

Stanovení vlákniny ve vybraných druzích sladkovodních řas

Bc. Zuzana Hrdinová

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zuzana HRDINOVÁ**
Osobní číslo: **T08797**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Stanovení vlákniny ve vybraných druzích
sladkovodních řas**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizace vlákniny.
2. Popis metod stanovení vlákniny.
3. Složení a význam sladkovodních řas.

II. Praktická část

1. Metodika stanovení vlákniny na přístroji ANKOM.
2. Metodika stanovení vlákniny enzymatickou metodou.
3. Stanovení vlákniny ve vzorcích sladkovodních řas různými metodami.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] KALINA, T., VÁŇA, J. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*, Karolinum, Univerzita Karlova v Praze, 2005.

[2] DE VRIES, J. V. *On defining dietary fibre*, Proceedings of the Nutrition Society, 2003, 62, p. 37-43.

[3] DUMITRU, S. *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, Marcel Dekker, New York, 2005.

[4] BARSANTI, L., GUALTIERI, P. *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*, Taylor & Francis, New York, 2006.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Ladislava Mišurcová, Ph.D.**
Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **4. ledna 2010**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2010**

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 12. 5. 2010

Hrdinová

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Teoretická část diplomové práce se zabývá obecnými charakteristikami vlákniny a popisem metod stanovení vlákniny. Práce se rovněž věnuje tématice řas a zaměřuje se na vybrané druhy sladkovodních řas, u nichž byla stanovena vláknina.

Cílem praktické části diplomové práce bylo stanovit ve vzorcích sladkovodních řas vlákninu pomocí přístroje ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer a enzymatickou metodou. Obě metody stanovení vlákniny byly srovnány.

Klíčová slova: vláknina, stanovení, metodika, vzorek, sladkovodní řasy

ABSTRACT

The theoretical part of the thesis deals with general characteristics of fiber and with description of methods to determine fiber. The thesis subsequently concerns in chosen species of freshwater algae determined to contain fiber.

The aim of practical part of the thesis was to determine fiber in samples of freshwater algae using ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer and enzymatic method. Both of the determinative methods were compared.

Keywords: fiber, determination, methodology, sample, freshwater algae

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Magdě Sergejevové, Ph.D. a doc. RNDr. Jiřímu Masojídkovi, CSc. z Ústavu fyzikální biologie JČU ČB v Nových Hradech a z MÚ AV ČR v Třeboni za poskytnutí vzorků sladkovodních řas a sinic.

Také bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce, paní Ing. Ladislavě Mišurcové, Ph.D., za odborné vedení, v rámci něhož mi poskytovala užitečné informace, cenné rady a připomínky pro vypracování diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 VLÁKNINA	13
1.1 DEFINICE VLÁKNINY	13
1.2 TYPY VLÁKNIN A JEJICH VLASTNOSTI	15
1.2.1 Nerozpustná vláknina.....	16
1.2.2 Rozpustná vláknina	16
1.3 ÚČINKY VLÁKNINY NA LIDSKÝ ORGANISMUS.....	16
1.4 DOPORUČENÝ PŘÍJEM VLÁKNINY	17
1.5 ZDROJE VLÁKNINY	18
1.6 SLOŽKY VLÁKNINY VYSKYTUJÍCÍ SE V ŘASÁCH	19
1.6.1 Celulosa.....	19
1.6.2 Hemicelulosity.....	20
1.6.3 Lignin	21
1.6.4 Chitin.....	22
1.6.5 Pektiny.....	23
1.6.6 Rostlinné gummy a slizy	24
1.6.7 Polysacharidy mořských řas	24
1.6.7.1 Agary.....	24
1.6.7.2 Karagenany	24
1.6.7.3 Furcellaran	25
1.6.7.4 Algin	25
1.6.7.5 Fukany.....	25
2 STANOVENÍ VLÁKNINY	27
2.1 HISTORICKÝ VÝVOJ METOD STANOVENÍ VLÁKNINY	27
2.2 METODY STANOVENÍ VLÁKNINY.....	28
2.2.1 Neenzymaticko-gravimetrické metody stanovení vlákniny	28
2.2.1.1 Stanovení vlákniny podle Henneberga a Stohmanna.....	29
2.2.1.2 Stanovení vlákniny podle Van Soesta.....	29
2.2.1.3 Stanovení vlákniny podle Mergenthalera	29
2.2.1.4 Stanovení vlákniny oxidační hydrolyzou dle Scharrera a Kürschnera. 29	
2.2.1.5 Stanovení ligninu podle Freudemberga	30
2.2.2 Enzymaticko-gravimetrické metody stanovení vlákniny	30
2.2.3 Enzymaticko-chemické metody stanovení vlákniny	30
2.2.3.1 Englyst-Cummingsova metoda.....	30
2.2.3.2 Metoda Uppsala	31
2.2.4 Semi-automatizované metody stanovení vlákniny.....	31
2.2.4.1 Stanovení vlákniny přístrojem ANKOM ²²⁰ Fiber Analyzer	31
2.2.4.2 Stanovení vlákniny přístrojem Fibertec	32
2.3 SROVNÁNÍ METOD STANOVENÍ VLÁKNINY	32
2.3.1 Korelace mezi hrubou a neutrálně-detergentní vlákninou	32

2.3.2	Revize NDF a nové trendy stanovení.....	33
3	ŘASY	34
3.1	TAXONOMIE ŘAS	34
3.2	VÝŽIVA ŘAS	35
3.3	STAVBA BUŇKY ŘAS	35
3.3.1	Buněčná stěna.....	36
3.4	MORFOLOGIE ŘAS.....	38
3.5	CHEMICKÉ SLOŽENÍ A FYZIOLOGICKÉ ÚČINKY ŘAS	38
3.6	VÝSKYT ŘAS.....	39
3.7	VYUŽITÍ ŘAS.....	40
3.8	CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH DRUHŮ SLADKOVODNÍCH ŘAS	41
3.8.1	<i>Chlorella kessleri</i>	41
3.8.2	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	42
3.8.3	<i>Spirulina platensis</i>	43
II	PRAKTICKÁ ČÁST	45
4	CÍL PRÁCE	46
5	STANOVENÍ VLÁKNINY PŘÍSTROJEM ANKOM²²⁰ FIBER ANALYZER.....	47
5.1	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	47
5.2	STANOVENÍ HRUBÉ VLÁKNINY	48
5.2.1	Princip	48
5.2.2	Chemikálie	48
5.2.3	Postup stanovení.....	48
5.3	STANOVENÍ NEUTRÁLNĚ-DETERGENTNÍ VLÁKNINY	49
5.3.1	Princip	49
5.3.2	Chemikálie	49
5.3.3	Postup stanovení.....	50
5.4	STANOVENÍ ACIDO-DETERGENTNÍ VLÁKNINY	50
5.4.1	Princip	50
5.4.2	Chemikálie	51
5.4.3	Postup stanovení.....	51
5.5	STANOVENÍ HEMICELULOS	52
5.5.1	Princip	52
5.5.2	Chemikálie	52
5.5.3	Postup stanovení.....	52
5.6	STANOVENÍ ACIDO-DETERGENTNÍHO LIGNINU	52
5.6.1	Princip	52
5.6.2	Chemikálie	52
5.6.3	Postup stanovení.....	53
5.7	VÝPOČET OBSAHU JEDNOTLIVÝCH DRUHŮ VLÁKNIN VE VZORCÍCH ŘAS	53
6	STANOVENÍ VLÁKNINY ENZYMATICKOU METODOU	55

6.1	PRINCIP	55
6.2	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	55
6.3	CHEMIKÁLIE	56
6.4	POSTUP STANOVENÍ	57
6.4.1	Stanovení nerozpustné vlákniny	57
6.4.2	Stanovení rozpustné vlákniny	57
6.4.2.1	Stanovení obsahu popela	58
6.4.2.2	Stanovení celkového obsahu dusíkatých látek	58
6.5	VÝPOČET OBSAHU VLÁKNIN VE VZORCÍCH ŘAS	59
6.5.1	Výpočet obsahu nerozpustné vlákniny	59
6.5.2	Výpočet obsahu rozpustné vlákniny	59
6.5.3	Výpočet obsahu vlákniny potravy	59
7	ANALYZOVANÉ VZORKY ŘAS	61
8	VÝSLEDKY A DISKUSE	62
8.1	OBSAHY VLÁKNIN STANOVENÉ PŘÍSTROJEM ANKOM ²²⁰ FIBER ANALYZER	62
8.1.1	Hrubá vláknina	62
8.1.2	Neutrálně-detergentní vláknina	63
8.1.3	Acido-detergentní vláknina	64
8.1.4	Hemicelulosa	65
8.1.5	Acido-detergentní lignin	67
8.2	OBSAHY VLÁKNIN STANOVENÉ ENZYMATICKOU METODOU	68
8.2.1	Nerozpustná vláknina	69
8.3	SROVNÁNÍ METOD POUŽITÝCH PRO STANOVENÍ VLÁKNINY	70
8.3.1	Srovnání obsahů vlákniny stanovených přístrojem ANKOM ²²⁰ Fiber Analyzer a enzymatickou metodou	71
8.4	SROVNÁNÍ STANOVENÝCH OBSAHŮ VLÁKNINY VE VZORCÍCH SLADKOVODNÍCH ŘAS S ÚDAJI PUBLIKOVANÝMI V LITERÁRNÍCH ZDROJÍCH	72
8.4.1	Srovnání obsahů hrubé vlákniny	72
	ZÁVĚR	74
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	83
	SEZNAM OBRÁZKŮ	85
	SEZNAM TABULEK	86

ÚVOD

Za významnou složku potravy je v současné době považována dříve opomíjená vláknina. Vláknina představuje nestravitelnou část rostlinné potravy. Je tvořena řadou chemických sloučenin, které jí dodávají specifické fyziologické, funkční a nutriční vlastnosti. Podle rozpustnosti ve vodě se vláknina dělí na nerozpustnou (celulosa, části hemicelulos, lignin) a rozpustnou (pektiny, gumy, slizy). Vyvážený příjem vlákniny má na organismus člověka pozitivní vliv a může sehrávat významnou úlohu v prevenci civilizačních chorob. Vláknina se vyskytuje přirozeně ve všech rostlinách a je dostupná ve stravě lidí prostřednictvím řady potravinářských surovin a výrobků. Mezi nejbohatší zdroje vlákniny patří ovoce, zelenina, luštěniny, celozrnné mlýnské a pekárenské výrobky, brambory. Vláknina je ve značném množství obsažena také v řasách.

Četné druhy řas se využívají jako nízkokalorické potraviny. Z živin jsou v řasách nejvíce zastoupeny bílkoviny, dále sacharidy, zatímco lipidy se vyskytují pouze v nízkých koncentracích. Řasy jsou nutričně cenné také z hlediska obsahu řady minerálních látek, stopových prvků a vitaminů. Konzumace řas příznivě ovlivňuje lidské zdraví. V řasách byly zjištěny biologicky aktivní látky, které vykazují antikancerogenní, hepatoprotektivní, protizánětlivé, antivirové a antioxidační účinky. Ze sladkovodních řas se vyrábějí především doplňky stravy, léčiva, krmiva a kosmetické přípravky. Některé druhy řas se používají k čištění odpadních vod nebo mohou sloužit i jako testovací organismy v genetice, toxikologii, alergologii atd.

Metody pro analýzu vlákniny se stále zdokonalují a při výběru metody je nutné brát v úvahu účel stanovení, složení výrobku, vybavení laboratoře, finanční a časovou náročnost. Vlastní stanovení vlákniny bylo provedeno přístrojem ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer a enzymatickou metodou ve vybraných druzích sladkovodních řas. Některé řasy jsou běžně dostupné v prodejnách zdravé výživy, kde jsou nabízeny jako doplňky stravy nejčastěji v podobě tablet a vloček.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VLÁKNINA

1.1 Definice vlákniny

Již po desetiletí jsou celosvětově vedeny diskuse ohledně definice vlákniny. Prvotní definice vycházely pouze z fyziologického působení vlákniny v trávicím systému člověka [1]. Termín „vláknina potravy“ poprvé užil v roce 1953 Hipsley pro nevyužitelné sacharidy rostlinného původu netrávené a neresorbované v horní části lidského trávicího ústrojí (tj. v žaludku a tenkém střevě). Trowellova definice z roku 1972 pod pojmem vláknina potravy zahrnuje zbytky rostlinné buněčné stěny neštěpitelné lidskými trávicími enzymy [1, 2]. Tato definice byla později rozšířena o nestravitelné polysacharidy, jako jsou např. gummy, slizy, modifikované celulosy, oligosacharidy a pektiny. Postupně vznikaly další definice vlákniny potravy, které zohledňovaly její fyziologický význam nebo analytické postupy stanovení specifickými metodami [1].

V současnosti nejvíce preferovanou definici vlákniny potravy navrhla v roce 2000 AACC (American Association of Cereal Chemists). Tato definice vymezuje složky vlákniny potravy a její metabolické a fyziologické účinky. „Vlákninu potravy tvoří jedlé části rostlin nebo analogické sacharidy, které jsou rezistentní k trávení a absorpci v tenkém střevě člověka, přičemž v tlustém střevě dochází k jejich úplné nebo částečné fermentaci. Vláknina potravy obsahuje polysacharidy, oligosacharidy, lignin a doprovodné rostlinné látky. Podporuje prospěšné fyziologické účinky, např. laxativní, snižování cholesterolu a glukosy v krvi“ [3].

Složky vlákniny potravy byly dle AACC definovány následovně:

- ***neškrobové polysacharidy a rezistentní oligosacharidy*** – celulosa, hemicelulosa, arabinoxylany, arabinogalaktany, polyfruktosany, inulin, oligofruktany, galaktooligosacharidy, gummy, slizy, pektiny,
- ***analogické sacharidy*** – nestravitelné dextriny, rezistentní maltodextriny (z kukuřice a jiných zdrojů), rezistentní dextriny brambor, syntetické sloučeniny sacharidů, polydextrosa, metylcelulosa, hydroxypropylmethylcelulosa, nestravitelný škrob,
- ***složky ligninu doprovázející neškrobové polysacharidy a komplexy ligninu v rostlinách*** – vosky, fytáty, kutin, saponiny, suberin, taniny [4].

Definice vlákniny, nutná k provádění řady předpisů Evropským společenstvím, je stanovena směrnicí 2008/100/ES, kterou se mění směrnice 90/496/EHS o nutričním označování potravin, pokud jde o doporučené denní dávky, převodní faktory pro energetickou hodnotu a definice. Směrnice 2008/100/ES byla zahrnuta do Sbírký zákonů ČR ve vyhlášce č. 330/2009. „Vlákninou se rozumí uhlovodíkové polymery se třemi nebo více monomerními jednotkami, které nejsou tráveny ani vstřebávány v tenkém střevě lidského organismu a náleží do těchto kategorií:

- jedlé uhlovodíkové polymery přirozeně se vyskytující v přijímané potravě,
- jedlé uhlovodíkové polymery, které byly získány z potravních surovin fyzikálními, enzymatickými nebo chemickými prostředky a které mají prospěšný fyziologický účinek prokázaný obecně uznávanými vědeckými poznatky,
- jedlé uhlovodíkové polymery, které mají prospěšný fyziologický účinek prokázaný obecně uznávanými vědeckými poznatky.“

Ve směrnici 2008/100/ES jsou zahrnuty další požadavky na vlákninu. „Vláknina je tradičně konzumována ve formě rostlinného materiálu a má jeden nebo více prospěšných fyziologických účinků: například zkracuje dobu průchodu tráveniny střevy, zvyšuje objem stolice, je zkvasitelná mikroflórou tlustého střeva, snižuje celkový krevní cholesterol, snižuje krevní hladiny LDL cholesterolu, snižuje postprandiální krevní glukosu nebo snižuje hladiny krevního inzulinu. Uhlovodíkové polymery rostlinného původu, které vyhovují definici vlákniny, mohou být v rostlinách úzce svázány s ligninem nebo dalšími složkami, které nejsou na bázi uhlovodíků, např. fenolovými sloučeninami, vosky, saponiny, fytasami, kutinem, fytosteroly. Tyto látky, jsou-li úzce svázány s uhlovodíkovými polymery rostlinného původu a extrahovány při analýze vlákniny s těmito uhlovodíkovými polymery, lze považovat za vlákninu. Jsou-li však tyto látky od uhlovodíkových polymerů odděleny, za vlákninu by být považovány neměly“ [5, 6].

V literatuře bývá pojem „vláknina“ vyjádřen různými termíny. Často se pro formulaci vlákniny využívají názvy, které jsou uvedeny v Tab. 1. V České republice se odborníci na výživu přiklánějí k termínu „vláknina potravy“ pro jeho univerzálnost a relativně dobrou definovatelnost [7].

