detekována u 5 obj. % extraktu (96,06 %). Co se týče extraktů ze *Spirulina*, antimikrobiální aktivitu vůči testované bakterii vykazovaly pouze 10 obj. % (85,77 %) extrakty. Ostatní hodnoty se pohybují v rámci chyby stanovení.

V grafu (Obrázek 41) můžeme pozorovat, že všechny připravené extrakty ze *Saccharomyces cerevisiae* vykazovaly mírnou antimikrobiální aktivitu vůči bakterii *Micrococcus luteus*. Nejvyšší účinnost byla zaznamenána u 10 obj. % hexan:ethanolového extraktu (77,74 %). U ethanolového extraktu kvasinky se jednalo o 1,25 obj. % a nižší koncentrace extraktu.

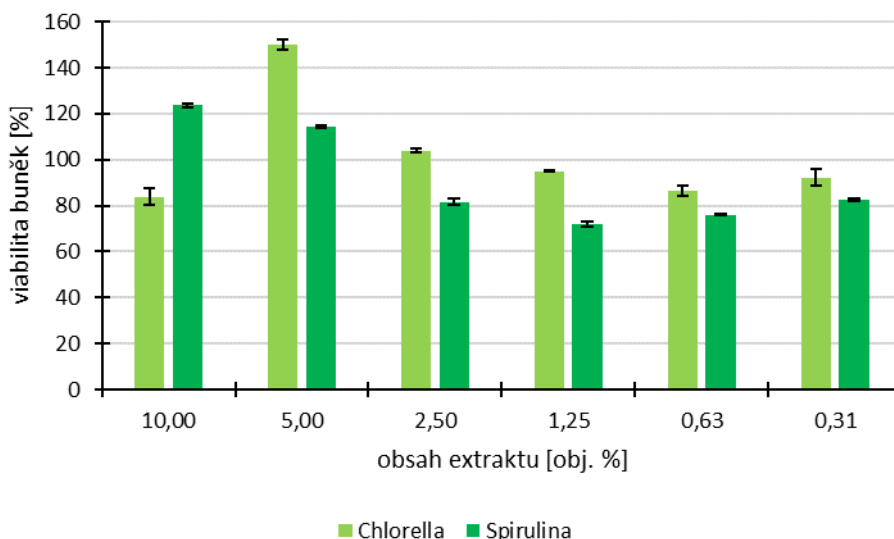


Obrázek 41: Stanovená antimikrobiální aktivita extraktů z kvasinek–*Micrococcus luteus*



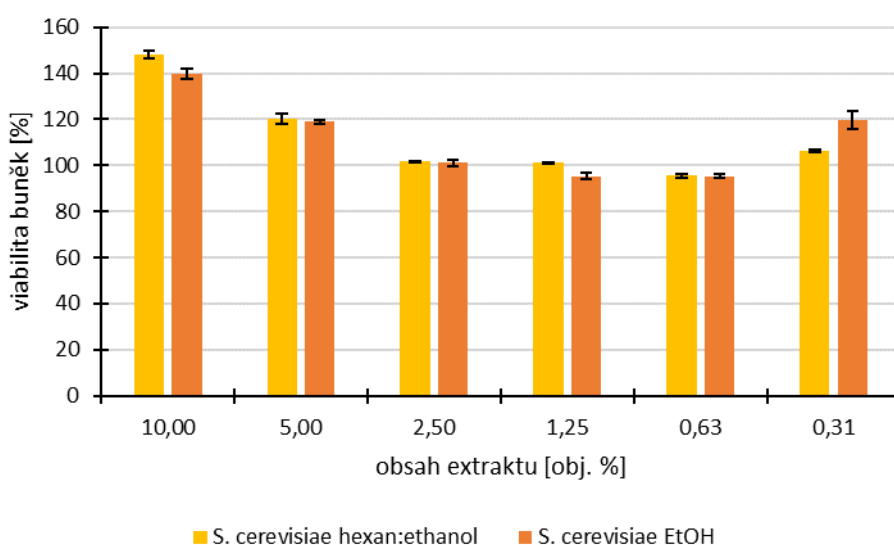
Obrázek 42: Stanovená antimikrobiální aktivita vodných extraktů–*Serratia marcescens*

V grafu (Obrázek 42) můžeme pozorovat, že antimikrobiální aktivitu vůči bakterii *Serratia marcescens* nevykazovaly prakticky žádné připravené extrakty. Naopak, s rostoucí koncentrací extraktu ve vzorku obě obiloviny spíše podporovaly růst bakterií. Co se týče připravených extraktů o nižší koncentraci, hodnoty antimikrobiální aktivity se pohybovaly v rámci chyby stanovení.



Obrázek 43: Stanovená antimikrobiální aktivita extraktů z řas–*Serratia marcescens*

V grafu výše je zobrazena stanovená antimikrobiální aktivita připravených extraktů z řas *Chlorella* a *Spirulina* vůči *Serratia marcescens*. Bylo zjištěno, že u extraktů s nižší koncentrací (1,25; 0,63 a 0,31 obj.%) byla vykázána antimikrobiální aktivita vůči testované bakterii. Extrakty z obou řas o koncentraci nad 2,5 obj. % antimikrobiální aktivitu nevykazovaly, spíše přispívaly k růstu testovací kultury.



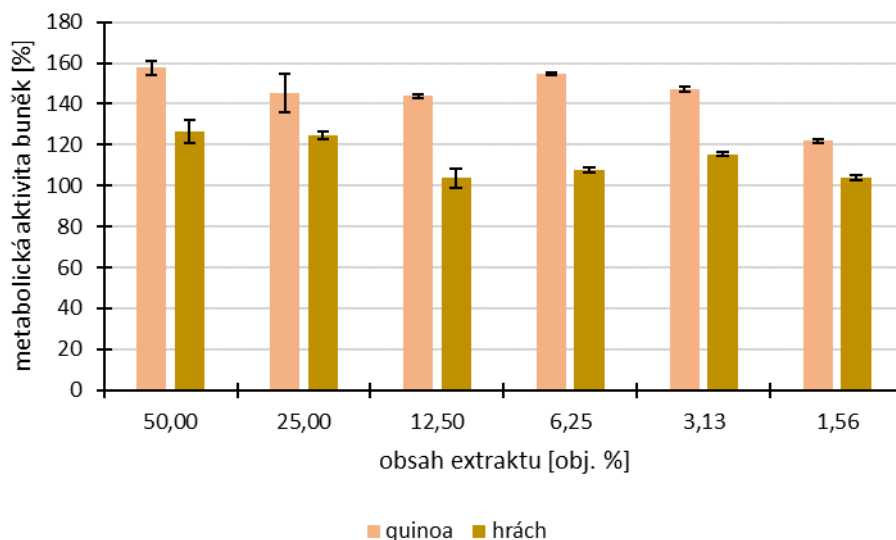
Obrázek 44: Stanovená antimikrobiální aktivita extraktů z kvasinek–*Serratia marcescens*

Z grafu lze vyzorovat, že ethanolové a hexan:ethanolové extrakty *Saccharomyces cerevisiae* působily na testovanou bakterii téměř stejně. U nižších koncentrací extraktů (do 2,5 %) se stanovení antimikrobiální aktivity pohybovalo v rámci chyby měření, vyšší koncentrace extraktů spíše přispívaly k podpoře růstu kultury.

5.5.1 Resazurinový test

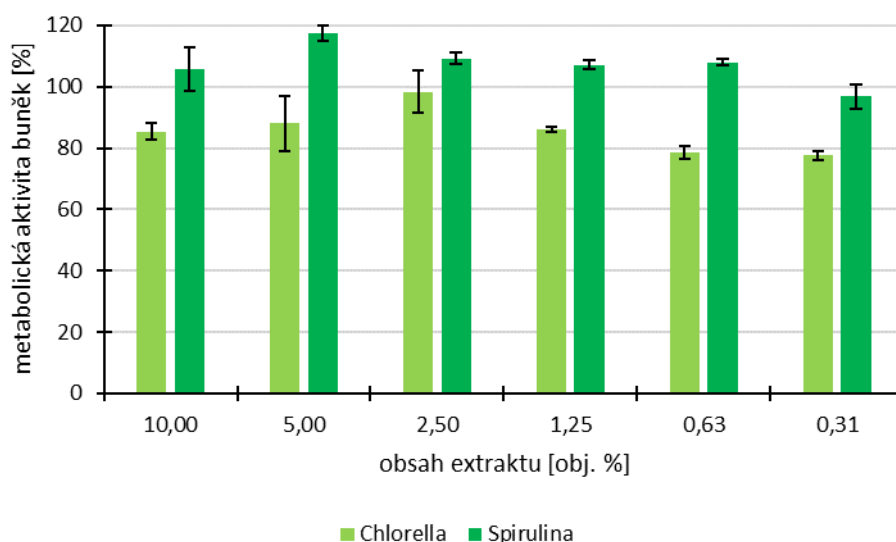
Při testování antimikrobiální aktivity připravených extraktů byl také proveden resazurin test dle postupu uvedeném v kapitole 4.5.4.1. Resazurin se běžně používá při mikrobiálních

stanoveních k posouzení metabolické aktivity bakteriálních buněk. Na následujících grafech je zobrazena metabolická aktivita buněk v přítomnosti testovaných extraktů stanovená pomocí resazurinu.



