

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie

Náhrada pestré stravy a antioxidační vlastnosti

Lada Jarešová

Diplomová práce

2018

The University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology
Department of Analytical Chemistry

Replacement of multivariuous diet and its antioxidant properties

Lada Jarešová

Diploma thesis

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lada Jarešová**
Osobní číslo: **C16607**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Náhrada pestré stravy a antioxidační vlastnosti**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Popište základní principy zdravého stravování (příjem energie a živin).
 2. S využitím zahraničních odborných periodik zjistěte antioxidační vlastnosti a související složení surovin použitých v experimentální práci.
 3. Experimentálně zjistěte antioxidační vlastnosti náhrad pestré stravy dodané externí firmou s využitím spektrofotometrických metod.
 4. Výsledky statisticky zpracujte a zhodnoťte ve srovnání s dostupnou odbornou literaturou.
-

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

20. února 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

11. května 2018



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji

Tuto práci jsem vypracovala samostatně s využitím literárních pramenů a informací, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající z autorského zákona č. 121/2000 Sb., zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubic.

V Pardubicích dne: 10. 5. 2018

Lada Jarešová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu své práce doc. Ing. Liborovi Červenkovi, Ph.D. za jeho cenné rady, připomínky a trpělivost během vedení mé diplomové práce.

Velké poděkování bych také chtěla věnovat své rodině a přátelům za podporu a povzbuzení během mého studia, a hlavně za důvěru kterou do mě vložili.

ANOTACE

Tato práce se zabývá antioxidační aktivitou u náhrady pestré stravy. Teoretická část se zaměřuje na složení této stravy bohaté na zdraví prospěšné suroviny. V práci je popsán vznik volných radikálů a následek těchto reaktivních sloučenin. V praktické části je popsán vliv úpravy nutričních směsí na antioxidační vlastnosti v závislosti na době skladování.

KLÍČOVÁ SLOVA

ANOVA, antioxidanty, volné radikály, xylitol

ANNOTATION

This thesis deals with antioxidant activity and replacement of a multivariuous diet. The theoretical part is focused on the composition of this diet which is rich in healthy ingredients. The work describes the formation of free radicals and the consequences of these reactive compounds. The influence of the processing of nutritional mixtures on the antioxidant properties according to the storage time is described in the practical part of the thesis.

KEYWORDS

ANOVA, antioxidants, free radicals, xylitol

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonová kyselina) diamonná sůl)
AVs	avenanthramidy
BMI	body mass index–index tělesné hmotnosti
BMR	basal metabolic rate–bazální metabolismus
CCP	koloidní fosforečnan vápenatý
CFM	mikrofiltrace s příčným průtokem
DHA	kyselina dokosahexaenová
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EPA	kyselina eikosapentaenová
FRAP	ferric reducing antioxidant power assay
FC	Folin & Ciocalteu činidlo
GI	glykemický index
GLE	gas-liquid extraction–extrakce plyn-kapalina
HDL	lipoproteiny s vysokou hustotou
HPP	vysokotlaké zpracování
HTST	high temperature short time–pasterace za vysoké teploty v krátkém časovém úseku
LLE	liquid-liquid extraction–extrakce kapalina-kapalina

LTLT	low temperature long time–pasterace za nízké teploty po delší dobu
MCP	micelární fosforečnan vápenatý
MK	mastné kyseliny
MPC	mléčný proteinový koncentrát
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
PAL	physical activity level–stupeň fyzické aktivity
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
SAFA	nasycené mastné kyseliny
SLE	solid-liquid extraction–extrakce pevná látka-kapalina
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity–ekvivalentní množství látky Trolox
TEE	total energy expenditure = celkový energetický výdej
TK	krevní tlak
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-s-triazine
UHT	ultra-high temperature–pasterace za ultra vysoké teploty
VMK	vyšší mastné kyseliny
WP	whey protein–syrovátka
WPC	whey protein concentrate–syrovátkový proteinový koncentrát

TERMINOLOGIE

Acetylkoenzym A = je to tzv. aktivovaná kyselina octová, obecně koenzym A přenáší acyly [1]

Amfofilní antioxidanty = vlastnost hydrofilní i lipofilní [2]

Atomový orbital = prostor s nejvyšší pravděpodobností výskytu elektronů/soubor vlnových funkcí [3]

Autotrofní organismus = organismus využívající jako zdroj energie anorganické látky [2]

Avenanthramidy = skupina N-cinnamoylantranilových kyselin [4]

B-glukany = přírodní komplexní polysacharid [5]

Dehulling = proces, během kterého je odstraněn vnější obal semene [6]

Denaturace = změna struktury bílkovin způsobená zvýšenou teplotou [7]

Dyslipidémie = zvýšená koncentrace lipidů v krevní plazmě [7]

Fentonova reakce = reakce železnatých iontů s peroxidem vodíku za vzniku železitých iontů a hydroxylového radikálu [8]

Fotosyntéza = biochemický proces, při němž se v rostlinách mění anorganické látky v organické za využití světelné energie [2]

Fytosteroly = steroidy rostlinného původu [7]

Glykemický index = hodnota srovnávající různé potraviny dle vlivu na glykémii [9]

Glykosidová vazba = vazba, která spojuje 2 skupiny –OH u dvou sacharidů v poloze 1,4 a 1,6 za současného odštěpení vody [10]

Heterotrofní organismus = Organismus vyžadující organické sloučeniny jako hlavní zdroj potravy [2]

Hydrofilní = schopnost vázat vodu nebo se v ní rozpouštět [11]

Hypertenze = vysoký krevní tlak [12]

Chymosin = proteáza nacházející se v žaludku savčích mláďat [13]

Inzulínová rezistence = snížená schopnost reakce tkání na inzulín [14]

Kaseinové micely = shluky kaseinu složené z proteinu a fosforečnanu vápenatého [15]

Laktoferrin = glykoprotein vázající železo [16]

Maillardova reakce = neenzymová reakce mezi redukujícími cukry nebo produkty jejich degradace a aminokyselinami či bílkovinami [17]

Myeloperoxidasa = peroxidáza obsažená v bílých krvinkách–neutrofilech [7]

Nepárový elektron = elektron, který je ve valenční sféře nespárovaný (radikál) [3]

Prediabetes = zvýšená glykémie nad normální rozmezí (>5,6 mmol/l) [18]

Prochymosin = prekurzor chymosinu, aktivován při nízkém pH [13]

Supernatant = tekutina nad sedimentem [7]

Syneresis = kontrakce gelu doprovázená vylučováním kapaliny [2]

OBSAH

ÚVOD.....	17
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	18
1.1 Základní principy zdravého stravování.....	18
1.1.1 Příjem energie a živin	18
1.1.2 Index tělesné hmotnosti	24
1.1.3 Obezita	25
1.2 Volné radikály	25
1.2.1 Antioxidanty	26
1.2.2 Vzájemné působení antioxidantů a radikálů	26
1.3 Složení náhrady pestré stravy.....	27
1.3.1 Syrovátka	29
1.3.2 Mléčný protein.....	31
1.3.3 Kasein	32
1.3.4 Kešu	33
1.3.5 Mandle	34
1.3.6 Řepkový olej	36
1.3.7 Oves	37
1.3.8 Ovoce	39
1.3.9 Chia semínka.....	41
1.3.10 Voda.....	42
1.4 Metody prodlužující trvanlivost	43
1.4.1 Metody využívající zářev k usmrcení mikroorganismů	43
1.4.2 Pasterace	44

1.4.3	Další metody využívající záhřev.....	44
1.5	Metody zvyšující odolnost potravin	45
1.5.1	Chemoanabiosa.....	46
1.6	Metody Stanovení antioxidační aktivity	47
1.6.1	Celkový obsah fenolických látek (TPC).....	47
1.6.2	DPPH test.....	47
1.6.3	TEAC test (ABTS).....	48
1.6.4	FRAP	48
1.6.5	Metoda detekující schopnost antioxidantů zachytávat peroxid vodíku	48
1.6.6	Chelatační schopnost Fe ²⁺ iontů	49
2	PRAKTICKÁ ČÁST	50
2.1	Přístrojové vybavení a materiál.....	50
2.2	Použité chemikálie	50
2.3	Testované vzorky	51
2.4	Příprava zásobních roztoků.....	52
2.4.1	Zásobní roztok radikálu ABTS	52
2.4.2	Zásobní roztok radikálu DPPH.....	52
2.4.3	Zásobní roztok pro metodu FRAP	52
2.4.4	Roztoky pro metodu zachytávající H ₂ O ₂	53
2.5	Příprava kalibračních roztoků standardů.....	53
2.5.1	Kalibrační roztok kyseliny gallové	53
2.5.2	Kalibrační roztok Troloxu	53
2.6	Pasterace vzorku	54
2.6.1	Postup zpracování vzorků.....	54

2.7	Spektrofotometrická analýza	55
2.7.1	Stanovení celkového počtu fenolických látek	55
2.7.2	Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS	55
2.7.3	Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH	56
2.7.4	Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP	56
2.7.5	Specifická metoda zachytávající H ₂ O ₂	57
2.7.6	Chelatační schopnost Fe ²⁺	57
2.8	Statistická analýza dat	58
3	VÝSLEDKY	59
3.1	Vliv skladování na celkový obsah fenolických látek.....	59
3.2	Vliv skladování na antioxidační aktivitu měřenou metodou ABTS.....	61
3.3	Vliv skladování na antioxidační aktivitu měřenou metodou DPPH	62
3.4	Vliv skladování na antioxidační aktivitu měřenou metodou FRAP.....	63
3.5	Vliv skladování na výsledky měřené metodou zachytávající H ₂ O ₂	65
4	DISKUZE VÝSLEDKŮ	67
5	ZÁVĚR	69
6	SEZNAM LITERATURY	70
7	PŘÍLOHY	82

SEZNAM ROVNIC

Rovnice č. 1 Vzorec pro výpočet BMI [30].....	24
Rovnice č. 2 Vzorec pro výpočet inhibice roztoku v % [101].....	55
Rovnice č. 3 Vzorec pro výpočet schopnosti sloučeniny zachytávat peroxid vodíku [101]	57

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek č. 1 Reakční schéma DPPH radikálu s antioxidantem [102].....	47
Obrázek č. 2 Schéma oxidace ABTS [102]	48
Obrázek č. 3 Průběh Fentonovy reakce [8].....	49

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Hodnoty pro různé tělesné činnosti (PAL) [20].....	19
Tabulka č. 2 Doporučené hodnoty bílkovin pro denní příjem [20]	20
Tabulka č. 3 Doporučený denní příjem tuků [20].....	23
Tabulka č. 4 Kategorie BMI a zdravotní rizika [30].....	24
Tabulka č. 5 Nutriční hodnoty náhradní stravy pro dospělé.....	27
Tabulka č. 6 Nutriční hodnoty náhradní stravy pro děti	28
Tabulka č. 7 Složení komerčních syrovátkových proteinových produktů [49].....	30
Tabulka č. 8 Zastoupení mastných kyselin ve dvou druzích řepkového oleje [69].....	37
Tabulka č. 9 Zjednodušená tabulka použitých vzorků se souhrnem údajů	51
Tabulka č. 10 Výsledky celkového obsahu fenolických látek 1× pasterovaných vzorků	59
Tabulka č. 11 Výsledky celkového obsahu fenolických látek 2× pasterovaných vzorků	60
Tabulka č. 12 Výsledky antioxidační aktivity stanovené metodou ABTS pro vzorky 1× pasterované.	61
Tabulka č. 13 Výsledky antioxidační aktivity stanovené metodou ABTS pro vzorky 2× pasterované.	61
Tabulka č. 14 Výsledky antioxidační aktivity stanovené metodou DPPH pro vzorky 1× pasterované.	62
Tabulka č. 15 Výsledky antioxidační aktivity stanovené metodou DPPH pro vzorky 2× pasterované.	63
Tabulka č. 16 Výsledky antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP pro vzorky 1× pasterované	64
Tabulka č. 17 Výsledky antioxidační aktivity metodou FRAP pro vzorky 2× pasterované	64
Tabulka č. 18 Výsledky pro metodu zachytávající H ₂ O ₂ v [%] pro vzorky 1× pasterované....	65
Tabulka č. 19 Výsledky pro metodu zachytávající H ₂ O ₂ v [%] pro 2× pasterované vzorky....	66

ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá tématem náhrady pestré stravy a její antioxidační aktivitou. V dnešní době plné shonu se mnoho lidí obrací k rychlému přísunu jídla. Důležité však je, aby lidé vyhledávali tu správnou rychlou potravinu plnou vyvážených živin. Moderní doba však přináší i více zdrojů s rychlým přísunem potravin, avšak ne všechny potraviny jsou tělu k prospěchu. Mnoho rychlých náhrad obsahuje nadměru nezdravých tuků, především nasycených a trans-nenasycených mastných kyselin, které zvyšují hladinu cholesterolu a přispívají k dalším metabolickým onemocněním.

Vzhledem k těmto zdravotním komplikacím se mnoho firem snaží vyvinout náhradu stravy tak, aby splňovala požadavky na zdravý vyvážený přísun živin bez nadbytečných cukrů a tuků. Musí však být zajištěna bezpečnost výrobku během skladování a splnění požadavek obchodní sterility.

V teoretické části diplomové práce je na základě rešerší popsáno složení surovin využitých k přípravě náhrady pestré stravy. U každé suroviny jsou zmíněny antioxidační vlastnosti dané komodity.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo spektrofotometricky proměřit antioxidační aktivitu u sedmi vzorků dodaných externí firmou. Vzorky byly od data výroby skladovány v různých časových intervalech a podrobeny nejdříve mikrobiologickému a poté analytickému stanovení. Ve vzorcích byly zjišťovány celkové fenolické látky a antioxidační aktivita metodami ABTS, DPPH a FRAP. Dále byla využita metoda specifická pro záchyt peroxidu vodíku a metoda založená na chelatační schopnosti Fe^{2+} iontů. Výsledky spektrofotometrického stanovení byly statisticky zpracovány analýzou rozptylu a zhodnoceny ve srovnání s dostupnou literaturou.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Základní principy zdravého stravování

Pro správný příjem živin je důležité pochopit základní principy fungování našeho těla a těmi se následně i řídit. Základem zdravého stravování je pravidelný příjem živin v malých porcích o rozmanitém složení. Obecně se uvádí, že by za den mělo tělo přijmout 3 až 6 malých porcích. Konzumace malých porcích je prospěšná i v rámci redukce váhy, jelikož tělo při pravidelném přísunu živin není nuceno snižovat bazální metabolismus neboli snižovat optimální energetickou spotřebu [19].

1.1.1 Příjem energie a živin

Každý živý organismus potřebuje k zajištění základních funkcí v těle a termoregulaci určité množství energie. Tato základní energetická potřeba je označována jako bazální metabolismus (BMR). Bazální metabolismus úzce souvisí s netukovou tělesnou hmotou, kdy muži jí mají o 10 % více než ženy, a proto je i jejich BMR vyšší. Při obvyklé fyzické aktivitě představuje BMR největší část energetického výdeje. Zjistit tuto hodnotu lze dvěma způsoby. Lze jej vypočítat podle vzorců nebo změřit nepřímou kolorimetrií. Do celkové potřeby energie zahrnujeme vliv bazálního metabolismu, energii potřebnou pro svalovou práci, postprandiální termogenezi, pro fyziologický růst, těhotenství a laktaci. Vyjádření energie je uváděno v megajoulech (MJ) nebo v kilokaloriích (kcal) ($1\text{kcal} = 4,184\text{ KJ}$). Celková energetická potřeba s věkem jedince stoupá neboli zvyšují se nároky na potřebné množství joulů za den.

Průměrný denní výdej energie (TEE) lze experimentálně měřit metodou dvojité izotopově značené vody. Průměrná denní energetická potřeba je udávána jako poměr $\text{TEE}/(\text{BMR u dané v násobku})$. Pro tento poměr byla stanovena hodnota PAL, která ukazuje míru pro tělesné činnosti u konkrétního jedince [19, 20].

Hodnoty PAL jsou v rozmezí od 1,2 do 2,4 dle pracovní činnosti a volnočasové aktivity viz následující tabulka č. 1 [20].

Tabulka č. 1 Hodnoty pro různé tělesné činnosti (PAL) [20]

Pracovní zátěž a zátěž ve volném čase	PAL	Příklady
Výhradně sedavý způsob života nebo lidé upoutání k lůžku	1,2	Staří, nemocní lidé
Sedavý způsob života, bez volnočasové aktivity	1,4–1,5	Úředníci
Sedavá činnost s občasnou lehkou aktivitou ve stoje nebo chůzi	1,6–1,7	Laboranti, studenti, řidiči
Činnost převážně ve stoje a v chůzi	1,8–1,9	Prodavači, čišníci, mechanici, řemeslníci
Fyzicky náročná pracovní činnost	2,0–2,4	Stavební dělníci, zemědělci, lesníci, výkonní sportovci

Plnohodnotný příjem živin je zajištěn pravidelným přísunem organických složek potravy. Mezi tyto základní složky patří bílkoviny, sacharidy a tuky.

Bílkoviny

Bílkoviny neboli proteiny, jsou vysokomolekulární přírodní látky složené z aminokyselin. Aminokyseliny jsou základními stavebními jednotkami v bílkovinách, obsahující ve své molekule aminoskupinu $-NH_2$ a karboxylovou skupinu $-COOH$. Bílkoviny vznikají procesem kondenzace. Během tohoto procesu je jedna karboxylová skupina aminokyseliny spojena s aminoskupinou jiné aminokyseliny amidovou vazbou. Vedlejším produktem kondenzace je voda, která se odštěpuje. Vzniklá bílkovina je propojena dvěma aminokyselinami amidovou vazbou. Za bílkoviny jsou považovány takové struktury, které obsahují více než 100 aminokyselin v molekule [19, 21].

Potřeba aminokyselin pro organismus je nezbytná z hlediska jeho správné funkce, např. pro syntézu hemoglobinu. Organismus sám o sobě některé aminokyseliny dokáže syntetizovat (neesenciální), ale jsou i takové, které si vyrobit nedovede (esenciální). Z těchto důvodů je nezbytné dodávat aminokyseliny i potravou, a tím zajistit bílkovinnou rovnováhu. Existuje 9 esenciálních aminokyselin, které musí být dodány. Mezi ně se řadí histidin, leucin, izoleucin,

lyzin, methionin, fenylalanin, threonin, tryptofan a valin. Společnost pro výživu vydala doporučený denní příjem bílkovin, viz následující tabulka č. 2 [19, 21].

Tabulka č. 2 Doporučené hodnoty bílkovin pro denní příjem [20]

Denní příjem bílkovin	[g/den]		[g/kg ¹ /den]	
	muž	žena	Muži + Ženy	
Věk				
Kojenci				
0–≤1 měsíc	12	12	2,7	
1–11 měsíců	10	10	(2,0–1,1) ²	
Děti				
1–3 roky	14	13	1,0	
4–6 let	18	17	0,9	
7–9 let	24	24	0,9	
10–12 let	34	35	0,9	
13–14 let	46	45	0,9	
Dospívající a dospělí				
15–18 let	60	46	0,9	0,8
19–24 let	59	48	0,8	
25–50 let	59	47	0,8	
51–64 let	58	46	0,8	
≥ 65 let	54	44	0,8	
Těhotné	x	58	x	
Kojící	x	63	x	

x = není definováno

¹ Vztaženo na referenční tělesnou hmotnost

² Doporučený příjem bílkovin ubývá s rostoucím věkem (měsíce kojení).

Sacharidy

Sacharidy jsou na světě velmi rozšířenou skupinou organických látek. Z chemického hlediska se jedná o polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony, které mají nejméně tři alifaticky vázané uhlíkové atomy. Klasifikace sacharidů je obvykle dle počtu sacharidových molekul na monosacharidy (glukóza, fruktóza). Spojením 2–10 stejných nebo různých monosacharidových jednotek glykosidovou vazbou vznikají oligosacharidy. Podle počtu spojených jednotek jsou oligosacharidy děleny na disacharidy, trisacharidy, tetrasacharidy až dekasacharidy. Nejdůležitějšími z nich jsou disacharidy, mezi které řadíme sacharózu, maltózu a laktózu. Pokud dojde ke spojení více než 10 molekul, řadí se takové sloučeniny mezi polysacharidy [22, 23].

Sacharidy obecně zastávají funkci zásobní (škrob, glykogen, inulin), stavební (celulóza, chitin) a jsou zdrojem rychlé energie (glukóza, fruktóza). Zapojení do biologických a chemických procesů je velmi podstatné pro funkci metabolismu. Sacharidy se syntetizují v rostlinách (autotrofní orgány) jako primární produkty fotosyntézy. Heterotrofní organismy tuto funkci nemají a musí je přijímat ve formě potravy. Doporučené denní množství sacharidů pro průměrného dospělého člověka činí přibližně 342 g, což představuje 55 % celkového příjmu energie. Nadbytečný příjem sacharidů má za následek přeměnu části acetylkoenzymu A na mastné kyseliny, čímž vznikají tuky [19, 20, 23].

Tuky-Lipidy

Lipidy jsou dalším významným zdrojem příjmu energie a součástí buněčných membrán. Jejich energetická hodnota je dvojnásobně vyšší, než je tomu u sacharidů a bílkovin. Dle chemické struktury se jedná o estery vyšších karboxylových kyselin. Lipidy se dělí na jednoduché a složené, jednoduché lipidy obsahují alkohol a vyšší mastné kyseliny (MK). Mezi ně se řadí acylglyceroly-estery glycerolu a vyšších mastných kyselin (VMK). Tuto skupinu zastupují tuky a oleje. Druhou skupinu představují vosky-vyšší jednosytné alkoholy a VMK. Mezi složené lipidy řadíme fosfolipidy a glykolipidy. Fosfolipidy obsahují esterově vázanou kyselinu fosforečnou a glykolipidy obsahují sacharidovou složku (glukóza) [21].