Tab. 1. Termíny používané pro vlákninu [7]

Anglický název	Anglická zkratka	Český překlad
crude fiber	CF	hrubá vláknina
dietary fiber	DF	vláknina potravy
plant fiber	PF	rostlinná vláknina
fiber	-	vláknina
nonpurified plant fiber	NPPF	surová rostlinná vláknina
purified plant fiber	PPF	čistá rostlinná vláknina
nonnutritive natural fiber	-	nevýživová přirozená vláknina
nonnutritive syntetic fiber	-	nevýživová syntetická vláknina
undigestible carbohydrate	UC	nestravitelné sacharidy
plantix	PX	plantix (celulosa, hemicelulosa, slizy, pektiny, gumy a lignin)
complantix	CCX	complantix (plantix doplněný o případné nestravitelné složky buněčných stěn, mezi které patří i některé nerostné látky)
partially digestible plant polymer	PDPP	částečně stravitelné rostlinné polymery
partially digestible biopolymer	PDB	částečně stravitelné biopolymery

1.2 Typy vláknin a jejich vlastnosti

Ke společným vlastnostem všech typů vláknin patří:

- odolnost k hydrolýze trávicími enzymy,
- schopnost postoupit do tlustého střeva ve formě, ve které se konzumovaly,
- schopnost ovlivňovat některé gastrointestinální funkce (GI-funkce).

Strukturální odlišnost jednotlivých typů vláknin se projevuje těmito vlastnostmi: některé jsou rozpustné, jiné nerozpustné, jsou viskosní a tvoří gel, mají různou schopnost vázat vodu (nebo vodu nevážou), hydrolyzují se a metabolizují mikroflóru tlustého střeva, vážou organické molekuly (např. žlučové kyseliny) nebo ionty, ovlivňují gastrointestinální, ale i systemické fyziologické funkce (lipidy, cholesterol). Na základě těchto rozdílných vlastností lze vlákniny dělit na dvě podskupiny, a to:

- vlákninu nerozpustnou,
- vlákninu rozpustnou.

1.2.1 Nerozpustná vláknina

Nerozpustnou vlákninu lze označit za vlákninu neviskosní a nefermentovatelnou. Reguluje pouze GI-funkce. Zkracuje průchod intestinálním traktem, zvyšuje hmotu výkalů, významně neovlivňuje metabolismus sacharidů nebo lipidů, nemá vliv na intraluminální pH, může vést ke zbytnění střevní mukosy. Účinků nerozpustné vlákniny se využívá při úpravě zácpy [8]. Nerozpustnou vlákninu tvoří hlavně celuloza, lignin a některé části hemicelulos [9].

1.2.2 Rozpustná vláknina

Rozpustná vláknina bývá taktéž nazývána vlákninou viskosní či fermentovatelnou. Reguluje jak funkce GI-traktu, tak i funkce s ním související. Oddaluje vyprazdňování žaludku, zpomaluje nebo snižuje absorpci glukosy, snižuje intraluminální pH, působí na změnu složení mikroflóry v trakčníku, je hypocholesterolemická, má vliv na zbytnění střevní mukosy. Je vhodná k léčbě diabetiků a obézních pacientů [8]. Mezi rozpustnou vlákninu se řadí pektiny, gumy a slizy [9].

1.3 Účinky vlákniny na lidský organismus

Zdravotní význam vlákniny potravy byl zaznamenán v 70. letech minulého století na základě porovnávání zhoršeného zdravotního stavu obyvatelstva vyspělých zemí (u kterého převládala strava s nižším obsahem vlákniny) s obyvatelstvem rozvojových zemí (s nižším výskytem některých civilizačních onemocnění, ale stravou bohatou na vlákninu). Zájem o problematiku vlákniny pokračoval a rozšířil se po celém světě. Vláknina potravy tak získala důležité místo mezi složkami potravin, které podporují zdraví. Její význam ve výživě člověka je i v současnosti často diskutovaným tématem a spočívá především v její ochranné funkci před civilizačními nemocemi jako obezita, cukrovka II. typu, chronická zácpa, rakovina, ischemická choroba srdeční a další.

Přestože vláknina poskytuje organismu velmi malé množství energie, působí na něj v mnoha ohledech příznivě:

- snižuje hladinu cholesterolu v krvi, jednoho z hlavních rizikových faktorů srdečně-cévních onemocnění,

- zpomaluje vstřebávání cukru do krve, pomáhá diabetikům udržovat si stabilnější hladiny cukru v krvi,
- urychluje průchod trávené potravy, tudíž je stěna střeva vystavena kratší dobu působení případných škodlivých složek potravy a zplodin látkové přeměny (prevence vzniku rakoviny tlustého střeva, prsu, prostaty),
- pomáhá bojovat proti obezitě, má využití při redukčních dietách, váže vodu, tím se její objem zvětšuje a vyvolává pocit sytosti,
- je účinným prostředkem pro lidi trpících na zácpu, hemoroidy, žlučnickové obtíže,
- snižuje riziko vstřebávání různých látek ze střeva, a tak může v mnohých případech snižovat riziko absorpce nežádoucích látek,
- je považována za prebiotikum, neboť tvoří část živné půdy pro probiotické mikroorganismy.

Nadměrný příjem vlákniny může působit na lidský organismus nepříznivě. Strava s vysokým obsahem vlákniny vyvolává u některých jedinců pocit nafouklosti, bolesti břicha či průjmů. Tyto účinky bývají většinou přechodné a objevují se na počátku diety s vyšším obsahem vlákniny a postupně ustupují [10]. V souvislosti s konzumací velkého množství vlákniny byla prokázána také horší resorpce některých minerálních látek. Nepředpokládá se však, že by se za fyziologických okolností mohl tento vliv, i při doporučeném zvýšení vlákniny v dietě našeho typu, uplatnit a vyvolávat nebo zhoršovat deficity minerálních látek [2]. Za rizikový se považuje příjem vlákniny vyšší než 60 g za den [10].

1.4 Doporučený příjem vlákniny

Stanovení jednoznačného doporučení pro denní příjem vlákniny je problematické, neboť je vláknina komplexem různých složek, které plní rozličné funkce a většinou jsou vzájemně nezastupitelné. Doporučení se také liší z důvodu použití rozdílných analytických metod pro stanovení vlákniny. Pro státy Evropské unie bylo v rámci projektu *Dietary fibre intakes in Europe* stanoveno doporučení v rozpětí 21 – 25,3 g vlákniny za den. V České republice existuje doporučení uvedené ve výživových doporučeních publikovaných v roce 2005, a to na úrovni 25 – 30 g vlákniny za den. Konzumace vlákniny u nás se však odhaduje na pouhých 10 – 15 g za den. Doporučený poměr rozpustné a nerozpustné

vlákniny je 3:1 [11]. Dle *Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA)* je pro normální fungování střev adekvátní příjem vlákniny 25 g za den [12].

1.5 Zdroje vlákniny

Vláknina se vyskytuje přirozeně ve všech rostlinách a je dostupná ve stravě lidí prostřednictvím řady potravinářských surovin a výrobků. Na její obsah v surovinách mohou mít vliv faktory jako typ půdy, klima, odrůda rostlin, doba skladování apod. [7].

Hlavním zdrojem nerozpustné vlákniny jsou především obiloviny, celozrnné pekárenské výrobky (chléb, pečivo, těstoviny, ovesné vločky). Nerozpustná vláknina je obsažena také ve slupkách jablek, hrušek, hroznů, brambor apod. Rozpustná vláknina se nachází zejména v ovoci a zelenině: v citrusových plodech, banánech, jablkách, hruškách, rybízu, šípčích, kopru, mrkvi, kapustě aj. V podobě rostlinných gum se vyskytuje ve fazoli, bobu, ovsu a ječmeni. Slizy jsou obsaženy v semenech lnu, mořských řasách a houbách. Mezi další zdroje vlákniny patří hrách, sója, čočka, ořechy, mák, sušené ovoce [10].

Zastoupení vlákniny potravy, nerozpustné a rozpustné vlákniny ve vybraných potravinách je uvedeno v Tab. 2.

Tab. 2. Obsah vlákniny ve vybraných potravinách [7]

Zdroje vlákniny	Vláknina (g/100 g potravy)		
	<i>vláknina potravy</i>	<i>nerozpustná vláknina</i>	<i>rozpustná vláknina</i>
kukuřičné otruby	89,0	66,0	23,0
ovesné otruby	30,4	15,3	15,1
celozrnná žitná mouka	15,6	12,0	3,6
celozrnná pšeničná mouka	11,8	9,5	2,3
hrášek zelený	11,5	6,2	5,3
fazole vařené	11,5	6,6	4,9
meruňky sušené nevařené	9,6	8,5	1,1
maliny čerstvé	4,9	4,7	0,2
špenát vařený	3,7	1,9	1,8
brambory syrové	3,5	2,6	0,9
cibule syrová	1,4	0,8	0,6

Na trhu jsou běžně dostupné také koncentráty vlákniny, kterými je možno obohacovat pokrmu, které se vyznačují nízkým obsahem vlákniny. Tyto koncentráty se vyrábějí například ze zbytků jablek po odlisování šťávy nebo z řepných řízků [13]. Výhodnější je přijímat vlákninu jako součást běžných potravin, tedy ovoce, zeleniny a celozrnných výrobků, než v potravinách obohacených izolovanou vlákninou a ve formě potravních doplňků. V přirozených potravinách je zřejmě vláknina součástí komplexu řady látek, jejichž příznivé účinky se vzájemně doplňují a zesilují [14].

Tepelné úpravy a zpracování (vaření, dušení, pečení, extruze, sterilace aj.) potravin rostlinného původu mohou v závislosti na druhu potraviny, množství přítomné vody, kyselosti a slanosti prostředí, teplotě a době, obsahy některých složek vlákniny snížit, ale i zvýšit. Ke snížení dochází v důsledku částečného štěpení složitých molekul na jednodušší a z toho plynoucí zvýšení rozpustnosti některých složek vlákniny, např. pektinových látek a hemicelulos. Změny v poměrném zastoupení jednotlivých složek vlákniny mohou mít příčinu v jejich uvolňování z vázaných forem (např. ligninu z lignocelulos). Ke zdánlivému zvýšení obsahu vlákniny v tepelně upravovaných (zejména pečených) potravinách přispívají různé produkty, které při takových úpravách vznikají a mohou mít podobné vlastnosti jako přirozená vláknina (např. produkty neenzymového hnědnutí, retrogradovaný škrob apod.). Celkově jsou změny obsahu a složení vlákniny způsobené průmyslovými a kuchyňskými úpravami potravin rostlinného původu většinou malé a z hlediska předpokládaných fyziologických účinků vlákniny nevýznamné [7].

1.6 Složky vlákniny vyskytující se v řasách

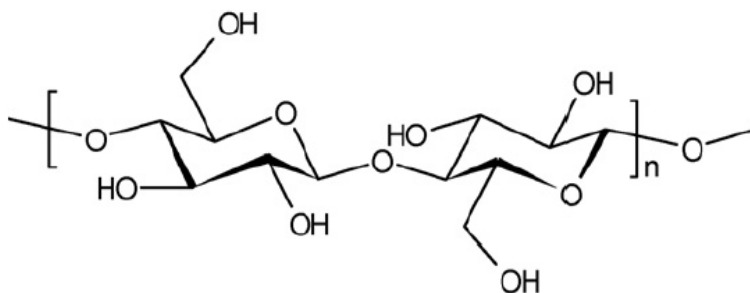
1.6.1 Celulosa

Celulosa je základním strukturním polysacharidem buněčných stěn vyšších rostlin. Je možno ji nalézt i v houbách a zelených řasách. Obsahuje přes polovinu veškerého uhlíku v biosféře. Jedná se o lineární polymer obsahující až 15 000 D-glukosových zbytků spojených $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidovými vazbami. Každá z vázaných glukosových jednotek v řetězci je otočena vzhledem k předchozí a v této poloze je udržována intramolekulárními vodíkovými vazbami. Částečnou hydrolýzou celulosy vzniká směs disacharidů, trisacharidů a tetrasacharidů, z nichž asi 50 % tvoří disacharid cellobiosa,

kteřá je pokládána za stavební jednotku celulosy. Totální kyselou hydrolyzou se štěpí až na D-glukosu [15].

Molekuly celulosy jsou vedle sebe uloženy ve vláknitém uspořádání, vykazují krystalickou strukturu. Patří k soustavě monoklinické, menší podíl je amorfní. Krystalické mikrofibrily celulosy jsou uloženy v amorfním gelu, složeném hlavně z hemicelulos a pektinových látek s malým množstvím bílkovin. Vláknité uspořádání molekul celulosy umožňuje tvorbu molekulárních vodíkových vazeb a dodává celulosovým vláknům pevnost a elasticnost.

Průmyslově se celuloza získává z bavlníkových semen, ze dřeva a slámy. Surová bavlna obsahuje 85 – 90 % celulosy, ve dřevě se její množství pohybuje v rozmezí 40 – 60 % a ve slámě tvoří přibližně 30 %. Je významnou surovinou pro výrobu vaty, papíru, textilu atd. [16]. V potravinářském průmyslu se používají různé deriváty celulosy, které slouží jako zahušťovadla a stabilizátory emulzí [17].



Obr. 1. Struktura celulosy [18]

1.6.2 Hemicelulosy

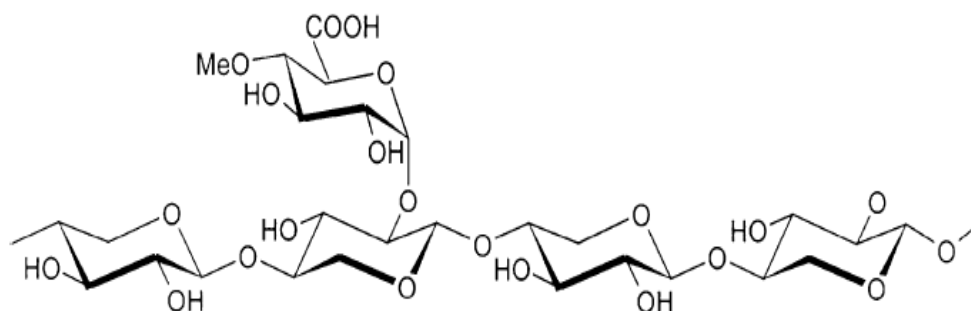
Hemicelulosy jsou biopolymerní sloučeniny, které jsou řazeny mezi polysacharidy buněčných stěn rostlin. Tvoří cca 20 – 35 % lignocelulosového komplexu. Po chemické stránce se jedná o heterogenní polymerní sloučeniny. Jejich složení závisí na druhu přírodního materiálu, ve kterém jsou obsaženy. Mohou být tvořeny pentosami (xylosa, arabinosa), hexosami (mannosa, glukosa, galaktosa) a cukernými kyselinami.

Mezi nejhojněji zastoupené hemicelulosy patří xylany. Hlavní řetězec xylanů je tvořen jednotkami D-xylopyranosy, které jsou vázány $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidovými vazbami. Kromě xylosy mohou obsahovat arabinosu, glukuronovou kyselinu nebo její 4-O-metyléter a kyseliny: octovou, ferulovou a p-kumarovou [19]. Další skupiny hemicelulos tvoří mannany, β -glukany a xyloglukany [20].

Hemicelulosity zaujímají v rostlinách různé funkce. Některé vytvářejí, podobně jako celulóza, kostru buněčné stěny nebo jsou součástí amorfnní hmoty. Jiné slouží jako rezervní polysacharidy v semenech rostlin [21].

Bohatým zdrojem hemicelulos jsou vedlejší potravinářské produkty jako mláto, pšeničné otruby a řepné řízky [16].

V potravinářství se hemicelulosity využívají například jako látky zlepšující technologické vlastnosti škrobu [17].



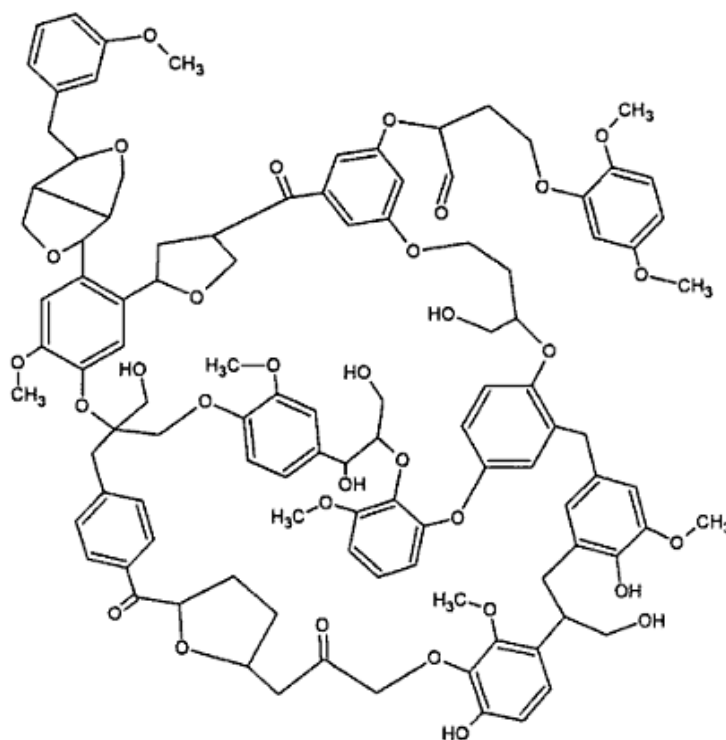
Obr. 2. Primární struktura 4-O-metyl-D-glukurono-D-xylanu [20]

1.6.3 Lignin

Lignin je polymer vyztužující a zpevňující buněčné stěny rostlin. Je součástí matrice, v níž jsou uloženy celulosové fibrily. Chemicky není přesně definován, jeho složení se různí podle rostlinného druhu [22]. Vznik ligninu je obvykle přisuzován dehydrogenační polymeraci p-kumarylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapylalkoholu. Z těchto prekurzorů mohou vzniknout různé typy ligninových jednotek (hydroxyfenylpropanová, guaiacylpropanová, syringylpropanová), které jsou vázány éterovými vazbami (C-O-C) nebo vazbami mezi dvěma atomy uhlíku (C-C). Prekurzory se spojují různými mechanismy v několika místech za tvorby rozvětvené polymerní sítě.