Obrázek 45: Resazurin test vodných extraktů–*Micrococcus luteus*

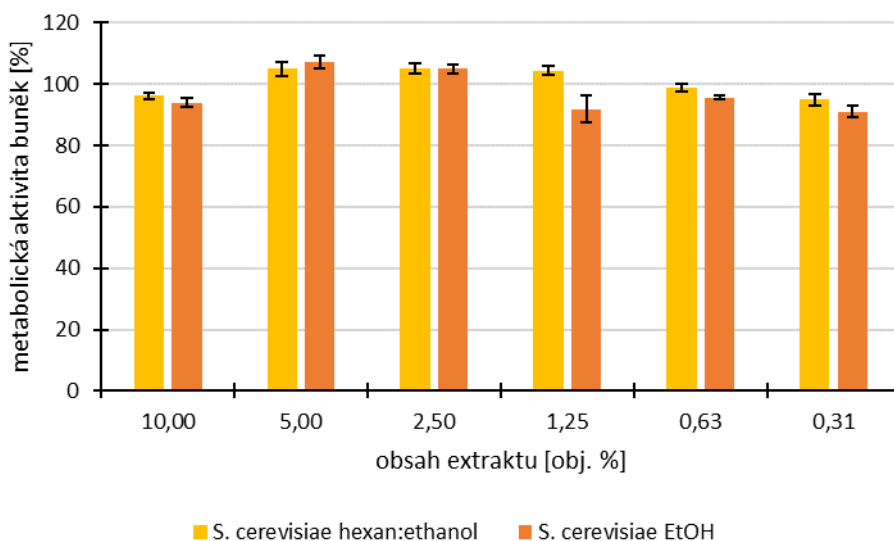
V grafu (Obrázek 45) můžeme vidět vynesena data závislosti metabolické aktivity bakteriálních buněk na obsahu vodných extraktů quinoi a hrachu. Jelikož tyto extrakty nevykazovaly vůči bakterii *Micrococcus luteus* žádnou antimikrobiální aktivitu (Obrázek 39), dalo se předpokládat, že metabolická aktivita bude vyšší než 100 %. Test tedy potvrzuje, že extrakty obilovin podporují růst testovacích G+ buněk.



Obrázek 46: Resazurin test extraktů z řas–*Micrococcus luteus*

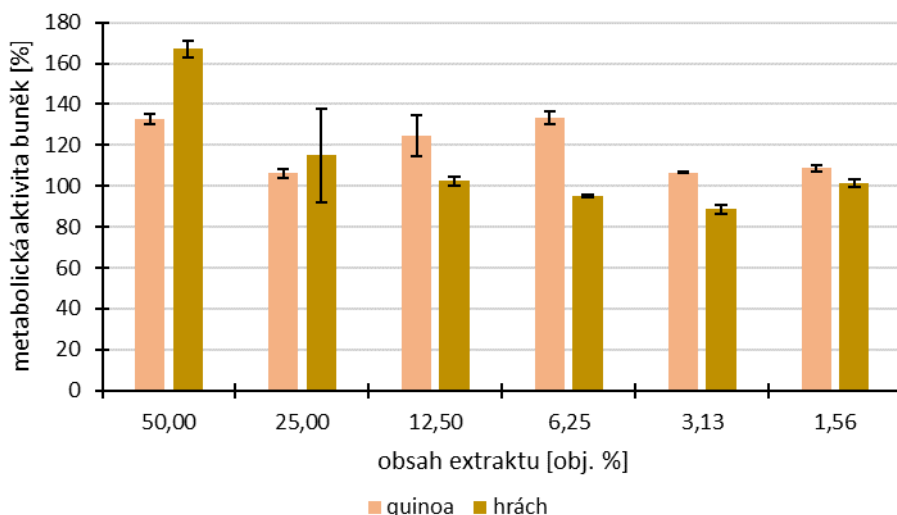
U resazurin testu v případě *Chlorella* a *Spirulina* můžeme vůči testované bakterii pozorovat stejný trend jako u quinoi a hrachu. Jelikož všechny připravené extrakty z *Chlorella* vykazovaly

antimikrobiální aktivitu vůči G+ bakteriím *M. luteus* (Obrázek 40), byla jejich metabolická aktivita při resazurin testu nižší než 100 %.



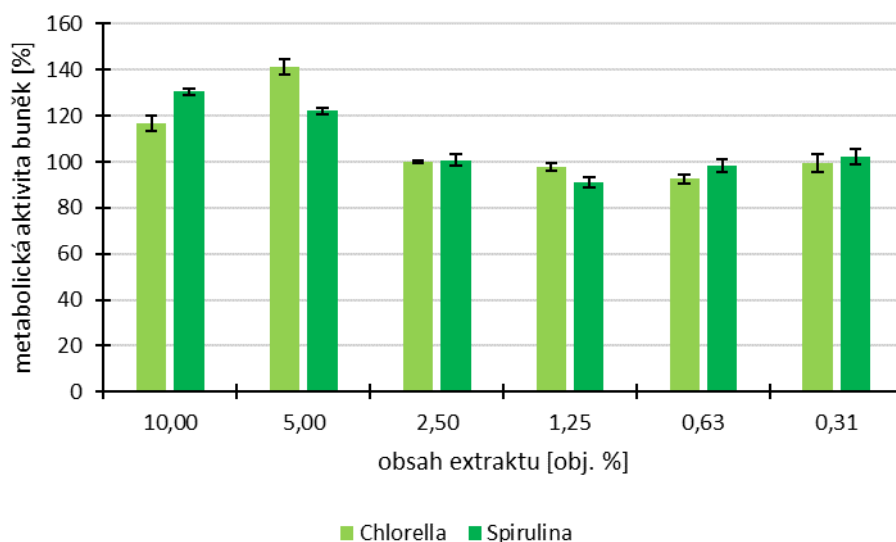
Obrázek 47: Resazurin test extraktů z kvasinek–*Micrococcus luteus*

Až na pár výjimek byl opět u kvasinkových extraktů *Saccharomyces cerevisiae* pozorován stejný trend jako u předchozích extraktů. Část hexan:ethanolových a ethanolových extraktů vykazovala negativní vliv na metabolickou aktivitu buněk, zatímco ostatní extrakty se pohybovaly v rámci chyby stanovení.



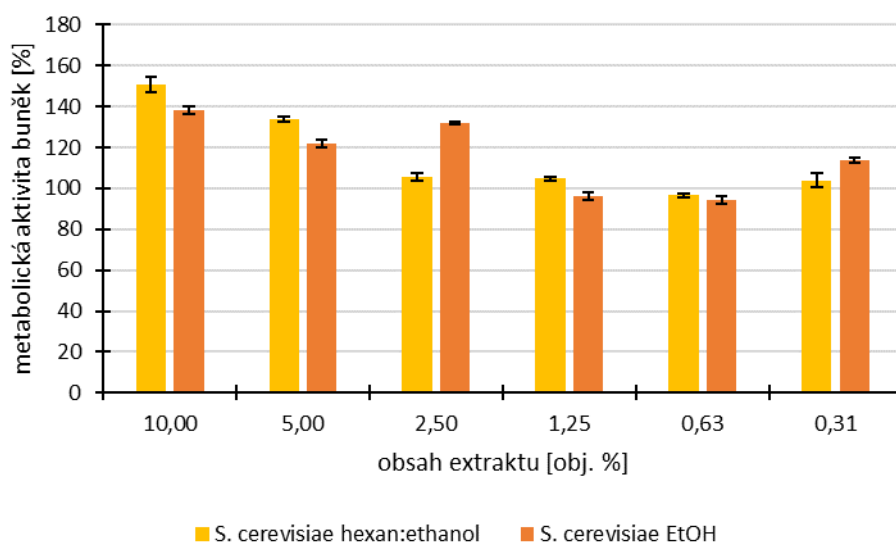
Obrázek 48: Resazurin test vodných extraktů–*Serratia marcescens*

Co se týče účinnosti resazurin testu vůči *Serratia marcescens*, pouze vodné extrakty hrachu o koncentracích 6,25 a 3,13 obj. % vykazovaly vliv na sníženou metabolickou aktivitu buněk. Můžeme zde v porovnání s grafem (Obrázek 42) pozorovat stejný trend nárůstu buněk jako u vodných extraktů u testované bakterie *Micrococcus luteus*.



