



# 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

# NÁVRH RECEPTURY POTRAVINOVÉHO DOPLŇKU NA BÁZI BIOAKTIVNÍCH LÁTEK IZOLOVANÝCH Z PLODŮ TRNKY OBECNÉ (PRUNUS SPINOSA)

RECIPE OF A FOOD SUPPLEMENT BASED ON BIOACTIVE SUBSTANCES ISOLATED FROM PRUNUS  
SPINOSA

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Zuzana Červinková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2023

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1773/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Zuzana Červinková**  
Studijní program: Chemie přírodních látek  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Návrh receptury potravinového doplňku na bázi bioaktivních látek izolovaných z plodů trnky obecné (*Prunus spinosa*)

### Zadání diplomové práce:

1. Rešerše (chemické složení a biologické účinky plodů *Prunus spinosa*, vliv způsobu uchování plodů na obsah bioaktivních látek, doplňky stravy)
2. Experimentální část:
  - a) Příprava produktů na bázi plodů *Prunus spinosa* (etanolový extrakt, lyofilizovaný prášek z plodů, želé bonbóny)
  - b) Stanovení antioxidační a antimikrobiální aktivity, analýza složení připravených produktů.
3. Vyhodnocení výsledků z hlediska vlivu zpracování produktů na jejich složení.
4. Diskuse a závěr práce.

### Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

-----  
Bc. Zuzana Červinková  
studentka

prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

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



## ABSTRAKT

Plody trnky obecné (*Prunus spinosa*) jsou drobné modrofialové peckovice obsahující řadu bioaktivních látek, díky kterým disponují rozmanitými biologickými účinky. Tradičně jsou využívány nejen v lidovém léčitelství, neboť jim je přisuzováno množství preventivních a léčivých účinků.

Předložená diplomová práce se zabývá přípravou a následnou charakterizací ethanolového extraktu a doplňků stravy na bázi bioaktivních látek izolovaných z plodů trnky obecné. Ethanolový extrakt byl připraven macerací čerstvých plodů *Prunus spinosa* v 40% konzumním lihu. Poté byl u extraktu stanoven obsah celkových polyfenolů ( $2111,39 \pm 11,32$  mg GAE/l), flavonoidů ( $903,89 \pm 5,08$  mg CAE/l) a anthokyanů ( $165,24 \pm 0,38$  mg CGE/l), antioxidační ( $11,99 \pm 0,40$  mmol TE/l) i antimikrobiální aktivita, profil fenolických látek a profil jednoduchých cukrů. Ethanolový extrakt vykázal antibakteriální účinek vůči grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus* i gramnegativní bakterii *Escherichia coli*, avšak vůči kvasince *Candida glabrata* nebyl účinný. Po šetrném zahuštění na vakuové odparce byl extrakt použit při přípravě doplňku stravy.

V rámci diplomové práce byly připraveny dva typy doplňků stravy, a to želatinové bonbóny s extraktem z plodů trnky obecné a želatinové kapsle plněné práškem z lyofilizovaných plodů. U těchto produktů byl charakterizován jejich nutriční profil, obsah bioaktivních látek (tj. celkové polyfenoly, flavonoidy a anthokyany), profil fenolických sloučenin a antioxidační aktivita. Dále u nich bylo sledováno uvolňování polyfenolů v průběhu modelového *in vitro* trávení „nalačno“. Mimo to byly želatinové bonbony s různým obsahem extraktu (5, 10, 15 a 20 %) podrobeny sensorickému hodnocení, kdy cílem byla optimalizace přídavku koncentrovaného extraktu do želatinové matrice. Dle preferencí hodnotitelů byl vzorek s přídavkem 15 % extraktu hodnocen jako nejlepší z pohledu celkové chuti, resp. flavouru. V pořadové zkoušce se tento vzorek umístil na druhém místě, a to za vzorkem s 5 % extraktu, avšak ten pro změnu získal horší hodnocení sensorického profilu.

Součástí práce bylo také sledování vlivu mrazení, lyofilizace a sušení na obsah bioaktivních látek (tj. celkové polyfenoly, flavonoidy a anthokyany) a antioxidační aktivitu plodů *Prunus spinosa*. Nejvyšší obsah celkových polyfenolů ( $57,49 \pm 0,33$  mg GAE/g DW), flavonoidů ( $45,75 \pm 0,12$  mg CAE/g DW) i anthokyanů ( $6,41 \pm 0,19$  mg CGE/g DW) byl kvantifikován u lyofilizovaných plodů, avšak nejvyšší antioxidační aktivita ( $281,72 \pm 0,70$   $\mu$ mol TE/g DW) byla zaznamenána u plodů mražených. U analyzovaných vzorků byla pozorována statisticky významná středně silná kladná korelace (0,641) antioxidační aktivity a celkových flavonoidů.

Výsledky práce poukázaly na velký potenciál využití plodů trnky obecné v nutričním průmyslu, kde mohou jako aktivní aditiva přispět k zvýšení jak bioaktivní, tak i nutriční kvality potravinových doplňků.

## KLÍČOVÁ SLOVA

trnka obecná (*Prunus spinosa*), ethanolový extrakt, doplněk stravy, želatinové bonbony, kapsle, polyfenoly, flavonoidy, anthokyany, antioxidační aktivita, antimikrobiální aktivita, nutriční profil, modelové trávení *in vitro*, sensorická analýza

## ABSTRACT

Blackthorn fruits (*Prunus spinosa*) are small blue-purple drupes containing a range of bioactive substances that give them diverse biological effects. They are traditionally used not only in folk medicine, as they are attributed with many preventive and therapeutic effects.

The presented master's thesis deals with the preparation and characterization of an ethanol extract and dietary supplements based on bioactive substances isolated from the fruits of blackthorn. The ethanol extract was prepared by maceration fresh *Prunus spinosa* fruits in 40% alcohol. The extract was analyzed for the polyphenols ( $2111.39 \pm 11.32$  mg GAE/l), flavonoids ( $903.89 \pm 5.08$  mg CAE/l) and anthocyanins ( $165.24 \pm 0.38$  mg CGE/l) content, antioxidant ( $11.99 \pm 0.40$  mmol TE/l) and antimicrobial activity, phenolic compounds profile and sugars profile. The ethanolic extract exhibited antibacterial effect against the gram-positive bacterium *Micrococcus luteus* and gram-negative bacterium *Escherichia coli* but was not effective against the yeast *Candida glabrata*. After gentle concentration on a vacuum evaporator, the extract was used to prepare a dietary supplement.

Two types of dietary supplements were prepared, namely gelatine candies with blackthorn fruit extract and gelatine capsules filled with lyophilized fruit powder. The nutritional profile of these products, content of bioactive substances (i.e. total polyphenols, flavonoids, and anthocyanins), phenolic compound profile and antioxidant activity were characterized. Additionally, the release of polyphenols was monitored during a simulated *in vitro* digestion. The gelatine candies with different extract concentrations (5, 10, 15 and 20 %) were subjected to sensory evaluation, where the aim was to optimize the addition of the extract to the gelatine matrix. According to the preferences of the evaluators, the sample with 15 % extract was rated as the best in terms of overall taste. In the ranking test, this sample was ranked second, behind the sample with 5 % extract, which, on the other hand, received a worse sensory profile rating.

The thesis also included monitoring the effect of freezing, lyophilization, and drying on the bioactive compounds content (i.e. total polyphenols, flavonoids, anthocyanins) and antioxidant activity of *Prunus spinosa* fruits. The highest contents of total polyphenols ( $57.49 \pm 0.33$  mg GAE/g DW), flavonoids ( $45.75 \pm 0.12$  mg CAE/g DW) and anthocyanins ( $6.41 \pm 0.19$  mg CGE/g DW) were quantified in lyophilized fruits, but the highest antioxidant activity ( $281.72 \pm 0.70$   $\mu$ mol TE/g DW) was observed in frozen fruits. A statistically significant moderately strong positive correlation (0.641) of antioxidant activity and total flavonoids was observed for the analyzed samples.

The results of the thesis showed a great potential for the use of blackthorn berries in the nutraceutical industry, where they can contribute as active additives to increasing both the bioactive and nutritional quality of dietary supplements.

## KEY WORDS

blackthorn fruit (*Prunus spinosa*), ethanol extract, dietary supplement, gelatine candies, capsules, polyphenols, flavonoids, anthocyanins, antioxidant activity, antimicrobial activity, nutrient profile, simulated digestion *in vitro*, sensory analysis

ČERVINKOVÁ, Zuzana. *Návrh receptury potravinového doplňku na bázi bioaktivních látek izolovaných z plodů trnky obecné (Prunus spinosa)*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/147624>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. 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

Ráda bych touto formou poděkovala mé vedoucí diplomové práce prof. Ing. Adriáně Kovalčík, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, vstřícnost a čas, který mi věnovala. Také bych ráda poděkovala mému konzultantovi Ing. Pavlovi Vostrejšovi za pomoc, cenné rady a čas, který mi věnoval při realizaci této diplomové práce. Dále děkuji Ing. Nicole Černekové za pomoc a čas, který mi věnovala při realizaci antimikrobiálních testů a HPLC analýzy. V neposlední řadě děkuji také celé mé rodině za velkou podporu po celou dobu mého studia.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1	Trnka obecná.....	11
2.1.1	Chemické složení plodů.....	11
2.1.2	Biologické účinky plodů.....	14
2.2	Vliv způsobu zpracování a uchovávání na kvalitu dužnatého ovoce.....	18
2.2.1	Mrazení .....	18
2.2.2	Sušení.....	19
2.2.3	Lyofilizace .....	20
2.3	Nutraceutika .....	21
2.3.1	Doplňky stravy .....	21
2.4	Nečokoládové cukrovinky .....	25
2.4.1	Želé cukrovinky .....	26
2.5	Senzorická analýza.....	27
2.5.1	Smyslové vnímání .....	27
2.5.2	Podmínky sensorické analýzy .....	28
2.5.3	Hodnotitelé .....	28
2.5.4	Metody sensorické analýzy .....	29
2.5.5	Stupnice v sensorické analýze.....	31
2.5.6	Metody hodnocení výsledků sensorické analýzy .....	32
2.5.7	Senzorické hodnocení nečokoládových cukrovinek.....	32
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	34
3.1	Chemikálie .....	34
3.2	Přístroje a pomůcky .....	34
3.3	Chemikálie pro přípravu kultivačních médií .....	35
3.4	Použité mikroorganismy .....	35
3.5	Suroviny pro výrobu doplňků stravy .....	35
3.6	Cíle práce .....	35
3.7	Vzorky.....	37
3.8	Extrakce polyfenolů .....	39
3.9	Extrakce anthokyanů.....	39
3.10	Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů.....	40

3.11	Spektrofotometrické stanovení celkových flavonoidů.....	40
3.12	Spektrofotometrické stanovení celkových anthokyanů .....	41
3.13	Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity metodou TEAC .....	43
3.14	Stanovení vitamínů C metodou HPLC/DAD .....	43
3.15	Stanovení profilu fenolických látek metodou HPLC/DAD .....	44
3.16	Stanovení profilu jednoduchých cukrů metodou HPLC/DAD .....	45
3.17	Stanovení vybraných nutričních hodnot .....	46
3.17.1	Stanovení celkové sušiny .....	46
3.17.2	Stanovení popela .....	46
3.17.3	Stanovení celkových bílkovin .....	47
3.17.4	Stanovení celkových tuků .....	48
3.17.5	Stanovení celkových cukrů po inverzi .....	48
3.17.6	Stanovení vlákniny .....	50
3.17.7	Stanovení celkových sacharidů .....	50
3.17.8	Stanovení energetické hodnoty .....	50
3.18	Stanovení antimikrobiální aktivity .....	51
3.19	Studium uvolňování bioaktivních látek v průběhu modelového trávení .....	52
3.20	Senzorická analýza.....	52
3.21	Statistická analýza dat .....	53
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	55
4.1	Vliv způsobu uchovávání plodů <i>Prunus spinosa</i> na obsah bioaktivních látek ...	55
4.2	Charakterizace extraktu z plodů <i>Prunus spinosa</i> .....	58
4.2.1	Antimikrobiální aktivita extraktu .....	61
4.3	Charakterizace připravených doplňků stravy .....	62
4.3.1	Nutriční složení doplňků stravy .....	62
4.3.2	Obsah bioaktivních látek a antioxidační aktivita doplňků stravy .....	64
4.4	Studium uvolňování bioaktivních látek v průběhu modelového trávení .....	68
4.5	Senzorická analýza doplňku stravy ve formě želatinových bonbónů .....	71
4.5.1	Charakterizace senzorického panelu .....	72
4.5.2	Vyhodnocení senzorického profilu .....	73
4.5.3	Vyhodnocení pořadové zkoušky .....	76
5	ZÁVĚR.....	77
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	80

7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	93
8	SEZNAM PŘÍLOH.....	95
9	PŘÍLOHY.....	97



# 1 ÚVOD

Doplňky stravy (resp. suplementy) jsou českou legislativou definovány jako potraviny, jejichž účelem je doplňovat běžnou stravu a které jsou koncentrovaným zdrojem vitaminů a minerálů nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem [1]. Suplementy se obvykle konzumují ve formě tablet, kapslí, prášků či tekutin. V posledních několika letech byl zaznamenán celosvětový nárůst trhu s doplňky stravy, který v roce 2022 dosáhl hodnoty 165,71 miliardy amerických dolarů (USD) [2]. Vzdávající trend tohoto trhu je predikován i v dalším desetiletí s očekávaným tempem růstu 8,9 %, přičemž již v roce 2030 by měl dle některých zdrojů dosáhnout hodnoty 354,21 miliardy USD [3]. Dynamický rozvoj trhu s doplňky stravy byl v minulých letech podpořen také pandemií COVID-19, kdy během jednoho roku došlo k nárůstu o cca 8 %. Suplementy však nebyly vždy populární jako dnes. Mezi lety 1975 a 2015 byl zaznamenán pouze 25% nárůst amerického trhu se suplementy. Pro srovnání v posledních méně než deseti letech došlo k nárůstu o 78,9 % [2,3].

Rostoucí nabídka jak doplňků stravy, tak funkčních potravin a superpotravin, jde ruku v ruce s rostoucí poptávkou ze stran spotřebitelů. Až 30,8 % z trhu s doplňky stravy tvoří segment vitaminů následovaný bylinnými preparáty (9,2 %) [2,3]. Z průzkumu amerického trhu bylo zjištěno, že 57,6 % dospělých lidí užívá minimálně jeden doplněk stravy denně, a počet konzumovaných suplementů roste se zvyšujícím se věkem [4]. Spotřebitelé mají také tendenci důvěřovat spíše produktům na přírodní bázi než těm, které si spojují s farmaceutickým průmyslem (až 72 % dotázaných) [2]. Důvodů proč lidé doplňky stravy konzumují je hned několik. Téměř polovina spotřebitelů očekává zlepšení zdravotního stavu, třetina konzumentů suplementy užívá za účelem udržení aktuálního zdravotního stavu [4]. Existuje také skupina lidí, kteří doplňky stravy berou kvůli zvýšení sportovního výkonu. Vzhledem k vysoké konkurenci na trhu se stovky společností po celém světě snaží nabízet zákazníkům stále nové produkty [2].

Plody trnky obecné (*Prunus spinosa*) jsou drobné modrořialové peckovice [5] obsahující řadu bioaktivních látek, jako jsou polyfenoly, flavonoidy, anthokyany, taniny, karotenoidy, organické kyseliny, minerální látky či vitaminy C, B1, B2, B3, B6, B9 a E [6–11]. Díky bohatému bioaktivnímu složení plody disponují rozmanitými biologickými účinky, jako je antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivá, antidiabetická či antikarcinogenní aktivita. Trnky jsou tradičně využívány v lidovém léčitelství, neboť jim je přisuzováno množství preventivních a léčivých účinků [6,12–14]. Dříve byly využívány k léčbě například nachlazení, cukrovky, obezity, respiračních a zažívacích obtíží apod [12].

Cílem této diplomové práce byla příprava a následná charakterizace ethanolového extraktu a doplňků stravy na bázi bioaktivních látek získaných z plodů trnky obecné (*Prunus spinosa*). V rámci této práce byly připraveny dva typy doplňků stravy, a to želatinové bonbóny s extraktem z plodů trnky obecné a želatinové kapsle plněné práškem z lyofilizovaných plodů. Ethanolový extrakt byl připraven 14denní macerací čerstvých plodů v 40% konzumním lihu a pomocí jednoduchých, rychlých, spektrofotometrických metod byl charakterizován z hlediska obsahu vybraných bioaktivních látek, antioxidační a antimikrobiální aktivity. Metodou HPLC/DAD byl v extraktu analyzován také profil fenolických látek. Po šetrném zahuštění na vakuové odparce byl extrakt použit při přípravě doplňku stravy ve formě želé bonbonů. Ty byly podrobeny sensorickému hodnocení, a to s cílem optimalizovat přísadový trnkového

extraktu (5, 10, 15 a 20 %) do želatinové matrice s ohledem na spotřebitelskou přijatelnost. U obou typů připravených doplňků stravy byl stanoven příslušný nutriční profil, obsah vybraných bioaktivních látek, antioxidační aktivita a profil fenolických látek. Taktéž u nich bylo sledováno uvolňování polyfenolů v průběhu modelového *in vitro* trávení „nalačno“. Součástí práce bylo také studium vlivu způsobu uchování, resp. konzervace, plodů trnky obecné na obsah vybraných bioaktivních látek a antioxidační aktivitu, a to se záměrem zvolit vhodný způsob uchovávání těchto plodů před jejich dalším zpracováním.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Trnka obecná

Trnka obecná (*Prunus spinosa*, blackthorn) je hustě větvený, opakovaně kvetoucí, 1–3 m vysoký, listnatý keř s dlouhými trny [5,15]. Drobné čistě bílé květy s výraznou vůní kvetou od března do května [5,16]. Teprve po jejich odkvětu začínají rašit listy tmavě zelené až šedavě zelené barvy [5,17]. Plody tzv. trnky (obrázek 1) jsou kulovité, modrofialové až modročerné, oviněné dužnaté peckovice o velikosti přibližně 10–15 mm [5]. Plody jsou značně podobné švestkám, avšak dozrávají později, a to až v říjnu [5,15,18]. Jejich chuť je trpce kyselá až svíravá, vzácněji sladká [5,12,17].



Obrázek 1: Plod *Prunus spinosa* (fotografie byla převzata a upravena) [19].

*Prunus spinosa* L. (PsL) je rozšířený druh, který roste převážně v mírném kontinentálním podnebí severní polokoule v nížinných až podhorských oblastech [13,16,20]. Vyskytuje se téměř na celém území Evropy [5]. Běžnými lokalitami růstu jsou také severozápadní Afrika, Malá Asie, Turecko, Izrael, Írán, Kavkaz a izolované lokality v okolí Balchašského jezera v Kazachstánu [5,20]. V České republice trnka obecná roste roztroušeně po celém území [5]. Jejím stanovištěm jsou meze, stře, sutě, křovinaté slunné stráně, kamenité či skalnaté svahy, lesní pláně apod [5,16]. Mnohdy roste v listnatých lesích, především výmladkového typu, vzácněji při komunikacích a na opuštěných místech poblíž obcí [5,17].

#### 2.1.1 Chemické složení plodů

Plody trnky obecné jsou významné pro své vyvážené bioaktivní a nutriční složení. Mimo jiné jsou cenným zdrojem energie, kdy na 100 g suchých plodů připadá energetická hodnota přibližně 249–383 kcal [6,7]. Chemické složení plodů PsL, tedy i jejich energetická hodnota, jsou závislé na řadě faktorů, jako je stádium zralosti, podmínky růstu (tj. podnebí, nadmořská výška, hnojení aj.), způsob a délka skladování či způsob zpracování [21].

Nejvíce zastoupenou makroživinou v plodech PsL jsou sacharidy, které často tvoří až 88 % hmotnosti suchých plodů. V trnkách byly identifikovány a kvantifikovány hlavní cukry, a to glukóza (29,84 g/100 g suchého materiálu tzv. DW), fruktóza (6,95 g/100 g DW) a sacharóza (0,27 g/100 g DW) [6]. Vedle těchto cukrů ovoce obsahuje i další sacharidy, především polysacharidy pektin, celulózu, škrob aj. Pektin a celulóza se řadí mezi tzv. nevyužitelné polysacharidy, neboť nejsou snadno stravitelné. Obecně se označují jako vláknina [21]. Plody *Prunus spinosa* obsahují až 32 g vlákniny/100 g DW [6].

Obsah bílkovin v ovoci je zpravidla pouze nízký [21]. Proteiny v plodech PsL tvoří přibližně 1,35–3,4 % z hmotnosti suchých plodů [6,7,8]. Doposud bylo v plodech PsL kvantifikováno 13 aminokyselin, jejichž obsah se pohyboval v rozmezí 47,6–356,7 mg/100 g DW (tabulka 1) [8].

Nejméně zastoupenou makroživinou v plodech PsL jsou lipidy, které tvoří přibližně 2 % hmotnosti suchých plodů [6,7]. V plodech trnky obecné bylo identifikováno a kvantifikováno 20 mastných kyselin (tabulka 1). Nejvíce jsou v plodech obsaženy mononenasyčené mastné kyseliny tzv. MUFA (58,45 %), mezi které spadá dominantní kyselina olejová tvořící 57,58 % z celkového obsahu mastných kyselin. Polynenasycené mastné kyseliny tzv. PUFA (26,40 %), které zahrnují druhou nejvíce zastoupenou kyselinu linolovou (23,57 %), převažují nad nasycenými mastnými kyselinami tzv. SAFA (15,16 %) [6].

Plody *Prunus spinosa* jsou bohaté jak na minerální látky, tak na organické kyseliny. Doposud v nich bylo identifikováno a kvantifikováno 16 minerálních látek, jejichž obsah činil 0,279–500 025,97 mg/kg suchých plodů [7] a 5 organických kyselin s obsahem v rozmezí 1,64–158,00 mg/100 g DW (tabulka 1) [9,22].

Tabulka 1: Profil aminokyselin, mastných kyselin, organických kyselin a minerálních látek plodů *Prunus spinosa* [6,7,8,9,22].

aminokyseliny	mastné kyseliny	minerální látky	organické kyseliny
leucin	kyselina olejová	síra	kyselina jablečná
izoleucin	kyselina linolová	draslík	kyselina citronová
valin	kyselina palmitová	vápník	kyselina fumarová
fenylalanin	kyselina trikosanová	fosfor	kyselina jantarová
lysin	kyselina $\alpha$ -linolenová	hořčík	kyselina mléčná
threonin	kyselina stearová	sodík	
tyrosin	kyselina palmitoolejová	bor	
kyselina glutamová	kyselina arachová	hliník	
kyselina asparagová	kyselina lignocerová	železo	
serin	kyselina behenová	lithium	
prolin	kyselina heptadecylová	mangan	
alanin	kyselina heptadecenová	vanad	
glycin	kyselina laurová	chrom	
	kyselina myristová	olovo	
	kyselina eikosenová	nikl	
	kyselina myristoolejová	kadmium	
	kyselina pentadecylová		
	kyselina kaprinová		
	kyselina kaprylová		
	kyselina (cis, cis, cis)-11,14,17-eikosatrienová a kyselina heneikosanová		

Plody dále obsahují řadu bioaktivních látek jako jsou polyfenoly, fenolové kyseliny, flavonoidy, anthokyany, tanniny, karotenoidy, vitaminy apod [6,10,11]. Obsah celkových polyfenolů (TPC) se v plodech trnky obecné pohybuje v rozmezí přibližně 30,20–33,08 mg kyseliny gallové/100 g DW [10,24]. Polyfenoly jsou velice rozsáhlou heterogenní skupinou sloučenin, které vykazují množství biologických účinků, jako je například antioxidační, antibakteriální, antivirový, protizánětlivý, antikarcinogenní, antialergický, antitrombotický či vazodilatační efekt [6,23]. V plodech PsL byly kvantifikovány nejen celkové fenolové kyseliny (7,24 mg katechinu/g DW), ale také suma hydroxyskořicových (56,50 mg/100 g DW) a hydroxybenzoových kyselin (21,66 mg/100 g DW) [11,24]. V plodech jsou hojně zastoupeny také flavonoidy (1,54–3,29 mg rutinu/g DW), anthokyany (3,48–5,17 mg chloridu kyanidin-3-glukosidu/g DW), proanthokyanidiny (22,10–26,49 mg kyanidin chloridu/g DW) či tanniny neboli třísloviny (0,11–0,27 % w/w) [10,24,25]. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzními fázemi a detektorem diodového pole tzv. RP-HPLC-DAD byly v plodech identifikovány jednotlivé fenolové kyseliny, flavonoidy a anthokyany (tabulka 2) [9,11,13,26,27].

Vedle fenolických sloučenin, trnky dále obsahují karotenoidy, které jsou obecně považovány za hlavní původce antioxidačních vlastností těchto divokých plodů. Doposud byl v plodech PsL kvantifikován pouze obsah  $\beta$ -karotenu, který činí přibližně 0,22–0,78 mg/100 g DW [6,10,22].

Dalšími složkami plodů PsL, které vykazují antioxidační vlastnosti, jsou vitaminy (tabulka 2). Trnky jsou bohaté především na vitamin C, jehož koncentrace se často pohybuje v rozmezí 19–26 mg kyseliny L-askorbové/100 g čerstvého materiálu (FW), resp. 131,64 mg kyseliny L-askorbové/100 g DW [9,10,28]. Vitamin C patří mezi nejvíce nestálé vitaminy, kdy celkové ztráty v důsledku zpracování a skladování často činí 20–80 % [23]. Plody trnky obecné dále vykazují relativně vysokou koncentraci vitaminu E (2,75–9,25 mg/100 g DW), přestože se nejedná o potravinu s vysokým obsahem lipidů, pro které je výskyt vitaminu E charakteristický [6,22].

Tabulka 2: Profil fenolových kyselin, flavonoidů, anthokyanů a anthokyanidinů a vitaminů v plodech *Prunus spinosa* [6,9,10,11,13,22,26,27].

fenolové kyseliny	flavonoidy	anthokyany a anthokyanidiny	vitaminy
kyselina gallová	katechin	kyanidin-3-o-glukosid	vitamin C
kyselina kávová	rutin	kyanidin-3-o-rutinosid	vitamin E
kyselina chlorogenová	kvercetin	peonidin-3-o-glukosid	vitamin B1
kyselina neochlorogenová	myricetin	peonidin-3-o-rutinosid	vitamin B2
kyselina 4-hydroxybenzoová	floridzin	malvidin	vitamin B3
kyselina syringová	genistin	delfinidin	vitamin B6
kyselina p-kumarová		pelargonidin	vitamin B9
kyselina ferulová			
kyselina vanilová			
kyselina sinapová			
kyselina rozmarýnová			

Aroma plodů trnky obecné je tvořeno množstvím těkavých látek, přičemž majoritními jsou aldehydy, následují terpenoidy, alkoholy, estery, alkany a ketony. Pomocí mikroextrakce na pevné fázi a plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií tzv. SPME-GC-MS bylo v plodech PsL identifikováno a kvantifikováno celkem 39 těkavých látek (tabulka 3) [29].

Tabulka 3: Profil těkavých látek u plodů *Prunus spinosa* [29].

skupina	zastoupení	těkavá látka
aldehydy	70,0 %	hexanal, nonanal, (E)-2-oktenal, (Z)-2-heptenal, oktanal, 2-hexenal, heptanal, benzaldehyd, dekanal, (Z)-2-nonenal, (E)-2-dekenal, benzacetaldehyd, (Z)-3-hexenal, 2-undecenal, (E,E)-2,4-nonadienal
terpenoidy	13,5 %	linalool, terpineol, (Z)-linalool oxid, $\alpha$ -cyklocitral, $\alpha$ -damascenon, (E)-geranylaceton, $\alpha$ -ionon, $\alpha$ -terpineol, hotrienol
alkoholy	8,2 %	2-ethyl-1-hexanol
estery	3,0 %	butylacetát, hexylacetát, geranylisovalerát, methylsalicylát, (Z)-3-hexenylbutyrát, butylkarbitolacetát
alkany	2,7 %	dodekan, hexadekan, pentadekan, heptadekan
ketony	1,9 %	1-hepten-3-on, 2,6,6-trimethylcyklohexanon, dodekan-6,7-dion

### 2.1.2 Biologické účinky plodů

Rostlinné buňky produkují řadu fytochemikálií, především sekundárních metabolitů, které slouží jako obranné mechanismy proti vnějším vlivům. Sekundární metabolity rostlin jsou široce zkoumány pro své rozmanité biologické účinky, jako je antioxidační, antimikrobiální, antikarcinogenní či protizánětlivá aktivita [30]. Biologicky aktivní sloučeniny, jako jsou například fenolové sloučeniny včetně flavonoidů, karotenoidy, vitaminy, organické kyseliny či minerální látky, disponují terapeutickým potenciálem [31,32]. Pravidelné konzumaci potravin bohatých na bioaktivní látky je připisován pozitivní vliv na lidské zdraví včetně prevence vzniku řady neinfekčních onemocnění, jako je například rakovina, cukrovka, mrtvice, kardiovaskulární onemocnění, Alzheimerova choroba, šedý zákal či funkční dekadence související s věkem [32]. Bioaktivní sloučeniny jsou zajímavou alternativou pro prevenci, příp. léčbu některých onemocnění, a to nejen díky stále vzrůstajícímu zájmu spotřebitelů o udržitelná řešení pro zlepšení kvality života [33].

Plody *Prunus spinosa* disponují nejen vysokou antioxidační aktivitou, ale také řadou dalších biologických účinků, jako je antimikrobiální, antikarcinogenní, antihemolytická, antidiabetická či protizánětlivá aktivita [12–14]. Díky četným biologickým účinkům jsou trnky velmi zajímavou surovinou pro potravinářský, nutriční, farmaceutický i kosmetický průmysl [13]. Plodům trnky obecné je připisována řada preventivních i léčivých účinků, a tak je často označována jako „léčivá potravina“, která je tradičně využívána v lidovém léčitelství [6,12].



## Antioxidační aktivita plodů

Živé organismy jsou vystaveny nepřetržitému působení exogenních a endogenních volných radikálů. Volné radikály, což jsou částice obsahující nejméně jeden nepárový elektron ve svém elektronovém obalu, vznikají *in vivo* nejčastěji přijetím či ztrátou jednoho elektronu neutrální molekulou [34,35]. Přítomnost nepárového elektronu je příčinou vysoké reaktivity těchto částic, které se snaží nepárový elektron doplnit za zisku stabilní elektronové konfigurace [34]. V posledních několika letech se věnuje pozornost především negativnímu působení volných radikálů na organismus. Jedná se zejména o reaktivní formy kyslíku tzv. ROS (např. superoxidový radikál, hydroxylový radikál či peroxylové radikál) a dusíku tzv. RNS (např. oxid dusnatý či peroxyinitrit) [34,35]. Mezi zdroje exogenních radikálů patří ionizující i neionizující záření, nadměrné množství škodlivin v ovzduší, cigaretový kouř, intoxikace chemickými látkami a také potrava, v níž volné radikály vznikají zejména při tepelné úpravě. Vyšší zátěži pro organismus jsou však radikály endogenní, které vznikají při základních fyziologických procesech, jako jsou oxidační reakce aerobního metabolismu [34].

V živém organismu existuje dynamická rovnováha mezi tvorbou volných radikálů a antioxidační ochranou. Udržení oxidoredukční rovnováhy je velmi důležité pro zachování buněčných a biochemických funkcí. Při narušení této rovnováhy ve prospěch volných radikálů mluvíme o tzv. oxidačním stresu, který je spojován s možným poškozením biomolekul [34]. Radikály iniciují kaskádu reakcí zejména s lipidy, bílkovinami a nukleovými kyselinami. V důsledku těchto reakcí dochází ke změnám struktury biomolekul a tím i k modifikaci důležitých funkcí v organismu [35]. Role oxidačního stresu byla prokázána u řady patologických procesů, jako je zánět, nekróza či apoptóza, a také u řady onemocnění, jako je ateroskleróza, diabetes mellitus, revmatoidní artritida, neurodegenerativní onemocnění atd [34].

Reparativní mechanismy organismu nejsou schopny plně eliminovat poškození biomolekul, a tak důležitou roli v ochraně před volnými radikály hraje prevence jejich vzniku [35]. Přirozeným ochranným mechanismem organismu vůči volným radikálům jsou látky s antioxidačním efektem [36]. Antioxidanty tvoří různorodou skupinu látek, které jsou definovány buď jako látky eliminující již vzniklé volné radikály, tím že je převádějí na méně reaktivní nebo nereaktivní formy, nebo jako sloučeniny zabraňující tvorbě volných radikálů regulací oxidačních pochodů v organismu [34,36].

Antioxidační aktivita kvalifikuje antioxidační kapacitu materiálu, což je schopnost sloučeniny nebo směsi látek eliminovat radikály [36]. K přírodním látkám s antioxidační aktivitou, které jsou přijímány stranou, tradičně patří vitaminy C a E, karotenoidy či polyfenolické sloučeniny mezi něž se řadí flavonoidy, katechiny, fenolické kyseliny atd. Strava bohatá na antioxidanty je spojována s prevencí některých onemocnění, jako jsou například kardiovaskulární choroby, neurologické poruchy, karcinogeneze či proces stárnutí [35].

U plodů *Prunus spinosa* byla opakovaně prokázána *in vitro* antioxidační aktivita, která se pohybuje v poměrně širokém rozmezí, a to 18,30–76,40  $\mu\text{M}$  Troloxu/g FW [10,37,38]. Rozptyl hodnot je dán závislostí antioxidační aktivity plodů na řadě faktorů, mezi které patří například odlišnost genotypů, lokalita a klimatické podmínky růstu či sezóna sběru [24,37].

Veličkovič a kol. [12] sledovali závislost antioxidační aktivity extraktu z plodů PsL na použitém rozpouštědle a zvoleném *in vitro* antioxidačním testu. U metod využívajících volný radikál DPPH, kation-radikál ABTS a redukci  $\text{Fe}^{3+}$  iontu se jako nejúčinnější ukázal

ethanolový extrakt, vodný a acetonový extrakt vykázaly podstatně nižší antioxidační aktivitu. Barros a kol. [6] využili pro extrakci antioxidantů z plodů PsL methanol, avšak z pohledu toxicity jsou upřednostňovány především ethanolové extrakty.

Sikora a kol. [10] sledovali antioxidační aktivitu jak čerstvých plodů *Prunus spinosa* (43,6  $\mu\text{M}$  Troloxu/g FW), tak plodů mrazirensky skladovaných po dobu tří měsíců při teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  (48,5  $\mu\text{M}$  Troloxu/g FW). Mírný nárůst antioxidační aktivity byl vysvětlen poškozením buněčných struktur, v důsledku čehož byly antioxidační komponenty při extrakci dostupnější.

### **Antimikrobiální aktivita plodů**

Antimikrobiální aktivita je proces inhibice růst, příp. usmrcení daného mikroorganismu. K tomuto účelu jsou používány různé antimikrobiální látky, které lze rozlišit na antibakteriální, antifungální, resp. antimykotické a antivirové [39]. K hodnocení antimikrobiální účinnosti různých látek se používají hodnoty MIC, MBS a MFC. MIC neboli minimální inhibiční koncentrace je definována jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která zabraňuje viditelnému růstu mikroorganismů, je tzv. bakteriostatická, fungistatická či virustatická. MBS neboli minimální baktericidní koncentrace je nejnižší koncentrace antibakteriální látky potřebná k usmrcení bakterie za určený čas (např. za 24 hodin za specifikovaných podmínek). MFC neboli minimální fungicidní koncentrace je nejnižší koncentrace antifungální látky potřebná k usmrcení vláknité houby nebo kvasinky za určený čas [40,41].

U extraktů z plodů *Prunus spinosa* byl prokázán významný *in vitro* antibakteriální účinek vůči širokému spektru patogenních gramnegativních i grampozitivních bakterií (viz tabulka 4) [11–13,26,42]. Ethanolové extrakty vykazují významně lepší bakteriostatické i baktericidní účinky vůči testovaným bakteriím v porovnání s vodnými extrakty [12]. Za antibakteriální účinek extraktů z plodů PsL jsou pravděpodobně zodpovědné především některé flavonoidy (např. rutin, kvercetin a myricetin) a fenolové kyseliny (např. kyselina gallová, kávová a ferulová), které poškozují bakteriální membránu, potlačují některé z faktorů virulence a inhibují enzymy i toxiny [13]. Mechanismus antibakteriálního účinku patrně souvisí se schopností fenolických látek vytvářet komplexy s extracelulárními a rozpustnými proteiny, s polypeptidy buněčné stěny i s enzymy vázanými na buněčné membráně, čímž narušují jejich funkce [30].

U extraktů z plodů *Prunus spinosa* byl dále sledován *in vitro* antifungální účinek vůči kvasince *Candida albicans* a vláknitým houbám rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Trichoderma* (viz tabulka 5) [11,12,26]. Údaje dostupné v literatuře jsou prozatím nedostatečné a rozporuplné [12]. Veličkovič a kol. [12] a Veličkovič a kol. [26] u kvasinky *Candida albicans* zaznamenali antiproliferativní účinek ethanolového extraktu z plodů PsL, zatímco Gegiu a kol. [43] uvádí, že je kvasinka proti testovanému vodnému extraktu rezistentní. Veličkovič a kol. [12] dále prezentují antifungální účinek ethanolového i vodného extraktu vůči plísni *Aspergillus niger*, naproti tomu Veličkovič a kol. [26] uvádí, že je plíseň proti testovanému ethanolovému extraktu rezistentní. Fungicidní účinek ethanolového extraktu byl zaznamenán až při maximální testované koncentraci (tj. 69,75 mg/ml), což potvrzuje nízkou účinnost extraktu z plodů PsL proti této plísni [11].

Tabulka 4: Seznam testovaných grampozitivních a gramnegativních bakterií, u kterých byl prokázán antibakteriální účinek extraktů z plodů *Prunus spinosa*, dále příslušné hodnoty MIC, MBC a velikosti inhibičních zón získané pomocí jamkové difuzní metody [11–13,26,42].

testovaný mikroorganismus	ethanolový extrakt			vodný extrakt	
	MIC [mg/ml]	MBC [mg/ml]	JDM [mm]	MIC [mg/ml]	MBC [mg/ml]
<b>grampozitivní bakterie</b>					
<i>Bacillus cereus</i>	5,68	11,36	l.n.	11,36	22,73
<i>Bacillus subtilis</i>	l.n.	l.n.	6,92; 13,67	l.n.	l.n.
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,68; 8,72	11,36; 17,44	5,42; 11,33	11,36	22,73
<i>Listeria monocytogenes</i>	5,68	11,36	l.n.	11,36	22,73
<i>Enterococcus faecalis</i>	4,36	8,72	7,76; 14,33	l.n.	l.n.
<i>Micrococcus flavus</i>	5,68	11,36	l.n.	11,36	22,73
<b>gramnegativní bakterie</b>					
<i>Enterobacter cloacae</i>	5,68	11,36	l.n.	5,68	11,36
<i>Enterobacter aerogenes</i>	l.n.	l.n.	l.n.	l.n.	l.n.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,36; 5,68	8,72; 11,36	6,00; 16,33	11,36	22,73
<i>Salmonella typhimurium</i>	5,68	11,36	l.n.	11,36	22,73
<i>Salmonella enterica</i>	l.n.	l.n.	5,25; 10,33	l.n.	l.n.
<i>Salmonella enteritidis</i>	4,36	8,72	l.n.	l.n.	l.n.
<i>Salmonella abony</i>	l.n.	l.n.	l.n.	l.n.	l.n.
<i>Escherichia coli</i>	5,68; 8,72	11,36; 17,44	5,00; 10,00	11,36	22,73

Pozn.: MIC (minimální inhibiční koncentrace), MBC (minimální baktericidní koncentrace), JDM (jamková difuzní metoda), l.n. (literatura neuvádí).

Tabulka 5: Seznam testovaných vláknitých hub a kvasinek, u kterých byl sledován antifungální účinek extraktů z plodů *Prunus spinosa*, dále příslušné hodnoty MIC a MFC [11,12,26].

testovaný mikroorganismus	ethanolový extrakt		vodný extrakt	
	MIC [mg/ml]	MFC [mg/ml]	MIC [mg/ml]	MFC [mg/ml]
<i>Candida albicans</i>	8,72	17,44	l.n.	l.n.
<i>Aspergillus niger</i>	11,26; 34,87	22,52; 69,75	11,26	22,52
<i>Aspergillus fumigatus</i>	11,57	23,15	11,57	23,15
<i>Aspergillus versicolor</i>	11,06	22,12	11,06	22,12
<i>Aspergillus ochraceus</i>	22,94	45,87	5,73	11,47
<i>Trichoderma viride</i>	5,74	11,47	2,87	5,73
<i>Penicillium funiculosum</i>	5,68	11,36	5,68	11,36
<i>Penicillium ochrochloron</i>	5,48	10,96	5,48	10,96
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	11,16	22,32	11,16	22,32

Pozn.: MIC (minimální inhibiční koncentrace), MFC (minimální fungicidní koncentrace), l.n. (literatura neuvádí).

## 2.2 Vliv způsobu zpracování a uchovávání na kvalitu dužnatého ovoce

Plody trnky obecné (*Prunus spinosa*) jsou drobné dužnaté peckovice bohaté na vodu a sacharidy [5,44]. Jedná se o živé rostlinné orgány s aktivním enzymovým aparátem, které dýchají a podléhají i po sklizni dalšímu vývoji. Pro uchování plodiny ve vysoké kvalitě je nutná šetrná manipulace, tak aby nedošlo k mechanickému poškození, které by mohlo přispět k stresové reakci či k mikrobiální kontaminaci. Posklizňové úpravy, jako jsou odstranění nepoživatelných částí, zchlazení či dosušení, slouží k co nejrychlejšímu převedení plodiny do stavu vhodného k přepravě, zpracování či skladování. Během celého procesu zpracování a skladování podléhají plody komplexním změnám, které zahrnují změny: fyziologické, enzymové, chemické a mikrobiologické. Jelikož je skladovatelnost zralých dužnatých plodů jen velmi omezená, bývají často zpracovávány s cílem prodloužit jejich uchovatelnost, zachovat nutriční a sensorickou kvalitu a zajistit zdravotní bezpečnost [44].

Metody konzervace potravin se podle principu účinku dělí do 3 hlavních skupin: vylučování mikroorganismů z prostředí potravin, usmrcování mikroorganismů neboli *abiosa* a zvyšování odolnosti potravin prodloužením lag fáze růstu mikroorganismů neboli *anabiosa* [44].

Mezi metody *anabiosy* patří: konzervace sníženou teplotou (např. chlazení a mrazení), konzervace osmoanabiosou (např. sušení, koncentrace či proslazování), konzervace chemoanabiosou (např. přidavek chemických konzervovadel, alkoholizace, přidavek antibiotik či fytoncidních látek) a konzervace cenoanabiosou (např. konkurenční mikroflóra uskutečňující mléčné či alkoholové kvašení) [44].

### 2.2.1 Mrazení

Mrazení je anabiotická metoda konzervace potravin fyzikálně-chemickou úpravou [45]. V důsledku zmrazení dochází ke zpomalení či úplnému zastavení metabolismu přítomných mikroorganismů, výrazně se také zpomalují enzymové a chemické reakce, které jinak snižují výživovou hodnotu potravin. Konzervace mrazením je účinná pouze během mrazírenského skladování (tj. při teplotách  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a nižších), které je energeticky náročné. Po rozmrazení je produkt náchylný kontaminaci, proto se potraviny před zmrazením často uvádí do stavu určeného k přímé spotřebě [44,45].