Lignin se vyskytuje v cévnatých rostlinách, kterým poskytuje mechanickou oporu. Zvyšuje nepropustnost buněčných stěn rostlin a chrání rostliny před patogeny [23]. Ve dřevě jehličnanů je obsaženo až 50 % ligninu.

Lignocelulosové materiály jsou významnými surovinami pro biotechnologické účely (např. výroba etanolu) [22]. Lignin je v malém množství přítomen v lihovinách zrajících v dubových sudech [15].



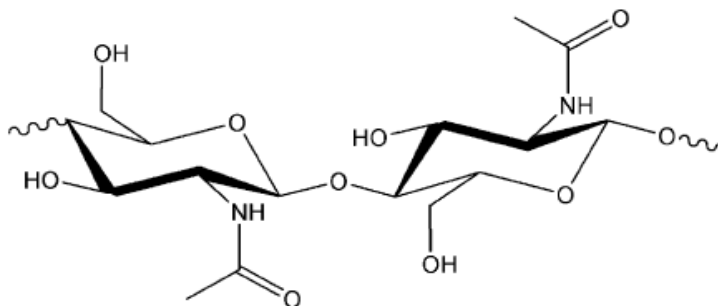
Obr. 3. Struktura ligninu [24]

1.6.4 Chitin

Chitin je strukturální polysacharid, ve kterém se váží navzájem převážně N-acetyl- β -D-glukosamin a β -D-glukosamin $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidovou vazbou. U některých druhů organismů mohou být stavebními jednotkami jiné deriváty D-glukosaminů. Za základní stavební jednotku chitinu se obecně považuje disacharid chitobiosa.

V přírodě je chitin po celulóse druhou nejčastěji se vyskytující sloučeninou [15]. Nachází se zejména v krovkách hmyzu, krunýřích koryšů, ale i v buněčných stěnách hub, plísní a hnědých řas. Má především stavební a ochrannou funkci [15, 25].

Využití chitinu prochází v posledních letech velkým vývojem. Důvodem je snadno dostupná surovina, tj. průmyslové pěstování hub a lov mořských živočichů. Chitin a jeho deriváty jsou připravovány a využívány podobně jako regenerovaná celulóza a její deriváty. Průmyslovým zpracováním chitinu ve farmacii, potravinářském a textilním průmyslu se zabývají především v Japonsku [16].



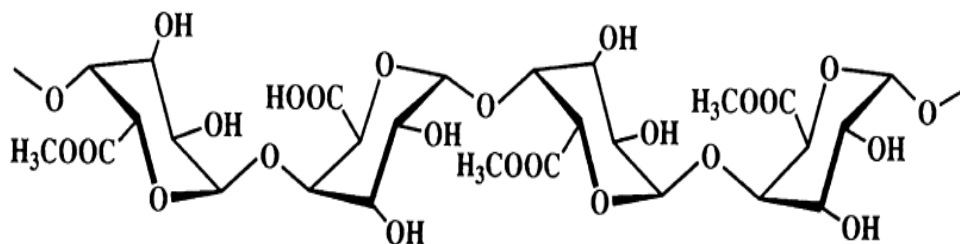
Obr. 4. Struktura chitinu [26]

1.6.5 Pektiny

Pektiny představují skupinu strukturních polysacharidů proměnlivého složení, jejichž základem je řetězec 25 – 100 jednotek kyseliny D-galakturonové, částečně esterifikované metanolem. Volné karboxyly kyseliny D-galakturonové mohou být neutralizovány kationty, především vápenatými. V různé míře jsou však přítomny i další složky, proto se někdy používá souhrnné označení „pektinové látky“. Pektiny vznikají v rostlinách především v raných fázích růstu a jsou uloženy zejména ve střední lamelle. Značný obsah je v nezralých plodech a zdužnatělých kořenech (řepa, mrkev), kde zajišťují mechanickou tuhost. Komplex pektinů s celulosou se označuje jako protopektin. V období zrání se pektiny postupně odbourávají působením příslušných pektolytických enzymů a plody měknou [27]. Obsah pektinu v ovoci a zelenině se většinou pohybuje v mezích 0,2 – 1,5 %.

Kromě obecných účinků vlákniny jsou pektiny prospěšné tím, že z alkalického střevního obsahu dosti pevně vážou toxické kovové ionty, a to úměrně počtu neesterifikovaných karboxylových skupin [28].

Pektin se uplatňuje v konzervářském průmyslu jako rosotvorná složka při výrobě pomazánek (džemy, marmelády, rosoly). Přidává se v práškovité nebo tekuté podobě, vyrábí se z jablečných výlisků nebo albeda citrusových plodů [27, 29].



Obr. 5. Struktura pektinu [30]

1.6.6 Rostlinné gummy a slizy

Rostlinné gummy (klovatiny) jsou lepivé šťávy, které vytékají z pletiv při napadení mikroorganismy nebo při poranění. Na vzduchu tuhnou v pevné, gumovité hmoty. Jako slizy bývají označeny slizké sekundární metabolity rostlin, které se vyskytují v plodech a semenech. Gummy i slizy jsou tzv. kyselé polysacharidy. Jsou tvořeny nejčastěji z arabinosy, galaktosy a rhamnosy, dále mohou obsahovat glukuronovou a galakturonovou kyselinu, xylosu, fruktosu a mannosu [31]. Rostlinné gummy a slizy jsou značně polydisperzní, větvené, neuniformní struktury. Řadí se mezi hydrokoloidy, i když se v případě nízkomolekulárních frakcí jedná o pravé roztoky. Disperze nebo roztoky jsou viskosní, v některých případech také mohou vznikat gely [32].

V potravinářství se rostlinné gummy využívají jako složky poutající vodu. Mezi nejběžnější patří arabská guma, tragant a karaja.

Některé slizy mají uplatnění jako léčiva, přísady do polévek a omáček [27, 31].

1.6.7 Polysacharidy mořských řas

1.6.7.1 Agary

Agary tvoří intracelulární gelovou matici řady druhů červených mořských řas, které zastávají v řasách obdobnou funkci jako celuloza u vyšších rostlin. Řasy pocházejí nejčastěji z čeledí *Gelidaceae*, *Gracilariaceae* a *Pterocladaceae*. Základními stavebními jednotkami agarů jsou β -D-galaktopyranosa a 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranosa střídavě vázané glykosidovými vazbami (1 \rightarrow 3) a (1 \rightarrow 4) [32]. Agary se získávají z řas nejčastěji extrakcí horkou vodou. Vymražením vzniknou gely, které se suší.

Agary se používají do pekařských výrobků, při výrobě džemů a želé, cukrářských, mléčných, masových, rybích výrobků a při výrobě nápojů [31].

1.6.7.2 Karagenany

Karagenany jsou extrakty z červených mořských řas, zejména řas rodů *Euchema*, *Chondrus* a *Gigantina*. Základem struktury karagenanů je opakující se sekvence β -D-galaktopyranosy a 3,6-anhydro- α -D-galaktopyranosy. Karagenany se z řas extrahují horkou vodou v alkalickém prostředí jako sodné soli. Okyselením se získávají příslušné kyselé

karagenany. Finální materiály vzniknou sušením nebo srážením rozpouštědly [32]. Jejich důležitou vlastností je schopnost tvorby komplexů s mléčnými bílkoviny.

Používají se jako zahušňovadla, gelotvorné látky, stabilizátory a emulgátory při výrobě mléčných dezertů, nápojů, zmrzlin a masových konzerv [31].

1.6.7.3 *Furcellaran*

Furcellaran se získává hlavně z červených řas rodu *Furcellaria*. Jedná se o sulfátovaný polysacharid tvořený jednotkami D-galaktosy, 3,6-anhydro-D-galaktosy a jejich sulfáty. Je rozpustný v teplé vodě, tvoří jemné, pružné a termoreverzibilní gely.

Používá se při výrobě pudिंगů a mléčných dezertů [32].

1.6.7.4 *Algin*

Algin je název pro alginovou kyselinu a její soli algináty. Nachází se jako intercelulární matrice v hnědých mořských řasách. Hlavními průmyslovými zdroji jsou řasy *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea* a řasy rodů *Ascophyllum* a *Sargassum*. Algináty jsou nevětvené lineární kopolymery β -D-mannuronové kyseliny a α -L-guluronové kyseliny spojené glykosidovými vazbami (1 \rightarrow 4) [32].

Sodná sůl (alginát) se používá jako zahušňovadlo, stabilizátor a emulgátor pro zlepšení konzistence pečiva, omáček, dressingů, zmrzlin, ovocných džusů. Gelotvorných vlastností se využívá při výrobě ovocných a dezertních želé, pudिंगů a rekonstituovaného ovoce z ovocných dření (např. alginátové třešně) [31].

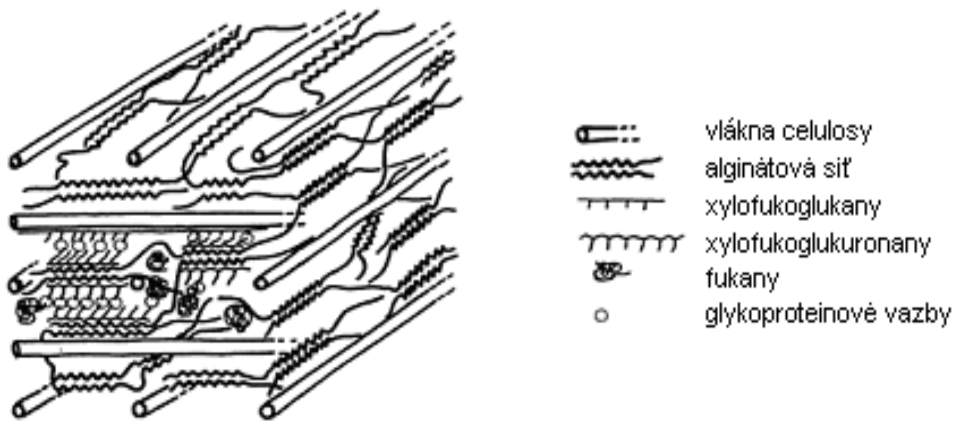
1.6.7.5 *Fukany*

Fukany se řadí k polysacharidům buněčných stěn hnědých mořských řas. Jsou tvořeny převážně jednotkami L-fukosy, které mohou být do různé míry esterifikovány kyselinou sírovou. U některých druhů řas jsou přítomny také další sloučeniny jako galaktosa, glukosa, mannosy, xylosy a kyselina glukuronová.

Fukany vykazují širokou škálu biologické aktivity. Mají antikoagulační, antioxidační, antitrombotické a antivirové účinky [33].

V buněčných stěnách hnědých řas fukany doprovázejí celulosu a algináty [34].

Na Obr. 6 jsou znázorněny fibrilární složky a komponenty matrix buněčné stěny hnědých řas.



Obr. 6. Struktura buněčné stěny hnědých řas [35]

2 STANOVENÍ VLÁKNINY

2.1 Historický vývoj metod stanovení vlákniny

První filozofií určující vývoj metod stanovení vlákniny se stala představa, že lze relativně jednoduchým fyzikálně-chemickým procesem oddělit od sebe složku nestavitelnou od složky stravitelné. První pokusy stanovit vlákninu se objevují již začátkem 19. století:

- H. EINHOF (1806): kyselá a zásaditá hydrolyza,
- H. DAVY (1814): var ve vodě a alkoholu,
- SPRENGEL (1832): hydrolyza kyselinou, louhem a chlorovou vodou,
- SCHULZE (1857): oxidační hydrolyza v prostředí kyseliny dusičné a chlorečnanu draselného,
- W. HENNEBERG, F. STOHMANN (1860): dvoustupňová hydrolyza ve slabě kyselém a slabě zásaditém prostředí \Rightarrow „hrubá vláknina“ (CF),
- K. SCHARRER, K. KÜRSCHNER (1931): oxidační hydrolyza (směs kyselin octové, dusičné a trichloroctové),
- R. D. WILLIAMS, W. D. OLMSTED (1935): využití enzymů - odstranění škrobu a proteinu pankreatinem, kyselá hydrolyza a stanovení cukerných frakcí,
- P. J. VAN SOEST a kol. (1963):
 - mírná hydrolyza za varu v pufovaném neutrálním roztoku detergentu laurylsulfátu sodného \Rightarrow „neutrálně-detergentní vláknina“ (NDF),
 - kyselá hydrolyza v prostředí detergentu (cetyltrimethylamonium bromid v roztoku kyseliny sírové) \Rightarrow „acido-detergentní vláknina“ (ADF),
 - hydrolyza zbytku buněčných stěn po stanovení ADF 72% kyselinou sírovou za studena \Rightarrow „acido-detergentní lignin“ (ADL),
- K. NEHRING (1968): frakcionace strukturálních polysacharidů různými rozpouštědly,
- D. A. T. SOUTHGATE (1969): frakcionace strukturálních a nestrukturálních polysacharidů,
- O. THEANDER, P. AMAN (1982): stanovení strukturálních monosacharidů plynovou chromatografií,

- HELLENDOR, IZRAELSEN, KELNER, KIRCHGESSNER (70. léta 20. století): hydrolyza proteinu pepsinem, hydrolyza škrobu pankreatinem, hydrolyza celulosy enzymem celulasa, využití α -amylasy,
- L. PROSKY a kol. (1984): stanovení vlákniny v potravinách - enzymatická metoda: stanovení „vlákniny potravy“ (TDF) - rozpuštění jednoduchých sacharidů 78% etylalkoholem, odstranění škrobu pomocí α -amylasy a amyloglukosidasy, odstranění proteinu pomocí proteasy. TDF zahrnuje nerozpustné i rozpustné složky vlákniny [36, 37].

2.2 Metody stanovení vlákniny

Neexistuje ideální metoda, která by vyhovovala definici vlákniny, poskytovala komplexní kvantitativní i kvalitativní výsledky a současně byla rychlá, levná a jednoduchá. Metody analýzy se stále zdokonalují a při výběru metody je nutné brát v úvahu účel stanovení, složení výrobku, vybavení laboratoře, finanční a časovou náročnost atd. Pro běžná stanovení byly vypracovány tři základní skupiny metod:

- neenzymaticko-gravimetrické,
- enzymaticko-gravimetrické,
- enzymaticko-chemické, které zahrnují:
 - enzymaticko-kolorimetrické,
 - enzymaticko-chromatografické (GLC/HPLC) [10, 38].

2.2.1 Neenzymaticko-gravimetrické metody stanovení vlákniny

Neenzymaticko-gravimetrické metody zahrnují především metodu stanovení vlákniny podle Henneberga a Stohmanna, která kvantifikuje hrubou vlákninu a Van Soest-metodu, která je používána při stanovování jednak neutrálně-detergentní vlákniny a také acido-detergentní vlákniny [37, 38]. Vlákninu lze analyzovat gravimetricky také dalšími metodami: podle Mergenthalera, podle Scharrera a Kürschnera. Ke stanovení ligninu slouží metoda podle Freudemberga [39].

2.2.1.1 Stanovení vlákniny podle Henneberga a Stohmanna

Hrubá vláknina je stanovena jako zbytek substrátu rostlinného původu po dvoustupňové hydrolýze ve slabě kyselém prostředí kyseliny sírové a slabě zásaditém prostředí hydroxidu za přesně definovaných podmínek. Představuje zbytky stavebních složek buněčných stěn rostlin. V průměru se skládá z 20 % hemicelulos, 10 – 50 % ligninu a 50 – 90 % celulosy [37, 40]. Takto stanovená vláknina se stala základem pro tzv. Weendeský způsob hodnocení krmiva [36]. Metoda je vhodná pro stanovení vlákniny v rostlinném materiálu. V některých případech mohou výsledky ovlivnit přítomné pentosany [39].

2.2.1.2 Stanovení vlákniny podle Van Soesta

Neutrálně-detergentní vláknina představuje zbytek buněčných stěn rostlinných pletiv izolovaný po hydrolýze v prostředí roztoku pufru při pH 7 a účinné látky laurylsulfátu sodného za definovaných podmínek. Reziduum tvoří celuloza, hemicelulosy a lignin. Organicky vázaný dusík bývá v reziduu pouze ve stopových množstvích. Minerální podíl tvoří většinou jen oxid křemičitý.