Příjem lipidů je podstatný, jelikož jejich funkce je nenahraditelná. Pro organismus jsou zdrojem energie, zásoba energie (tuková tkáň), stavební složkou biomembrán a zastávají ochrannou funkci orgánů. Příjem lipidů v potravinách je podstatný, vzhledem k jejich vazbě s vitamíny rozpustných v tucích, chuťovými a aromatickými látkami. Důležitou složkou tuků v potravě

jsou MK, které rozdělujeme dle počtu dvojných vazeb na nasycené-saturované (SAFA) a nenasycené-nesaturované. Nenasycené můžeme dále rozdělit na mononenasycené (MUFA) a polynenasycené (PUFA)[21, 24].

Nasycené mastné kyseliny

Nasycené mastné kyseliny neobsahují ve svém řetězci žádnou dvojnou vazbu. Jedná se například o kyselinu stearovou a palmitovou, které jsou ve velkém množství obsaženy v tuku užitkových zvířat. Z živočišných produktů lze také jmenovat máslo, které je bohaté na množství SAFA. Výskyt nasycených mastných kyselin je i v rostlinných produktech. Příkladem je kokosový a palmojádrový tuk, kde je obsah nasycených MK poměrně vysoký. Na druhou stranu olej řepkový má velmi malé množství těchto MK. Mastné kyseliny jež obsahují menší počet atomů uhlíku v molekule jsou dobře vstřebatelné střevní stěnou oproti vyšším s 12–16 atomy uhlíku (kyselina palmitová). Vyšší příjem nasycených mastných kyselin představuje riziko z hlediska vyšší hladiny cholesterolu [21, 25].

Mononenasycené mastné kyseliny

Mononenasycené MK neboli monoenoové kyseliny obsahují jednu dvojnou vazbu ve svém řetězci. Naopak polynenasycené MK obsahují dvojných vazeb více. Mezi nejznámější představitele MUFA patří kyselina olejová, kterou nalezneme například v olivovém oleji a v avokádu. Po zdravotní stránce je tyto kyseliny vhodné konzumovat především pro jejich protizánětlivé účinky, pozitivní vliv na krevní tlak a zlepšení funkce cévní výstelky [26, 27].

Polynenasycené mastné kyseliny

Polynenasycené MK neboli polyenoové kyseliny obsahují více dvojných vazeb v řetězci. Tyto kyseliny naše tělo nedokáže tvořit, tudíž musí být přijímány potravou, jsou nazývané jako esenciální MK. Většinou mají tyto kyseliny na náš organismus příznivý vliv, snižují cholesterol a zabraňují vzniku trombů. Zdrojem PUFA jsou rostlinné oleje (slunečnicový) a tuk obsažený v rybím mase (losos, tuňák, sardinky) [26, 27, 28].

ω -6-MK a ω -3-MK

ω -6-MK patří mezi esenciální mastné kyseliny, avšak v dnešní jich máme v těle nadbytek, čímž může docházet ke vzniku zánětů. Zdrojem této kyseliny je hlavně olej slunečnicový a sójový.

Další esenciální MK je ω -3-MK, která má protizánětlivý účinek, čímž snižuje pravděpodobnost vzniku srdečních a nádorových onemocnění. Konzumace těchto kyselin může mít významný preventivní účinek proti diabetu II typu a degenerativním onemocněním mozku. Obsahují kyselinu EPA (kyselina eikosapentaenová) a DHA (kyselina dokosaheptaenová). Zdrojem těchto kyselin jsou zejména ryby, chia semínka, ořechy a z olejů je hlavním zdrojem řepkový olej. Řepkový olej i chia semínka byly firmou použity v nutriční směsi.

Přesto, že jsou tyto kyseliny prospěšné pro člověka, je však důležité, v jakém poměru jsou konzumovány. Poměr by měl činit nejlépe 1:1 nebo 2:1 ve prospěch ω -6-MK. V dnešní době je však tento poměr nevyvážený a dochází k vyššímu příjmu ω -6-MK. Tento poměr je nežádoucí a přispívá ke vzniku civilizačních onemocnění. Podle společnosti pro výživu byl doporučený denní příjem tuku shrnut v následující tabulce č. 3 [24, 26].

Tabulka č. 3 Doporučený denní příjem tuků [20]

Denní příjem tuků	% celkového energetického příjmu
Věk	
Kojenci	
0–3 měsíce	45–50
4–11 měsíců	35–45
Děti	
1–3 roky	30–40
4–6 let	30–35
7–9 let	30–35
10–12 let	30–35
13–14 let	30–35
Dospívající a dospělí	
15–18 let	30 ³
19–24 let	30
25–50 let	30
51–64 let	30
≥ 65 let	30
Těhotné	30–35
Kojící	30–35

³ Osoby od 15–50 let se zvýšenou potřebou energie mohou potřebovat vyšší % zastoupení tuku

1.1.2 Index tělesné hmotnosti

Mezi nejznámější metody hodnotící tělesný tuk v lidském těle patří Body mass index (BMI). Tento index posuzuje hmotnost vzhledem k následným zdravotním rizikům (viz tabulka č. 4). BMI se počítá jako podíl tělesné hmotnosti (kg) k výšce jedince (m) umocněné na druhou (rovnice č. 1).

$$BMI = \frac{\text{hmotnost (kg)}}{\text{výška (m)}^2}$$

Rovnice č. 1 Vzorec pro výpočet BMI [30]

Tabulka č. 4 Kategorie BMI a zdravotní rizika [30]

BMI	kategorie podle WHO	zdravotní rizika
<18,5	podváha	poruchy příjmu potravy
18,5–24,9	normální váha	minimální
25–29,9	nadváha	lehce zvýšená
30,0–34,9	obezita stupeň 1	středně vysoká
35,0–39,9	obezita stupeň 2	vysoká
> 40	obezita stupeň 3	velmi vysoká

[30]

Tento ukazatel není zcela přesný, ale je prvním a rychlým ukazatelem nesrovnalostí v našem těle. BMI je stále využíván v dietologických nebo zdravotně výživových centrech. Hlavním důvodem, proč se od této metody dosud neustoupilo je ten, že se jedná o nejlevnější metodu pro zjištění tuku v těle. Pro děti a mládež (do 19 let) je index tělesné hmotnosti počítán stejným způsobem, avšak jinak porovnáván. Pro správně vypočítané BMI je důležité zahrnout hodnoty i ostatních dětí a dospívajících, jelikož podíl tělesného tuku se mění v rámci vývoje. Další věc, která musí být zohledněna u všech věkových kategorií, je pohlaví, protože existuje rozdíl mezi hodnotami BMI pro ženské a mužské pohlaví, ikdyž mohou mít stejné číselné údaje.

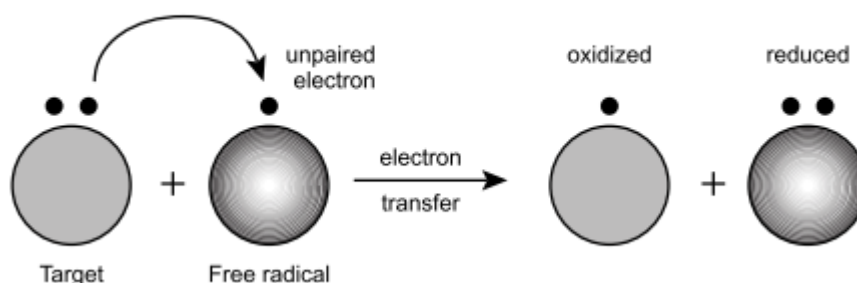
Přesnějších výsledků o zastoupení tuku v těle lze dosáhnout měřením kožních řas nebo využitím bioelektrické impedance. Studie ukazují na korelaci mezi vyšším BMI a rozvojem kardiovaskulárních onemocnění, zúžením vnitřních stran tepen (ateroskleróza), zvyšující se hladinou glukózy na lačno a rozvojem obezity [30,31,32, 33].

1.1.3 Obezita

Obezita je celosvětový zdravotní problém, který dosahuje epidemiologické úrovně, která neustále roste. Nyní se již jedná o vážnou výzvu pro veřejné zdraví po celém světě. Navíc obezita u dětí je velmi závažným problémem z hlediska objevujících se metabolických komplikací v již tak ranném věku. Těmito komplikacemi je myšlena dyslipidémie, hypertenze, inzulínová rezistence a prediabetes. Mimo to jsou také díky obezitě predispozice ke vzniku koronárních chorob srdečních. Některé studie poukazují na souvislost, že více otlých dětí se vyskytuje v rodinách s anamnézou kardiovaskulárního onemocnění [34, 35, 36].

1.2 Volné radikály

Volné radikály představují důležitou součást aerobního metabolismu, jelikož jsou základem mnoha biochemických procesů. Vznik volných radikálů je možný třemi způsoby. Prvním způsobem může být samotná oxidace–přijmutí elektronu, nebo druhým způsobem a to redukcí–odevzdáním elektronu a třetí možná cesta vzniku volných radikálů je pomocí homolytického štěpení kovalentní vazby. Jestliže radikál začne reagovat s jinou normální molekulou, stane se z ní také radikál neboli dojde k tzv. propagaci radikálové reakce (viz obrázek č.1). Konečnou fází je reakce dvou radikálů. Volné radikály mohou způsobit řetězec oxidačních procesů potravin, urychlit zhoršování potravin a způsobit zdravotní obtíže. Na vznik nežádoucích biochemických pochodů v těle mají vliv reaktivní druhy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). Vysoká hladina těchto reaktivních druhů může způsobit poškození DNA a základních látek (bílkoviny, lipidy). Dále může způsobit oxidační stres a podíl na vzniku aterosklerózy, rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění [37, 38, 39, 41].



Obrázek č. 1 Vznik nového radikálu [40]

1.2.1 Antioxidanty

Mezi antioxidanty se řadí látky, které zabraňují vzniku volných radikálů, nebo snižují jejich aktivitu. Antioxidanty přeměňují volné radikály z reaktivních forem na méně reaktivní, nebo z nich dokáží udělat i nereaktivní formu. Tento proces je podstatný zejména pro ochranu před oxidací genetické informace a základních stavebních látek, kterými jsou lipidy, sacharidy, bílkoviny. Výsledkem je chráněný produkt a jeho prodloužená doba údržnosti [42].

Mezi přirozené antioxidanty řadíme látky, které dokáže sám organismus produkovat nebo přijímat formou potravy. Tyto antioxidanty se nacházejí v běžných potravinách, kterými jsou ovoce, zelenina, ale vyskytují se i v nápojích (čaj a káva). Výhodou je jejich rozpustnost ve vodné nebo tukové fázi. Hydrofilní antioxidanty jsou nízkomolekulární. Patří sem kyselina askorbová, kyselina močová, bilirubin, polyfenoly a polyfenolové bioflavonoidy. Lipofilními antioxidanty jsou vysokomolekulární látky, mezi které se řadí vitamín E (α - tokoferol), karotenoidy (β -karoten, lykopen), ubiquinol (koenzym Q10), estrogeny a steroidy. Do skupiny amfofilních antioxidantů patří kyselina lipoová a melatonin [39].

Existují nejen přirozené, ale i syntetické antioxidanty. Příkladem takového antioxidantu jsou statiny, které se užívají k redukci cholesterolu. Nemusí se nutně jednat o syntetické produkty, stačí když je přirozený antioxidant modifikován a stává se syntetickým produktem. Příkladem je vitamín C, kdy se modifikací stává z hydrofilní látky, látka lipofilní [43].

Antioxidační sloučeniny jsou schopné snižovat rizika mnoha chronických onemocnění jako je rakovina, koronární srdeční onemocnění, pokles imunitního systému a další. Jedná se o přirozené obranné látky, které organismu slouží k boji proti volným radikálům. Antioxidanty jsou často přidávány do potravinových receptur kvůli zvýšení antioxidační aktivity [38, 41].

1.2.2 Vzájemné působení antioxidantů a radikálů

Volné radikály jsou vysoce reaktivní částice, která obsahují jeden či více nepárových elektronů. V atomovém orbitalu se nacházejí osamoceny, bez opačného spin, což je velmi nestabilní stav. Zde účinkují antioxidanty, které poskytují svůj elektron volnému radikálu, který se stane stabilním, avšak z původního antioxidantu se stane nový volný radikál. Naštěstí systém antioxidantů má vše pod kontrolou a vzájemné působení mezi antioxidanty a radikály je propojeno. Spotřebované antioxidanty jsou regenerovány jinými antioxidanty do původního

stavu. Přirozeně existuje dynamická rovnováha mezi množstvím volných radikálů generovaných v těle a antioxidanty, které chrání tělo před jejich škodlivými účinky[41, 42].

1.3 Složení náhrady pestré stravy

"Běžná" svačina pro dospělé (Super Food MIX)

Nutriční hodnoty náhrady pestré stravy poskytnuté výrobcem v tabulce č. 5.

Uvažované suroviny

- syrovátkový proteinový koncentrát CFM
- micelární kasein
- kešu „máslo“
- mandlové „máslo“
- řepkový olej
- jemně mleté/instantní ovesné vločky
- ovocné pyré/sušené ovoce
- chia semínka
- voda

Tabulka č. 5 Nutriční hodnoty náhradní stravy pro dospělé

Nutriční hodnoty náhradní stravy na 150 g výrobku	
bílkoviny	20 g
tuky	15 g
(z toho nasycené)	do 5 g
sacharidy	20 g
(z toho cukry)	do 5 g
vláknina	5 g
ω -3-mastné kyseliny	1 g (a více)

Celkový energetický příjem činí cca 300 kcal

Běžná" svačina pro děti (Super Food Mix–Junior)

Nutriční hodnoty náhrady pestré stravy poskytnuté výrobcem v tabulce č. 6.

Uvažované suroviny:

- mléčný proteinový koncentrát
- syrovátkový proteinový koncentrát CFM
- kešu „máslo“
- mandlové „máslo“
- řepkový olej
- jemně mleté/instantní ovesné vločky
- ovocné pyré/sušené ovoce
- chia semínka
- voda

Tabulka č. 6 Nutriční hodnoty náhradní stravy pro děti

Požadované parametry produktu/nutriční hodnoty na 100 g výrobku	
bílkoviny	10 g
tuky	10 g
(z toho nasycené)	do 3 g
sacharidy	20 g
(z toho cukry)	do 10 g
Vláknina	5 g
ω -3-mastné kyseliny	1 g (a více)

Celkový energetický příjem činí cca 180 kcal

1.3.1 Syrovátka

Syrovátka je vedlejším produktem při výrobě sýrů, jogurtů a tvarohu, často označována za odpadní produkt. Vzniká po koagulaci a oddělení kaseinu, je bohatá na laktózu, bílkoviny a tuky. Obsahuje také velké množství vitaminů a minerálů, např. vápník (Ca), hořčík (Mg), sodík (Na) a draslík (K). Syrovátka představuje druhou podstatnou složku mléka hned po kaseinu. Tyto dvě hlavní bílkoviny lze od sebe oddělit při pH 4,6 a 20°C. Kasein se projevuje jako sraženina, kdežto syrovátka je rozpustná [44, 45].

Syrovátka se dělí do dvou skupin na sladkou a kyselou dle výrobního způsobu. Kyselá syrovátka vzniká při výrobě čerstvých sýrů, např. sýru Ricotta, Cottage a jogurtů řeckého stylu. Sladká syrovátka pochází z výroby tvrdých sýrů. Druhotným produktem je slaná syrovátka s vysokým obsahem soli. Sůl je aplikována během kroku solení některých sýrů (například Cheddar a Colby) [45].

Dříve byla syrovátka považována za odpad kvůli vysokému obsahu organických látek, které bylo nutné minimalizovat. Organické množství syrovátky mohlo být minimalizováno, avšak proces vyžadoval vyšší nároky na množství kyslíku, což mělo neblahý dopad na životní prostředí. Dnes se již syrovátka zpracovává při dalších technologických procesech. Využívá se do syrovátkových prášků, pro výrobu syrovátkových bílkovin a laktózy. Syrovátkové prášky jsou využívány jako potravinářské přísady v mnoha výrobních odvětvích. Procesní účinky, jako je solení, zahřívání a okyselení mění povrchové a strukturní vlastnosti syrovátkového proteinu (WP) [44, 46].

Syrovátkový protein

Hlavními složkami syrovátkových proteinů jsou β -laktoglobuliny, α -laktalbuminy, albuminy a imunoglobuliny. Syrovátkové proteiny jsou významné pro své vlastnosti. Nejdůležitější vlastností je tvorba gelů se schopností uchovávat vodu, tuky a další složky. Dalším pozitivním aspektem je pěnivá vlastnost, která závisí na koncentraci bílkovin daného druhu syrovátkového proteinu [48].

Dnes existují tři druhy syrovátkových proteinů.

- Koncentrát
- Izolát
- Hydrolyzát

Tabulka č. 7 Složení komerčních syrovátkových proteinových produktů [49]

Syrovátkové produkty	Látkové složení v [%]		
	Bílkoviny	Tuky	Laktóza
Proteinový koncentrát-WPC	34–80	1–7	4–52
Proteinový izolát-WPI	90–95	0,5–1	0,5–1
Proteinový hydrolyzát	80–90	0,5–8	0,5–10

Bylo prokázáno, že konzumací syrovátkového proteinu se dosahuje inhibice růstu rakovinových buněk, čímž mu je přisuzována funkce ochrany proti rozvoji nádorů. Jedna z hlavních syrovátkových bílkovin β -laktoglobulin zajišťuje funkci nosiče hydrofilních a amfifilních molekul, včetně retinolu. O retinolu, vitamínu A, je uvažováno jako o ochránci molekul před oxidací během transportu živin přes žaludek do tenkého střeva. Vitamin A je jeden z důležitých antioxidantů. Pro β -laktoglobulin a kasein bylo zjištěno, že zachycují peroxylové radikály [46, 49].

Syrovátkový proteinový koncentrát

Syrovátkový proteinový koncentrát je využíván v mnoha potravinářských systémech především pro své vlastnosti emulgace a pění. K výrobě syrovátkového i kaseinového proteinu lze využít i plnotučné mléko, avšak tuk je uzavřen v izoelektrickém kaseinu a narušuje charakterizaci proteinů. Tuk se odstraní jednoduše pomocí centrifugace, která je zde výhodnějším typem řešení. Uvádí se, že obsah bílkovin se pohybuje v rozmezí od 30–80 %, záleží na kvalitě výsledného produktu. Tento typ proteinu je nejdostupnější variantou, avšak obsahující i laktózu a tuky. Řadí se mezi hůře stravitelné než ostatní druhy syrovátkových proteinů, ale chuťově patří k nejlepším. Tento typ syrovátkového proteinu byl využit pro výrobu nutriční směsi [46, 47, 48].

1.3.2 Mléčný protein

Mléko obsahuje několik proteinů o různých koncentracích. Mnohé z nich jsou biologicky aktivní, i když se vyskytují pouze v minimálním množství. Z těch, které se vyskytují ve vyšších koncentracích, lze jmenovat β -laktoglobulin, α -laktalbumin, imunoglobuliny, sérový albumin, laktoferin, transferin a další. Některé proteiny mají vlastnost vázat na sebe kovy. Příkladem je laktoferin, pocházející ze skupiny látek vázajících na sebe železo. Nachází se ve slinách, slzách, spermatu a potu. Významné jsou jeho biologické funkce, mezi které patří například bakteriostatická, antioxidační a antivirová vlastnost. Lidské mateřské mléko má velmi vysokou hladinu laktoferinu, zastupuje více jak 20 % z celkového množství dusíku [45, 46, 50, 51].

Mléčný proteinový koncentrát

Mléčný proteinový koncentrát (MPC) vzniká z pasterizovaného odstředěného mléka s následnou ultrafiltrací a diafiltrací. Dále je produkt sušen pomocí rozprašování do prášků. MPC prášky se zhotovují s různou koncentrací bílkovin. Množství bílkovin se pohybuje v rozmezí od 40 % do 80 %. Čím více bílkovin je v prášku obsaženo, tím je horší rozpustnost a hydratace. Rychlost rozpuštění limitují i další faktory, kterými jsou: tepelné zpracování, obsah minerálů, teplota sušení, skladovací podmínky (čas a teplota) a rehydratace [46, 52].

Bílkoviny obsažené v mléce mají antioxidační účinek v potravinách, jelikož mohou inhibovat oxidaci lipidů. Jsou schopné inaktivace reaktivních druhů kyslíku a redukce hydroperoxidů [50].