Průběh zmrazování je závislý na složení dané potravin, zejména na obsahu vody a na koncentraci rozpuštěných látek, které ovlivňují hodnotu bodu mrazu potravin, jež je často nižší než  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  [46]. Jak proces zmrazování, tak jakost ovoce po rozmrznutí jsou ovlivněny skupenskou přeměnou vody na led [45]. Celý proces krystalizace ledu se dělí na dvě fáze, kterými jsou nukleace krystalizačních jader a samotný růst krystalů. Průběh nukleace je přímo závislý na rychlosti zmrazování, kdy při velmi rychlém zmrazování vzniká velký počet krystalizačních jader malých rozměrů. Se zpomalujícím se zmrazováním dochází k migraci molekul vody k již existujícím jádrům a počet vznikajících jader se tak snižuje [46]. Druhou fází krystalizačního procesu je růst krystalů, který závisí na stupni podchlazení a na rychlosti odnímání krystalizačního tepla. Předpokládá se, že větší teplotní rozdíl mezi povrchem krystalu a okolím je příčinou rychlejšího růstu krystalů [45].

V důsledku vymrzání vody, dochází v potravině k zvyšování koncentrace rozpuštěných látek, což vede ke změnám aktivity vody, pH, viskozity, povrchového napětí a redoxního potenciálu [46].

Ovoce se zmrazuje volně nebo předem ošetřené cukerným roztokem. Cukerný roztok po proniknutí do pletiv zvyšuje osmotický tlak v mezibuněčném prostoru, čímž dochází k vyrovnání podmínek pro vznik ledu v buňkách i mimo ně. Snižuje se tedy riziko poškození pletiv tvorbou velkých krystalů ledu [44]. Velké krystaly ledu vytahují vodu z buněk a zhoršují tak hydrataci původních struktur během procesu rozmrazování. Jsou také příčinou mechanického poškození pletiv, díky němuž dochází ke kontaktu enzymů se substráty. Již během zmrazování se tak mohou projevovat enzymové změny, jako jsou změny textury, změny nutriční hodnoty, degradace kyseliny askorbové, enzymové hnědnutí či oxidace nenasyčených mastných kyselin doprovázené vznikem tzv. mraziřenských příchů [46].

Enzymové reakce pomalu probíhají i během mraziřenského skladování, naplno se rozbíhají až během rozmrazování a po něm. Během skladování dochází také ke změnám chemickým, kdy u dlouhodobě mraziřensky skladovaných potravin dochází k degradaci barviv (např. anthokyanů), k autooxidaci tuků, k ztrátám vitamínů i nutriční kvality. Na kvalitu produktu má vliv také proces rozmrazování, při kterém je nutné minimalizovat ztráty šťávy a maximalizovat hydrataci původních struktur. Z tohoto důvodu se preferuje co nejpomalejší rozmrazování [46].

### 2.2.2 Sušení

Sušení je anabiotická metoda konzervace potravin fyzikálně-chemickou úpravou [45]. Principem metody je snížení aktivity vody a zvýšení osmotické tlaku ve zbylém kapalném podílu potraviny (tzv. osmoanabiosa). V důsledku sušení dochází ke zpomalení či úplnému zastavení metabolismu přítomných mikroorganismů, výrazně se také zpomalují enzymové a chemické reakce, které jinak snižují výživovou hodnotu potraviny. Sušené potraviny je nutné chránit před zvlhnutím, a to buď podmínkami skladování či zabalením do obalů nepropustných jak pro vlhkost, tak pro kyslík [44,45].

Sušení je proces, při kterém je k sušenému materiálu přiváděno teplo za současného odvodu vlhkosti. Teplo, které je k potravine přiváděno pomocí předehřátého vzduchu, vyhřívaného povrchu, mikrovlnné energie či energie radiových vln, se spotřebovává na skupenskou přeměnu vody na vodní páru, která je následně odváděna pomocí sušícího média (např. vzduch či přehřátá pára) [45,46]. Proces sušení lze rozdělit do dvou fází, a to na fázi konstantní rychlosti sušení a následující fázi klesající rychlosti sušení. V první fázi sušení rychlost odvádění vodní páry z povrchu potraviny odpovídá rychlosti přesunu vody k povrchu, který zůstává během celé této fáze vlhký. Po dosažení kritického obsahu vody dochází k pozvolnému poklesu rychlosti sušení, a to až do dosažení rovnováhy vlhkosti sušeného materiálu s vlhkostí sušícího média, kdy je rychlost sušení nulová [46].

Proces sušení je uskutečňován v tzv. sušárnách, jež jsou dostupné v nejrůznějších konstrukcích. Konstruovány jsou především s ohledem na optimalizaci spotřeby energie, která je majoritní složkou nákladů na celý sušící proces [46].

Sušené ovoce musí být vysoké kvality, dostatečně vyzrálé a vybarvené, také musí mít dostatečně pevné pletivo a optimálně vysoký obsah sušiny. Za cílem inhibovat oxidační enzymy, odbarvit nepolymerovaná barviva a usnadnit proces sušení bývá ovoce před sušením často ošetřováno sířením či antioxidačním máčením v 1% roztoku kyseliny citronové [44].

Během procesu sušení je nutné minimalizovat ztráty termolabilních látek a maximalizovat zachování schopnosti rehydratace, což je schopnost materiálu zpětně navázat vodu a pokud možno získat vzhled, vůni a chuť blízkou čerstvému materiálu [44]. Schopnost rehydratace může být narušena v důsledku aplikace příliš vysoké teploty, která způsobuje ireverzibilní denaturaci hydrokoloidů. Ovoce je obvykle sušeno při teplotách 60–90 °C. Jelikož obsahuje množství osmoaktivních látek, zejména cukrů, je sušeno na zbytkovou vlhkost 15–20 % [44,45]. V důsledku sušení ovoce často tmavne, mění se jeho vůně a chuť, a snižuje nutriční hodnota. Optimalizací sušicího procesu je snaha tyto změny minimalizovat [46].

### 2.2.3 Lyofilizace

Sublimační sušení neboli lyofilizace či kryosikace je konzervační metoda založená na principech anabiózy [47]. Jedná se o speciální metodu sušení, která k odstranění vlhkosti ze sušeného materiálu využívá mrazení a sušení za sníženého tlaku. Lyofilizační proces zahrnuje tři fáze, a to zmrazení, primární sušení a sekundární sušení [46,47].

Materiál určený k lyofilizaci musí být vysoké kvality s vysokým obsahem sušiny a nízkým obsahem tuků a vázané vody. Ke správnému průběhu lyofilizačního procesu je nutné, aby materiál měl co nejvyšší poměr povrchu ke svému objemu, a to z důvodu rychlejšího postupu sublimace z povrchu směrem ke středu. Před začátkem procesu lyofilizace mohou v závislosti na povaze materiálu proběhnout předběžné úpravy, jako je drcení, sekání, krájení, mletí, vaření, blanšírování či přidávek látek za účelem ochrany nebo získání požadovaných vlastností [47].

V první fázi je sušená potravina rychle zmrazena tak, aby vznikající krystalky ledu co nejméně poškodily její strukturu [46]. Vedle mechanického poškození může během zmrazování docházet také k poškození chemickému, které bývá způsobeno koncentrováním rozpuštěných látek v důsledku vymrazování vody. Toto poškození lze taktéž eliminovat vysokou rychlostí zmrazování [47]. Konečné teploty zmrazeného materiálu musí být dostatečně nízké tak, aby došlo k vymrazení veškeré vody v potravíně (dle doporučení -60 °C až -20 °C) [46,47].

Druhou fází lyofilizačního procesu je tzv. primární sušení neboli sublimace, při kterém je z potraviny odstraňována voda zmrzlá v led [46,47]. Obvykle se jedná o nejdelší fázi celého procesu, jenž trvá několik hodin až dní. Vzhledem k energetické náročnosti sušení má délka této fáze přímé dopady na konečnou cenu daného produktu [47,48]. Hluboce zmrazená potravina je umístěna do sušárny, v níž je udržován tlak nižší než tlak vodní páry na povrchu ledu při dané teplotě [46,48]. Za těchto podmínek při dodání množství tepla dochází k sublimaci ledu, tedy ke změně skupenství z pevného na plynné bez tání na kapalinu. Vznikající vodní pára je nepřetržitě odváděna ze sušárny do výparníku, kde kondenzuje [46,47]. Sublimace začíná na povrchu sušené potraviny a postupuje až do jejího středu [46]. Po odstranění veškeré zmrzlé vody produkt stále obsahuje vodu v kapalné formě, jejíž obsah činí přibližně 10–30 % [47,48].

Třetí fází lyofilizačního procesu je tzv. sekundární sušení neboli desorpce, při kterém je z potraviny odstraňováno zbylé množství kapalné vody vázané adsorpcí na pevných látkách. Pro odstranění vázané vody se v lyofilizační komoře ještě více sníží tlak a zvýší se teplota [47]. Rychlost desorpce je přímo závislá na rychlosti difuze vody k povrchu materiálu [48], délka procesu se pohybuje v rozmezí 1–6 hodin [47]. V závislosti na typu produktu je konečný obsah vody v materiálu přibližně 2–6 % [46,47].



V závislosti na potravině a parametrech lyofilizačního procesu dochází ke zmenšení objemu materiálu přibližně o 2–10 % a snížení hmotnosti o 50–90 % v porovnání s čerstvým materiálem. V případě, že je lyofilizační proces proveden správně, potravina si zachovává schopnost rehydratace a nedochází v ní k výrazným změnám barvy, textury, chuti a vůně ani ke změnám nutriční hodnoty, obsahu vlákniny či antioxidantů. Dochází pouze k mírným ztrátám vitamínů. Výsledný produkt je vysoké kvality s dobou trvanlivosti 1–5 let (v případě správného skladování při teplotách do 30 °C v utěsněných obalech nepropustných pro tuky, plyny a vodní páry) [47].

## 2.3 Nutraceutika

Termín nutraceutika (angl. nutraceuticals) vznikl v roce 1989, kdy jej vytvořil Stephen L. Defelice z anglických výrazů „nutrition” a „pharmaceutical“. Ten nutraceutika definoval jako: *„potravinu nebo její části, které mají lékařské nebo zdravotní účinky, včetně prevence či léčby nemocí.“* Vzhledem k definovaným fyziologickým účinkům, se nutraceutika nachází na pomezí potravin a léčiv. Obecně jsou nutraceutika definována jako produkt vyrobený ze složek potravin, který se konzumuje v jednotkových dávkách ve formě tablet, kapslí či tekutiny [49].

### 2.3.1 Doplnky stravy

Dle zákona č. 110/1997 Sb. ze dne 24. dubna 1997 o potravinách a tabákových výrobcích, se doplňkem stravy rozumí: *„potravina, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu a která je koncentrovaným zdrojem vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravině samostatně nebo v kombinaci, určená k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích“* [1].

Na základě zákona č. 110/1997 Sb. je provozovatel potravinářského podniku (PPP) mimo jiné povinen *„dodržovat požadavky na složení doplňků stravy, jejich označování a způsob použití“* [1]. Tyto požadavky se upravují vyhláškou č. 58/2018 Sb. ze dne 29. března 2018 o doplňcích stravy a složení potravin [50]. Vitaminy a minerální látky a jejich formy, které lze použít pro výrobu doplňků stravy, jsou stanoveny v přílohách č. I a II nařízení Komise (ES) č. 1170/2009 [51].

Potraviny určené pro zvláštní výživu a doplňky stravy lze na trh uvádět pouze balené, přičemž obaly musí výrobek chránit před znehodnocením a splňovat požadavky [1] jak nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1935/2004 o materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami [52], tak vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 38/2001 Sb. o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmů [53]. Kromě požadavků na označování balených potravin, které jsou stanoveny nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům [54], a požadavků upravených v zákoně č. 110/1997 Sb. [1] se na obalu pro spotřebitele musí uvést: *„v názvu potraviny slova „doplňěk stravy“, název vitaminů, minerálních látek nebo dalších látek charakterizujících výrobek, číselný údaj o množství vitaminů, minerálních látek nebo jiných látek s výživovým nebo fyziologickým účinkem vztahovaný na doporučenou denní dávku, údaje o obsahu vitaminů a minerálních látek i v procentech referenční hodnoty příjmu, doporučené denní dávkování, varování před překročením doporučeného denního dávkování,*

*upozornění, aby byly výrobky uloženy mimo dosah dětí, upozornění, že doplňky stravy nejsou náhradou pestré stravy, upozornění „Nevhodné pro těhotné ženy“ u doplňků stravy obsahujících více než 800 µg (RE) vitamínu A v denní dávce, upozornění „Může snižovat srážlivost krve“ u doplňků stravy obsahujících rostlinu Ginkgo biloba (jinan dvoualocný), upozornění na nutnost přerušení konzumace a vyhledání lékaře při jakémkoliv podezření na jaterní onemocnění u doplňků stravy obsahujících rostlinu Cimicifuga racemosa (ploštičnik hroznovitý) nebo její extrakty a upozornění na nevhodnost pro děti, mládež, těhotné a kojící ženy, dále pro osoby užívající hypolipidemika a osoby s onemocněním ledvin, jater a se svalovými poruchami u doplňků stravy s obsahem monakolinu K.“ Označování nesmí doplňkům stravy přisuzovat vlastnosti týkající se prevence, léčby nebo vyléčení lidských onemocnění nebo na tyto vlastnosti odkazovat, nesmí ani obsahovat žádná tvrzení uvádějící či naznačující, že vyvážená a pestrá strava obecně nemůže poskytnout dostatečné množství živin [50]. Podmínky pro uvádění výživových a zdravotních tvrzení upravuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin [55].*

Dle §4 vyhlášky č. 58/2018 Sb. se doplňky stravy užívají v malých odměřených množstvích ve formě tobolek, pastilek, tablet, pilulek, sypek, kapalin v ampulích, v lahvičkách s kapátkem, sypekých či kapalných výrobků a v jiných obdobných formách, a takto se uvádějí na trh [50].




Zákon č. 110/1997 Sb. provozovateli potravinářského podniku, který vyrábí nebo uvádí na trh potravinu, do níž byly přidány vitaminy, minerální látky nebo další látky s nutričním nebo fyziologickým účinkem uvedené v nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1925/2006 [56], nebo doplněk stravy, ukládá povinnost oznámit toto uvedení na trh příslušnému ministerstvu [1].






V případě, že PPP nedodrží některou z povinností uložených tímto zákonem, dopouští se přestupku, za který lze uložit pokutu dle zákona č. 174/2021 Sb., a to až do maximální výše 50 000 000 Kč dle spáchaného přestupku [1,57].

### **Vybrané doplňky stravy dostupné na českém trhu**

Na českém trhu je k dispozici řada doplňků stravy různých forem s rozmanitými účinky na lidský organismus. Stále se rozrůstající nabídka jde ruku v ruce s rostoucí poptávkou, kdy i pandemie virového onemocnění COVID-19 přispěla k popularitě doplňků stravy u spotřebitelů. Z široké nabídky doplňků stravy bylo vybráno 10 produktů, které jsou zdrojem vitaminů, minerálních látek či obsahují rostlinné extrakty (viz tabulka 6). Převážně se jedná o doplňky stravy ve formě želé bonbónů, jež se v poslední době setkávají se vzrůstající oblibou nejen u dětí. U každého doplňku stravy je uveden jeho název, značka, forma, výčet aktivních složek včetně jejich obsahu a fotografie balení (viz obrázek 2–11) [58–67].

Tabulka 6: Vybrané doplňky stravy dostupné na českém trhu [58–67].

	<b>název produktu</b>	<b>značka produktu</b>	<b>aktivní složky</b>
 <p>Obrázek 2: Spektrum Gummies Imunita [58].</p>	Spektrum Gummies Imunita	Walmark	2 želatinové tablety: vitamin A (800 µg), D3 (5 µg), E (12 mg), C (80 mg), B1 (1,1 mg), B3 (16 mg), B6 (1,4 mg), B12 (2,5 µg), biotin (50 µg), kyselina pantotenová (6 mg), kyselina listová (200 µg), mangan (2 mg), jód (150 µg), selen (55 µg), zinek (10 mg)
 <p>Obrázek 3: Maxi Vita Kids Multivitamin želé [59].</p>	Multivitamin želé	Maxi Vita Kids	2 želatinové tablety: vitamin C (80 mg), E (12 mg), B6 (1,4 mg), B12 (2,5 µg), D3 (5 µg), biotin (50 µg), nikotinamid (16 mg), kyselina listová (200 µg), kyselina pantotenová (6 mg), jod (150 µg), zinek (10 mg) a extrakt ze šípku (20 mg)
 <p>Obrázek 4: Bears with Benefits Hair Vitamins [60].</p>	Ah-mazing Hair Vitamins mit Biotin sugarfree	Bears With Benefits	1 tableta z modifikovaného škrobu: vitamin A (315 µg), E (5,5 mg), C (11,6 mg), B6 (1 mg), biotin (5 µg), kyselina pantotenová (2,6 mg), kyselina listová (130 µg), zinek (1,45 mg), jód (130 µg)
 <p>Obrázek 5: Sambucus Immuno Kids [61].</p>	Immuno Kids	Sambucus	2 želatinové tablety: vitamin C (32 mg), zinek (4 mg), extrakt z plodů černého bezu (100 mg)
 <p>Obrázek 6: VENIRA vlasy, nehty, pleť [62].</p>	vlasy, nehty, pleť gumoví medvídci	VENIRA	2 želatinové tablety: vitamin A (600 µg), D3 (10 µg), E (12 mg), C (30,3 mg), B6 (3 mg), B12 (6 µg), biotin (300 µg), kyselina pantotenová (7 mg), kyselina listová (400 µg), zinek (5,2 mg), selen (30 µg), kolagen (4 mg), cholin (80 µg), inositol (80 µg)

	<b>název produktu</b>	<b>značka produktu</b>	<b>aktivní složky</b>
 <p>Obrázek 7: TEREZIA Rakytňiček [63].</p>	Rakytňiček Multivitaminové želatinky s rakytňičkem	TEREZIA	2 želatinové tablety: sušená rakytňíková šťáva (240 mg), vitamin C (1920 µg), E (288 µg), B6 (33,6 µg), B2 (33,6 µg), B1 (26,4 µg), B12 (0,06 µg), biotin (1,2 µg), kyselina listová (4,8 µg), kyselina pantotenová (144 µg)
 <p>Obrázek 8: NUVI HEALTH Vitamin C komplex [64].</p>	Vitamin C komplex	NUVI HEALTH	2 celulókové kapsle: extrakt z aceroly (1294 mg) z toho vitamin C (220 mg), extrakt ze šípku (400 mg) z toho vitamin C (180 mg)
 <p>Obrázek 9: Zdravý den Camu Camu BIO [65].</p>	Camu Camu BIO	Zdravý den	2 celulókové kapsle: prášek camu camu (732 mg) z toho vitamin C (43,3 mg)
 <p>Obrázek 10: GOLDEN NATURE Acai Berry [66].</p>	Acai Berry	GOLDEN NATURE	2 želatinové kapsle: extrakt z Acai berry (1 g)
 <p>Obrázek 11: FutuNatura African mango [67].</p>	African mango	FutuNatura	2 želatinové kapsle: extrakt ze semen afrického manga (800 mg) z toho flavony (80 mg)

## 2.4 Nečokoládové cukrovinky

Dle §11 vyhlášky č. 76/2003 Sb. ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbóny, se cukrovinkami rozumí: „*potraviný jiné než čokolády a čokoládové bonbóny, jejichž základní složku tvoří přírodní sladidla a další složky, jimiž mohou být i kakaové součásti nebo čokoláda, a které nesplňují požadavky na čokoládu nebo čokoládové bonbony podle §19.*“ Součástí této vyhlášky je rovněž členění cukrovinek do skupin a podskupin, které jsou podrobně definovány (viz tabulka 7) [68].

Tabulka 7: Členění cukrovinek na skupiny a podskupiny dle vyhlášky č. 76/2003 Sb. včetně definic [68].

druh	skupina	definice skupiny	podskupina	
cukrovinky	karamely	cukrovinky tvárné konzistence, do určité míry žvýkavé, s různou příchutí	tukové s jádrovinami, s ovocnou příchutí, mléčné, kakaové nebo kávové, podle druhu vložky (cukrová, želé, jádroviny, sušené ovoce nebo proslazené, marcipán a další)	
	dražé	cukrovinky tužší až tvrdé konzistence s různými vložkami, s náblem zejména cukru		
	želé	cukrovinky s konzistencí gelu vzniklou přidáním želírujících látek, zejména pektinu, agaru, škrobu nebo želatiny		
	rahat	škrobové želé různých tvarů obalených směsí práškového cukru a škrobu		
	chalva	šlehaná kandytová hmota s pěnотvornou látkou pastovité konzistence, popřípadě s přidáním suchých skořápkových plodů a tuku		
	turecký med	šlehaný cukrosirupový roztok s bílkem, popřípadě s přidáním suchých skořápkových plodů		
	lékořicové cukrovinky	cukrovinky ze směsi cukru, glukózového sirupu a mouky, popřípadě dalších surovin, jejichž charakteristickou složku tvoří výtažek z lékořice		
	pěnové cukrovinky (marshmallow)	cukrovinky lehčené, pěnovité, žvýkavé konzistence, popřípadě s jemnými částicemi směsi práškového cukru nebo škrobu anebo jejich kombinací		
	komprimáty	cukrovinky vyráběné lisováním ochucených a obarvených práškovitých směsí, zejména ve tvaru čoček nebo tablet		
	žvýkačky	cukrovinka výrazně gumovité až tažné konzistence s různými příchutěmi		balónkové (bubble gum); plátkové; dražované
	dropsy	cukrovinky neplněné, z kandytové hmoty, složené převážně z cukrů a glukózového sirupu, různě tvarované, různé barvy a chuti, tvrdé konzistence		

druh	skupina	definice skupiny	podskupina
cukrovinky	roksy	cukrovinky tvrdé konzistence podobné dropsům, ve tvaru špalíčků, tyčinek nebo lízátek, které mohou mít na průřezu barevné obrazce z ochucených kandytových hmot	
	furé	cukrovinky z kandytové hmoty, na povrchu matné, sklovité, tvrdé konzistence obsahující uvnitř minimálně 13 % polotuhé nebo tekuté náplně	s tukovou náplní; s cukernou (sirupovou) náplní
	marcipán	cukrovinky polotuhé konzistence, různých tvarů vyrobené z nejméně 1 dílu surové marcipánové hmoty (sestavující nejméně z 50 % loupaných mandlí a nejvýše 50 % cukru) a nejvýše 1 dílu cukrové moučky, popřípadě přibarvené, upravené na povrchu sypáním, zdobením či polevou	
	fondánové cukrovinky	cukrovinky polotuhé až tuhé konzistence z cukerné hmoty, popřípadě s přidavkem dalších látek s jemnou krystalickou strukturou	

Nečokoládové cukrovinky se z pohledu technologie výroby dělí na dvě velké skupiny, a to na cukrovinky s nevykrytalizovanými cukry, mezi které patří želé, kandyty (tj. dropsy, roksy, furé), karamely, gumovité cukrovinky, žvýkáci gumy či šlehané cukrovinky (např. francouzský nugát a marshmallow), a cukrovinky s vykrytalizovanými cukry, mezi které patří komprimáty, turecký med, rahat, chalva, marcipán nebo fondánové cukrovinky [69,70].

#### 2.4.1 Želé cukrovinky

Dle §11 vyhlášky č. 76/2003 Sb. ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbóny, se želé cukrovinkami rozumí: „*cukrovinky s konzistencí gelu vzniklou přidavkem želírujících látek, zejména pektinu, agaru, škrobu nebo želatiny*“ [68]. Vyrábí se ze sacharózy, glukózového sirupu a želírující látky, která je schopna za daných podmínek vytvářet souvislou prostorovou síť a tím pevný a chuťově jemný gel. Želírující schopnost rosolotvorné látky je obvykle závislá na řadě faktorů, jako je koncentrace sacharózy, teplota či hodnota pH cukrosirupového roztoku. Podle použité rosolotvorné látky je rozlišováno želé pektinové, agarové, škrobové a želatinové [69,70].

Želatinové želé se vyrábí z cukrosirupového roztoku, který se připravuje smísením sacharózy a glukózového sirupu v poměru 2:1 až 1:1, a roztoku želatiny. Po odpaření cukrosirupového roztoku při teplotě 113–121 °C a jeho ochlazení na teplotu 100 °C se tento roztok pozvolna přilévá k roztoku želatiny, tak aby nedošlo k výraznému ohřátí želatinového roztoku. Želírující schopnost želatiny je značně závislá na hodnotě pH, která je dána jejím izoelektrickým bodem. Optimální oblastí je pH 3,8–4,0. Při pH 4,5–5,5 je nutné roztok okyselit. K okyselení se nejčastěji používá kyselina citronová či kyselina askorbová. Želé se tvaruje převážně litím forem [69,70].



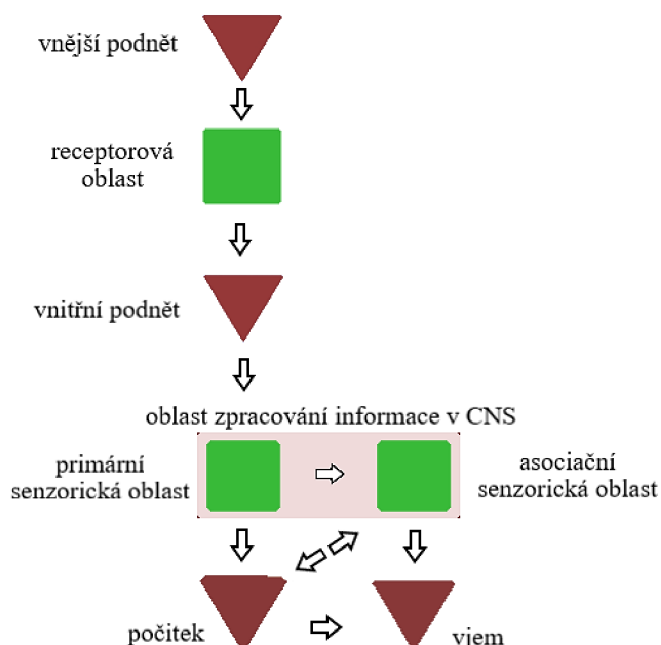
## 2.5 Senzorická analýza

Senzorická analýza (angl. sensory analysis) je věda zabývající se hodnocením organoleptických vlastností vzorků potravin výhradně lidskými smysly (tj. zrak, čich, chuť, hmat a sluch) včetně zpracování výsledků centrálním nervovým systémem. Jedná se o poměrně mladý vědecký obor, který využívá poznatků z psychologie, sociologie, fyziologie a biologie, v menší míře také z chemie a biochemie. Dnes je sensorická analýza považována za objektivní metodu stojící na vědeckém základu, jejíž objektivnost a přesnost je srovnatelná s analýzou fyzikální, chemickou i mikrobiologickou [71,72].

V dnešní době zastává sensorické hodnocení potravin významnou roli, neboť sensorická jakost je součástí celkové jakosti výrobku a současně jedinou stránkou jakosti, kterou hodnotí sám spotřebitel. Spotřebitelé předpokládají splnění výživové i hygienické jakosti za samozřejmé, a tak je sensorická jakost velmi důležitým parametrem při uvádění výrobků na trh, kde panuje silný konkurenční boj mezi výrobci [71,72].

### 2.5.1 Smyslové vnímání

Princip smyslového vnímání je u člověka založený na třech hlavních částech smyslových orgánů, kterými jsou receptor, dostředivý (centripetální) nerv a centrální nervová soustava (CNS). Receptor je drážděn vnějšími, příp. vnitřními podněty, v důsledku čehož vzniká vzruch, což je zpravidla tok iontů. Vzruch je v receptoru často zesílen a následně veden aferentními nervovými vlákny do centrální nervové soustavy. Zde je nervový vzruch zpracován nejprve v primární sensorické oblasti, následně v asociační sensorické oblasti na komplexní vjem [71]. Schéma smyslového vnímání je znázorněno níže na obrázku 12.



Obrázek 12: Schéma smyslového vnímání [71].

### 2.5.2 Podmínky sensorické analýzy

Podmínky a průběh sensorického hodnocení jsou řízeny českými i mezinárodními normami, dle kterých musí analýza probíhat za takových podmínek, aby bylo zajištěno objektivní, přesné a reprodukovatelné měření [72]. Neobjektivnějších a nejpřesnějších výsledků je dosaženo v případě dodržení tzv. optimálních podmínek (tabulka 8), při nichž jsou maximálně eliminovány rušivé vlivy. Optimálních podmínek bývá nejčastěji dosaženo v sensorických laboratořích, které jsou sensorickému hodnocení speciálně uzpůsobeny a splňují předepsaná nařízení a normy (např. ČSN EN ISO 8589) [71].

Tabulka 8: Optimální podmínky pro sensorickou analýzu [71].

optimalizovaný faktor	optimální podmínky pro hodnocení
hladina zvuku	kolem 40 dB, izolace dveří a oken
teplota	21–23 °C, nejlépe klimatizace
vlhkost vzduchu	40–70 %, v zimě vlhčení
pohyb vzduchu	poznatelný pouze o přestávkách, jinak klid
pachy	ochrana před pachy ventilací, pachovými filtry a nátěry neabsorbujícími pachy
zrakové vjemy	světlo šedá nebo bílá barva, bez výzdoby
kontakt s lidmi	příhrady mezi hodnotiteli, kóje

Příprava a předkládání vzorků hodnotitelům podléhá řadě pokynů. Základem je dodržení hygienických předpisů pro zdravotní nezávadnost [71]. Zcela nezbytné je zachování anonymity vzorků, což je obvykle zajištěno přípravou vzorků v místnosti oddělené od zkušební místnosti a kódovým značením vzorků [71,73]. Důležitá je také tzv. randomizace vzorků, kdy jsou vzorky předkládány v náhodném pořadí [71]. Vzorky musí být předkládány ve stejném a dostatečném množství (obvykle 15–20 ml tekutého a 8–10 g tuhého vzorku) ve stejných nádobách, které splňují tzv. sensorickou neutralitu a odpovídají běžnému servírování [71,73]. Za sensoricky neutrální je považováno například čiré nebroušené sklo bez potisku, bílá keramika bez potisku a nerezavějící ocel [73]. Taktéž je třeba zajistit, aby měl vzorek předepsanou teplotu [71]. Hodnotitel musí mít k dispozici chuťový neutralizátor (např. voda, bílé pečivo, chléb apod.). Mezi delšími hodnoceními musí být zajištěny přestávky [73].

### 2.5.3 Hodnotitelé

Sensorická hodnocení jsou vykonávána skupinou hodnotitelů, též označovaných jako tzv. sensorický panel. Pro dosažení objektivních výsledků je nutné, aby sensorický panel disponoval dostatečným počtem způsobilých hodnotitelů. Způsobilost hodnotitelů je posuzována podle vybraných kritérií, mezi které patří například věk, zdravotní stav, motivace, dostupnost či vztah k dané potravíně. Potřebná úroveň hodnotitelů (viz tabulka 9) je pak dána charakterem dané analýzy [71,74].

Tabulka 9: Stupeň kvalifikace hodnotitelů pro různé úkoly sensorické analýzy [71].

úkol	potřebná kvalifikace
konzumentské zkoušky	žádná kvalifikace
stanovení preferencí	základní zacvičení
rozdílové zkoušky, srovnání se standardy	základní zacvičení nebo školení hodnotitelé
sensorické profily	školení hodnotitelé
vypracování vhodné sensorické metody	metodičtí experti
posouzení sensorické jakosti	komoditní experti
výchova a školení expertů	metodičtí experti

#### 2.5.4 Metody sensorické analýzy

V sensorické analýze existuje množství metod a postupů, které umožňují získat požadované informace o vlastnostech vzorku. Výběr vhodné metody závisí na řadě faktorů, jako je charakter řešeného úkolu, počet a typ hodnocených vzorků, počet a kvalita hodnotitelů, čas, prostředí, potřebná statistická spolehlivost a další [71–74].

Většina laboratorních metod sensorické analýzy je již normalizována v mezinárodním nebo alespoň v národním měřítku. Běžně používané metody (viz tabulka 10) lze rozdělit do tří skupin, a to na metody diskriminační, deskriptivní a metody využívající stupnice [71,72].

Tabulka 10: Přehled nejběžnějších metod laboratorní sensorické analýzy [71].

úkol	vhodné metody
stanovení existence rozdílů mezi vzorky	rozdílové zkoušky
stanovení velikosti rozdílu	rozdílové zkoušky; stupnicové metody
stanovení preferencí	rozdílové zkoušky; stupnicové metody
srovnání několika vzorků	pořadové zkoušky (preferenční/ intenzitní)
stanovení absolutní přijatelnosti a intenzity	stupnicové metody; zředovací metody; srovnání se stupnicí
stanovení charakteru vjemu	metody sensorického profilu; metody volného popisu srovnání se sadou standardů

#### A) Diskriminační (rozdílové) metody

Rozdílové zkoušky umožňují stanovit, zda existují vnímatelné rozdíly v organoleptických vlastnostech nebo v sensorické jakosti mezi dvěma, případně více testovanými vzorky. Pro rozdílové zkoušky je obvykle potřeba přibližně 10 až 30 hodnotitelů. Mezi nejčastěji využívané rozdílové zkoušky patří: párová porovnávací zkouška, zkouška duo-trio, trojúhelníková zkouška či jednostimulová zkouška „A“ – „ne A“ [71–73].

#### **a) Párová porovnávací zkouška**

Párová porovnávací zkouška je nejjednodušší klasifikační zkouškou, jejíž uspořádání a průběh je řízen normou ČSN EN ISO 5495. Vzhledem k jednoduchosti je tato zkouška vhodná pro všechny typy hodnotitelů, i pro spotřebitelské zkoušky. Slouží k určení, zda mezi dvěma vzorky „A“ a „B“ existuje vnímatelný rozdíl, příp. podobnost. Hodnotitel může vzorky porovnávat také z pohledu preference, kdy ze dvou vzorků vybírá ten lepší. Jelikož se jedná o zkoušku s tzv. nucenou volbou, musí hodnotitel označit jeden ze vzorků, přestože mezi vzorky rozdíl nerozpozná [72,73].

#### **b) Zkouška duo-trio**

Zkouška duo-trio je jednoduchá klasifikační zkouška, jejíž uspořádání a průběh je řízen normou ČSN EN ISO 10399. Posuzovatel obdrží sadu tří vzorků, z nichž je jeden označen jako referenční a dva jsou kódované. Úlohou hodnotitele je ze dvou neznámých vzorků označit ten, který je shodný se standardem. U zkoušky se uplatňuje nucená volba. Metoda je vhodná pro stanovení malých rozdílů mezi zkoumaným a referenčním vzorkem [72,73].

#### **c) Trojúhelníková zkouška**

Trojúhelníková zkouška je náročnější zkouškou vyžadující zkušenější hodnotitele. Její průběh a uspořádání je řízen normou ČSN EN ISO 4120. Hodnotitel obdrží sadu tří zakódovaných vzorků, z nichž jsou dva shodné a jeden je rozdílný. Úlohou hodnotitele je ze vzorků vybrat ten, který je od ostatních rozdílný, a to i v případě, že je výběr učiněn pouze na základě odhadu, neboť se jedná o zkoušku s nucenou volbou. Metoda je použitelná pro vzorky mezi nimiž existuje rozdíl v jedné či několika vlastnostech [72,73].

#### **d) Jednostimulová zkouška „A“ – „ne A“**

Průběh a uspořádání zkoušky „A“ – „ne A“ je řízen normou ČSN ISO 8588. Posuzovateli je předložen vzorek „A“ představující standard. Po jeho odebrání je hodnotiteli předkládána série vzorků, u nichž musí stanovit, zda jsou shodné s referenčním vzorkem či nikoli. Pořadí předkládaných vzorků „A“ a „ne A“ musí být zcela náhodné a pro každého hodnotitele odlišné. Počet předkládaných vzorků „A“ a „ne A“ musí být stejný [72,73].

### **B) Pořadové metody**

Pořadové zkoušky jsou poměrně často používané metody, které umožňují hodnotit rozdíly mezi několika vzorky na základě intenzit či preferencí jednoho nebo více deskriptorů nebo na základě celkového dojmu. Zjištěné rozdíly mezi vzorky však není možné kvantifikovat. Průběh a uspořádání pořadové zkoušky je řízen normou ČSN ISO 8587. Hodnotiteli je předložena série tří a více vzorků v náhodném pořadí. Počet předkládaných vzorků se odvíjí od složitosti dané zkoušky (např. pro hodnocení chuti je předkládáno maximálně 5–6 vzorků, pro hodnocení vůně a textury 8–10 vzorků, pro hodnocení vzhledu a barvy 20–30 vzorků). Úlohou hodnotitele je vzorky uspořádat podle daného kritéria, jako je intenzita nebo příjemnost některé z vlastností vzorku (např. světlost, tuhost, sladkost, kyselost), nebo na základě celkového dojmu. Pro popisné hodnocení výrobku je doporučeno minimum 12–15 hodnotitelů. Pro stanovení pořadí preferencí u konzumentských zkoušek je minimum 60 posuzovatelů [72,73].

### C) Deskriptivní (popisné) metody

Deskriptivní metody neboli metody pro stanovení sensorického profilu výrobku podléhají normě ČSN EN ISO 13299. Sensorický profil výrobku je složen z dílčích identifikovatelných sensorických vlastností (tzv. deskriptorů) s příslušnou hodnotou intenzity. Nejrozšířenějšími sensorickými profily jsou profil chuti, vůně, textury či flavoru. Vlastnímu stanovení sensorického profilu předchází identifikace a výběr deskriptorů. Zpravidla rozsáhlý seznam deskriptorů se následně redukuje a optimalizuje. Výsledný seznam by měl obsahovat 6–12 deskriptorů pro méně zkušené hodnotitele, pro experty lze použít 10–40 deskriptorů. Pro realizaci deskriptivních zkoušek je potřeba panel 8–12 školených hodnotitelů, kteří jsou schopni kvalitativní vlastnosti výrobku kvantifikovat pomocí deskriptorů. Hodnotitel opakovaně ochutnává vzorek a stanovuje intenzity vybraných deskriptorů, které zapisuje do stupnic. Pro méně zkušené hodnotitele je vhodné použít pěti až devítibodové stupnice, pro experty lze použít grafické nestrukturované stupnice. Celkové výsledky analýzy se pak nejčastěji prezentují ve formě diagramů (např. lineární, pavučinový, hvězdicový aj.) [72,73].

#### 2.5.5 Stupnice v sensorické analýze

Mezi nejrozšířenější způsoby vyjadřování výsledků sensorického hodnocení patří kvantitativní odpovědní stupnice, přičemž jejich použití se řídí technickou normou ČSN ISO 4121 [72,73]. Stupnice slouží jako nástroj pro zaznamenání reakce hodnotitele na daný podnět, tak aby byla tato reakce převoditelná na číselnou hodnotu [72]. V tabulce 11 jsou uvedeny čtyři hlavní typy stupnic. Výběr stupnice se odvíjí od uloženého úkolu, od charakteru vzorků a od kvality hodnotitelů. Dle zvoleného typu stupnice se musí zvolit také vhodné statistické zpracování výsledků [71]. Stupnice jsou tvořeny jednotlivými stupni seřazenými dle určité posloupnosti. Podle typu zpracování se stupnice rozdělují na: numerické, slovní, dynamické, grafické a obrázkové. Dále jsou rozlišovány stupnice jednapolární, které mají neutrální, resp. nulovou, hodnotu umístěnou na jednom ze svých konců, a stupnice bipolární, které mají neutrální hodnotu umístěnou ve svém středu [72,73].

Tabulka 11: Čtyři hlavní typy odpovědních stupnic v sensorické analýze [71,72].

typ stupnice	příklady
kategorová (nominální)	ano – ne – nevím; modrá – zelená – hnědá; muž – žena;
ordinální (pořadová)	A – B – C – D; neznatelná – velmi slabá – slabá – silná
intervalová	0–100 °C; 32–212 °F
poměrová	vztažené na standard; magnitudové hodnocení

Jedny z nejpoužívanějších stupnic v sensorické analýze potravin jsou kategorové ordinální stupnice, kdy se kontinuum možných počítků rozdělí do oddělených kategorií (např. 1-nekyselý, 2-kyselý; 3-velmi kyselý). Hodnotitel vždy musí zvolit jednu z uvedených kategorií, přičemž nesmí používat žádné mezistupně [72,73]. Jednotlivé stupně by měly obsahovat slovní popis. Přípustný počet stupňů se odvíjí od kvality hodnotitelů. Pro nezaškolené hodnotitele je vhodná 2–3 bodová stupnice, pro zaškolené hodnotitele s praxí lze použít 5–7 bodovou někdy až 9 bodovou stupnici [73].



Chacón-Garza a kol. [77] provedli senzoričnou analýzu želé s obsahem šťávy z plodů červené a zelené opuncie (*Opuntia ficus indica*). Senzorický panel byl složen z 50 neškolených hodnotitelů. Cukrovinky byly hodnoceny pomocí jednoduché sedmibodové hedonické stupnice (1-nechutné, 7-velmi chutné). V rámci této analýzy byl posuzován celkový vzhled, barva, konzistence, vůně opuncie, sladkost chuti, chuť opuncie a celková přijatelnost vzorku.

Tapotubun a kol. [78] se zabývali senzoričnou charakteristikou želé cukrovinek s obsahem zelené mořské řasy lazucha (*Caulerpa*) s cílem prověřit jejich celkovou přijatelnost spotřebitelem. Senzorický panel pro konzumentskou zkoušku byl složen z 15 proškolených hodnotitelů, studentů univerzity Pattimura. Hodnocení probíhala pomocí jednoduché hedonické stupnice od 1 do 9 (1-nepřijatelné, 9-velmi žádoucí), kde byla posuzována barva, chuť, textura a pach mořské řasy lazuchy.

Vývojem zdravých želé cukrovinek z čerstvého ovoce se zabývali Ali a kol. [79], kteří připravili tři druhy želé bonbonů, jež obsahovaly jahody a červenou řepu v poměrech 3:1, 1:1 a 1:3. Bonbony s vyšším obsahem jahod byly bohatší na bioaktivní látky, avšak senzoričny přijatelnější byly bonbony obsahující jahody a červenou řepu v poměru 1:1. Senzorický panel složený z 60 neškolených hodnotitelů, studentů univerzity Cairo, posuzoval vzhled, barvu, vůni, chuť, sladkost, elasticitu, žvýkatelnost a celkovou přijatelnost cukrovinek dle devítibodové hedonické stupnice.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část této diplomové práce byla realizována na Ústavu chemie potravin a biotechnologií Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně.