Acido-detergentní vláknina je zbytek buněčných stěn rostlinných pletiv izolovaný po kyselé hydrolýze reagenční směsí cetyltrimethylamonium bromidu v roztoku kyseliny sírové za definovaných podmínek. Reziduum po eliminaci prakticky celého podílu hemicelulos tvoří lignocelulosový komplex.

Na koncepci frakcionace lignocelulosového komplexu navazuje stanovení acido-detergentního ligninu dle Van Soesta. Acido-detergentní lignin je nerozpustný zbytek po hydrolýze acido-detergentní vlákniny 72% roztokem kyseliny sírové za definovaných podmínek [37].

2.2.1.3 Stanovení vlákniny podle Mergenthalera

Principem metody je rozrušení balastních látek vzorků směsí etylenglykolu, vody a kyseliny sírové.

2.2.1.4 Stanovení vlákniny oxidační hydrolýzou dle Scharrera a Kürschnera

Působením směsi kyseliny octové, dusičné a trichloroctové se rozruší balastní látky a získá se vláknina, která se stanoví vázkově.

2.2.1.5 Stanovení ligninu podle Freudenbergova

Zředěná minerální kyselina zhydrolyzuje sacharidy, bílkoviny a ostatní součásti buněk se převedou do rozpustné formy, zatímco lignin zůstává nezměněn a stanoví se gravimetricky. Metoda je vhodná pro stanovení ligninu v rostlinných materiálech [39].

2.2.2 Enzymaticko-gravimetrické metody stanovení vlákniny

Do enzymaticko-gravimetrických metod spadají celosvětově rozšířené metody AOAC (Association of Analytical Communities), které slouží pro analýzu vlákniny potravy. Metody AOAC 985.29 a 991.43 jsou schopné stanovit polysacharidy buněčných stěn, část rezistentního škrobu, gumy, slizy a lignin.

Podstatou enzymaticko-gravimetrického stanovení vlákniny je odstranění škrobu a bílkovin ze vzorku působením trávicích enzymů: termostabilní α -amylasy, amyloglukosidasy a proteasy. Zbytek tvoří vláknina a minerální látky. Rozpustné neškrbové sacharidy (SDF – Soluble Dietary Fiber) se vysrážejí etanolem. Nerozpustná vláknina (IDF – Insoluble Dietary Fiber) se oddělí od rozpustné vlákniny filtrací a stanoví se gravimetricky. Od nerozpustného zbytku je nutno odečíst bílkoviny, které se nerozrušily působením proteasy, popel a slepý pokus. Vláknina potravy (TDF – Total Dietary Fiber) se stanoví jako součet rozpustných a nerozpustných polysacharidů [37, 41].

2.2.3 Enzymaticko-chemické metody stanovení vlákniny

Enzymaticko-chemické metody stanovení vlákniny zahrnují enzymaticko-kolorimetrické a enzymaticko-chromatografické analýzy jednotlivých složek vlákniny [41].

2.2.3.1 Englyst-Cummingsova metoda

Metoda slouží pro stanovení neškrbových polysacharidů. Škrob a proteiny jsou podrobeny enzymatické hydrolyze v roztoku dimetylsulfoxidu. Po přidavku etanolu se neškrbové polysacharidy hydrolyzují kyselinou sírovou. Neutrální sacharidy jsou analyzovány kapalinovou či plynovou chromatografií a uronové kyseliny kolorimetrickými metodami. Celkový obsah neškrbových polysacharidů je dán součtem stanoveného množství hexos, pentos a uronových kyselin [41].

2.2.3.2 *Metoda Uppsala*

Metoda Uppsala je enzymaticko-chromatografickou metodou AOAC 994.13 [42]. Slouží ke stanovení neutrálních polysacharidů, uronových kyselin, Klasonova ligninu a TDF. Škrob je hydrolyzován α -amylasou a amyloglukosidasou. Rozpustné složky vlákniny jsou vysráženy etanolem. Po kyselé hydrolyze jsou neutrální sacharidy stanoveny plynovou chromatografií, uronové kyseliny kolorimetricky a Klasonův lignin gravimetricky [43].

2.2.4 **Semi-automatizované metody stanovení vlákniny**

Semi-automatizované metody pomocí přístrojů ANKOM a Fibertec byly vyvinuty pro stanovení NDF a ADF za účelem zvýšení kapacity zpracovávaných vzorků [44].

2.2.4.1 *Stanovení vlákniny přístrojem ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer*

Metodika pro práci s přístrojem ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer (Obr. 7) vychází z normalizovaného postupu stanovení CF, NDF, ADF a ADL. Pro stanovení vlákniny se využívá technologie filtračních sáčků (FBT – Filter Bag Technology), kdy vzorek uzavřený v zataveném sáčku uvolňuje rozpuštěné látky, které odchází stěnou sáčku do roztoku a nerozpustné částice zůstávají uzavřeny uvnitř. Sáčky odolávají působení kyselin a hydroxidů, mají zanedbatelný obsah dusíku a popela, nepohlcují vlhkost [45].

Po naplnění a uzavření sáčků jsou vzorky uloženy do extrakční nádoby s refluxem přístroje ANKOM²²⁰, který zahřívá a neustále protlačuje extrakční činidlo sáčkem. Takto je možné současně zpracovat až 24 vzorků, které projdou cca 60 minutovým procesem rozpouštění a filtrace. Po této době se získají přesné a reprodukovatelné výsledky [46].



Obr. 7. ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer [47]

2.2.4.2 Stanovení vlákniny přístrojem Fibertec

Přístroje Fibertec pro stanovení vlákniny jsou vyvinuty v souladu s klasickými metodami a standardy. Mezi nejdůležitější parametry patří hrubá vláknina, detergentní vláknina a vláknina potravy.

Systémy **FibertecTM 2010** a **FibertecTM 1020 (M6)** jsou vytvořeny pro stanovení vlákniny dle Weendeho, Van Soesta a dalších uznávaných metod. Jednotlivé nebo postupné extrakce zahrnující vaření, proplachování a filtraci probíhají za reprodukovatelných podmínek. **Fibertec 2010** je poloautomatický systém využívající interně předehřívaná činidla, která jsou přidávána v uzavřeném systému, aby se minimalizoval kontakt s horkými činidly. **FibertecTM 1023 (E)** (Obr. 8) je vyvinut pro rychlou a racionální analýzu vlákniny potravy založené na schválené enzymové metodě (AOAC). Fibertec E stanovuje vlákninu potravy i rozpustnou a nerozpustnou vlákninu zvlášť. Je vhodný na přípravu vzorků pro další analýzy frakcí vlákniny (chromatografie nebo kolorimetrie) [48].



Obr. 8. FibertecTM 1023 (E) [48]

2.3 Srovnání metod stanovení vlákniny

2.3.1 Korelace mezi hrubou a neutrálně-detergentní vlákninou

Při stanovení obsahu CF a NDF u identických materiálů je často zjišťováno, že hodnoty obsahu NDF jsou vyšší. Např. u obilnin a plev, které mají vysoký obsah hemicelulos (hlavně snadněji štěpitelných pentosanů), tvoří hodnoty CF pouze 20 – 30 % obsahu NDF, u trav je to 40 – 60 % a u legumios, u kterých je menší obsah hemicelulos a rozpustnost ligninu v alkáliích je také nízká, je to 60 – 80 %. Přesnost korelace mezi CF a NDF

různých typů rostlinných materiálů je tedy závislá hlavně na podílu hemicelulos a ligninu v jejich buněčné stěně.

CF má nízkou vypovídající schopnost o kvalitě vlákniny. Příčinou jsou ztráty některých nestravitelných komponent, např. rozpustnost ligninu v alkáliích. Tyto deficity se výrazně liší dle typu a druhu rostliny. U hemicelulos mohou dosahovat až 85 %, u celulosy 50 % a u ligninu dokonce 90 %. Produktem klasické metody stanovení vlákniny je tudíž směs strukturálních polysacharidů s velmi variabilním složením. V moderních systémech hodnocení krmiv je stále méně používána a je nahrazována NDF. Hodnota NDF v sobě zahrnuje všechny tři složky nerozpustné vlákniny, které jsou díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem (nerozpustnost ve vodě, stabilita v neutrálním prostředí) zachycovány téměř kvantitativně.

2.3.2 Revize NDF a nové trendy stanovení

Stanovení NDF bylo podrobena rozsáhlým srovnávacím testům, včetně ověření pomocí moderních instrumentálně náročných metod.

Při srovnání s enzymatickými metodami vykazovalo stanovení NDF hlavně u škrobnatých materiálů vyšší hodnoty. Příčinou byl reziduální škrob, který se při standardním postupu z vlákninového komplexu neodstranil. Na odbourání škrobu byla odzkoušena teplotně stabilní α -amylasa používaná v enzymatické metodě. Na podkladě těchto ověření bylo použití α -amylasy zapracováno do metody pro stanovení NDF. Bylo zjištěno, že lze α -amylasu použít i v případě jiných než vyloženě škrobnatých materiálů. Pro obzvláště problematické materiály byla vyvinuta další modifikace, ve které se účinnost α -amylasy zvyšuje přidávkem 8 M močoviny před vlastním stanovením [36].

Velmi efektivní stanovení NDF v současnosti nabízejí semi-automatizované metody pomocí přístrojů ANKOM a Fibertec [47, 48].

3 ŘASY

Jako řasy jsou souhrnně označovány morfologicky velmi různorodé organismy. Nepředstavují přirozenou fylogenetickou skupinu, ale pravděpodobně se jedná o samostatné vývojové větve, které se vyvíjely souběžně. Řasy jsou autotrofní, jednobuněčné až mnohobuněčné nižší rostliny, u nichž nedošlo k diferenciaci pletiv. Tělo mnohobuněčných řas je nazýváno stélkou (thallus), u dokonalejších druhů je stélka rozlišena na přichytná vlákénka (rhizoidy), stonek (kauloid) a lístky (fyloidy) [49].

3.1 Taxonomie řas

Řasy, latinsky **Algae**, řecky **Phykos**, představují skupinu, která nehledě na současné systematické zařazení do čtyř říší, má řadu podobných vlastností jako biotická skupina. Studium řas se zabývá algologie, často též nazývána fykologie. V české odborné literatuře se používá spojení „sinice a řasy“, což ukazuje na rozdíl mezi prokaryotními sinicemi a eukaryotními řasami [50]. Člení se do několika oddělení, která představují hlavní vývojové větve. K nim se pak přimyká několik samostatných tříd s nejasným systematickým zařazením. Hlavní rozdíly mezi odděleními a třídami spočívají ve vnitřní stavbě buňky a v rozdílném způsobu uskutečnění fotosyntézy. Při fotosyntéze se významnou měrou uplatňují asimilační barviva, která jsou u sinic rozptýlena v plazmě, u řas jsou uložena v plastidech [51].

Jako řasy uvádí VAN DEN HOEK a kol. (1995) systematické skupiny obsažené v následující tabulce (Tab. 3) [50].

Tab. 3. Přehled řasových oddělení a jejich současné zařazení [50]

Impérium	Říše	Oddělení
Prokarya	Bakterie (Bacteria)	Sinice (Cyanobacteria)
Eukarya	Prvoci (Protozoa)	Eugleny (Euglenophyta) Obrněnky (Dinophyta) Chlorarachniophyta
	Chromista	Skrytěnky (Cryptophyta) Heterokontophyta
	Rostliny (Plantae)	Glaucophyta Ruduchy (Rhodophyta) Zelené řasy (Chlorophyta) Parožnatky (Charophyta)

Sinice a řasy mají mnohé společné znaky druhořadého významu. Jeví jistou souběžnost ve tvarech stélky a pro všechny je základním životním prostředím voda. Za nejstarší skupinu jsou považovány sinice. V jejich buňkách, připomínajících buňky bakterií, nejsou v typické podobě vyvinuty plastidy a jádro. Jaderná hmota i asimilační barviva jsou rozptýleny v plazmě. V buňkách řas je jádro obklopeno jadernou blánou a jsou vyvinuty plastidy různého tvaru. Jednotlivé skupiny řas vznikly v odlišných podmínkách v různých geologických obdobích [51].

Podle druhu barviva obsaženého v řasách rozlišujeme:

- Modro-zelené „řasy“ – Cyanophyta,
- Červené řasy (ruduchy) – Rhodophyta,
- Hnědé řasy – Heterokontophyta (čeleď: Phaeophyceae),
- Zelené řasy – Chlorophyta [52].

3.2 Výživa řas

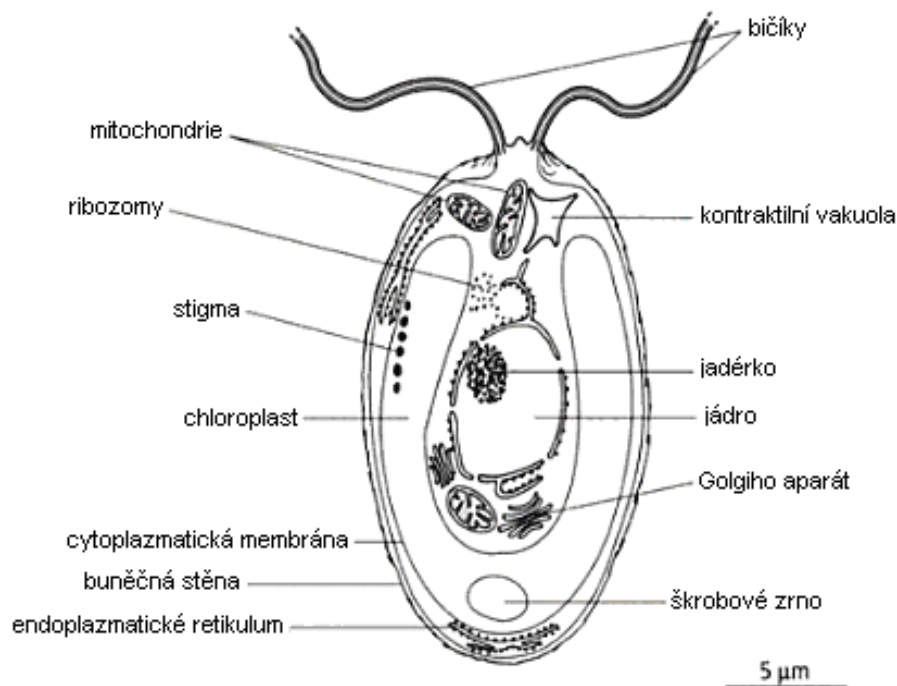
Řasy jsou fotoautotrofní organismy, tj. jsou vybaveny fotosyntetickými barvivy, která jim umožňují vytvářet organickou hmotu a kyslík z látek anorganických za účasti světla. Z pohledu ekologie jsou primárními producenty, zejména vodních a mokřadních ekosystémů. Některé druhy řas jsou schopny mixotrofní výživy. Kromě anorganických zdrojů dovedou za určitých okolností využívat také organické látky. Bičíkovci mohou pohlcovat drobné bakterie a živit se heterotrofně. S tímto způsobem výživy souvisí také teorie vzniku plastidů, případně dalších organel eukaryot. Podle ní došlo ve vývoji k pohlcování primitivních prokaryot fagotrofními měňavkami, které svoji kořist nestrávily, ale začaly s ní žít v symbióze. Z endosymbiontů se postupně vyvinuly organely: mitochondrie a chloroplasty [53].

3.3 Stavba buňky řas

Řasy mají eukaryotní strukturu. Dýchání se děje v mitochondriích. Fotosyntéza probíhá v chloroplastech na thylakoidech. Leukoplasty neobsahují žádná asimilační barviva. Někdy jsou plastidy s ostatními nezelenými barvivy označovány jako chromoplasty, případně podle barvy – rodoplasty, fenoplasty atd. V leukoplastech probíhá syntéza nižších organických molekul na vyšší, které se ukládají jako zásobní látky. Rostliny

bez leukoplastů syntetizují tyto látky v chloroplastech. Některé eukaryotické buňky hromadí zásobní látky ve zvláštním tělísku – pyrenoidu, který je součástí chloroplastu. Chlorophyta akumulují škrob na pyrenoidu a na povrchu chloroplastů.

Od ostatních oddělení se výrazně liší Rhodophyta. Přítomností fykobiliproteinů, stavbou thylakoidů, absencí bičíkatých stádií ve vývojovém cyklu stojí nejbližší k sinicím. Výrazně se však liší pohlavním rozmnožováním oogamií, stavbou buňky a stélky [49].