Obrázek 49: Resazurin test extraktů z řas–*Serratia marcescens*

Z grafu (Obrázek 49) je možné pozorovat, že oba řasové extrakty s koncentrací 10 a 5 obj. % vykazovaly pozitivní vliv na metabolickou aktivitu bakterie *Serratia marcescens*. Metabolická aktivita bakteriálních buněk u zbývajících připravených extraktů z *Chlorella* a *Spirulina* byla kolem 100 % a pohybovala se v rámci chyby stanovení.



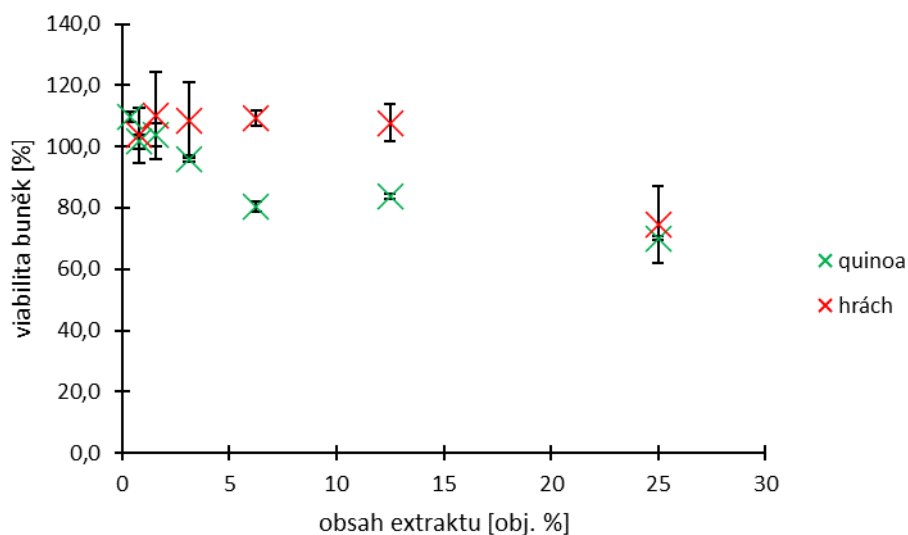
Obrázek 50: Resazurin test extraktů z kvasinek–*Serratia marcescens*

Z grafu (Obrázek 50) lze vyčíst, že metabolická aktivita buněk *Serratia marcescens* nebyla negativně ovlivněna extrakty kvasinek, u koncentrace extraktu nad 2,5 % byla pozorována podpora viability (podobně jako u řas), u nižší koncentrace extraktů se hodnoty viability pohybovaly kolem 100 % v rámci chyby stanovení.

5.6 MTT test cytotoxicity

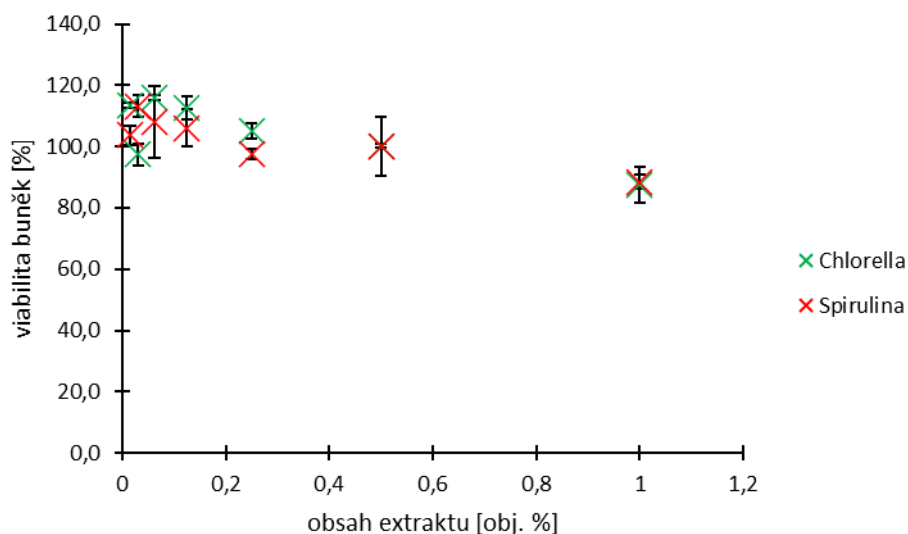
Na základě získaných výsledků byly vybrány extrakty, které byly podrobené MTT testu cytotoxicity. Ze vzorků cereálií a luštěnin byly vybrány quinoa a hrách, z nichž byly připraveny vodné extrakty (viz 4.5.1.1). Z extraktů řas a kvasinek byly vybrány hexan:ethanolové extrakty

Chlorella, *Spirulina* a *Saccharomyces cerevisiae* v poměru 1:1 a ethanolový extrakt *Saccharomyces cerevisiae*. Účinky cytotoxicity byly testovány na buněčné linii CaCo-2. Podrobný postup analýzy je popsán v kapitole 4.5.5. Hranice cytotoxických účinků je 60 % viability a méně. Jestliže viabilita buněk vykazuje nižší hodnotu než 60 %, lze extrakt považovat za cytotoxický. Výsledky jednotlivých MTT testů jsou znázorněny na následujících grafech (Obrázek 51, Obrázek 52 a Obrázek 53).



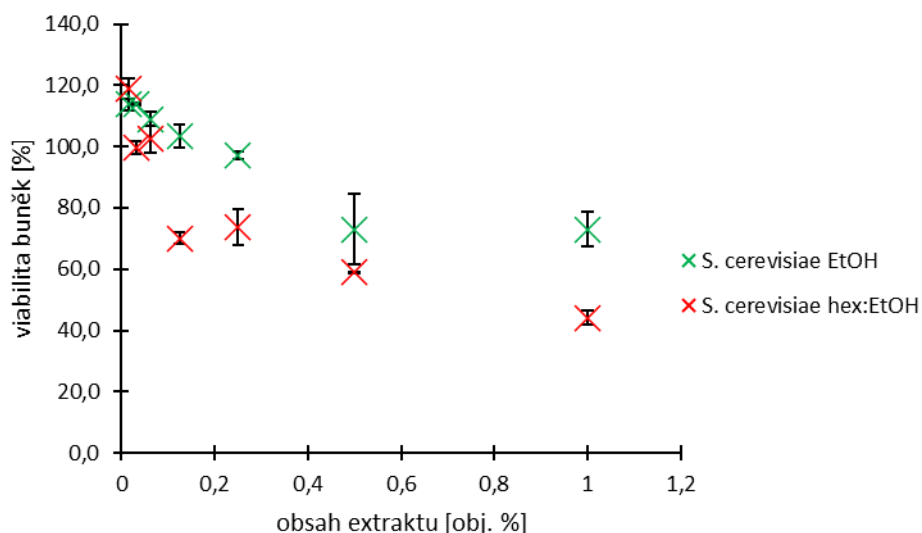
Obrázek 51: Závislost viability CaCo-2 na koncentraci extraktů cereálií a luštěnin

Z vybrané cereálie a luštěniny byly připraveny vodné extrakty v různých koncentracích, které byly podrobeny MTT testům. Z grafu (Obrázek 51) vyplývá, že žádný z připravených extraktů quinoi a hrachu nevykazoval cytotoxické účinky, jelikož viabilita buněk byla vždy stanovena nad 60 %. Nižší viabilita buněk byla stanovena u extraktu quinoi (70,05 %) a hrachu (74,49 %) s koncentrací 25 obj. %. Naopak nejvyšší viabilita buněk byla stanovena u vodného extraktu hrachu (110,03 %) s koncentrací 1,56 obj. %. Z toho lze usuzovat, že viabilita buněk s rostoucí koncentrací extraktu klesá.



Obrázek 52: Závislost viability CaCo-2 na koncentraci extraktů řas

Co se týče hexan:ethanolových extraktů (1:1) *Chlorella* a *Spirulina*, nebyly opět prokázány cytotoxické účinky na testované buňky. Většina extraktů vykazovala viabilitu buněk nad 100 %. Nejnižší stanovená viabilita buněk byla zjištěna u 1 obj. % extraktů *Chlorella* (87,55 %) a *Spirulina* (88,45 %). Naopak nejpozitivnější vliv na buňky měl 0,02 obj. % extrakt *Chlorella*, u kterého byla viabilita buněk stanovena na 113,39 %. Opět je zde pozorován trend, jenž potvrzuje, že s vyšší koncentrací extraktů klesá viabilita buněk.