#### 3.1 Chemikálie

ABTS (Sigma-Aldrich, Německo); D-glukóza bezvodá (p. a., Lach-ner, Česká republika); dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner, Česká republika); dusitan sodný (p. a., Lach-ner, Česká republika); ethanol 96% (Penta, Česká republika); ethanol absolutní (VWR Prolabo Chemicals, USA); ethanol UV-VIS 96% (Penta, Česká republika); fenolftalein (indikátor, Penta, Česká republika); Folin-Ciocalteuovo činidlo (Penta, Česká republika); hexakyno-železnatan draselný trihydrát (p. a., Lach-ner, Česká republika); hydrogenarseničnan sodný heptahydrát (p. a., Alfa Aesar, Německo); hydrogenuhlíčan sodný (p. a., Lach-ner, Česká republika); hydroxid sodný (p. a., Lach-ner, Česká republika); chlorid draselný (p. a., Lach-ner, Česká republika); chlorid hlinitý bezvodý (p. a., Lach-ner, Česká republika); chlorid sodný (p. a., Lach-ner, Česká republika); katechin hydrát (p. a., Sigma-Aldrich, Německo); kyselina L-askorbová (p. a., Sigma-Aldrich, Německo); kyselina gallová monohydrát (p. a., Loba Chemie Vídeň – Fischamend, Rakousko); kyselina chlorovodíková 37% (VWR Prolabo Chemicals, USA); kyselina metafosforečná (VWR Prolabo Chemicals, USA); kyselina octová 99,8% (p. a., Lach-ner, Česká republika); kyselina octová ledová 99,8% (p. a., Penta, Česká republika); kyselina sírová 96% (p. a., Penta, Česká republika); kyselina šťavelová dihydrát (p. a., Penta, Česká republika); molybdenan amonný tetrahydrát (p. a., Lach-ner, Česká republika); octan sodný bezvodý (p. a., Lach-ner, Česká republika); octan zinečnatý dihydrát (p. a., Penta, Česká republika); pankreatin (Sigma-Aldrich, Čína); pepsin (0,7 FIP-U/mg, Merck KGaA, Německo); peroxidisíran draselný (Sigma-Aldrich, Německo); síran měďnatý pentahydrát (p. a., Penta, Česká republika); síran sodný bezvodý (p. a., Lach-ner, Česká republika); Tashirův indikátor (indikátor, Bernd Kraft, Německo); Trolox (Sigma-Aldrich, Německo); uhlíčan sodný bezvodý (p. a., Lach-ner, Česká republika); vínan sodno-draselný tetrahydrát (p. a., Lachema, Česká republika); Wieningerův katalyzátor (VWR Prolabo Chemicals, USA).

#### 3.2 Přístroje a pomůcky

UV/VIS spektrofotometr SPEKOL 1300 (Analytik Jena GmbH, Německo); UV/VIS spektrofotometr HELIOS Delta (Thermo Spectronic, USA); analytické váhy Pioneer (OHAUS, Švýcarsko); centrifuga EBA 200S (Hettich, Německo); lyofilizátor FreeZone 4.5 (Labconco, USA); rotační vakuová odparka RV06-ML (IKA WERKE, Německo); ultrazvuková lázeň Elmasonic S30 (ELMA, Německo); inkubátor s třepačkou Unimax 1010 (HEIDOLPH, Německo); inkubátor s třepačkou Orbital Shaker-Incubator ES-20 (BioSan, Litva); automatický extraktor Soxtherm a Soxtherm Manager (Gerhardt, Německo); laminární box (Aura mini, BioAir, USA); ELISA – Synergy HTX multimode reader (BioTek, USA); mineralizační blok KJELDATHERM KT BS (Gerhardt, Německo); automatická destilační jednotka VAPODEST 200 (Gerhardt, Německo); sestava HPLC s detektorem SPD-M10AVP DAD (Shimadzu, Japonsko); sestava HPLC Dionex UltiMate 3000 s detektorem Vanquish DAD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); sestava HPLC Dionex UltiMate 3000 s detektorem DAD (Thermo Fisher Scientific, USA); laboratorní pH metr inoLab pH 720 (WTW, Česká republika); termostat Polystat cc1 (HUBER, Německo); magnetická míchačka s ohřevem MM7 (LAVAT, Česká republika); laboratorní muflová pec LE 05/11 (LAC, Česká republika); topné hnízdo LTHS 500 (Brněnská Drutěva, Česká republika); vortex REAX TOP



(HEIDOLPH, Německo); rotating blade coffee grinder TSMGAO 14R (BOSCH, Německo); nylonové filtry 0,45 µm (CHROMSERVIS Syringe Filters, Česká republika); PTFE filtry 0,45 µm (CHROMSERVIS Syringe Filters, Česká republika); laboratorní sušárna; automatické pipety a běžné laboratorní sklo.

### 3.3 Chemikálie pro přípravu kultivačních médií

Agar práškový (HiMedia Laboratories, India); glukóza monohydrát (p. a., Lach-ner, Česká republika); kvasničný extrakt práškový (HiMedia Laboratories, Indie); LB Broth (Sigma-Aldrich, Česká republika); Nutrient Broth w/1% peptone (HiMedia Laboratories, Indie); pepton (HiMedia Laboratories, Indie).

### 3.4 Použité mikroorganismy

- *Candida glabrata* (CCM 8270)
- *Escherichia coli* (CCM 5172)
- *Micrococcus luteus* (CCM 1569)

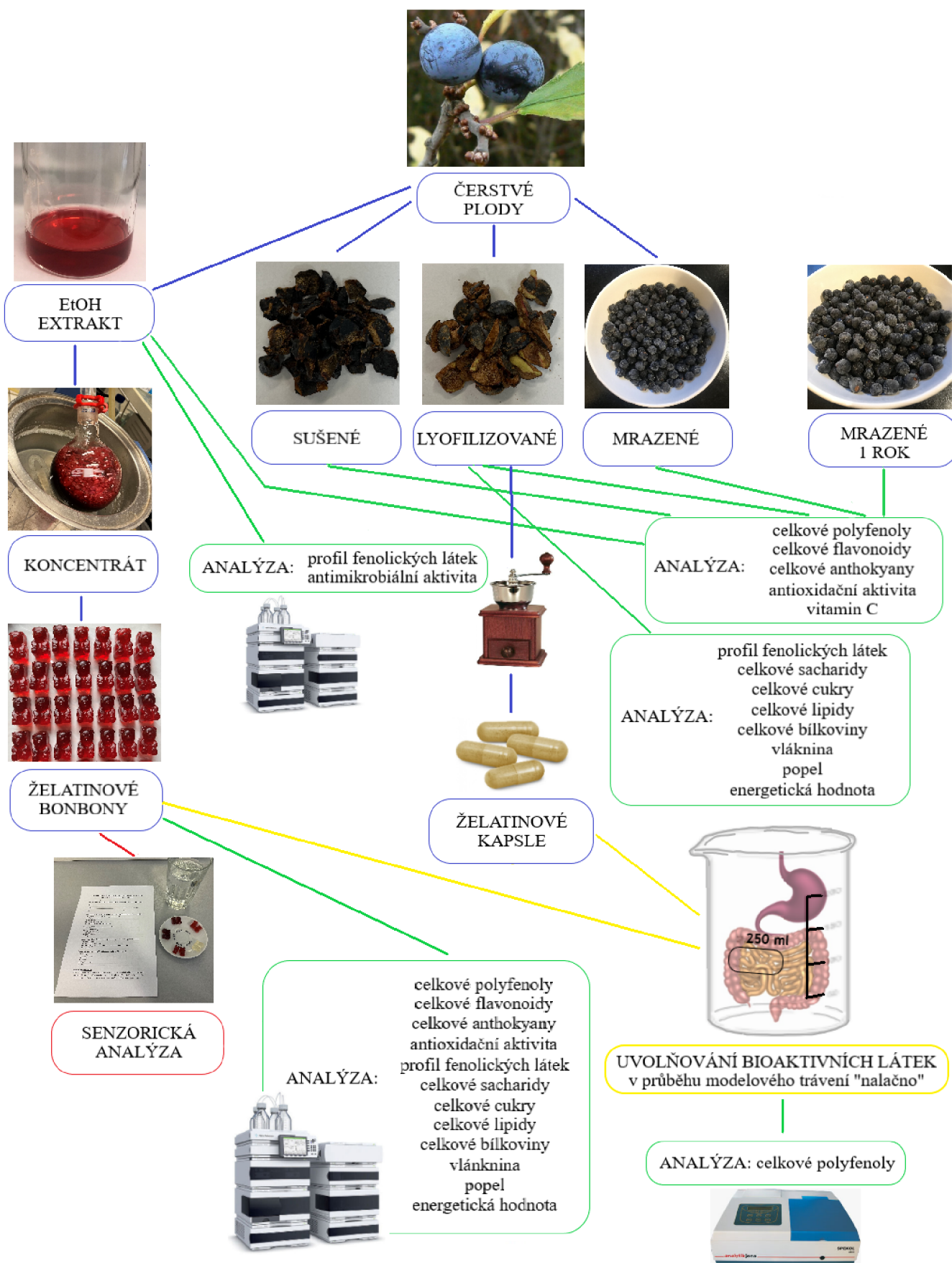
### 3.5 Suroviny pro výrobu doplňků stravy

- řepný bílý cukr krystal
- glukózový sirup Fractal
- želatina na ztužení krémů, jemně mletá, Dr. Oetker
- kyselina citronová do potravin, jemně krystalická, Dr. Oetker
- koncentrovaný extrakt z čerstvých plodů trnky obecné (*Prunus spinosa*)
- želatinové kapsle, bílé neprůhledné, velikost 000
- lyofilizovaný prášek z čerstvých plodů trnky obecné (*Prunus spinosa*)

### 3.6 Cíle práce

Prvním z cílů praktické části diplomové práce bylo studium vlivu způsobu uchování plodů *Prunus spinosa* na obsah vybraných bioaktivních látek, a to se záměrem zvolit vhodný způsob uchování plodů před jejich dalším zpracováním.

Dalším z cílů bylo připravit dva typy doplňků stravy, a to želatinové bonbóny s extraktem z plodů trnky obecné a želatinové kapsle plněné lyofilizovaným práškem, který byl připraven taktéž z plodů *Prunus spinosa*. Oba typy připravovaných doplňků stravy byly charakterizovány z pohledu nutričního složení a obsahu vybraných bioaktivních látek. Taktéž u nich byla sledována antioxidační aktivita a uvolňování vybraných bioaktivních látek v průběhu modelového trávení „nalačno“. Mimo to byly želatinové bonbony podrobeny sensorickému hodnocení, a to s cílem optimalizace přídatku trnkového extraktu s ohledem na spotřebitelskou přijatelnost. Zmíněný trnkový extrakt byl před aplikací do želatinové matrice taktéž charakterizován z hlediska obsahu vybraných bioaktivních látek, antioxidační a antimikrobiální aktivity. Pro lepší orientaci v problematice bylo vytvořeno autentické grafické schéma (viz obrázek 14).



Obrázek 14: Grafické schéma experimentální části diplomové práce.

### 3.7 Vzorky

Analyzováno bylo celkem 11 druhů vzorků z plodů trnky obecné, jejich kompletní seznam je uveden v tabulce 12. První sběr plodů *Prunus spinosa* se uskutečnil koncem října 2021 v okrajové části města Kroměříž, poblíž toku řeky Moravy. Po očištění byly tyto plody zmrazeny a uchovávány při teplotě -18 °C po dobu přibližně 1 roku. Další sběr plodů trnky obecné proběhl v Otrokovicích, a to v polovině října 2022. Plody byly očištěny a uchovávány při teplotě cca 4 °C po dobu 3–5 dní do dalšího zpracování.

Tabulka 12: Seznam použitých vzorků z plodů *Prunus spinosa*.

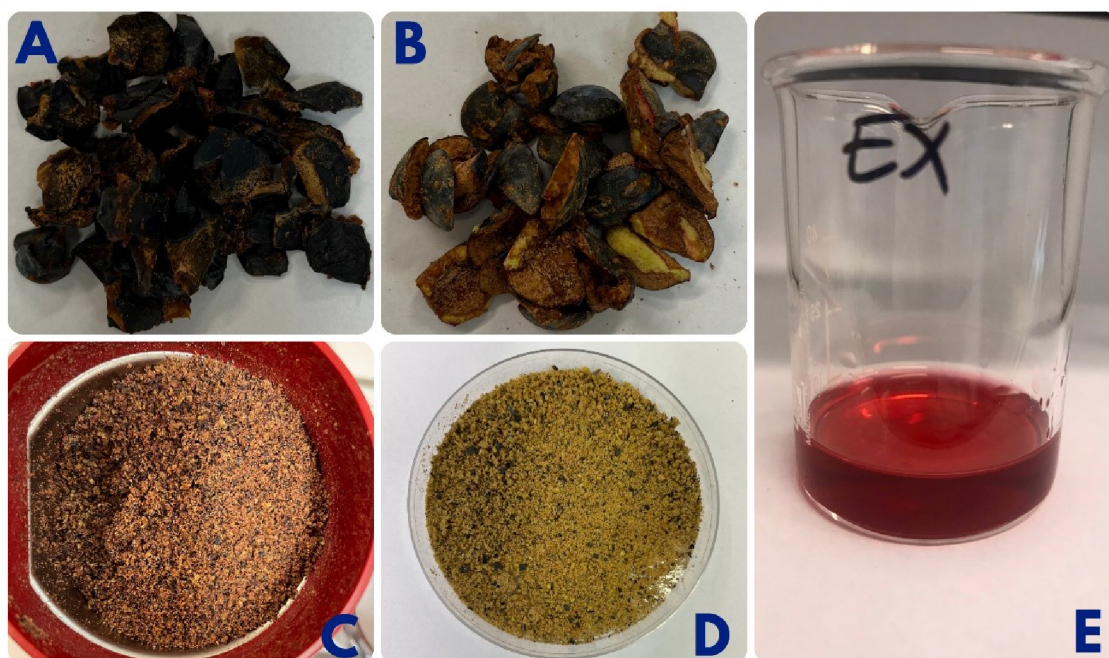
č.	druh vzorku	zkratka
1	čerstvé plody PsL	ČP
2	sušené plody PsL	SP
3	lyofilizované plody PsL	LP
4	mrazené plody PsL	MP
5	plody PsL mrazené 1 rok	M1P
6	ethanolvý extrakt z čerstvých plodů PsL	EX
7	želatinové bonbóny s 5 % extraktu z plodů PsL	M5
8	želatinové bonbóny s 10 % extraktu z plodů PsL	M10
9	želatinové bonbóny s 15 % extraktu z plodů PsL	M15
10	želatinové bonbóny s 20 % extraktu z plodů PsL	M20
11	želatinové kapsle s lyofilizovaným práškem z plodů PsL	KLP

#### Sušené, lyofilizované a mrazené plody

Část čerstvých plodů byla vypeckována (ručně ořezem) a rozdělena na tři díly. Jeden díl byl sušen v horkovzdušné sušárně při teplotě 40 °C. Druhý díl byl hluboce zmrazen a sublimačně sušen v lyofilizátoru. Sušené a lyofilizované plody (obrázek 15 A a 15 B) byly rozemlety na prášek (obrázek 15 C a 15 D) pomocí elektrického mlýnku na kávu a uskladněny v těsně uzavřených nádobách. Třetí díl vypeckovaných čerstvých plodů byl zmrazen a uchován při teplotě -18 °C po dobu 2 týdnů.

#### Ethanolvý extrakt

Druhá část čerstvých plodů byla použita pro přípravu ethanolvého extraktu (obrázek 15 E). Ve velké sklenici s uzávěrem bylo smícháno 900 g čerstvých plodů a 1,5 l konzumního lihu s obsahem alkoholu 40 %. Po důkladném promíchání byla sklenice byla uzavřena a směs se nechala 14 dní macerovat při pokojové teplotě, každý den byla protřepána. Po 2 týdnech byl extrakt scezen a následně skladován ve skleněných lahvích při teplotě cca 4 °C. Parametry pro maceraci byly převzaty z bakalářské práce [80], na kterou tato diplomová práce navazuje.



Obrázek 15: Úprava plodů *Prunus spinosa* před analýzou:

*A – sušené plody; B – lyofilizované plody; C – prášek ze sušených plodů;*

*D – prášek z lyofilizovaných plodů; E – ethanolový extrakt z čerstvých plodů*

### Želatinové bonbóny

Připravovaný ethanolový extrakt byl zahuštěn odpařením ethanolu na vakuové odparce a aplikován v různém množství do želatinové matrice. Pro výrobu želatinové matrice byl použit upravený technologický postup z diplomové práce Ing. Rychetského, který se zabýval optimalizací výroby želé cukrovinek s přidavkem bylinných extraktů [81].

V prvním kroku byl připraven tzv. cukrosirupový roztok tvořený 50% roztokem sacharózy a glukózovým sirupem v poměru 55:45. Roztok byl zahříván na teplotu 80 °C. Paralelně byl připraven roztok želatiny, a to rozmícháním práškové želatiny ve studené vodě. Po dosažení teploty 80 °C byla k cukrosirupovému roztoku přidána nabobtnalá želatina (7 % želatiny), směs byla odstavena z plamene a za stálého míchání byla ochlazená na teplotu cca 50 °C. V tomto okamžiku byla k směsi přimíchána kyselina citronová (2 % kyseliny citronové) a požadované množství extraktu. Poté byla hmota nalita do silikonových forem, ve kterých byla ponechána 20 minut při pokojové teplotě. Následně byla vložena do lednice na 48 hodin. Bonbony byly skladovány v uzavřené krabici při teplotě cca 4 °C.

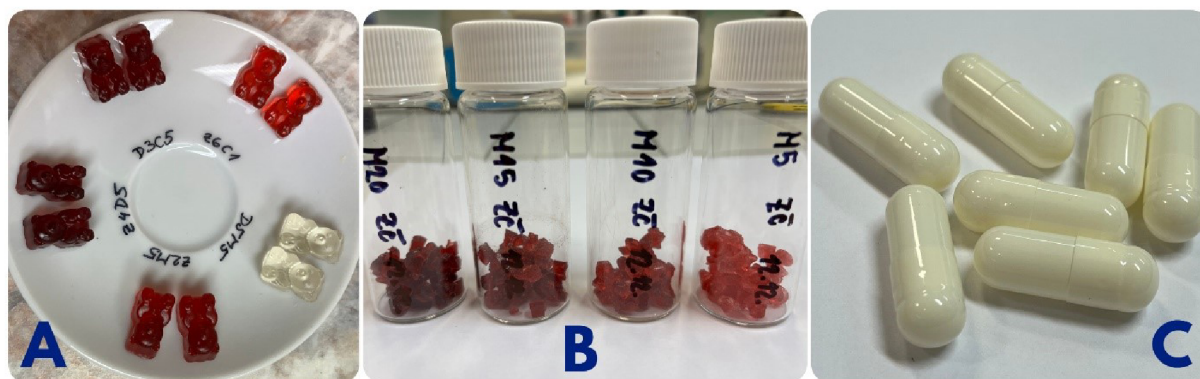
Pro optimalizaci přidavku extraktu s ohledem na spotřebitelskou přijatelnost byla připravena série vzorků obsahující standard bez přidavku extraktu a čtyři vzorky s různými koncentracemi extraktu: 5, 10, 15 a 20 % (viz tabulka 12, obrázek 16 A).

Pro účely chemické analýzy byly vzorky lyofilizovány, nakrájeny na drobné kousky (obrázek 16 B) a rozpuštěny v 50% ethanolu s hodnotou pH 2–3.

### Kapsle s lyofilizovaným práškem

Čerstvé plody byly vypeckovány (ručně ořezem), lyofilizovány a rozemlety na prach pomocí elektrického mlýnku na kávu. Následně byl prášek naplněn do prázdných želatinových kapslí velikosti 000 (obrázek 16 C), které byly zakoupeny.





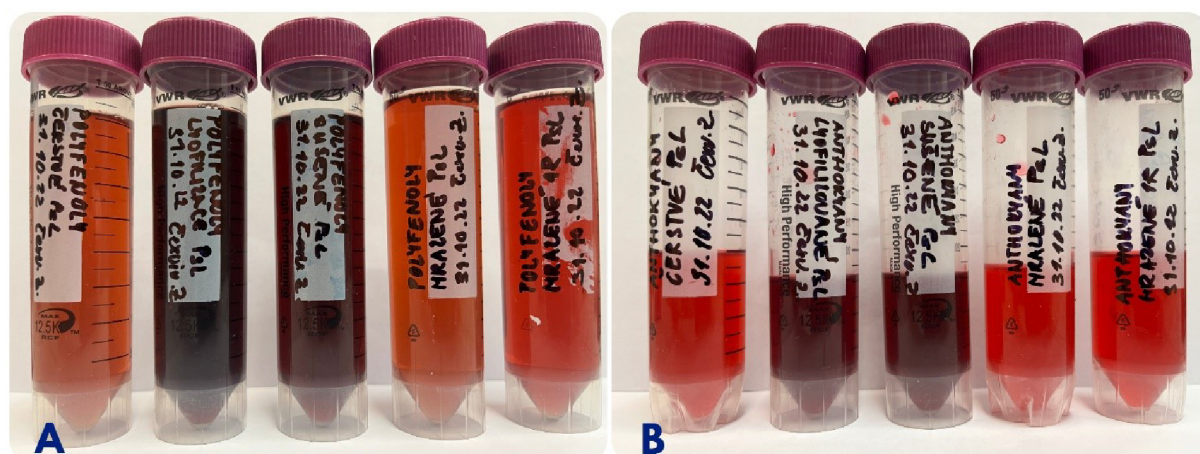
Obrázek 16: Želatinové bonbóny (A) a jejich úprava před analýzou (B) a želatinové kapsle (C).

### 3.8 Extrakce polyfenolů

Pro extrakci fenolických látek bylo naváženo přibližně 6 g zhomogenizovaného vzorku, ke kterému bylo přidáno 60 ml 67% methanolu o pH 7,0. Po důkladném protřepání a promíchání, byla směs v uzavřené skleněné nádobě umístěna do ultrazvukové lázně (10 min, 10 °C) [27]. Následně byla směs zcentrifugována (6 000 rpm, 10 min), supernatant byl odpipetován a uskladněn při teplotě cca 4 °C. Takto získané extrakty (viz obrázek 17 A) byly použity pro spektrofotometrická stanovení celkových polyfenolů a flavonoidů a antioxidační aktivity.

### 3.9 Extrakce anthokyanů

Pro extrakci anthokyanů bylo naváženo přibližně 1,5 g zhomogenizovaného vzorku, ke kterému bylo přidáno 20 ml 44% methanolu o pH 2,0. Po důkladném protřepání a promíchání, byla směs v uzavřené skleněné nádobě umístěna do ultrazvukové lázně (5 min, 48 °C) [27]. Následně byla směs zcentrifugována (6 000 rpm, 10 min), supernatant byl odpipetován a uskladněn při teplotě cca 4 °C. Takto získané extrakty (viz obrázek 17 B) byly použity pro spektrofotometrické stanovení celkových anthokyanů.



Obrázek 17: Extrakty polyfenolů (A) a extrakty anthokyanů (B).

### 3.10 Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů

Celkový obsah polyfenolů (TPC) byl stanoven spektrofotometrickou metodou využívající Folin-Ciocalteuovo činidlo (F-C). Principem této metody je přenos elektronů v alkalickém prostředí z fenolických sloučenin na komplexy fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny F-C činidla. Intenzita vznikajících modrých komplexů je proměřována spektrofotometricky při vlnové délce přibližně 750–760 nm. Přestože není doposud známa přesná chemická povaha těchto reakcí, jedná se o široce používanou metodu pro studium fenolických látek, a to především pro její jednoduchost a reprodukovatelnost [82,83].

Pro analýzu bylo smícháno 100  $\mu$ l vzorku, 1 ml destilované vody a 1 ml zředěného vodného roztoku F-C činidla v poměru 1:9. Roztok byl důkladně promíchán na vortexu a ponechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. Následně byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitánu sodného, roztok byl opět promíchán na vortexu. Po 15 minutách stání při laboratorní teplotě byla u roztoku změřena absorbance při vlnové délce 750 nm proti slepému vzorku, který byl připraven stejným způsobem, avšak namísto vzorku bylo použito 100  $\mu$ l destilované vody. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních [83].

Pro kvantitativní vyhodnocení výsledků byla sestrojena kalibrační závislost, a to pro standardní roztok kyseliny gallové o koncentraci 0,356 g/l. Postup měření kalibrační závislosti byl shodný s měřením vzorků, pouze na místo 100  $\mu$ l vzorku bylo použito 100  $\mu$ l zředěného standardního roztoku kyseliny gallové [83].

Koncentrace celkových polyfenolů ve vzorku byla vypočtena z regresní rovnice kalibrační závislosti (viz příloha 2):

$$y = 3,0596x; \quad R^2 = 0,9997 \quad (1)$$

a výsledky byly vyjádřeny jako mg ekvivalentů kyseliny gallové (GAE) na g vzorku.

### 3.11 Spektrofotometrické stanovení celkových flavonoidů

Celkový obsah flavonoidů (TFC) byl stanoven spektrofotometrickou metodou využívající roztok chloridu hlinitého a dusitanu sodného. Principem této metody je komplexotvorná reakce molekul flavonoidů s chloridem hlinitým, resp. s kovovým iontem hliníku. V alkalickém prostředí v přítomnosti  $\text{NaNO}_2$  dochází k nitraci jakéhokoli aromatického kruhu nesoucího katecholovou skupinu se třemi nebo čtyřmi polohami, které nejsou substituované ani stericky blokovány. Po přidávku  $\text{AlCl}_3$ , resp.  $\text{Al(III)}$ , vzniká žlutě zbarvený roztok komplexu, který po přidání  $\text{NaOH}$  okamžitě zčervená. Vznikající komplexy způsobují změny v absorpčním spektru flavonoidů, které jsou přímo úměrné koncentraci celkových flavonoidů. Tyto změny jsou proměřovány spektrofotometricky při vlnové délce 510 nm. Jako standard se u této metody upřednostňuje katechin [84].

Pro analýzu bylo smícháno 500  $\mu$ l vzorku, 1,5 ml destilované vody a 200  $\mu$ l 5% roztoku dusitanu sodného. Roztok byl důkladně promíchán na vortexu a ponechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 200  $\mu$ l 10% roztoku chloridu hlinitého, roztok byl opět promíchán na vortexu a ponechán stát 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 1,5 ml 1 M roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Po důkladném promíchání, 15minutovém odstání a opětovném promíchání byla u roztoku změřena absorbance při vlnové

délce 510 nm proti slepému vzorku, který byl připraven stejným způsobem, avšak namísto vzorku bylo použito 500 µl destilované vody. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních [83].

Pro kvantitativní vyhodnocení výsledků byla sestrojena kalibrační závislost, a to pro standardní roztok katechinu o koncentraci 0,300 g/l. Postup měření kalibrační závislosti byl shodný s měřením vzorků, pouze na místo 500 µl vzorku bylo použito 500 µl zředěného standardního roztoku katechinu [83].

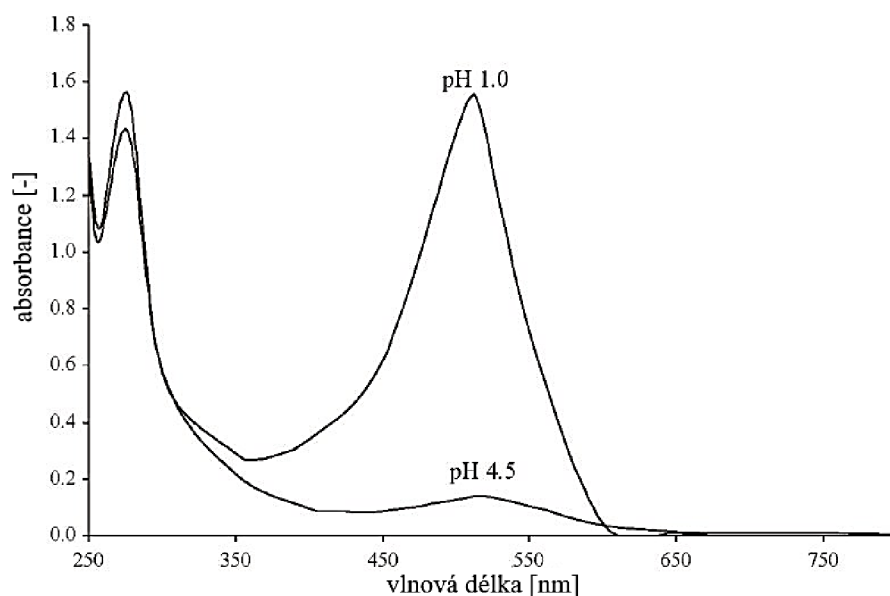
Koncentrace celkových flavonoidů ve vzorku byla vypočtena z regresní rovnice kalibrační závislosti (viz příloha 3):

$$y = 3,4591x; \quad R^2 = 0,9987 \quad (2)$$

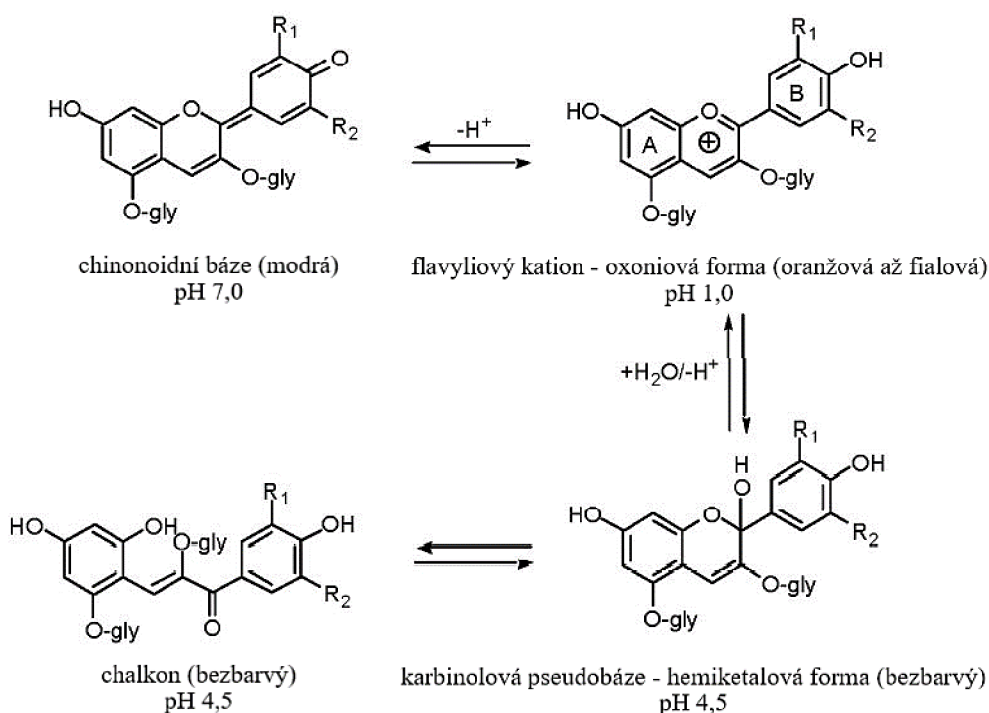
a výsledky byly vyjádřeny jako mg ekvivalentů katechinu (CAE) na g vzorku.

### 3.12 Spektrofotometrické stanovení celkových anthokyanů

Celkový obsah anthokyanů (TAC) byl stanoven spektrofotometrickou pH-diferenční metodou, jež využívá reverzibilní změny struktury anthokyanových pigmentů v závislosti na změně pH prostředí, což je doprovázeno změnou absorpčního spektra. Při hodnotě pH 1,0 dominuje v roztoku barevná oxoniová forma, zatímco při pH 4,5 převažuje bezbarvá hemiketalové forma (viz obrázek 18 a 19). pH-diferenční metoda umožňuje jednoduché, rychlé a poměrně přesné měření celkových monomerních anthokyanů, a to i v přítomnosti polymerizovaných či degradovaných pigmentů a dalších rušivých vlivů [85,86].



Obrázek 18: Spektrální charakteristiky anthokyanu z borůvky při pH pufru 1,0 a 4,5 [86,85].



Obrázek 19: Převládající strukturální formy anthokyanů přítomných při různých hodnotách pH [86].

Pomocí UV-VIS spektrofotometru Helios byly změřeny absorpční spektra anthokyanů v rozsahu vlnových délek 315–720 nm při pH pufrů 1,0 a 4,5, čímž byl ověřen rozsah vlnových délek v UV-VIS oblasti, při kterých hodnota absorbance měřených vzorků z plodů trnky obecné dosáhla maximálních hodnot. Pro měření absorpčního spektra byly připraveny vzorky ředěné 0,025 M pufrům chloridu draselného o pH 1,0 a 0,4 M pufrům octanu sodného o pH 4,5 [86].

Pro následné analýzy bylo v závislosti na typu vzorku použito 100–1 000  $\mu\text{l}$  vzorku. Daný objem vzorku byl smíchán s 2,0–2,9 ml 0,025 M pufru chloridu draselného o pH 1,0 tak, že celkový objem vzniklého roztoku činil 3 ml (např. 100  $\mu\text{l}$  vzorku bylo smícháno s 2,9 ml pufru). Stejným způsobem byl vzorek paralelně smíchán také s 0,4 M pufrům octanu sodného o pH 4,5. Následně byl roztok důkladně promíchán na vortexu a proměřen na spektrofotometru při vlnových délkách 510 nm a 700 nm proti slepému vzorku, kterým byla destilovaná voda. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních [86].

Koncentrace celkových monomerních anthokyanů ve vzorku byla vypočtena ze získaných absorbancí při vlnové délce 510 nm ( $A_{510}$ ) a 700 nm ( $A_{700}$ ):

$$A [-] = (A_{510} - A_{700})_{pH=1} - (A_{510} - A_{700})_{pH=4,5} \quad (3)$$

$$c [g/l] = \frac{A \cdot F \cdot M_w}{\varepsilon \cdot l} \quad (4)$$

kde  $A$  je vypočtená celková absorbance zředěného vzorku,  $M_w$  je molekulová hmotnost kyanidin-3-O-glukosidu (449,2 g/mol),  $l$  je optická délka kyvety,  $F$  je faktor zředění,  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient kyanidin-3-O-glukosidu (26 900 l/mol·cm). Výsledky byly vyjádřeny jako mg ekvivalentů kyanidin-3-O-glukosidu (CGE) na g vzorku [86].



### 3.13 Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity metodou TEAC

Antioxidační aktivita (AA) byla stanovena spektrofotometrickou metodou TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), jež je založena na hodnocení schopnosti vzorku eliminovat kation-radikál ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)]. Antioxidanty obsažené ve vzorku, které se chovají jako donory vodíku, zhasí kation-radikál ABTS<sup>•+</sup>, čímž způsobují odbarvení modrozelené reakční směsi. Změny v absorpčním spektru jsou pozorovány spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm, kdy míra poklesu absorbance odpovídá koncentraci antioxidantů ve vzorku. Výsledná antiradikálová aktivita vzorku je poté srovnávána s antiradikálovou aktivitou standardní látky zvané Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) [83].

Pro analýzu byl připraven roztok kation-radikálu ABTS<sup>•+</sup>, a to rozpuštěním ABTS v destilované vodě na koncentraci 7 mM s následným přidavkem 2,45 mM roztoku peroxidisíranu draselného. Vzniklý modrozelený roztok byl ponechán minimálně 12 hodin ve tmě při laboratorní teplotě. Před každým použitím byl roztok zředěn UV-VIS ethanolem na absorbanci  $0,70 \pm 0,02$  při vlnové délce 734 nm [83].

Pro měření byl smíchán 1 ml zředěného roztoku kation-radikálu ABTS<sup>•+</sup> a 10  $\mu$ l destilované vody. Ihned poté byla změřena absorbance v čase 0 minut ( $A_0$ ) při vlnové délce 734 nm. Následně byl smíchán 1 ml zředěného roztoku ABTS<sup>•+</sup> a 10  $\mu$ l vzorku, směs byla promíchána na vortexu a ponechána ve tmě při laboratorní teplotě. V 10. minutě byl změřen pokles absorbance ( $A_{10}$ ). Jako blank byl použit UV-VIS ethanol. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních [83].

Pro kvantitativní vyhodnocení výsledků byla sestrojena kalibrační závislost, a to pro standardní roztok Troloxu o koncentraci 0,388  $\mu$ g/ml. Postup měření kalibrační závislosti byl shodný s měřením vzorků, pouze na místo 10  $\mu$ l vzorku bylo použito 10  $\mu$ l zředěného standardního roztoku Troloxu, a na místo 10  $\mu$ l destilované vody bylo použito 10  $\mu$ l 60% UV-VIS ethanolu [83].

Celková antioxidační aktivita vzorku byla vypočtena z regresní rovnice kalibrační závislosti (viz příloha 4):

$$y = 0,5959x; \quad R^2 = 0,9801 \quad (5)$$

kde za  $y$  byl dosazen rozdíl absorbancí v čase 0 minut ( $A_0$ ) a 10 minut ( $A_{10}$ ):

$$A [-] = A_0 - \phi A_{10} \quad (6)$$

a výsledky byly vyjádřeny jako  $\mu$ mol ekvivalentů Troloxu (TE) na g vzorku.

### 3.14 Stanovení vitaminů C metodou HPLC/DAD

Vitamin C (resp. kyselina L-askorbová) byl identifikován metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s detektorem diodového pole (tzv. DAD). Jedná se o analytickou separační techniku, při níž dochází k distribuci jednotlivých složek vzorku mezi nepohyblivou stacionární a pohyblivou mobilní fází. Vzorek je unášen proudem mobilní fáze chromatografickou kolonou vyplněnou sorbentem směrem k detektoru. Při průchodu vzorku kolonou dochází k mnohačetným interakcím jednotlivých analytů se sorbentem, což způsobuje jejich zadržení v koloně, přičemž čas, který každý analyt stráví na povrchu sorbentu, závisí právě na síle jeho interakce se sorbentem [87].

Vzorky byly extrahovány, příp. rozpuštěny, v 2% kyselině metafosforečné. Přibližně 1 g vzorku byl smíchán s 5 ml rozpouštědla a v uzavřené skleněné nádobě byl vložen do ultrazvukové lázně (4 x 15 min). Následně byly všechny vzorky přefiltrovány přes nylonový filtr (velikost pórů 0,45  $\mu\text{m}$ ) do čistých šroubovacích vialek a do analýzy uchovány v mrazáku.

Analýza vzorků byla realizována na HPLC sestavě značky Thermo Fisher Scientific. Podmínky separace a složení mobilní fáze jsou uvedeny níže v tabulce 13. Kyselina L-askorbová byla identifikována pomocí komerčního standardu a chromatografická data byla vyhodnocena pomocí softwaru Chromeleon 7.2.

Tabulka 13: Podmínky separace hydrofilních vitaminů pomocí HPLC/DAD.

<b>kolona</b>	Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%); 250 x 4,6 mm
<b>teplota</b>	50 °C
<b>objem vzorku</b>	20 $\mu\text{l}$
<b>typ eluce</b>	izokratická
<b>mobilní fáze</b>	5 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>průtok mobilní fáze</b>	0,3 ml/min
<b>čas analýzy</b>	15 min
<b>detekce analytů</b>	DAD, absorpance při $\lambda = 210 \text{ nm}$

### 3.15 Stanovení profilu fenolických látek metodou HPLC/DAD

Profil fenolických látek byl stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s detektorem diodového pole (HPLC/DAD).

Lyofilizovaný prášek z plodů PsL byl extrahován 96% methanolem a želatinové bonbóny byly rozpuštěny v 50% ethanolu s hodnotou pH 2–3. Vždy byl použit přibližně 1 g vzorku, který byl smíchán s 5 ml příslušného rozpouštědla, a v uzavřené skleněné nádobě byl vložen do ultrazvukové lázně (4 x 15 min). Následně byly vzorky přefiltrovány přes PTFE filtr (velikost pórů 0,45  $\mu\text{m}$ ) do čistých šroubovacích vialek a předány na HPLC analýzu.

Analýza vzorků byla realizována na HPLC sestavě značky Thermo Fisher Scientific. Podmínky separace, složení mobilních fází a průběh gradientové eluce jsou uvedeny v tabulce 14 a 15. Jednotlivé fenolické látky byly identifikovány pomocí komerčních standardů. Chromatografická data byla vyhodnocena pomocí softwaru Chromeleon 7.2.

Tabulka 14: Podmínky separace fenolických látek pomocí HPLC/DAD.

<b>kolona</b>	Kinetex F5 100 Å (150 mm x 4,6 mm x 2,6 $\mu\text{m}$ )
<b>teplota</b>	25 °C
<b>objem vzorku</b>	20 $\mu\text{l}$
<b>typ eluce</b>	gradientová eluce
<b>průtok mobilní fáze</b>	0,4 ml/min
<b>čas analýzy</b>	30 min
<b>detekce analytů</b>	DAD, absorpance při $\lambda = 260, 280, 300 \text{ nm}$

Tabulka 15: Složení mobilních fází a průběh gradientové eluce pro analýzu fenolických látek pomocí HPLC/DAD.

čas [min]	1	5	10	21	26	30
0,1% trifluoroctová kyselina [%]	90	85	80	25	55	90
100% acetonitril [%]	10	15	20	75	45	10

### 3.16 Stanovení profilu jednoduchých cukrů metodou HPLC/DAD

Profil jednoduchých cukrů v ethanolovém extraktu z plodů PsL byl stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s detektorem diodového pole (HPLC/DAD).

Vzorek ethanolového extraktu byl zředěn 1:9 destilovanou vodou a následně přefiltrován přes PTFE filtr (velikost pórů 0,45 μm) do čistých šroubovacích vialek a předán na HPLC analýzu. Analýza vzorku byla realizována na HPLC sestavě značky Shimadzu. Podmínky separace a složení mobilní fáze jsou uvedeny níže v tabulce 16. Jednotlivé cukry byly identifikovány pomocí komerčních standardů a kvantifikovány pomocí příslušných regresních rovnic:

$$\text{fruktóza: } y = 78766x \quad (7)$$

$$\text{glukóza: } y = 87489x \quad (8)$$

Tabulka 16: Podmínky separace jednoduchých cukrů a složení mobilní fáze pro analýzu HPLC/DAD.

kolona	Waters, WAT084038 Carbohydrate Analysis, (300 mm x 3,9 mm)
teplota	35 °C
tlak	105–115 bar
objem vzorku	5 μl
typ eluce	izokratická eluce
mobilní fáze	acetonitril: voda (80:20)
průtok mobilní fáze	1,2 ml/min
čas analýzy	18 min

### 3.17 Stanovení vybraných nutričních hodnot

#### 3.17.1 Stanovení celkové sušiny

Celková sušina, tedy suma nerozpustné a rozpustné sušiny, byla stanovena vážkovou metodou s využitím procesu sušení. Jedná se o jednu z nejpoužívanějších metod pro stanovení sušiny a vlhkosti v potravinářských produktech [88].

Pro analýzu bylo naváženo přibližně 5 g homogenizovaného vzorku, a to s přesností na čtyři desetinná místa. Navážka vzorku byla sušena při teplotě 105 °C do dosažení konstantní hmotnosti (cca 4 hodiny). Poté byla miska se vzorkem uložena do exikátoru, kde vzorek zchladl a nakonec byl zvážěn s přesností na čtyři desetinná místa. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních [88].

Obsah celkové sušiny ( $w_{sušina}$ ) ve vzorku byl vypočten ze získaných hmotností vzorku před sušením ( $m_1$ ) a po vysušení ( $m_2$ ):

$$w_{sušina} [\% hm.] = 100 - \left( \frac{m_1 - m_2}{m_1} \cdot 100 \right) \quad (9)$$

a výsledky byly vyjádřeny v hmotnostních procentech.

### 3.17.2 Stanovení popela

Celkový obsah popela byl stanoven vázkovou metodou, a to po spálení vzorku v elektrické peci při teplotě přibližně 800 °C. Jedná se o univerzální metodu použitelnou prakticky pro všechny druhy potravinářských produktů [88].

Pro analýzu bylo do vyžíhaného kelímku naváženo přibližně 0,5 g sušiny vzorku, a to s přesností na čtyři desetinná místa. Navážka vzorku byla zuhelnatěna na vařiči v digestoři a následně žihána v elektrické peci při teplotě 650 °C po dobu cca 3 hodin. Kelímek s vyžíhaným bílošedým popelem byl vložen do exikátoru a po vychladnutí byl zvážen s přesností na čtyři desetinná místa. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních [88].

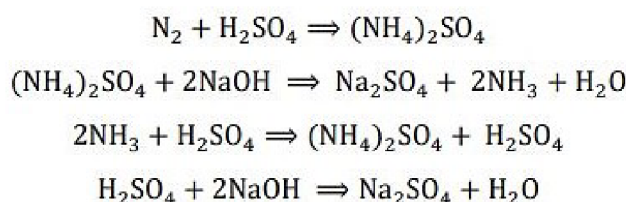
Obsah celkového popelu ( $w_{popel}$ ) ve vzorku byl vypočten ze získaných hmotností vzorku před ( $m_1$ ) a po žihání ( $m_2$ ):

$$w_{popel} [\% hm.] = \frac{m_2}{m_1} \cdot 100 \quad (10)$$

a výsledky byly vyjádřeny v hmotnostních procentech.