Obr. 9. Struktura jednobuněčné zelené řasy *Chlamydomonas* [54]

3.3.1 Buněčná stěna

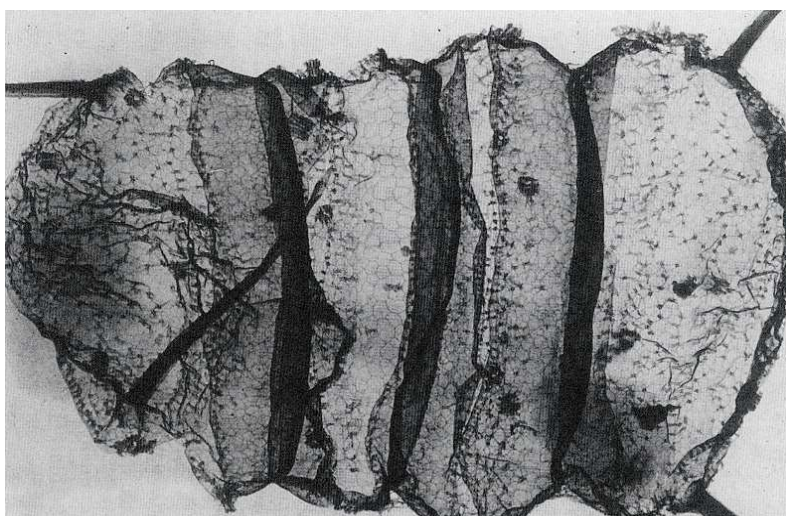
Složení buněčných stěn řas je rozmanité, závisí na konkrétním druhu řasy. U většiny řas je buněčná stěna tvořena mikrofibrilární strukturou a amorfní hmotou. Mezi nejčastěji vyskytující se komponenty patří celulóza, hemicelulózy, xylan, mannan, galaktosa, kyselina alginová, fukoidan. V buněčných stěnách mohou být zabudovány také anorganické sloučeniny (kyselina křemičitá, uhličitan vápenatý) [55].

Základní strukturu buněčných stěn Rhodophyta tvoří submikroskopické mikrofibrily celulózy s pravidelným křížovým uspořádáním. Při biosyntéze mikrofibril a jejich organizaci se uplatňují terminální komplexy složené z molekul enzymu, který polymeruje celulózu. U některých druhů tvoří mikrofibrilární složku 1,3-xylan [50]. Celulóza je

v buněčné stěně obsažena v množství 20 – 25 % [55]. Podstatnou složkou jsou amorfni vysoce hydrofilni polygalaktany, jejichž subjednotky jsou propojeny sulfátovými můstky. Jedná se o polymery β -(1,4)-galaktosy a α -(1,3)-anhydrogalaktosy. Tyto polysacharidy jsou hlavní součástí fykokoloidů získávaných z ruduch, tj. agaru a karagenanů [50].

V buněčné stěně Phaeophyceae se vlákna celulosy vyskytují obvykle v nepravidelné struktuře, obsah celulosy se pohybuje v rozmezí 1,5 – 20 % [55]. Amorfni složku tvoří alginové kyseliny (polymery kyseliny mannuronové a guluronové) a jejich soli algináty. Mannuronová kyselina zajišťuje ohebnost stélky, zatímco soli guluronové kyseliny určité části stélky zpevňují. Phaeophyceae produkují do prostředí značné množství slizu, jehož hlavní složkou je polysacharid fukoidan. Ten obsahuje algináty, různé polysacharidy a monosacharidy (např. fruktosu, galaktosu, mannosu) v sulfátové vazbě [50, 56].

Chlorophyta se vyznačují strukturální i chemickou rozmanitostí buněčných stěn. V nejjednodušším případě jsou buňky bičíkoviců, zoospor a gametů nahé, tj. jejich povrch pokrývá pouze plazmatická membrána. Buněčné stěny ostatních Chlorophyta jsou polysacharidové. Pevná část buněčné stěny sestává ze svazků submikroskopických mikrofibril, které mají určitou orientaci a tvoří základ jedné nebo několika vrstev buněčné stěny. Mikrofibrily jsou nejčastěji celulosní, ale mohou mít i jiné složení, např. mannan, xylan aj. [57]. Obsah celulosy může dosahovat až 83 %. Amorfni složky jsou hemicelulosové nebo pektinové. Z těchto složek vzniká sliz, který buňky často obklopuje. V malém množství jsou přítomny bílkoviny (extensin). K dalším specifickým látkám patří sporopolenin [55, 57].



Obr. 10. Struktura buněčné stěny zelené řasy *Scenedesmus quadricauda* [50]

3.4 Morfologie řas

Důležitým znakem řas je tvar stélky. Rozlišujeme několik organizačních stupňů stélky:

- monadoidní (bičíkovec) – kapkovitý tvar, pohyb realizován pomocí bičíku,
- rhizopodová (měňavka) – proměnlivý tvar s panožkami,
- kapsální (buňka ve slizu) – jednobuněčná buňka ve slizu, může mít zachovány některé znaky bičíkovců – pulzující vakuoly, stigma a bičíkům podobné, ale nepohyblivé útvary (pseudocilie),
- kokální (buňka) – oblaněné, nepohyblivé jednobuněčné řasy,
- trichální (vlákno) – jednotvaré buňky tvoří nevětvená či větvená mnohobuněčná vlákna nebo plošné útvary,
- signální (trubice) – vláknitá stélka bez přepážek mezi jednotlivými buňkami,
- sifonokladální – vláknitá či vakovitá stélka, sestávající z mnohjaderných buněk,
- pletivná – odvozena od heterotrichální, v nejdokonalejší podobě připomíná primitivní pletiva [49, 53].

Většina sladkovodních sinic a řas má mikroskopické rozměry a pouhým okem je můžeme vidět pouze ve velkém seskupení – zelené skvrny na skalách, kůrách stromů, hnědé kluzké kameny v potoce, chumáče vláknitých řas. Některé řasy tvoří kolonie (např. váleč), které dosahují rozměrů několika milimetrů. Parožnatky, které stojí vývojově nejvýše, mohou mít velikost několika centimetrů až decimetrů. V mořích žijí i několikametrové chaluhy [53].

3.5 Chemické složení a fyziologické účinky řas

Chemické složení řas závisí na jejich druhu a stáří, geografickém stanovišti a podmínkách životního prostředí. Jedlé mořské řasy jsou bohaté na minerální látky, vlákninu a proteiny [58]. Řasy jsou zdrojem celé řady bioaktivních látek. Jsou využívány buď pro přímou konzumaci jako součást pokrmů nebo z nich mohou být funkční složky extrahovány a následně přidávány do potravin. Existuje široké spektrum těchto organismů. Jejich složení a účinky jsou předmětem četných studií a analýz [59].

Přehled chemických komponent řas a fyziologické účinky některých bioaktivních látek řas jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4. Chemické složení řas a účinky bioaktivních látek obsažených v řasách [59]

Bioaktivní látka	Fyziologický účinek
<i>Bílkoviny</i>	
fykobiliproteiny	imunomodulační, antikancerogenní, hepato-protektivní, protizánětlivý, antioxidační
<i>Polysacharidy</i>	
sulfatované polysacharidy (např. fukoidan z hnědých řas)	antivirový, protinádorový, antilipidemický, omezující krvácení
nerozpustná vláknina	snížování LDL a celkového cholesterolu
<i>Mastné kyseliny</i>	
eikosapentaenová, dokosahexaenová, palmitolejová kyselina	snížení rizika určitých srdečních onemocnění
olejová kyselina	antioxidační
linolenová, palmitová kyselina	antimikrobiální
<i>Vitaminy</i>	
tokoferol	antioxidační
<i>Karotenoidy</i>	
β -karoten, lutein, violaxanthin	antioxidační
astaxanthin, kanthaxanthin	antioxidační, imunomodulační
<i>Fenoly</i>	
deriváty kyseliny benzoové, hydroxybenzaldehyd, kyselina skořicová a její deriváty	antioxidační
<i>Těžké látky</i>	
neophytadien, fytol	antioxidační

3.6 Výskyt řas

Řasy se vyskytují zejména ve vodním prostředí. V tekoucích vodách žijí převážně na kamenech a jiných ponořených předmětech (bentos), nebo mohou přisedat na další řasy a vyšší vodní rostliny (epifyti). Ve stojatých a pomalu tekoucích vodách se kromě bentických a epifytických druhů řas vyskytují také, které se volně vznášejí ve vodním sloupci (plankton). Epizootické řasy rostou na povrchu vodních koryšů, hlavně buchanek a perlooček. Za bezvětrí tvoří některé řasy na hladině tůň víceméně souvislý povlak (neuston). Jedná se o společenstvo řas přizpůsobených k životu na povrchové blance vody. Halofilní řasy osídlují stanoviště s vysokou koncentrací solí. Některé sinice a řasy žijí také mimo vodní prostředí – na sněhu a ledu (kryoseston), v půdě (fytoedafon), na kůře stromů

(vzdušné, aerofytické řasy). Mohou obývat i takové stanoviště jako jsou termální a minerální prameny, jeskyně s minimálním osvětlením. Přežívat mohou po jistý čas také v podzemních vodách. Vstupují do symbiosy s jinými organismy, např. s houbami vytvářejí lišejníky. Rozvoj řas ovlivňují vnější podmínky, zejména intenzita slunečního záření, teplota a chemické vlastnosti vody [49, 51, 53].

3.7 Využití řas

Řasy mají mnohostranné využití. Uplatňují se v zemědělství buď přímo jako hnojivo a krmivo, nebo nepřímo jako půdní organismy. Využívají se větší druhy řas, hlavně mořské. Řasy jsou součástí některých pokrmů [60]. Například v Japonsku a Koreji se z hnědé řasy *Laminaria* připravují polévky (japonské „kombu“) a ruducha *Porphyra* slouží k balení sushi (japonské „nori“) [61]. Mořské řasy jsou bohaté na jód a kyselinu glutamovou a v recepturách jsou nositeli „umami“ vlastností [62]. Řasy jsou konzumovány především pro svou výtečnou a neobvyklou chuť, ať už v syrovém, tepelně upraveném nebo konzervovaném stavu (sušené, tekuté extrakty) [61, 63]. Látky gelovitého charakteru, které jsou součástí buněčné stěny řas (algináty u hnědých řas, agar a karagenan u ruduch), jsou získávány pro komerční účely. Tyto látky jsou hojně používány jako ztužovač pudíngů a salátových dressingů nebo jako mazadla olejových vrtacích strojů. Agar se uplatňuje v mikrobiologii pro přípravu kultivačních médií, v papírenském a textilním průmyslu. Agar spolu s karagenanem slouží k výrobě léků a v kosmetice jako součást čistících a opalovacích krémů, mýdel, past atd. [60, 61]. Obranné mechanismy rostlin je možné aktivovat některými oligosacharidy hnědých řas. Tyto látky je možné použít k ochraně rostlin proti celé řadě houbových chorob (např. padlí, rzi na obilninách, skvrnitosti listů ječmene, padlí na révě vinné, skvrnitosti jabloní) [64]. Ze sladkovodních řas se vyrábějí tablety, které jsou doplňkovým zdrojem vitaminů a minerálních látek. Využívají se jako testovací organismy v genetice, toxikologii, alergologii atd. Na základě znalosti řas mohou školení odborníci posuzovat kvalitu prostředí, v němž řasy žijí, tj. kontrolovat čistotu povrchových vod [53].

3.8 Charakteristika vybraných druhů sladkovodních řas

Níže uvedené řasy jsou souhrnně označovány jako tzv. mikrořasy a jsou hojně využívány pro biotechnologické účely [65].

3.8.1 *Chlorella kessleri*

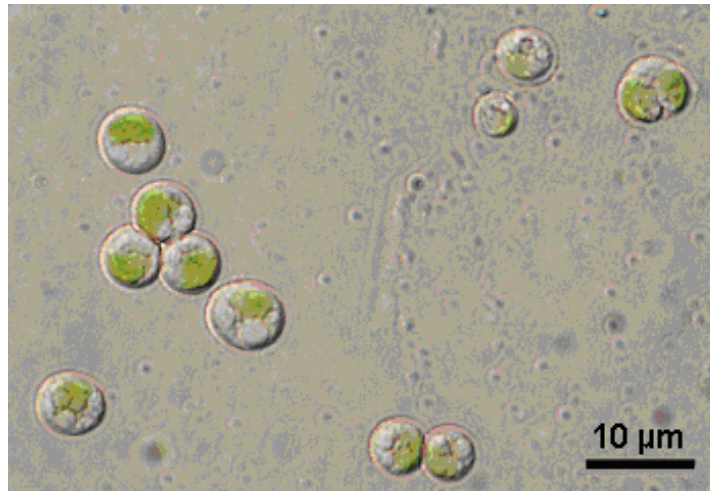
Chlorella kessleri (Obr. 11) spadá systematicky do říše: Plantae, oddělení: Chlorophyta, třídy: Treuboxiophyceae, řádu: Chlorellales, rodu: *Chlorella* [50].

Chlorella je zelená jednobuněčná řasa kulovitého nebo elipsoidního tvaru, která dosahuje velikosti 1 – 10 μm . Obsahuje hrncovitý nebo miskovitý chloroplast s pyrenoidem. Buňka je jednojaderná, rozmnožuje se autosporami, které mají již v mateřské buněčné stěně plně vyvinutou buněčnou stěnu a tvar vegetativních buněk. Bičíkatá stádia chybějí. Buněčná stěna je hladká [50, 53].

Chlorella obsahuje přibližně 60 % bílkovin, 20 % sacharidů a 10 % tuků. Bílkoviny zahrnují všechny esenciální aminokyseliny. V porovnání se složením živočišných bílkovin je v menší míře zastoupena pouze aminokyselina methionin [66]. *Chlorella* je dodavatelem širokého spektra vitaminů, minerálních látek a chlorofylu. Další vysoce biologicky ceněnou složkou je chlorelový růstový faktor (CGF), což je komplex nukleotidů a peptidů (obsahující především deriváty nukleových kyselin), který vzniká při intenzivní fotosyntéze a umožňuje rychlý růst (dělení buněk) řasy. Pokusy s mikroorganismy, živočichy a dětmi ukázaly, že CGF urychluje růst, a to bez vedlejších účinků. U dospělých se zdá, že stimuluje obnovu tkání a chrání buňky před toxickými látkami. Při pravidelném užívání by *Chlorella* mohla pomáhat při obnově poškozeného genetického materiálu v lidských buňkách, chránit zdraví a zpomalovat stárnutí [67]. Vedle CGF obsahuje *Chlorella* řadu dalších fyziologicky účinných látek. Enzymaticky vyrobený bílkovinný hydrolyzát této řasy se vyznačuje antitumorálním, hepatoprotektivním, antioxidačním, antibakteriálním a imunostimulačním efektem. Je popsán i účinek nestravitelné frakce na snížení cholesterolu. V řase byly zjištěny také látky s antioxidačním účinkem jako lutein, karoten, kyselina askorbová či tokoferol [59].

Většina řas rodu *Chlorella* žije ve vodě či v půdě. Tyto řasy nebyly zjištěny v mořské vodě. Některé žijí jako zoochlorelly uvnitř organismů (ploštěnek, nálevníků). Tvoří také fykobionta lišejníků [49].

Chlorella patří mezi biotechnologicky významné řasy. Často se pěstuje ve velkoobjemových kulturách a získaná biomasa se upravuje k různým účelům [57, 68]. Používá se k výrobě vitaminových preparátů, léčiv, krmiv a kosmetických přípravků [69].



Obr. 11. *Chlorella kessleri* [70]

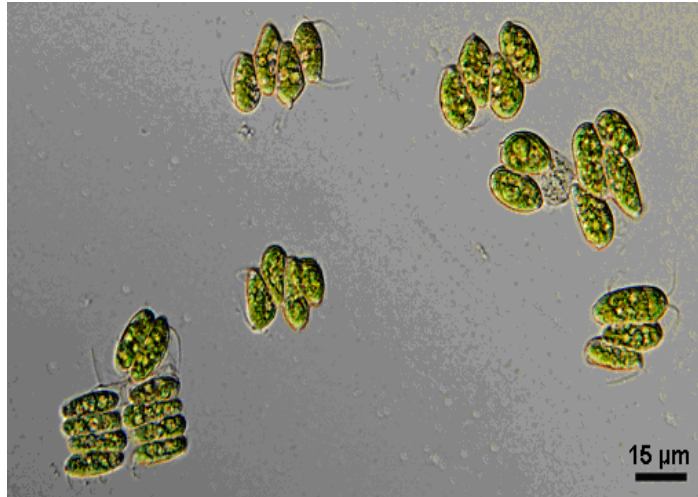
3.8.2 *Scenedesmus quadricauda*

Scenedesmus quadricauda (Obr. 12) se systematicky začleňuje do říše: Plantae, oddělení: Chlorophyta, třídy: Chlorophyceae, řádu: Chlorococcales, rodu: *Scenedesmus* [50].

Scenedesmus představuje na druhy nejbohatší rod zelených řas – cca 150 druhů (většinou planktonní). Určení druhů komplikuje morfoloická variabilita všech znaků včetně ultrastrukturálních. Zájem o taxonomii scenedesmů souvisí především s jejich využitím v biotechnologiích [50].