Obrázek 53: Závislost viability CaCo-2 na koncentraci extraktů kvasinek

Dále byly testovány dva kvasinkové extrakty *Saccharomyces cerevisiae*, ethanolový a hexan:ethanolový (1:1). Z grafu (Obrázek 53) je patrné, že ethanolový extrakt nevykazoval v žádné z testovaných koncentrací cytotoxické účinky. Můžeme pozorovat znovu se opakující trend, že s rostoucí koncentrací klesá viabilita buněk. Naopak u hexan:ethanolové extraktu bylo zjištěno, že v koncentracích 1 a 0,5 obj. % byly zjištěny cytotoxické účinky na testované buňky. Z toho vyplývá, že cytotoxicitu nevykazují pouze hexan:ethanolové extrakty *Saccharomyces cerevisiae* v poměru 1:1 při nižších koncentracích. Nejvyšší viabilita buněk, a tedy nejnižší negativní efekt byl zjištěn u 0,02 obj. % (113,74 %) a 0,03 obj. % (113,78 %) extraktu kvasinek.

5.7 Charakterizace připravených směsí

Podle kapitoly 4.5.1.5 byly připraveny směsné cereální kaše. Přesné složení jednotlivých směsí je uvedeno v Tabulka 5 a Tabulka 6. Po zalití horkou vodou byly směsi promíchány a vizuálně porovnány. Vzhled jednotlivých směsí lze pozorovat na obrázcích (Obrázek 54 a Obrázek 55).



Obrázek 54: Připravené cereální směsi 1



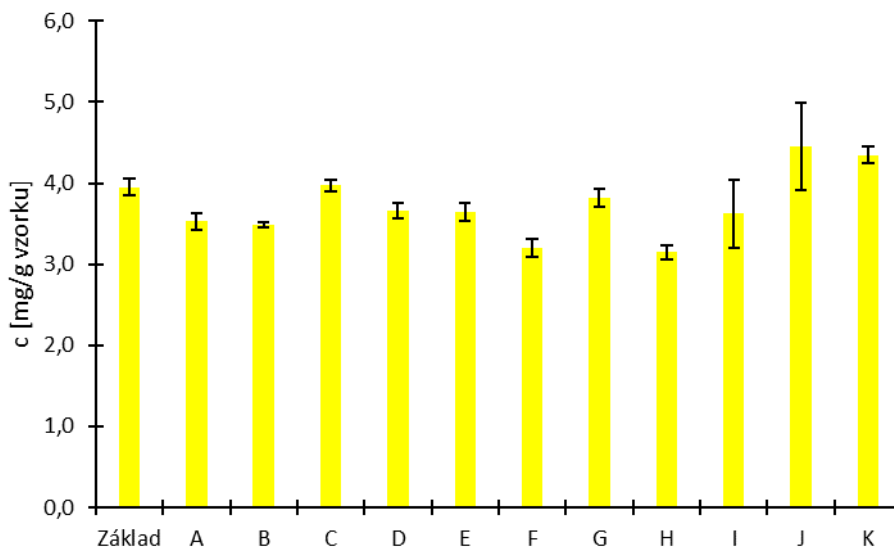
Obrázek 55: Připravené cereální směsi 2

5.7.1 Stanovení celkových polyfenolů u směsí

Celkový obsah fenolických látek v připravených směsích byl stanoven spektrofotometricky podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2.2. Každý vzorek směsi byl stanoven celkem třikrát a průměrná hodnota naměřených absorbancí byla dosazena do Rovnice 2, čímž byla získána koncentrace fenolických látek. Ta byla poté vztažena na navážku jednotlivých směsí. Výsledný obsah celkových fenolických látek, včetně odchylek jednotlivých měření, znázorňuje graf (Obrázek 56).

Složení připravených směsí je znázorněno v Tabulka 5 a Tabulka 6. V grafu níže lze pozorovat, že obsah fenolických látek v připravených směsích je velmi podobný. Nejvyšší koncentrace fenolických látek byla stanovena u směsi J ($4,45 \pm 0,54$ mg/vzorku), což je směs obsahující quinou a biomasu *Chlorella*. V porovnání se základem ($3,95 \pm 0,11$ mg/g vzorku), což je směs obsahující pouze quinou, lze konstatovat, že přidavek biomasy *Chlorella* zvýšil obsah fenolických látek. Vyšší obsah fenolických látek oproti základu byl stanoven také ve

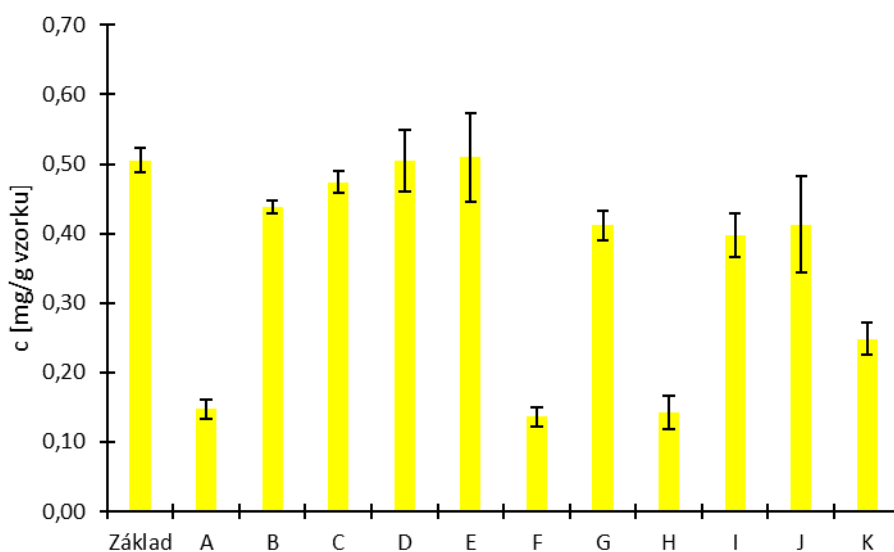
směsi C ($3,97 \pm 0,07$ mg/g vzorku), což je směs obsahující hexan:ethanolový extrakt *Spirulina* v poměru 1:1. Lze tedy konstatovat, že i tento extrakt ze *Spirulina* napomohl vyššímu extrahování fenolických látek. Naopak nejnižší obsah fenolů byl stanoven u směsi H ($3,15 \pm 0,09$ mg/g vzorku), což je směs obsahující ethanolový a hexan:ethanolový extrakt *Saccharomyces cerevisiae* v poměru 1:1.



Obrázek 56: Obsah celkových fenolických látek v připravených směsích

5.7.2 Stanovení flavonoidů

Obsah flavonoidů byl v připravených směsích analyzován spektrofotometricky pomocí metody, která je podrobně popsána v kapitole 4.5.2.3. Koncentrace flavonoidů byla získána dosazením průměrných hodnot absorbancí do kalibrační křivky (Rovnice 3) a následným přepočtem na navážku vzorku směsí. Graf (Obrázek 57) zobrazuje výsledný obsah flavonoidů v připravených směsích včetně odchylek.

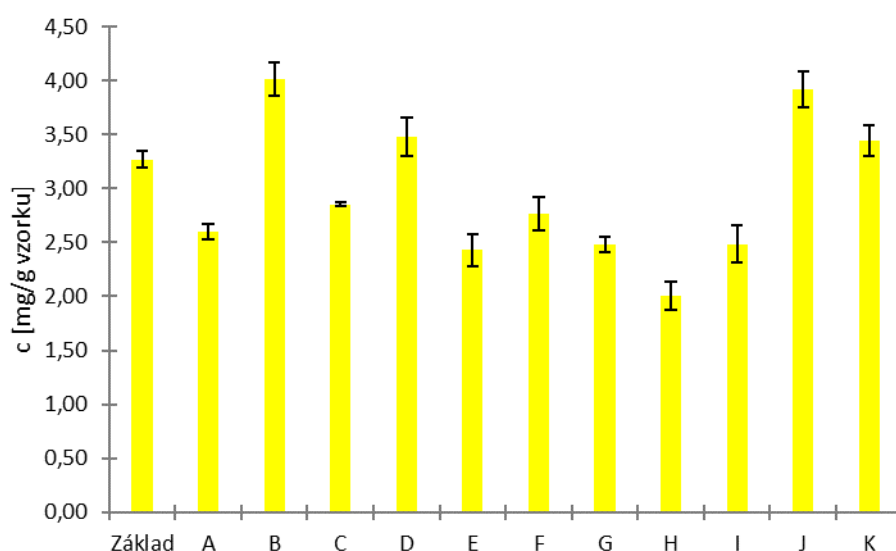


Obrázek 57: Obsah flavonoidů v připravených směsích

V grafu můžeme pozorovat, že obsah flavonoidů se v připravených směsích velmi liší. V základu, jenž obsahuje pouze quinoou, byl stanoven obsah flavonoidů na $0,51 \pm 0,02$ mg/g vzorku. Směs E ($0,51 \pm 0,06$ mg/g vzorku) vykazuje vyšší koncentraci flavonoidů než základ. Tato směs je tvořena quinoou a ethanolovým extraktem *Saccharomyces cerevisiae*. Lze tedy konstatovat, že přítomnost kvasinkového extraktu lehce zvyšuje obsah flavonoidů. Z grafu lze také vyčíst, že směsi A, F a H obsahují mnohem nižší koncentraci flavonoidů než ostatní směsi. Základ těchto jednotlivých směsí je tvořen quinoou a hrachem v poměru 1:1. Z tohoto důvodu bylo usouzeno, že nízká koncentrace flavonoidů je zapříčiněna obsahem hrachu.