### 3.17.3 Stanovení celkových bílkovin

Celkový obsah bílkovin byl stanoven po mineralizaci Kjeldahlovou metodou. Základem této metody je mineralizace vzorku varem s koncentrovanou kyselinou sírovou za přídavku Wieningerova katalyzátoru, čímž dochází k převedení dusíkatých látek na síran amonný. Z něj se v alkalickém prostředí hydroxidu sodného uvolní amoniak, který se predestiluje s vodní parou, a jako čistý amoniak je jímán do předlohy se známým množstvím kyseliny sírové. Nadbytek kyseliny se následně zpětně titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného (obrázek 20). Jedná se o univerzální metodu, která je však poměrně časově náročná [88].



Obrázek 20: Schéma reakcí charakterizující průběh stanovení celkového dusíku podle Kjeldahla.

Pro mineralizaci bylo do mineralizačních trubic naváženo po 1 g sušiny vzorku, a to s přesností na 1 mg. Poté bylo ke každé navážce přidáno 10 ml koncentrované kyseliny sírové a 2 g Wieningerova katalyzátoru (směs: 90 g síranu sodného, 7 g síranu rtuťnatého, 1,5 g síranu měďnatého a 1,5 g selenu). Trubice byly umístěny do mineralizačního bloku a vzorek byl mineralizován po dobu cca 75 minut do dosažení čirého vzhledu [88].

Mineralizát vzorku byl následně kvantitativně převeden do destilační baňky a smíchán s několika kapkami fenolftaleinu. Po připojení destilační baňky k destilačnímu přístroji bylo k směsi přidáno cca 40 ml 33% roztoku hydroxidu sodného, tak že bylo dosaženo fialového zabarvení fenolftaleinu. Uvolněný amoniak byl predestilován s vodní parou (30 min) do předlohy obsahující 25 ml standardizovaného 0,05 M roztoku kyseliny sírové (standardizován na 0,1 M standardizovaný roztok hydroxidu sodného a Tashirův indikátor). Po ukončení destilace byly k destilátu v předloze přidány 3 kapky Tashirova indikátoru a roztok byl titrován standardizovaným 0,1 M roztokem hydroxidu sodného (standardizován na 0,05 M roztok dihydrátu kyseliny šťavelové a indikátor fenolftalein) do prvního trvalého žlutého zabarvení. Každý vzorek byl analyzován ve dvou paralelních stanoveních [88].

Celkový obsah hrubých bílkovin ve vzorku byl vypočten přes celkový obsah dusíku ze získaných objemů spotřeby odměrného roztoku hydroxidu sodného:

$$w_N [\% \text{ hm.}] = \frac{2 \cdot \left( c_{H_2SO_4} \cdot 0,025 - \frac{c_{NaOH} \cdot V_{NaOH}}{2} \right) \cdot Mr}{m} \cdot 100 \quad (11)$$

$$w_B [\% \text{ hm.}] = f_B \cdot w_N \quad (12)$$

kde  $w_N$  je procentuální obsah dusíku;  $c_{H_2SO_4}$  je přesná koncentrace odměrného roztoku kyseliny sírové; 0,025 je objem standardizovaného roztoku kyseliny sírové v předloze;  $c_{NaOH}$  je přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného;  $V_{NaOH}$  je objem spotřeby odměrného roztoku hydroxidu sodného;  $Mr$  je molární hmotnost dusíku (14,01 g/mol);  $m$  je hmotnost navážky vzorku;  $w_B$  je procentuální obsah hrubých bílkovin a  $f_B$  je univerzální přepočítávací faktor ( $f_B = 6,25$ ). Výsledky byly vyjádřeny v hmotnostních procentech.

#### 3.17.4 Stanovení celkových tuků

Celkový obsah tuků byl stanoven vázkovou metodou podle Soxhleta. Principem této metody je extrakce lipidů nepolárním rozpouštědlem (např. hexan, petrolether, diethylether), které je následně odstraněno a tuk je po vysušení zvážen [88].

Pro analýzu bylo do extrakční patrony naváženo přibližně 8,5 g sušiny vzorku, a to s přesností na čtyři desetinná místa. Po utěsnění patrony vatou byla vložena do automatického extrakčního přístroje Soxtherm. Do extrakční tuby bylo nalito 100 ml hexanu a po umístění tuby do přístroje byl zahájen proces extrakce (170 °C; 184 min), který byl řízen prostřednictvím softwaru Soxtherm Manager. Po ukončení extrakce bylo rozpouštědlo s vyextrahovaným tukem kvantitativně převedeno do předem zvážené suché varné baňky a hexan byl odstraněn na vakuové odparce. Následně byla baňka s tukem sušena přibližně 30 minut při teplotě 80 °C a po zchladnutí v exikátoru byla zvážena s přesností na čtyři desetinná místa. Každý vzorek byl analyzován ve dvou paralelních stanoveních [88].

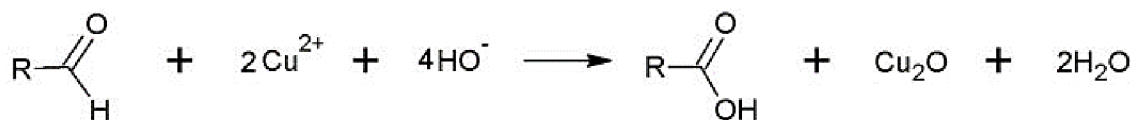
Obsah celkového tuku ( $w_{tuk}$ ) ve vzorku byl vypočten ze získaných hmotností navážky vzorku ( $m_1$ ) a vysušeného tuku ( $m_2$ ):

$$w_{tuk} [\% \text{ hm.}] = \frac{m_2}{m_1} \cdot 100 \quad (13)$$

a výsledky byly vyjádřeny v hmotnostních procentech.

### 3.17.5 Stanovení celkových cukrů po inverzi

Celkový obsah redukujících cukrů po inverzi (TSC) byl stanoven spektrofotometrickou metodou podle Somogyi-Nelsona. Základem této metody je redukce měďnaté soli ( $\text{Cu}^{2+}$ ) v alkalickém prostředí za zvýšené teploty ( $100\text{ }^\circ\text{C}$ ) na měďnou sůl ( $\text{Cu}^+$ ). Ta následně vytváří s Nelsonovým činidlem modrozelený komplex (obrázek 21), jehož intenzita se proměřuje spektrofotometricky při vlnové délce  $540\text{ nm}$  [90].



Obrázek 21: Reakce měďných iontů s arsenomolybdenovou kyselinou za vzniku molybdenové modři [80].

Samotnému stanovení předcházela extrakce cukrů, čiření roztoku pomocí Carrezova činidla I a II (viz tabulka 17) a inverze neredukujících cukrů na redukující. Do odměrné baňky (OB) o objemu  $50\text{ ml}$  byl navážen přibližně  $1\text{ g}$  sušiny vzorku, a to s přesností na  $1\text{ mg}$ . Po přidavku  $40\text{ ml}$   $40\%$  ethanolu byla OB uzavřena a umístěna na třepačku, kde byla ponechána  $1,5$  hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl přidán  $1\text{ ml}$  Carrezova činidla I a směs byla třepána  $1$  minutu. Pak byl přidán  $1\text{ ml}$  Carrezova činidla II a směs byla opět třepána  $1$  minutu. Následně byla OB doplněna  $40\%$  ethanolem po rysku, promíchána a směs byla zfiltrována. Získaný filtrát byl zahříván v kádince s cílem odpařit přítomný ethanol (původní objem roztoku byl zredukován cca na polovinu). Po vytemperování roztoku na laboratorní teplotu byl tento roztok převeden do  $50\text{ ml}$  OB a doplněn po rysku destilovanou vodou [91].

Pro inverzi neredukujících cukrů na redukující bylo v OB o objemu  $50\text{ ml}$  smícháno  $25\text{ ml}$  extraktu cukrů s  $2,5\text{ ml}$  koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Po promíchání byla baňka umístěna na  $30\text{ min}$  do vroucí vodní lázně, kde došlo k inverzi. Následně byl roztok ochlazen a zneutralizován přidavkem  $4\text{ M}$  roztoku hydroxidu sodného. Po doplnění OB po rysku destilovanou vodou byl roztok vzorku připraven pro analýzu redukujících cukrů [91,92].

Pro analýzu bylo připraveno Somogyiho činidlo I a II a Nelsonovo činidlo (tabulka 18). Nelsonovo činidlo bylo ponecháno stát minimálně  $48$  hodin při teplotě  $37\text{ }^\circ\text{C}$  v hnědé lahvi.

Pro měření bylo smícháno  $800\text{ }\mu\text{l}$  Somogyiho činidla I s  $200\text{ }\mu\text{l}$  Somogyiho činidla II a s  $1\text{ ml}$  vzorku. Roztok byl důkladně promíchán pomocí vortexu a na  $15$  minut vložen do vroucí vodní lázně. Po ochlazení na laboratorní teplotu byly k roztoku přidány  $2\text{ ml}$  Nelsonova činidla a směs byla míchána až do rozpuštění sraženiny oxidu měďného. Přibližně po  $2$  minutách bylo přidáno  $6\text{ ml}$  destilované vody a po důkladném promíchání byla u roztoku změřena absorbance při vlnové délce  $540\text{ nm}$  proti slepému vzorku, který byl připraven stejným způsobem, avšak namísto vzorku byl použit  $1\text{ ml}$  destilované vody. Každý vzorek byl analyzován ve dvou paralelních stanoveních [90].

Pro kvantitativní vyhodnocení výsledků byla sestrojena kalibrační závislost, a to pro standardní roztok glukózy o koncentraci 0,203 g/l. Postup měření kalibrační závislosti byl shodný s měřením vzorků, pouze na místo 1 ml vzorku byl použit 1 ml zředěného standardního roztoku glukózy [90].

Koncentrace celkových cukrů ve vzorku byla vypočtena z regresní rovnice kalibrační závislosti (viz příloha 5):

$$y = 6,0748x; \quad R^2 = 0,9992 \quad (14)$$

a výsledky byly vyjádřeny jako g ekvivalentů glukózy (GLE) na 100 g vzorku.

Tabulka 17: Složení Carrezova činidla I a II pro čiření extraktu cukrů [91].

Carrezovo činidlo I		Carrezovo činidlo II	
Zn(CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	21,9 g	K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] · 3H <sub>2</sub> O	10,6 g
ledová CH <sub>3</sub> COOH	3 ml	destil. voda (po rysku OB)	100 ml
destil. voda (po rysku OB)	100 ml		

Pozn.: OB (odměrná baňka).

Tabulka 18: Složení roztoků pro stanovení redukujících cukrů podle Somogyi-Nelsona [90].

Somogyiho činidlo I		Somogyiho činidlo II		Nelsonovo činidlo	
vínan sodno- draselný	12 g	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	4 g	molybdenan amonný	25 g
NaHCO <sub>3</sub>	16 g	bezvodý Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	36 g	Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3 g
bezvodý Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	24 g	destil. voda	200 ml	konc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	21 ml
bezvodý Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	144 g			destil. voda	475 ml
destil. voda	800 ml				

### 3.17.6 Stanovení vlákniny

Celkový obsah vlákniny byl stanoven metodou podle Henneberga a Stohmanna. Principem této metody je převedení balastních látek do roztoku pomocí kyselé (5% roztok kyseliny sírové) a zásadité hydrolýzy (5% roztok hydroxidu sodného). Izolovaná vláknina se vysuší a zváží [88].

Pro analýzu byly v destilační baňce smíchány přibližně 3 g rozmělněného vzorku s 200 ml 5% roztoku kyseliny sírové. Směs byla vařena po dobu 30 minut s občasným promícháním pod zpětným chladičem. Poté byla směs ještě za horka zfiltrována přes filtrační kelímek M2 a pevný podíl na filtru byl promyt horkou destilovanou vodou. Následně byl kvantitativně převeden do destilační baňky a smíchán s 200 ml 5% roztoku hydroxidu sodného. Směs byla opět vařena 30 minut s občasným promícháním pod zpětným chladičem, poté byla za horka zfiltrována přes filtrační kelímek M2. Pevný podíl na filtru byl promyt horkou destilovanou vodou a ethanolem. Po vysušení při teplotě 105 °C a vychladnutí v exikátoru byl kelímek s pevným zbytkem zvážen. Následně byl kelímek umístěn do muflové pece, kde byl pevný podíl spálen při teplotě cca 650 °C na popel, který byl taktéž zvážen. Každý vzorek byl analyzován ve dvou paralelních stanoveních [88].

Obsah vlákniny ve vzorku ( $w_{\text{vláknina}}$ ) byl vypočten ze získaných hmotností původního ( $m_1$ ), vysušeného ( $m_2$ ) a spáleného vzorku ( $m_3$ ):

$$w_{\text{vláknina}} [\% \text{ hm.}] = \frac{m_2 - m_3}{m_1} \cdot 100 \quad (15)$$

a výsledky byly vyjádřeny v hmotnostních procentech.

### 3.17.7 Stanovení celkových sacharidů

Celkový obsah sacharidů byl stanoven výpočtem dle rovnice:

$$m_S [g] = 100 - (m_V + m_B + m_T + m_P) \quad (16)$$

kde  $m_S$  je hmotnost sacharidů,  $m_V$  je hmotnost vlhkosti,  $m_B$  je hmotnost bílkovin,  $m_T$  je hmotnost tuků a  $m_P$  je hmotnost popela, přičemž vše bylo vztaženo na 100 g materiálu. Výsledky byly vyjádřeny jako g sacharidů na 100 g materiálu [6].

### 3.17.8 Stanovení energetické hodnoty

Celková energetická hodnota byla stanovena výpočtem dle rovnice:

$$E [kcal] = 4 \cdot (m_B + m_S) + 9 \cdot (m_T) \quad (17)$$

kde  $E$  je energetická hodnota,  $m_B$  je hmotnost bílkovin,  $m_S$  je hmotnost sacharidů a  $m_T$  je hmotnost tuků, přičemž vše bylo vztaženo na 100 g materiálu. Výsledky byly vyjádřeny v kcal na 100 g materiálu [6].

## 3.18 Stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita byla sledována jednoduchou diluční metodou. Principem této metody je smísení antimikrobiální látky s inokulem testovaného mikroorganismu v jamkách mikrotitrační destičky nebo ve skleněných zkumavkách. Následně jsou tyto destičky či zkumavky inkubovány za podmínek vhodných pro daný mikroorganismus. Poté je prostřednictvím vzniklého zákalu hodnocen růst daného kmene v přítomnosti antimikrobiální látky, a to spektrofotometricky či turbidimetricky [93].

### Použité mikroorganismy

Pro stanovení antimikrobiální aktivity vzorku ethanolového extraktu z plodů PsL byl použit jeden druh grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus* (CCM 1569), jeden druh gramnegativní bakterie *Escherichia coli* (CCM 5172) a jeden typ kvasinky *Candida glabrata* (CCM 8270). Všechny mikroorganismy byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM) Masarykovy univerzity v Brně.

### Kultivace mikroorganismů

Bakteriální kmeny (*Micrococcus luteus* a *Escherichia coli*) byly kultivovány na živném médiu Nutrient Broth 1% peptone (NB), zatímco kvasinková kultura (*Candida glabrata*) byla kultivována na Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) médiu (složení médií je uvedeno v tabulce 19). U všech kultur byla kultivace realizována jak na pevných agarových plotnách,



tak v kapalném médiu. Pevné médium, které obsahovalo 25 g/l NB, resp. 50 g/l YPD, a 20 g/l agaru, bylo vysterilizováno (30 minut při teplotě 120 °C), rozlito na Petriho misku a zaočkováno křížovým roztěrem kulturou daného mikroorganismu. Kapalném médiu, které obsahovalo 25 g/l NB, resp. 50 g/l YPD, bylo také vysterilizováno, převedeno do Erlenmayerových baněk o objemu 50 ml a zaočkováno kulturou daného mikroorganismu pomocí jedné kličky. Všechna zaočkováná média byla inkubována na temperované třepačce při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin za stálého míchání 150 rpm [94,95].

Tabulka 19: Složení kultivačních médií pro testované bakteriální a kvasinkové kmeny [94,95].

Nutrient Broth 1% peptone (NB)		Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD)	
pepton	10 g/l	pepton	20 g/l
hovězí extrakt	10 g/l	kvasniční extrakt	10 g/l
NaCl	5 g/l	glukóza	20 g/l

### Diluční metoda

Inhibice růstu vybraných mikroorganismů byla sledována pomocí bujónové diluční metody s využitím 96jamkových mikrotitračních destiček a ELISA readeru pro spektrofotometrickou detekci zákalu při vlnové délce 630 nm.

Pro analýzu bylo k 50 µl tekutého vzorku přidáno 150 µl tekutého média zaočkovaného buněčnou suspenzí s konečnou absorbancí 0,1 (bylo použito cca 0,5 ml kultury na 50 ml média). Pro slepý pokus bylo použito 50 µl rozpouštědla, tedy 40% ethanolu. Mikrotitrační destička byla inkubována na temperované třepačce při teplotě 37 °C za stálého míchání 150 rpm a v čase 0, 24 a 48 hodin byly pomocí ELISA readeru sledovány změny intenzity zákalu při vlnové délce 630 nm [94]. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních a výsledky byly vyjádřeny v procentech.

### 3.19 Studium uvolňování bioaktivních látek v průběhu modelového trávení

Vyrobené doplňky stravy (tj. želatinové bonbony a želatinové kapsle s lyofilizovaným práškem) byly podrobeny sledování uvolňování polyfenolů během simulovaného gastrointestinálního trávení „nalačno“. Modelové trávení probíhalo za použití umělé žaludeční (SGF; simulated gastric fluid) a střevní šťávy (SIF; simulated intestinal fluid), jejichž složení je popsáno níže v tabulce 20 [96,97].

Pro *in vitro* zkoušku disoluce byl vzorek smíchán s 50 ml SGF, která byla předem vytemperovaná na 37 °C, a v uzavřené nádobě byl umístěn na třepačku, kde byl za stálého míchání (100 rpm) inkubován po dobu 30 min při teplotě 37 °C. V 5minutových intervalech byly provedeny odběry (200 µl) pro sledování uvolněných polyfenolů [96,97].

Po půl hodině byla SGF smíchána s SIF (předem vytemperovanou na 37 °C) v poměru 1:1. Směs byla dále inkubována na třepačce za stálého míchání (100 rpm), při teplotě 37 °C po dobu 60 minut. V 10minutových intervalech byly provedeny odběry (200 µl) pro sledování uvolněných polyfenolů. Veškeré odebrané vzorky byly analyzovány na celkový obsah polyfenolů (TPC), a to spektrofotometrickou metodou využívající F-C činidlo (kapitola 3.10) [96,97].

Tabulka 20: Složení použitých disolučních médií [96].

typ média	složení média
žaludeční šťáva	3,2 g pepsinu, 2,0 g chloridu sodného, 80 ml 1 M roztoku kyseliny chlorovodíkové, doplněno v OB destilovanou vodou na 1 000 ml roztoku, pH 1,2
střevní šťáva	10 g pankreatinu, 6,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 77 ml 0,2 M roztoku hydroxidu sodného, doplněno v OB destilovanou vodou na 1 000 ml roztoku, pH 6,8

Pozn.: OB (odměrná baňka).

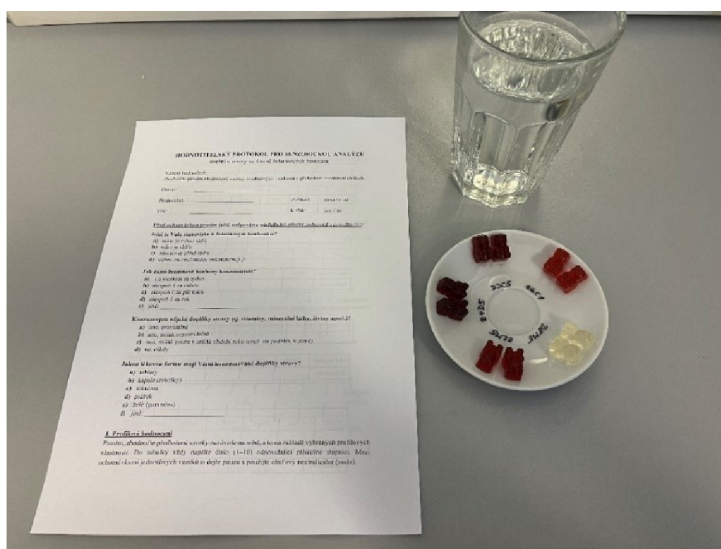
### 3.20 Senzorická analýza

Vyrobené doplňky stravy ve formě želatinových bonbónů s přidavkem koncentrovaného extraktu z plodů trnky obecné (*Prunus spinosa*) byly podrobeny sensorické analýze, přičemž cílem byla optimalizace přídavku extraktu s ohledem na spotřebitelskou přijatelnost.

Vzorky byly pro sensorické hodnocení připraveny na bílé porcelánové talířky, zakódovány (tabulka 21) a společně s chuťovým neutralizátorem a hodnotitelským protokolem (obrázek 22) předloženy panelu hodnotitelů. Hodnocení se zúčastnilo celkem 30 respondentů z řad studentů Fakulty chemické VUT v Brně.

Tabulka 21: Kódování vzorků pro sensorickou analýzu.

kód vzorku	zkratka vzorku	množství přidaného extraktu [%]			
D5M5	M0	0			
Z6C1	M5	5			
Z2M5	M10	10			
D3C5	M15	15 </tr <tr> <td>Z4D5</td> <td>M20</td> <td>20</td> </tr>	Z4D5	M20	20
Z4D5	M20	20			



Obrázek 22: Vzorky připravené pro sensorickou analýzu.

Senzorické hodnocení se skládalo ze dvou částí, a to z profilového hodnocení a pořadové zkoušky. V první části byly pomocí grafických intervalových stupnic hodnoceny parametry jako vzhled, barva, konzistence, lepivost, sladkost, kyselost, ovocitost a celková chuť, resp. flavour. Hodnotitelé své číselné odpovědi zaznamenávali do tabulek v hodnotitelském protokolu, který je uveden v příloze (viz příloha 1). Prostřednictvím pořadové zkoušky byla hodnocena celková přijatelnost vzorků, které byly hodnotiteli seřazeny od nejvíce přijatelného po nejméně přijatelný.

### **3.21 Statistická analýza dat**

Všechna experimentálně získaná data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programů Microsoft Excel, Statistica 13 a OriginPro 2018 64-bit. Veškeré statistické analýzy byly provedeny na zvolené hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Výsledky senzorické analýzy jsou vyjádřeny jako medián  $\pm$  interkvartilové rozpětí (IQR), neboť se jedná o data s nenormální distribucí, což bylo zjištěno pomocí Shapiro-Wilkova testu normality. Pro statistické vyhodnocení byla použita neparametrická analýza rozptylu Kruskal-Wallisova ANOVA a metoda vícenásobného srovnání vzorků (tzv. Multiple comparisons). Dále byla provedena korelační analýza podle Spearmana. Taktéž byl dataset podroben kontrole na přítomnost odlehlých hodnot pomocí Grubbsova testu.

Výsledky z chemických analýz jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD). Směrodatné odchylky byly vypočteny z naměřených dat pomocí funkce SMODCH.VÝBĚR.S v programu MS EXCEL a v grafech jsou znázorněny jako chybové úsečky. Tato data byla dále analyzována a statisticky vyhodnocena v programu OriginPro 2018 64-bit pomocí techniky pro analýzu rozptylu One-Way ANOVA a Tukeyho srovnávacího testu, taktéž na zvolené hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

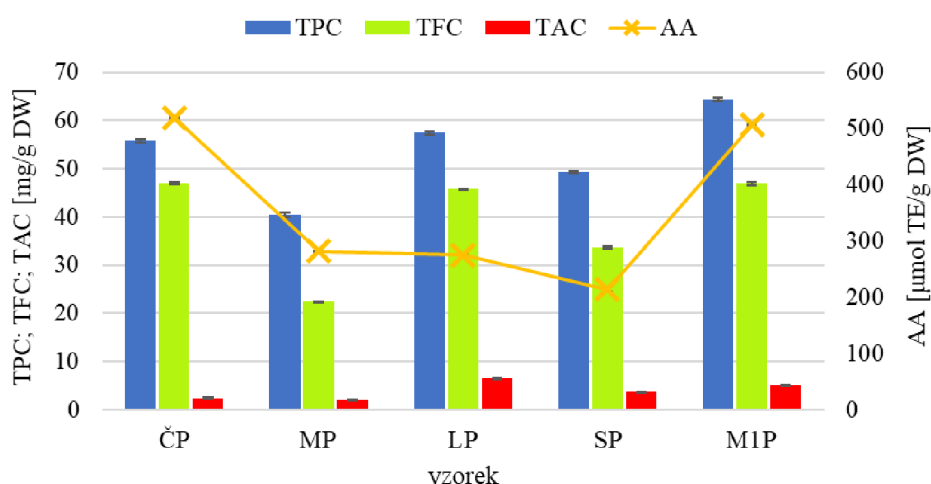
### 4.1 Vliv způsobu uchovávání plodů *Prunus spinosa* na obsah bioaktivních látek

Pro studium vlivu způsobu uchovávání plodů *Prunus spinosa* na obsah vybraných bioaktivních látek byly analyzovány čerstvé (ČP), mražené (MP), lyofilizované (LP), sušené (SP) a 1 rok mrazírensky skladované plody PsL (M1P). Před analýzami byly vzorky extrahovány dle postupů uvedených v kapitolách: 3.8, 3.9, a následně testovány z hlediska obsahu celkových polyfenolů (TPC), flavonoidů (TFC), anthokyanů (TAC) a antioxidační aktivity (AA). Dílčí stanovení byla provedena dle postupů uvedených v kapitolách: 3.10, 3.11, 3.12, 3.13. Všechny vzorky byly analyzovány ve třech paralelních stanoveních ( $n = 3$ ). Ze získaných dat byl vypočten průměr a směrodatná odchylka (SD) a výsledky byly vyjádřeny v mg/g sušiny materiálu (DW), resp. v  $\mu\text{mol/g DW}$  (viz tabulka 22 a obrázek 23). Výsledky statistického zpracování dat pomocí srovnávacího Tukeyho testu jsou uvedeny v příloze 6.

Tabulka 22: Celkový obsah polyfenolů (TPC), flavonoidů (TFC) a anthokyanů (TAC) a antioxidační aktivita (AA) plodů *Prunus spinosa* konzervovaných různými způsoby (průměr  $\pm$  SD;  $n = 3$ ).

vzorek	TPC [mg GAE/g DW]	TFC [mg CAE/g DW]	TAC [mg CGE/g DW]	AA [ $\mu\text{mol TE/g DW}$ ]
ČP	55,79 $\pm$ 0,27	46,98 $\pm$ 0,21	2,39 $\pm$ 0,05	519,64 $\pm$ 2,12
MP	40,54 $\pm$ 0,49	22,35 $\pm$ 0,09	2,16 $\pm$ 0,02	281,72 $\pm$ 0,70
LP	57,49 $\pm$ 0,33	45,75 $\pm$ 0,12	6,41 $\pm$ 0,19	274,75 $\pm$ 1,06
SP	49,33 $\pm$ 0,17	33,64 $\pm$ 0,20	3,65 $\pm$ 0,04	214,20 $\pm$ 4,60
M1P	64,42 $\pm$ 0,26	46,90 $\pm$ 0,29	5,14 $\pm$ 0,05	506,27 $\pm$ 1,78

Pozn.: Zkratkové značení jednotlivých vzorků je uvedeno v tabulce 12.



Obrázek 23: Celkový obsah polyfenolů (TPC), flavonoidů (TFC) a anthokyanů (TAC) a antioxidační aktivita (AA) plodů *Prunus spinosa* konzervovaných různými způsoby (značení vzorků viz tabulka 12).

Výsledky z jednotlivých analýz uvedené v tabulce 22 a na obrázku 23 vykazují vyšší hodnoty TAC a TPC u lyofilizovaných a sušených plodů v porovnání s plody čerstvými, které sloužily jako kontrolní vzorek. Důvodem těchto výsledků je především lepší extrahovatelnost

látek z rozmělněného rostlinného materiálu, kdy při mletí sušených a lyofilizovaných plodů došlo k výraznému narušení buněčných stěn. Nicméně je důležité zmínit, že správně vedený proces zmrazení a mrazírenského skladování umožňuje zachovat potraviny v kvalitě velmi blízké čerstvé surovině. To potvrzují zjištěné hodnoty TPC, TFC, TAC i AA u vzorku plodů PsL, které byly zmrazeny a mrazírensky skladovány po dobu 1 roku. Obsah celkových polyfenolů a anthokyanů ve vzorku M1P převýšil obsah těchto bioaktivních látek ve vzorku ČP. Koncentrace celkových flavonoidů i antioxidační aktivita vzorku M1P se velmi blížila hodnotám vzorku ČP. Příčinou těchto výsledků je pravděpodobně fakt, že obsah bioaktivních látek v plodech PsL a jejich biologická aktivita jsou ovlivněny řadou faktorů, jako jsou zralost, půdní a podnebné podmínky, teplota a množství světla během růstu či nadmořská výška apod [98]. Všechny tyto vlivy zde mohly být uplatněny, neboť plody vzorku M1P byly sbírány v roce 2021 v Kroměříži a plody vzorku ČP v roce 2022 v Otrokovicích. Z toho lze usoudit, že v roce 2021 v Kroměříži byly pro růst plodů PsL, co se do obsahu bioaktivních látek týče, lepší podmínky než v roce 2022 v Otrokovicích. Z tohoto důvodu jsou dále diskutovány pouze vzorky ČP, MP, LP a SP. Ty byly připraveny z plodů, jejichž sběr se uskutečnil v roce 2022.

Nejvyšší koncentrace polyfenolů byla zjištěna u vzorku LP, a to  $57,49 \pm 0,33$  mg GAE/g DW, což mírně převýšilo i hodnotu TPC zaznamenanou u vzorku ČP  $55,79 \pm 0,27$  mg GAE/g DW. Naproti tomu u vzorku SP došlo k poklesu hodnoty TPC, který však nebyl tak výrazný jako u vzorku MP. Olesińska a kol. [99] prezentují zvýšené hodnoty TPC, jak u lyofilizovaných, tak u sušených plodů PsL, což také připisují účinnější extrakci vzhledem k povaze materiálu, kdy došlo k jeho rozrušení. U mrazených plodů nezaznamenali výraznější změny v hodnotě TPC v porovnání s plody čerstvými. V literatuře jsou dostupné také obecné informace o množství polyfenolů v plodech trnky obecné. Barros a kol. [6] stanovili obsah celkových polyfenolů v plodech PsL na  $83,40$  mg GAE/g methanolového extraktu. Sikora a kol. [10] kvantifikovali hodnotu TPC v čerstvých ( $33,09$  mg/g DW) a 3 měsíce mrazírensky skladovaných plodech PsL ( $33,53$  mg/g DW), avšak rozdíl nebyl dle autorů statisticky významný. Erturk a kol. [100] uvádí hodnotu TPC  $4,07$  mg GAE/g FW, podobnou hodnotu TPC  $4,03$  mg GAE/g FW prezentují Jabłońska-Rys a kol. [28]. Dedić a kol. [42] stanovili rozsah hodnot TPC pro různé ethanolové extrakty ( $2,77$ – $6,87$  mg GAE/g), které byly připraveny z plodů sušených při pokojové teplotě.

Ze zkoumaných vzorků (tabulka 22) vykázal nejvyšší hodnotu TFC srovnávací vzorek ČP, a to  $46,98 \pm 0,21$  mg CAE/g DW. Zatímco nejnižší hodnota TFC byla zjištěna u vzorku MP ( $22,35 \pm 0,09$  mg CAE/g DW), u něhož došlo k poklesu hodnoty TFC přibližně na polovinu ve srovnání se vzorkem ČP. U vzorku SP byl detekovaný obsah flavonoidů nižší než u vzorku LP, což lze vysvětlit negativním vlivem vyšší teploty na tyto bioaktivní látky. K jejich ztrátám pravděpodobně došlo během procesu sušení, kdy byly plody po delší dobu vystaveny teplotě  $40$  °C. Olesińska a kol. [101] popisují podobnou míru poklesu obsahu flavonoidů v mrazených plodech PsL proti čerstvým plodům. Naproti tomu u lyofilizovaných a konvenčně sušených plodů zaznamenali značně vyšší hodnoty TFC ve srovnání s čerstvými plody, avšak absolutně nejvyšší hodnotu TFC vykázaly právě lyofilizované plody. V pozdější publikaci autoři uvádí obdobný trend vývoje obsahu TFC v plodech PsL v důsledku použitého typu konzervace [99]. Barros a kol. [6] stanovili obsah celkových flavonoidů v plodech PsL na  $8,68$  mg kvercetinů/g

methanolového extraktu. Dedić a kol. [42] prezentují rozsah hodnot TFC (0,064–0,149 mg kvercetin/g) u ethanolových extraktů připravených ze sušených plodů PsL. Tahirović a kol. [24] ve své studii poukázali na silnou korelaci obsahu flavonoidních látek a antioxidační aktivity.

Nejvyšší koncentrace anthokyanů byla zjištěna u vzorku LP, a to  $6,41 \pm 0,19$  mg CGE/g DW, což je téměř trojnásobná hodnota TAC, která byla zaznamenána u vzorku čerstvých plodů ( $2,39 \pm 0,05$  mg CGE/g DW). Mírný pokles hodnoty TAC proti vzorku ČP (9,46 %) byl zaznamenán u vzorku MP, kdy koncentrace celkových anthokyanů v mrazených plodech PsL byla rovna  $2,16 \pm 0,02$  mg CGE/g DW. U vzorku SP byl zjištěn obsah TAC ( $3,65 \pm 0,04$  mg CGE/g DW) přibližně o 43,04 % nižší než u vzorku LP. Nižší hodnotu u SP lze vysvětlit sklony anthokyanů k oxidaci během procesu sušení, kdy při delším vystavení těchto látek teplotě 40 °C, pravděpodobně došlo k jejich degradaci. Olesińska a kol. [101] zmiňují výrazné navýšení hodnoty TAC u lyofilizovaných plodů PsL ve srovnání s plody čerstvými. Taktéž popisují srovnatelné koncentrace TAC u plodů čerstvých a mrazených, avšak u plodů sušených při teplotě 60 °C zaznamenali pokles hodnoty TAC vůči čerstvým plodům, který ale nebyl statisticky významný. Naproti tomu v pozdější studii autoři zaznamenali vyšší hodnoty TAC u vzorků konvenčně sušených při teplotě 60 °C, než u vzorků mrazených. Nejvyšší obsah TAC tradičně zaznamenali u lyofilizovaných plodů [99]. Sikora a kol. [10] ve své studii stanovili koncentraci celkových anthokyanů v čerstvých (3,69 mg/g DW) a 3 měsíce mrazených plodech *Prunus spinosa* (4,15 mg/g DW), přičemž rozdíl nebyl dle autorů statisticky významný. Podobné hodnoty TAC uvádí také Erturk a kol. [100], a to 0,41 mg/g FW. Dedić a kol. [42] kvantifikovali rozsah hodnot TAC (0,746–2,271 mg CGE/g) u ethanolových extraktů připravených ze sušených plodů PsL.

Znatelně nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u vzorku čerstvých plodů (ČP)  $519,64 \pm 2,12$   $\mu\text{mol TE/g DW}$ , což bylo očekáváno vzhledem k labilitě řady antioxidantů. Druhá nejvyšší hodnota AA byla detekována u vzorku MP ( $281,72 \pm 0,70$   $\mu\text{mol TE/g DW}$ ), ta odpovídá snížení antioxidační aktivity přibližně o 45,79 % proti ČP. Ze srovnání vzorků LP a SP, lze vyvodit, že proces lyofilizace byl k antioxidantům přítomným ve vzorku šetrnější ( $274,75 \pm 1,06$   $\mu\text{mol TE/g DW}$ ). Obsah antioxidantů ve vzorku SP ( $214,20 \pm 4,60$   $\mu\text{mol TE/g DW}$ ) byl vzhledem k vzorku LP snížen o 22,04 %. Během procesu zmrazování jak vzorku MP, tak LP, pravděpodobně došlo k degradaci některých vitaminů s antioxidačními aktivitou. Mohlo se jednat například o vitamin C, který během skladování a zpracování snadno podléhá oxidaci. Ztráty se často pohybují v rozmezí 20–80 % [23]. Opačný trend u čerstvých a mrazených plodů PsL popisují Sikora a kol. [10], kteří u čerstvých plodů stanovili nižší AA (43,6  $\mu\text{mol TE/g FW}$ ) než u plodů mrazených po dobu 3 měsíců (48,5  $\mu\text{mol TE/g FW}$ ). Detekci vyšších hodnot antioxidačních vlastností mrazených plodů vysvětlují lepší dostupností komponent díky poškození buněčných struktur mrazem. Olesińska a kol. [99] ve své studii uvádí, že nejvyšší AA příslušela lyofilizovaným plodům, následovaly plody sušené, a nejnižší schopnost redukce iontů železa (FRAP) vykázal vzorek mrazených plodů. Redukční vlastnosti mrazených plodů se statisticky významně nelišily od vlastností plodů čerstvých, u kterých autoři kvantifikovali AA jako 0,14 mmol  $\text{Fe}^{3+}/\text{g FW}$ . Jabłońska-Ryś a kol. [28] stanovili

antioxidační aktivitu mražených plodů PsL pomocí metody FRAP (14,17 mmol Fe<sup>3+</sup>/100 g FW) a ABTS (5,33 μmol TE/g FW). Dedić a kol. [42] kvantifikovali AA ethanolových extraktů z plodů PsL jako schopnost zhaset radikál DPPH, a to v rozsahu hodnot 39,15–76,85 %. Erturk a kol. [100] prezentují antioxidační aktivitu plodů PsL na úrovni 78,99 %.

Pomocí korelační analýzy podle Spearmana byly posuzovány vzájemné vztahy mezi koncentrací polyfenolů, flavonoidů, anthokyanů a antioxidační aktivitou. Vypočítané hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu pro jednotlivé proměnné jsou uvedeny v tabulce 23, přičemž statisticky významné korelace jsou znázorněny červenou barvou. Z výsledků korelační analýzy byly zjištěny tři středně silné kladné korelace. Ze středně silné kladné korelace antioxidační aktivity a celkových flavonoidů (0,641) lze usoudit, že s rostoucí koncentrací flavonoidů roste také antioxidační aktivita vzorku.

Tabulka 23: Spearmanova korelační analýza koncentrací polyfenolů (TPC), flavonoidů (TFC), anthokyanů (TAC) a antioxidační aktivity (AA) pro studium vlivu způsobu uchování plodů PsL.

	TPC	TFC	TAC	AA
TPC	1,000	0,762	0,767	0,281
TFC	0,762	1,000	0,342	0,641
TAC	0,767	0,342	1,000	-0,292
AA	0,281	0,641	-0,292	1,000

U vzorků sušených (SP) a lyofilizovaných plodů (LP) byl dále identifikován vitamin C, resp. kyselina L-askorbová (viz příloha 8 a 9), a to metodou HPLC/DAD jejíž postup je uveden v kapitole 3.14. Vzhledem k povaze vzorků a podmínkám separace, které jsou nastaveny u metody zavedené na fakultě, nebylo možné kyselinu L-askorbovou ve vzorcích spolehlivě kvantifikovat. Pro kvantifikaci by bylo nutno zavést a optimalizovat novou metodu analýzy, na což nebyla tato diplomová práce zaměřena. U nové metody by bylo nutné použít jiný typ kolony, například kolonu Gemini C18 s rozměry 150 x 4,6 mm a průměrem částic 5 μm, která byla použita pro analýzu vitamínu C ve šťávách z různých odrůd černého rybízu Ing. Kaniovou [102]. Vzhledem k vysoké koncentraci cukrů v plodech PsL (38,57±0,33 g/100 g DW) by bylo vhodné zvážit také zařazení před-kolony.

## 4.2 Charakterizace extraktu z plodů *Prunus spinosa*

Ethanolový extrakt z plodů *Prunus spinosa* byl charakterizován z hlediska obsahu celkových polyfenolů (TPC), flavonoidů (TFC), anthokyanů (TAC) a antioxidační aktivity (AA). Analyzován byl jak surový ethanolový extrakt, tak i extrakt po zahuštění na vakuové odparce. Dílčí stanovení byla provedena dle postupů uvedených v kapitolách: 3.10, 3.11, 3.12, 3.13. Vzorky extraktu (EX) byly vždy analyzovány ve třech paralelních stanoveních (n = 3). Ze získaných dat byl vypočten průměr a směrodatná odchylka (SD) a výsledky byly vyjádřeny v mg/l vzorku, resp. v mmol/l vzorku (tabulka 24).



Tabulka 24: Celkový obsah polyfenolů (TPC), flavonoidů (TFC) a anthokyanů (TAC) a antioxidační aktivita (AA) surového a koncentrovaného extraktu (EX) z plodů *Prunus spinosa* (průměr ± SD; n = 3).

	EX (surový)	EX (koncentrovaný)
TPC [mg GAE/l]	2111,39 ± 11,32	4038,29 ± 19,36
TFC [mg CAE/l]	903,89 ± 5,08	2493,90 ± 3,34
TAC [mg CGE/l]	165,24 ± 0,38	389,25 ± 3,61
AA [mmol TE/l]	11,99 ± 0,40	13,50 ± 0,26

Z charakteristik surového a koncentrovaného extraktu z plodů *Prunus spinosa* (tabulka 24) je zřejmé, že zahuštění surového ethanolového na vakuové odparce mělo za následek zakonzentrování celkových polyfenolů, flavonoidů a anthokyanů na přibližně dvojnásobný obsah, zatímco nárůst antioxidační aktivity u zahuštěného extraktu byl velmi nízký. Z toho lze usoudit, že během zahušťování ethanolového extraktu došlo k degradaci některých antioxidantů. Pravděpodobně byl v důsledku delšího zahřívání snížen obsah některých termolabilních vitaminů, například vitamínu C.

Obsah celkových polyfenolů, flavonoidů či anthokyanů v ethanolovém extraktu z plodů PsL byl již dříve popsán řadou autorů [6,12,24–26,42,80,98,103,104]. Právě roztoky alkoholů jsou nejúčinnějšími extrakčními činidly pro získání fenolických látek. Vzhledem k toxicitě některých alkoholů je ethanol nejčastěji používaným rozpouštědlem. Jelikož na účinnost extrakčního procesu má vliv množství faktorů, včetně polarit rozpuštědla, je pro extrakci často volen vodný roztok ethanolu [12,24–26,98,103]. Tahirović a kol. [24] v ethanolovém extraktu z plodů *Prunus spinosa* (50% EtOH) kvantifikovali obsah polyfenolů (30,2 mg GAE/g DW), flavonoidů (1,538 mg rutinu/g DW, resp. 1,039 mg kvercetinu/g DW) i anthokyanů (0,973 mg CGE/g DW). Veličković a kol. [12] prezentují hodnoty TPC (19,98 mg GAE/g sušiny extraktu) a TFC (3,07 mg kvercetinu/g sušiny extraktu) v ethanolovém extraktu (96% EtOH) připraveném macerací zmrazených plodů PsL. Ve starší studii autoři popisují hodnoty TPC (20,94 mg GAE/g FW), TFC (1,242 mg kvercetinu/g FW) i TAC (0,238 mg CGE/g FW) v extraktu (50% EtOH), avšak výsledky vztahují na navážku čerstvých plodů [26]. Popović a kol. [103] uvádí rozmezí hodnot TPC 11,10–30,43 mg GAE/g DW pro ethanolové extrakty (50% EtOH) připravené z plodů PsL různých genotypů. Stanković a kol. [25] charakterizovali obsah TPC, TFC a TAC u čtyř typů extraktů využívající různá extrakční činidla (destilovaná voda, 70% EtOH, methanol a 45% propylenglykol). Nejvyšší hodnotu TPC (1,82 mg GAE/g DW) zaznamenali u 45% propylenglykolového extraktu, následoval vodný extrakt (1,51 mg GAE/g DW). U flavonoidů byla nejvyšší koncentrace detekována ve vodném extraktu (3,29 mg rutinu/g DW). U vodného extraktu taktéž zaznamenali nejvyšší obsah anthokyanů (517,23 mg CGE/g DW). Pozzo a kol. [13] prezentují koncentraci celkových polyfenolů ve vodném extraktu, a to 5,50 mg GAE/g DW. Barros a kol. [6] stanovili v methanolovém extraktu obsah celkových polyfenolů 83,40 mg GAE/g extraktu a celkových flavonoidů 8,68 mg CAE/g extraktu.