Scenedesmus vytváří dvou-, čtyř-, osmi- až šestnácti- buněčná cenobia, v nichž jsou buňky uspořádány lineárně nebo alternujícím způsobem. Jsou opatřeny ostny, žebry nebo bradavkami. Skupina druhů s ostny byla oddělena do zvláštního rodu *Desmodesmus*. Uvnitř buňky je možno pozorovat bílkovinná tělíska (pyrenoidy). Velikost větvenovitých buněk je 6 – 40 μm. Rozmnožování se děje autosporami [53, 57, 71]. Vzácně byla pozorována izogamie a planozygoty. Povrchová vrstva buněčné stěny je chemicky rezistentní (algenan, sporopolenin) a bohatě strukturovaná. Vnitřní vrstvy jsou polysacharidové [50].

Scenedesmus má podobné biotechnologické využití jako *Chlorella* a slouží často jako modelový organismus pro výzkum fotosyntézy [60]. Standardní kmeny se používají např. k testům toxicity [53].

Obr. 12. *Scenedesmus quadricauda* [72]

3.8.3 *Spirulina platensis*

Spirulina má na rozdíl od výše uvedených řas prokaryotní stavbu buňky a řadí se mezi sinice. Dle taxonomické klasifikace patří *Spirulina platensis* (Obr. 13) do říše: Bacteria, oddělení: Cyanobacteria, třídy: Cyanophyceae, řádu: Oscillatoriales, rodu: *Arthrospira* (*Spirulina*) [50, 68].

Strukturu *Spiruliny* tvoří šroubovitě vinuté cylindrické trichomy. Hustě spirální vlákna dosahují délky až 0,5 mm [73]. Buněčná stěna je vícevrstevná. Vnější buněčný obal tvoří slizová vrstva složená z lipopolysacharidů (glykokalyx). Pevná složka buněčné stěny je uložena mezi dvojicí lipoproteinových membrán a je složena z peptidoglykanu, jehož hlavní složkou je murein. V buněčné stěně jsou vytvořeny transportní kanály umožňující difúzi iontů nebo malých molekul [50].

Nutriční hodnota *Spiruliny* je vysoká. Obsahuje až 70 % bílkovin v sušině, všechny aminokyseliny jsou dobře využitelné. Stravitelnost této sinice činí až 95 %, neboť její buněčná stěna neobsahuje celulosu. *Spirulina* je bohatým zdrojem minerálních látek, vitaminů (hlavně skupiny B, A, E, K) a polynenasycených mastných kyselin (γ -linolenová kyselina) [73, 74]. Příznivé účinky na lidské zdraví mají fykobiliproteiny, které se využívají jako terapeutický prostředek při rakovině a leukémii. Významnými složkami jsou i chlorofyly, karotenoidy, deriváty kyseliny benzoové, hydroxybenzaldehyd, kyselina skořicová. Některé nepolární extrakty ze *Spiruliny* mají antimikrobiální účinky [59].

Klinické studie prokazují léčebné účinky této sinice: snižuje hladinu cholesterolu v krvi, chrání před některými druhy rakoviny, posiluje imunitní systém, zlepšuje střevní mikroflóru, podporuje detoxikaci ledvin, chrání buňky před radiací, má vliv na snížení obezity [75].

Ze *Spiruliny* se vyrábějí doplňky stravy, přidává se do krmiv, je zdrojem účinných složek pro farmaceutický a kosmetický průmysl. Její biomasy se využívá také pro čištění odpadních vod a slouží jako absorbent těžkých kovů [76].



Obr. 13. *Spirulina platensis* [77]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části diplomové práce bylo stanovit ve vzorcích sladkovodních řas:

- obsah hrubé vlákniny (CF), neutrálně-detergentní vlákniny (NDF), acido-detergentní vlákniny (ADF) a acido-detergentního ligninu (ADL) přístrojem ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer,
- obsah nerozpustné vlákniny (IDF) a rozpustné vlákniny (SDF) enzymatickou metodou.

Obě zvolené metody pro stanovení vlákniny byly srovnány.

5 STANOVENÍ VLÁKNINY PŘÍSTROJEM ANKOM²²⁰ FIBER ANALYZER

Stanovení jednotlivých druhů vláknin bylo provedeno dle pracovních postupů uvedených v manuálu, který byl dodán k přístroji ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer.

5.1 Přístroje a pomůcky

- ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer (ANKOM Technology, New York)
- filtrační sáčky F 57 o velikosti pórů 50 µm (ANKOM Technology, New York)
- impulsní svářečka sáčků KF-200H (O.K. SERVIS BioPro, Praha)
- předvážky KERN KB 600-2610
- analytické váhy Explorer Pro model EP 214 CM
- sušárna Venticell 111 Comfort (BMT, Pardubice)
- digestoř
- el. muflová pec 018 LP (Elektrické pece Svoboda, ČR)
- magnetická míchačka Heidolph MR 1000
- chladnička AFG F
- varná konvice
- exsikátor
- porcelánové kelímky
- kleště
- filtrační papír
- kádinky
- odměrné baňky
- pipety
- skleněná tyčinka
- hodinové sklíčko

- míchadlo
- pinzeta
- gumové rukavice
- obličejový ochranný štít

5.2 Stanovení hrubé vlákniny

5.2.1 Princip

Hrubá vláknina je stanovena jako zbytek substrátu rostlinného původu získaný po dvoustupňové hydrolyze ve slabě kyselém prostředí kyseliny sírové a slabě zásaditém prostředí hydroxidu za přesně definovaných podmínek.

5.2.2 Chemikálie

- H_2SO_4 ($c = 0,1275 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), příprava: 14,16 ml 96% H_2SO_4 + dest. voda do 2 l (Penta, dodavatel Ing. Švec, Chrudim)
- NaOH ($c = 0,3130 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), příprava: 25 g NaOH + dest. voda do 2 l (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- aceton (Penta, dodavatel Ing. Švec, Chrudim)

5.2.3 Postup stanovení

Sáčky byly ponořeny do kádinky s acetonem. Po chvíli byly pinzetou vyjmuty na filtrační papír a ponechány v digestoři k odvětrání acetonu. Sáčky byly označeny popisovačem odolným vůči použitým chemikáliím. Na analytických vahách byl zvážen prázdný sáček (m_1). Do sáčku byl navážen 1 g lyofilisovaného vzorku s přesností na 0,0001 g (m_2). Sáček byl zataven impulsní svářečkou a vzorek byl v sáčku rovnoměrně roztřepán. Sáčky se vzorky byly následně vloženy do nosiče. Součástí každého oddílu nosiče byly tři vzorky, které byly oproti předchozímu oddílu otočeny o 120°. Poslední oddíl byl ponechán prázdný a byl nasazen na předchozí díl jako víko, aby bylo zabráněno vyplavání sáčků na hladinu roztoku. Na poslední oddíl nosiče bylo umístěno závaží. Nosič byl vložen do nádoby analyzátoru.

Do přístroje byla přes nosič se sáčky nalita H_2SO_4 ($c = 0,1275 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v objemu 1,7 l. Bylo zapnuto míchání a topení. Po provedení kontroly funkce míchání byl přístroj uzavřen a víko bylo utěsněno. Po 45 minutách bylo vypnuto míchání i ohřev. Vypouštěcí kohout byl postupně otevírán, dokud nebyla horká kyselina zcela vypuštěna. Poté byl 3x proveden proplach horkou vodou v 5 minutových intervalech. Do nádoby přístroje byl nalit roztok NaOH ($c = 0,3130 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Byl zapnut ohřev a míchání, doba byla nastavena opět na 45 minut. Po uplynutí času bylo zastaveno míchání a ohřev. Horký louh byl opatrně vypuštěn. Znovu byl proveden trojnásobný proplach horkou vodou. Na závěr byla k proplachu použita studená voda k ochlazení vzorků a nádoby přístroje.

Sáčky byly z nosiče vyjmuty a pomocí filtračního papíru byl ze sáčků vytlačen zbytek vody. Sáčky byly vloženy do kádinky a zality acetonem. Po 3 minutách byl ze sáčků vytlačen aceton pomocí filtračního papíru. Sáčky byly rozprostřeny na suchý filtrační papír a nechaly se odvětrat v digestoři. Poté byly sušeny při teplotě $105 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 4 hodin a po vychladnutí byly zváženy (m_3).

V muflové peci byly předžhánány porcelánové kelímky. Poté do nich byly umístěny vysušené sáčky. Jejich mineralizace byla provedena při teplotě $550 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 hodin a po vychladnutí byly zváženy (m_4).

5.3 Stanovení neutrálně-detergentní vlákniny

5.3.1 Princip

Neutrálně-detergentní vláknina představuje zbytek buněčných stěn rostlinných pletiv izolovaný po hydrolýze v prostředí roztoku pufru při pH 7 a účinné látky laurylsulfátu sodného za definovaných podmínek.

5.3.2 Chemikálie

- neutrálně-detergentní roztok, příprava:
 - 120 g neutrálně-detergentního činidla (disodná sůl kyseliny etylendiamin-tetraoctové, tetraboritan sodný, hydrogenfosforečnan sodný, laurylsulfát sodný) + 20 ml trietylenglykolu + dest. voda do 2 l (pH = 6,9 – 7), (ANKOM Technology, New York)

- 20 g siřičitanu sodného (Lachema o. p. Brno) + 4 ml α -amylasy (ANKOM Technology, New York) byly přidány do výše připraveného roztoku
- aceton (Penta, dodavatel Ing. Petr Švec, Chrudim)

5.3.3 Postup stanovení

Sáčky byly vyprány v acetonu a ponechány v digestoři k odvětrání. Sáčky byly označeny popisovačem odolným vůči použitým chemikáliím. Na analytických vahách byl nejprve zvážen prázdný sáček (m_1). Poté bylo do sáčku naváženo 0,5 g lyofilisovaného vzorku s přesností na 0,0001 g (m_2). Sáčky byly zataveny impulsní svářečkou. Vzorek byl v sáčku rovnoměrně roztřepán. Nosič se vzorky byl vložen do nádoby přístroje.

Přes nosič bylo do přístroje nalito 1,7 l neutrálně-detergentního roztoku. Bylo zapnuto míchání a topení. Přístroj byl uzavřen a víko bylo utěsněno. Čas byl nastaven na 75 minut. Po uplynutí času bylo vypnuto míchání a ohřev. Vypouštěcím kohoutem byl z přístroje postupně odpouštěn neutrálně-detergentní roztok. Do přístroje bylo nalito 1,7 l horké vody a 4 ml α -amylasy k prvnímu i druhému propláchnutí, které bylo prováděno 5 minut za stálého míchání. Na poslední proplach byla použita studená voda.

Ze sáčků byla odstraněna voda pomocí filtračního papíru. Následně byly sáčky vloženy do kádinky a zality acetonem na dobu 3 minut. Poté z nich byl odstraněn aceton pomocí filtračního papíru. Sáčky byly rozprostřeny v digestoři k odvětrání.

Sušení sáčků bylo provedeno při teplotě 105 °C po dobu 4 hodin a po vychladnutí byly sáčky zváženy (m_3).

V muflové peci byly předžhánány porcelánové kelímky, do nichž byly umístěny vysušené sáčky. Mineralizace byla provedena při teplotě 550 °C po dobu 5 hodin. Vychladnuté sáčky byly zváženy (m_4).

5.4 Stanovení acido-detergentní vlákniny

5.4.1 Princip

Acido-detergentní vláknina je zbytek buněčných stěn rostlinných pletiv izolovaný po kyselé hydrolýze reagenční směsí cetyltrimetylamonium bromidu v roztoku kyseliny sírové za definovaných podmínek.

5.4.2 Chemikálie

- acido-detergentní roztok, příprava:
 - H_2SO_4 ($c = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), příprava: 55,40 ml 96% H_2SO_4 + dest. voda do 2 l (Penta, dodavatel Ing. Petr Švec, Chrudim)
 - 40 g cetyltrimetylamonium bromidu (ANKOM Technology, New York) bylo přidáno do výše připraveného roztoku
- aceton (Penta, dodavatel Ing. Petr Švec, Chrudim)

5.4.3 Postup stanovení

Filtrační sáčky byly ponořeny do kádinky s acetonem. Poté byly umístěny na filtrační papír a ponechány v digestoři k odvětrání acetonu. K označení sáčků byl použit popisovač odolný vůči použitým chemikáliím. Na analytických vahách byl zvážen prázdný filtrační sáček (m_1). Do sáčku bylo naváženo 0,5 g lyofilisovaného vzorku s přesností na 0,0001 g (m_2). Sáčky byly zataveny impulsní svářečkou. Třesením sáčku a lehkými poklepy na jeho okraje byl vzorek rovnoměrně rozložen. Sáčky se vzorky byly umístěny do nosiče, který byl vložen do nádoby přístroje.

Do přístroje bylo nalito přes nosič sáčků 1,7 l acido-detergentního roztoku. Bylo zapnuto míchání a topení. Přístroj byl uzavřen a víko bylo utěsněno. Po 60 minutách bylo míchání a topení vypnuto. Vypouštěcí kohout byl pomalu otevírán a roztok byl vypouštěn. Postupně byly v 5 minutových intervalech provedeny 3 proplachy horkou vodou. Na poslední proplach byla použita studená voda.

Sáčky byly vyjmuty z nosiče a položeny na filtrační papír. Jemně z nich byla vymačkána voda. Dále byly vloženy do kádinky s acetonem na dobu 3 minut. Poté z nich byl odstraněn přebytek acetonu filtračním papírem. Sáčky byly rozprostřeny na filtrační papír v digestoři k odvětrání.

Sušení sáčků bylo realizováno při teplotě 105 °C po dobu 4 hodin. Vychladlé sáčky byly zváženy (m_3).

Do předžíhaných porcelánových kelímků byly vloženy vysušené sáčky. Vzorky byly mineralizovány v muflové peci při teplotě 550 °C po dobu 5 hodin, po vychladnutí byly zváženy (m_4).

5.5 Stanovení hemicelulos

5.5.1 Princip

Obsah hemicelulos je zjištěn odečtením hodnoty ADF od NDF. Pro stanovení ADF se nepoužívá původní vzorek, ale produkt, který zůstane po stanovení NDF.

5.5.2 Chemikálie

- chemikálie pro stanovení NDF – uvedeno v kapitole 5.3.2
- chemikálie pro stanovení ADF – uvedeno v kapitole 5.4.2

5.5.3 Postup stanovení

Nejprve bylo provedeno stanovení NDF dle postupu uvedeného v kapitole 5.3.3 bez sušení vzorku, poté následovalo stanovení ADF dle postupu uvedeného v kapitole 5.4.3.

5.6 Stanovení acido-detergentního ligninu

5.6.1 Princip

Acido-detergentní lignin je nerozpustný zbytek po hydrolýze acido-detergentní vlákniny 72% roztokem kyseliny sírové za definovaných podmínek.

5.6.2 Chemikálie

- acido-detergentní roztok, příprava:
 - H_2SO_4 ($c = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), příprava: 55,40 ml 96% H_2SO_4 + dest. voda do 2 l (Penta, dodavatel Ing. Petr Švec, Chrudim)
 - 40 g cetyltrimetylamonium bromidu (ANKOM Technology, New York) bylo přidáno do výše připraveného roztoku
- 72% H_2SO_4 (Penta, dodavatel Ing. Petr Švec, Chrudim)
- aceton (Penta, dodavatel Ing. Petr Švec, Chrudim)

5.6.3 Postup stanovení

Pro stanovení ADL byl použit stejný postup jako při stanovení ADF na přístroji ANKOM (kapitola 5.4.3). Po vyjmutí sáčků z nádoby přístroje bylo provedeno jejich důkladné vysušení. Poté byly sáčky umístěny do třílitrové kádinky a zality 72% H₂SO₄ takovým objemem (cca 250 ml), aby byly zcela ponořeny. Do třílitrové kádinky byla vložena dvoulitrová kádinka, pomocí které byly sáčky udržovány pod hladinou. Tlačáním a zdviháním dvoulitrové kádinky byly sáčky míchány – v počátku a poté v 30 minutových intervalech asi 30x. Po 3 hodinách byla H₂SO₄ slita. Několikanásobným proplachováním sáčků horkou vodou byla odstraněna všechna H₂SO₄. Neutrální pH bylo ověřeno pomocí lakmusového papírku. Po odstranění vody byly sáčky zality acetonem a byly ponechány 3 minuty ponořené. Sáčky byly rozprostřeny na filtrační papír v digestoři k odvětrání.

Sušení sáčků bylo provedeno v laboratorní sušárně při teplotě 105 °C po dobu 4 hodin. Po vychladnutí byly sáčky zváženy (m_3).

Do předžhánaných porcelánových kelímků byly vloženy vysušené sáčky. Jejich mineralizace byla provedena při teplotě 550 °C po dobu 5 hodin, po vychladnutí byly zváženy (m_4).