1.3.3 Kasein

Kasein se řadí mezi fosfoprotein, který se nachází především v mléce hospodářských zvířat, kde zaujímá 80 % z celkového množství bílkovin. V lidském mléce je však obsah kaseinu nižší, pohybuje se v rozmezí 20–40 %. Zastoupení fosforu v kaseinu činí průměrně 0,85 %, jehož funkcí je vazba vápníku. Množství kaseinu obsaženého v mléce se liší, avšak typická analýza složení kravského mléka je následující:

- Voda 87 %
- Tuk 3,5–4 %
- Laktóza 5 %
- Kasein 3 %
- Globulin + albumin 0,5–1 %
- Ostatní složky 0,5–1 %

Micelární kasein

Mléko obsahuje kasein ve velmi malých koloidních částicích označovaných jako micely-micelární kasein. Tyto micely se skládají z proteinového komplexu a fosforečnanu vápenatého (viz příloha č. 1). Proteinové zastoupení kaseinových micel představuje 93 % jeho sušiny, která se skládá ze čtyř složek označované jako α_1 -, α_2 -, β - a κ - kasein. Zbytek micel sestává z anorganického materiálu, označovaného jako koloidní fosforečnan vápenatý (CCP) nebo micelární fosforečnan vápenatý (MCP). Destrukce kaseinových micel může být provedena několika způsoby. K destrukci může dojít účinkem tepla, alkoholů, kyselin, solí nebo enzymového syřidla. Většina mléčných výrobků je založena na procesu srážení kaseinu kyselinami nebo pomocí syřidla, chymosinu. Chymosin jako enzym příbuzný pepsinu je tvořen v žaludku mladých přežvýkavců. Jeho sekrece dosahuje nejvyšších hodnot během prvních dnů po porodu, následně vyloučená koncentrace klesá. Nejdříve je vylučován jako proenzym nazývaný prochymosin, který je aktivován působením kyselin. Úkolem tohoto enzymu je rozklad mléka za vzniku sýřeniny, která se používá pro výrobu sýra. [15, 52, 53, 54, 55].

Kaseináty

Dalšími méně kvalitními produkty s obsahem kaseinu, vyrobené chemickou cestou, jsou kaseináty. Vlivem alkálií (NaOH nebo KOH) se zvyšuje pH na hodnotu přibližně 6,7 za vzniku kaseinátu sodného nebo draselného záleží na použité alkálii [55].

Dle výrobního procesu rozlišujeme kyselé srážení pomocí kyselin a sladké srážení pomocí syřidla. U výroby jogurtů a tvarohů se uplatňuje srážení pomocí kyselin vznikajících během mléčného kvašení nebo se kyseliny přidávají přímo. Pro výrobu sýrů se využívá syřidla za vzniku sladkého kaseinu [54].

Kasein je využíván jako vstupní surovina nejen pro výrobu sýrů, nýbrž i pro další průmyslová odvětví (barvy, lepidla). Rozsáhlé využití má i jako doplněk stravy pro vrcholové sportovce a kulturisty [57].

1.3.4 Kešu

Kešu ořechy pocházejí z Jižní Ameriky, přesněji z Brazílie, odkud je kolonisté přivezli do Afriky a Indie. Tyto země jsou dnes největšími producenty této komodity. Kešu oříšky jsou měkké, nasádlé a obsahují vysoký podíl bílkovin a tuků.

Jádra kešu obsahují

- Bílkoviny 20–24 %
- Sacharidy 23–25 %
- Tuky 40–60 %.

Zpracování kešu ořechů zahrnuje řadu několika kroků, kterými jsou pražení, loupání, třídění a balení. Ořechy jsou bohaté na nenasycené mastné kyseliny, bílkoviny, vlákninu, mikronutrienty, vitamíny a fytochemikálie. Hlavními flavonoidy v oříšcích jsou flavan-3ony, flavanoly a anthokyany, avšak kešu ořechy spolu s piniovými semínky a brazilskými ořechy tyto antioxidanty neobsahují. Obsah mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin (MK) pomáhá příznivě redukovat hladiny LDL a HDL cholesterolu a chránit před onemocněním srdce a vznikem rakoviny. Kešu ořechy, makadamové a para ořechy obsahují o něco více nasycených MK než mandle a pekanové ořechy. Ořechy jsou důležitým zdrojem vlákniny, ve 100 g je obsaženo 1,75 g zejména rozpustné vlákniny [27, 57, 58].

Z minerálních látek kešu ořechy obsahují hořčík, který se účastní mnoha enzymatických reakcí v těle, včetně zmiňované syntézy MK. Kromě těchto reakcí je hořčík důležitý z hlediska svalové relaxace a neuromuskulárního přenosu a aktivity. Podílí se též na asimilaci vápníku do kostí. Také měď, která je prospěšná pro udržení kolagenu a elastinu, je jedním z prvků obsažených v kešu oříšcích. Draslík, železo a zinek jsou dalšími minerály zastupujícími tuto komoditu [57, 59].

1.3.5 Mandle

Mandle jsou plody mandloně obecné a samy o sobě v syrovém stavu obsahují mnoho prospěšných látek. Jsou bohaté na proteiny, tuky a minerální látky. Tuky tvoří přes polovinu jejich hmotnosti, avšak více obsaženými jsou nenasycené mastné kyseliny, jako je kyselina olejová (67,88–77,29 %) a kyselina linolová (15,82–25,10 %). Tyto nenasycené MK jsou vhodné z hlediska kontroly hladin lipidů v krvi a také snižují hustotu lipoproteinů, což je prospěšné pro prevenci kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních onemocnění. Mandlová jádra jsou bohatá na vitaminy a minerály, považují se za dobrý zdroj vitamínu E, riboflavinu, vápníku, hořčíku, fosforu, draslíku, zinku, mědi a manganu. V plodech mandloně obecné nalezneme také řadu antioxidantů, například proanthocyanidiny, flavonoidy, fenolové kyseliny a fytoosteroly. Mnoho výzkumných pracovišť poukazuje na snížení koncentrace LDL cholesterolu v krvi vlivem fytoosterolů, které přispívají ke snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění [27, 60, 61].

Ořechové a živočišné „máslo“

Termínem rostlinné/ořechové „máslo“ se rozumí produkt obsahující nejméně 90 % ořechů. Dnes se čím dál více využívá jako alternativa místo mléčného másla především se vzrůstajícími pochybnostmi o spotřebě tohoto živočišného produktu. Živočišné máslo je v ČR dle nařízení ES definováno jako produkt s obsahem mléčného tuku minimálně z 80 %, avšak méně než 90 % a maximálním obsahem vody 16 %. Nepřípustná jsou aditiva a přídavek rostlinných tuků. Pokud jsou přidány rostlinné tuky, nelze použít označení máslo, nýbrž se jedná o „směsný tuk“. Máslo označené jako čerstvé je možné prodávat pouze 20 dní od data výroby uchované při teplotě 8 °C. Stolním máslem je produkt z mléčného tuku, který je přípustný uchovávat v chladírenských nebo mrazírenských teplotách po delší dobu, avšak maximálně jeden rok [62, 63, 64].

První krokem výroby ořechového másla je třídění ořechů, následuje pražení, blanšírování a mletí. Při tomto kroku je aplikován přídatek soli, cukru, stabilizátorů a emulgátorů. Konečnými kroky je odvodušnění, chlazení, plnění a balení, viz schéma příloha č. 2 [65].

Studie prokazují, že pravidelná konzumace ořechů i ořechového másla snižuje riziko obezity, cukrovky, srdečních chorob a také celkovou úmrtnost. Konzumace másla navíc podporuje zdravou pleť, vlasy a zvyšuje energii, čímž také pomáhá v redukci hmotnosti [59].

Mandlové a kešu „máslo“

Celé plody mandlí a kešu ořechů jsou dále zpracovány, aby se získaly menší částice různého tvaru a velikosti. Mohou být krájené, sekané nebo drcené. Částice s menší velikostí mají více frakturovaných buněk a tím snadnější uvolňování živin než částice větší. Vyrábí se z mandlí syrových, pražených nebo bez slupky. Během výroby se nesmí opomenout zachování nutričních vlastností, aby byly využity přínosy čerstvých ořechů a semen. Minimalizace přeměny zdravých složek na nezdravé a teplotní podmínky během pražení, broušení a skladování jsou významnými faktory [62].

Ořechová „másla“ je možné konzumovat samostatně nebo jako součást jakýchkoli pokrmů. U mandlového másla je obsah vlákniny, draslíku a vápníku vyšší než v másle arašídovém. Statisticky významný rozdíl je především v množství vápníku, kterého je v mandlovém „másle“ více než v kešu „másle“. Mezi zdravotní přínosy obou komodit patří jejich vysoký obsah fotochemikálií, řadících se mezi antioxidanty, též někdy označovaných jako barevné pigmenty sloužící jako ochranné rostlinné látky. Preventivně působí proti rakovině, kardiovaskulárním nemocem a byl jim také prokázán vliv na snižování výskytu nádorů [61, 62, 65, 66, 67].

1.3.6 Řepkový olej

Řepkový olej se získává z plodiny řepky olejky, patřící do čeledi brukvovitých. Potravinářský trh nabízí dva druhy řepkového oleje. Jedním z nich je panenský řepkový olej neboli olej lisovaný za studena. Druhým produktem na trhu je rafinovaná forma řepkového oleje zpracovaná rafinací. Olej lisovaný za studena je velmi kvalitním jedlým olejem bohatým na vitamín E. Využíván je jak za studena, tak i v teplé kuchyni. Barva výsledného produktu je nažloutlá, s chutí po oříšcích. Olej lisovaný za studena vzniká stlačováním semen řepky olejky při trvalé nízké teplotě. Technologie je považována za zcela novodobou, vyžadující pečlivé provedení [25, 68].

Dle obsahu MK je u obou typů řepkového oleje přínosné relativně vysoké zastoupení mononenasyčených a polynenasycených MK a naopak nízké zastoupení nasycených tuků (~ 7 %). Řepkový olej za studena lisovaný obsahuje nejen tuky, ale i další prospěšné látky, kterými jsou tokoferoly a fytosteroly. Fytosteroly jsou jedny z antioxidantů pocházející z rostlinných zdrojů. V případě řepkového oleje rafinovaného je obsah tokoferolů o málo nižší, ale rozdíl není statisticky významný. Naopak rozdíl v obsahu fenolů je statisticky významně vyšší u rafinované varianty tohoto oleje. Další výhodou rafinovaného oleje je vysoký bod přepálení (kolem 240 °C), takže je vhodný pro smažení a při vysokých teplotách neztrácí své vlastnosti [69, 70].

Složení MK u řepkového oleje

Varianta řepkového oleje lisovaného za studena obsahuje více kyseliny linolenové (C18:3) než rafinovaná verze oleje, avšak hodnoty rozdílnosti nebyly statisticky prokázány. Za statisticky významný rozdíl v obsahu mastných kyselin lze považovat množství mastné kyseliny palmitoolejové, arachové a eikosenové. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin pro řepkový olej rafinovaný a za studena lisovaný je znázorněn v tabulce č. 8 [69].

Tabulka č. 8 Zastoupení mastných kyselin ve dvou druzích řepkového oleje [69]

Obsah jednotlivých kyselin	Řepkový olej lisovaný za studena	Rafinovaný řepkový olej
Palmitová	^A 5,3 ± 0,4	^A 5,3 ± 0,2
Palmitoolejová	^A 0,1 ± 0,0	^B 0,2 ± 0,5
Stearová	^A 1,9 ± 0,3	^A 1,9 ± 0,1
Olejová	^A 56,2 ± 2,9	^A 55,7 ± 2,0
Vakcenová	^A 2,0 ± 0,2	^A 2,1 ± 0,2
Linolová	^A 21,0 ± 2,0	^A 21,1 ± 0,8
α-linolenová	^A 10,0 ± 1,5	^A 9,2 ± 0,8
Arachová	^A 0,7 ± 0,2	^B 0,5 ± 0,3
Eikosenová	^A 1,5 ± 0,3	^B 1,8 ± 0,1
C 20–22 ⁴	^A 0,8 ± 0,6	^B 1,3 ± 0,2
SAFA	^A 8,3 ± 0,7	^A 8,0 ± 0,6
MUFA	^A 60,1 ± 2,7	^A 60,7 ± 1,9
PUFA	^A 31,0 ± 2,5	^A 30,4 ± 1,6

Různá písmena v horním indexu před číslem znamenají statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v jednotlivých řádcích ($p = 0,05$). Standardní odchylka znázorněna \pm .

Oxidační stabilita je dalším faktorem důležitým v oblasti zpracování a uvádění na trh jakýchkoliv výrobků obsahující tuk. Metody pro stanovení stability jsou nezbytné zvláště tam, kde jsou antioxidanty hodnoceny z hlediska funkce zpomalovat žluknutí. Metodou stanovení oxidační stability tuku je Schaalův test. Tímto testem jsou oleje, tuky nebo potraviny obsahující tuk zahřívány na teplotu 60 °C a pravidelně hodnoceny organoleptické změny (zápach) a peroxidové číslo. Peroxidové číslo udává pouze obsah primárních produktů oxidace. Z křivky peroxidového čísla/reakční doba se odečte indukční perioda-doba potřebná k tvorbě peroxidů. V případě řepkového oleje lisovaného za studena je peroxidové číslo statisticky významně vyšší než u rafinovaného oleje [26, 69, 71].

1.3.7 Oves

Oves je velmi starou plodinou našich předků. Na rozdíl od pšenice je ovesné zrno konzumováno ve formě celého zrna. Tato plodina má vyšší obsah bílkovin, sacharidů a esenciálních MK, než ostatní zrna. Bohatá je na fosfor, železo, vápník a vitamin B1. Velmi podstatné množství této obiloviny zastupuje vláknina, včetně rozpustné vlákniny a smíšeného β-glukanu. B-glukany jsou prospěšné především pro svou funkci snižování hladiny cholesterolu v krvi tím,

⁴ C 20–22 se skládá z kombinace kyseliny C20: 2, C22: 1 a C24: 0 (Eikosadienová, Eruková, Lignocerová)

že vstřebávají a odstraňují ze střev žlučové kyseliny. V tom jim ještě napomáhá avenasterol, patřící mezi rostlinné steroly. Avenasterol je látka, která zabraňuje vstřebávání cholesterolu ve střevech. Dále také působí proti vzniku srdečních chorob a mrtvici. Hlavním steroidem této plodiny je však sitosterol. Velmi významné zastoupení v této komoditě má rozpustná vláknina. Její schopností je navázání a zadržování vody, přičemž dojde k nabobtnání a ke vzniku rosolovitého gelu. Pro trávicí systém to znamená změkčení jeho obsahu [72, 73].

Ovesné produkty

Z ovesných produktů jsou nejvíce oblíbené ovesné vločky, např. pro přípravu ovesných kaší. Mnoho důkazů poukazuje na to, že oves má schopnost snížit postprandiální hladinu glukózy v krvi, ale záleží na následném zpracování ovsu.

Úprava ovsu se provádí procesem dehulling-loupání, kdy je ze semene odstraněn jeho vnější obal. Tento proces zvyšuje nutriční hodnotu výsledného produktu. Zbytky neboli trupy, mohou být dále využity jako přísady do jiných výrobků. Nevýhodou tohoto procesu je ztráta typické oříškové chuti a antioxidačních vlastností. Výhoda však spočívá ve snížení hodnot antinutrientů (taniny, kyselina šťavelová a kyselina fytová), které ovlivňují využití bílkovin. Potravinářský průmysl nabízí ovesné vločky v různých variantách dle technologie zpracování. Například „ocelově řezané“ vločky, vločky velkých rozměrů, vločky pro rychlou přípravu a instantní verze vloček. Výhodou menších vloček je jejich kratší doba vaření. Instantní ovesné vločky jsou zpracovány ocelovým řezem a účinkem vyšších teplot, což podporuje želatinaci škrobu. Tento proces výroby má za následek rychlé hydratování instantních ovesných vloček ve vroucí vodě. Jedním ze známých produktů, využívajících oves jako hlavní surovinu, je müsli. To se vyrábí z různě velkých ovesných vloček bez dalších úprav, oproti „granole“, která se připravuje opékáním ovesných vloček [74, 75,76].

Ze studií vyplynuly příznivější výsledky GI pro ovesné vločky větších rozměrů a klasicky „ocelově řezané“ vločky, než pro instantní a rychle připravující se vločky. Rozdílné hodnoty pravděpodobně souvisí s menší velikostí částic, zvýšeným stupněm narušení struktury při mletí a lepší želatinaci škrobu při výrobě a vaření ovesných vloček. Glykemický index vykazuje střední až nízké hodnoty i pro müsli a „granolu“, které v průměru dosahovaly lepších výsledků než rychle se připravující vločky, či instantní kaše [74].

Ovesné vločky a antioxidanty

Ovesné vločky jsou bohaté na fotochemikálie (fytáty, fenolové kyseliny, karotenoidy, indoly), vykazující antioxidační účinky. Běžně zastoupenými antioxidanty jsou fenolové kyseliny, flavonoidy a tokoly. Mimo tyto běžné antioxidanty obsahuje pouze oves také skupinu speciálních N-skořicoantranilových kyselin, nazývaných jako avenanthramidy (AVs). *In vitro* experimenty byla zjištěna 10–30 x zvýšená antioxidační aktivita AVs, než u kyseliny kávové, ferulové a vanilinu. Avenanthramidy jsou fytoalexiny, které mohou hrát roli v obraně rostlin proti patogenním organismům. Sekundárními metabolity přítomnými v obilovinách, ale také v ovoci a zelenině, jsou fenolické a polyfenolické sloučeniny. Tyto metabolity mají ochranný vliv, který chrání rostlinu proti UV záření nebo napadení patogeny. V potravinách mají významný příspěvek k oxidační stabilitě, ale také k hořkosti nebo vzniku zbarvení. Antioxidační účinek polyfenolů působí jako prevence poškození lipidů, proteinů, DNA, RNA a buněčných organel volnými radikály. Výzkumy potvrzují, že konzumace obilných produktů chrání lidský organismus před rozvojem chronických onemocnění jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění a diabetes mellitus [76, 72, 77].

1.3.8 Ovoce

Ovoce i zelenina jsou důležitou součástí lidské stravy bohaté na rozpustnou vlákninu vázající na sebe vodu z organismu. Ovoce je také velmi bohaté na antioxidanty, zejména na flavonoidy–polyfenoly, antokyany, které dávají ovoci zbarvení a kyselinu askorbovou. Z ovoce bohaté na polyfenoly lze jmenovat černý rybíz, jahody, borůvky, maliny a jablka. Ze všech těchto surovin je možné ovocné pyré vyrobit. Flavonoidy zvyšují účinnost vitamínu A, E, působí protizánětlivě a také brzdí množení střevních patogenů [78, 79].

Zpracování ovoce

Moderní metody zpracování potravin se snaží minimalizovat nepříznivé tepelné působení na nutriční složky, vitamíny, minerální látky a antioxidanty. Zpracování vysokým tlakem (HPP) je jednou z metod, která se využívá k výrobě vysoce kvalitních produktů [80].

Vysokotlaké zpracování je technologie bez použití vysokých teplot zpracovávající potraviny. Takové zpracování může inaktivovat mikroorganismy, ovlivnit enzymy související s potravinami a modifikovat struktury s minimálními změnami nutričních a sensorických aspektů kvality potravin. Tento druh zpracování vyvolal všeobecný zájem především díky

mírnému vlivu na potravinářské výrobky při zachování vysokých nutričních hodnot a čerstvosti. Jedna studie porovnávala vliv tepelného zpracování a vysokého tlaku na jahodové a ostružinové pyré. Ze studie [78] vyplynulo, že vlivem tepelného ošetření dochází u jahod ke statisticky významnému poklesu koncentrace pro celkové fenolické látky, anthokyany i askorbovou kyselinu. Metodou HPP za využití různých tlaků nedocházelo ke statisticky významným rozdílům. Výjimkou byla hodnota koncentrace kyseliny askorbové u vzorku jahod, kde byl statisticky významný rozdíl při porovnání čerstvých jahod s jahody po procesu HPP. U borůvek bylo dosaženo podobných výsledků pouze v případě koncentrace fenolických látek a anthokyanů [78, 80, 81].

Touto studií bylo hodnoceno i zachování barvy plodů. Tepelné ošetření výrazně snížilo barvu ovocného pyré v porovnání s čerstvým ovocem. Červená barva je dána především přítomností antokyanů, jejichž množství je důsledkem tepelného zpracování nižší než při zpracování metodou HPP, avšak hodnoty nevykazují statisticky významný rozdíl. Vysokotlaké zpracování při mírných teplotách může udržet výživovou kvalitu pyré a mohlo by být využito při výrobě velice kvalitních produktů [78, 80, 81].

Ovocné pyré/sušené ovoce

Výrobci byla zaznamenána vyšší poptávka spotřebitelů po zdravější a čerstvé stravě pro jejich děti. Hledají přírodní produkty, nutričně vyvážené podle věkové kategorie, obsahující pečlivě vybrané přísady, bez umělých konzervačních látek a barviv. Vybírají to, co se nejlépe podobá připravovanému domácímu pyré. Vybírat zdravé a přírodní produkty pro děti má zásadní vliv na jejich vývoj.

Hlavním cílem, proč vybírat kvalitní a přírodní produkty, je především zabránění vzniku dětské obezity a tím i chronických onemocnění v dospělosti. Výrobky na bázi ovocného pyré představovaly revoluci v potravinářském průmyslu a dnes již tvoří hlavní část stravy pro kojence. Chloubou těchto produktů je obsah vlákniny, mikroživin a přírodních antioxidantů, které podpoří zdravé návyky stravování již v útlém věku. Ovocná pyré jsou výživově obsáhle, ale i sensoricky přijatelné. Analýza sensoriky je hodnocena dospělými jedinci, ale i kojenci. Ovocné pyré je součástí džemu, konzerv a smoothie s obsahem antioxidantů podporujících zdraví, proto je důležité, aby bylo zachováno počáteční množství antioxidantů [80, 82].