5.7.3 Stanovení antioxidační aktivity

Obsah antioxidantů v připravených směsích byl stanoven spektrofotometricky dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2.4. Získaná antioxidační aktivita byla vyjádřena jako parametr TEAC, který určuje antioxidační aktivitu jako ekvivalent Troloxu v mg/g vzorku. Výsledný obsah antioxidantů byl získán dosazením průměrných hodnot naměřených absorbancí do rovnice kalibrační přímky (Rovnice 4), jež byl následně vztažen na navážku vzorku směsi. V grafu níže (Obrázek 58) je znázorněna získaná antioxidační aktivita jednotlivých připravených směsí včetně odchylek měření.

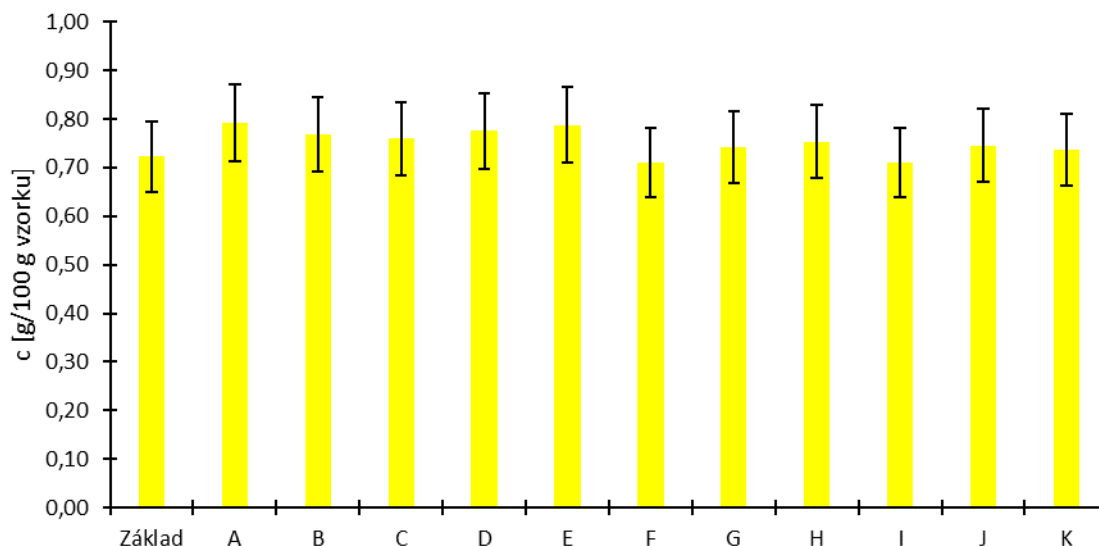


Obrázek 58: Stanovená antioxidační aktivita připravených směsí

V grafu výše můžeme pozorovat, že stanovená antioxidační aktivita připravených směsí se od sebe poněkud liší, ale směsné vzorky vykazují vyrovnanější účinek. Obsah antioxidantů v základu byl stanoven na $3,27 \pm 0,08$ mg/g vzorku. Vyšší antioxidační aktivitu než základ vykazovaly směsi B ($4,01 \pm 0,15$ mg/g vzorku), D ($3,47 \pm 0,18$ mg/g vzorku), J ($3,92 \pm 0,17$ mg/g vzorku) a K ($3,44 \pm 0,14$ mg/g vzorku). U směsí J a K to bylo předpokládáno, jelikož obsahují biomasu *Chlorella* a *Spirulina*, jež jsou známy pro své vysoké antioxidační účinky. Celkově byl nejvyšší obsah antioxidantů stanoven u směsi B, jež obsahovala quinoou a hexan:ethanolový extrakt *Chlorella* v poměru 1:1, což opět vypovídá o vysokých antioxidačních účincích *Chlorella*. Naopak nejnižší obsah antioxidantů byl zjištěn u směsi H ($2,01 \pm 0,14$ mg/g vzorku). To mohlo být opět způsobeno přítomností hrachu, jež snižoval antioxidační účinky dané směsi.

5.7.4 Stanovení rozpustných proteinů dle Hartree-Lowryho

V připravených směsích byly stanoveny celkové rozpustné bílkoviny podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2.6. Obsah proteinů byl získán dosazením průměrných hodnot naměřených absorbancí do kalibrační křivky (Rovnice 6), jež byl následně přepočítán na navážku vzorku jednotlivých směsích. Získané koncentrace jsou zaznamenány v grafu (Obrázek 59), včetně odchylek jednotlivých měření.



Obrázek 59: Obsah rozpustných proteinů v připravených směsích

Z vynesných dat z grafu výše můžeme pozorovat, že koncentrace rozpustných proteinů se u všech připravených směsích pohybovala v rozmezí 0,71–0,79 g/100 g vzorku. Zjištěný obsah bílkovin v základu byl stanoven na $0,72 \pm 0,07$ g/100 g vzorku. U směsích F a I byl naměřen stejný obsah rozpustných proteinů ($0,71 \pm 0,07$ g/100 g vzorku), který byl nižší oproti základu. Nejvyšší koncentrace proteinů byla zjištěna u směsích A, D a E. Z tohoto důvodu lze konstatovat, že v případě směsích A byl zvýšený obsah bílkovin oproti základu způsoben přítomností hrachu, jenž sám disponuje vysokým obsahem bílkovin. Směs D byla obohacena o hexan:ethanolový extrakt z *Saccharomyces cerevisiae*, směs E o ethanolový extrakt téže kvasinky. Lze tedy předpokládat, že oba kvasinkové extrakty napomohly vyextrahování většího množství bílkovin.

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala vývojem cereálních produktů pro zvláštní výživu s přidavkem luštěnin, řas a kvasinek. Byly připraveny obohacené cereální směsi, cílené pro bezlepkovou dietu. V práci byly stanoveny nutriční složky a bioaktivní látky komerčně dostupných cereálií a luštěnin. Dále byly připraveny různé druhy extraktů z řas a kvasinek, u kterých byl analyzován obsah biologicky aktivních látek. Dle vykonaných analýz a získaných výsledků byly připraveny cereální směsné produkty, jež byly obohaceny o vybranou luštěninu, extrakty z řas a kvasinek.

V rámci experimentální části práce byly k analýzám vybrány cereálie, o kterých je známo, že se přirozeně vyskytují bez lepku, tedy pohanka, quinoa a bezlepkové ovesné vločky. V analyzovaných vzorcích byly stanoveny bioaktivní látky, tedy celkové fenolické látky, flavonoidy, antioxidační aktivita a β -glukany. Nejvyšší obsah fenolických látek ($3,56 \pm 0,02$ mg/g vzorku) a flavonoidů ($0,40 \pm 0,02$ mg/g vzorku), jež byly analyzovány spektrofotometricky, byl stanoven u quinoi. Největší množství antioxidantů, které byly stanoveny za pomoci metody TEAC, bylo analyzováno v pohance ($4,21 \pm 0,21$ mg/g vzorku). Zastoupení β -glukanů bylo stanoveno pomocí enzymatického kitu, kdy nejvyšší obsah byl naměřen u bezlepkových ovesných vloček ($7,78 \pm 0,41$ g/100 g vzorku). Při stanovení koncentrace lepku v cereáliích bylo zjištěno, že pohanka a bezlepkové ovesné vločky mohou být označovány za přirozeně bezlepkové potraviny, v případě quinoi za potravinu s velmi nízkým obsahem lepku. Z hlediska významných nutričních složek byly ve vybraných cereáliích stanoveny celkové sacharidy, proteiny, mastné kyseliny a lipidy. Celkové sacharidy byly stanoveny metodou dle Duboise. Nejvyšší naměřený obsah byl u pohanky ($49,19 \pm 2,04$ g/100 g vzorku), nejnižší u bezlepkových ovesných vloček ($39,65 \pm 2,18$ g/100 g vzorku). Jelikož ke stanovení proteinů byla použita metoda Hartree-Lowryho, byl ve vzorcích cereálií stanoven obsah pouze rozpustných proteinů ve vodě. Nejvyšší byl zjištěn u quinoi ($1,03 \pm 0,02$ g/100 g vzorku), nejnižší u bezlepkových ovesných vloček ($0,34 \pm 0,01$ g/100 g vzorku). Největší množství lipidů bylo stanoveno v bezlepkových vločkách ($4,42 \pm 0,38$ g/100 g vzorku), jež měly i nejvyšší zastoupení PUFA (50,29 %).