5.7 Výpočet obsahu jednotlivých druhů vláknin ve vzorcích řas

Pro výpočet obsahu CF, NDF, ADF, ADL byl použit následující vzorec:

$$V = \frac{(m_3 - m_1 \cdot c_1) - (m_4 - m_1 \cdot c_2)}{m_2} \cdot 100$$

kde:

V - obsah CF, NDF, ADF, ADL [%]

m_1 - hmotnost sáčku [g]

m_2 - hmotnost navážky vzorku [g]

m_3 - hmotnost vysušeného sáčku s rezidui vzorku po hydrolýze [g]

m_4 - hmotnost popela po spálení vysušeného sáčku s rezidui vzorku po hydrolýze [g]

c_1 - korekce hmotnosti sáčku po hydrolýze

c_2 - korekce hmotnosti sáčku po spálení

Do souboru sáčků se vzorky byl zařazen také jeden prázdný (korekční) sáček, a to u každého stanovení vlákniny. Pomocí zjištěných hmotností vysušeného sáčku po hydrolyze a jeho popela po mineralizaci byly vypočteny korekce:

$$c_1 = \frac{m_s}{m_1}$$

$$c_2 = \frac{m_p}{m_1}$$

kde:

m_s - hmotnost vysušeného sáčku po hydrolyze [g]

m_p - hmotnost popela sáčku [g]

m_1 - hmotnost sáčku [g]

6 STANOVENÍ VLÁKNINY ENZYMATICKOU METODOU

Stanovení vlákniny potravy bylo provedeno dle postupu uvedeného ve vyhlášce č. 293/1997 Sb., příloha 2. Pracovní postup byl částečně modifikován podle manuálu dodávaného k soupravě enzymů (Megazyme) a vybavení laboratoře.

6.1 Princip

Podstatou enzymatické metody je odstranění škrobu a bílkovin ze vzorku působením trávicích enzymů. Zbytek pak tvoří vláknina a minerální látky. Vzorek je postupně podroben účinku tří enzymů: termostabilní α -amylasy, proteasy a amyloglukosidasy. Přídavkem čtyřnásobného objemu etanolu je vysrážena rozpustná vláknina. Od nerozpustného zbytku je nutno odečíst bílkoviny, které se nerozrušily působením proteasy, popel a slepý pokus.

6.2 Přístroje a pomůcky

- magnetická míchačka Heidolph MR 1000
- vodní lázeň s třepacím nástavcem Memmert
- pH-metr
- sušárna Venticell (BMT, Pardubice)
- analytické váhy Explorer Pro model EP 214 CM
- předvážky KERN KB 600-2610
- el. muflová pec 018 LP (Elektrické pece Svoboda, ČR)
- mineralizátor Bloc Digest 12
- automatická destilační jednotka Pro-Nitro 1430 (O.K. SERVIS BioPro, Praha)
- digestoř
- el. vařič
- chladnička AFG F
- exsikátor
- Erlenmayerovy baňky

- kádinky
- pipety
- Büchnerova nálevka
- vodní vývěva
- porcelánové kelímky
- mineralizační zkumavky
- laboratorní špachtle
- filtrační papír
- hliníková fólie
- míchadlo

6.3 Chemikálie

- MES-TRIS směsný roztok pufru (pH = 8,2)
- enzymy: α -amylasa, proteasa, amyloglukosidasa (Megazyme International Ireland Ltd.)
- HCl o koncentracích: $0,561 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; 5 % (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- NaOH o koncentracích: 5 %, 13 %, 30 % (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- aceton (Penta, dodavatel Ing. Petr Švec, Chrudim)
- 95% etanol (Penta, dodavatel Ing. Petr Švec, Chrudim)
- konc. H_2SO_4 (Penta, dodavatel Ing. Petr Švec, Chrudim)
- směsný katalyzátor $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4$ v poměru 10:1
- 2% H_3BO_3 (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- indikátor Tashiro

6.4 Postup stanovení

Do Erlenmayerových baněk byl navážen 1 g lyofilisovaného vzorku s přesností na 0,0001 g (n). Současně byl proveden také slepý pokus (stanovení bez navážky vzorku: m_{SP}). Do baněk bylo přidáno 40 ml MES-TRIS směsného roztoku pufru (pH = 8,2). Pro dokonalé dispergování vzorků v roztoku byly baňky opatřeny míchadlem a umístěny na magnetické míchačky. Poté bylo do roztoku pipetováno 50 μ l α -amylasy za pomalého míchání. Baňky byly přikryty hliníkovou fólií. Poté byly vloženy do třepací vodní lázně vyhřáté na teplotu 100 °C na dobu 35 minut při plynulém třepání. Po 35 minutách byly baňky vyjmuty z horké vodní lázně a byly ochlazeny na 60 °C. Z baněk byly odstraněny krycí fólie. Pomocí laboratorní špachtle byly ze stěn baněk seškrábány ulpělé zbytky vzorků. Špachtle a stěny baněk byly opláchnuty 10 ml destilované vody z pipety. Teplota vodní lázně byla upravena na 60 °C. Do každé baňky bylo pipetováno 100 μ l proteasy. Baňky byly přikryty hliníkovou fólií a vloženy do vodní lázně na dobu 30 minut za stálého třepání. Poté byly baňky vyjmuty z vodní lázně, fólie byly odstraněny a za stálého míchání bylo dávkováno 5 ml 0,561 M HCl. Pomocí pH-metru byla provedena kontrola pH roztoku, jehož hodnota se měla pohybovat v rozmezí 4,1 – 4,8. Pokud bylo zjištěno pH mimo toto rozmezí hodnot, byla provedena úprava pH roztoku přidávkem 5% NaOH nebo 5% HCl. Následně bylo do baněk pipetováno 200 μ l amyloglukosidasy za míchání na magnetické míchačce. Hliníkové zátky byly vyměněny. Baňky byly umístěny do vodní lázně o teplotě 60 °C a po dobu 30 minut bylo prováděno jejich pomalé třepání.

6.4.1 Stanovení nerozpustné vlákniny

Nejprve byl zvážena filtrační papír a poté byla provedena filtrace enzymové směsi. Zbytky vzorku v baňce byly vypláchnuty destilovanou vodou o teplotě 70 °C. Nerozpustný zbytek na filtru (nerozpustná vláknina) byl po přelití filtrátu promyt 10 ml acetonu. Filtrační papír byl po odtěkání acetonu sušen při 105 °C po dobu 4 hodin. Po vysušení a následném vychladnutí byl zvážena (m_{IDF}). U každého druhu vzorku byl poté stanoven popel a celkový obsah dusíkatých látek.

6.4.2 Stanovení rozpustné vlákniny

Filtrát, získaný při stanovení nerozpustné vlákniny, byl přelit do předem zvážené baňky a byl zvážena. K filtrátu byl přidán čtyřnásobek jeho hmotnosti 95% etanolu předeřátého

na 60 °C. Baňky byly zakryty hliníkovou fólií a vloženy do vodní lázně o teplotě 45 °C na 1 hodinu pro vytvoření sraženiny. Předem byl zvážen filtrační papír a poté byla provedena filtrace. Filtrační koláč byl promyt 10 ml acetonu. Po odvětrání acetonu byl filtrační papír sušen při 105 °C po dobu 4 hodin. Po vysušení a vychladnutí byl zvážen (m_{SDF}). U každého druhu vzorku byl stanoven popel a celkový obsah dusíkatých látek.

6.4.2.1 Stanovení obsahu popela

Obsah popela byl stanoven u každého vzorku (zvláště pro nerozpustnou a rozpustnou vlákninu) a také u slepého pokusu. Vysušené filtrační papíry se zbytky nerozpustné a rozpustné vlákniny byly vloženy do porcelánových kelímků. Jejich mineralizace byla provedena v muflové peci při teplotě 550 °C po dobu 5 hodin. Po vychladnutí byly kelímky zváženy (m_P).

6.4.2.2 Stanovení celkového obsahu dusíkatých látek

Celkový obsah dusíkatých látek byl stanoven u každého vzorku (zvláště pro nerozpustnou a rozpustnou vlákninu) a také u slepého pokusu. Do mineralizačních zkumavek byly vloženy vysušené filtrační papíry se zbytky nerozpustné a rozpustné vlákniny. K nim bylo v digestoři přidáno 10 ml konc. H_2SO_4 , 3 kapky H_2O_2 a 1 malá lžička směsného katalyzátoru ($Na_2SO_4 + CuSO_4$ v poměru 10:1). Baňka byla umístěna na topnou desku mineralizátoru Bloc Digest 12 s přídatným zařízením umožňujícím odsávání par vznikajících zplodin. Byl zapnut vyhřívací blok a pračka plynů. Teplota ohřevu byla nastavena na 400 °C. Po dosažení této teploty byla mineralizace prováděna 1 hodinu. Pokud měl vzorek po uplynutí této doby ještě černé zbarvení, byla mineralizace prodloužena. Po skončení mineralizace byl vyhřívací blok vypnut a zkumavky byly vloženy do stojanu. Pračka byla ponechána zapnuta, dokud zkumavky nezchladly. Poté bylo do zkumavek přidáno 15 ml destilované vody. Před analýzou byl obsah zkumavek protřepán. Dále byla pro stanovení celkového obsahu dusíkatých látek použita automatická destilační jednotka Pro-Nitro 1430 (m_B).

6.5 Výpočet obsahu vláknin ve vzorcích řas

6.5.1 Výpočet obsahu nerozpustné vlákniny

$$IDF = \frac{m_{IDF} - m_B - m_P - m_{SP}}{n} \cdot 100$$

kde:

IDF - obsah nerozpustné vlákniny [%]

m_{IDF} - hmotnost vysušeného filtračního papíru s nerozpustnou vlákninou [g]

m_B - hmotnost bílkovin (vysušený filtrační papír s nerozpustnou vlákninou) [g]

m_P - hmotnost popela (vysušený filtrační papír s nerozpustnou vlákninou) [g]

m_{SP} - součet hmotnosti bílkovin a popela u slepého pokusu (prázdný filtrační papír) [g]

n - navážka vzorku [g]

6.5.2 Výpočet obsahu rozpustné vlákniny

$$SDF = \frac{m_{SDF} - m_{BR} - m_{PR} - m_{SP}}{n} \cdot 100$$

kde:

SDF - obsah rozpustné vlákniny [%]

m_{SDF} - hmotnost vysušeného filtračního papíru s rozpustnou vlákninou [g]

m_{BR} - hmotnost bílkovin (vysušený filtrační papír s rozpustnou vlákninou) [g]

m_{PR} - hmotnost popela (vysušený filtrační papír s rozpustnou vlákninou) [g]

m_{SP} - součet hmotnosti bílkovin a popela u slepého pokusu (prázdný filtrační papír) [g]

n - navážka vzorku [g]

Pro výpočet hmotnosti bílkovin byl použit přepočítávací faktor ($F = 6,25$), kterým bylo vynásobeno stanovené množství dusíku pomocí přístroje Pro-Nitro.

6.5.3 Výpočet obsahu vlákniny potravy

$$TDF = IDF + SDF$$

kde:

TDF - obsah vlákniny potravy [%]

IDF - obsah nerozpustné vlákniny [%]

SDF - obsah rozpustné vlákniny [%]

7 ANALYZOVANÉ VZORKY ŘAS

Lyofilisované vzorky řas (Tab. 5) pocházely z Ústavu fyzikální biologie v Nových Hradech, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. U kmenů *K1* a *K2* nebyla dosud provedena taxonomická klasifikace, jsou používány pouze jako laboratorní kmeny s perspektivou jejich využití v potravinářství.

Tab. 5. Analyzované vzorky řas

Vzorky řas	Označení vzorku
<i>Chlorella kessleri</i>	C
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	SC
<i>Scenedesmus</i> + kmen <i>K1</i> (60 % + 40 %)	SC-K1
kmen <i>K2</i>	K2
<i>Spirulina platensis</i>	S

8 VÝSLEDKY A DISKUSE

Ve vzorcích sladkovodních řas byly stanoveny obsahy jednotlivých druhů vláknin (CF, NDF, ADF, ADL) pomocí přístroje ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer. Enzymatickou metodou byly ve vzorcích řas zjištěny pouze obsahy nerozpustné vlákniny z důvodu velkých ztrát rozpustné vlákniny při analýze (kapitola 8.2). Stanovené obsahy vlákniny ve vzorcích řas byly srovnány s údaji publikovanými v literárních zdrojích. Pro statistické vyhodnocení obsahů vlákniny byly použity matematické vztahy pro výpočet aritmetického průměru, směrodatné odchylky a Studentova rozdělení při testované hladině 5 % a třech stupních volnosti.

8.1 Obsahy vláknin stanovené přístrojem ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer

8.1.1 Hrubá vláknina

Hrubá vláknina (CF) je tvořena celulosou, hemicelulosami a ligninem.

V Tab. 6 jsou uvedeny obsahy CF ve vzorcích sladkovodních řas a graficky jsou znázorněny na Obr. 14.

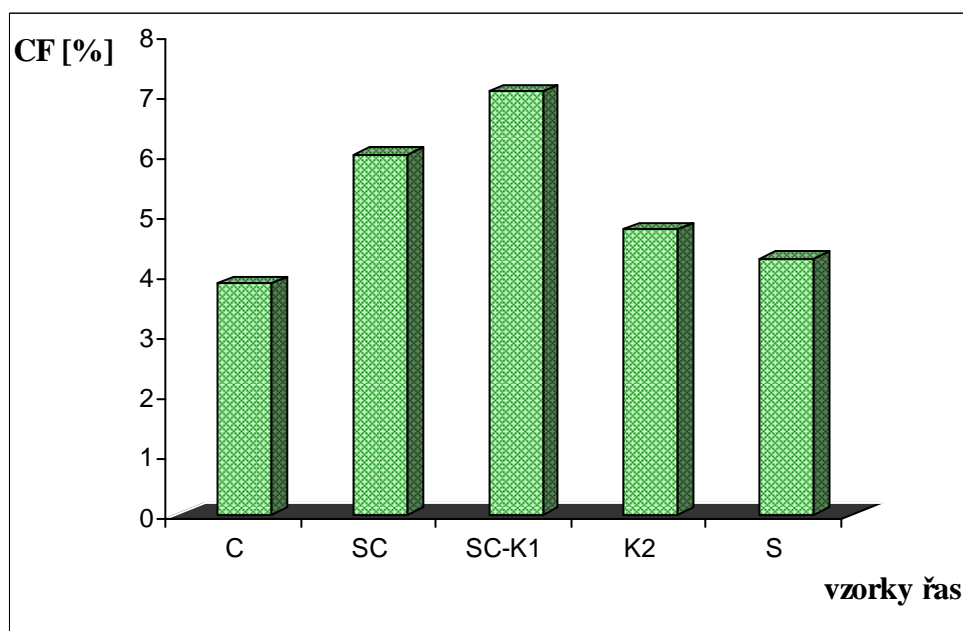
Tab. 6. Obsahy CF ve vzorcích sladkovodních řas

Vzorky řas	Označení	Obsah CF [%]
<i>Chlorella kessleri</i>	C	3,85 ± 0,57
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	SC	6,00 ± 1,68
<i>Scenedesmus</i> + kmen K1 (60 % + 40 %)	SC-K1	7,05 ± 1,91
kmen K2	K2	4,76 ± 1,53
<i>Spirulina platensis</i>	S	4,27 ± 1,09

Nejvyšší obsah CF byl zjištěn ve směsném vzorku *Scenedesmus* + K1 7,05 %. Vzorek řasy *Scenedesmus quadricauda* obsahoval 6,00 % CF. Dále následoval vzorek K2 s 4,76 % a vzorek sinice *Spirulina platensis* s 4,27 % CF. Nejmenší obsah CF vykazoval vzorek řasy *Chlorella kessleri* 3,85 %.

Rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou CF ve vzorcích činil pouze 3,2 %, zatímco u ostatních stanovovaných vláknin (NDF, ADF, ADL) byly rozdíly mnohem výraznější.

CF má obecně nízkou vypovídající schopnost o kvalitě vlákniny. Příčinou jsou ztráty některých nestravitelných komponent (rozpuštění ligninu v alkáliích).



Obr. 14. Grafické znázornění obsahu CF ve vzorcích sladkovodních řas

8.1.2 Neutrálně-detergentní vláknina

V hodnotě neutrálně-detergentní vlákniny (NDF) jsou zahrnuty všechny tři složky nerozpustné vlákniny (celulosa, hemicelulosa, lignin), které jsou díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem (nerozpustnost ve vodě, stabilita v neutrálním prostředí) zachycovány téměř kvantitativně.