1.3.9 Chia semínka

Chia semínka, známá také pod názvem *Salvia hispanica*, jsou dnes již velice oblíbenými semeny mezi konzumenty. *Salvia hispanica*, neboli Šalvěj hispánská, bylina z čeledi hluchavkovitých, pochází z Mexika a části Jižní Ameriky. Semínka jsou drobná v barvě černé, tmavě šedé nebo mohou být i bílá s chutí připomínající oříšky. Konzumace je možná hned několika způsoby: vcelku nebo mleté, samotná nebo přidaná do pokrmů či zalitá vodou. Ve vodě semínka produkují vysoce viskózní roztok kvůli uvolňování slizu, komplexních karbohydrátů s vysokou molekulovou hmotností ($0,8 - 2 \times 10^2 Da$). Těto vlastnosti se uplatňuje v potravinářském průmyslu, kdy tímto slizem jsou nahrazována vajíčka či přímo olej. Díky procesu tvorby slizu semínka zvětšují až 12x svůj objem a výborně hydratují celý organismus, čímž tělo dostává přímý zdroj dostatku tekutin pro fyzickou aktivitu. Semínka se mohou přidávat do jakéhokoliv pokrmu vzhledem k tomu, že nemají žádnou chuť, která by rušila dané senzorycké vlastnosti původního pokrmu. Množství chia semínek přidávaných do potravin je však limitováno legislativou. Vhodné jsou také pro diabetiky, do bezlepkové stravy a pro jedince, jež chtějí zhubnout, jelikož pro svoji hydrofilní vlastnost a obsah vlákniny navozují pocit sytosti po dlouhou dobu [83, 84, 86].

Semena mají nízký obsah nasycených mastných kyselin, avšak podíl nenasycených MK je vysoký. Obsah MK zaujímá přibližně až 40 % hmotnosti semene, z větší části je to kyselina α -linolenová (ALA). Denní příjem chia semínek by měl činit 25–30 g, tato gramáž odpovídá dvěma polévkovým lžícím. Obsah vlákniny tvoří přibližně 30 % hmotnosti semen, převážně jsou tvořena nerozpustnou vlákninou [86].

Tato blahodárná plodina obsahuje také vysokou hladinu bílkovin. Vzhledem k nutričnímu složení jsou chia semínka přidávána do cereálních produktů jako přirozená obohacující složka. V posledních letech jsou stále více oblíbená a přidávána do dalších potravin (jogurty, obilné kaše, zákusky atd.). Výhodou této potraviny je její vhodnost pro každého, kdo je omezen celikakií a nemá žádné vlastnosti, jež by vyvolávaly alergické reakce [84, 85].

Chia semínka a antioxidanty

Dalšími látkami obsaženými v semenech šalvěže hispánské jsou antioxidanty. Ty chrání tělo před volnými radikály a zánětlivým onemocněním. Přírodními antioxidanty těchto semen jsou kyselina chlorogenová, kávová, ferulová, flavanoglykosidy, myricetin a kvercetin a mnoho dalších. Například kyselina chlorogenová, ester kyselina kofeinové, je v semenech obsažena v největším množství. Nadále je to také hlavní fenolická sloučenina kávy, především zelené. Konzumace kyseliny chlorogenové má pozitivní dopad na zmírnění vývoje některých nádorů (např. tlustého střeva, jater). Přispívá také ke zlepšení diabetu 2. typu a k prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Kyselinu nalezneme v potravinách jako jsou artyčoky, brambory, kopřivy a již zmíněná káva. Chia semínka obsahují hojné množství zdraví prospěšných látek. Dalšími zastoupenými látkami v této plodině jsou také mikronutrienty. Mnohými studiemi bylo prokázáno, že užíváním chia semínek dochází ke snížení hodnot triacylglycerolu a k zvýšení hladiny HDL cholesterolu a ω -3-MK kyselin. Pozitivní účinek byl také pozorován na homeostázu lipidů a glukózy [87, 88, 89].

1.3.10 Voda

Voda je hlavní složkou všech živých organismů. V lidském těle zaujímá přibližně kolem 50 – 70 % tělesné hmotnosti u dospělého jedince. Procentuální variabilita zastoupení vody je dána rozdílným složením těla. Množství vody je závislé na pohlaví, věku, metabolismu, fyzické zátěži a stravování. Mezi živé organismy se samozřejmě řadí i rostliny, pro které je hlavním zdrojem vody půda. Rostliny mají přístup k vodě díky propracovanému zesíťovanému systému kořenů, který jim umožňuje kdykoliv čerpat vodu a udržovat tak svůj rovnovážný systém [90, 91].

Pro udržitelnost potravinářského průmyslu je markantně významný dostatek vody. Voda je důležitý klíčový prvek a hlavní složkou pro zpracování potravin. V potravině je přítomna buď v důsledku biologického zdroje, nebo je do produktu zavedena během výroby a zpracování. V čerstvých potravinách voda ovlivňuje fyzikální vlastnosti potravin. Obsah vody v potravině se nejčastěji vyjadřuje jako aktivita vody (a_w), která se pohybuje v rozsahu od 0,05 do 0,99. Aktivita vody je jedním z nejdůležitějších faktorů udávajících míru zhoršení potravin mikrobiálními i nemikrobiálními účinky. Voda se využívá k ochraně, stabilizaci potravin a k rozvoji potravinářských výrobků. U některých výrobků se pro delší uchování a konzervaci snižuje aktivita vody [92, 93].

Konzervace využívající snížení aktivity vody se nazývá osmoanabiosa. Obecně mezi procesy osmoanabiosy patří sušení, koncentrace, proslazování a solení. Během sušení a koncentrování je z potraviny odnímána voda. Další dva příklady jsou typem přidavku osmoaktivních látek. Společným znakem výrobků takto ošetřených je potřeba ochrany před zvlhnutím během skladování nebo během balení do materiálu, který je pro vodu nepropustný. Potraviny takto ošetřené jsou například solené ryby a maso, sušené salámy a ryby, džemy, čokoláda, cukrovinky a mnoho dalších. Sušené potraviny nebo potraviny o nízké vlhkosti neobsahují více než 25 % vlhkosti, a_w je nižší než 0,60. Potraviny o vlhkosti 20–50 % mají a_w mezi 0,60–0,85. Snížením hodnoty a_w v potravinách dochází k zabránění růstu vegetativních mikrobiálních buněk, klíčení spor a tvorbě toxinů [92, 93].

Voda je nepostradatelnou součástí života, která je nezbytná pro všechny živé organismy. Zastává roli rozpouštědla, teplotního pufru a metabolitu v živých buňkách. Zajišťuje rovnováhu našemu tělu neboli homeostázu. V potravinách ovlivňuje vlastnosti dané komodity a udává míru kažení. Potravinářský průmysl vodu využívá v různých kvalitách. Využití může být složkou pro jakoukoliv výrobu, vektor pro výměnu tepla, vektor mechanické energie, pro mytí a sanitaci a pro výrobu páry [94, 95, 96].

1.4 Metody prodlužující trvanlivost

1.4.1 Metody využívající záhřev k usmrcení mikroorganismů

Firmou dodané vzorky nutriční směsi byly podrobeny pasteraci. Pasterace je druh konzervační metody, při které se využívá teploty za cílem usmrtit mikroorganismy. Některé vzorky byly pasterovány jednou, jiné byly pasterovány dvakrát pro porovnání účinku pasterace. Kromě metod využívající záhřev existují i další konzervační metody, například: konzervace zářením, fyzikálními metodami a konzervace chemosterilací.

1.4.2 Pasterace

Pasterací nebo také pasterizací se rozumí proces, který zajišťuje zničení nežádoucích mikroorganismů (MO) v potravinách. Potravinu je nutné zahřát na určitou teplotu a následně dostatečně zchladit. Tímto procesem je znemožněno šíření závažných nemocí jako je břišní tyfus, tuberkulóza, spála atd. Důležitým faktorem správné pasterace je čas a teplota po které je potravina pasteraci podrobena. Na vztahu mezi těmito základními veličinami soustavy SI je založeno ošetření potravin vyšší teplotou po krátkou dobu (HTST) a ošetření nižší teplotou po delší dobu (LTLT). Teplota záhřevu musí být v celém objemu vzorku [92, 97].

Nízkoteplotní pasterace (LTLT) je zaměřena na zneškodnění všech patogenních mikroorganismů, čímž se snižuje znehodnocení potraviny. Mléko podrobené tomuto typu pasterace je vhodné pro přípravu sýrů, protože podporuje „syneresis“, které se využívá k výrobě sýrů a tvarohu. Při tomto procesu dochází k odstranění hydrofilních makropeptidů, načež dochází k nerovnováze intermolekulárních sil. Nízkomolekulární pasterace využívá teplot od 63–85 °C po dobu 30–70 minut [93].

Pasterace za vyšší teploty (HTST) je cíleně zaměřena na vegetativní patogenní MO a na mikroorganismy způsobující kažení potraviny a denuraci sérových proteinů. Mléko podrobené této pasteraci je vhodnější pro výrobu jogurtů. Z důvodů denaturace sérových proteinů nedochází k syneresi. Vysokoteplotní pasterace, nazývaná také jako blesková pasterace, využívá teplotu od 72 °C do 74 °C po dobu 15–20 sekund. Ošetření je cíleně zaměřené na patogenní bakteriální spory (*Clostridium botulinum*) [93, 97, 98].

Výběr metody zahrnuje účel pasterizovaného mléka, vybavení pracoviště, objem mléka, který má být podroben pasteraci a cílový mikroorganismus.

1.4.3 Další metody využívající záhřev

Blanšírování

Blanšírování je krátké tepelné zpracování potravin zejména ovoce a zeleniny, přičemž dochází k inaktivaci enzymů a k odstranění plynu z pletiv. Proces je uskutečněn parou nebo ponořením potraviny do horkého roztoku cukru nebo soli. Tento proces se uskutečňuje před zmrazováním a sušením čerstvé zeleniny, lze ho provést i před pasterací, sterilací. Zmrazené produkty kvůli blanšírování ztrácejí živiny, avšak více jich ztratí v rámci oxidace během skladování [92].

Sterilace

Sterilací jsou produkty ošetřovány při teplotách vyšších než 100 °C, což vede k inaktivaci vegetativních forem MO: Pro méně kyselé potraviny (pH vyšší než 4,0) se provádí až při teplotách vyšších než 120 °C. Sterilace je procesem záhřevu, který probíhá minimálně 10 minut, aby došlo k potřebné inaktivaci. S tímto procesem je spojen jakýkoliv termoinaktivační zákrok, tj. i pasteurace [92].

Tyndalace

Tyndalací se rozumí opakovaná pasteurace, tj. opakované zahřátí na teplotu do 100 °C. Prvním krokem jsou inaktivovány vegetativní buňky. Přežívající bakteriální spory zde po ochlazení vyklíčí a následně druhým krokem pasteurace jsou usmrceny [92].

UHT-ultra vysokoteplotní úprava potravin

UHT proces je integrovanou sérií procesů, které přeměňují nesterilní produkt (např. syrové mléko) do zabaleného, komerčně sterilního produktu. Během procesu UHT je mléko zahříváno na teplotu v rozmezí 138–145 °C po dobu 1–10 sekund pro dosažení komerční sterility. Vysoká teplota je zaměřena především na bakterie *Coxiella burnetii* a na všechny vegetativní formy bakterií. Výhodou UHT pasteurace je stabilní uchování mléka po dobu několika měsíců. Během pasteurace se u produktů s vyšším obsahem lipidů (např. plnotučné mléko) provádí také homogenizace (60–75 °C), která zabraňuje oddělování tuku během skladování [92, 97].

1.5 Metody zvyšující odolnost potravin

Do třech vzorků nutriční směsi dodané externí firmou byl přidán xylitol. Jeden vzorek s přídatkem xylitolu obsahoval navíc sorban. Mezi procesy, které vedou ke zvýšení odolnosti potravin patří konzervace sníženou teplotou, snížení aktivity vody a chemoanabiosa [92].

1.5.1 Chemoanabiosa

Do průmyslově vyráběných potravin se přidávají látky, které prodlužují trvanlivost potravin, zvýrazňují nebo obnovují barvu, regulují kyselost nebo dodávají potravinám sladkou chuť bez použití řepného cukru. Podmínky použití přídatných látek (aditiv) jsou regulovány legislativou⁵. Legislativa Evropské unie je definuje jako „Jakoukoli látku, která se běžně nespotřebovává jako potravina sama o sobě a běžně se nepoužívá jako charakteristická složka potraviny, ať už má nebo nemá nutriční hodnotu“ [99].

Xylitol

Xylitol, řadící se do skupiny cukerných alkoholů, je náhradní sladidlo, jehož sladivost je podobná sacharóze, ale s nižším obsahem kalorií. Jeho další využití v potravinách může být jako stabilizátor, zvlhčovač nebo pro výrobu nízkokalorických potravin. Xylitol se přirozeně vyskytuje v ovoci, zelenině a houbách. V potravinářském průmyslu je využíván pro výrobu cukrovinek, žvýkaček, zmrzlin, čokolád a dalších potravin. Příjem xylitolu je v běžné dávce považován za neškodný. Pro EU je na potravinách označován zkratkou E967. „Pro ČR (celou EU) je používání xylitolu pro potravinářské účinky povoleno s výjimkou dětské výživy. Při použití xylitolu je nutné konzumenty také upozornit na jeho schopnost nadýmat“ [63, 101].

Sorbany

Velmi používanou konzervační látkou je kyselina sorbová (E200) a její soli. Soli této kyseliny se vyskytují v podobě bílého krystalického prášku a nazývají se sorbany. Pro EU se na obalech označují zkratkami E201, E202, E203. Kyselina sorbová a její soli jsou využívány především pro zabránění šíření plísní a kvasinek v potravinách. Tyto konzervanty se přidávají například do moštů, pečiva, čokolád, kečupů a mnoha dalších výrobků. Využití sorbanů je i v kosmetice a farmacii. V EU je použití těchto konzervantů omezeno legislativou. Výhodou kyseliny sorbové je její snadná metabolizace organismem, díky čemuž je považována za aditivum bez nežádoucích účinků [63].

⁵ Odkaz na legislativu: <http://www.szpi.gov.cz/clanek/pridatne-latky-aditiva.aspx>

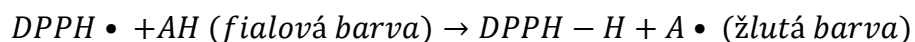
1.6 Metody Stanovení antioxidační aktivity

1.6.1 Celkový obsah fenolických látek (TPC)

Touto metodou lze kvantifikovat celkový fenolický obsah ve vzorku. Prvním činidlem zachycující celkový fenolický obsah bylo Folinovo-Denis reagensium. Později bylo nahrazeno Folinem a Ciocalteou na Folin & Ciocalteu činidlo (FC) s vyšším obsahem molybdenu pro lepší redoxní citlivost. Mechanismus stanovení spočívá v reakci FC činidla s hydroxylovou skupinou. Po inkubační době dochází k redukci molybdenové složky ve fosfomolybdenovém komplexu dle níže uvedeného schématu. Absorbance vzorků je proměřována při 765 nm a výsledky jsou vyjadřovány jako ekvivalent kyseliny gallové [101].

1.6.2 DPPH test

DPPH metoda je založena na schopnosti stabilního 2,2-diphenyl-1-pikrylhydrazylvého volného radikálu reagovat s donory vodíku. Při tomto testu se roztok radikálu odbarvuje vlivem působení antioxidantu (AH), kdy se absorpce snižuje v důsledku tvorby jeho neradikální formy dle následujícího schématu:

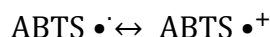


Obrázek č. 1 Reakční schéma DPPH radikálu s antioxidantem [102]

Radikál DPPH vykazuje intenzivní absorpční spektrum v UV–VIS oblasti při 517 nm. Tato metoda je velmi jednoduchá a rychlá pro analýzu zachycující aktivitu přírodních sloučenin [103, 104].

1.6.3 TEAC test (ABTS)

ABTS metoda je jednou z nejpoužívanějších pro stanovení koncentrace volných radikálů označována také jako (TEAC) Trolox® Equivalent Antioxidant Capacity". Principem metody je redukce radikálu ABTS •⁺ (modrozelený), který vzniká oxidací syntetického chromoforu 2,2'- azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) s peroxodisíranem draselným dle schématu (obrázek č. 2). Úbytek absorbance je proměřován při 765 nm [103, 105].



Obrázek č. 2 Schéma oxidace ABTS [102]

1.6.4 FRAP

Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) je metoda založena na redukcí komplexů 2,4,6-tripyridyl-s-triazinu (TPTZ) s hexa-hydrátem chloridu železitého ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), které jsou téměř bezbarvé a nakonec mírně hnědé. Po redukcí Fe^{3+} na Fe^{2+} vznikají modré komplexy s absorpčním spektrem při 593 nm. Snížení absorbance je přímo úměrné množství antioxidantů ve vzorku. Limitujícím faktorem této metody je pH (3,6), při kterém je nutno vzorky proměřit. Další nevýhoda spočívá v nedetekovatelnosti pomalu reaktivních polyfenolických sloučenin a thiolů [102].

1.6.5 Metoda detekující schopnost antioxidantů zachytávat peroxid vodíku

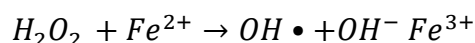
Peroxid vodíku (H_2O_2) nepatří mezi radikál, avšak patří mezi látky s reaktivním kyslíkem (ROS). Většina reaktivních druhů kyslíku včetně $\text{O}_2\bullet^-$, $\text{H}_2\text{O}_2\bullet$ a $\text{OH}\bullet$ jsou běžnými vedlejšími produkty aerobního metabolismu. Tyto nežádoucí produkty metabolismu jsou zvýšeny během infekcí, stresových stavů a vlivem záření. Molekula peroxidu vodíku sama o sobě není toxická, ale může být přeměněna do stavu toxického radikálu jako je $\text{OH}\bullet$ Fentonovou reakcí nebo kyselinou chlornou a enzymem myeloperoksidasou [38].

Test využívající 1,10-fenantrolin je založen na reakci železnatého iontu (Fe^{2+}) s 1,10-fenantrolinem. Železnatý iont tvoří červeno-oranžový komplex tri-fenantrolinu, který absorbuje maximálně při 508–510 nm. Je známo, že pokud je peroxid vodíku přidán v prvním pořadí a 1,10 fenantrolin v pořadí druhém, peroxid vodíku zoxiduje všechny železnaté ionty na železité. Vzniklé Fe^{3+} ionty nejsou schopné tvořit červeno-oranžový komplex s 1,10-fenantrolinem. Následně dochází k ostrému poklesu absorbance [37, 102].

1.6.6 Chelatační schopnost Fe^{2+} iontů

Železo, jako jeden z hlavních prvků, je nezbytné pro správný růst organismu. V lidském těle existuje ve dvou formách: železnatý iont (Fe^{2+}) a železitý iont (Fe^{3+}). Tento prvek má řadu prospěšných účinků, podílí se na přenosu kyslíku z plic do celého řečiště, na procesu stárnutí buněk a apoptózy. Je také součástí mnoha enzymů a tím i biologických reakcí, například: metabolismus nukleových kyselin, proteinů, ve kterých hraje roli přenašeče elektronů. Mimo tyto pozitivní reakce má železo i negativní účinky na lidský organismus. Různé studie poukazují na schopnost přechodných kovů (Fe^{2+} , Cu^+ , Co^{2+}) vyvolat vznik volných radikálů, čímž dochází k buněčnému poškození [8].

Železnatý iont je znám jako silný pro-oxidant pro svoji vysokou reaktivitu, způsobující oxidaci lipidů rozštěpením vodíkové a lipidové peroxidázy na reaktivní volné radikály. Železnaté ionty jsou katalyzátorem Fentonovy reakce, kde volné železnaté ionty reagují s peroxidem vodíku za vzniku Fe^{3+} iontů a hydroxylového radikálu viz schéma níže (obrázek č. 3) [77].



Obrázek č. 3 Průběh Fentonovy reakce [8]

Metoda je založena na schopnosti ferrozinu tvořit komplexy s Fe^{2+} . V přítomnosti chelatačních činidel dochází k narušení tvorby komplexu, čímž dochází k poklesu červeného zbarvení. Spektrofotometrické zachycení poklesu zbarvení vyjadřuje chelatotvornou aktivitu koexistujícího chelátoru. Absorbance roztoků je proměřována při 562 nm [41, 102].

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Přístrojové vybavení a materiál

- UV/VIS spektrofotometr (Beckman) a UV/VIS spektrofotometr ThermoSpectronic (helios).
- předvážky typu Kern 440–35N: Kern & Sohn, Balingen, Německo
- ultrazvuk (Bandelin-sonorex RK31): Bandelin Electronic, Berlín, Německo
- centrifuga NF 400: Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş., Turecko
- centrifugační zkumavky 15 ml i 50 ml (typ FALCON): iBioTech, ČR, Praha
- automatické pipety: Sartorius, Göttingen, Německo
- špičky pro pipety (1–200 μ l) a (100-1000 μ l)
- skleněné zkumavky s uzávěrem
- navažovací pomůcky, laboratorní nádobí
- kyvety plastové, jednorázové (1,5ml), šířka kyvety = 1cm (firma Brand GMBH-Německo)

2.2 Použité chemikálie

Většina chemikálií pocházela od německého výrobce Sigma Aldrich, Steinheim, Německo.