Ve vybraných luštěninách byly stanovovány stejné nutriční složky a biologicky aktivní látky jako u cereálií, s výjimkou lepku a β -glukanů. Nejvyšší obsah fenolických látek ($3,87 \pm 0,10$ mg/g vzorku) byl stanoven v hrachu, nejvyšší množství flavonoidů ($0,41 \pm 0,01$ mg/g vzorku) v černé čočce Beluga. Nejvyšším zastoupením antioxidantů ($5,85 \pm 0,18$ mg/g vzorku) disponoval hrách. V hrachu bylo také naměřeno největší množství sacharidů ($42,48 \pm 1,20$ g/100 g vzorku), největším množstvím proteinů disponovala Beluga ($1,13 \pm 0,02$ g/100 g vzorku).

Dalším bodem experimentální části byla příprava extraktů z vybraných řas a kvasinek. Mezi vybrané vzorky řas patřily *Dulse*, *Chlorella* a *Spirulina*, mezi kvasinky sušené pekařské droždí a *Saccharomyces cerevisiae*. Extrakty byly připraveny pomocí rozpouštědel splňující podmínku GRAS, použity byly voda, ethanol, hexan, ethylacetát a jejich různé kombinace. Ve všech připravených extraktech byly stanoveny fenolické látky, flavonoidy a antioxidanty. Nejvíce vyextrahovaných fenolických látek u extraktů z řas bylo zjištěno u vodného extraktu *Spirulina*, z hlediska kvasinek u ethanolového extraktu *Saccharomyces cerevisiae*. Nejvyšší obsah flavonoidů byl stanoven u ethylacetátového extraktu *Chlorella* a hexanového extraktu *Saccharomyces cerevisiae*. Nejvíce antioxidantů vykazovaly hexanové extrakty *Dulse* a

Saccharomyces cerevisiae. Dále byly analyzovány lipidy a mastné kyseliny. Nejvyšší obsah lipidů byl zjištěn u biomasy *Chlorella* ($1,52 \pm 0,04$ g/100 g vzorku), jež byla z 51,14 % zastoupena PUFA kyselinami. Pomocí absorpčních spekter byly v extraktech zjištěny chlorofyly a karotenoidy. Analýza extraktů na HPLC umožnila upřesnit obsah lipofilních metabolitů a pigmentů. Pomocí komerčně dostupných kitů bylo stanoveno množství β -glukanů v biomase řas a kvasinek. Nejvyšší množství bylo stanoveno u *Dulse* ($0,09 \pm 0,02$ g/100 g vzorku) a *Saccharomyces cerevisiae* ($9,017 \pm 0,750$ g/100 g vzorku).

Na základě získaných výsledků byly na pro obohacení cereálních směsí vybrány quinoa a hrách, z nichž byly připraveny vodné extrakty. Z řas a kvasinek byly vybrány hexan:ethanolové extrakty *Chlorella*, *Spirulina* a *Saccharomyces cerevisiae*, a ethanolový extrakt *Saccharomyces cerevisiae*. Tyto extrakty byly podrobeny testům antimikrobiální aktivity a MTT testům cytotoxicity. Antimikrobiální aktivita byla stanovována vůči bakteriím *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens*. Vybrané preparáty nevykazovaly s výjimkou řasy *Chlorella* antimikrobiální účinek, při vyšších koncentracích sloužily spíše jako doplňková výživa testovacích buněk. MTT testy byly prováděny na buněčné linii CaCo-2. Bylo zjištěno, že testované extrakty nevykazovaly cytotoxické účinky, s výjimkou 1 obj. % a 0,5 obj. % hexan:ethanolového extraktu *Saccharomyces cerevisiae*.

V závěru experimentální části byly připraveny směsné cereální produkty, jejichž základ tvořila quinoa. Směsi byly obohacovány hrachem, hexan:ethanolovými extrakty *Chlorella*, *Spirulina* a *Saccharomyces cerevisiae*, a ethanolovým extraktem *Saccharomyces cerevisiae*. V připravených směsích byl pozorován nárůst nutričních složek a biologicky aktivních látek, jenž byl způsoben přidavkem obohacujících složek. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že přidavkem hrachu nebo přidavkem biomasy *Chlorella* a *Spirulina* vzrostl obsah proteinů. Díky přítomnosti biomasy a extraktů testovaných řas došlo ke zvýšení množství antioxidantů a fenolických látek. Ze získaných výsledků tedy vyplývá, že kombinace cereálií s luštěninami je vhodná pro navýšení obsahu proteinů v bezpečných výrobcích. Dále bylo také zjištěno, že vybrané mikrořasy a kvasinka mají potenciál pro obohacení bezpečných výrobků o bioaktivní látky, a to při použití biomasy či extraktů z nich vyrobených. Existuje tedy možnost pro budoucí aplikace v potravinářství, v obohacování potravin nebo i při výrobě doplňků stravy.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SLUKOVÁ, Marcela; SKŘIVAN, Pavel a HRUŠKOVÁ, Marie. *Cereální chemie a technologie: zpracování obilovin - mlýnská a těstářenská výroba*. online. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2017. ISBN 978-80-7592-000-3. [cit. 2023-11-21].
- [2] WALDAMICHAEL, Fraol; DEBELEE, Taye; SCHWENKER, Friedhelm; AYANO, Yehualashet a KEBEDE, Samuel. Machine Learning in Cereal Crops Disease Detection: A Review. online. *Algorithms*. 2022, roč. 15, č. 3. ISSN 1999-4893. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/a15030075>. [cit. 2023-12-08].
- [3] BENDER, D. a SCHÖNLECHNER, R. Recent developments and knowledge in pseudocereals including technological aspects. online. *Acta Alimentaria*. 2021, roč. 50, č. 4, s. 583-609. ISSN 0139-3006. Dostupné z: <https://doi.org/10.1556/066.2021.00136>. [cit. 2023-12-08].
- [4] KHAIRUDDIN, Muhammad a LASEKAN, Ola. Gluten-Free Cereal Products and Beverages: A Review of Their Health Benefits in the Last Five Years. online. *Foods*. 2021, roč. 10, č. 11. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods10112523>. [cit. 2023-12-03].
- [5] BIESIEKIERSKI, Jessica R. What is gluten?. online. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2017, roč. 32, č. 1, s. 78-81. ISSN 0815-9319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jgh.13703>. [cit. 2023-11-30].
- [6] ALJADA, Bara; ZOHNI, Ahmed a EL-MATARY, Wael. The Gluten-Free Diet for Celiac Disease and Beyond. online. *Nutrients*. 2021, roč. 13, č. 11. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu13113993>. [cit. 2023-11-30].
- [7] *Celiak.cz*. online. In: *Celiak.cz*. Dostupné z: <https://celiak.cz/onemocneni/celiakie/>. [cit. 2023-11-23].
- [8] LEBWOHL, Benjamin a RUBIO-TAPIA, Alberto. Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease. online. *Gastroenterology*. 2021, roč. 160, č. 1, s. 63-75. ISSN 00165085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.098>. [cit. 2023-11-30].
- [9] SAHIN, Yasin. Celiac disease in children: A review of the literature. online. *World Journal of Clinical Pediatrics*. 2021, roč. 10, č. 4, s. 53-71. ISSN 2219-2808. Dostupné z: <https://doi.org/10.5409/wjcp.v10.i4.53>. [cit. 2023-11-30].
- [10] MARTÍNEZ-VILLALUENGA, Cristina; PEÑAS, Elena a HERNÁNDEZ-LEDESMA, Blanca. Pseudocereal grains: Nutritional value, health benefits and current applications for the development of gluten-free foods. online. *Food and Chemical Toxicology*. 2020, roč. 137. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111178>. [cit. 2023-12-09].