Antioxidační vlastnosti extraktů z plodů PsL byly v minulosti studovány několika autory [6,12,24–26,42,80,98,103,104]. Tahirović a kol. [24] popsali antioxidační aktivitu několika druhů extraktů z plodů PsL, které byly připraveny pomocí pěti různých rozpouštědel. Nejvyšší hodnoty AA vykázal extrakt s 50% ethanolom, a to při metodách stanovení s ABTS



(223,98  $\mu\text{mol TE/g DW}$ ), s DPPH (140,80  $\mu\text{mol TE/g DW}$ ) i FRAP (249,13  $\mu\text{mol TE/g DW}$ ). Ruiz-Rodríguez a kol. [37] udávají nižší hodnoty AA u methanol-acetonového extraktu z plodů PsL, které byly opět stanoveny metodami s ABTS (5,08 mmol TE/100 g FW), s DPPH (1,14 mmol TE/100 g FW) a FRAP (10,81 mmol TE/100 g FW). Veličkovič a kol. [26] stanovili antioxidační aktivitu ethanolového extraktu z plodů PsL (50% EtOH) pomocí metody s DPPH na 4,25 mg kvercetin/g FW, resp. 72,12 %. Popović a kol. [103] metodou s DPPH stanovili rozmezí hodnot AA jako IC<sub>50</sub> na 620–3 460  $\mu\text{g TE/ml}$  vzorku. Veličkovič a kol. [12] hodnotu IC<sub>50</sub> stanovili na 184,43 mg TE/l vzorku. Vzhledem k rozdílným principům extrakce bioaktivních látek z plodů PsL a odlišnostem v metodách analýzy i vyjadřování výsledků, je obtížné hodnoty mezi sebou kriticky porovnat.

Surový ethanolový extrakt z plodů trnky obecné byl dále charakterizován z hlediska obsahu jednoduchých cukrů, a to pomocí metody HPLC/DAD, která byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 3.16. V extraktu byly detekovány dva cukry (viz tabulka 25), a to glukóza v majoritním zastoupení 74,57 % (resp. 33,40 g/l) a fruktóza v zastoupení 25,43 % (resp. 11,39 g/l). V součtu byla koncentrace jednoduchých cukrů v surovém ethanolovém extraktu rovna 44,78 g/l.

Tabulka 25: Profil a kvantifikace jednoduchých cukrů v surovém ethanolovém extraktu z plodů PsL.

	RT [min]	plocha [-]	[g/l]	[%]
fruktóza	5,674	89 691	11,39	25,43
glukóza	6,648	292 177	33,40	74,57

Pozn. Retenční čas analytu (RT).

U vzorku surového extraktu byl dále stanoven profil fenolických látek, a to pomocí HPLC/DAD dle postupu uvedeného v kapitole 3.15. Analýza byla realizována ve dvou paralelních stanoveních ( $n = 2$ ). V surovém ethanolovém extraktu byly identifikovány pouze čtyři fenolické látky, a to kyselina gallová, kyselina vanilová, katechin a kvercetin-3-glukosid (tabulka 26). V chromatogramech, které jsou uvedeny v příloze 10, se však vyskytuje množství neidentifikovaných píků. Ty pravděpodobně náleží fenolickým látkám, na které buď nebyla použita metodika standardizována, nebo došlo k posunu retenčního času daného analytu v důsledku komplexnosti matrice daného vzorku. Profil polyfenolů v extraktu z plodů *Prunus spinosa* byl stanoven řadou autorů [11,13,26,37,103]. Výsledky studií jsou značně různorodé, což lze předpokládat vzhledem variabilitě obsahu bioaktivních látek v rostlinném materiálu, která je zapříčiněna řadou faktorů, jako jsou zralost, půdní a podnebné podmínky, teplota a množství světla během růstu či nadmořská výška apod [98]. Pozzo a kol. [13] ve vodném extraktu z lyofilizovaných plodů PsL metodou HPLC/DAD při vlnových délkách 265, 320 a 372 nm identifikovali i kvantifikovali celkem 11 fenolických látek (tj. kyselina gallová, kávová, ferulová, sinapová, p-kumarová, rozmarýnová a 4-hydroxybenzoová, dále rutin, genistin, kvercetin a myricetin). Autoři zmiňují možný vliv polarity použitého rozpouštědla na účinnost extrakce jednotlivých fenolických látek, kdy rozpustnost polyfenolů je dána jejich strukturou. Veličkovič a kol. [26] identifikovali 7 fenolických látek (tj. kyselina kávová a neochlorogenová, myricetin, kvercetin, kyanidin-3-O-glukosid, kyanidin-3-O-rutinosid a peonidin-3-O-glukosid) v ethanolovém extraktu (50% EtOH) z čerstvých plodů trnky obecné. Analýzu realizovali

taktéž pomocí metody HPLC/DAD, avšak s detekcí při vlnových délkách 320 a 520 nm. Popović a kol. [103] v ethanolovém extraktu (50% EtOH) z lyofilizovaných plodů PsL metodou HPLC/PDA identifikovali 10 fenolických látek, kterými jsou kyselina chlorogenová a neochlorogenová, kvercetin, kvercetin-3-glukosid, kvercetin-3-rutinosid, kvercetin-3-galaktosid, kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-rutinosid, peonidin-3-glukosid a peonidin-3-rutinosid. Sabatini a kol. [11] stanovili profil polyfenolů v ethanolovém extraktu (70% EtOH) z mrazených plodů PsL metodou HPLC/DAD s detekcí při vlnových délkách 280 a 525 nm. Autoři v extraktu identifikovali kyselinu gallovou, vanilovou, kávovou, syringovou, chlorogenovou a m-kumarovou a kyanidin-3-glukosid. Ruiz-Rodríguez a kol. [37] analyzovali metodou HPLC/PDA s detekcí při vlnových délkách 280, 360 a 520 nm profil polyfenolů v aceton-methanolovém extraktu z lyofilizovaných plodů PsL. Ve studii bylo identifikováno 6 fenolických látek, a to kyselina gallová, kyselina kávová, kvercetin-3-glukosid, kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-rutinosid a peonidin-3-glukosid. Ozkan [9] metodou HPLC/DAD identifikoval 10 fenolických látek v plodech *Prunus spinosa* různých genotypů. Signifikantní rozdíly napříč genotypy zaznamenal u pěti majoritních fenolických látek, tedy kyseliny kávové, chlorogenové, syringové a p-kumarové a katechinu. Dále identifikoval také kyselinu gallovou, vanilovou a ferulovou, rutin a phloridzin. Je zřejmé, že čtyři fenolické látky, které se podařilo identifikovat v připraveném surovém ethanolovém extraktu, byly již dříve u plodů trnky obecné identifikovány nejméně v jedné studii.

Tabulka 26: Identifikace fenolických látek v surovém ethanolovém extraktu metodou HPLC/DAD (průměr ± SD; n = 2).

analyt	RT [min]		
	260 nm	280 nm	300 nm
kyselina gallová	–	6,464 ± 0,054	6,465 ± 0,053
kyselina vanilová	15,291 ± 0,004	15,293	15,290 ± 0,003
katechin	11,303	11,280	–
kvercetin-3-glukosid	16,304 ± 0,001	–	–

Pozn. Retenční čas analytu (RT).

#### 4.2.1 Antimikrobiální aktivita extraktu

Antimikrobiální aktivita surového ethanolového extraktu z plodů *Prunus spinosa* byla sledována jednoduchou diluční metodou s využitím 96jamkových mikrotitračních destiček a ELISA readeru (kapitola 3.18). Antimikrobiální účinek extraktu byl testován na kvasince *Candida glabrata*, na grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus* a gramnegativní bakterii *Escherichia coli*. Inhibice růstu těchto mikroorganismů byla hodnocena na základě změn intenzity zákalu po 24hodinové a 48hodinové kultivaci. Vzorek extraktu byl u každého mikroorganismu analyzován ve třech paralelních stanoveních (n = 3), výsledky byly zprůměrovány a vyjádřeny jako inhibice růstu daného mikroorganismu v % s příslušnou směrodatnou odchylkou (SD) (tabulka 27).

Tabulka 27: Antimikrobiální aktivita ethanolového extraktu z plodů PsL (průměr ± SD; n = 3).

testovaný mikroorganismus	inhibice růstu [%]	
	24 h	48 h
<i>Candida glabrata</i>	-52,83 ± 3,34	-48,56 ± 2,96
<i>Micrococcus luteus</i>	2,64 ± 7,60	31,97 ± 11,09
<i>Escherichia coli</i>	49,70 ± 2,76	42,83 ± 12,33

Surový ethanolový extrakt z plodů PsL vykázal poměrně silnou inhibici růstu gramnegativní bakterie *Escherichia coli*, a to již po 24 hodinách kultivace (49,70±2,76 %). Vůči grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus* byl významný inhibiční účinek extraktu pozorován až po 48 hodinách kultivace (31,97±11,09 %). Po 24hodinové kultivaci byl inhibiční účinek téměř nezatelný. *In vitro* antibakteriální účinek extraktů z plodů PsL vůči širokému spektru gramnegativních i grampozitivních bakterií (tabulka 4) byl popsán již dříve řadou autorů [11–13,26,42]. Bakteriostatické účinky ethanolového extraktu z plodů PsL vůči *Escherichia coli* prezentuje několik autorů [11–13,26,42]. Například Veličkovič a kol. [12] a Sabatini a kol. [11] uvádí minimální inhibiční koncentraci (MIC), a to 5,68 mg/ml a 8,72 mg/ml. Veličkovič a kol. [12] dále uvádí MIC u grampozitivní bakterie *Micrococcus flavus* (5,68 mg/ml). Za antibakteriální účinek extraktů z plodů PsL jsou pravděpodobně zodpovědné především některé flavonoidy (např. rutin, kvercetin a myricetin) a fenolové kyseliny (např. kyselina gallová, kávová a ferulová), které poškozují bakteriální membránu, potlačují některé z faktorů virulence či inhibují enzymy i toxiny [13].

Antifungální účinek připraveného ethanolového extraktu vůči kvasince *Candida glabrata* nebyl prokázán. I v přítomnosti extraktu došlo k nárůstu kultury. Údaje o *in vitro* antifungální aktivitě extraktů z plodů PsL dostupné v literatuře jsou prozatím nedostatečné a rozporuplné [12]. Sabatini a kol. [11], Veličkovič a kol. [26] a Dedić a kol. [42] u kvasinky *Candida albicans* zaznamenali fungicidní účinek ethanolového extraktu, zatímco Gegiu a kol. [43] zmiňují nedostatečný fungicidní účinek vodného extraktu.

### 4.3 Charakterizace připravených doplňků stravy

Oba typy vyrobených doplňků stravy (tj. želatinové bonbony s extraktem z plodů PsL a želatinové kapsle s práškem z lyofilizovaných plodů PsL) byly charakterizovány jak z pohledu nutričního složení (tj. sušina a vlhkost, sacharidy, cukry, vláknina, bílkoviny, tuky, popel a energetická hodnota), tak obsahu vybraných bioaktivních látek (tj. celkové polyfenoly (TPC), flavonoidy (TFC), anthokyany (TAC) a profil fenolických látek) a antioxidační aktivity (AA).

#### 4.3.1 Nutriční složení doplňků stravy

U vzorků želatinových bonbonů obsahujících různá množství koncentrovaného extraktu z plodů trnky obecné (tj. M5, M10, M15, M20) a náplně želatinových kapslí (tj. prášek z lyofilizovaných plodů PsL, značení vzorku KLP) byl stanoven základní nutriční profil (tj. obsah sušiny, vlhkosti, popela, bílkovin, tuků, cukrů, vlákniny, celkových sacharidů a energetická hodnota). Dílčí stanovení byla provedena dle postupů uvedených v kapitolách:

3.17.1, 3.17.2, 3.17.3, 3.17.4, 3.17.5, 3.17.6, 3.17.7, 3.17.8. Vzorčky byly analyzovány ve třech, příp. ve dvou, paralelních stanoveních (n = 3, příp. n = 2). Ze získaných dat byl vždy vypočten průměr a směrodatná odchylka (SD) a výsledky byly vyjádřeny v g/100 g produktu a v kcal/100 g produktu, resp. v kJ/100 g produktu (tabulka 28).

Tabulka 28: Výživové údaje vyrobených doplňků stravy vztažené na 100 g produktu určeného ke konzumaci (průměr ± SD; n = 3, příp. n = 2).

výživové údaje na 100 g produktu:					
	KLP	M5	M10	M15	M20
<b>energie [kcal]</b>	381,24±0,14 <sup>b</sup>	361,05±3,87 <sup>b</sup>	352,59±4,52 <sup>b</sup>	359,57±3,76 <sup>b</sup>	356,02±4,17 <sup>b</sup>
<b>energie [kJ]</b>	1594±1 <sup>b</sup>	1509±16 <sup>b</sup>	1474±19 <sup>b</sup>	1503±16 <sup>b</sup>	1488±17 <sup>b</sup>
<b>sacharidy [g]</b>	88,82±0,12 <sup>b</sup>	83,59±0,97 <sup>b</sup>	81,47±1,13 <sup>b</sup>	83,22±0,94 <sup>b</sup>	82,33±1,04 <sup>b</sup>
<b>z toho cukry [g]</b>	38,57±0,33 <sup>a</sup>	77,13±0,46 <sup>a</sup>	76,08±0,70 <sup>a</sup>	81,13±0,82 <sup>a</sup>	80,87±1,59 <sup>a</sup>
<b>vláknina [g]</b>	1,96±0,02 <sup>b</sup>	<0,10 <sup>c</sup>	<0,10 <sup>c</sup>	<0,10 <sup>c</sup>	<0,10 <sup>c</sup>
<b>bílkoviny [g]</b>	5,46±0,07 <sup>b</sup>	6,68 <sup>c</sup>	6,68 <sup>c</sup>	6,68 <sup>c</sup>	6,68 <sup>c</sup>
<b>tuky [g]</b>	0,46±0,04 <sup>b</sup>	<0,10 <sup>c</sup>	<0,10 <sup>c</sup>	<0,10 <sup>c</sup>	<0,10 <sup>c</sup>
<b>popel [g]</b>	5,25±0,02 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>a</sup>
<b>sušina [g]</b>	100,00 <sup>c</sup>	90,51±0,95 <sup>a</sup>	88,39±1,11 <sup>a</sup>	90,14±0,92 <sup>a</sup>	89,25±1,02 <sup>a</sup>
<b>vlhkost [g]</b>	0,00 <sup>c</sup>	9,49±0,95 <sup>a</sup>	11,61±1,11 <sup>a</sup>	9,86±0,92 <sup>a</sup>	10,75±1,02 <sup>a</sup>

Pozn.: Hodnoty značené písmenem „a“ byly měřeny v tripletu, hodnoty značené písmenem „b“ byly měřeny v dubletu a hodnoty značené písmenem „c“ byly odvozeny z technologie výroby daného produktu. Zkratkové značení jednotlivých vzorků je uvedeno v tabulce 12.

Dle stanovených výživových údajů uvedených v tabulce 28 je 100 g náplně želatinové kapsle (tj. prášek z lyofilizovaných plodů PsL) tvořeno 88,82±0,12 g sacharidů, z čehož cukry tvoří 38,57±0,33 g. Dále 100 g prášku obsahuje 5,46±0,07 g bílkovin, 0,46±0,04 g tuků a 1,96±0,02 g vlákniny. Z hodnot jednotlivých makronutrientů byla také vypočtena energetická hodnota náplně, a to 381,24±0,14 kcal/100 g DW, resp. 1594±1 kJ/100 g DW. Obsah popela, tedy suma přítomných minerálních látek, činil 5,25±0,02 g/100 g DW. Nutriční charakteristiky prášku z lyofilizovaných plodů PsL lze srovnat také s dostupnou literaturou. Barros a kol. [6] v lyofilizovaných plodech PsL stanovili téměř shodný obsah celkových sacharidů 88,51 g/100 g DW, z toho sumu jednoduchých cukrů 37,06 g/100 g DW. Sikora a kol. [10] prezentují mírně nižší obsah jednoduchých cukrů jak v čerstvých (30,48 g/100 g DW), tak mrazených plodech PsL (31,07 g/100 g DW). Hodnoty obsahu bílkovin v plodech PsL, které uvádí dostupné studie, jsou převážně nižší. Barros a kol. [6] uvádí přibližně poloviční hodnotu 2,86 g/100 g DW. Marakoğlu a kol. [7] prezentují koncentraci proteinů v sušených plodech 3,4 %. Sikora a kol. [10] kvantifikovali obsah proteinů v čerstvých (4,42 g/100 g DW) a mrazených plodech PsL (2,07 g/100 g DW). Naproti tomu zastoupení tuků v plodech PsL, uvedené v řadě studií převyšuje stanovené hodnoty. Barros a kol. [6] ve své studii uvedli přibližně čtyřnásobnou hodnotu 1,98 g/100 g DW. Marakoğlu a kol. [7] uvádí ještě vyšší hodnotu 2,01 %. Podobnou hodnotu prezentují také Sikora a kol. [10] u čerstvých

(2,04 g/100 g DW) a mražených plodů PsL (2,05 g/100 g DW). Zjištěný obsah vlákniny je výrazně nižší než hodnoty uvedené ve studiích. Marakoğlu a kol. [7] uvedli obsah surové vlákniny 4,6 %. Výrazně vyšší koncentraci vlákniny stanovili Sikora a kol. [10] v čerstvých (31,97 g/100 g DW) a mražených plodech (29,45 g/100 g DW). Téměř shodnou energetickou hodnotu plodů PsL (383,27 kcal/100 g DW) uvádí ve své studii Barros a kol. [6]. Dostupné studie taktéž uvádí široké rozpětí obsahu popela v plodech PsL. Vyšší zastoupení popela v plodech prezentují Barros a kol. [6], a to 6,65 g/100 g DW. Nižší hodnoty uvádí Marakoğlu a kol. [7] v sušených plodech (2,72 %) a Sikora a kol. [10] pro čerstvé (3,81 g/100 g DW) a mražené plody (2,54 g/100 g DW).

Nutriční profily želatinových bonbonů s různým přídatkem extraktu z plodů PsL jsou velmi podobné (viz tabulka 28). Na 100 g želatinových bonbonů určených ke konzumaci připadá 81,47–83,59 g sacharidů, z toho jednoduchých cukrů 76,08–81,13 g. Dále 100 g bonbonů obsahuje stejné množství bílkovin 6,68 g, tuků <0,01 g, vlákniny <0,01 g a také popela 0,25±0,02 g. Obsah sušiny činil 88,39–90,51 %. Energetická hodnota se pohybovala v rozmezí 352,59–361,05 kcal/100 g produktu, resp. 1474–1509 kJ/100 g produktu. Výživové hodnoty vyrobených želatinových bonbonů s extraktem z plodů trnky obecné lze srovnat například s hodnotami želé bonbonů s ovocnými příchutěmi ve tvaru medvídků značky JOJO (výrobce Nestlé Česko s.r.o., závod Sfinx Holešov). Zmíněné JOJO bonbony dle deklarovaných nutričních hodnot ve 100 g obsahují 77 g sacharidů, z toho 53 g cukrů, 5,2 g bílkovin, 0,5 g tuků a 0,7 g vlákniny. Energetická hodnota JOJO bonbonů je 331 kcal/100 g, resp. 1407 kJ/100 g. JOJO bonbony, naproti vyrobeným bonbonům s extraktem, obsahují lešticí látky (tj. rostlinné tuky a Karnaubský vosk), které jsou původci přítomných tuků. Dále obsahují extrakt ze spiruliny, koncentrát šťávy z černé mrkve a jablečnou šťávu z koncentrátu. Tyto tři složky jsou pravděpodobně příčinou obsahu vlákniny v JOJO bonbonech [105,106].

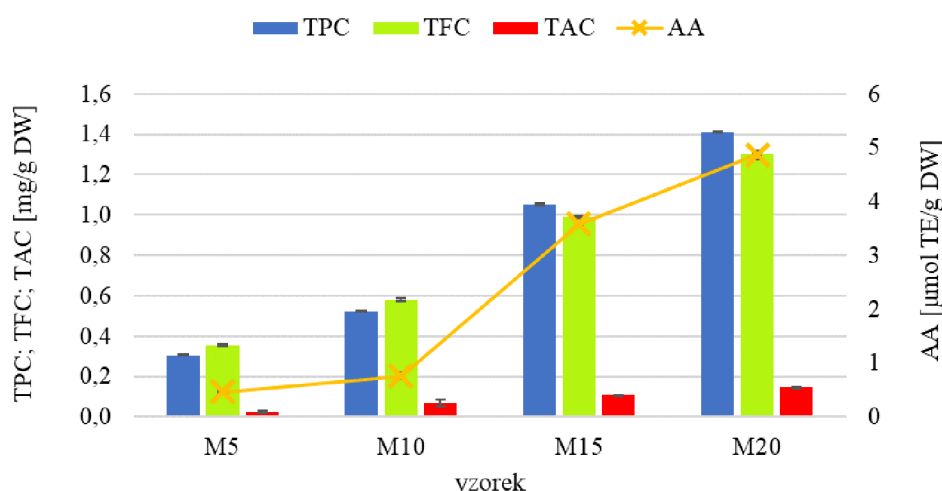
#### **4.3.2 Obsah bioaktivních látek a antioxidační aktivita doplňků stravy**

Vzorky vyrobených doplňků stravy na bázi bioaktivních látek izolovaných z plodů *Prunus spinosa* byly charakterizovány z hlediska obsahu celkových polyfenolů (TPC), flavonoidů (TFC), anthokyanů (TAC) a antioxidační aktivity (AA). Analyzovány byly jak želatinové bonbony obsahující různá množství koncentrovaného extraktu z plodů PsL (tj. M5, M10, M15, M20), tak náplň želatinových kapslí (tj. prášek z lyofilizovaných plodů PsL). Dílčí stanovení byla provedena dle postupů uvedených v kapitolách: 3.10, 3.11, 3.12, 3.13. Všechny vzorky byly vždy analyzovány ve třech paralelních stanoveních (n = 3). Ze získaných dat byl vypočten průměr s příslušnou směrodatnou odchylkou (SD) a výsledky byly vyjádřeny v mg/g DW, resp. v μmol TE/g DW (viz tabulka 29 a obrázek 24). Výsledky statistického zpracování dat pomocí srovnávacího Tukeyho testu jsou uvedeny v příloze 7.

Tabulka 29: Celkový obsah polyfenolů (TPC), flavonoidů (TFC) a anthokyanů (TAC) a antioxidační aktivita (AA) náležící vyrobeným doplňkům stravy (průměr ± SD; n = 3).

vzorek	TPC [mg GAE/g DW]	TFC [mg CAE/g DW]	TAC [mg CGE/g DW]	AA [μmol TE/g DW]
M5	0,305 ± 0,004	0,356 ± 0,006	0,026 ± 0,006	0,461 ± 0,021
M10	0,523 ± 0,003	0,580 ± 0,008	0,069 ± 0,016	0,762 ± 0,063
M15	1,054 ± 0,005	0,990 ± 0,005	0,108 ± 0,002	3,585 ± 0,047
M20	1,410 ± 0,003	1,301 ± 0,007	0,146 ± 0,004	4,870 ± 0,080
KLP	57,488 ± 0,329	45,748 ± 0,120	6,407 ± 0,187	274,750 ± 1,056

Pozn.: Zkratkové značení jednotlivých vzorků je uvedeno v tabulce 12.



Obrázek 24: Celkový obsah polyfenolů (TPC), flavonoidů (TFC) a anthokyanů (TAC) a antioxidační aktivita (AA) doplňku stravy ve formě želatinových bonbonů s různým přidavkem trnkového extraktu (značení vzorků viz tabulka 12).

Výsledky z jednotlivých analýz, uvedené v tabulce 29 a na obrázku 24, na první pohled ukazují, že nejvyšší koncentrace celkových polyfenolů, flavonoidů a anthokyanů obsahoval vzorek M20, což bylo očekáváno, neboť tento vzorek obsahoval nejvíce trnkového extraktu, a to 20 %. Naproti tomu nejnižší množství těchto bioaktivních sloučenin obsahoval vzorek M5 (obsah trnkového extraktu 5 %). Stejný trend byl pozorován i u antioxidační aktivity vzorků. Nejvyšší AA měl, dle očekávání, vzorek M20 (4,870±0,080 μmol TE/g DW). Zajímavé jsou ovšem samotné rozdíly AA mezi jednotlivými vzorky, kdy nejvýraznější rozdíl AA byl pozorován u vzorků M10 a M15. Mezi vzorky M5 a M10 byl rozdíl v AA pouze nízký. Musí se však zohlednit fakt, že během technologie výroby želatinových bonbonů byl koncentrovaný extrakt nalit do ještě teplé želatino-cukerné hmoty o teplotě přibližně 50 °C. Reálná teplota jednotlivých směsí mohla tedy ovlivnit míru degradace jednotlivých termolabilních antioxidantů, především vitamínu C a některých fenolických látek. Z pohledu detekovaného obsahu jednotlivých bioaktivních látek i antioxidační aktivity by byla pro doplněk stravy nejvhodnější receptura vzorku M20, protože je z uvedených vzorků želé nejbohatším zdrojem polyfenolů, flavonoidů, anthokyanů i celkových antioxidantů.

V prášku z lyofilizovaných plodů trnky obecné byly stanoveny výrazně vyšší hodnoty koncentrací jednotlivých bioaktivních látek. Také antioxidační aktivita prášku převyšovala hodnoty AA všech želatinových bonbonů. Srovnání detekovaných hodnot TPC, TFC, TAC i AA v prášku z lyofilizovaných plodů PsL s dostupnou literaturou bylo diskutováno již v kapitole 4.1.

U vyrobených doplňků stravy na bázi bioaktivních látek izolovaných z plodů *Prunus spinosa* byl taktéž stanoven profil fenolických látek, a to pomocí HPLC/DAD dle postupu uvedeného v kapitole 3.15. Analýza byla realizována ve dvou paralelních stanoveních ( $n = 2$ ) a výsledky jsou uvedeny v tabulce 30. Příslušné chromatogramy jsou pak uvedeny v příloze (viz příloha 11 až 15). Nejvyšší počet fenolických sloučenin byl identifikován u vzorku KLP, tedy náplně kapsle (tj. prášek z lyofilizovaných plodů PsL). Současně tento vzorek jako jediný obsahoval v detekovatelném množství kofein. Naproti tomu u vzorku M5 nebyla detekována žádná fenolická sloučenina, což lze připsat nízkému obsahu trnkového extraktu v želatinové matici. Na chromatogramu (příloha 12), je viditelný jeden neidentifikovaný pík s retenčním časem blízkým kvercetin-3-glukosidu, který byl identifikován ve všech dalších vzorcích želatinových bonbonů. Nejvyšší počet fenolických látek v želatinových bonbonech byl identifikován u vzorku M15. U něj se podařilo identifikovat celkem 8 fenolických látek, což je přesně dvojnásobné množství identifikovaných látek než u vzorku surového ethanolového extraktu (kapitola 4.2). Kyselina gallová a vanilová, katechin a kvercetin-3-glukosid, které byly zjištěny v ethanolovém extraktu, byly identifikovány i u vzorku M15. Ve vzorku M15 byly dále identifikovány kyselina chlorogenová a kávová, epikatechin a hesperidin. Některé z těchto látek byly identifikovány také ve vzorcích M20 a M10. Mimo to vzorek M10 obsahoval ještě pelargonidin-3-glukosid. Vzhledem k tomu, že jediným možným zdrojem fenolických látek v želatinových bonbonech byl koncentrovaný extrakt z plodů trnky obecné, který byl připraven zahuštěním surového ethanolového extraktu, lze říci, že všechny látky identifikované v bonbonech obsahoval také zmíněný ethanolový extrakt, přestože se tyto látky u něj nepodařilo identifikovat. Identifikace některých látek mohla být znemožněna buď zředěním ethanolového extraktu před jeho analýzou, nebo posunem retenčních časů jednotlivých analytů či nedostatečnou separací v důsledku komplexnosti matrice analyzovaného materiálu. Profil polyfenolů u plodů *Prunus spinosa* byl sledován řadou autorů [9,11,13,26,37,103]. Studie uvádí značně různorodé výsledky, což lze ovšem předpokládat vzhledem množství faktorů, které přispívají k variabilitě obsahu bioaktivních látek v plodech PsL (např. genotyp, zralost, půdní a podnebné podmínky, teplota, množství světla či nadmořská výška apod.) [98]. Rozdílnost výsledků je taktéž pravděpodobně zapříčiněna odlišnými separačními podmínkami během analýzy metodou HPLC/PDA, resp. HPLC/DAD (např. využití jiné kolony či detekce při jiné vlnové délce apod.). Výsledky dostupných studií [9,11,13,26,37,103] byly diskutovány již u profilu polyfenolů v surovém ethanolovém extraktu v kapitole 4.2. Ve vzorku KLP byly detekovány čtyři fenolické sloučeniny, které výše uvedené studie u plodů PsL neuvádí, a to pelargonidin-3-glukosid, epikatechin, hesperidin a kofein. Pelargonidin byl ve vzorcích ethanolového a acetonového extraktu z mražených plodů PsL stanoven Veličkovič a kol. [12], kteří metodou HPLC/DAD analyzovali složení anthokyanů v ethanolovém, acetonovém a vodném extraktu. Ze srovnání látek identifikovaných v této diplomové práci a látek, které byly identifikovány ve výše zmíněných studiích, vyplývá, že píky, které se nepodařilo identifikovat,

mohou náležet některým látkám z následujícího výčtu: rutin, kyselina ferulová, sinapová, syringová, rozmarýnová, m-kumarová, p-kumarová, 4-hydroxybenzoová, neochlorogenová, myricetin, genistin, kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-rutinosid, peonidin-3-glukosid, peonidin-3-rutinosid, kvercetin-3-rutinosid či kvercetin-3-galaktosid [9,11,13,26,37,103]. Z uvedených fenolických látek byla použita metodika standardizována pouze na kyselinu ferulovou, sinapovou a p-kumarovou a rutin. Tyto fenolické látky byly identifikovány Pozzo a kol. [13] ve vodné extraktu z plodů PsL, avšak Veličković a kol. [26] a Popović a kol. [103] v profilu polyfenolů ethanolového extraktu (50 % EtOH) z plodů PsL ani jednu z těchto látek neidentifikovali. Lze tedy uvažovat o vlivu polaritý extrakčního činidla na účinnost extrakce jednotlivých fenolických látek [13].

Tabulka 30: Identifikace fenolických látek ve vyrobených doplňcích stravy metodou HPLC/DAD (průměr ± SD; n = 2).

vzorek	analyt	RT [min]		
		260 nm	280 nm	300 nm
M5	–	–	–	–
M10	kyselina vanilová	–	–	15,117
	katechin	–	11,788	–
	kvercetin-3-glukosid	16,245 ± 0,117	16,252 ± 0,156	16,244 ± 0,115
	pelargonidin-3-glukosid	–	13,785 ± 0,004	13,785
M15	kyselina gallová	6,125	6,112	6,110
	kyselina chlorogenová	9,942	9,947	9,948
	kyselina kávová	13,217	13,217	13,218
	kyselina vanilová	15,527	15,403	15,405
	katechin	11,555	11,557	11,555
	epikatechin	14,228 ± 0,172	14,230	14,232
	kvercetin-3-glukosid	16,288	–	–
	hesperidin	–	17,092	–
M20	kyselina vanilová	15,265 ± 0,000	15,265	15,265
	kvercetin-3-glukosid	16,289 ± 0,002	16,297	–
KLP	kyselina gallová	6,175 ± 0,000	6,141 ± 0,004	6,111 ± 0,039
	kyselina kávová	13,201 ± 0,018	13,194 ± 0,016	13,172 ± 0,012
	kyselina vanilová	15,124 ± 0,008	15,138	15,124 ± 0,009
	katechin	11,716 ± 0,001	11,717 ± 0,002	11,726 ± 0,001
	epikatechin	–	–	14,508
KLP	kvercetin-3-glukosid	–	–	16,270 ± 0,132
	pelargonidin-3-glukosid	13,781 ± 0,001	13,784 ± 0,006	13,783 ± 0,001
	hesperidin	–	–	17,254 ± 0,005
	kofein	–	–	10,341 ± 0,016

Pozn. Retenční čas analytu (RT), zkratkové značení jednotlivých vzorků je uvedeno v tabulce 12.

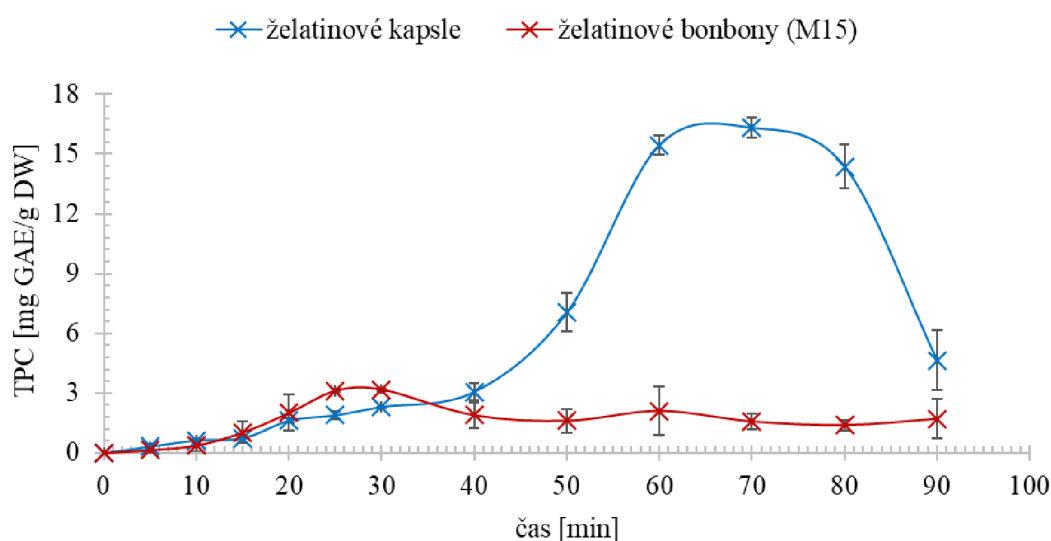


#### 4.4 Studium uvolňování bioaktivních látek v průběhu modelového trávení

Modelové *in vitro* trávení vyrobených doplňků stravy bylo realizováno dle postupu uvedeného v kapitole 3.19. Testovanými vzorky byly želatinové bonbony s 15 % extraktu z plodů PsL a želatinové kapsle s lyofilizovaným práškem z plodů PsL. Během simulovaného gastrointestinálního trávení „nalačno“ bylo sledováno uvolňování fenolických látek, a to pomocí spektrofotometrické metody s Folin-Ciocalteuovým činidlem (viz kapitola 3.10). Každý typ potravinového doplňku byl analyzován ve třech paralelních stanoveních ( $n = 3$ ). Ze získaných dat byl vypočten průměr a směrodatná odchylka (SD) a koncentrace celkových polyfenolů (TPC) byla vyjádřena v mg GAE/g sušiny daného vzorku (DW) (tabulka 31 a obrázek 25).

Tabulka 31: Koncentrace celkových polyfenolů (TPC) uvolněných během modelového trávení vyrobených doplňků stravy (průměr  $\pm$  SD;  $n = 3$ ).

čas [min]	TPC – želatinové kapsle [mg GAE/g DW]	TPC – želatinové bonbony (M15) [mg GAE/g DW]
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
5	0,31 $\pm$ 0,14	0,14 $\pm$ 0,12
10	0,64 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,32
15	0,74 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,54
20	1,62 $\pm$ 0,12	2,01 $\pm$ 0,91
25	1,89 $\pm$ 0,18	3,11 $\pm$ 0,09
30	2,31 $\pm$ 0,02	3,18 $\pm$ 0,05
40	3,07 $\pm$ 0,41	1,89 $\pm$ 0,66
50	7,05 $\pm$ 0,95	1,61 $\pm$ 0,60
60	15,45 $\pm$ 0,50	2,11 $\pm$ 1,23
70	16,31 $\pm$ 0,51	1,58 $\pm$ 0,41
80	14,36 $\pm$ 1,10	1,40 $\pm$ 0,26
90	4,65 $\pm$ 1,51	1,71 $\pm$ 0,97



Obrázek 25: Grafické znázornění zjištěných koncentrací polyfenolů (TPC) v průběhu modelového trávení vyrobených doplňků stravy.

Cílem simulovaného *in vitro* gastrointestinálního trávení bylo získat informace o biologické dostupnosti a biologické aktivitě fenolických sloučenin obsažených v připravených doplňcích stravy. Tyto informace mohou být přínosné především z hlediska potenciálních pozitivních vlivů na lidské zdraví, neboť fenolické látky disponují antioxidační aktivitou a jsou často spojovány se snížením rizika rozvoje chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární choroby, diabetes či rakovina. Avšak je důležité zohlednit fakt, že studie *in vitro* trávení nemohou věrně napodobit složité interakce, ke kterým dochází v lidském organismu. Výsledky je tedy nutné interpretovat se značnou opatrností.

V průběhu půlhodinové inkubace želatinového bonbonu v umělé žaludeční šťávě (SGF), došlo k jeho úplné disoluci. Z grafického znázornění průběhu modelového trávení (obrázek 25) je patrné, že v čase 25 a 30 minut bylo dosaženo maximální koncentrace uvolněných polyfenolů. Po smísení SGF se střevní šťávou (SIF) došlo k trvalému poklesu hodnoty TPC, což bylo s vysokou pravděpodobností způsobeno výrazným promícháním roztoku v důsledku přilítí SIF. Do okamžiku přilítí SIF byla SGF míchána pouze mírně, a to pomocí třepačky nastavené na rychlost 100 rpm. Přestože byly odběry SGF vždy realizovány vždy ze stejného místa, je nutné konstatovat, že zjištěné koncentrace TPC jsou zkreslené nedokonalým rozptýlením polyfenolů do celého objemu SGF, neboť v kapitole 4.3 byly kvantifikovány celkové polyfenoly ve vzorku M15 ( $1,054 \pm 0,005$  mg GAE/g DW). V posledních 50 minutách inkubace vzorku ve směsi SGF a SIF nebyly zaznamenány významné změny v hodnotách TPC. Směs umělých trávicích šťáv SGF a SIF po 1,5hodinovém modelovém trávení želatinového bonbonu M15 je znázorněna na obrázku 26 A.

U vzorku želatinové kapsle byla během 30minutové inkubace v SGF pozorována postupná degradace želatinového obalu a uvolňování polyfenolů z práškové náplně do žaludeční šťávy. K znatelnějšímu nárůstu TPC v SGF došlo až po 20 minutách inkubace, kdy byla část obalu kapsle rozpuštěna. Po smísení SGF a SIF nedošlo v prvních 10 minutách k rapidní změně hodnoty TPC, jako tomu bylo u želatinových bonbonů. Kapsle s lyofilizovaným práškem, na rozdíl od želatinových bonbonů, v SGF plavala na hladině, a tak bylo míchání roztoku na třepačce rychlostí 100 rpm dostatečné pro rovnoměrné rozptýlení polyfenolů v SGF. Po 20 minutách inkubace ve směsi SGF a SIF (tj. celkový čas inkubace 50 minut) byl zaznamenán první výraznější nárůst hodnoty TPC. Před odběrem v čase 50 min byl také zaznamenán úplný rozklad obalu kapsle, což znamená, že polyfenoly měly k dispozici pro přestup do roztoku výrazně větší plochu. K nejvyššímu nárůstu hodnoty TPC došlo mezi odběry v čase 50 min a 60 min. Maximální hodnoty TPC pak byly identifikovány u odběrů v čase 60 min a 70 min. Po dosažení maximální koncentrace polyfenolů v roztoku byl zaznamenán zprvu mírný a následně výrazný pokles hodnoty TPC. Důvodem tohoto poklesu je pravděpodobně nestabilita fenolických látek v neutrálních až zásaditých podmínkách SIF, kdy i přítomnost pankreatických enzymů může vést k hydrolýze některých fenolických sloučenin [107,108]. Degradace již uvolněných polyfenolů byla pravděpodobně dále doplněna zpomaleným uvolňováním dalších polyfenolů, neboť si prášková náplň kapsle i po rozpuštění obalu zachovávala původní tvar válečku. K uvolňování polyfenolů tedy docházelo pouze z povrchu tohoto útvaru. Zbylé polyfenoly byly vázány v matici materiálu a dalšímu uvolňování pravděpodobně bránila taktéž přítomná vláknina, jejíž obsah v lyofilizovaném prášku z plodů PsL ( $1,962 \pm 0,024$  % hm. DW) byl kvantifikován v kapitole 4.3. Směs umělých

trávicích šťáv SGF a SIF po 1,5hodinovém modelovém trávení želatinové kapsle je znázorněna na obrázku 26 B a „nestrávený“ zbytek práškové náplně kapsle je zobrazen na obrázku 26 C.

Snížení hodnot TPC během střevního trávení lze srovnat s dostupnou literaturou. Zhou a kol. [107] popisují změny chemického složení a antioxidační aktivity u odvaru z listů jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*) a komerčně dostupných kapslí v důsledku *in vitro* gastrointestinálního trávení. Autoři popisují pokles hodnot TPC při střevním a úplném trávení, což opírají také o výsledky z HPLC analýzy jednotlivých fenolických látek, kdy po trávení v žaludku nedošlo k zjevným změnám těchto látek, zatímco během střevního trávení došlo k snížení obsahu většiny fenolických látek. Ortega-Vidal a kol. [108] ve své studii taktéž popisují degradaci či přeměnu většiny fenolických látek během gastrointestinálního trávení vodného a methanolového extraktu „skalního čaje“ (*Jasonia glutinosa*).



Obrázek 26: Vzorky po ukončení 1,5hodinového modelového gastrointestinálního trávení (A – výsledek trávení želatinového bonbonu s trnkovým extraktem (M15); B – výsledek trávení želatinové kapsle s lyofilizovaným práškem z plodů PsL; C – nestrávený zbytek náplně želatinové kapsle).

Vzhledem k použití kolorimetrické metody využívající nespecifické Folin-Ciocalteuovo činidlo, která není vysoce selektivní metodou, musí být bráno v úvahu možné ovlivnění výsledků přítomností jiných redukčních činidel či interferencí s jinými sloučeninami ve vzorku, jako jsou například aminokyseliny, cukry, bílkoviny, organické kyseliny, aromatické aminy či vitamíny. Přítomnost těchto sloučenin často vede k nadhodnoceným výsledkům [107,109].