- Ferrozin: (3-(2-Pyridyl)-5,6-difenyl-1,2,4-triazine-*p,p'*-hydrát monosodné soli disulfonové kyseliny
- Tetrahydrát chloridu železnatého
- TPTZ: (2, 4, 6- tris(2-pyridyl)-s-triazin)
- 40 mM HCL
- 0,3 Octanový pufr (pH 3,6), (2M kyselina octová, 0,3 M NaOH)
- Trolox: (\pm)-6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-karboxylový kyselina
- Chlorid železitý
- DPPH: 2,2-Difenyl -1-pikrylhydrazyl
- Tablety ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina) diamonná sůl)
- Folin & Ciocalteua činidlo
- Peroxid vodíku 30%

- Peroxodisíran draselný $\geq 99,9\%$
- 1,10 fenantrolin
- 5% roztok Na_2CO_3
- 96% ethanol, methanol 99,9%
- Destilovaná voda

2.3 Testované vzorky

K spektrofotometrické analýze byly využity vzorky nejmenované firmy. Firma poskytla celkem 7 vzorků o různém způsobu stabilizace a některé s přidavkem xylitolu. Fotografie vzorků k nahlédnutí v příloze č.3. V této práci však o rozdělení děti/dospělí není uvažováno. Pro znázornění níže uvedena tabulka č. Podrobnější tabulka viz. příloha č. 4.

Tabulka č. 9 Zjednodušená tabulka použitých vzorků se souhrnem údajů

Skladovací pokus			
Označení vzorku	Varianta + množství	Způsob stabilizace	Čas pasterace
1-A	120 g + xylitol (5 g)	1x pasterace	20 min. á 80 °C
2-B	120 g	1x pasterace	20 min. á 80 °C
3-C	100 g	1x pasterace	20 min. á 80 °C
4-A	120 g + xylitol (5 g)	2x pasterace	2x (20 min. á 80 °C)
5-B	120 g	2x pasterace	2x (20 min. á 80 °C)
6-C	100 g	2x pasterace	2x (20 min. á 80 °C)
7-A	120 g + xylitol (5 g)	1x pasterace (+ Sorban 1000 mg)	20 min. á 80 °C

pH všech vzorků od 4,1–4,18

2.4 Příprava zásobních roztoků

2.4.1 Zásobní roztok radikálu ABTS

Roztok radikálu byl připraven reakcí diamonné soli ABTS s peroxodisíranem draselným. Diamonniová sůl byla ve formě tablety (10 mg). Příprava roztoku spočívá v rozpuštění této tablety v 5 ml destilované vody, po rozpuštění bylo přidáno 100 μ l 0,064 mol/l roztoku peroxodisíranu draselného. Směs reagovala po dobu 12–16 hodin při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby bylo odpipetováno 2,5 ml roztoku do 100 ml odměrné baňky.

Molekulová hmotnost: 548,68 g/mol

2.4.2 Zásobní roztok radikálu DPPH

Roztok radikálu DPPH byl připraven navážením 12,5 mg standardu (2,2- Diphenyl- 1- picrylhydrazyl) do 500 ml odměrné baňky. Navážka byla rozpuštěna v methanolu a doplněna po rysku baňky.

Molekulová hmotnost: 394,32 g/mol

2.4.3 Zásobní roztok pro metodu FRAP

Roztok byl připraven smíšením chloridu železitého, roztoku TPTZ a octanového pufru v poměru 1:1:10.

20 mmol/l chlorid železitý byl připraven navážením 0,0811g do 25 ml odměrné baňky, doplněno destilovanou vodou po rysku.

Molekulová hmotnost FeCl_3 : 162,20 g/mol

Roztok TPTZ byl připraven navážením 0,078 g do 25 ml odměrné baňky a doplněno 40 mM kyselinou HCl.

Molekulová hmotnost: 312,33 g/mol

Pufr o pH 3,6 byl připraven smícháním 14,95 ml 0,3 M NaOH (navážka 0,3 g do 25 ml odm. baňky) a 6,3 ml 2 M kyseliny octové do 100 ml odměrné baňky, doplněno destilovanou vodou po rysku.

Molekulová hmotnost NaOH: 39,9 g/mol, CH₃COOH: 60,05 g/mol

2.4.4 Roztoky pro metodu zachytávající H₂O₂

Příprava 1mM roztoku 1,10 fenantrolin C₁₂H₈N₂·H₂O byla proveden navážením 0,0198 g do 100 ml odměrné baňky, doplněno redestilovanou vodou po rysku.

Molekulová hmotnost: 198,23

Roztok 1mM síranu železnato amonného (Mohrova sůl) byl připraven navážením 0,05 g do 100 ml odměrné baňky, doplněno destilovanou vodou po rysku.

Molekulová hmotnost: 392,14

Roztok 0,005 M peroxidu vodíku byl připraven pipetáží 28,3 µl 30% H₂O₂ do 50 ml odměrné baňky a doplněn redestilovanou vodou po rysku. Roztok byl připravován vždy čerstvý a uchován ve tmě po dobu měření.

Molekulová hmotnost: 34,01 g/mol

2.5 Příprava kalibračních roztoků standardů

2.5.1 Kalibrační roztok kyseliny gallové

Zásobní roztok kyseliny gallové byl připraven navážením 0,02 g kyseliny gallové doplněné metanolem po rysku 50 ml odměrné baňky s výslednou koncentrací 400 µg/ml. Z připraveného zásobního roztoku byla připravena pomocí ředění kalibrační řada s koncentrací od 2 do 80 µg/ml.

2.5.2 Kalibrační roztok Troloxu

Příprava zásobního roztoku Troloxu spočívala v navážení 0,01 g Troloxu v pevném stavu do 100 ml odměrné baňky, doplněna metanolem po rysku. Výsledná koncentrace roztoku činila 100 µg/ml. Z tohoto zásobního roztoku byla ředěním připravena kalibrační řada s rozmezím koncentrací od 25 do 80 µg/ml.

2.6 Pasterace vzorku

Nutriční pasta byla za studena plněna do sáčků s uzávěrem (doypack). Sáčky byly následně umístěny do vodní lázně (paster) s nastavenou teplotou na 80 °C, která byla monitorována pomocí teploměru TFA30.1034. Po dosažení této teploty se začal měřit čas pasterace (20 min). Po uplynulé době pasterace se nechaly samovolně vychladnout. Tento proces byl proveden firmou, která nám dodala jednotlivé vzorky.

2.6.1 Postup zpracování vzorků

Všechny zkoumané vzorky byly vyrobeny 2. 10. 2017 nejmenovanou firmou, v ten samý den nebo den poté byly připraveny a naplněny do hliníkových sáčků. Vzorky skladované při pokojové teplotě byly k mikrobiologickému zpracování odebírány 8. den, 22. den, 50. den, 134. den a 162. den od vyrobení (viz. diplomová práce Bc. Rozálie Peřinové). Po mikrobiologickém rozboru následovalo zpracování na Katedře analytické chemie. Nejdříve byl vzorek z hliníkového obalu (doypack) vytlačen v rozsahu $0,5 \pm 0,4$ cm vrstvy mezi několik pečících papírů o rozměru $5 \times 5 \pm 0,2$ cm a uchováván v mrazničce při -20 °C. Z takto připraveného materiálu bylo odebíráno množství pro extrakci. Pro každou extrakci byly odváženy přibližně 2 g zmraženého produktu do skleněných lahviček s víčkem. Od každého vzorku byly vždy odebrány dvě navážky a přidáno 15 ml extrakčního rozpouštědla. Byly vyzkoušeny extrakce typu pevná látka-kapalina. První extrakční rozpouštědlo, které bylo vyzkoušeno pro izolaci látek rozpustných v tucích byl hexan K extrakci látek s antioxidačními účinky byl vyzkoušen 80% metanol ve kterém se nadále všechny vzorky extrahovaly (viz kapitola č. 5). Extrakce dále probíhala v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut. Po uplynulých 20 minutách bylo odpipetováno 10 ml supernatantu do centrifugační zkumavky a nastaveno na 10 min při 4000 ot/min. Po odstředění byl odebrán supernatant z obou navážek a pipetován do čistých zkumavek pro následující spektrofotometrickou analýzu.

2.7 Spektrofotometrická analýza

2.7.1 Stanovení celkového počtu fenolických látek

Ze zhotovených extraktů byl odebrán a pipetován 1 ml extraktu do skleněné zkumavky se závitkem a opatřené víčkem. Extrakty nebylo nutné ředit. Dále byl přidán 1 ml 96% etanolu, 5 ml destilované vody a 0,5 ml činidla FC. Takto připravené zkumavky byly ponechány 5 minut v klidu. Po uplynulém čase byl přidán 1 ml 5% roztoku Na₂CO₃. Po přidavku uhličitanu sodného následovala inkubace po dobu 30 minut (laboratorní teplota), dle optimalizovaného času, viz příloha č. 5. Po inkubační době byla proměřena absorbance u všech vzorků při 765 nm. Stejným způsobem byl proměřen i slepý pokus pro každou časovou řadu, kde byl 1 ml extraktu nahrazen 1 ml extrakčního činidla. Obsah fenolických látek ve vzorku byl vyjádřen pomocí kalibrační řady kyseliny gallové jako její ekvivalentní množství µg/ml extraktu vzorku (příloha č. 9) [4].

2.7.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Z připraveného roztoku radikálu ABTS•⁺ (viz. kapitola 2.4.1) bylo do skleněné zkumavky se závitkem a víčkem pipetováno 5 ml tohoto radikálu. K roztoku bylo následně pipetováno 500 µl extraktu, opět neředěného nebo kalibračního roztoku Troloxu o dané koncentraci pro zjištění kalibrační křivky. Pro tuto metodu byl zjištěn optimální čas 40 minut (příloha č. 6), během které byly zkumavky ponechány v temnu při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby byl u všech vzorků proměřen úbytek absorbance při 734 nm. S každou časovou řadou byl souběžně proměřen i slepý pokus, kde extrakt opět nahradilo extrakční činidlo. Výsledná antioxidační aktivita je vyjádřena jako inhibice roztoku v % (viz rovnice č. 2) Přes kalibrační závislost (viz. příloha č. 10) byla tato inhibice roztoku přepočítána na ekvivalentní množství Troloxu v µg/ml extraktu vzorku [102].

$$\text{inhibice [\%]} = \frac{A_{bl} - A_{vz}}{A_{bl}} \times 100$$

Rovnice č. 2 Vzorec pro výpočet inhibice roztoku v % [101]

A_{bl} = absorbance slepého pokusu

A_{vz} = absorbance vzorku

2.7.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Z metanolickeho roztoku (viz. kapitola 2.4.2) bylo do skleněných zkumavek s víčkem pipetováno 5 ml tohoto roztoku. Dále bylo přidáno 500 μ l neředěného extraktu vzorku nebo kalibrační látky Trolox o různé koncentraci. Takto připravené zkumavky byly ponechány při laboratorní teplotě 15 minut. Čas doby inkubace byl optimalizován (příloha č. 7). Po uplynutí reakčního času byl proměřen úbytek absorbance, kde došlo ke změně zbarvení z fialové do světle růžové, při 517 nm. S každou časovou řadou byl proměřen i slepý vzorek, kde byl extrakt nahrazen extrakčním činidlem. Dle předchozího vzorce (rovnice č. 2) byl úbytek absorbance přepočítán na procenta inhibice roztoku. Pomocí kalibrační řady látky Trolox (viz příloha č. 11) byly absorbance přepočítány na ekvivalentní množství této látky v μ g/ml extraktu vzorku [42, 106].

2.7.4 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Z roztoku FRAP (viz kapitola 2.4.3.) bylo do skleněných zkumavek s víčkem pipetováno 5 ml tohoto roztoku. Dále bylo přidáno 500 μ l neředěného extraktu vzorku nebo kalibrační látky Trolox o různé koncentraci. Zkumavky byly ponechány 50 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Čas inkubace byl optimalizován (viz příloha č. 8). Po uplynutí inkubační doby byla proměřena absorbance při 593 nm. Stejným postupem byl zároveň proměřen slepý pokus, kde místo extraktu zkumavka obsahovala extrakční činidlo. Pomocí kalibrační křivky, která je k náhledu v příloze č.12, byla naměřená absorbance přepočítána na ekvivalentní množství Troloxu v μ g/ml extraktu vzorku [102].

2.7.5 Specifická metoda zachytávající H₂O₂

Do série skleněných zkumavek bylo pipetováno 0,25 ml síranu železnatého–FeSO₄ (1mM). Poté bylo do zkumavek přidáno 1,5 ml extraktu neředěného vzorku a 62,5 µl H₂O₂ (5mM). V případě slepého vzorku bylo pipetováno pouze 1,5 ml extrakčního činidla bez peroxidu vodíku. Takto připravené vzorky se inkubují ve tmě 5 minut. Po 5 minutách je do zkumavek pipetováno 1,5 ml 1-10 fenantrolinu (1mM). Vzorky byly promíchány a inkubace probíhala při teplotě místnosti po dobu 10 minut. Následně byla u vzorků proměřena absorbance při 510 nm. Pro výpočet schopnosti sloučeniny zachytávat peroxid vodíku slouží následující vzorec (rovnice č. 3) [37, 101].

$$\% H_2O_2 = \frac{A_{vz}}{A_{bl}} \times 100$$

Rovnice č. 3 Vzorec pro výpočet schopnosti sloučeniny zachytávat peroxid vodíku [101]

A_{bl} = absorbance slepého pokusu

A_{vz} = absorbance vzorku

2.7.6 Chelatační schopnost Fe²⁺

Do skleněných zkumavek s víčkem byl pipetován 1 ml extraktu neředěných extraktů. Dále bylo přidáno 50 µl FeCl₂ (2mM) a 200 µl Ferrozinu (5mM). Takto připravená reakční směs byla intenzivně protřepána a ponechána stát při pokojové teplotě 10 minut. Po 10 minutách inkubace byla u vzorků proměřena absorbance při 562 nm. Slepý vzorek byl nachystán stejným způsobem, pouze extrakt byl plně nahrazen extrakčním činidlem. Nižší absorbance vzorku vykazují vyšší chelatační schopnost železa. K porovnání se vzorky extraktů byla použita také reakce s 2 mM EDTA [41, 101].

2.8 Statistická analýza dat

Pro statistickou analýzu dat byl využit softwarový program OriginPro9 (Northampton, Massachusetts, USA.) s aplikací analýzy rozptylu–ANOVA. Pomocí Tukeyova testu bylo možné provést párové porovnání naměřených hodnot. Druhým použitým programem pro zhodnocení vzorků byl program STATISTICA (Tulsa, Oklahoma, USA), kterým byla provedena dvou-faktorová analýza rozptylu (ANOVA). Faktorem A byl vždy zvolen čas a faktor B představoval typ pasterace nebo obsah xylytolu. Výsledky jsou udány jako aritmetické průměry získaných dat \pm standardní odchylka (N=4). Všechny statistické výsledky byly provedeny na hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$.

3 VÝSLEDKY

Cílem diplomové práce bylo stanovit celkový obsah fenolických látek a antioxidační aktivitu v náhradě pestré stravy. Prvním úkolem bylo správné zvolení extrakčního činidla. V případě použitého hexanu se vzorek uzavřel do kulovitého útvaru. Tento stav vzorku zůstal v nezměněné podobě i po následném procesu ultrazvuku. V případě použití 80% metanolu docházelo k rozmělnění a zakalení vzorku. Zvolení této koncentrace extrakčního roztoku bylo na základě vědeckých publikací, kde extrahovaly podobné produkty [103, 106, 108]. Před provedením každé spektrofotometrické metody byla provedena optimalizace inkubačního času, jak je znázorněno v přílohách č. 5–8. Optimalizace byla provedena spektrofotometrickým proměřením zkumavek s danými reagensii v intervalu od 10 minut do 60 minut. Za optimální čas byl zvolen takový, po kterém následovaly téměř neměnné hodnoty absorbance.

3.1 Vliv skladování na celkový obsah fenolických látek

Kalibrační závislost pro obsah fenolických látek byla sestavena z 9 bodů v rozsahu koncentrací kyseliny gallové od 2–100 µg/ml (příloha č. 9). Extrakty po odstředění při 4000 ot./min nevykazovaly zákal a nebylo je nutné ředit v žádné další použité metodě. Každý kalibrační bod byl proměřen 3× a vzorek–extrakt byl proměřen 2× na UV/VIS spektrofotometru od firmy Beckman. Z naměřených hodnot absorbancí bylo možné vyjádřit průměrné hodnoty a jejich standardní odchylky. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny gallové v µg/ml extraktu vzorku. V tabulce č. 10 a 11 jsou vyjádřeny hodnoty pro celkový obsah fenolických látek při párovém porovnání softwarovým programem OriginPro9.

Tabulka č. 10 Výsledky celkového obsahu fenolických látek 1× pasterovaných vzorků

Celkový obsah fenolických látek v µg kyseliny gallové/ml extraktu vzorku					
Vzorky	8. den	22. den	50. den	134. den	162. den
1-A	^{A, B} 15,3 ± 1,2	^B 19,9 ± 0,2	^A 10,8 ± 2,1	^{A, C} 13,3 ± 1	^{B, C} 16,6 ± 1,1
2-B	^C 21,9 ± 0,6	^B 29,1 ± 0,8	^A 9,6 ± 1,5	^D 16,7 ± 1,7	^B 31,5 ± 0,1
3-C	^C 44,3 ± 0,4	^A 22,6 ± 0,4	^B 27,2 ± 0,6	^B 28,6 ± 1,1	^D 10,5 ± 1,1
7-A	^B 27,1 ± 0,1	^C 36 ± 0,2	^D 22,4 ± 0,3	^A 11,4 ± 1,2	^E 38,3 ± 0,2

Různá písmena v horním indexu před číslem znamenají statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v jednotlivých řádcích ($p = 0,05$). Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4). Uvedené dny jsou počítány od data výroby (2.10. 2017).

Z tabulky pro 1× pasterované vzorky⁶ je zřetelné, které hodnoty vykazují statisticky významný rozdíl. U extraktu vzorku 1-A při porovnání prvního (8.den) a posledního (162. den) dne skladovacího pokusu není prokázán statisticky významný rozdíl v hodnotách pro celkový obsah fenolických látek. Pro extrakty vzorků 2-B a 7-A byl naopak prokázán statisticky významný rozdíl, byla zaznamenána vyšší hodnota pro celkový obsah fenolických látek během 8. dne a 162. dne skladovacího testu. Významný pokles v obsahu celkových fenolických látek byl zaznamenán pouze u jednoho extraktu vzorku (3-C), u ostatních byly zjištěné vyšší nebo kolísavé hodnoty na konci skladovacího testu.

Tabulka č. 11 Výsledky celkového obsahu fenolických látek 2× pasterovaných vzorků

Celkový obsah fenolických látek v μg kyseliny gallové/ml extraktu vzorku					
Vzorky	8. den	22. den	50. den	134. den	162. den
4-A	^C 29,4 ± 1,3	^B 21,7 ± 0,4	^B 21,8 ± 0,8	^A 18 ± 0,3	^B 21,4 ± 0,2
5-B	^B 20,9 ± 0,4	^C 23,3 ± 0,1	^B 18,9 ± 0,6	^A 15,3 ± 0,4	^D 27,5 ± 1
6-C	^B 40,3 ± 1,8	^B 39,1 ± 1,3	^C 27,3 ± 0,4	^A 14,6 ± 0,2	^B 40,9 ± 1,2

Různá písmena v horním indexu před číslem znamenají statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v jednotlivých řádcích ($p = 0,05$). Průměrné hodnoty ± standardní odchylka ($N=4$). Uvedené dny jsou počítány od data výroby (2.10. 2017).

Z tabulky pro 2× pasterované vzorky⁷ je zřetelný statisticky významný rozdíl v hodnotách (μg kyseliny gallové/ml extraktu vzorku) pro celkový obsah fenolických látek. Významný rozdíl byl zjištěn u hodnot pro extrakty vzorků 4-A a 5-B v případě prvního a posledního bodu skladovacího pokusu. U extraktu vzorku 6-C nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi hodnotami prvního a posledního dne. U všech 1× i 2× pasterovaných vzorků neměly hodnoty určitý trend, jedná se spíše o fluktuaci.

Dvou-faktorovou analýzou rozptylu (doba skladování a typ pasterace), nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl pro celkový obsah fenolických látek mezi extrakty vzorků, jež byly jednou pasterované a vzorky, které byly dvakrát pasterované. Ve druhém případě byly v porovnání extrakty vzorků s přísadkou xylitolu a extrakty bez přísadky. V tomto případě již docházelo ke statisticky významnému poklesu hodnot celkového obsahu fenolických látek pro extrakty vzorků s přísadkou xylitolu ($p = 0,00420$).

⁶ 1×pasterované vzorky = 80 °C (vodní lázeň) po dobu 20 minut od dosažení teploty uvnitř produktu

⁷ 2× pasterované vzorky = 80 °C (vodní lázeň) 2× 20 min od dosažení teploty uvnitř produktu

3.2 Vliv skladování na antioxidační aktivitu měřenou metodou ABTS

Kalibrační závislost pro metodu ABTS byla sestavena z 8 bodů v rozsahu koncentrací látky Trolox od 15–50 µg/ml (příloha č. 10). Každý kalibrační bod byl proměřen 3× a vzorek–extrakt byl proměřen 2× na UV/VIS spektrofotometru od firmy Beckman. Z naměřených hodnot absorbancí bylo možné vyjádřit průměrné hodnoty a jejich standardní odchylky. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako ekvivalent látky Trolox v µg/ml extraktu vzorku. V tabulce č. 12 a 13 jsou vyjádřeny hodnoty antioxidační aktivity měřené metodou ABTS, které byly hodnoceny párovým porovnáním.

Tabulka č. 12 Výsledky antioxidační aktivity stanovené metodou ABTS pro vzorky 1× pasterované.