- [11] STIKIC, Radmila; GLAMOCLIIJA, Djordje; DEMIN, Mirjana; VUCELIC-RADOVIC, Biljana; JOVANOVIC, Zorica et al. Agronomical and nutritional evaluation of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) as an ingredient in bread formulations. online. *Journal of Cereal Science*. 2012, roč. 55, č. 2, s. 132-138. ISSN 07335210. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.10.010>. [cit. 2023-12-08].
- [12] MERKULOVA, N.Yu.; ZUEVA, O.N. a TOHIRIYON, B. The Composition and Quality Study of Sugar and Oatmeal Cookies Using Quinoa Seed Flour. online. *Food Industry*. 2018, roč. 3, č. 3. ISSN 25001922. Dostupné z: <https://doi.org/10.29141/2500-1922-2018-3-3-8>. [cit. 2024-04-09].
- [13] HUDA, Md.; LU, Shuai; JAHAN, Tanzim; DING, Mengqi; JHA, Rintu et al. Treasure from garden: Bioactive compounds of buckwheat. online. *Food Chemistry*. 2021, roč. 335. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127653>. [cit. 2023-11-30].
- [14] *What are the health benefits of buckwheat?*. online. In: . Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/325042>. [cit. 2023-11-30].
- [15] PATHAN, Safiullah a SIDDIQUI, Rafat. Nutritional Composition and Bioactive Components in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Greens: A Review. online. *Nutrients*. 2022, roč. 14, č. 3. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu14030558>. [cit. 2023-11-30].
- [16] ROYAL BOTANIC GARDENS. *Chenopodium quinoa* Quinoa. online. In: . Dostupné z: <https://www.kew.org/plants/quinoa>. [cit. 2023-11-30].
- [17] OLSON, Rebecca; GAVIN-SMITH, Breda; FERRABOSCHI, Chiara a KRAEMER, Klaus. Food Fortification: The Advantages, Disadvantages and Lessons from Sight and Life Programs. online. *Nutrients*. 2021, roč. 13, č. 4. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu13041118>. [cit. 2023-12-08].
- [18] OSENDARP, Saskia; MARTINEZ, Homero; GARRETT, Greg; NEUFELD, Lynnette; DE-REGIL, Luz et al. Large-Scale Food Fortification and Biofortification in Low- and Middle-Income Countries: A Review of Programs, Trends, Challenges, and Evidence Gaps. online. *Food and Nutrition Bulletin*. 2018, roč. 39, č. 2, s. 315-331. ISSN 0379-5721. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0379572118774229>. [cit. 2023-12-08].
- [19] LIYANAGE, C a HETTIARACHCHI, M. Food fortification. online. *Ceylon Medical Journal*. 2011, roč. 56, č. 3, s. 124-127. ISSN 2386-1274. Dostupné z: <https://doi.org/10.4038/cmj.v56i3.3607>. [cit. 2023-12-08].
- [20] KAMALI ROUSTA, Leila; BODBODAK, Samad; NEJATIAN, Mohammad; GHANDEHARI YAZDI, Amir; RAFIEE, Zahra et al. Use of encapsulation technology to enrich and fortify bakery, pasta, and cereal-based products. online. 2021, roč. 118, s. 688-710. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.029>. [cit. 2023-12-08].

- [21] HUGHES, Jaimee; PEARSON, Emma a GRAFENAUER, Sara. Legumes—A Comprehensive Exploration of Global Food-Based Dietary Guidelines and Consumption. online. *Nutrients*. 2022, roč. 14, č. 15. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu14153080>. [cit. 2023-12-01].
- [22] KUMARI, Tapasya a DEKA, Sankar. Potential health benefits of garden pea seeds and pods: A review. online. *Legume Science*. 2021, roč. 3, č. 2. ISSN 2639-6181. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/leg3.82>. [cit. 2023-11-28].
- [23] LUDVÍKOVÁ, Michaela a GRIGA, Miroslav. Pea transformation: History, current status and challenges. online. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2022, roč. 58, č. 3, s. 127-161. ISSN 12121975. Dostupné z: <https://doi.org/10.17221/24/2022-CJGPB>. [cit. 2023-11-28].
- [24] HIRST, K. Kris. Pea (*Pisum sativum* L.) Domestication - The History of Peas and Humans. *ThoughtCo*. 2021. ISSN 169-376.
- [25] SHANTHAKUMAR, Parvathy; KLEPACKA, Joanna; BAINS, Aarti; CHAWLA, Prince; DHULL, Sanju et al. The Current Situation of Pea Protein and Its Application in the Food Industry. online. *Molecules*. 2022, roč. 27, č. 16. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27165354>. [cit. 2023-11-28].
- [26] DAHL, Wendy; FOSTER, Lauren a TYLER, Robert. Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). online. *British Journal of Nutrition*. 2012, roč. 108, č. 1, s. 3-10. ISSN 0007-1145. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0007114512000852>. [cit. 2023-11-28].
- [27] MUSTAFA, Ahmed; ABOUELENEIN, Doaa; ACQUATICCI, Laura; ALESSANDRONI, Laura; ANGELONI, Simone et al. Polyphenols, Saponins and Phytosterols in Lentils and Their Health Benefits: An Overview. online. *Pharmaceuticals*. 2022, roč. 15, č. 10. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph15101225>. [cit. 2023-11-29].
- [28] CHUA, ; MALEK, ; CHONG, ; SUJARWO, a HO, . Red Lentil (*Lens culinaris*) Extract as a Novel Natural Coagulant for Turbidity Reduction: An Evaluation, Characterization and Performance Optimization Study. online. *Water*. 2019, roč. 11, č. 8. ISSN 2073-4441. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/w11081686>. [cit. 2023-11-28].
- [29] KAALE, Lilian; SIDDIQ, Muhammad a HOOPER, Sharon. Lentil (*Lens culinaris* Medik) as nutrient-rich and versatile food legume: A review. online. *Legume Science*. 2023, roč. 5, č. 2. ISSN 2639-6181. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/leg3.169>. [cit. 2023-11-29].
- [30] TETERYCZ, Dorota; SOBOTA, Aldona; ZARZYCKI, Piotr a LATOCH, Agnieszka. Legume flour as a natural colouring component in pasta production. online. *Journal of Food Science and Technology*. 2020, roč. 57, č. 1, s. 301-309. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04061-5>. [cit. 2023-11-29].

- [31] GRAF, Daniela; MONK, Jennifer; LEPP, Dion; WU, Wenqing; MCGILLIS, Laurel et al. Cooked Red Lentils Dose-Dependently Modulate the Colonic Microenvironment in Healthy C57Bl/6 Male Mice. online. *Nutrients*. 2019, roč. 11, č. 8. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu11081853>. [cit. 2023-11-29].
- [32] PULIVARTHI, Manoj; NKURIKIYE, Eric; WATT, Jason; LI, Yonghui a SILIVERU, Kaliramesh. Comprehensive Understanding of Roller Milling on the Physicochemical Properties of Red Lentil and Yellow Pea Flours. online. *Processes*. 2021, roč. 9, č. 10. ISSN 2227-9717. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pr9101836>. [cit. 2023-11-29].
- [33] CHATZIMITAKOS, Theodoros; ATHANASIADIS, Vassilis; MAKRYGIANNIS, Ioannis; KOTSOU, Konstantina; PALAIOGIANNIS, Dimitrios et al. Nutritional Quality and Antioxidant Properties of Brown and Black Lentil Sprouts. online. *Horticulturae*. 2023, roč. 9, č. 6. ISSN 2311-7524. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060668>. [cit. 2023-11-30].
- [34] EL-NAGGAR, Noura; HUSSEIN, Mervat; SHAABAN-DESSUUKI, Sami a DALAL, Shima. Production, extraction and characterization of *Chlorella vulgaris* soluble polysaccharides and their applications in AgNPs biosynthesis and biostimulation of plant growth. online. *Scientific Reports*. 2020, roč. 10, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59945-w>. [cit. 2023-11-27].
- [35] BITO, Tomohiro; OKUMURA, Eri; FUJISHIMA, Masaki a WATANABE, Fumio. Potential of *Chlorella* as a Dietary Supplement to Promote Human Health. online. *Nutrients*. 2020, roč. 12, č. 9. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu12092524>. [cit. 2023-11-27].
- [36] EL-SHEEKH, Mostafa; ABU-FADDAN, Mahmoud; ABO-SHADY, Atef; NASSAR, Mohamed a LABIB, Wagdy. Molecular identification, biomass, and biochemical composition of the marine chlorophyte *Chlorella* sp. MF1 isolated from Suez Bay. online. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2020, roč. 18, č. 1. ISSN 2090-5920. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00044-8>. [cit. 2023-11-27].
- [37] FITHRIANI, D a MELANIE, S. Vitamin and mineral content of microalgae *Phorpyridium* and *Chlorella* and development prospects for food raw materials in Indonesia. online. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2022, roč. 1034, č. 1. ISSN 1755-1307. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1034/1/012043>. [cit. 2023-11-27].
- [38] FAIS, Giacomo; MANCA, Alessia; BOLOGNESI, Federico; BORSELLI, Massimiliano; CONCAS, Alessandro et al. Wide Range Applications of *Spirulina*: From Earth to Space Missions. online. *Marine Drugs*. 2022, roč. 20, č. 5. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md20050299>. [cit. 2023-11-27].
- [39] PYNE, Smriti; BHATTACHARJEE, Paramita a SRIVASTAV, Prem. Microalgae (*Spirulina Platensis*) and Its Bioactive Molecules:. *Open Science Publications*. 2017, roč. 4, č. 2. ISSN 2395-2326.