#### 4.5 Senzorická analýza doplňku stravy ve formě želatinových bonbónů

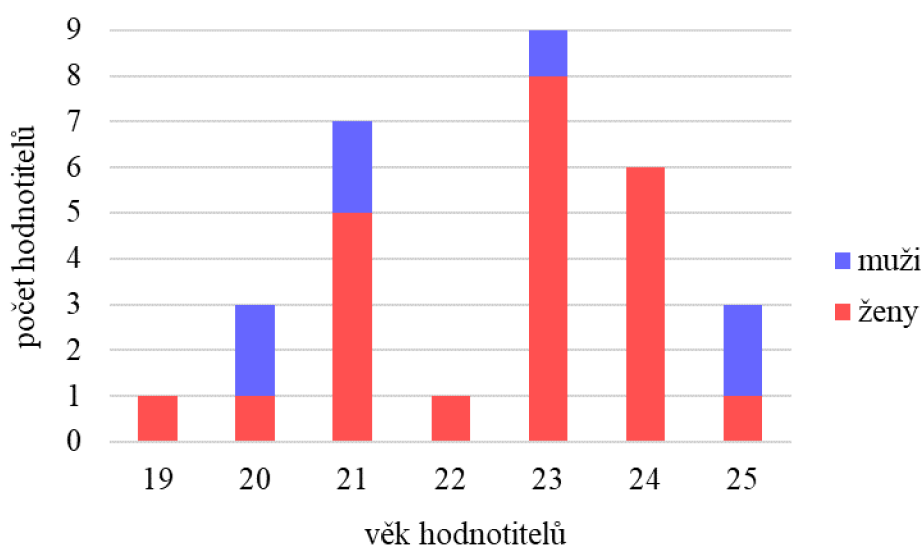
Vyrobený doplněk stravy ve formě želatinových bonbónů s přidavkem koncentrovaného extraktu z plodů *Prunus spinosa* (viz obrázek 27) byl podroben sensorické analýze (viz 3.20), přičemž cílem byla optimalizace přidavku extraktu s ohledem na spotřebitelskou přijatelnost.



Obrázek 27: Doplněk stravy ve formě želatinových bonbonů s přidavkem koncentrovaného extraktu z plodů PsL (M0 – standard, M5 – želé s 5 % extraktu, M10 – želé s 10 % extraktu, M15 – želé s 15 % extraktu, M20 – želé s 20 % extraktu).

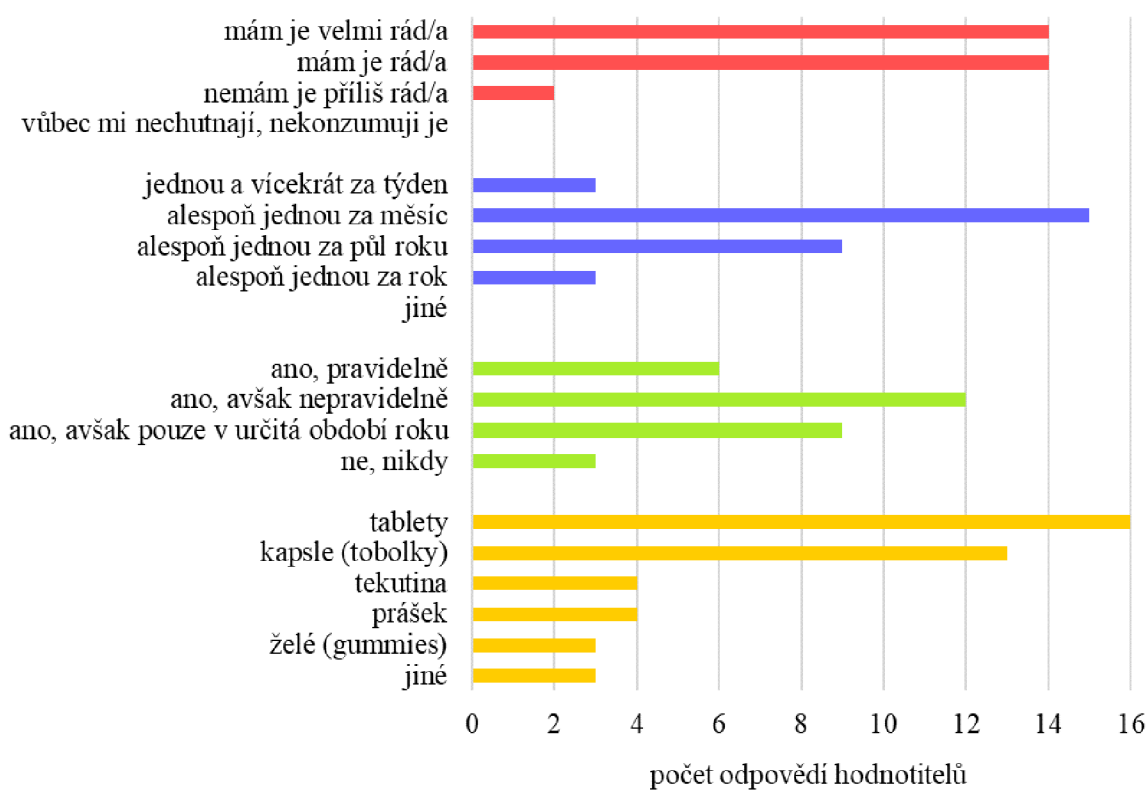
#### 4.5.1 Charakterizace sensorického panelu

Senzorického hodnocení se zúčastnilo celkem 30 hodnotitelů z řad studentů Fakulty chemické VUT v Brně. Před samotným hodnocením vzorků jim byl předložen krátký dotazník pro získání elementárních informací o sensorickém panelu. Dle získaných informací byl sensorický panel ze 76,67 % tvořen ženami a z 23,33 % muži. Zastoupení hodnotitelů z pohledu pohlaví a věku je uvedeno na obrázku 28. Z grafického zobrazení je patrné, že téměř jedna třetina hodnotitelů byla ve věku 23 let, což odpovídá obvyklému věku studentů navazujícího magisterského studia. Dále bylo zjištěno, že převážnou část hodnotitelů tvořili nekuřáci, a to z 93,33 %. Pouze dva hodnotitelé uvedli, že jsou kuřáky, což odpovídá 6,67 %.



Obrázek 28: Zastoupení hodnotitelů z pohledu pohlaví a věku.

Dále byly hodnotitelům položeny otázky ohledně jejich postoje k želatinovým bonbonům a frekvence jejich konzumace. Výsledné odpovědi jsou shrnuty na obrázku 29. Na otázku stanoviska k želatinovým bonbonům hodnotitelé nejčastěji volili odpověď „mám je velmi rád/a“ či „mám je rád/a“. Žádný z hodnotitelů neoznačil odpověď „vůbec mi nechutnají, nekonzumuji je“. Z pohledu frekvence jejich konzumace největší část hodnotitelů uvedla odpověď „alespoň jednou za měsíc“. Následovala odpověď „alespoň jednou za půl roku“. Hodnotitelé také odpovídali na otázky ohledně frekvence konzumace doplňků stravy a formy, ve které je konzumují. Na otázku ohledně konzumace doplňků stravy hodnotitelé nejčastěji volili odpověď „ano, avšak nepravidelně“. Druhou nejčastější odpovědí bylo „ano, avšak pouze v určitá období roku“. Na otázku týkající se formy konzumovaných doplňků stravy, byla nejčastější odpovědí forma „tablety“, následovaná odpovědí „kapsle, resp. tobolky“.



Obrázek 29: Odpovědi hodnotitelů na otázky oblíbenosti želatinových bonbonů a frekvence jejich konzumace, dále frekvence konzumace doplňků stravy a formy, ve které je konzumují [1. Jaké je Vaše stanovisko k želatinovým bonbonům? 2. Jak často želatinové bonbóny konzumujete? 3. Konzumujete nějaké doplňky stravy (tj. vitamíny, minerální látky, živiny apod.)? 4. Jakou lékovou formu mají Vámi konzumované doplňky stravy?].

#### 4.5.2 Vyhodnocení sensorického profilu

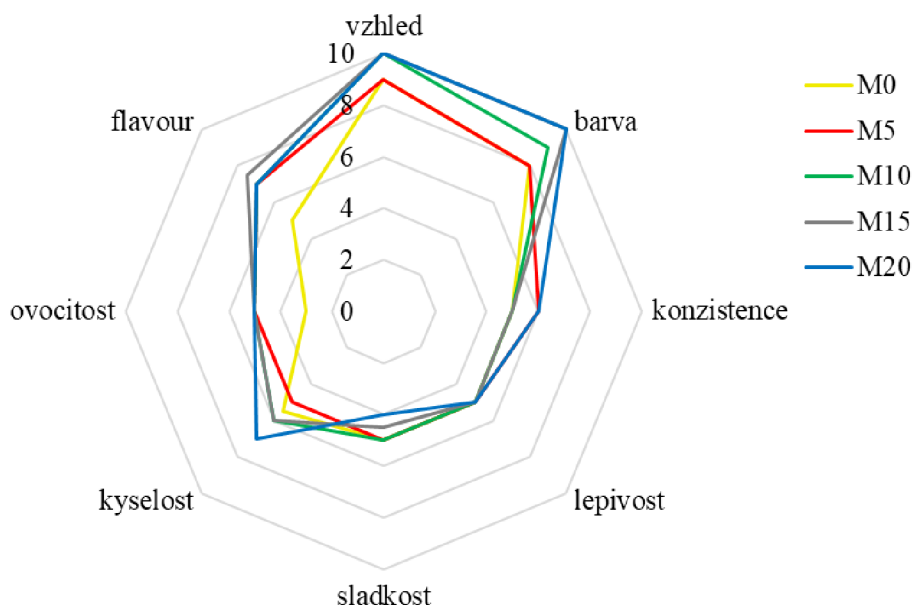
V první části sensorické analýzy byly u předložených vzorků hodnoceny deskriptory vzhled, barva, konzistence, lepivost, sladkost, kyselost, ovocitost a celková chuť, resp. flavour. Sensorické hodnocení bylo realizováno dle postupu uvedeného v kapitole 3.20.

Všechna data z profilového hodnocení byla statisticky zpracována. Na počátku statistického vyhodnocování byl na celý dataset použit Grubbsův test na přítomnost odlehlých hodnot na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (příloha 16). Na základě hypotézových otázek byla v datasetu zjištěna přítomnost odlehlých hodnot, které byly následně identifikovány pomocí boxových grafů a poté z datasetu odstraněny. Výskyt odlehlých hodnot byl očekáván neboť bylo sensorické hodnocení realizováno s nezkušenými hodnotiteli, u kterých je riziko výskytu odlehlých hodnot vyšší. Na upravený dataset byl opět aplikován Grubbsův test (příloha 17), kterým byla potvrzena nepřítomnost odlehlých hodnot. Tento dataset byl dále podroben analýze distribuce dat, a to pomocí Shapiro-Wilkova testu taktéž s hladinou významnosti  $\alpha = 0,05$  (příloha 18). Použitím hypotézových otázek bylo zjištěno, že každý hodnocený deskriptor obsahuje alespoň jednu skupinu dat s nenormální distribucí. Z tohoto důvodu byly pro další statistické analýzy použity neparametrické testy a namísto průměru se směrodatnou odchylkou byl použit medián s interkvartilovým rozpětím (IQR). Hodnoty získané základním vyhodnocením sensorického profilu jsou uvedeny v tabulce 32 a zobrazeny v radarovém grafu (obrázek 30).

Tabulka 32: Hodnocení sensorického profilu doplňku stravy ve formě želatinových bonbonů s různou koncentrací extraktu z plodů *Prunus spinosa*. Výsledky jsou uvedeny jako medián s interkvartilovým rozpětím (IQR).

		medián $\pm$ IQR				
		M0	M5	M10	M15	M20
hodnocený deskriptor	vzhled	9,0 $\pm$ 2,0	9,0 $\pm$ 2,0	10,0 $\pm$ 1,0	10,0 $\pm$ 1,0	10,0 $\pm$ 2,0
	barva	8,0 $\pm$ 3,0	8,0 $\pm$ 3,0	9,0 $\pm$ 2,0	10,0 $\pm$ 1,0	10,0 $\pm$ 1,0
	konzistence	5,0 $\pm$ 3,0	6,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 1,0	6,0 $\pm$ 3,0
	lepivost	5,0 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 3,0	5,0 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 2,0
	sladkost	5,0 $\pm$ 3,0	5,0 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 2,0	4,5 $\pm$ 3,0	4,0 $\pm$ 2,0
	kyselost	5,5 $\pm$ 3,0	5,0 $\pm$ 1,0	6,0 $\pm$ 1,0	6,0 $\pm$ 2,0	7,0 $\pm$ 2,0
	ovocitost	3,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 3,0	5,0 $\pm$ 1,0
	flavour	5,0 $\pm$ 3,0	7,0 $\pm$ 2,0	7,0 $\pm$ 3,0	7,5 $\pm$ 2,0	7,0 $\pm$ 2,0





Obrázek 30: Radarový graf sestavený z mediánů bodového hodnocení dílčích deskriptorů u jednotlivých vzorků doplňku stravy ve formě želatinových bonbonů s extraktem z plodů *Prunus spinosa*.

Z radarového grafu (obrázek 30) je patrné, že z hlediska celkové chuti, resp. flavouru byl nejlépe hodnocen vzorek M15, který obsahoval 15 % trnkového extraktu. Tento vzorek byl dále vysoce hodnocen v parametrech vzhled a barva. Vzorek M20, který obsahoval 20 % trnkového extraktu, byl hodnocen jako nejkyselejší a současně jako nejméně sladký. Vyšší kyselost vzorku byla pravděpodobně způsobena množstvím přidaného extraktu a sladkost vzorku byla zřejmě potlačena právě výraznější kyselostí. Naproti tomu vzorek M5, který obsahoval 5 % trnkového extraktu, byl hodnocen jako nejméně kyselý. Taktéž je nutné poznamenat, že v parametru lepivost se vzorky velmi podobaly. Podobnost vzorků obsahujících trnkový extrakt lze zaznamenat též u parametru ovocitost.

Celý dataset byl dále analyzován pomocí neparametrického testu Kruskal-Wallisovy ANOVY s hladinou významnosti  $\alpha = 0,05$  (příloha 19). Použitím hypotézových otázek bylo zjištěno, že mezi předloženými vzorky existuje alespoň jeden statisticky významný rozdíl v parametrech barva, konzistence, sladkost, kyselost, ovocitost a flavour. Lepivostí ( $p$ -value = 0,0800) a vzhledem ( $p$ -value = 0,1048) se hodnocené vzorky nelišily. Statisticky významné rozdíly v jednotlivých parametrech, resp. deskriptorech, mezi vzorky byly identifikovány pomocí metody vícenásobného srovnání taktéž s hladinou významnosti  $\alpha = 0,05$  (příloha 20). Například vzorek M5 se statisticky významně liší z hlediska parametru barva a kyselost jak od vzorku M15, tak od vzorku M20. Dále byla zaznamenána statisticky významná odlišnost vzorku M5 od vzorku M20 v parametru sladkost a vzorku M5 od vzorku M10 v konzistenci. Z mean ranku Kruskal-Wallisovy ANOVY (příloha 19) bylo zjištěno, že vzorek M20 byl nejvýše hodnocen v parametrech barva, lepivost, kyselost a ovocitost. Naproti tomu byl nejnižší hodnocen v parametru sladkost. Nejvyšší hodnocení v parametru sladkost získal vzorek M5, který byl dále nejvýše hodnocen v parametru konzistence. Nejvyššího hodnocení v parametrech vzhled a flavour, resp. celková chuť, získal vzorek M15.

Po analýze rozptylu byla na dataset aplikována korelační analýza podle Spearmana, z níž byly zjištěny vztahy mezi jednotlivými hodnocenými parametry, resp. deskriptory. Vypočítané hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu pro jednotlivé deskriptory jsou uvedeny v tabulce 33, přičemž statisticky významné korelace jsou znázorněny červenou barvou. Z výsledků korelační analýzy byly zjištěny dvě středně silné kladné korelace, a to mezi deskriptory flavour a ovocitost a mezi parametry vzhled a barva. Z toho lze usoudit, že vzorky, které byly kladně hodnoceny z hlediska ovocitosti, získaly lepší hodnocení také z pohledu celkové chuti, tedy flavouru. U druhé korelace lze říci, že barva vzorku měla vliv na pozitivní hodnocení celkového vzhledu. Ostatní zjištěné korelace byly pouze slabé kladného charakteru (tj. vzhled – ovocitost, barva – kyselost, barva – ovocitost, konzistence – lepivost, konzistence – sladkost, konzistence – kyselost, konzistence – ovocitost, lepivost – kyselost, sladkost – ovocitost, sladkost – flavour a kyselost – ovocitost). Ze slabých kladných korelací je zajímavá souvztažnost sladkosti a flavouru. Z toho vyplývá, že vzorky které byly výše hodnoceny v parametru sladkost, získaly vyšší hodnocení celkové chuti (flavouru).

Tabulka 33: Spearmanova korelační analýza hodnocených deskriptorů.

	vzhled	barva	konzistence	lepivost	sladkost	kyselost	ovocitost	flavour
vzhled	1,000	0,436	0,068	0,052	0,065	0,071	0,179	0,105
barva	0,436	1,000	0,036	0,012	-0,096	0,259	0,268	0,146
konzistence	0,068	0,036	1,000	0,272	0,179	0,285	0,242	0,008
lepivost	0,052	0,012	0,272	1,000	0,034	0,203	0,162	0,099
sladkost	0,065	-0,096	0,179	0,034	1,000	-0,055	0,243	0,221
kyselost	0,071	0,259	0,285	0,203	-0,055	1,000	0,294	-0,060
ovocitost	0,179	0,268	0,242	0,162	0,243	0,294	1,000	0,512
flavour	0,105	0,146	0,008	0,099	0,221	-0,060	0,512	1,000

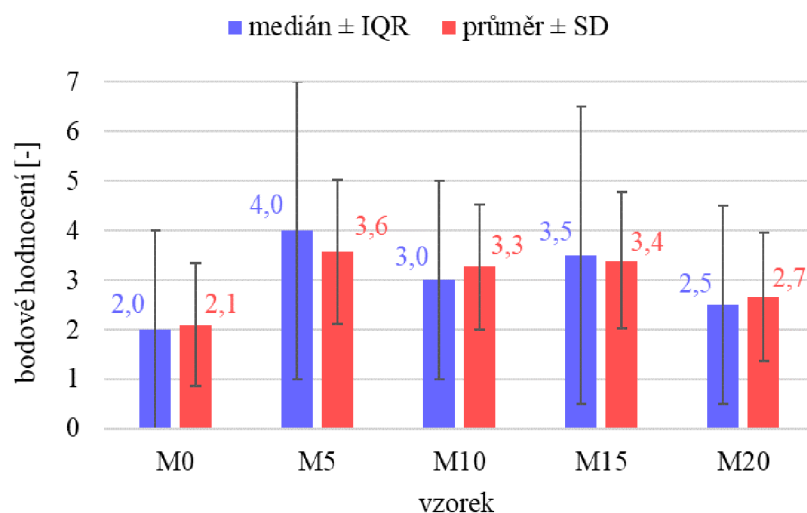
#### 4.5.3 Vyhodnocení pořadové zkoušky

Po profilovém hodnocení jednotlivých deskriptorů následovala pořadová zkouška, jejímž prostřednictvím byla hodnocena celková přijatelnost předložených vzorků. Vzorky byly hodnotiteli seřazeny dle individuálních preferencí od nejvíce přijatelného po nejméně přijatelný, a to přiřazením celého čísla od 1 do 5, přičemž nejhoršímu vzorku byla přiřazena hodnota 1 a nejlepšímu vzorku hodnota 5.

Všechna data z pořadové zkoušky byla statisticky zpracována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (příloha 21). Pomocí Grubbsova testu, bylo ověřeno, že se v datasetu nevyskytují odlehle hodnoty. Následně bylo pomocí Shapiro-Wilkova testu zjištěno, že jsou data nenormálně distribuovaná. Z tohoto důvodu byly pro další statistické analýzy použity neparametrické testy a namísto průměru se směrodatnou odchylkou (SD) byl použit medián s interkvartilovým rozpětím (IQR). Dále byla na skupinu dat aplikována neparametrická Kruskal-Wallisova ANOVA, z níž bylo zjištěno, že v bodovém hodnocení vzorků existuje alespoň jeden statisticky významný rozdíl. Z grafického zobrazení výsledků pořadové zkoušky (obrázek 31) je patrné, že nejvyššího bodového hodnocení dosáhl vzorek M5, který obsahoval 5 % trnkového extraktu. Druhým nejlépe hodnoceným vzorkem z hlediska preferencí hodnoti-



telů byl vzorek M15 obsahující 15 % trnkového extraktu. Dále v pořadí následoval vzorek M10 s 10 % trnkového extraktu a vzorek M20 s 20 % trnkového extraktu. Nejhůře hodnoceným byl vzorek bez trnkového extraktu M0.



Obrázek 31: Vliv množství přidaného trnkového extraktu na spotřebitelskou přijatelnost vzorku. Data jsou uvedena jako průměr se směrodatnou odchylkou (SD), resp. jako medián s interkvartilovým rozpětím (IQR).

Při srovnání výsledků z pořadové zkoušky s výsledky hodnocení senzoričského profilu je zřejmé, že vzorky obsahující trnkový extrakt (M5, M10, M15, M20) byly v porovnání se standardem (M0), který trnkový extrakt neobsahoval, hodnoceny výrazně lépe. Zajímavostí je to, že v pořadovém testu byl nejlépe hodnocen vzorek M5, zatímco při hodnocení deskriptoru celková chuť, resp. flavour, byl nejlépe hodnocen vzorek M15, který se v pořadovém testu umístil na druhém místě.

## 5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla příprava a následná charakterizace ethanolového extraktu a doplňků stravy na bázi bioaktivních látek získaných z plodů trnky obecné (*Prunus spinosa*). V rámci této práce byly připraveny dva typy doplňků stravy, a to želatinové bonbóny s extraktem z plodů trnky obecné a želatinové kapsle plněné práškem z lyofilizovaných plodů. Součástí práce bylo také studium vlivu způsobu uchování, resp. konzervace, plodů na obsah vybraných bioaktivních látek, a to se záměrem zvolit vhodný způsob uchování plodů před jejich dalším zpracováním.

V první fázi práce byl sledován vliv mrazení, lyofilizace a konvenčního sušení na obsah celkových polyfenolů, flavonoidů a anthokyanů, a antioxidační aktivitu plodů *Prunus spinosa*. Jako kontrolní vzorek sloužily čerstvé plody trnky obecné (sběr v roce 2022 v Otrokovicích). Nejvyšší koncentrace celkových polyfenolů ( $57,49 \pm 0,33$  mg GAE/g DW) i anthokyanů ( $6,41 \pm 0,19$  mg CGE/g DW) byla kvantifikována u lyofilizovaných plodů. Čerstvé plody zase vykazovaly nejvyšší koncentraci flavonoidů ( $46,98 \pm 0,21$  mg CAE/g DW) a antioxidační aktivitu ( $519,64 \pm 2,12$   $\mu$ mol TE/g DW). Spojitost mezi flavonoidními látkami a antioxidační aktivitou byla pozorována také prostřednictvím korelace, kdy u analyzovaných vzorků byla mezi těmito parametry zaznamenána statisticky významná středně silná kladná korelace (0,641). Z konzervovaného materiálu nejvyšší koncentraci flavonoidů vykazaly opět lyofilizované plody ( $45,75 \pm 0,12$  mg CAE/g DW), avšak nejvyšší antioxidační aktivita ( $281,72 \pm 0,70$   $\mu$ mol TE/g DW) byla zaznamenána u plodů mrazených. S přihlédnutím na prostorové, energetické a finanční nároky na další skladování konzervovaného materiálu se lyofilizace jeví jako vhodný způsob uchování plodů PsL před jejich dalším zpracováním. Analyzovány byly také plody mrazírensky skladované po dobu 1 roku (sběr v roce 2021 v Kroměříži). Při srovnání těchto plodů s plody čerstvými z roku 2022 se ukázalo, že plody z roku 2021 i po jednom roce mrazírenského skladování obsahovaly vyšší koncentrace celkových polyfenolů ( $64,42 \pm 0,26$  mg GAE/g DW) a anthokyanů ( $5,14 \pm 0,05$  mg CGE/g DW). Koncentrace celkových flavonoidů a antioxidační aktivita byly velmi blízké hodnotám stanoveným u čerstvých plodů z roku 2022. Z toho bylo usouzeno, že v roce 2021 v Kroměříži byly pro růst plodů PsL, co se do obsahu bioaktivních látek týče, lepší podmínky než v roce 2022 v Otrokovicích.

V další fázi práce byl z čerstvých plodů trnky obecné a 40% konzumního lihu připraven ethanolový extrakt, u kterého byly kvantifikovány polyfenoly ( $2111,39 \pm 11,32$  mg GAE/l), flavonoidy ( $903,89 \pm 5,08$  mg CAE/l) a anthokyany ( $165,24 \pm 0,38$  mg CGE/l). Antioxidační aktivita ethanolového extraktu byla metodou TEAC s kation-radikálem ABTS stanovena na  $11,99 \pm 0,40$  mmol TE/l. Pomocí jednoduché diluční metody a ELISA readeru byl u extraktu prokázán antibakteriální efekt proti grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus* i gramnegativní bakterii *Escherichia coli*, avšak vůči kvasině *Candida glabrata* neúčinkoval. U ethanolového extraktu byl taktéž stanoven profil fenolických látek, kdy se podařilo metodou HPLC/DAD identifikovat kyselinu gallovou a vanilovou, katechin a kvercetin-3-glukosid. Lze však předpokládat, že extrakt obsahoval další fenolické látky, jako je kyselina chlorogenová, kyselina kávová, epikatechin, pelargonidin-3-glukosid a hesperidin, neboť se tyto látky

podářilo identifikovat v produktech, kde byl jediným zdrojem fenolických látek právě extrakt z plodů *Prunus spinosa*. Metodou HPLC/DAD byly v extraktu dále identifikovány a kvantifikovány jednoduché cukry, a to glukóza (33,40 g/l) a fruktóza (11,39 g/l).

Po šetrném zahuštění na vakuové odparce byl extrakt použit při přípravě doplňku stravy ve formě želatinových bonbonů. S cílem optimalizovat přídavek extraktu do želatinové matrice byly bonbony s různou koncentrací extraktu (5, 10, 15 a 20 %) podrobeny sensorické analýze, která se skládala z profilového hodnocení a pořadové zkoušky. Po statistickém vyhodnocení získaných dat bylo zjištěno, že hodnotitelé z pohledu celkové chuti, resp. flavouru, preferovali vzorek s 15 % extraktu. V pořadové zkoušce se tento vzorek umístil na druhém místě, a to za vzorkem s 5 % extraktu, avšak ten pro změnu získal horší hodnocení řady deskriptorů v profilovém hodnocení. Vezmeme-li v potaz vyšší obsah bioaktivních látek, je optimálním přídavkem extraktu jednoznačně přídavek 15 %.

Oba typy vyrobených doplňků stravy (tj. želatinové bonbony s extraktem a želatinové kapsle s práškem z lyofilizovaných plodů) byly charakterizovány z pohledu jak nutričního složení (tj. sušina a vlhkost, sacharidy, cukry, vláknina, bílkoviny, tuky, popel a energetická hodnota), tak obsahu celkových polyfenolů, flavonoidů, anthokyanů, profilu fenolických látek a antioxidační aktivity. Obsah sušiny, resp. vlhkosti, se u želatinových bonbonů pohyboval v rozmezí 88,39–90,51 g/100 g, resp. 9,49–11,61 g/100 g produktu. 100 g želé bonbonů určených ke konzumaci obsahovalo 81,47–83,59 g sacharidů, z toho 76,08–81,13 g cukrů, dále <0,10 g vlákniny, 6,68 g bílkovin, < 0,10 g tuků a 0,25±0,02 g popela. Energetická hodnota se pohybovala v rozmezí 352,59–361,05 kcal/100 g, resp. 1 474–1 509 kJ/100 g. Koncentrace celkových polyfenolů (0,305–1,410 mg GAE/g DW), flavonoidů (0,356–1,301 mg CAE/g DW) a anthokyanů (0,026–0,146 mg CGE/g DW) v želé bonbonech i jejich antioxidační aktivita (0,461–4,870 μmol TE/g DW) byly závislé na množství přidaného extraktu. Ve vzorcích želatinových bonbonů bylo metodou HPLC/DAD identifikováno 9 fenolických látek, a to: kyselina gallová, vanilová, kávová a chlorogenová, katechin, epikatechin, kvercetin-3-glukosid, pelargonidin-3-glukosid a hesperidin.

Výživové údaje byly stanoveny taktéž u náplně kapsle, tedy prášku z lyofilizovaných plodů. Prášek obsahoval 88,82±0,12 g sacharidů, z toho 38,57±0,33 g cukrů, dále 1,96±0,02 g vlákniny, 5,46±0,07 g bílkovin, 0,46±0,04 g tuků a 5,25±0,02 g popela (vše vztaheno na 100 g produktu). Energetická hodnota 100 g náplně byla vypočtena na 381,24±0,14 kcal, resp. 1 594±1 kJ. Spektrofotometrickými metodami byly v náplni kapsle kvantifikovány celkové polyfenoly (57,488±0,329 mg GAE/g DW), flavonoidy (45,748±0,120 mg CAE/g DW) i anthokyany (6,407±0,187 mg CGE/g DW). Dále byla u prášku stanovena antioxidační aktivita (274,750±1,056 μmol TE/g DW) a profil fenolických látek. V porovnání s želé bonbony se u náplně podařilo identifikovat kofein, nezdařilo se však detekovat kyselinu chlorogenovou.

Na závěr bylo u doplňků stravy sledováno uvolňování polyfenolů v průběhu modelového *in vitro* trávení „nalačno“. Z želatinové matrice se veškeré polyfenoly uvolnily již během 30minutové inkubace v umělé žaludeční šťávě (SGF). U vzorku kapsle bylo dosaženo maximální koncentrace polyfenolů v trávicí šťávě až po 60 minutách inkubace, poté následoval výrazný pokles koncentrace, který byl pravděpodobně důsledkem degradace některých fenolických látek v zásaditých podmínkách umělé střevní šťávy (SIF).

Z výsledků práce vyplývá, že oba typy připravených doplňků stravy na bázi bioaktivních látek získaných z plodů trnky obecné jsou cennými zdroji řady fenolických a flavonoidních sloučenin, anthokyanových barviv a antioxidantů. Tyto látky jsou často spojovány s řadou protektivních a preventivních účinků, a tak může být pravidelná konzumace těchto produktů přínosná pro zdraví spotřebitelů. Doplňky stravy mohou být také způsobem, jak dostat bioaktivní látky plodů *Prunus spinosa* do jídelníčku mnoha lidí, včetně dětí. Plody trnky obecné mohou být v nutraceutickém průmyslu využity také jako aktivní aditiva zvyšující jak bioaktivní, tak i nutriční kvalitu již existujících suplementů.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ČESKO. Zákon č. 110/1997 Sb. ze dne 24. dubna 1997 o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. In: Sbírnka zákonů České republiky. 1997. [cit. 2022-11-24]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-110>
- [2] FLYNN, Jack. 25 Fascinating Supplements Industry Statistics 2023: Data + Trends. In: *ZIPPIA: The Career Expert* [online]. 20 Mar 2023 [cit. 2023-04-26]. Dostupné z: <https://www.zippia.com/advice/supplements-industry-statistics/>
- [3] PHOENIX, Sam. Vitamin and Supplement Industry Statistics 2023: Surprising Facts & Data. In: *Great Green Wall* [online]. Pennsylvania, USA, 9 February 2023 [cit. 2023-04-26]. Dostupné z: <https://www.greatgreenwall.org/supplements/vitamin-and-supplement-industry-statistics/>
- [4] PHOENIX, Sam. Dietary Supplement Statistics: US 2023. In: *Great Green Wall* [online]. Pennsylvania, USA, 4 February 2023 [cit. 2023-04-26]. Dostupné z: <https://www.greatgreenwall.org/supplements/dietary-supplement-statistics/>
- [5] HEJNÝ, Slavomil, Bohumil SLAVÍK, Jan KIRSCHNER a Bohdan KŘÍSA. *Květena České republiky*. 3. Praha: Academia, 1992, 542 s. ISBN 80-200-0256-1. Dostupné také z: <https://pladias.cz/taxon/flora/Prunus%20spinosa>
- [6] BARROS, Lillian, Ana Maria CARVALHO, Jorge Sá MORAIS a Isabel C.F.R. FERREIRA. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry* [online]. 2010, **120**(1), 247-254 [cit. 2022-04-24]. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.016>
- [7] MARAKOĞLU, Tamer, Derya ARSLAN, Musa ÖZCAN a Haydar HACISEFEROĞULLARI. Proximate composition and technological properties of fresh blackthorn (*Prunus spinosa* L. subsp. *dasyphylla* (Schur.)) fruits. *Journal of Food Engineering* [online]. 2005, **68**(2), 137-142 [cit. 2022-04-24]. ISSN 02608774. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.024>
- [8] ÖZCAN, Tamer. Fatty acid and amino acid profiles in the fruits of *Prunus spinosa* L. subsp. *dasyphylla* (Schur) Domin from Europe-in Turkey. *Advances in Molecular Biology* [online]. 2008, (1), 39-46 [cit. 2022-05-23]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/303924466\\_Fatty\\_acid\\_and\\_amino\\_acid\\_profiles\\_in\\_the\\_fruits\\_of\\_Prunus\\_spinosa\\_L\\_subsp\\_dasyphylla\\_Schur\\_Domin\\_from\\_Europe-in-Turkey](https://www.researchgate.net/publication/303924466_Fatty_acid_and_amino_acid_profiles_in_the_fruits_of_Prunus_spinosa_L_subsp_dasyphylla_Schur_Domin_from_Europe-in-Turkey)

- [9] ÖZKAN, Gursel. Phenolic Compounds, Organic Acids, Vitamin C And Antioxidant Capacity In *Prunus Spinosa* L. Fruits. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* [online]. Academic Publishing House, 2019, 2019, **72**(2), 267-273 [cit. 2022-05-23]. ISSN 1310-1331. DOI:10.7546/CRABS.2019.02.17. Dostupné z: [http://www.proceedings.bas.bg/DOI/doi2019\\_2\\_17.html](http://www.proceedings.bas.bg/DOI/doi2019_2_17.html)
- [10] SIKORA, Elzbieta, Malgorzata BIENIEK a Barbara BORCZAK. Composition and antioxidant properties of fresh and frozen stored blackthorn fruits (*Prunus spinosa* L.). *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* [online]. 2013, 2013, **12**(4), 365-372 [cit. 2022-05-23]. Dostupné z: <https://www.food.actapol.net/volume12/issue4/abstract-3.html>
- [11] SABATINI, Luigia, Daniele FRATERNALE, Barbara DI GIACOMO, et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity of *Prunus spinosa* L. fruit ethanol extract. *Journal of Functional Foods* [online]. 2020, **67** [cit. 2022-05-05]. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103885>
- [12] VELICKOVIC, Ivona, Zeljko ZIZAK, Nemanja RAJCEVIC, Marija IVANOV, Marina SOKOVIC, Petar MARIN a Slavica GRUJIC. Examination of the polyphenol content and bioactivities of *Prunus spinosa* L. fruit extracts. *Archives of Biological Sciences* [online]. 2020, **72**(1), 105-115 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0354-4664. Dostupné z: <https://doi.org/10.2298/ABS191217004V>
- [13] POZZO, Luisa, Rossella RUSSO, Stefania FRASSINETTI, et al. Wild Italian *Prunus spinosa* L. Fruit Exerts In Vitro Antimicrobial Activity and Protects Against In Vitro and In Vivo Oxidative Stress. *Foods* [online]. 2020, **9**(1) [cit. 2022-03-29]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods9010005>
- [14] MESCHINI, Stefania, Evelin PELLEGRINI, Maria CONDELLO, Giovanni OCCHIONERO, Sebastiano DELFINE, Giancarlo CONDELLO a Franco MASTRODONATO. Cytotoxic and Apoptotic Activities of *Prunus spinosa* Trigno Ecotype Extract on Human Cancer Cells. *Molecules* [online]. 2017, **22**(9) [cit. 2022-07-16]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules22091578>
- [15] MURATI, T., M. MILETIĆ, A. ŠTEFANKO, I. LANDEKA JURČEVIĆ, I. ELEZ GAROFULIĆ, V. DRAGOVIĆ-UZELAC a I. KMETIČ. Comparative assessment of *Prunus spinosa* L. flower extract in non-neoplastic hepatocytes and hepatoblastoma cells. *South African Journal of Botany* [online]. 2019, **123**, 36-42 [cit. 2022-03-29]. ISSN 02546299. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.02.006>
- [16] KUBÁT, Karel, Lubomír HROUDA, Jindřich CHRTEK, Zdeněk KAPLAN, Jan KIRSCHNER a Jan ŠTĚPÁNEK, ed. *Klíč ke květeně České republiky*. Praha: Academia, 2002, 627 s. ISBN 80-200-0836-5.
- [17] RANDUŠKA, Dušan, Ladislav ŠOMŠÁK a Izabela HÁBEROVÁ. *Barevný atlas rostlin*. 2.vyd. Bratislava: Obzor, 1983, 638 s.

- [18] KVASNIČKOVÁ, Danuše a Šárka BRTNOVÁ. *ROSTLINY naší přírody – atlas rostlin*. Praha: Blug, 1998, 60 s. ISBN 80-856-3593-3.
- [19] Schlehdorn Prunus Spinosa. In: *Pixabay* [online]. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: [https://cdn.pixabay.com/photo/2016/09/28/21/25/blackthorn-1701517\\_960\\_720.jpg](https://cdn.pixabay.com/photo/2016/09/28/21/25/blackthorn-1701517_960_720.jpg)
- [20] RHODES L. a N. MAXTED. Prunus spinosa, Blackthorn. *The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T172194A19400568* [online]. 2016 [cit. 2022-03-29]. ISSN 2307-8235. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T172194A19400568.en>
- [21] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin I*. Tábor: OSSIS, 1999, 328 s. ISBN 80-902391-3-7.
- [22] ÖZCAN, Tamer. Some vitamin and organic acid contents in the fruits of Prunus spinosa L. subsp. dasyphylla (Schur) Domin from Europe-in Turkey. *IUFS Journal of Biology* [online]. 2008, **67**(2), 105-114 [cit. 2022-05-23]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Tamer-Oezcan/publication/228374401\\_Some\\_vitamin\\_and\\_organic\\_acid\\_contents\\_in\\_the\\_fruits\\_of\\_Prunus\\_spinosa\\_L\\_subsp\\_dasyphylla\\_Schur\\_Domin\\_from\\_Europe-in-Turkey](https://www.researchgate.net/profile/Tamer-Oezcan/publication/228374401_Some_vitamin_and_organic_acid_contents_in_the_fruits_of_Prunus_spinosa_L_subsp_dasyphylla_Schur_Domin_from_Europe-in-Turkey)
- [23] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin II*. Tábor: OSSIS, 1999, 304 s. ISBN 80-902-3914-5.
- [24] TAHIROVIĆ, A., N. BAŠIĆ a A. ČOPRA-JANIĆIJEVIĆ. Effect of solvents on phenolic compounds extraction and antioxidant activity of Prunus spinosa L. fruits. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* [online]. Bosnia and Herzegovina, 2018, (50), 19-24 [cit. 2022-05-05]. ISSN 2232-7266. Dostupné z: [http://www.pmf.unsa.ba/hemija/glasnik/files/Issue%2050/5-19-24-Tahirovi\\_A.pdf](http://www.pmf.unsa.ba/hemija/glasnik/files/Issue%2050/5-19-24-Tahirovi_A.pdf)
- [25] STANKOVIĆ, Milica I., Vesna Lj. SAVIĆ, Jelena V. ŽIVKOVIĆ, Vanja M. TADIĆ a Ivana A. ARSIĆ. Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Activity of Wild Prunus spinosa L. Fruit Extracts as Natural Source of Bioactive Compounds. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* [online]. 2019, **47**(3) [cit. 2022-05-05]. ISSN 1842-4309. Dostupné z: <https://doi.org/10.15835/nbha47311425>
- [26] VELICKOVIC, Jasmina M., Danijela A. KOSTIC, Gordana S. STOJANOVIC, Snežana S. MITIC, Milan N. MITIC, Saša S. RANDJELOVIC a Aleksandra S. DJORDJEVIC. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from Prunus spinosa L. fruit. *Hemijska industrija* [online]. 2014, **68**(3), 297-303 [cit. 2022-05-05]. ISSN 0367-598X. Dostupné z: <https://doi.org/10.2298/HEMIND130312054V>
- [27] V. GONZÁLEZ-DE-PEREDO, Ana, Mercedes VÁZQUEZ-ESPINOSA, Estrella ESPADA-BELLIDO, et al. Optimization of Analytical Ultrasound-Assisted Methods for the Extraction of Total Phenolic Compounds and Anthocyanins from Sloes (Prunus spinosa L.). *Agronomy* [online]. 2020, **10**(7) [cit. 2022-05-05]. ISSN 2073-4395. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/agronomy10070966>



- [28] JABŁOŃSKA-RYŚ, Ewa, Marta ZALEWSKA-KORONA a Janusz KALBARCZYK. Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* [online]. Polsko, 2009, **17**(2), 115-120 [cit. 2022-05-23]. Dostupné z: [http://www.inhort.pl/files/journal\\_pdf/journal2009\\_2/full11%202009\(2\).pdf](http://www.inhort.pl/files/journal_pdf/journal2009_2/full11%202009(2).pdf)
- [29] CHAI, Qianqian, Benhong WU, Weisheng LIU, et al. Volatiles of plums evaluated by HS-SPME with GC-MS at the germplasm level. *Food Chemistry* [online]. 2012, **130**(2), 432-440 [cit. 2022-10-06]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.127
- [30] COMPEAN, K.L. a R.A. YNALVEZ. Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant* [online]. 2014, **8**(5), 204-213 [cit. 2022-05-25]. ISSN 18193455. Dostupné z: <https://doi.org/10.3923/rjmp.2014.204.213>
- [31] KAMILOGLU, Senem, Merve TOMAS, Tugba OZDAL, Perihan YOLCI-OMEROGLU a Esra CAPANOGLU. Bioactive component analysis. *Innovative Food Analysis* [online]. Elsevier, 2021, 2021, 41-65 [cit. 2022-07-01]. ISBN 9780128194935. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819493-5.00002-9
- [32] SANTOS, Diana I., Jorge Manuel Alexandre SARAIVA, António A. VICENTE a Margarida MOLDÃO-MARTINS. Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds* [online]. Elsevier, 2019, 2019, 23-54 [cit. 2022-07-01]. ISBN 9780128141748. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814174-8.00002-0
- [33] CAZARIN, Cinthia Baú Betim, Juliano Lemos BICAS, Glaucia Maria PASTORE a Mario Roberto MAROSTICA JUNIOR. Introduction. *Bioactive Food Components Activity in Mechanistic Approach* [online]. Elsevier, 2022, 2022, 1-3 [cit. 2022-07-01]. ISBN 9780128235690. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-823569-0.00004-7
- [34] MERCOVÁ, Miroslava. *Optimalizace diagnostických metod oxidačního stresu* [online]. Hradec Králové, 2013 [cit. 2022-07-24]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/56513/150018501.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Rigorózní práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie. Vedoucí práce Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.
- [35] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK IN VITRO. *Chemické Listy* [online]. 2004, 2004, **98**(4), 174-179 [cit. 2022-07-24]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2144/2144>

- [36] KOPŘIVA, Vladimír. *Antioxidační aktivita potravin: Doplnkový studijní materiál* [online]. 2011 [cit. 2022-07-24]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/ANTIOXIDA%C8N%CD-KAPACITA-POTRAVIN.pdf>
- [37] MARÍA RUIZ-RODRÍGUEZ, Brígida, Begoña DE ANCOS, Concepción SÁNCHEZ-MORENO, Virginia FERNÁNDEZ-RUIZ, María DE CORTES SÁNCHEZ-MATA, Montaña CÁMARA a Javier TARDÍO. Wild blackthorn ( *Prunus spinosa* L.) and hawthorn ( *Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits* [online]. 2014, **69**(1), 61-73 [cit. 2022-08-01]. ISSN 0248-1294. Dostupné z: doi:10.1051/fruits/2013102
- [38] GANHÃO, Rui, Mario ESTÉVEZ, Petri KYLLI, Marina HEINONEN a David MORCUENDE. Characterization of Selected Wild Mediterranean Fruits and Comparative Efficacy as Inhibitors of Oxidative Reactions in Emulsified Raw Pork Burger Patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, **58**(15), 8854-8861 [cit. 2022-08-01]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf101646y
- [39] Clinical Microbiology: Open Access. *Walsh Medical Media* [online]. [cit. 2022-05-24]. ISSN 2327-5073. Dostupné z: <https://www.walshmedicalmedia.com/scholarly/antimicrobial-activity-journals-articles-ppts-list-3252.html>
- [40] Minimum Inhibitory (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) Evaluations as R&D Tools. *Q Laboratories* [online]. [cit. 2022-05-24]. Dostupné z: <https://www.qlaboratories.com/minimum-inhibitory-mic-and-minimum-bactericidal-concentration-abc-evaluations-as-rd-tools/>
- [41] MUNI. *Přehled antimikrobiálních látek*. Brno, 2006, 5 s. Dostupné také z: [https://is.muni.cz/el/med/jaro2004/BZKM021p/um/Prehled\\_antimikrobiálních\\_latek.pdf](https://is.muni.cz/el/med/jaro2004/BZKM021p/um/Prehled_antimikrobiálních_latek.pdf)
- [42] DEDIĆ, A., H. DŽUDŽEVIĆ-ČANČAR, A. ALISPAHIĆ, I. TAHIROVIĆ a E. MURATOVIĆ. IN-VITRO ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AERIAL PARTS OF PRUNUS SPINOSA L. GROWING WILD IN BOSNIA AND HERZEGOVINA. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* [online]. 2021, 01 July 2021, **12**(7), 3643-3653 [cit. 2022-05-24]. ISSN 0975-8232. Dostupné z: [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12\(7\).3643-53](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12(7).3643-53)
- [43] GEGIU, G., A. BRANZA, L. BUCUR, M. GRIGORIAN, T. TACHE a V. BADEA. Contributions to the antimicrobial and antifungal study of the aqueous extract of *Prunus spinosa* L. *FARMACIA* [online]. Rumunsko, 2015, 2015, **63**(2), 275-279 [cit. 2022-05-25]. ISSN 2065-0019. Dostupné z: [https://farmaciajournal.com/wp-content/uploads/2015-02-art-18-Gegiu\\_275-279.pdf](https://farmaciajournal.com/wp-content/uploads/2015-02-art-18-Gegiu_275-279.pdf)
- [44] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin I*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 300 s. ISBN 80-708-0509-9.