Antioxidační schopnost zachytit radikál ABTS^{•+} v µg látky Trolox/ml extraktu vzorku					
Vzorky	8. den	22. den	50. den	134. den	162. den
1-A	^{B, C} 68,2 ± 1,1	^C 61,2 ± 7,9	^A 37,8 ± 0,6	^A 28,8 ± 2,8	^{A, D} 37,6 ± 0,5
2-B	^B 81,2 ± 2,0	^C 70,1 ± 4,3	^A 42,5 ± 0,1	^A 36,6 ± 1,3	^D 57 ± 1,6
3-C	^B 127,4 ± 2,4	^{A, D} 73,5 ± 5,1	^{D, C} 84 ± 1,1	^A 61,6 ± 4,2	^C 88,8 ± 1,8
7-A	^C 83,5 ± 1,0	^B 59,3 ± 0,1	^B 59 ± 7,3	^A 24,6 ± 1	^B 57,7 ± 0,7

Různá písmena v horním indexu před číslem znamenají statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v jednotlivých řádcích ($p = 0,05$). Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4). Uvedené dny jsou počítány od data vyrobení (2.10. 2017).

Hodnoty antioxidační aktivity pro 1× pasterované extrakty vzorků stanovené metodou ABTS jsou zaznamenány v tabulce č. 12. Při vzájemném porovnání docházelo k poklesu antioxidační aktivity, s občasným kolísáním, během celého skladovacího pokusu. Na konci tohoto pokusu ve srovnání s jeho začátkem byly zjištěny nižší hodnoty u všech extraktů vzorků.

Tabulka č. 13 Výsledky antioxidační aktivity stanovené metodou ABTS pro vzorky 2× pasterované.

Antioxidační schopnost zachytit radikál ABTS^{•+} v µg látky Trolox/ml extraktu vzorku					
Vzorky	8. den	22. den	50. den	134. den	162. den
4-A	^C 67,6 ± 0,3	^{B, C} 63,8 ± 8,6	^{B, C} 62 ± 1,6	^A 44,8 ± 1,2	^{A, B} 48,3 ± 0,1
5-B	^C 82,3 ± 1,1	^B 61 ± 3,7	^B 55,2 ± 4,2	^A 31,6 ± 0,9	^B 58,1 ± 1,5
6-C	^D 118,2 ± 4,2	^B 92,3 ± 1,2	^C 76,9 ± 0,3	^A 49,2 ± 5,9	^B 94,3 ± 1,5

Různá písmena v horním indexu před číslem znamenají statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v jednotlivých řádcích ($p = 0,05$). Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4). Uvedené dny jsou počítány od data vyrobení (2.10. 2017).

U všech vzorků 2x pasterovaných došlo ke statisticky významnému poklesu hodnot antioxidační aktivity stanovené metodou ABTS vyjádřené jako ekvivalent látky Trolox v µg/ml extraktu vzorku. Pokles byl porovnáván mezi prvním a posledním časovým záznamem skladovacího pokusu.

Analýzou rozptylu mezi dvěma faktory (doba skladování a typ pasterace) bylo zjištěno, že vliv pasterace není statisticky významný. Statisticky významný pokles hodnot byl zjištěn pro vzorky s obsahem xylitolu při vzájemném porovnání se vzorky extraktů bez jeho přídavku ($p = 0,00000$).

3.3 Vliv skladování na antioxidační aktivitu měřenou metodou DPPH

Kalibrační závislost pro metodu DPPH byla sestavena ze 7 bodů v rozsahu koncentrací látky Trolox od 0,6–35 µg/ml (příloha č. 11). Každý kalibrační bod byl proměřen 3× a vzorek–extrakt byl proměřen 2× na UV/VIS spektrofotometru Thermo Spectronic. Z naměřených hodnot absorbancí bylo možné vyjádřit průměrné hodnoty a jejich standardní odchylky. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako ekvivalent látky Trolox v µg/ml extraktu vzorku. V tabulce č. 14 a 15 jsou vyjádřeny hodnoty antioxidační aktivity měřené metodou DPPH, které byly hodnoceny párovým porovnáním.

Tabulka č. 14 Výsledky antioxidační aktivity stanovené metodou DPPH pro vzorky 1× pasterované.

Antioxidační aktivita stanovená metodou DPPH v µg Troloxu/ml extraktu vzorku					
Vzorky	8. den	22. den	50. den	134. den	162. den
1-A	^B 9,2 ± 0,4	^B 9,2 ± 0,1	^B 11 ± 0,8	^A 1,1 ± 0,3	^A 2,1 ± 0,8
2-B	^C 4,5 ± 0,2	^B 12,7 ± 0,3	^B 11 ± 1,2	^A 0,7 ± 0,3	^A 1,4 ± 0,8
3-C	^C 18,8 ± 0,6	^B 11,6 ± 0,9	^B 13 ± 1,4	^A 4 ± 1,6	^A 6,4 ± 0,3
7-A	^B 12 ± 0,5	^C 13,5 ± 0,2	^B 11,1 ± 0,3	^A 0,1 ± 0,1	^A 1,1 ± 0,1

Různá písmena v horním indexu před číslem znamenají statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v jednotlivých řádcích ($p = 0,05$). Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4). Uvedené dny jsou počítány od data vyrobení (2.10. 2017).

Z tabulky č.14 pro 1× pasterované vzorky jsou statisticky významné poklesy hodnot antioxidační aktivity u všech extraktů vzorků stanovených metodou DPPH jako ekvivalent látky Trolox v µg/ml extraktu vzorku. Pokles hodnot byl porovnáván mezi prvním a posledním hodnoceným dnem skladovacího testu.

Tabulka č. 15 Výsledky antioxidační aktivity stanovené metodou DPPH pro vzorky 2× pasterované.

Antioxidační aktivita stanovená metodou DPPH v μg Troloxu/ml extraktu vzorku					
Vzorky	8. den	22. den	50. den	134. den	162. den
4-A	^C 13,4 \pm 0,8	^B 10,4 \pm 0,4	^{B, C} 11,6 \pm 1,0	^A 0,9 \pm 0,4	^A 1,7 \pm 0,5
5-B	^B 8,1 \pm 0,3	^B 10 \pm 0,5	^C 12,3 \pm 1,1	^A 0,4 \pm 0,3	^A 2,0 \pm 0,0
6-C	^C 18,5 \pm 0,4	^B 14,4 \pm 0,3	^B 14,3 \pm 0,8	^A 2,6 \pm 0,8	^D 7,2 \pm 0,1

Různá písmena v horním indexu před číslem znamenají statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v jednotlivých řádcích ($p = 0,05$). Průměrné hodnoty \pm standardní odchylka ($N=4$). Uvedené dny jsou počítány od data vyrobení (2.10. 2017).

Pro vzorky 2× pasterované byl zjištěn statisticky významný pokles hodnot antioxidační aktivity stanovené metodou DPPH jako ekvivalent látky Trolox v $\mu\text{g}/\text{ml}$ extraktu vzorku. Ke stejnému poklesu v prvním a posledním zaznamenaném bodě došlo i u vzorků 1x pasterovaných.

Dvou-faktorovou analýzou rozptylu (doba skladování a typ pasterace) nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými stabilizačními procesy. Pro extrakty vzorků obsahující xylitol nebyl zjištěn statisticky významný pokles hodnot ve srovnání se vzorky bez přídavku ($p = 0,02888$).

3.4 Vliv skladování na antioxidační aktivitu měřenou metodou FRAP

Kalibrační závislost pro metodu FRAP byla sestavena z 8 bodů v rozsahu koncentrací látky Trolox od 15–50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (příloha č. 12). Každý kalibrační bod byl proměřen 3× a vzorek–extrakt byl proměřen 2× na UV/VIS spektrofotometru od firmy Beckman. Z naměřených hodnot absorbancí bylo možné vyjádřit průměrné hodnoty a jejich standardní odchylky. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako ekvivalent látky Trolox v $\mu\text{g}/\text{ml}$ extraktu vzorku. V tabulce č. 16 a 17 jsou vyjádřeny hodnoty antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP, které byly párově porovnávány pomocí Tukeyova testu.

Tabulka č. 16 Výsledky antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP pro vzorky 1× pasterované

Antioxidační aktivita stanovená metodou FRAP v μg Troloxu/ml extraktu vzorku					
Vzorky	8. den	22. den	50. den	134. den	162. den
1-A	^B 11,0 ± 1,7	^C 19,4 ± 0,2	^A 1,9 ± 1,0	^A 2,6 ± 1,1	^B 14,0 ± 1,1
2-B	^B 4,0 ± 0,2	^C 21,4 ± 0,1	^A 1,0 ± 0,5	^B 5,3 ± 0,8	^D 26,1 ± 0,8
3-C	^B 27,6 ± 1,9	^A 21,2 ± 0,4	^B 27,1 ± 0,7	^A 22,4 ± 0,3	^C 38 ± 0,5
7-A	^{B, C} 16,5 ± 3,8	^{C, D} 18,5 ± 0,6	^{A, C} 13,2 ± 0,5	^A 8,0 ± 0,5	^D 23,6 ± 0,1

Různá písmena v horním indexu před číslem znamenají statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v jednotlivých řádcích ($p = 0,05$). Průměrné hodnoty ± standardní odchylka ($N=4$). Uvedené dny jsou počítány od data výroby (2.10. 2017).

U extraktů vzorků, které byly 1x pasterované, byl zjištěn statisticky významný nárůst, mezi prvními a posledními hodnotami skladovacího testu, antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP v případě extraktů 2-B, 3-C a 7-A. Hodnota antioxidační aktivity extraktu vzorku 1-A byla vyšší na konci skladovacího testu v porovnání s 8. dnem, avšak nedosáhla statistického významu.

Tabulka č. 17 Výsledky antioxidační aktivity metodou FRAP pro vzorky 2× pasterované

Antioxidační aktivita stanovená metodou FRAP v μg Troloxu/ml extraktu vzorku					
Vzorky	8. den	22. den	50. den	134. den	162. den
4-A	^A 6,7 ± 0,2	^B 14,6 ± 1,5	^{A, B} 10,8 ± 1,1	^{B, C} 13,1 ± 0,4	^{C, D} 15,3 ± 1,1
5-B	^A 6,4 ± 0,2	^B 12,7 ± 0,5	^C 9,1 ± 0,8	^A 6,1 ± 0,6	^D 36,5 ± 0,4
6-C	^D 20,3 ± 0,0	^B 32,5 ± 0,3	^C 26,1 ± 0,4	^A 10 ± 0,1	^E 36,5 ± 0,4

Různá písmena v horním indexu před číslem znamenají statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v jednotlivých řádcích ($p = 0,05$). Průměrné hodnoty ± standardní odchylka ($N=4$). Uvedené dny jsou počítány od data výroby (2.10. 2017).

Všechny extrakty vzorků pasterovaných dvakrát též jevíly statisticky významný nárůst hodnot, mezi prvním a posledním dnem skladovacího testu, antioxidační aktivity, která byla stanovena metodou FRAP.

Vliv pasterace ani doba skladování neměly prokazatelný vliv na hodnoty antioxidační aktivity, měřené metodou FRAP. Obsah xylitolu ve vzorcích významně snížil antioxidační charakteristiku vzorků ($p = 0,00146$).

3.5 Vliv skladování na výsledky měřené metodou zachytávající H₂O₂

Z naměřených hodnot absorbancí bylo možné vyjádřit schopnost látky zachytávat peroxid vodíku, vyjádřenou v procentech. Výsledná % zachycení H₂O₂ byla zprůměrována a byla u nich vyjádřena standardní odchylka (N=4). Vzorek–extrakt byl proměřen 2× na UV/VIS spektrofotometru od firmy Beckman. V tabulce č. 18 a 19 jsou vyjádřeny hodnoty pro schopnost záchytu peroxidu vodíku při párovém porovnání pomocí Tukeyova testu.

Tabulka č. 18 Výsledky pro metodu zachytávající H₂O₂ v [%] pro vzorky 1× pasterované

Metoda vychytávající H ₂ O ₂					
Vzorky	8. den	22. den	50. den	134. den	162. den
1-A	^{B, C} 43,6 ± 4,7	^{A, C} 34,7 ± 0,2	^A 29,1 ± 0,8	^{B, D} 46,7 ± 2,4	^D 54,7 ± 0,8
2-B	^B 56,4 ± 2,9	^A 41,9 ± 2	^A 36,3 ± 1,8	^A 41,7 ± 1,4	^A 43,3 ± 0,3
3-C	^B 59 ± 2,3	^A 35,9 ± 0,2	^C 45 ± 0,6	^A 33,2 ± 0,8	^D 65,3 ± 0,6
7-A	^A 38,7 ± 0,5	^B 46,4 ± 0,8	^A 40,8 ± 0,5	^A 40,2 ± 2,3	^C 56,6 ± 0,5

Různá písmena v horním indexu před číslem znamenají statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v jednotlivých řádcích (p = 0,05). Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4). Uvedené dny jsou počítány od data výroby (2.10. 2017).

Metodou vychytávající peroxid vodíku byly zjištěny statisticky významně vyšší hodnoty u extraktů vzorků 1-A, 3-C a 7-A (1× pasterované). Statisticky významný pokles byl zjištěn pro extrakt vzorku 2-B. Porovnáván byl první časový bod s posledním skladovacím bodem.

Tabulka č. 19 Výsledky pro metodu zachytávající H₂O₂ v [%] pro 2× pasterované vzorky

Metoda vychytávající H₂O₂					
Vzorky	8. den	22. den	50. den	134. den	162. den
4-A	^B 59,4 ± 4,4	^A 64,8 ± 0,3	^A 34,8 ± 0,9	^A 35,5 ± 1,8	^C 48,5 ± 2,1
5-B	^B 81,3 ± 2,1	^A 31,9 ± 0,5	^C 42,2 ± 2,1	^D 52,9 ± 3	^E 61,5 ± 0,2
6-C	^B 73,4 ± 0,6	^C 45,5 ± 0,5	^D 51,9 ± 1,7	^A 38,9 ± 1,4	^E 63,5 ± 1,1

Různá písmena v horním indexu před číslem znamenají statisticky významný rozdíl v hodnotách uvedených v jednotlivých řádcích ($p = 0,05$). Průměrné hodnoty ± standardní odchylka (N=4). Uvedené dny jsou počítány od data výroby (2.10. 2017).

V tabulce č. 19 pro 2× pasterované vzorky byl u všech extraktů vzorků zaznamenán statisticky významný pokles hodnot procentuálního zachytu peroxidu vodíku. Porovnávány byly extrakty vzorků v prvním a posledním časovém bodě.

Dvou-faktorovou analýzou rozptylu (doba skladování a typ pasterace) byla zaznamenána statisticky významně vyšší hodnota zachytu H₂O₂ pro extrakty vzorků 2× pasterovaných v porovnání s jednou pasterovanými. Výsledky extraktů vzorků s obsahem xylitolu byly statisticky významně nižší než výsledky vzorků bez jeho přídavku ($p = 0,00068$).

4 DISKUZE

Ze statistické analýzy vyšlo najevo, že vzorky proměřené metodou ABTS nekorelují s výsledky zjištěnými dalšími použitými metodami stanovujícími antioxidační aktivitu. Toto tvrzení bylo podloženo i studii.

Při porovnání výsledků proměřených metodami stanovujícími antioxidační aktivitu bylo zjištěno, že vyšších hodnot bylo dosaženo při stanovení metodou ABTS a nejnižší hodnoty poskytovala metoda DPPH. Příkladem je vzorek 3-C, který dosahoval nejvyšších hodnot v prvním bodě měření skladovacího pokusu při stanovení celkového obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity měřenou metodami ABTS a DPPH. Ve všech případech došlo ke statisticky významnému poklesu v posledním bodě skladovacího testu v porovnání s prvním měřeným bodem. U metody FRAP došlo k opačnému jevu, kdy většina hodnot vykazovala statisticky významný vzestup na konci skladovacího testu.

Důvodem odlišných výsledků je zřejmě rozdílný reakční mechanismus jednotlivých metod stanovujících antioxidační aktivitu. Existují i další faktory, které mají vliv na výslednou hodnotu této aktivity měřenou různými metodami. Vliv na výsledné hodnoty má například pH, na které je citlivá především metoda FRAP a DPPH. Metoda FRAP má i další omezení v nižší detekovatelnosti polyfenolů a thiolů, které reagují pomaleji. Dalším limitujícím parametrem některých metod může být vliv teploty u zásobních roztoků nebo zabarvení extraktů. Doba analýzy je také velmi důležitým faktorem ovlivňujícím výsledky metod. Důvodem nekorelujících výsledků, kromě výše zmíněných parametrů, může být například rozdílná stechiometrie mezi antioxidačními sloučeninami v extraktech a použitými radikály [103, 106].

Použití dvoufaktorové analýzy ANOVA bylo umožněno v softwarovém programu STATISTICA, kde byly porovnávány dva parametry (čas a způsob stabilizace nebo obsah xylytolu). Z výsledných grafů bylo patrné, že vliv pasterace na většinu metod nemá statisticky významný vliv. Výjimkou byla metoda zachytávající peroxid vodíku, kde u vzorků 2x pasterovaných byla hodnota zachytu statisticky vyšší než u vzorků, které byly pasterovány 1x. Vědecká publikace [109] tvrdí, že pasterační proces při 80 °C po dobu delší než 15 minut zvyšuje obsah fenolických látek. V našem případě by to znamenalo očekávání zvýšených hodnot celkového obsahu fenolických látek pro vzorky 1x pasterované, avšak rozdíl mezi pasteracemi nebyl statisticky významný. Jiná studie došla k výsledkům, že ošetření při mírných teplotách (50–70 °C) zachovávají antioxidační kapacitu a zvyšují celkový obsah fenolických

látek. Vzorky nutriční směsi, které jsme testovali, byly však podrobeny pasteraci při 80°C po dobu 20 minut, tudíž se nejedná o ošetření při mírných teplotách. Nelze tedy u našich vzorků přepokládat vyšší hodnoty fenolických látek a zachování antioxidační aktivity [110].

Dalšími parametry, které byly porovnávány, dvoufaktorovou analýzou rozptylu, byl čas a obsah xylitolu. Z grafického znázornění extraktů vzorků s přídavkem a bez přídavku xylitolu bylo objasněno, že přídavek cukerného alkoholu statisticky významně snižoval výsledné hodnoty u všech proměřených metod stanovujících antioxidační aktivitu. Téhož výsledku bylo dosaženo i v dalších vědeckých publikacích. Zjištěná nižší antioxidační kapacita u extraktů vzorků s přídavkem xylitolu může být způsobena nižším obsahem redukujících složek. Xylitol, jakožto cukerný alkohol, není zařazován mezi redukující cukry, díky čemuž nepodléhá Maillardově reakci. Tato vlastnost xylitolu je podložena i vědeckou publikací [66, 109].

V metodice je kromě výše zmíněných metod popsána i chelatační metoda, a to z důvodu, že byla vyzkoušena, avšak extrakty vzorků měly většinou vyšší hodnoty absorbance oproti slepému vzorku. Předpoklad byl takový, že se absorbance bude snižovat, protože čím je nižší absorbance, tím je vyšší schopnost chelatace železnatých iontů. Vzhledem k nepotvrzení této hypotézy byla následně ověřena i schopnost chelatace 2mM EDTA pro ověření správné přípravy roztoků. Absorbance EDTA vykazovala průměrnou hodnotu 0,02, čímž byla dokázána správnost přípravy roztoků, jelikož se jedná o činidlo s vysokou chelatační schopností. Důvod, proč byla u vzorků vyšší absorbance než u slepého vzorku, nebyl prozatím objasněn.

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovit antioxidační vlastnosti u nutričních směsí, podrobených skladovacímu pokusu, různými spektrofotometrickými metodami. Nutriční směsi představují formu náhrady pestré stravy, která může představovat rychlý zdroj vyváženého příjmu energie.

Pro stanovení antioxidační aktivity bylo využito třech různých metod a na základě statistického porovnání byly vyhodnoceny. Výsledkem bylo zjištění, že u metody ABTS a DPPH bylo dosaženo po 162 dnech skladování statisticky významně nižších hodnot antioxidační aktivity než u metody FRAP, kde byly zjištěny vyšší hodnoty této aktivity. Metoda TPC prokazovala statisticky významný pokles celkového obsahu fenolických látek na konci sledovacího období oproti prvotnímu množství. Variabilních výsledků bylo dosaženo metodou zachytávající peroxid vodíku, kde se hodnoty v posledním bodě skladování statisticky významně snižovaly nebo zvyšovaly v porovnání s prvním bodem záznamu.

Druhým statistickým programem, porovnávající dva faktory, bylo zjištěno, že mezi hodnotami pro jednotlivé pasterace nebyl u vzorků prokázán statisticky významný rozdíl. Dále bylo zjištěno, že přídavek xylitolu značně snižuje antioxidační vlastnosti. Jeho sladivost však může nahradit úlohu sacharózy v potravinářském průmyslu, a tím snížit kalorický příjem konzumentů.