- [40] ASGHARI, Asieh; FAZILATI, Mohammad; LATIFI, Ali; SALAVATI, Hossain a CHOOPANI, Ali. A Review on Antioxidant Properties of Spirulina. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2016, roč. 3, č. 1. ISSN 345-351.
- [41] LOPES, ; MELO, ; MENESES, ; ABREU, ; PEREIRA, et al. A New Look for the Red Macroalga *Palmaria palmata*: A Seafood with Polar Lipids Rich in EPA and with Antioxidant Properties. online. *Marine Drugs*. 2019, roč. 17, č. 9. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md17090533>. [cit. 2023-11-27].
- [42] STÉVANT, Pierrick; SCHMEDES, Peter; LE GALL, Line; WEGEBERG, Susse; DUMAY, Justine et al. Concise review of the red macroalga dulse, *Palmaria palmata* (L.) Weber & Mohr. online. *Journal of Applied Phycology*. 2023, roč. 35, č. 2, s. 523-550. ISSN 0921-8971. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02899-5>. [cit. 2023-11-27].
- [43] HARNEDY, Pádraigín a FITZGERALD, Richard. Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. online. *LWT - Food Science and Technology*. 2013, roč. 51, č. 1, s. 375-382. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.023>. [cit. 2023-11-27].
- [44] WALKER, Graeme a STEWART, Graham. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. online. *Beverages*. 2016, roč. 2, č. 4. ISSN 2306-5710. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>. [cit. 2023-12-02].
- [45] *Saccharomyces cerevisiae-taxonomy*. online. In: . Dostupné z: <https://wwnorton.com/college/biology/micrograph/single.aspx?fig=387>. [cit. 2023-11-21].
- [46] PERLI, Thomas; WRONSKA, Anna; ORTIZ-MERINO, Raúl; PRONK, Jack a DARAN, Jean-Marc. Vitamin requirements and biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. online. *Yeast*. 2020, roč. 37, č. 4, s. 283-304. ISSN 0749-503X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/yea.3461>. [cit. 2023-11-23].
- [47] PARAPOULI, Maria; VASILEIADI, Anastasios; AFENDRA, Amalia-Sofía a HATZILOUKAS, Efstathios. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. online. *AIMS Microbiology*. 2020, roč. 6, č. 1, s. 1-32. ISSN 2471-1888. Dostupné z: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>. [cit. 2023-11-28].
- [48] VELÁZQUEZ-SÁMANO, Guillermo; COLLADO-CHAGOYA, Rodrigo; CRUZ-PANTOJA, Rubén; VELASCO-MEDINA, Andrea a ROSALES-GUEVARA, Juan. Reacciones de hipersensibilidad a aditivos alimentarios. online. *Revista Alergia México*. 2019, roč. 66, č. 3, s. 329-339. ISSN 2448-9190. Dostupné z: <https://doi.org/10.29262/ram.v66i3.613>. [cit. 2023-12-08].
- [49] MEDHI, Manisha; GUPTA, Arun; DHUA, Subhamoy a MISHRA, Poonam. Food Additives. online. *Advances in Food Chemistry*. 2022, s. 255-292. ISBN 978-981-19-4795-7. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-981-19-4796-4_7. [cit. 2023-12-08].

- [50] BURDOCK, George a CARABIN, Ioana. Generally recognized as safe (GRAS): history and description. online. *Toxicology Letters*. 2004, roč. 150, č. 1, s. 3-18. ISSN 03784274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.07.004>. [cit. 2023-12-08].
- [51] RAMOS-ROMERO, Sara; TORRELLA, Joan; PAGÈS, Teresa; VISCOR, Ginés a TORRES, Josep. Edible Microalgae and Their Bioactive Compounds in the Prevention and Treatment of Metabolic Alterations. online. *Nutrients*. 2021, roč. 13, č. 2. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu13020563>. [cit. 2023-12-08].
- [52] *Analytická chemie (1.díl)*. online. In: . Praha, 2016. [cit. 2023-12-04].
- [53] KOT, Anna; GIENKA, Iwona; BZDUCHA-WRÓBEL, Anna; BŁAŻEJAK, Stanisław a KURCZ, Agnieszka. Comparison of simple and rapid cell wall disruption methods for improving lipid extraction from yeast cells. online. *Journal of Microbiological Methods*. 2020, roč. 176. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105999>. [cit. 2023-11-30].
- [54] BLICHARSKI, Tomasz a ONISZCZUK, Anna. Extraction Methods for the Isolation of Isoflavonoids from Plant Material. online. *Open Chemistry*. 2017, roč. 15, č. 1, s. 34-45. ISSN 2391-5420. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/chem-2017-0005>. [cit. 2023-11-30].
- [55] ZHOU, Jianjun; WANG, Min; SARAIVA, Jorge; MARTINS, Ana; PINTO, Carlos et al. Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches. online. *Food Chemistry*. 2022, roč. 384. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132236>. [cit. 2023-11-30].
- [56] *Chromatografie*. online. In: . Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/oppa-sem-bio/PDFs/4OPPAst.pdf>. [cit. 2023-12-04].
- [57] PAULOVÁ, Hana; TÁBORSKÁ, Eva a BOCHOŘÁKOVÁ, Hana. *METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK IN VITRO*. online. In: . 2004. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf. [cit. 2023-12-05].
- [58] STRATIL, Pavel; KUBÁŇ, Vlastimil a FOJTOVÁ, Jitka. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. online. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008, roč. 26, č. 4, s. 242-253. ISSN 12121800. Dostupné z: <https://doi.org/10.17221/1119-CJFS>. [cit. 2023-12-06].
- [59] YU, Ja; LEE, Jae; PARK, Jong-Dae; CHOI, Yun-Sang; SUNG, Jung-Min et al. Analyzing Gluten Content in Various Food Products Using Different Types of ELISA Test Kits. online. *Foods*. 2021, roč. 10, č. 1. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods10010108>. [cit. 2023-12-06].
- [60] USHAKOVA, Yu; PAS'KOVA, E; RYSMUKHAMBETOVA, G; KARPUNINA, L; MAMINA, S et al. A study of the quantitative content of gluten in dietary products using the enzyme immunoassay system RIDASCREEN® Gliadin competitive. online. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021, roč. 640, č. 2. ISSN

1755-1307. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/640/2/022087>. [cit. 2023-12-06].

- [61] BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay a IBNSOUDA, Saad. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. online. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, roč. 6, č. 2, s. 71-79. ISSN 20951779. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>. [cit. 2023-12-07].
- [62] BONEV, B.; HOOPER, J. a PARISOT, J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. online. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008, roč. 61, č. 6, s. 1295-1301. ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jac/dkn090>. [cit. 2023-12-07].
- [63] WEYERMANN, Jörg; LOCHMANN, Dirk a ZIMMER, Andreas. A practical note on the use of cytotoxicity assays. online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, roč. 288, č. 2, s. 369-376. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.09.018>. [cit. 2023-12-07].
- [64] CARREÑO, Edith; ALBERTO, Anael; DE SOUZA, Cristina; DE MELLO, Heber; HENRIQUES-PONS, Andrea et al. Considerations and Technical Pitfalls in the Employment of the MTT Assay to Evaluate Photosensitizers for Photodynamic Therapy. online. *Applied Sciences*. 2021, roč. 11, č. 6. ISSN 2076-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app11062603>. [cit. 2023-12-06].
- [65] GHASEMI, Mahshid; TURNBULL, Tyron; SEBASTIAN, Sonia a KEMPSON, Ivan. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 23. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>. [cit. 2023-12-07].
- [66] PAŚKO, Paweł; TYSZKA-CZOCHARA, Małgorzata; NAMIEŚNIK, Jacek; JASTRZĘBSKI, Zenon; LEONTOWICZ, Hanna et al. Cytotoxic, antioxidant and binding properties of polyphenols from the selected gluten-free pseudocereals and their by-products: In vitro model. online. *Journal of Cereal Science*. 2019, roč. 87, s. 325-333. ISSN 07335210. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.04.009>. [cit. 2024-04-18].

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ARA	kyselina arachidonová
ABTS	2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
AMK	aminokyseliny
DHA	kyselina dokosahexaenová
DMSO	dimethylsulfoxid
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
FAO	Organizace pro výživu a polnohospodářství patřící pod OSN
FDA	Úřad pro kontrolu léčiv a potravin USA
GC	plynová chromatografie
GRAS	látka všeobecně považovaná za bezpečnou
HPLC	vysoceúčinná kapalinová chromatografie
MK	mastné kyseliny
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny
OSN	Organizace spojených národů
PUFA	polynenasyčené mastné kyseliny
SDS	dodecylsulfát sodný
SFA	nasyčené mastné kyseliny
TE	ekvivalent Troloxu
TEAC	antioxidační kapacita látek ekvivalentní Troloxu
UV-VIS	oblast ultrafialového a viditelného záření