- [45] DRDÁK, Milan. *Technológia rastlinných neúdržných potravín*. Bratislava: Alfa, 1989, 304 s. ISBN 80-050-0121-5.
- [46] KADLEC, Pavel. *Procesy potravinářských a biochemických výrob*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003, 308 s. ISBN 80-708-0527-7.
- [47] BONDOC, Marian. Theoretical research on forest fruit conservation by lyophilization. *Bulletin of the Transilvania University of Brasov, Series II: Forestry, Wood Industry, Agricultural Food Engineering* [online]. Rumunsko, 2017, **10**(59), 71-78 [cit. 2022-03-30]. ISSN 2065-2135. Dostupné z: [http://webbut2.unitbv.ro/bulletin/series%20II/2017/BULETIN%20I/08\\_Bondoc.pdf](http://webbut2.unitbv.ro/bulletin/series%20II/2017/BULETIN%20I/08_Bondoc.pdf)
- [48] MURÁNYI, Andrej a Mária VITKOVÁ. Lyofilizácia liečiv na báze proteínov. *Česká a slovenská farmacie* [online]. 2014, **63**(5), 199-205 [cit. 2022-03-30]. ISSN 1805-4439. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2014-5-4/lyofilizacia-liecv-na-baze-proteinov-50059>
- [49] GULATI, Om P. a Peter BERRY OTTAWAY. Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products. *Toxicology* [online]. 2006, **221**(1), 75-87 [cit. 2022-11-19]. ISSN 0300483X. Dostupné z: [doi:10.1016/j.tox.2006.01.014](https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.01.014)
- [50] ČESKO. Vyhláška č. 58/2018 Sb. ze dne 29. března 2018 o doplňcích stravy a složení potravin. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2018. [cit. 2022-11-24]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-58?text=58%2F2018+Sb>
- [51] Nařízení Komise (ES) č. 1170/2009 ze dne 30. listopadu 2009, kterým se mění směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/46/ES a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1925/2006, pokud jde o seznamy vitaminů a minerálních látek a jejich forem, které lze přidávat do potravin, včetně doplňků stravy. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2009. [cit. 2022-11-24]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32009R1170&qid=1669312574081>
- [52] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1935/2004 ze dne 27. října 2004 o materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami a o zrušení směrnic 80/590/EHS a 89/109/EHS. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2004. [cit. 2022-11-24]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32004R1935&qid=1669312842903>
- [53] ČESKO. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 38/2001 Sb. ze dne 19. ledna 2001 o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2001. [cit. 2022-11-24]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2001-38>

- [54] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a o zrušení směrnice Komise 87/250/EHS, směrnice Rady 90/496/EHS, směrnice Komise 1999/10/ES, směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES, směrnic Komise 2002/67/ES a 2008/5/ES a nařízení Komise (ES) č. 608/2004 Text s významem pro EHP. In: Úřední věstník Evropské unie. 2006. [cit. 2022-11-24]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32011R1169&qid=1669313356273>
- [55] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 ze dne 20. prosince 2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin. In: Úřední věstník Evropské unie. 2006. [cit. 2022-11-24]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32006R1924&qid=1669313494156>
- [56] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1925/2006 ze dne 20. prosince 2006 o přidávání vitaminů a minerálních látek a některých dalších látek do potravin. In: Úřední věstník Evropské unie. 2006. [cit. 2022-11-24]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32006R1925&qid=1669313671686>
- [57] ČESKO. Zákon č. 174/2021 Sb., kterým se mění zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a další související zákony. In: Sbírka zákonů České republiky. 2021. [cit. 2022-11-24]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2021-174>
- [58] Spektrum Gummies Imunita s echinaceou 60 tablet. In: *Dr.Max: lékárna* [online]. [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: [https://www.drmax.cz/walmart-spektrum-gummies-imunita-s-echinaceou-tbl-60?gclid=Cj0KCQiA99ybBhD9ARIsALvZavVKFnXfvHDPDuxNTI0SA3opiN4UcnYq54EA09IUFOHjIVk5bGdf2Y0aAmY1EALw\\_wcB](https://www.drmax.cz/walmart-spektrum-gummies-imunita-s-echinaceou-tbl-60?gclid=Cj0KCQiA99ybBhD9ARIsALvZavVKFnXfvHDPDuxNTI0SA3opiN4UcnYq54EA09IUFOHjIVk5bGdf2Y0aAmY1EALw_wcB)
- [59] Maxi Vita Kids Multivitamin želé. In: *VITAR, s.r.o.: Vitamíny, minerální látky, doplňky stravy* [online]. [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: <https://www.vitar.cz/maxivita-kids-multivitamin-zele/>
- [60] Bears With Benefits Ah-mazing Hair Vitamins mit Biotin sugarfree 60 ks. In: *Dr.Max: lékárna* [online]. [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: [https://www.drmax.cz/bears-with-benefits-ah-mazing-hair-vitamins-mit-biotin-sugarfree-60-ks?gclid=Cj0KCQiA99ybBhD9ARIsALvZavWcqfxhMXOrUL3e4T5IStYq45k6qQYgZVCi465Sq6zcD9uLUQFQfJ0aAt6qEALw\\_wcB](https://www.drmax.cz/bears-with-benefits-ah-mazing-hair-vitamins-mit-biotin-sugarfree-60-ks?gclid=Cj0KCQiA99ybBhD9ARIsALvZavWcqfxhMXOrUL3e4T5IStYq45k6qQYgZVCi465Sq6zcD9uLUQFQfJ0aAt6qEALw_wcB)
- [61] Sambucus Immuno Kids želatinové bonbony 60 ks. In: *Dr.Max: lékárna* [online]. [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: [https://www.drmax.cz/sambucus-immuno-kids-zelatinove-bonbony-60-ks?gclid=Cj0KCQiA99ybBhD9ARIsALvZavU9l5xbnmEPq6I6h71x8I8MguzdfW5qezZVNfxa68SYdfuaxyFifiAaAjcqEALw\\_wcB](https://www.drmax.cz/sambucus-immuno-kids-zelatinove-bonbony-60-ks?gclid=Cj0KCQiA99ybBhD9ARIsALvZavU9l5xbnmEPq6I6h71x8I8MguzdfW5qezZVNfxa68SYdfuaxyFifiAaAjcqEALw_wcB)

- [62] VENIRA gumoví medvídci pro vlasy, nehty a pleť: jahoda. In: *VENIRA: komplexní péče o krásu a zdraví* [online]. [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: [https://www.venira.cz/venira-gumovi-medvidci-pro-vlasy-nehty-a-plet/?gclid=Cj0KCQiA99ybBhD9ARIsALvZavUyO5EqdCIWNfTcQzvGpq01b1W1UkVpfx3amggmMdQa5jFt4bJNy60aAj7eEALw\\_wcB](https://www.venira.cz/venira-gumovi-medvidci-pro-vlasy-nehty-a-plet/?gclid=Cj0KCQiA99ybBhD9ARIsALvZavUyO5EqdCIWNfTcQzvGpq01b1W1UkVpfx3amggmMdQa5jFt4bJNy60aAj7eEALw_wcB)
- [63] Rakytříček Multivitaminové želatinky s rakytříčkem příchut' hruška 70 ks. In: *Dr.Max: lékárna* [online]. [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/rakytreckek-multivit-zelatinky-s-rakyt-hruska-70ks>
- [64] Nuvi Health Přírodní Vitamin C komplex 240 - extrakt z aceroly a šípku. In: *Nature for Life* [online]. [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: [https://www.natureforlife.cz/nuvi-health-prirodni-vitamin-c-komplex-240-kapsli-extrakt-z-aceroly-a-sipku/?gclid=CjwKCAiAmuKbBhA2EiwAxQnt70usAlCpMBqWwJFMU15YM\\_v6urlmXLwRvkQ7hh6w3ge9Svn7LvIiiBoCiE0QAvD\\_BwE](https://www.natureforlife.cz/nuvi-health-prirodni-vitamin-c-komplex-240-kapsli-extrakt-z-aceroly-a-sipku/?gclid=CjwKCAiAmuKbBhA2EiwAxQnt70usAlCpMBqWwJFMU15YM_v6urlmXLwRvkQ7hh6w3ge9Svn7LvIiiBoCiE0QAvD_BwE)
- [65] Camu Camu BIO 180 kapslí. In: *Zdravý den* [online]. [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: [https://www.zdravyden.cz/superpotraviny-bio-25/camu-camu-bio-180-kapsli-238/?gclid=CjwKCAiAmuKbBhA2EiwAxQnt702BivbnSs7S0\\_NglwDAG2gsEPxTamlTuc7X1D88fk289RjTFe4ZhoCp4EQAvD\\_BwE](https://www.zdravyden.cz/superpotraviny-bio-25/camu-camu-bio-180-kapsli-238/?gclid=CjwKCAiAmuKbBhA2EiwAxQnt702BivbnSs7S0_NglwDAG2gsEPxTamlTuc7X1D88fk289RjTFe4ZhoCp4EQAvD_BwE)
- [66] Golden Nature Acai berry 100 kapslí. In: *Pilulka: lepší život* [online]. [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: <https://www.pilulka.cz/golden-nature-acai-berry-100-tablet>
- [67] FutuNatura: Africké mango – výtažek. In: *FutuNatura: vše pro zdravý život* [online]. [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: <https://www.futunatura.cz/divoke-mango>
- [68] Vyhláška č. 76/2003 Sb. ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. [cit. 2022-08-19] In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2003. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-76>
- [69] Technologie výroby čokoládových a nečokoládových cukrovinek: Výroba nečokoládových cukrovinek. In: *Inovace studijních programů AF MENDELU směrem k internacionalizaci studia: Portál e-learningových prezentací* [online]. Brno: Mendelova univerzita v Brně [cit. 2022-08-21]. Dostupné z: [https://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/print.php?page=1437&typ=html](https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1437&typ=html)
- [70] ČOPIKOVÁ, Jana. *Technologie čokolády a cukrovinek*. 2. přepracované a aktualizované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2020. ISBN 978-80-7592- 077-5.
- [71] POKORNÝ, Jan, Zdeňka PANOVSÁ a Helena VALENTOVÁ. *Sensorická analýza potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0329-0.

- [72] JEŽEK, František a Alena SALÁKOVÁ. *Senzorická analýza potravin* [online]. Brno: Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012 [cit. 2022-08-09]. Dostupné z: [https://fvhe.vfu.cz/files/skripta-senzorika\\_2012.pdf](https://fvhe.vfu.cz/files/skripta-senzorika_2012.pdf)
- [73] JEŽEK, František. *Senzorická analýza potravin – Návodů na cvičení* [online]. Brno: Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, 79 s. [cit. 2022-08-09]. ISBN 978-80-7305-725-1. Dostupné z: <https://fvhe2.vfu.cz/files/senzoricka-analyza-potravin---navody-na-cviceni.pdf>
- [74] BUŇKA, František, Jan HRABĚ a Bohumír VOSPĚL, 2008. *Senzorická analýza potravin I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 978-80-7318-628-9.
- [75] TREMLOVÁ, Bohuslava, Martina OŠŤÁDALOVÁ a Alexandra TAUFEROVÁ. *Hygienu a technologie potravin rostlinného původu: hygiena a technologie cukru, cukrovinek, čaje a kávy: návody do cvičení* [online]. Brno: Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012, 53 s. [cit. 2022-08-20] ISBN 978-807-3056-346. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/Hygienu-a-technol.-cukru-cukrovinek.pdf>
- [76] GRAMZA-MICHALOWSKA, Anna a Julita REGULA. Use of tea extracts (*Camelia sinensis*) in jelly candies as polyphenols sources in human diet. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2007, **16**(1), 43-46 [cit. 2022-08-22]. Dostupné z: <https://apjcn.nhri.org.tw/server/APJCN/16%20Suppl%201/43.pdf>
- [77] CHACÓN-GARZA, L.E., D. HERNÁNDEZ-CERVANTES, J.M. VENTURA-SOBREVILLA a J.A. AGUIRRE-JOYA. Sensory analysis of jelly from prickly pear cactus fruit (*Opuntia ficus indica*). *Revista internacional de investigación e innovación tecnológica* [online]. 2020, **8**(44) [cit. 2022-08-22]. ISSN 2007-9753. Dostupné z: <https://www.scielo.org.mx/pdf/riiit/v8n44/2007-9753-riiit-8-44-1.pdf>
- [78] TAPOTUBUN, Alfonsina Marthina, T.E.A.A. MATRUTTY, Elizabeth Juleny TAPOTUBUN a Eirene Grace FRANSINA. The Sensory Characteristic of Caulerpa Jelly Candy Based on The Consumers Acceptance. *Science Nature* [online]. 2018, **1**(1), 15-21 [cit. 2022-08-22]. ISSN 2654-6264. Dostupné z: <https://doi.org/10.30598/SNVol1Iss1pp015-021year2018>
- [79] ALI, R. Marwa, M. Reda MOHAMED a G. Tarek ABEDELMAKSOU. Functional strawberry and red beetroot jelly candies rich in fibers and phenolic compounds. *Food Systems* [online]. Egypt, 2021, **4**(2), 82-88 [cit. 2022-08-23]. ISSN 2618-7272. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-1-82-88>
- [80] ČERVINKOVÁ, Zuzana. *Charakterizace produktů z plodů trnky obecné (*Prunus spinosa*)* [online]. Brno, 2021 [cit. 2023-01-20]. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/129937>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

- [81] RYCHETSKÝ, Matěj. *Aplikace rostlinného extraktu do nečokoládových cukrovinek* [online]. Brno, 2021 [cit. 2023-01-20]. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131319>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.
- [82] AINSWORTH, Elizabeth A a Kelly M GILLESPIE. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* [online]. 2007, **2**(4), 875-877 [cit. 2023-01-30]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- [83] MÁROVÁ, Ivana a Dana VRÁNOVÁ. *Praktikum z biochemie: pracovní sešit*. 2. přeprac. vyd. Brno: Ústav chemie potravin a biotechnologií FCH VUT v Brně, 2016.
- [84] PEKAL, Anna a Krystyna PYRZYNSKA. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods* [online]. 2014, **7**(9), 1776-1782 [cit. 2023-01-31]. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-014-9814-x
- [85] GIUSTI, M.Mónica a Ronald E. WROLSTAD. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* [online]. 2001, **00**(1) [cit. 2023-02-01]. ISSN 2572-5602. Dostupné z: doi:10.1002/0471142913.faf0102s00
- [86] LEE, Jungmin, Robert DURST a Ronald WROLSTAD. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* [online]. 2005, vol.**88**(5), 1269-1278 [cit. 2023-02-03]. ISSN 1944-7922. Dostupné z: <https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/37108/pdf/leejaoac.pdf>
- [87] BÖTTCHER, Juliane, Mareike MARGRAF a Kate MONKS. HPLC Basics - principles and parameteres. In: *KNAUER: Science Together* [online]. Berlín: KNAUER Wissenschaftliche Geräte [cit. 2023-02-17]. Dostupné z: [https://www.knauer.net/Application/application\\_notes/VSP0019\\_HPLC%20Basics%20-%20principles%20and%20parameters\\_final%20-web-.pdf](https://www.knauer.net/Application/application_notes/VSP0019_HPLC%20Basics%20-%20principles%20and%20parameters_final%20-web-.pdf)
- [88] HRSTKA, Miroslav, Lenka SOMROVÁ a Pavel DIVIŠ. *Praktikum z analytické chemie potravin*. Brno: Ústav chemie potravin a biotechnologií FCH VUT v Brně, 2019.
- [89] Coomassie Brilliant Blue G-250. In: *TCI AMERICA: Division of Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.* [online]. United States [cit. 2023-02-10]. Dostupné z: <https://www.tcichemicals.com/medias/B3193.jpg?context=bWFzdGVyfHJvb3R8NTYzMDV8aW1hZ2UvanBIZ3xoNDAvaDU1Lzg5MjAxMDY3OTUwMzgvQjMxOTMuanBnfDY5ZTgwMzdmMmMzMtMk2MDY3ZDNmNjNjMjk2NjQ1Zjc3ZjRmNzJhOTVlOjFiYzI0MGE2N2VhNWQ5MjhlMTI3YTM>



- [90] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie* [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005 [cit. 2023-02-08]. ISBN 80-708-0586-2. Dostupné z: [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_isbn-80-7080-586-2/pages-img/obalka-1.htm](http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-586-2/pages-img/obalka-1.htm)
- [91] ZBÍRAL, Jiří. Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv: Stanovení obsahu cukrů. In: *Národní referenční laboratoř: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský* [online]. 2019, 16.12.2019 [cit. 2023-02-19]. Dostupné z: [https://eagri.cz/public/web/file/641454/\\_10084.\\_1\\_Stanoveni\\_obsahu\\_cukru.pdf](https://eagri.cz/public/web/file/641454/_10084._1_Stanoveni_obsahu_cukru.pdf)
- [92] ZEMANOVÁ, Vladimíra. Laboratorní cvičení z analýzy potravin I: 4.2 Stanovení veškerých cukrů v plnotučné hořčici vážkovou metodou podle Herzfelda. In: *Inovace VOV: portál inovace vyššího odborného vzdělávání* [online]. Praha, 30. 4. 2019 [cit. 2023-02-19]. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/tech/294/page23.html>
- [93] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad Koraihi IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2016, 6(2), 71-79 [cit. 2023-02-10]. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005. ISSN 20951779. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177915300150>
- [94] KURZOVÁ, Pavlína. *Izolace antibakteriálních sloučenin z kávové sedliny* [online]. Brno, 2020 [cit. 2023-02-20]. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123783>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.
- [95] ČERNEKOVÁ, Nicole. *Uvolňování aktivních látek z pórovitého materiálu na bázi poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB)* [online]. Brno, 2019 [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/113502>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.
- [96] VRANÍKOVÁ, Barbora, Aleš FRANC, Jan GAJDZIOK a David VETCHÝ. BIORELEVANTNÍ DISOLUČNÍ MEDIA SIMULUJÍCÍ PODMÍNKY TRÁVICÍHO TRAKTU. Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a Farmaceutická Univerzita Brno, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno. *Chemické Listy* [online]. 2016, 110, 126-132 [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/233/233>
- [97] HOOVÁ, Julie. *VÝVOJ A TESTOVÁNÍ PŘÍRODNÍCH SLOŽEK POTRAVIN PRO DĚTSKOU VÝŽIVU* [online]. Brno, 2022 [cit. 2023-02-20]. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/150111>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

- [98] VELICKOVIC, J. M., S. ILIC, S. S. MITIC, M. N. MITIC a D. A. KOSTIC. Comparative analysis of phenolic and mineral composition of hawthorn and blackthorn from southeast serbia. *Oxidation Communications* [online]. 2016, **39**(3), 2280-2290 [cit. 2023-03-11]. ISSN 0209-4541.
- [99] OLESIŃSKA, KATARZYNA, DANUTA SUGIER a ŁUKASZ SĘCZYK. The influence of selected preservation methods and storage time on the content of antioxidants in blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruits. *Agronomy Science* [online]. 2019, **74**(1), 53-62 [cit. 2023-03-20]. ISSN 2544-798X. Dostupné z: doi:10.24326/as.2019.1.5
- [100] ERTURK, Y., S. ERCISLI a M. TOSUN. Physico-chemical characteristics of wild plum fruits (*Prunus spinosa* L.). *International Journal of Plant Production* [online]. Turecko, 2009, **3**(3), 89-92 [cit. 2023-03-20]. ISSN 1735-8043. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/239572837\\_Physicochemical\\_characteristics\\_of\\_wild\\_plum\\_fruits\\_Prunus\\_spinosa\\_L](https://www.researchgate.net/publication/239572837_Physicochemical_characteristics_of_wild_plum_fruits_Prunus_spinosa_L)
- [101] OLESIŃSKA, KATARZYNA, KAMIL WILCZYŃSKI a KLAUDIA KAŁWA. The effect method of preservation on selected bioactive compounds and antioxidant activity in blackthorn fruits (*Prunus spinosa* L.). *Agronomy Science* [online]. 2018, **73**(3), 45-54 [cit. 2023-03-20]. ISSN 2544-798X. Dostupné z: doi:10.24326/asx.2018.3.5
- [102] KANIOVÁ, L. *Analýza šťáv vybraných odrůd černého rybízu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 75 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [103] POPOVIĆ, B.M., B. BLAGOJEVIĆ, R. ŽDERO PAVLOVIĆ, et al. Comparison between polyphenol profile and bioactive response in blackthorn (*Prunus spinosa* L.) genotypes from north Serbia-from raw data to PCA analysis. *Food Chemistry* [online]. 2020, **302** [cit. 2023-03-11]. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125373>
- [104] PINACHO, Raquel, Rita Yolanda CAVERO, Iciar ASTIASARÁN, Diana ANSORENA a María Isabel CALVO. Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods* [online]. 2015, **19**, 49-62 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.015>
- [105] JOJO Medvídci želé bonbóny s ovocnými příchutěmi. *Rohlik.cz* [online]. [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: [https://www.rohlik.cz/719119-jojo-medvidci-zele-bonbony-s-ovocnymi-prichutemi?gclid=Cj0KCQjwla-hBhD7ARIsAM9tQKvhEme6AfgM97amjaWQq3j895KhVDyc-Ud4Ra1exEjZq8O9Bk6NSKMaAoLyEALw\\_wcB](https://www.rohlik.cz/719119-jojo-medvidci-zele-bonbony-s-ovocnymi-prichutemi?gclid=Cj0KCQjwla-hBhD7ARIsAM9tQKvhEme6AfgM97amjaWQq3j895KhVDyc-Ud4Ra1exEjZq8O9Bk6NSKMaAoLyEALw_wcB)

- [106] Nestlé Jojo Medvídci 80g. *Tomato.cz* [online]. [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: [https://www.tomato.cz/nestle-jojo-medvidci-80g/?gclid=Cj0KCQjwla-hBhD7ARIsAM9tQKvG0vagjU0JUzQWi-rQhjW8cpVLfB8tXtACHrciahjBp5\\_tt79vgrAaAlpGEALw\\_wcB](https://www.tomato.cz/nestle-jojo-medvidci-80g/?gclid=Cj0KCQjwla-hBhD7ARIsAM9tQKvG0vagjU0JUzQWi-rQhjW8cpVLfB8tXtACHrciahjBp5_tt79vgrAaAlpGEALw_wcB)
- [107] ZHOU, Yubo, Yingxin YANG, Minyan MA, Lingyun XIE, Aijuan YAN a Wen CAO. Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the chemical composition and antioxidant properties of Ginkgo biloba leaves decoction and commercial capsules. *Acta Pharmaceutica* [online]. 2022, **72**(4), 483-507 [cit. 2023-03-19]. ISSN 1846-9558. Dostupné z: doi:10.2478/acph-2022-0033
- [108] ORTEGA-VIDAL, J., A. RUIZ-RIAGUAS, M.L. FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, P. ORTEGA-BARRALES a E.J. LLORENT-MARTÍNEZ. Phenolic profile and antioxidant activity of Jasonia glutinosa herbal tea. Influence of simulated gastrointestinal in vitro digestion. *Food Chemistry* [online]. 2019, **287**, 258-264 [cit. 2023-03-19]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2019.02.101
- [109] SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, Anna, Alicja Z. KUCHARSKA, Katarzyna WIŃSKA, Antoni SZUMNY, Agnieszka NAWIRSKA-OLSZAŃSKA, Paulina MIZGIER a Dorota WYSPIAŃSKA. Composition and antioxidant activity of red fruit liqueurs. *Food Chemistry* [online]. 2014, **157**, 533-539 [cit. 2023-03-19]. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.083>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

USD	americký dolar
angl.	anglicky
PsL	trnka obecná ( <i>Prunus spinosa L.</i> )
EtOH	ethanol
DW	hmotnost suchého materiálu, resp. plodů (angl. dry weight)
FW	hmotnost čerstvého materiálu, resp. plodů (angl. fresh weight)
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny (angl. monounsaturated fatty acids)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (angl. polyunsaturated fatty acids)
SAFA	nasyčené mastné kyseliny (angl. saturated fatty acids)
RP-HPLC-DAD	vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi a detektorem diodového pole (angl. reverse phase high-performance liquid chromatography with diode array detector)
UV-VIS	ultrafialové viditelné záření
TPC	koncentrace celkových polyfenolů (angl. total phenolic content)
GAE	ekvivalent kyseliny gallové (angl. gallic acid equivalents)
TFC	koncentrace celkových flavonoidů (angl. total flavonoids content)
CAE	ekvivalent katechinu (angl. catechin equivalents)
TAC	koncentrace celkových anthokyanů (angl. total anthocyanins content)
CGE	ekvivalent kyanidin-3-O-glukosidu (angl. cyanidin-3-O-glucoside equivalents)
TTC	koncentrace celkových taninů (angl. total tannin content)
w/w	hmotnost rozpuštěné látky na hmotnost rozpouštědla (angl. weight per weight)
AAE	ekvivalent kyseliny askorbové (angl. ascorbic acid equivalents)
SPME-GC-MS	mikroextrakce na pevné fázi a plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (angl. solid phase microextraction and gas chromatography with mass spectrophotometry)
ROS	reaktivní formy kyslíku (angl. reactive oxygen species)
RNS	reaktivní formy dusíku (angl. reactive nitrogen species)
AA	antioxidační aktivita (angl. antioxidant activity)
TE	ekvivalent Troloxu (angl. Trolox equivalents)
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl volný radikál
ABTS	2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
<i>in vivo</i>	“zaživa” nebo “v živém organismu”
<i>in vitro</i>	“ve zkumavce” tedy pokus konaný mimo živý organismus
MIC	minimální inhibiční koncentrace (angl. minimum inhibitory concentration)
MBC	minimální baktericidní koncentrace (angl. minimum bactericidal concentration)
MFC	minimální fungicidní koncentrace (angl. minimum fungicidal concentration)

JDM	jamková difuzní metoda
l.n.	literatura neuvádí (danou informaci)
č.	číslo
Sb.	sbírka zákonů České republiky
ES	Evropské společenství
EU	Evropská unie
PPP	provozovatel potravinářského podniku
RE	retinoidy
CNS	centrální nervová soustava
ČSN EN ISO	převzatá (harmonizovaná) evropská norma
ČSN ISO	česká technická norma
rpm	otáčky za minutu (angl. rounds per minutes)
F-C	Folin-Ciocalteuovo činidlo
TEAC	antioxidační kapacita ekvivalentů Troloxu (angl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
PTFE	polytetrafluorethylen
OB	odměrná baňka
TSC	koncentrace celkových cukrů (angl. total sugars content)
GLE	ekvivalent glukózy (angl. glucose equivalents)
NB	živném médium Nutrient Broth w/1% peptone
YPD	živné médium Yeast Extract-Peptone-Dextrose
SGF	umělá žaludeční šťáva (angl. simulated gastric fluid)
SIF	umělá střevní šťáva (angl. simulated intestinal fluid)
VUT	Vysoké učení technické
SD	směrodatná odchylka
IQR	interkvartilový rozptyl
K-W	Kruskal-Wallisova neparametrická analýza rozptylu
ANOVA	analýza rozptylu (angl. analysis of variance)
RT	retenční čas

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Hodnotitelský protokol pro senzorickou analýzu – optimalizace přídavku extraktu z trnky obecné (*Prunus spinosa*) do želatinové matrice.

Příloha 2: Graf kalibrační závislosti absorbance na koncentraci kyseliny gallové v g/l pro stanovení celkových polyfenolů (TPC).

Příloha 3: Graf kalibrační závislosti absorbance na koncentraci katechinu v g/l pro stanovení celkových flavonoidů (TFC).

Příloha 4: Graf kalibrační závislosti absorbance na koncentraci Troloxu v mmol/l pro stanovení antioxidační aktivity (AA).

Příloha 5: Graf kalibrační závislosti absorbance na koncentraci glukózy v g/l pro stanovení celkových cukrů po inverzi (TSC).

Příloha 6: Statistické srovnání dvojic vzorků pomocí Tukeyho testu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  z pohledu obsahu celkových polyfenolů (TPC), flavonoidů (TFC) a anthokyanů (TAC) a antioxidační aktivity (AA) plodů *Prunus spinosa* konzervovaných různými způsoby. Statisticky významný rozdíl značen 1, statisticky nevýznamný rozdíl značen 0.

Příloha 7: Statistické srovnání dvojic vzorků pomocí Tukeyho testu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  z pohledu obsahu celkových polyfenolů (TPC), flavonoidů (TFC) a anthokyanů (TAC) a antioxidační aktivity (AA) vyrobených doplňků stravy na bázi plodů *Prunus spinosa*. Statisticky významný rozdíl značen 1, statisticky nevýznamný rozdíl značen 0.

Příloha 8: Chromatogram stanovení kyseliny L-askorbové ve vzorku sušených plodů *Prunus spinosa* pomocí HPLC/DAD při vlnové délce 210 nm (retenční čas analytu: 5,897 min).

Příloha 9: Chromatogram stanovení kyseliny L-askorbové ve vzorku lyofilizovaných plodů *Prunus spinosa* pomocí HPLC/DAD při vlnové délce 210 nm (retenční čas analytu: 5,940 min).

Příloha 10: Chromatogramy paralelních stanovení fenolických látek v surovém ethanolovém extraktu z plodů *Prunus spinosa* pomocí HPLC/DAD při vlnových délkách 260 nm, 280 nm a 300 nm (postupně shora). Identifikace viz Tabulka 27.

Příloha 11: Chromatogramy paralelních stanovení fenolických látek v prášku z lyofilizovaných plodů *Prunus spinosa* pomocí HPLC/DAD při vlnových délkách 260 nm, 280 nm a 300 nm (postupně shora). Identifikace viz Tabulka 31.

Příloha 12: Chromatogramy paralelních stanovení fenolických látek ve vzorku M5 (tj. želatinové bonbony s 5 % trnkového extraktu) pomocí HPLC/DAD při vlnových délkách 260 nm, 280 nm a 300 nm (postupně shora). Identifikace viz Tabulka 31.

Příloha 13: Chromatogramy paralelních stanovení fenolických látek ve vzorku M10 (tj. želatinové bonbony s 10 % trnkového extraktu) pomocí HPLC/DAD při vlnových délkách 260 nm, 280 nm a 300 nm (postupně shora). Identifikace viz Tabulka 31.

Příloha 14: Chromatogramy paralelních stanovení fenolických látek ve vzorku M15 (tj. želatinové bonbony s 15 % trnkového extraktu) pomocí HPLC/DAD při vlnových délkách 260 nm, 280 nm a 300 nm (postupně shora). Identifikace viz Tabulka 31.

Příloha 15: Chromatogramy paralelních stanovení fenolických látek ve vzorku M20 (tj. želatinové bonbony s 20 % trnkového extraktu) pomocí HPLC/DAD při vlnových délkách 260 nm, 280 nm a 300 nm (postupně shora). Identifikace viz Tabulka 31.

Příloha 16: Grubbsův test odlehlých hodnot původního datasetu profilové zkoušky (p-hodnoty;  $\alpha = 0,05$ ).

Příloha 17: Grubbsův test odlehlých hodnot upraveného datasetu zkoušky sensorického profilu (p-hodnoty;  $\alpha = 0,05$ ).

Příloha 18: Shapiro-Wilkův test normální distribuce upraveného datasetu zkoušky sensorického profilu (p-hodnoty;  $\alpha = 0,05$ ).

Příloha 19: Neparametrická Kruskal-Wallisova ANOVA upraveného datasetu zkoušky sensorického profilu včetně hodnot mean ranku (p-hodnoty;  $\alpha = 0,05$ ).

Příloha 20: Vícenásobné srovnání vzorků upraveného datasetu profilové zkoušky (p-hodnoty;  $\alpha = 0,05$ ).

Příloha 21: Statistické vyhodnocení dat (hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ ) pořadového testu sensorické analýzy doplňku stravy ve formě želatinových bonbonů s různou koncentrací trnkového extraktu.

## 9 PŘÍLOHY

*Příloha 1: Hodnotitelský protokol pro senzoričnou analýzu – optimalizace přídavku extraktu z trnky obecné (Prunus spinosa) do želatinové matrice.*

### HODNOTITELSKÝ PROTOKOL PRO SENZORICKOU ANALÝZU

doplňku stravy ve formě želatinových bonbonů

Vážení hodnotitelé,

zhodnoťte prosím předložené vzorky želatinových bonbonů s přídavkem bioaktivních látek.

Datum: \_\_\_\_\_

Pohlaví: žena / muž

Věk: \_\_\_\_\_

Kuřák: ano / ne

**Před ochutnávkou prosím ještě zodpovězte následující otázky (odpověď zakroužkujte):**

**Jaké je Vaše stanovisko k želatinovým bonbonům?**

- a) mám je velmi rád/a
- b) mám je rád/a
- c) nemám je příliš rád/a
- d) vůbec mi nechutnají, nekonzumuji je

**Jak často želatinové bonbony konzumujete?**

- a) 1 a vícekrát za týden
- b) alespoň 1 za měsíc
- c) alespoň 1 za půl roku
- d) alespoň 1 za rok
- e) jiné: \_\_\_\_\_

**Konzumujete nějaké doplňky stravy (tj. vitamíny, minerální látky, živiny apod.)?**

- a) ano, pravidelně
- b) ano, avšak nepravidelně
- c) ano, avšak pouze v určitá období roku (např. na podzim, v zimě)
- d) ne, nikdy

**Jakou lékovou formu mají Vámi konzumované doplňky stravy?**

- a) tablety
- b) kapsle (tobolky)
- c) tekutina
- d) prášek
- e) želé (gummies)
- f) jiné: \_\_\_\_\_

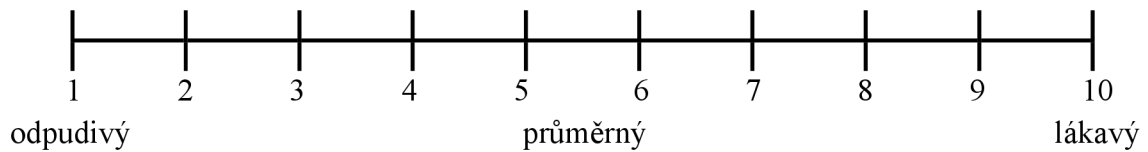
#### **1. Profilové hodnocení**

Prosím, zhodnoťte předložené vzorky nezávisle na sobě, a to na základě vybraných profilových vlastností. Do tabulky vždy napište číslo (1–10) odpovídající příslušné stupnici. Mezi ochutnávkami jednotlivých vzorků si dejte pauzu a použijte chuťový neutralizátor (vodu).



### Vzhled

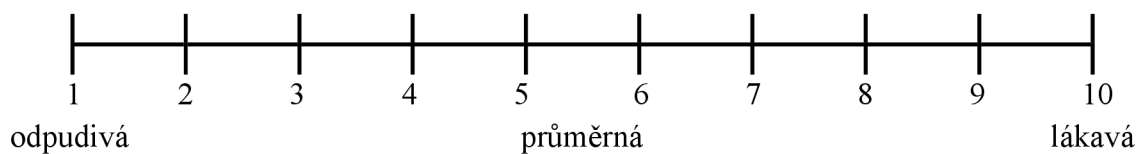
Hodnotí se celková přijatelnost povrchu vzorku.



<b>kód vzorku:</b>	D5M5	Z2M5	Z4D5	D3C5	Z6C1
<b>hodnocení:</b>					

### Barva

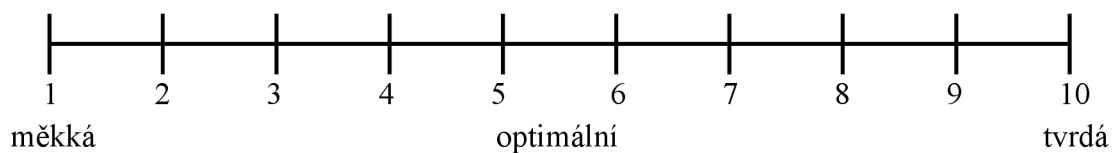
Hodnotí se příjemnost barvy (tj. odstín, barevné skvrny a jiné výrazné vady).



<b>kód vzorku:</b>	D5M5	Z2M5	Z4D5	D3C5	Z6C1
<b>hodnocení:</b>					

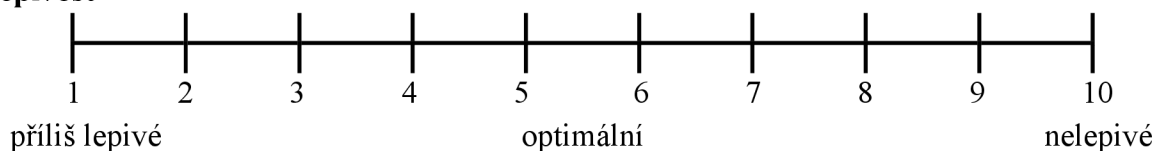
### Konzistence

Hodnotí se konzistence, textura a tuhost, a to buď hmatem nebo při žvýkání v ústech.



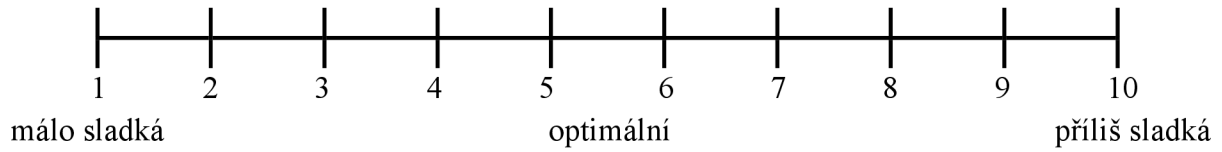
<b>kód vzorku:</b>	D5M5	Z2M5	Z4D5	D3C5	Z6C1
<b>hodnocení:</b>					

### Lepivost



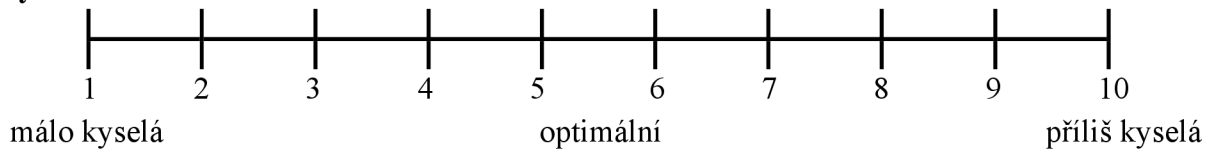
<b>kód vzorku:</b>	D5M5	Z2M5	Z4D5	D3C5	Z6C1
<b>hodnocení:</b>					

### Sladkost



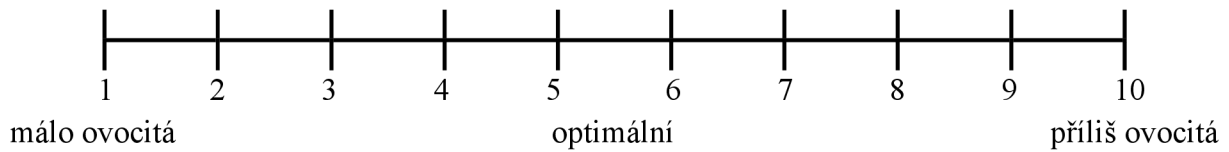
<b>kód vzorku:</b>	D5M5	Z2M5	Z4D5	D3C5	Z6C1
<b>hodnocení:</b>					

### Kyselost



<b>kód vzorku:</b>	D5M5	Z2M5	Z4D5	D3C5	Z6C1
<b>hodnocení:</b>					

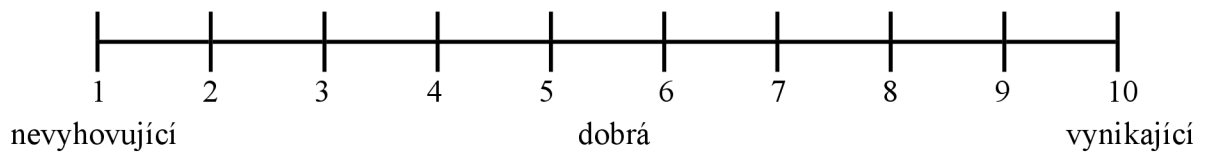
### Ovocitost



<b>kód vzorku:</b>	D5M5	Z2M5	Z4D5	D3C5	Z6C1
<b>hodnocení:</b>					

### Chuť/Flavour

Hodnotí se komplexní pocit v ústech při konzumaci vzorku.



<b>kód vzorku:</b>	D5M5	Z2M5	Z4D5	D3C5	Z6C1
<b>hodnocení:</b>					

**2. Pořadová zkouška (hodnocení celkové přijatelnosti vzorku):**

Na základě ochutnaných vzorků, seřaďte prosím tyto vzorky dle celkové přijatelnosti, v úvahu prosím berete výše uvedené vlastnosti. Do tabulky запиšte kódy vzorků v pořadí od nejvíce přijatelného po nejméně přijatelný vzorek dle Vašich preferencí.