6 SEZNAM LITERATURY

- [1] SCHROEDER, S., PENDL, T., ZIMMERMANN, A., et-al. Metabolic master regulator of autophagy and ongevity. *Landes Bioscience*, 2014. 10(7): p. 1335 – 1337. Doi:10.4161/auto.28919.
- [2] Dictionary [online]. 2018 [cit. 2018-04-20]. Dostupné z: <http://www.dictionary.com/>.
- [3] HOUSECROFT, C., SHARPE, A. G. *Anorganická chemie*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014. ISBN 978-80-7080-872-6.
- [4] CHEN, CH., WANG, L., WANG, R., LUO, X., LI, Y., LI, J., LI, Y., CHEN, Z. Phenolic contents, cellular antioxidant activity and antiproliferative capacity of different varieties of oats. *Food Chemistry*. 2018, 239: p. 260–267. Doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.104.
- [5] VĚTVIČKA, V. Betaglukany [online]. 2018 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <http://www.betaglukan.cz/>.
- [6] OOMAH, B., WARD, S., BALASUBRAMANIAN, P. Dehulling and selected physical characteristics of Canadian dry bean (*Phaseolus vulgaris L.*) cultivars. *Food Research International*, 2010. 43(5): p. 1410–1415. Doi:10.1016/j.foodres.2010.04.007.
- [7] Velký lékařský slovník. Maxdorf [online]. [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/>.
- [8] WINTERBOURN, C. Ch. Toxicity of iron and hydrogen peroxide : the Fenton reaction. *Toxicology Letters*, 1995. 82–83: p. 969–974. Doi:10.1016/0378-4274(95)03532-X.
- [9] CHUN, J., LOUIE, Y., JONES, M. W., BARCLAY, A., BRAND-MILLER, C. J. Dietary glycaemic index and glycaemic load among Australian adults—results from the 2011–2012 australian health survey. *Nature Publishing Group*. 2017, 7: p. 1–8. Doi:10.1038/srep43882.
- [10] ZHU, X., SCHMIDT, R. R. New principles for glycoside-bond formation. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009. 48(11): p. 1900 – 1934. Doi:10.1002/anie.200802036.
- [11] LINHART, J. et al. *Slovník cizích slov pro nové století*. 2003, Litvínov: Dialog. ISBN 80-85843-61-7.

- [12] kardiochirurgie ICHS. MeDitorial [online]. 2016 [cit. 2016-01-01]. Dostupné z: <http://www.kardiochirurgie.cz>.
- [13] SZESCI, P. B., HARBOE, M. Handbook of Proteolytic Enzymes. 2000, Dánsko: Academic Press. p. 37–42. ISBN 9780123822192.
- [14] BORÉN, J., TASKINEN, M. R., OLOFSSON, S. O., LEVIN, M. Ectopic lipid storage and insulin resistance: A harmful relationship. *Journal of Internal Medicine*, 2013. 274(1): p. 25–40. Doi:10.1111/joim.12071.
- [15] KRUIF, D., HUPPERTZ, T., URBAN, V. S., PETUKHOV, A. V. Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2012. 171–172: p. 36–52. Doi:10.1016/j.cis.2012.01.002.
- [16] LÖNNERDAL, B., IYES, S. Lactoferrin : molecular structure and biological function. *Annual Review of Nutrition*, 1995. 15: p. 93– 110. Doi:10.1146/annurev.nu.15.070195.000521.
- [17] Ministerstvo, Zemědělství. Bezpečnost potravin [online]. 2012 [cit. 2018-03-05]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz>.
- [18] PEDERSEN, S. D. Metabolic complications of obesity. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013. 27(2): p. 179 – 193. Doi:10.1016/j.bee m.2013.02.004.
- [19] HOUSOVÁ, J. ŽIJZDRAVĚ [online]. 2009 [cit. 2018-02-05]. Dostupné z: <http://www.zijzdrave.cz/jidlo/zdrava-strava-a-redukcnijidelnicek/zakladni-zasady/>
- [20] KOLEKTIV AUTORŮ. Referenční hodnoty pro příjem živin. 2011, Praha: Výživaservis. ISBN 978-80-254-6987-3.
- [21] PÁNEK, J. Základy výživy. 1. vyd. Praha: Svoboda servis, 2002. ISBN 80-86320-23-5.
- [22] VELÍŠEK, J. Chemie potravin I. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-3-7.
- [23] PELIKÁN, M., HŘIVNA, J., HUMPOLA, L. Technologie sacharidů. 1999. ISBN 80-7157-407-4.

- [24] HOPKINS, W. G. Photosynthesis and respiration (The Green World). 2006, Auburn, WA, U.S.A.: Infobase Publishing. p. 67–73. ISBN 9780791085615.
- [25] RUXTON, C. H. S, REED, S. C., SIMPSON, M. J. A, MILLINGTON, K. J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 2004. 17(5): p. 449–459. Doi:10.1111/j.1365-277X.2004.00552.x.
- [26] POKORNÝ, J. Společnost pro výživu. 9. 9. 2015 [online]. 2018 [cit. 2018-04-06]. Dostupné z: <http://www.vyzivapol.cz/?s=%C5%99epkov%C3%BD+olej&submit=Hledat>.
- [27] LI, H., FAN, W. Y., LI, Y., TANG, L., HU, N. J., DENG, Y. Z. Evaluating and predicting the oxidative stability of vegetable oils with different fatty acid compositions. *Journal of Food Science*, 2013. 78(4). Doi:10.1111/1750-3841.12089.
- [28] YANG, J., LIU, R. H., HALIM, L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 2009. 42(1): p. 1–8. Doi:10.1016/j.lwt.2008.07.007.
- [29] MORRISON, M. C., MULDER, P., STAVRO, M. P., SUÁREZ, M. Replacement of dietary saturated fat by PUFA-rich pumpkin seed oil attenuates non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis development, with additional health effects of virgin over refined oil. *PLOS One*, 2015. 10(9): p. 1–19. Doi:10.1371/journal.pone.0139196.
- [30] CDC Center for disease control and prevention [online]. 2017 [cit. 2018-01-18]. Dostupné z: http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/adult_bmi/index.html#interpretedAdults.
- [31] FREEDMAN, D. S, WANG, J., THORNTON, C. J., MEI, Z., PIERSON, N. R., DIETZ, H. W., HORLICK, M. Racial/ethnic differences in body fatness among children and adolescents. *Obesity*, 2008. 16(5): p. 1105–1111. Doi:10.1038/oby.2008.30.

- [32] World Health Organization. Preventing and Managing the global epidemic, 2000, Geneva: Obesity. p. 1–268. ISBN 92 4 120894 5.
- [33] POIRIER, P., GILES, D. T., BRAY, A. G., HONG, J. Y., STERN, S. J. Xavier, F., S., ECKEL, R. H. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2006. 26(5): p. 968–976. Doi:10.1161/01.ATV.0000216787.85457.f3.
- [34] HEITMANN, L. B. From nutrition , exercise and psychology to lifestyle. *Obesity*, 2014. 15(S2): p. 98–128. Doi:10.1111/obr.12150.
- [35] SVAČINA, V., BRETŠNAJDROVÁ, A. Cukrovka a obezita.2003, Praha: Maxdorf, s. r. o. ISBN 80-85912-58-9.
- [36] NIELSEN, L. A., KLOPPENBORG, T. J., TRIER, C., GAMBORG, M., HOLM, CH., J. The influence of familial predisposition to cardiovascular complications upon childhood obesity treatment. *PLOS One*, 2015. 10(3): p. 1– 10. Doi:10.1371/journal.pone.0120177.
- [37] VILLAREAL, D. T., APOVIAN, C. M. Obesity in older adults. *Obesity*, 2005. 13(11): p. 1849–1863. Doi:10.1038/oby.2005.228.
- [38] MUKHOPADHYAY, D., DASGUPTA, P., SINHA ROY, D., PALCHOUDHURI, S., CHATTERJEE, I., ALI, S., GHOSH DASTIDAR, S. A sensitive *in vitro* spectrophotometric hydrogen peroxide scavenging assay using 1,10-phenanthroline. *Free Radicals and Antioxidants*, 2016. 6(1), 124–132. Doi:10.5530/fra.2016.1.15
- [39] KIMÁKOVÁ, T., BARANOVIČOVÁ, I. Léčivá síla antioxidantů. 2015, Bratislava: Vydavateľstvo Príroda, s. r. o. ISBN 978-80-07-02455-7.
- [40] MAXWELL, S. R. J, LIP, G. Y. H. Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1997. 44(4): p. 307–317. Doi:10.1046/j.1365-2125.1997.t01-1-00594.x.
- [41] TIWARI, A. K. Imbalance in antioxidant defense and human disease : Multiple approach of natural antioxidant therapy. *JSTOR*, [online]. 2001. [vid. 2018-02-16]. 81(9): p. 1179–1187. Dostupné z: http://www.jstor.org/stable/24106434?seq=1#page_scan_tab_contents.

- [42] SASIKUMAR, V. Evaluation of free radical scavenging activity of various leaf extracts from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn., *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 2014. 3(2). Doi:10.4172/2161-1009.1000150.
- [43] IXTAINA, V. Y., NOLASCO, M. S., TOMÁS, C. M. Oxidative stability of chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil: Effect of antioxidants and storage conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2012. 89(6): p. 1077–1090. Doi:10.1007/s11746-011-1990-x.
- [44] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin III*. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-902391-5-3.
- [45] NISHANTHI, M., VASILJEVIC, T., CHANDRAPALA, J. Properties of whey proteins obtained from different whey streams. *International Dairy Journal*, 2017. 66: p. 76–83.. Doi:10.1016/j.idairyj.2016.11.009.
- [46] GOFF, H. D. *Gums and stabilisers for the food industry*. 2014, United Kingdom: Woodhead Publishing. p. 12–18. ISBN 978-1-85573-788-4.
- [47] O'REGAN, J., ENNIS, M. P., MULVIHILL, D. M. *Handbook of hydrocolloids*. 2009, New York: Woodhead Publishing Limited. p. 298–398 ISBN 9781845695873.
- [48] BACENETTI, J., BAVA, L., SCHIEVANO, A., ZUCALI, M. Whey protein concentrate (WPC) production: Environmental impact assessment. *Journal of Food Engineering*, 2018. 224: p. 139–147. Doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.12.018.
- [49] CORROCHANO, A. R., BUCKIN, V., KELLY, P. M., GIBLIN, L. Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. *Journal of Dairy Science*, 2018. 101(6): p. 1–15. Doi:10.3168/jds.2017-13618.
- [50] ELIAS, R. J., KELLERBY, S.S., DECKER, A. E., ELIAS, R. J. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008. 48(5): p. 430–441. Doi:10.1080/10408390701425615.
- [51] BOLAND, M. *Milk proteins: From expression to food*. 2008, New Zealand: Academic Press. p. 501–511. ISBN 978-0-12-374039-7.
- [52] FOX, P. F. *Advanced dairy chemistry: Vol 1: Proteins*. p. 1–48. ISBN 978-1-4419-8602-3.

- [53] MCCARTHY, N. A., POWER, O., WIJAYANTI, B. H., KELLY, M. P., MAO, L., FENELON, M. A. Effects of calcium chelating agents on the solubility of milk protein concentrate. *International Journal of Dairy Technology*, 2017. 70(3): p. 415–423.. Doi:10.1111/1471-0307.12408.
- [54] BRYDSON, J. A. *Plastics materials: Casein.miscellaneous*. 1995. Londýn: Iliffe Books. p. 853–873. ISBN 0750618647.
- [55] FOX, P. F. *Milk proteins*. 2008, New Zealand: Academic Press. p 1–54.. ISBN 9780124051751.
- [56] DALGLEISH, D. G. Casein micelles as colloids: Surface Structures and Stabilities. *Journal of Dairy Science*, 1998. 81(11): p. 3013–3018. Doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75865-5.
- [57] UNIVERSITY OF WISCONSIN-MADISON. *Casein glues: Their manufacture, preparation, and application*. Madison (U.S.), 1967, p. 1–17.
- [58] WARE, M. *Cashews: nutritional information, health benefits*. 25.4 [online]. 2016. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/309369.php>.
- [59] BOLLING, B. W., CHEN, C. Y. O., MCKAY, D. L. BLUMBERG, B. J. Tree nut phytochemicals: Composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutrition Research Reviews*, 2011. 24(2): p. 244–275. Doi:10.1017/S095442241100014X.
- [60] LIMA, J. R., GARRUTI, S. D, BRUNO. M. L. Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of cashew nut butter made from different kernel grades-quality. *LWT - Food Science and Technology*, 2012. 45(2): p. 180 – 185 Doi:10.1016/j.lwt.2011.08.018.
- [61] LI, S., CHU, S., LU, J., WANG, P. MA, M. Molecular and structural properties of three major protein components from almond kernel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017. 42(3): p. 1–7. Doi:10.1111/jfpp.13536.

- [62] GRUNDY, M. M, L., LAPSLEY, K., ELLIS, R. P. A review of the impact of processing on nutrient bioaccessibility and digestion of almonds. *International Journal of Food Science and Technology*, 2016. 51(9): p.1937–1946. Doi:10.1111/ijfs.13192.
- [63] DOHNALOVÁ, L., HŮLA, J. Fér potravina. 25.09.2017 [online]. 2017 [cit. 2018- 04- 24]. Dostupné z: <https://www.ferpotravina.cz/seznam-ecek/E967;E202>. <https://www.ferpotravina.cz/clanky/co-je-a-neni-maslo>.
- [64] SUKOVÁ, I. Průvodce označováním potravin. 2008, Praha: Ústav zemědělské ekonomiky a informací. ISBN 80-7271-174-1.
- [65] GORREPATI, K., BALASUBRAMANIAN, S., CHANDRA, P. Plant based butters. *Journal of Food Science and Technology*, 2015. 52(7): p. 3965–3976. Doi:10.1007/s13197-014-1572-7.
- [66] LIANG, S., WERE, M., L. Chlorogenic acid induced colored reactions and their effect on carbonyls, phenolic content, and antioxidant capacity in sunflower butter cookies. *LWT-Food Science and Technology*, 2018. 87: p. 6–22. Doi:10.1016/j.lwt.2017.08.069.
- [67] JIANG, R., MANSON, E. J., STAMPFER, J. M. Nut and Peanut Butter Consumption and Risk of Type 2 Diabetes in Women. *Jama Network*, 2015. 288(20): p. 2554–2560. Doi:10.1001/jama.288.20.2554.
- [68] LAURETTI, E., PRATICÒ, D. Effect of canola oil consumption on memory, synapse and neuropathology in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 2017. 7(1): p. 1–9. Doi:10.1038/s41598-017-17373-3.
- [69] MCDOWELL, D., ELLIOTT, T. CH., KOIDIS, A. Characterization and comparison of UK, Irish, and French cold pressed rapeseed oils with refined rapeseed oils and extra virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2017. 119(8): p. 1–12. Doi:10.1002/ejlt.201600327.
- [70] WRONIAK, M., KRYGIER, K., KACZMARCZYK, M. Comparison of the quality of cold pressed and virgin rapeseed oils with industrially obtained oils. *Polish journal of food and nutrition sciences*. 2008, 58(1), 85–89.

- [71] EASTMAN. Schaal Oven Storage Stability Test. 2010. U.S.A.
- [72] PETERSON, D. M. Oat antioxidants. *Journal of Cereal Science*, 2001. 33(2): p. 115–129. Doi:10.1006/jcrs.2000.0349.
- [73] JOHANSSON, D., ANDERSSON, R. P., ALMINGER, M., LANDBERG, R., LANGTON, M. Larger particle size of oat bran inhibits degradation and lowers extractability of β -glucan in sourdough bread–Potential implications for cholesterol-lowering properties *in vivo*. *Food Hydrocolloids*, 2017. 77: p. 49–56. Doi:10.1016/j.foodhyd.2017.09.016.
- [74] TOSH, S. M., CHU, F. Y. Systematic review of the effect of processing of whole-grain oat cereals on glycaemic response. *British Journal of Nutrition*, 2015. 114(8): p. 1256–1262. Doi:10.1017/S0007114515002895.
- [75] BROWN, L., ROSNER, B., WILLETT, W. W., SACKS, M. F. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: A meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999. 69(1): p. 30–42. Doi:10.3945/ajcn.114.086108.
- [76] SLAVIN, J. L., MARTINI, C. M., JACOBS, R. D., MARQUART, L. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999. 70(3): p. 459s–463s. Doi:10.1093/ajcn/70.3.459s.
- [77] HITAYEZU, R., BAAKDAH, M M., KINNIN, J., HENDERSON, K., TSOPMO, A. antioxidant activity, avenanthramide and phenolic acid contents of oat milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 2015. 63: p. 35–40. Doi:10.1016/j.jcs.2015.02.005.
- [78] PATRAS, A., BRUNTON, P. N., PIEVE, D. S., BUTLER, F. Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2009. 10(3): p. 308–313. Doi:10.1016/j.ifset.2008.12.004.
- [79] SKREDE, G., WROLSTAD, R. E, DURST, R. W. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*, 2000. 65(2): p. 357–364. Doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb16007.x.

- [80] GONZALEZ, M. E., BARRETT, M. D. Thermal, high pressure, and electric field processing effects on plant cell membrane integrity and relevance to fruit and vegetable quality. *Journal of Food Science*, 2010. 75(7): p. R121–R130. Doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01763.x.
- [81] INAREJOS-GARCÍA, A. M., MANCEBO-CAMPOS, V., CAÑIZARES, P, LLANOS, J. Physical-chemical characterization of fruit purees and relationship with sensory analysis carried out by infants (12–24 mē.). *Journal of Food Science*, 2015. 80(5): p. E1005–E1011. Doi:10.1111/1750-3841.12860.
- [82] ÁLVAREZ, E., CANCELA, M. A, DELGADO-BASTIDAS, N, MACEIRAS, R. Rheological characterization of commercial baby fruit purees. *International Journal of Food Properties*, 2008. 11(2): p. 321–329. Doi:10.1080/10942910701359424.
- [83] TAVARES, L. S., JUNQUEIRA, A. L, DE OLIVEIRA GUIMARÃES, Í, C., DE RESENDE, V. J. Cold extraction method of chia seed mucilage (*Salvia hispanica L.*): effect on yield and rheological behavior. *Journal of Food Science and Technology*, 2018. 55(2): p. 457–466. Doi:10.1007/s13197-017-2954-4.
- [84] COOREY, R., TJOE, A., JAYASENA, V. Gelling properties of chia seed and flour. *Journal of Food Science*, 2014. 79(5): p. E859–866. Doi:10.1111/1750-3841.12444.
- [85] BORNEO, R., AGUIRRE, A., LEÓN, E. A. Chia (*Salvia hispanica L*) Gel can be used as egg or oil replacer in cake formulations. *Journal of the American Dietetic Association*, 2010. 110(6): p. 946–949. Doi:10.1016/j.jada.2010.03.011.
- [86] STEFFOLANI, E., HERA, E. PÉREZ, G., GÓMEZ, M. Effect of chia (*salvia hispanica l*) addition on the quality of gluten-free bread. *Journal of Food Quality*, 2014. 37(5): p. 309–317. Doi:10.1111/jfq.12098.
- [87] BUDRYN, G., ZACZYŃSKA, D., ŻYŻELEWICZ, D., GRZELCZYK, J., ZDUŃCZYK, Z., JUŚKIEWICZ, J. Influence of the form of administration of chlorogenic acids on oxidative stress induced by high fat diet in rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2017. 72(2): p. 184–191. Doi:10.1007/s11130-017-0608-3.
- [88] OLTHOF, M. R., HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Journal of Nutrition*, 2001. 131(1): p. 66–71. Doi: 10.1093/jn/131.1.66.

- [89] EFSA. Opinion on the safety of Tahitian Noni® ‘Morinda citrifolia (noni) fruit puree and concentrate’ as a novel food ingredient. *EFSA Journal*, 2009. 7(4): p. 4–26. Doi:10.2903/j.efsa.2009.998.
- [90] SAWKA, M. N, CHEUVRONT, N. S., CARTER, R. Human water needs, 2005. 63(6): p. 30–39. Doi:10.1301/nr.2005.jun.S30-S39.
- [91] KYAW, A., YANJUAN, J., SHENG, Y. H. The role of water in plant-microbe interactions. *The Plant Journal*, 2018. 38(1): p. 42–49. Doi:10.1111/ijlh.12426.
- [92] KADLEC, P., MELZUCH, K., VOLDŘICH, M. Co byste měli vědět o výrobě potravin? 2009, Ostrava: KEY Publishing s.r.o. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [93] ERKMEN, O., BOZOGLU, F. T. Food microbiology: Principles into practice. 2016, USA: John Wiley & Sons, p. 44–58. ISBN 9781119237761.
- [94] SHINDE, V. R. Water-energy-food nexus : selected tools and models in practice.2017, USA: John Wiley & Sons. ISBN 978-1-119-24313-7.
- [95] TIWARI, B. K., NORTON, T., HOLDEN, N. M., T. Sustainable food processing. 2014, Turecko: John Wiley & Sons. ISBN 9780470672235.
- [96] OSWIN, R. C. Food group symposium roles of water in food. *Journal of Science Food and Agriculture*, 1976. 26:p. 709–712. Doi: 10.1002/jsfa.2740270720.
- [97] OTIENO, K. Milk pasteurization. 12.12.2017 [online]. 2017 [cit. 2018-04-06]. Dostupné z: <http://dairytechnologist.com/milk-pasteurization/>.
- [98] FOX, P. F., BRODKORB, A. The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, 2008. 18(7): p. 677–684.. Doi:10.1016/j.idairyj.2008.03.002.
- [99] EUROPEAN COMMISSION. Food- additives [online]. 2018 [cit. 2018-05-01]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/food/safety/food_improvement_agents/additives_en.
- [100] SKURRAY, G. Decoding food additives. 2006, Sydney: Lothian Books. ISBN 978-0733622243.