--	--	--	--	--

**nejvíce přijatelný**

**nejméně přijatelný**

Poznámky: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

---

---

---

**Děkuji vám za vyplnění formuláře!** Případné připomínky prosím napište zde:

---

---

---

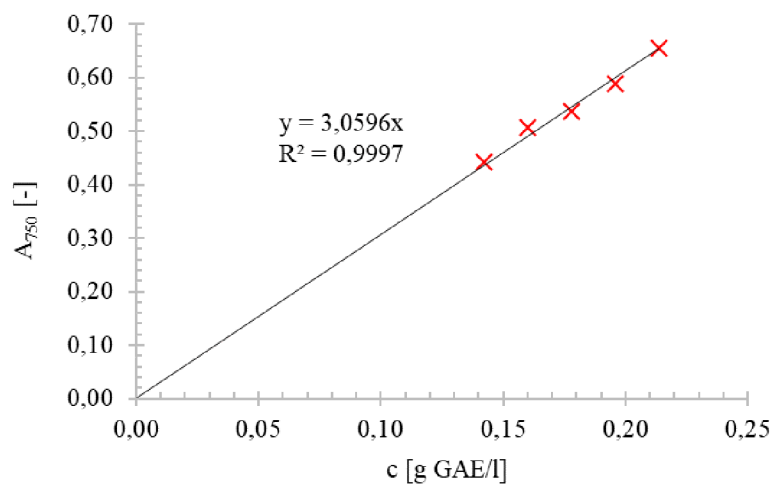
---

---

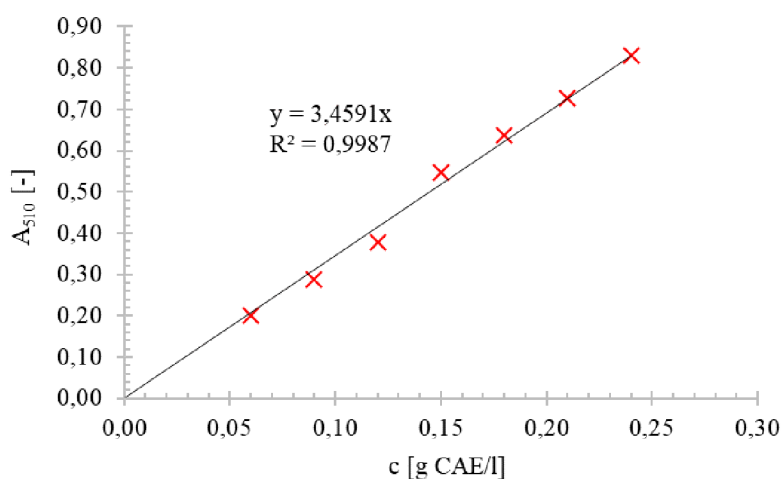
---

---

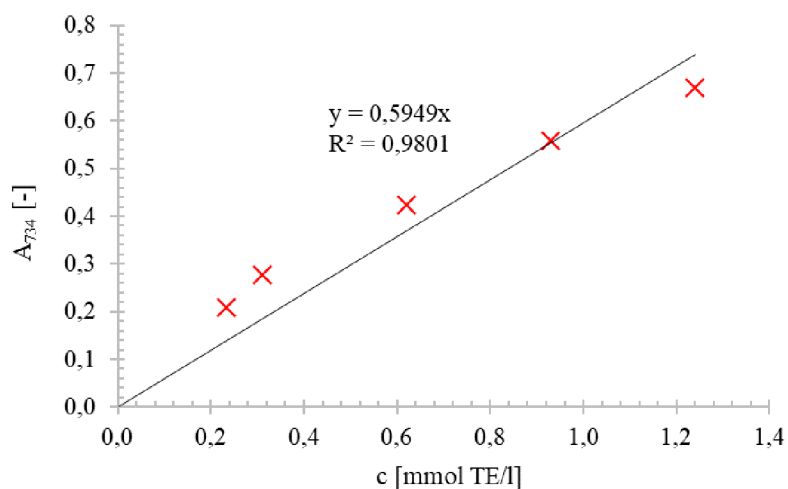
---



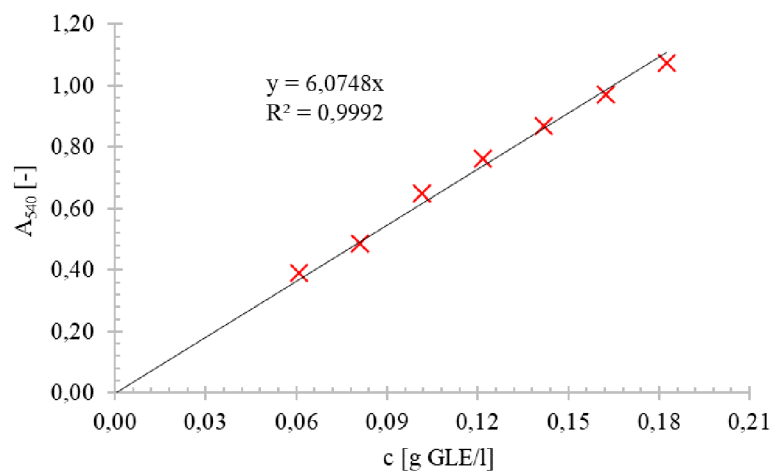
Příloha 2: Graf kalibrační závislosti absorbance na koncentraci kyseliny gallové v g/l pro stanovení celkových polyfenolů (TPC).



Příloha 3: Graf kalibrační závislosti absorbance na koncentraci katechinu v g/l pro stanovení celkových flavonoidů (TFC).



Příloha 4: Graf kalibrační závislosti absorbance na koncentraci Troloxu v mmol/l pro stanovení antioxidační aktivity (AA).



*Příloha 5: Graf kalibrační závislosti absorbance na koncentraci glukózy v g/l pro stanovení celkových cukrů po inverzi (TSC).*

Příloha 6: Statistické srovnání dvojic vzorků pomocí Tukeyho testu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  z pohledu obsahu celkových polyfenolů (TPC), flavonoidů (TFC) a anthokyanů (TAC) a antioxidační aktivity (AA) plodů *Prunus spinosa* konzervovaných různými způsoby. Statisticky významný rozdíl značen 1, statisticky nevýznamný rozdíl značen 0.

TPC [-]						TFC [-]					
	ČP	MP	M1P	LP	SP		ČP	MP	M1P	LP	SP
ČP	–	1	1	1	1	ČP	–	1	0	1	1
MP	1	–	1	1	1	MP	1	–	1	1	1
M1P	1	1	–	1	1	M1P	0	1	–	1	1
LP	1	1	1	–	1	LP	1	1	1	–	1
SP	1	1	1	1	–	SP	1	1	1	1	–

TAC [-]						AA [-]					
	ČP	MP	M1P	LP	SP		ČP	MP	M1P	LP	SP
ČP	–	0	1	1	1	ČP	–	1	1	1	1
MP	0	–	1	1	1	MP	1	–	1	1	1
M1P	1	1	–	1	1	M1P	1	1	–	1	1
LP	1	1	1	–	1	LP	1	1	1	–	1
SP	1	1	1	1	–	SP	1	1	1	1	–

Pozn.: Zkratkové značení jednotlivých vzorků je uvedeno v tabulce 12.

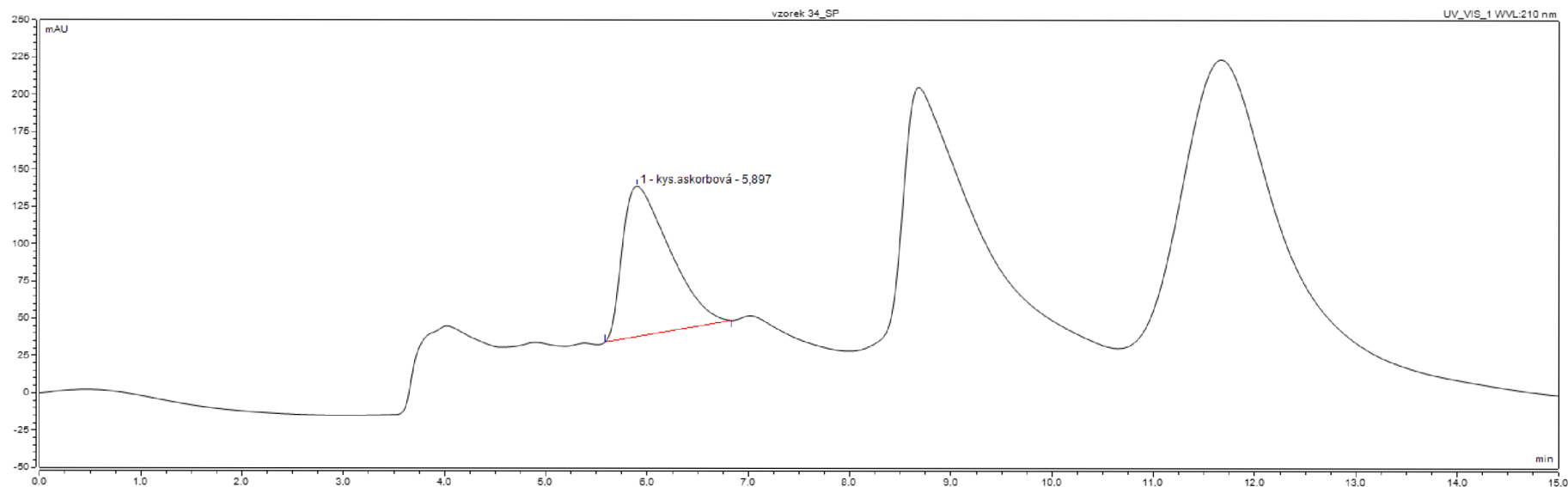
Příloha 7: Statistické srovnání dvojic vzorků pomocí Tukeyho testu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  z pohledu obsahu celkových polyfenolů (TPC), flavonoidů (TFC) a anthokyanů (TAC) a antioxidační aktivity (AA) vyrobených doplňků stravy na bázi plodů *Prunus spinosa*. Statisticky významný rozdíl značen 1, statisticky nevýznamný rozdíl značen 0.

TPC [-]						TFC [-]					
	M5	M10	M15	M20	KLP		M5	M10	M15	M20	KLP
M5	–	1	1	1	1	M5	–	1	1	1	1
M0	1	–	1	1	1	M0	1	–	1	1	1
M15	1	1	–	1	1	M15	1	1	–	1	1
M20	1	1	1	–	1	M20	1	1	1	–	1
KLP	1	1	1	1	–	KLP	1	1	1	1	–

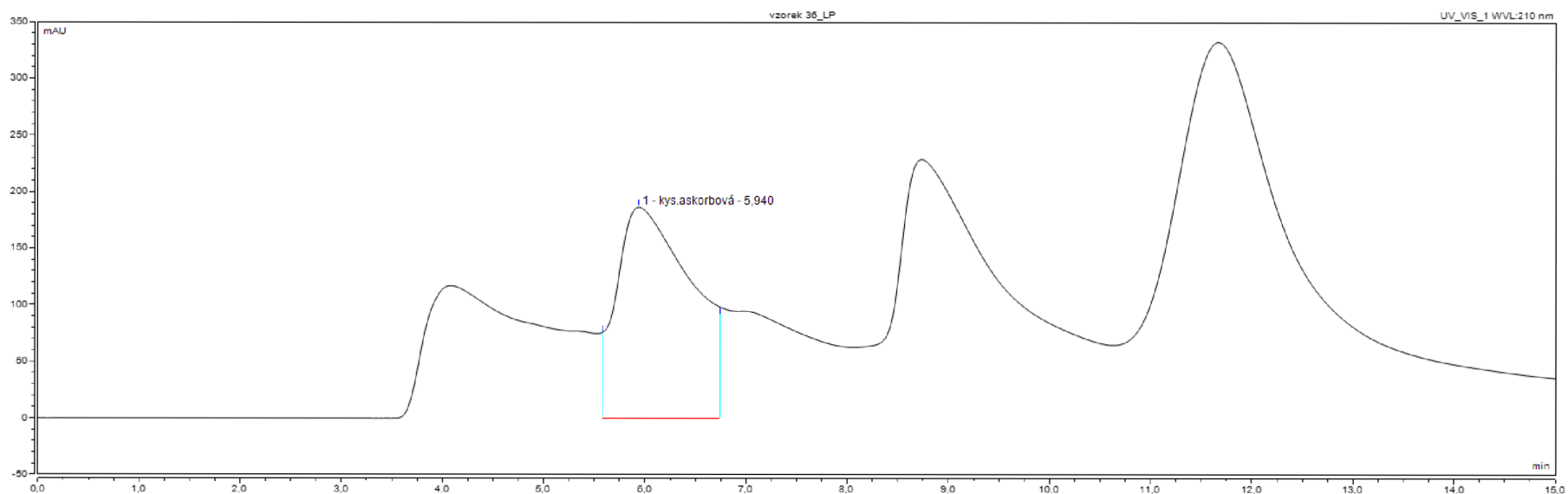
  

TAC [-]						AA [-]					
	M5	M10	M15	M20	KLP		M5	M10	M15	M20	KLP
M5	–	1	1	1	1	M5	–	1	1	1	1
M0	1	–	1	1	1	M0	1	–	1	1	1
M15	1	1	–	1	1	M15	1	1	–	1	1
M20	1	1	1	–	1	M20	1	1	1	–	1
KLP	1	1	1	1	–	KLP	1	1	1	1	–

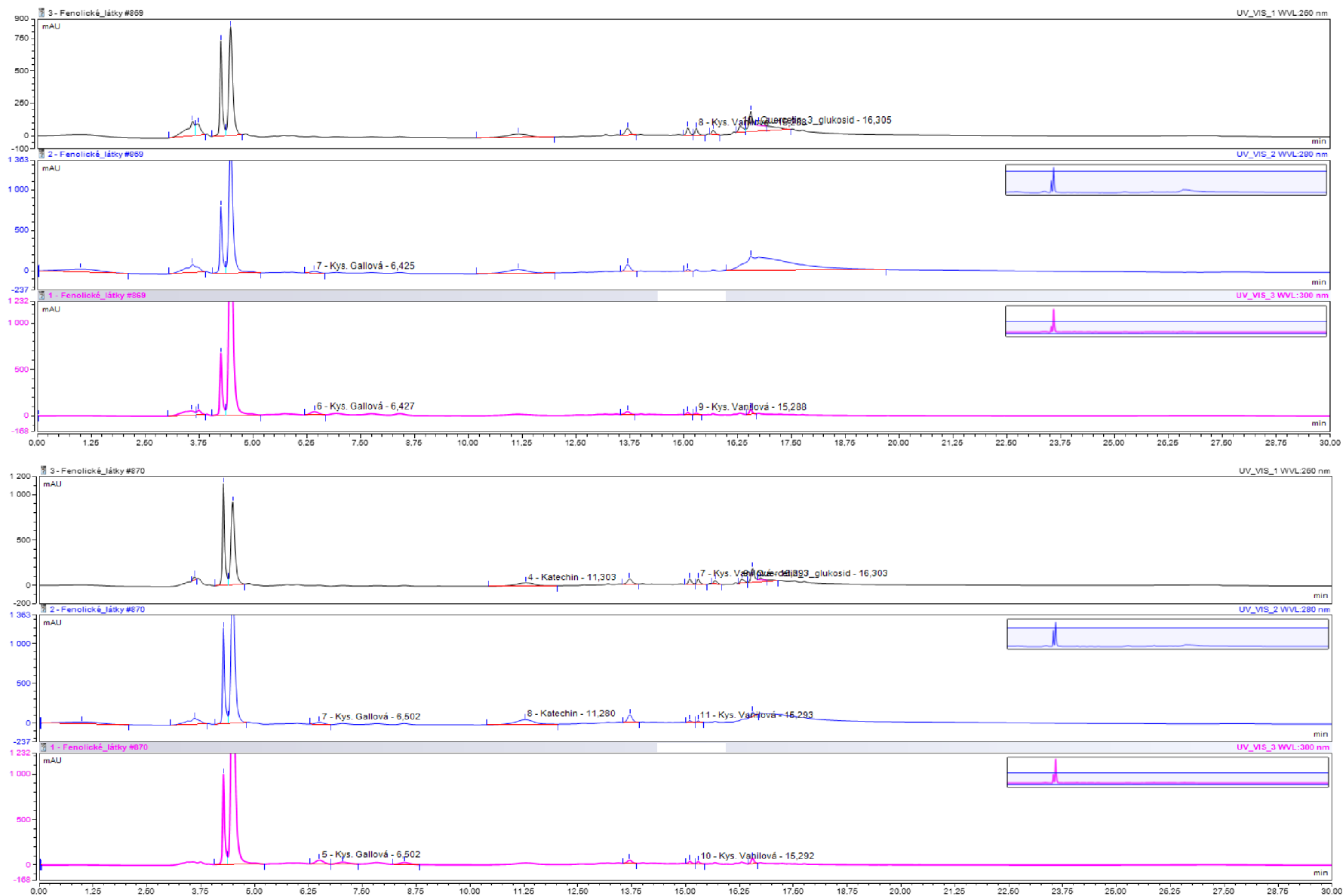
Pozn.: Zkratkové značení jednotlivých vzorků je uvedeno v tabulce 12.



*Příloha 8: Chromatogram stanovení kyseliny L-askorbové ve vzorku sušených plodů Prunus spinosa pomocí HPLC/DAD při vlnové délce 210 nm (retenční čas analytu: 5,897 min).*

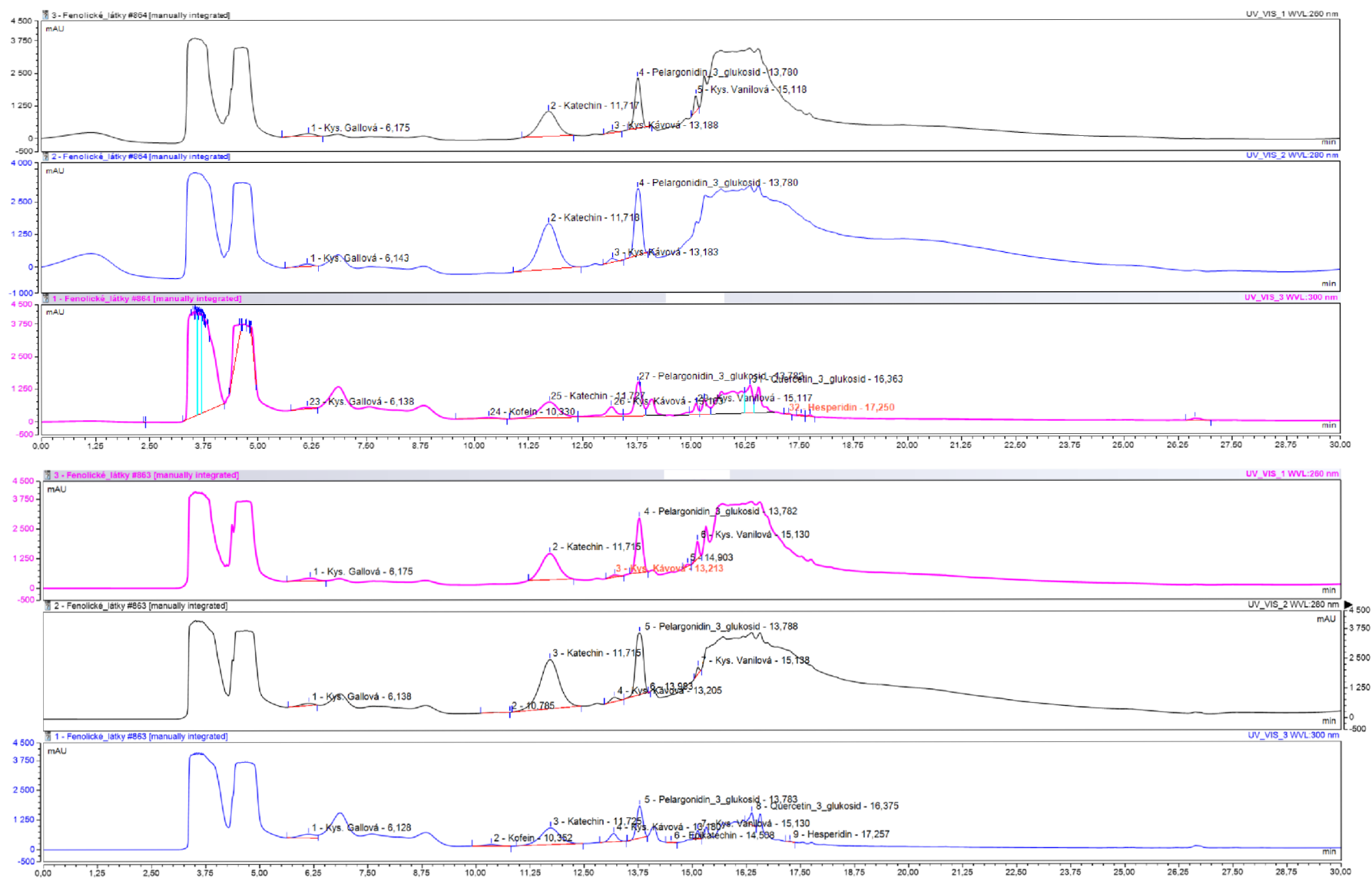


*Příloha 9: Chromatogram stanovení kyseliny L-askorbové ve vzorku lyofilizovaných plodů Prunus spinosa pomocí HPLC/DAD při vlnové délce 210 nm (retenční čas analytu: 5,940 min).*

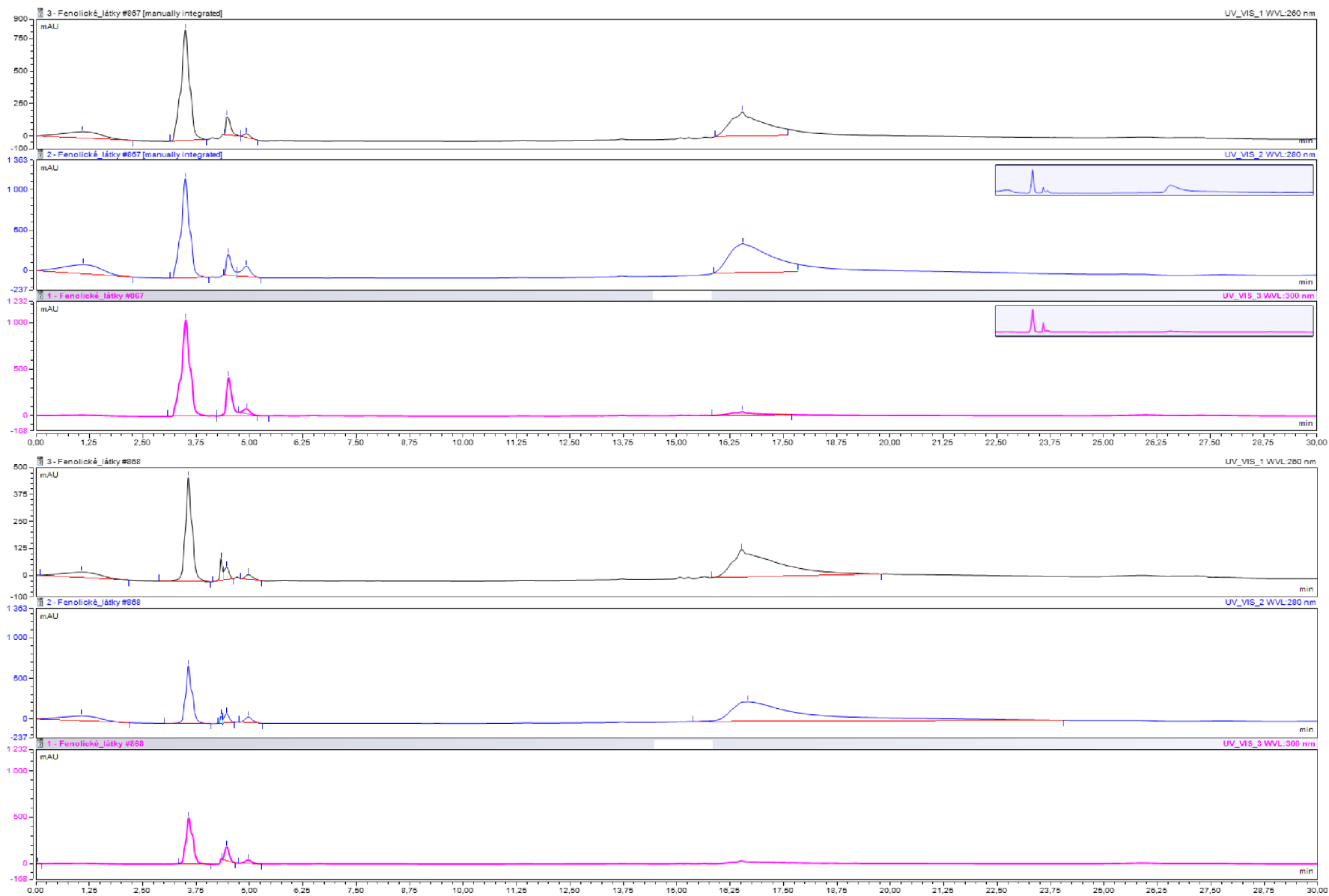


Příloha 10: Chromatogramy paralelních stanovení fenolických látek v surovém ethanolovém extraktu z plodů *Prunus spinosa* pomocí HPLC/DAD při vlnových délkách 260 nm, 280 nm a 300 nm (postupně shora). Identifikace viz Tabulka 26.

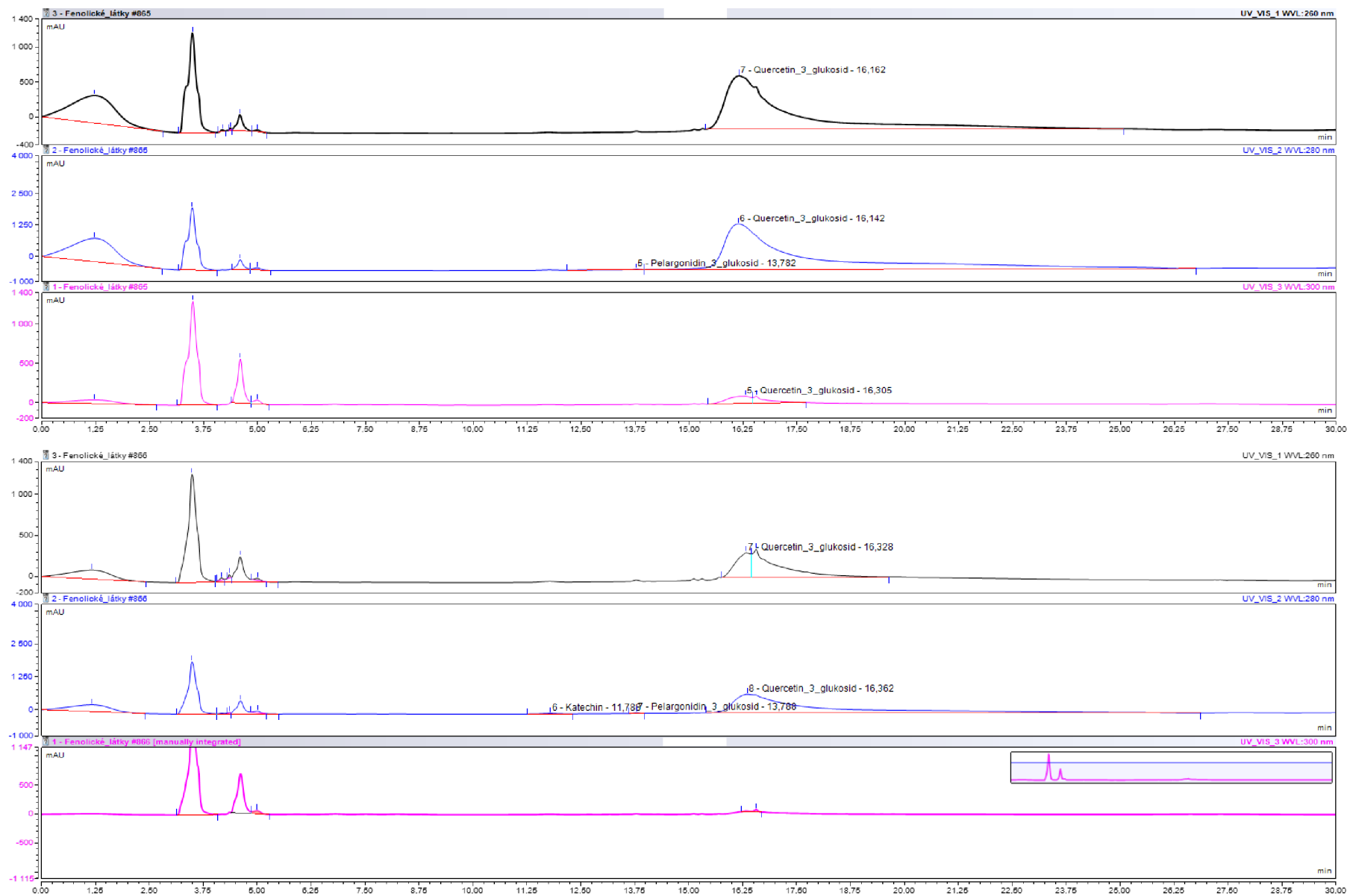




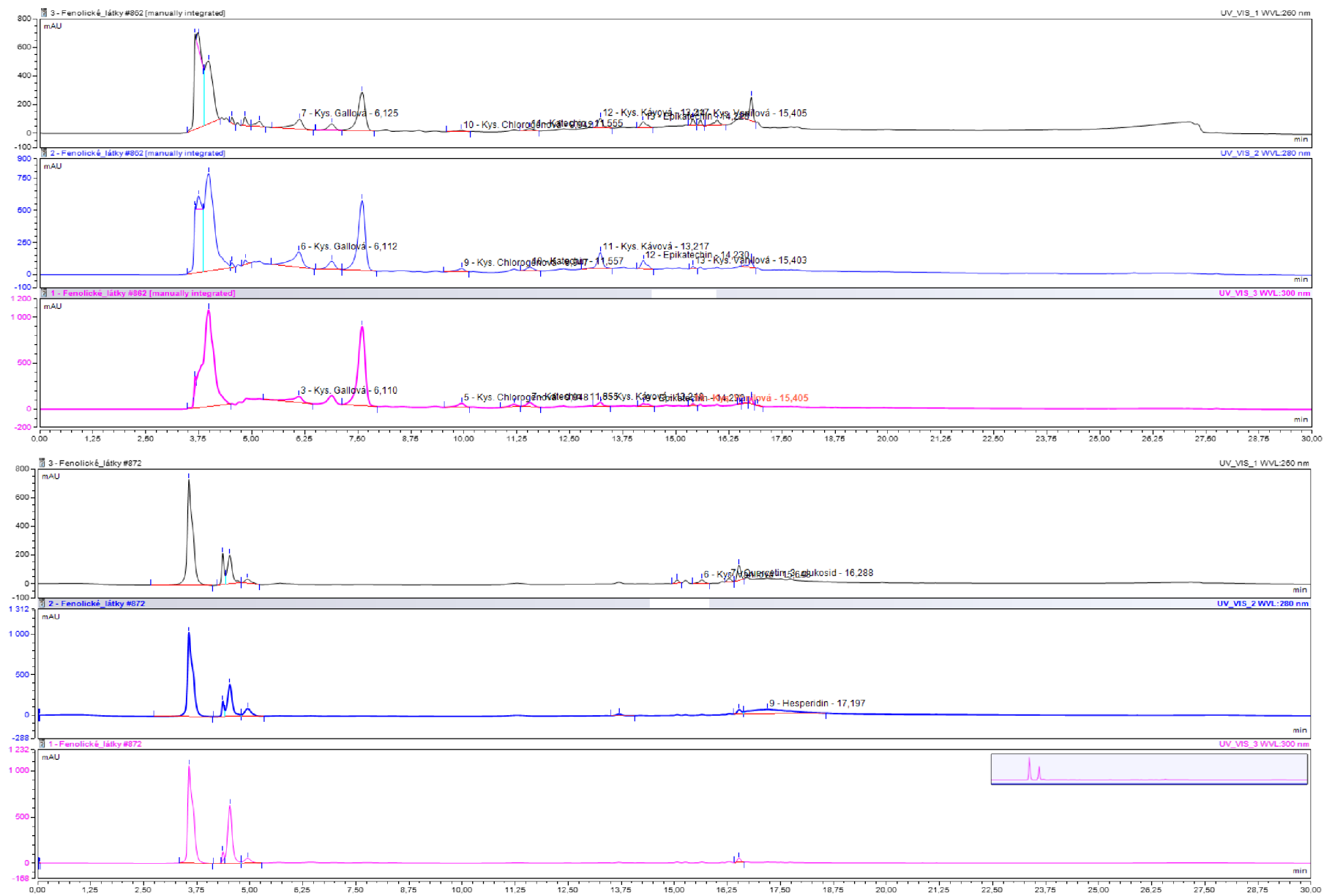
Příloha 11: Chromatogramy paralelních stanovení fenolických látek v prášku z lyofilizovaných plodů *Prunus spinosa* pomocí HPLC/DAD při vlnových délkách 260 nm, 280 nm a 300 nm (postupně shora). Identifikace viz Tabulka 30.



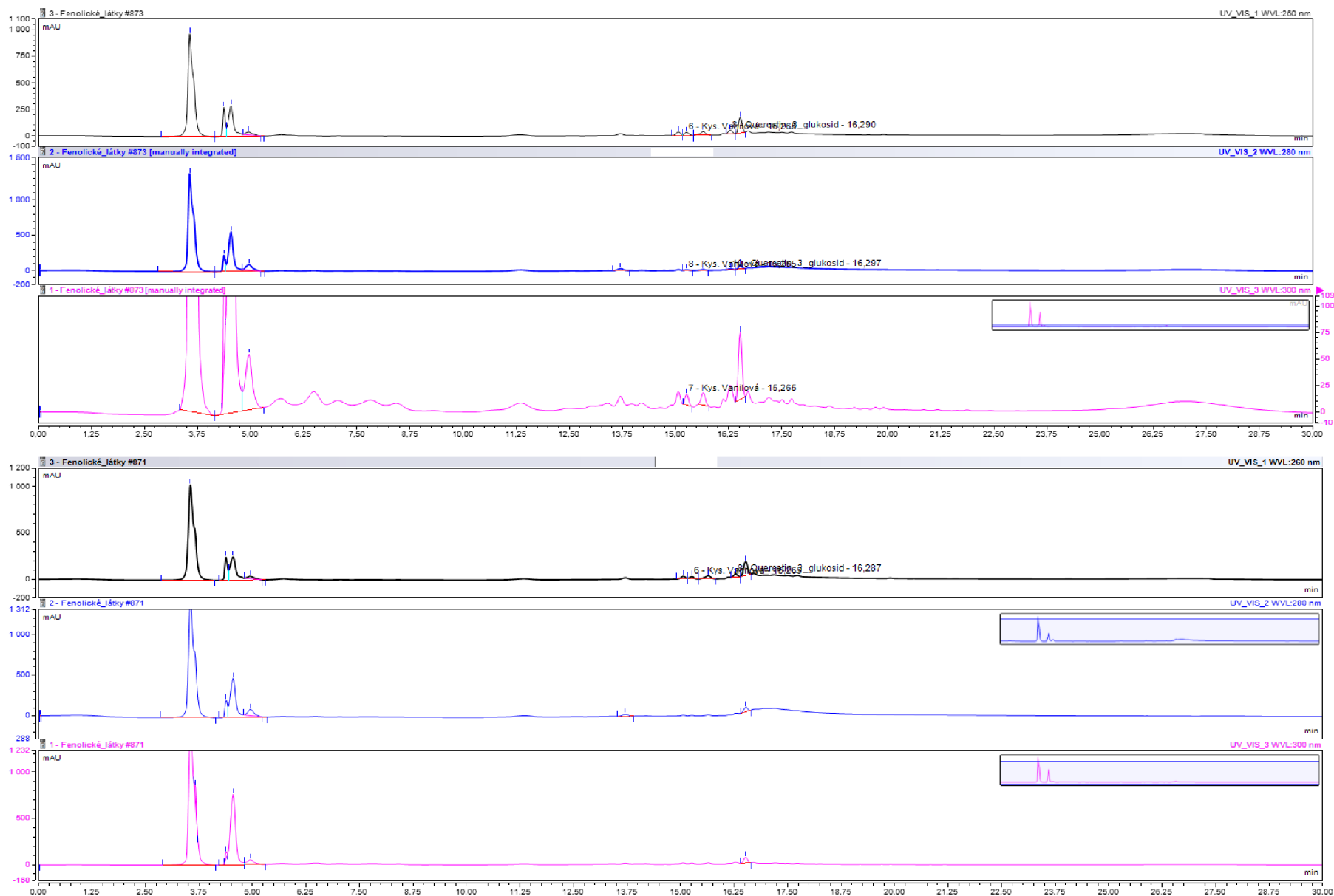
Příloha 12: Chromatogramy paralelních stanovení fenolických látek ve vzorku M5 (tj. želatinové bonbony s 5 % trnkového extraktu) pomocí HPLC/DAD při vlnových délkách 260 nm, 280 nm a 300 nm (postupně shora). Identifikace viz Tabulka 30.



Příloha 13: Chromatogramy paralelních stanovení fenolických látek ve vzorku M10 (tj. želatinové bonbonky s 10 % trnkového extraktu) pomocí HPLC/DAD při vlnových délkách 260 nm, 280 nm a 300 nm (postupně shora). Identifikace viz Tabulka 30.



Příloha 14: Chromatogramy paralelních stanovení fenolických látek ve vzorku M15 (tj. želatinové bonbony s 15 % trnkového extraktu) pomocí HPLC/DAD při vlnových délkách 260 nm, 280 nm a 300 nm (postupně shora). Identifikace viz Tabulka 30.



Příloha 15: Chromatogramy paralelních stanovení fenolických látek ve vzorku M20 (tj. želatinové bonbony s 20 % trnkového extraktu) pomocí HPLC/DAD při vlnových délkách 260 nm, 280 nm a 300 nm (postupně shora). Identifikace viz Tabulka 30.

Příloha 16: Grubbsův test odlehých hodnot původního datasetu profilové zkoušky ( $p$ -hodnoty;  $\alpha = 0,05$ ).

vzorek:		p-value [-]				
		M0	M5	M10	M15	M20
hodnocený deskriptor:	vzhled	0,0157	0,5205	0,1278	0,0045	1,0000
	barva	0,0224	0,7533	0,2476	0,0482	0,0004
	konzistence	0,1733	0,8693	0,0792	0,8370	0,3291
	lepivost	0,0131	0,4099	0,0047	0,0761	0,1051
	sladkost	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	kyselost	0,5468	1,0000	0,0654	1,0000	0,1354
	ovocitost	0,2492	1,0000	0,0098	1,0000	0,3540
	flavour	0,3931	0,4780	0,6207	1,0000	0,8652

Příloha 17: Grubbsův test odlehých hodnot upraveného datasetu zkoušky sensorického profilu ( $p$ -hodnoty;  $\alpha = 0,05$ ).

vzorek:		p-value [-]				
		M0	M5	M10	M15	M20
hodnocený deskriptor:	vzhled	0,1947	0,5205	0,6886	1,0000	1,0000
	barva	0,8513	0,7533	0,2476	0,9703	0,5856
	konzistence	0,1733	0,8693	1,0000	0,8370	0,3291
	lepivost	0,8336	0,4099	1,0000	0,9227	0,1051
	sladkost	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	kyselost	0,5468	1,0000	0,6948	1,0000	0,1354
	ovocitost	0,2492	1,0000	0,7892	1,0000	1,0000
	flavour	0,3931	0,4780	0,6207	1,0000	0,8652

Příloha 18: Shapiro-Wilkův test normální distribuce upraveného datasetu zkoušky sensorického profilu ( $p$ -hodnoty;  $\alpha = 0,05$ ).

vzorek:		p-value [-]				
		M0	M5	M10	M15	M20
hodnocený deskriptor:	vzhled	0,00150	0,00006	0,00002	0,00001	< 0,00001
	barva	0,01980	0,00241	0,00061	0,00002	< 0,00001
	konzistence	0,10000	0,63300	0,00608	0,02570	0,22000
	lepivost	0,00134	0,00676	0,00186	0,00161	0,01020
	sladkost	0,03640	0,06540	0,00447	0,00480	0,06140
	kyselost	0,04110	0,00357	0,00233	0,10000	0,03650
	ovocitost	0,01150	0,00661	0,00120	0,00511	0,09490
	flavour	0,16600	0,17400	0,02210	0,05600	0,06210

Příloha 19: Neparametrická Kruskal-Wallisova ANOVA upraveného datasetu zkoušky sensorického profilu včetně hodnot mean ranku (*p*-hodnoty;  $\alpha = 0,05$ ).

		K-W ANOVA p-value [-]	mean rank p-value [-]				
			M0	M5	M10	M15	M20
hodnocený deskriptor:	vzhled	0,1048	58,1034	69,4167	76,3966	83,0000	80,8000
	barva	< 0,0001	46,6034	59,0167	71,3333	91,2037	96,9821
	konzistence	0,0202	67,9833	87,3167	53,1538	73,3333	83,0000
	lepivost	0,0800	60,0000	68,0333	69,7222	71,7069	89,1000
	sladkost	0,0331	77,3500	93,9500	74,4000	73,1833	58,6167
	kyselost	< 0,0001	64,8333	49,3500	70,2308	82,9667	99,6833
	ovocitost	< 0,0001	31,5167	77,0000	86,4643	84,6667	91,7759
	flavour	0,0138	53,7667	86,6333	77,8333	87,6833	71,5833

Příloha 20: Vícenásobné srovnání vzorků upraveného datasetu profilové zkoušky (*p*-hodnoty;  $\alpha = 0,05$ ).

		vzorek				
		M0	M5	M10	M15	M20
vzorek	M0		ovocitost ( <i>p</i> = 0,000352) flavour ( <i>p</i> = 0,033903)	ovocitost ( <i>p</i> = 0,000009)	barva ( <i>p</i> = 0,000639) ovocitost ( <i>p</i> = 0,000013) flavour ( <i>p</i> = 0,024984)	barva ( <i>p</i> = 0,000052) kyselost ( <i>p</i> = 0,014150) ovocitost ( <i>p</i> = 0,000001)
	M5	ovocitost ( <i>p</i> = 0,000352) flavour ( <i>p</i> = 0,033903)		konzistence ( <i>p</i> = 0,025713)	barva ( <i>p</i> = 0,036284) kyselost ( <i>p</i> = 0,020796)	barva ( <i>p</i> = 0,005328) sladkost ( <i>p</i> = 0,016337) kyselost ( <i>p</i> = 0,000040)
	M10	ovocitost ( <i>p</i> = 0,000009)	konzistence ( <i>p</i> = 0,025713)			

Příloha 21: Statistické vyhodnocení dat (hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ ) pořadového testu sensorické analýzy doplňku stravy ve formě želatinových bonbonů s různou koncentrací trnkového extraktu.

		Grubbsův test	Shapiro-Wilkův test	průměr ± SD	medián ± IQR	Kruskal-Wallisova ANOVA	
		p-value [-]	p-value [-]	[-]	[-]	p-value [-]	mean rank [-]
vzorek	M0	0,44016	0,00015	2,1 ± 1,2	2,0 ± 2,0		48,50
	M5	1,00000	0,00035	3,6 ± 1,5	4,0 ± 3,0		92,50
	M10	1,00000	0,01590	3,3 ± 1,3	3,0 ± 2,0	0,0002	83,50
	M15	1,00000	0,00283	3,4 ± 1,4	3,5 ± 3,0		87,50
	M20	1,00000	0,00466	2,7 ± 1,3	2,5 ± 2,0		65,50

Pozn.: směrodatná odchylka (SD), interkvartilové rozpětí (IQR), analýza rozptylu (ANOVA).