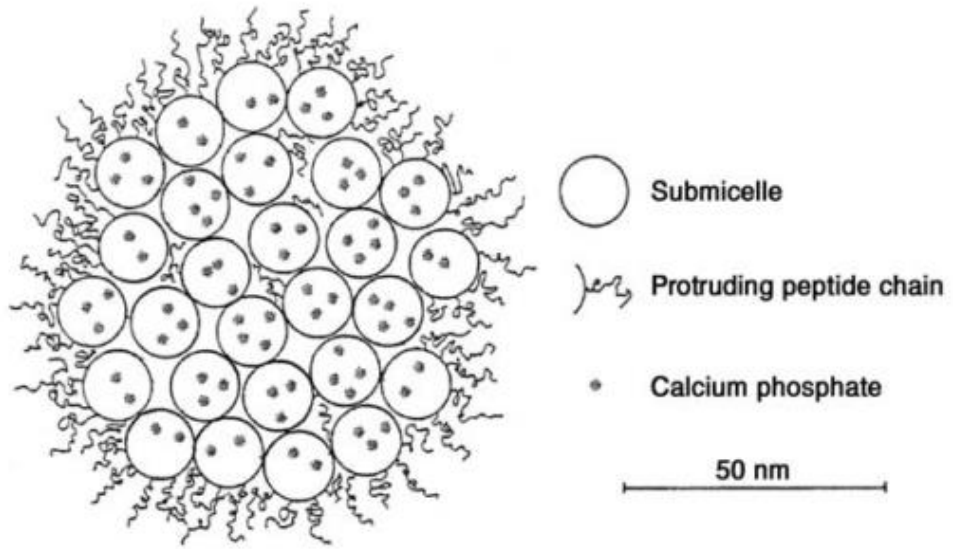
- [101] KHAN, R. A., KHAN, M. R., SAHREEN, S., AHMED, M. Evaluation of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of *Sonchus asper* (L.) hill. *Chemistry Central Journal*, 2012. 6(1): p. 1–7. Doi:10.1186/1752-153X-6-12.
- [102] SOCHOR, J., RYVOLOVA, M., KRYSTOFOVA, O., SALAS, P., HUBALEK, J. Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: advantages and disadvantages. *molecules*, 2010. 15(12): p. 8618–8640. Doi:10.3390/molecules15128618.
- [103] PAREJO, I., CODINA, C., PETRAKIS, CH., KEFALAS, P. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2000. 44(3): p. 507–512. Doi:10.1016/S1056-8719(01)00110-1.
- [104] STRATIL, P., KLEJDUS, B., KUBAN, V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables s evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006. 54(3): p. 607–616. Doi:10.1021/jf052334j.
- [105] PŘIKRYL, J. Tavený sýr jako funkční potravina. Pardubice, 2017. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.
- [106] GONÇALVES, G., A., S., RESENDE, S., N., CARVALHO, N., N., E. Effect of pasteurisation and freezing method on bioactive compounds and antioxidant activity of strawberry pulp. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2017. 68(6): p. 682–694. Doi:10.1080/09637486.2017.1283681.
- [107] BRANCO, I., G., MORAES, F., C., I., ARGANDOÑA, S., J., E. Influence of pasteurization on antioxidant and in vitro anti-proliferative effects of jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) fruit pulp. *Industrial Crops and Products*, 2016. 89: p. 225–230. Doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.055.

- [108] MUSTAFA, O, GU, K., ESRA, C. Antioxidant activity / capacity measurement . 1 . classi fi cation , physicochemical principles , mechanisms , and electron transfer (et) - based assays res . Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. 64 (5), 997-1027. Doi:10.1021/acs.jafc.5b04739.
- [109] LASLO, V., TEUSDEA, A., C., SOCACI, A., M., MIERLITA, D., VICAS, I., S. Influence of pasteurization on total phenols content and antioxidant capacity of (*Prunus persica L.*) juices. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 2017, 45(2): p. 553–560. Doi:10.15835/nbha45210699.
- [110] TCHUENCHIEU, A., ESSIA, J., J., NGANG, M., SERVAIS, M. Effect of low thermal pasteurization in combination with carvacrol on color, antioxidant capacity, phenolic and vitamin C contents of fruit juices. Food Science and Nutrition, 2018. 0(0): p.1–11. Doi:10.1002/fsn3.611.
- [111] NAKNAEN, P., ITTHISOPONKUL, T. Characteristics of cantaloupe jams as affected by substitution of sucrose with xylitol. International Journal of Fruit Science 2015. 15(4): p. 442–455. Doi:10.1080/15538362.2015.1031433.

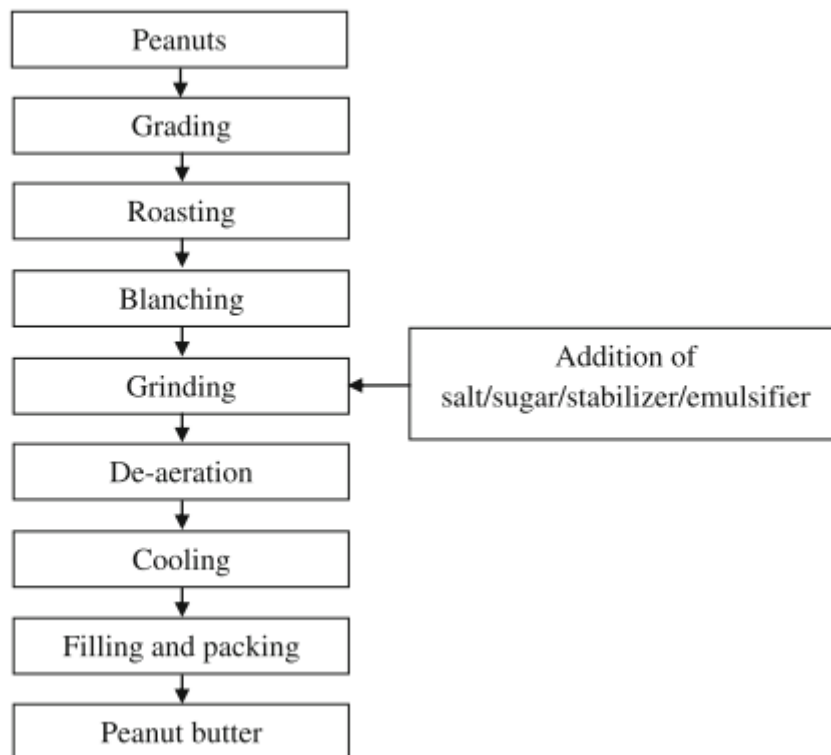
7 PŘÍLOHY

Příloha č. 1 Model kaseinové micely [15].	83
Příloha č. 2 Technologický postup výroby ořechového „másla“ [65].	84
Příloha č. 3 Ukázka vzorků-sáčků s uzávěrem (doypack).	85
Příloha č. 4 Rozsáhlá tabulka s charakteristikou vzorků.	86
Příloha č. 5 Optimalizace času pro celkový obsah fenolických látek.....	87
Příloha č. 6 Optimalizace času pro metodu ABTS	87
Příloha č. 7 Optimalizace času pro metodu DPPH	87
Příloha č. 8 Optimalizace času pro metodu FRAP	87
Příloha č. 9 Kalibrační křivka kyseliny gallové.....	88
Příloha č. 10 Kalibrační křivka látky Trolox pro metodu ABTS.....	88
Příloha č. 11 Kalibrační křivka látky Trolox pro metodu DPPH.....	89
Příloha č. 12 Kalibrační křivka látky Trolox pro metodu FRAP	89

Příloha č. 1 Model kaseinové micely [15].



Příloha č. 2 Technologický postup výroby ořechového „másla“ [65].



Příloha č. 3 Ukázka vzorků-sáčků s uzávěrem (doypack).



Příloha č. 4 Rozsáhlá tabulka s charakteristikou vzorků.

Skladovací pokus UPCE							
Označení vzorku	1-A	2-B	3-C	4-A	5-B	6-C	7-A
Varianta	Dospělá 120g + 5 g xylytolu	Dospělá 120g	Dětská 100g	Dospělá 120g + 5 g xylytolu	Dospělá 120g	Dětská 100g	Dospělá 120g + 5 g xylytolu
Datum a čas přípravy	3.10.2017 8:40 naplněno	3.10.2017 9:17 naplněno	3.10.2017 10:10 naplněno	2.10.2017 8:14 naplněno	2.10.2017 9:50 naplněno	2.10.2017 9:08 naplněno	3.10.2017 13:25 naplněno
pH	4,17	4,12	4,16	4,15	4,1	4,15	4,18
Způsob stabilizace	1x pasterace	1x pasterace	1x pasterace	2x pasterace	2x pasterace	2x pasterace	Sorban 1.000 mg + 1x pasterace
Čas pasterace	20 min. á 80 stupňů	20 min. á 80 stupňů	20 min. á 80 stupňů	2x (20 min. á 80 stupňů)	2x (20 min. á 80 stupňů)	2x (20 min. á 80 stupňů)	20 min. á 80 stupňů
Pasterační teplota	47/ 21,8	47/ 21,8	47/ 21,8	17/15,1 22/21,5	17/15,1 22/21,5	17/15,1 22/21,5	47/ 21,8
Dosažení 80 °C lázně	24 min.	24 min.	24 min.	36 min. 34 min.	36 min. 34 min.	36 min. 34 min.	24 min.
Dosažení 70 °C uvnitř	Po 24 min. již 75 stupňů	Po 24 min. již 75 stupňů	Po 24 min. již 75 stupňů	36 + 3 min. 34 + 3 min.	36 + 3 min. 34 + 3 min.	36 + 3 min. 34 + 3 min.	Po 24 min. již 75 stupňů
Čas-teplota nad 70 °C uvnitř	20 min +	20 min. +	20 min. +	17 min. 17 min.	17 min. 17 min.	17 min. 17 min.	20 min. +
Nejvyšší dosažená teplota během pasterace	80,7	80,7	80,7	80,9 80,6	80,9 80,6,	80,9 80,6,	80,7
Čas-teplota nad 70 °C uvnitř mimo lázeň (ochlazení)	11 min.	11 min.	11 min.	10 min. 11 min.?	10 min. 11 min.?	10 min. 11 min.?	11 min.

Příloha č. 5 Optimalizace času pro celkový obsah fenolických látek

Optimalizace času pro stanovení celkového počtu fenolických látek					
Počet měření	Čas inkubace				
	15	20	30	45	60
1	0,161	0,161	0,208	0,205	0,214
2	0,155	0,155	0,196	0,197	0,206
3	0,113	0,109	0,151	0,154	0,157
4	0,121	0,119	0,161	0,155	0,155

Příloha č. 6 Optimalizace času pro metodu ABTS

Optimalizace času pro stanovení metodou ABTS					
Počet měření	Čas inkubace				
	15	20	30	40	50
1	0,215	0,203	0,193	0,184	0,179
2	0,198	0,189	0,185	0,168	0,162
3	0,208	0,195	0,190	0,185	0,181
4	0,210	0,199	0,192	0,187	0,182

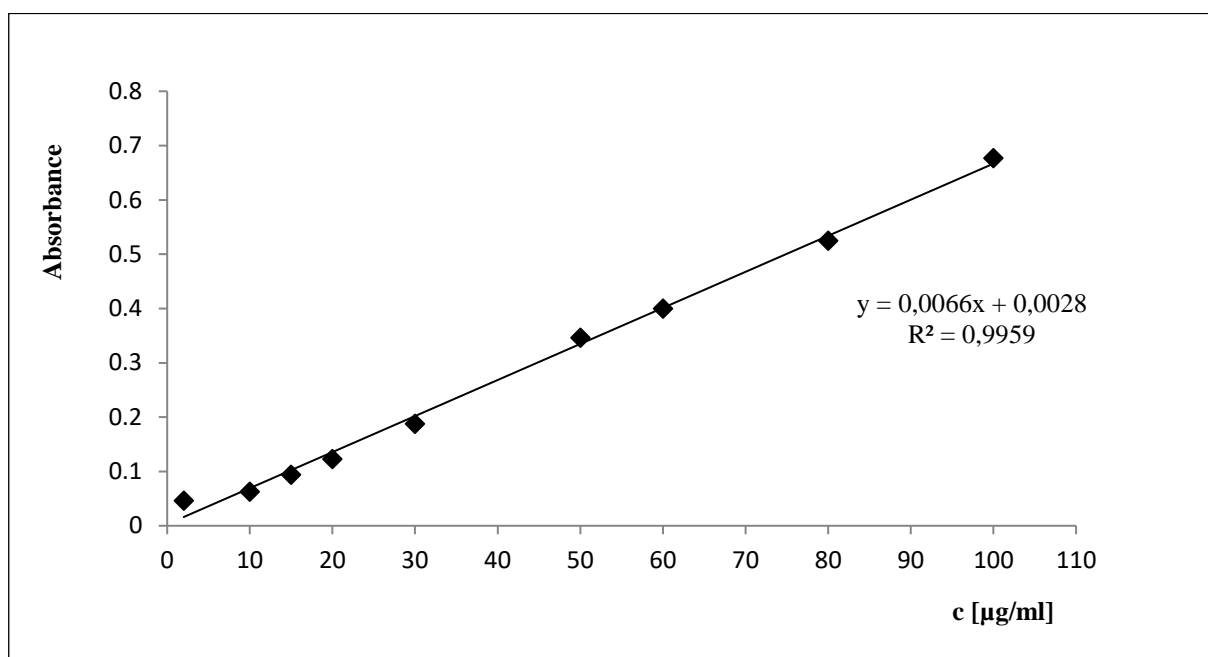
Příloha č. 7 Optimalizace času pro metodu DPPH

Optimalizace času pro stanovení metodou DPPH					
Počet měření	Čas inkubace				
	10	15	20	25	30
1	0,448	0,394	0,389	0,387	0,386
2	0,481	0,406	0,399	0,396	0,394
3	0,473	0,412	0,406	0,404	0,400
4	0,453	0,399	0,394	0,390	0,387

Příloha č. 8 Optimalizace času pro metodu FRAP

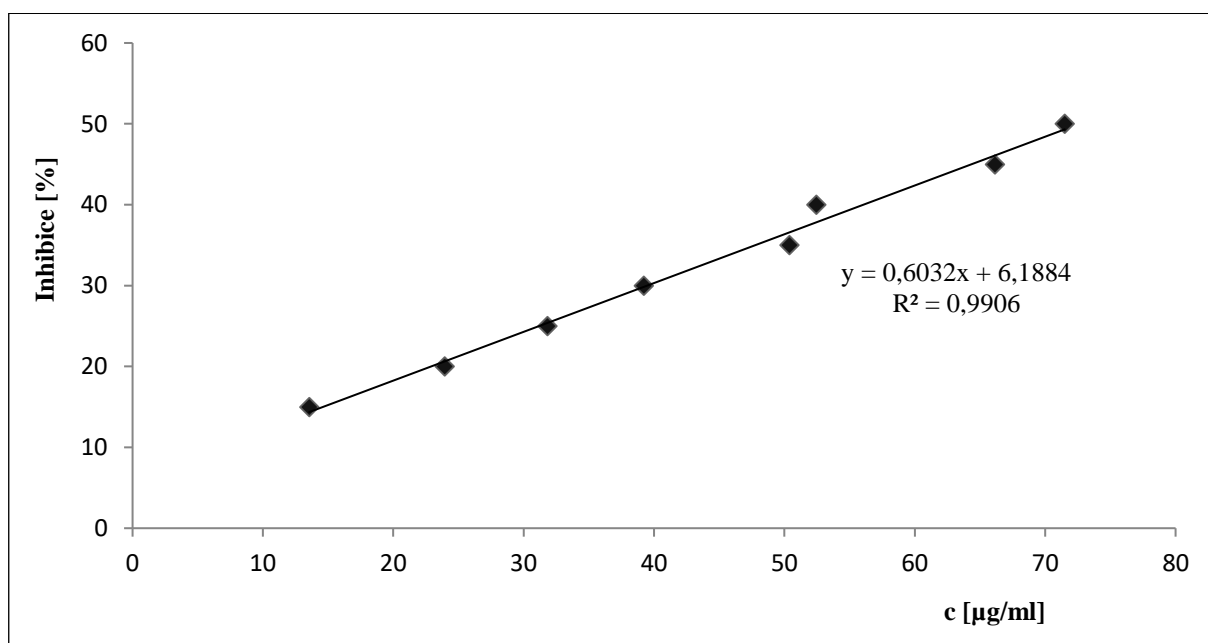
Optimalizace času pro stanovení metodou FRAP						
Počet měření	Čas inkubace					
	10	20	30	40	50	60
1	0,381	0,437	0,454	0,471	0,505	0,510
2	0,380	0,437	0,455	0,476	0,528	0,530
3	0,379	0,435	0,450	0,471	0,520	0,524
4	0,382	0,439	0,458	0,480	0,524	0,526

Příloha č. 9 Kalibrační křivka kyseliny gallové



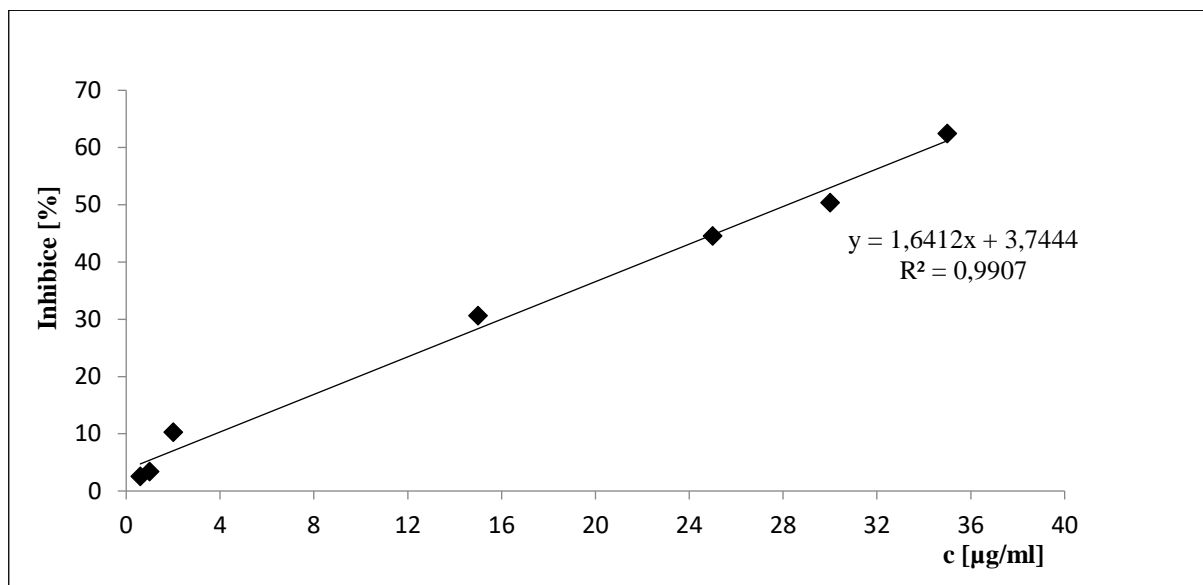
Průměrné hodnoty (N=4)

Příloha č. 10 Kalibrační křivka látky Trolox pro metodu ABTS



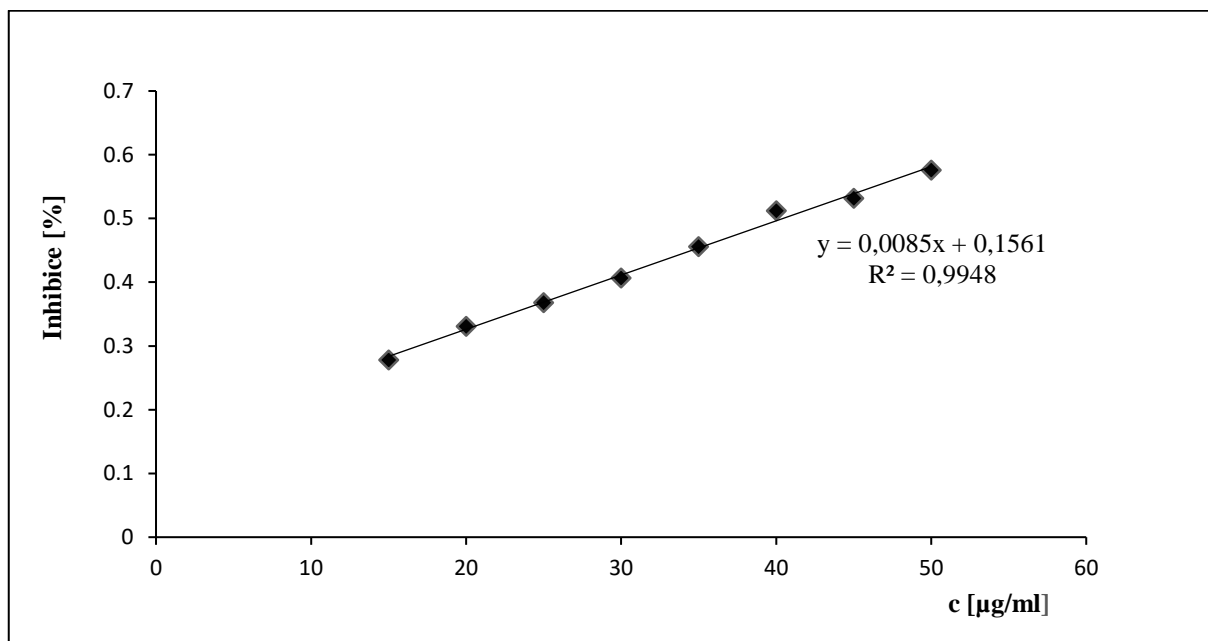
Průměrné hodnoty (N=4)

Příloha č. 11 Kalibrační křivka látky Trolox pro metodu DPPH



Průměrné hodnoty (N=4)

Příloha č. 12 Kalibrační křivka látky Trolox pro metodu FRAP



Průměrné hodnoty (N=4)