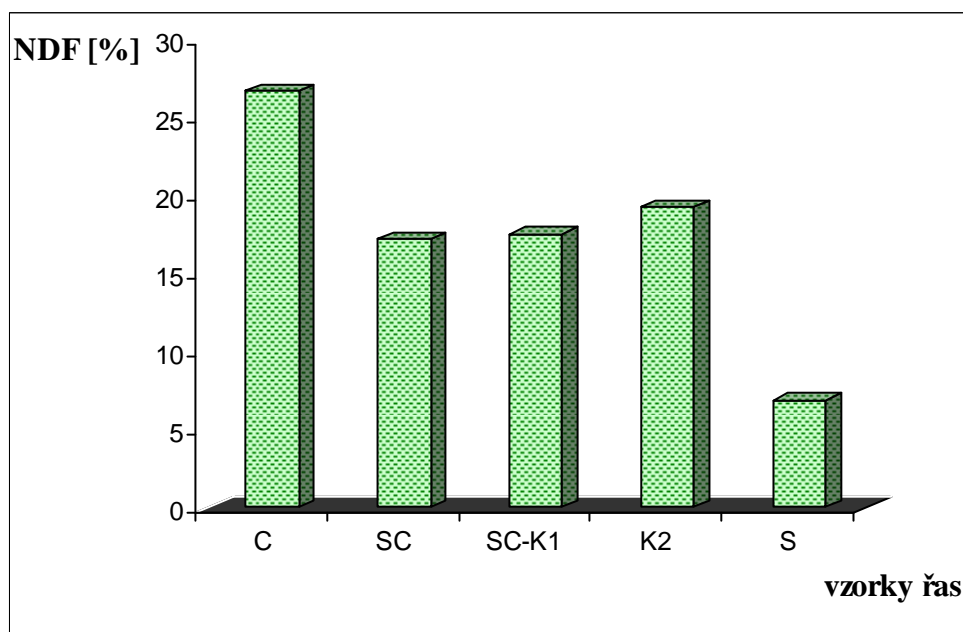
Obsahy NDF ve vzorcích sladkovodních řas jsou zaznamenány v Tab. 7 a graficky znázorněny na Obr. 15.

Tab. 7. Obsahy NDF ve vzorcích sladkovodních řas

Vzorky řas	Označení	Obsah NDF [%]
<i>Chlorella kessleri</i>	C	26,71 ± 3,02
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	SC	17,29 ± 2,02
<i>Scenedesmus + kmen K1 (60 % + 40 %)</i>	SC-K1	17,57 ± 1,76
<i>kmen K2</i>	K2	19,26 ± 2,04
<i>Spirulina platensis</i>	S	6,91 ± 1,61

Nejvyšší obsah NDF byl stanoven ve vzorku řasy *Chlorella kessleri* 26,71 %. Ve vzorku K2 bylo zjištěno 19,26 % NDF. Vzorky *Scenedesmus* + kmen K1 a *Scenedesmus quadricauda* obsahovaly přibližně stejné obsahy NDF 17,57 % a 17,29 % v uvedeném pořadí. Nejméně NDF bylo analyzováno ve vzorku sinice *Spirulina platensis* 6,91 %.

Hodnoty NDF stanovené ve vzorcích řas byly značně vyšší než hodnoty CF, přestože složení obou druhů vláknin zahrnuje stejné nerozpustné frakce vlákniny (celulosu, hemicelulosu a lignin). Dle zdroje [36] bylo při stanoveních CF a NDF u identických vzorků krmiv častokrát zjištěno, že NDF dosahovala vyšších hodnot. Korelace mezi NDF a CF u rostlinných materiálů byla ovlivněna především podílem hemicelulos a ligninu v jejich buněčné stěně. Čím větší množství hemicelulos bylo ve vzorku obsaženo, tím nižší hodnoty CF bylo oproti NDF dosaženo. Navíc docházelo při stanoveních CF ke ztrátám ligninu vlivem jeho rozpustnosti v alkáliích (v závislosti na typu rostlinného materiálu).



Obr. 15. Grafické znázornění obsahu NDF ve vzorcích sladkovodních řas

8.1.3 Acido-detergentní vláknina

Acido-detergentní vláknina (ADF) je tvořena lignocelulosovým komplexem.

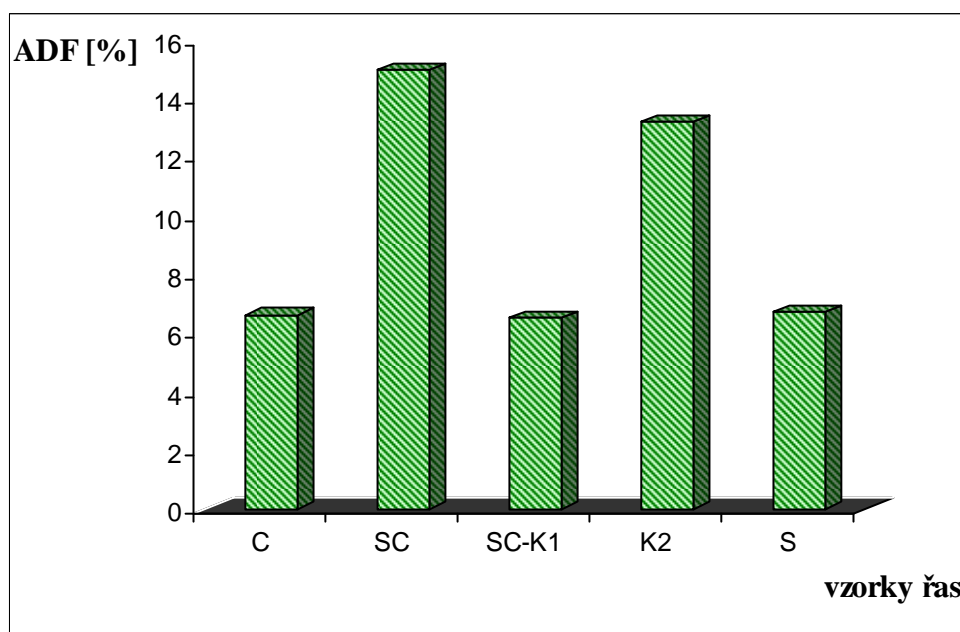
Obsahy ADF ve vzorcích sladkovodních řas jsou uvedeny v Tab. 8 a graficky jsou znázorněny na Obr. 16.

Tab. 8. Obsahy ADF ve vzorcích sladkovodních řas

Vzorky řas	Označení	Obsah ADF [%]
<i>Chlorella kessleri</i>	C	6,63 ± 1,42
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	SC	15,01 ± 1,97
<i>Scenedesmus</i> + kmen K1 (60 % + 40 %)	SC-K1	6,52 ± 0,51
kmen K2	K2	13,23 ± 2,37
<i>Spirulina platensis</i>	S	6,76 ± 0,74

Nejvyšší obsahy ADF byly stanoveny ve vzorcích řas *Scenedesmus quadricauda* 15,01 % a K2 13,23 %. V ostatních třech vzorcích bylo dosaženo nižších, velmi podobných hodnot ADF – *Spirulina platensis* 6,76 %, *Chlorella kessleri* 6,63 %, *Scenedesmus* + K1 6,52 %.

Ve všech vzorcích řas byly zjištěny nižší hodnoty obsahu ADF oproti hodnotám NDF.



Obr. 16. Grafické znázornění obsahu ADF ve vzorcích sladkovodních řas

8.1.4 Hemicelulosa

Obsah hemicelulos byl zjištěn odečtením hodnoty ADF od NDF. Pro stanovení ADF nebyl použit původní vzorek, ale nevysušený produkt po stanovení NDF.

Tento postup byl zvolen pro získání přesnějších hodnot obsahu hemicelulos. Literární zdroj [36] uvádí, že obsah hemicelulos zjištěný odečtením ADF od NDF je zatížen chybou,

pokud je ke stanovení ADF využit původní vzorek. Nepřesnost vzniká v důsledku toho, že jsou pektiny v neutrálním detergentu při stanovení NDF značně rozpustné a naopak v kyselém prostředí při stanovení ADF jsou poměrně stabilní. ADF je tak zvýšeno o jejich obsah, tudíž při prostém odečtení je obsah hemicelulos podhodnocen. Tento problém může být vyřešen pomocí tzv. sekvenční analýzy. Její podstata spočívá v tom, že se pro stanovení ADF nepoužívá původní vzorek, ale produkt, který zůstane po stanovení NDF. Pektiny jsou tak odstraněny ještě před vlastním stanovením ADF a nemohou zvyšovat výslednou hodnotu. Následným odečtením takto získané ADF od NDF je docíleno přesnějších výsledků obsahu hemicelulos.

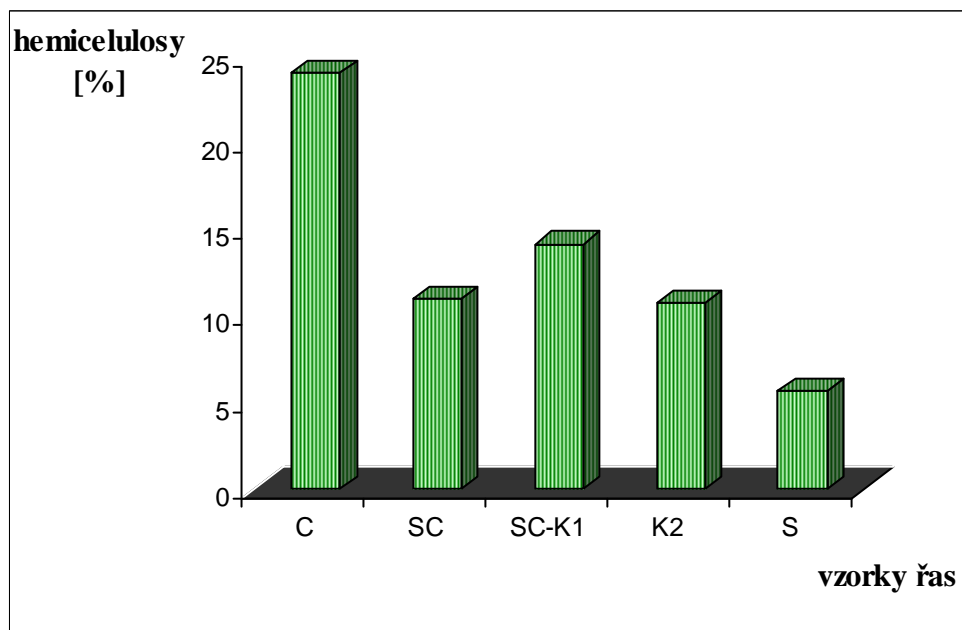
Obsahy hemicelulos ve vzorcích sladkovodních řas jsou uvedeny v Tab. 9 a graficky jsou znázorněny na Obr. 17.

Tab. 9. Obsahy hemicelulos ve vzorcích sladkovodních řas

Vzorky řas	Označení	Obsah hemicelulos [%]
<i>Chlorella kessleri</i>	C	24,09
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	SC	11,01
<i>Scenedesmus</i> + kmen K1 (60 % + 40 %)	SC-K1	14,19
kmen K2	K2	10,78
<i>Spirulina platensis</i>	S	5,64

Nejvyšší obsah hemicelulos byl zjištěn ve vzorku *Chlorella kessleri* 24,09 %. Ve směsném vzorku *Scenedesmus* + K1 bylo obsaženo 14,19 % hemicelulos. Ve vzorcích *Scenedesmus quadricauda* a K2 byl stanoven podobný obsah hemicelulos 11,01 % a 10,78 % v uvedeném pořadí. Nejnižší zastoupení hemicelulos vykazoval vzorek sinice *Spirulina platensis* 5,64 %.

Sekvenční analýzou bylo ve vzorcích dosaženo nižších obsahů ADF, než při použití přímé metody stanovení ADF. Příčinou byla rozpustnost pektinů v neutrálním detergentu při analýze NDF, která předcházela stanovení ADF.



Obr. 17. Grafické znázornění obsahu hemicelulos ve vzorcích řas

8.1.5 Acido-detergentní lignin

Acido-detergentní lignin (ADL) je tvořen pouze jedinou frakcí nerozpustné vlákniny – ligninem.

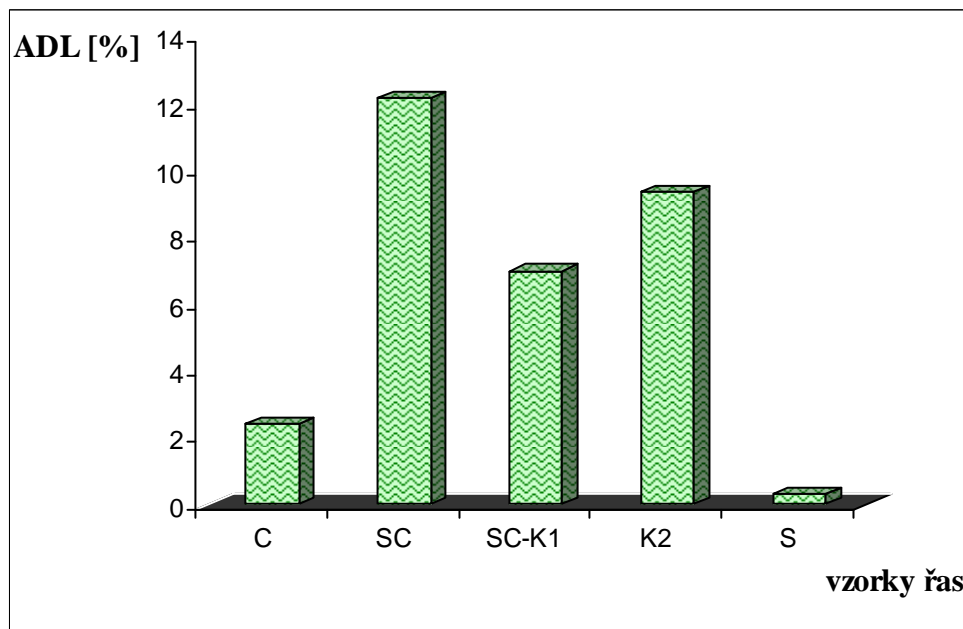
Obsahy ADL ve vzorcích sladkovodních řas jsou uvedeny v Tab. 10, graficky jsou znázorněny na Obr. 18.

Tab. 10. Obsahy ADL ve vzorcích sladkovodních řas

Vzorky řas	Označení	Obsah ADL [%]
<i>Chlorella kessleri</i>	C	2,39 ± 0,62
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	SC	12,18 ± 2,66
<i>Scenedesmus</i> + kmen K1 (60 % + 40 %)	SC-K1	7,00 ± 9,32
kmen K2	K2	9,35 ± 1,61
<i>Spirulina platensis</i>	S	0,33 ± 0,06

Obsahy ADL byly, stejně jako u ADF, nejvyšší ve vzorcích řas *Scenedesmus quadricauda* 12,18 % a K2 9,35 %. Směsný vzorek *Scenedesmus* + K1 obsahoval 7,00 % ADL. Ve vzorku řasy *Chlorella kessleri* bylo zjištěno 2,39 % ADL. Pouze 0,33 % ADL bylo stanoveno ve vzorku sinice *Spirulina platensis*.

Zjištěné obsahy ADL ve vzorcích sladkovodních řas byly nejnižší ze všech obsahů stanovovaných vláknin, neboť ADL tvoří pouze nerozpustný zbytek po hydrolýze ADF kyselinou sírovou.



Obr. 18. Grafické znázornění obsahu ADL ve vzorcích sladkovodních řas

8.2 Obsahy vláknin stanovené enzymatickou metodou

Použitá enzymatická metoda (kapitola 6) umožňuje stanovit jak vlákninu potravy (TDF), tak i její frakce – nerozpustnou vlákninu (IDF) a rozpustnou vlákninu (SDF). Jelikož nebyla laboratoř vybavena zařízením Fibertec, musel být postup stanovení modifikován.

Velmi problematická a zdlouhavá byla filtrace enzymové směsi. Póry filtračního papíru byly rychle ucpávány jemnými částicemi řas a průběh filtrace byl tudíž značně zpomalován. Vzorky řas při filtraci pěnily, což vedlo k obtížnému oddělení nerozpustné vlákniny od vlákniny rozpustné, která byla součástí filtrátu. Jelikož byla frakce rozpustné vlákniny získána ve velmi malých množstvích, bylo od jejího stanovení po první analýze upuštěno. Z tohoto důvodu nebyl ve vzorcích řas zjištěn ani obsah vlákniny potravy, který je dán součtem nerozpustné a rozpustné vlákniny. Vlastní stanovení vlákniny potravy nebylo u vzorků provedeno. Byl stanoven pouze obsah nerozpustné vlákniny z důvodu jeho srovnání s obsahem NDF, který byl zjištěn metodou využívající přístroj ANKOM.

Při stanovení nerozpustné vlákniny docházelo k určitým anomáliím u vzorku sinice *Spirulina platensis* oproti ostatním vzorkům řas. Před přidavkem amyloglukosidasy bylo měřeno pH roztoku, jehož hodnota se při stanoveních všech vzorků řas pohybovala v rozmezí 6,7 – 6,8. Roztok se *Spirulinou platensis* vykazoval hodnotu pH 7,5. U vzorku *Spirulina platensis* probíhala filtrace nejpomaleji a nejobtížněji.

Mineralizace pro stanovení obsahu dusíkatých látek byla u všech vzorků řas prováděna 1,5 hodiny. Po mineralizaci měly vzorky s nerozpustnou vlákninou světle zelené zabarvení. Vzorky s rozpustnou vlákninou byly zmineralizovány již po 0,5 hodině a měly světle modrou barvu.

8.2.1 Nerozpustná vláknina

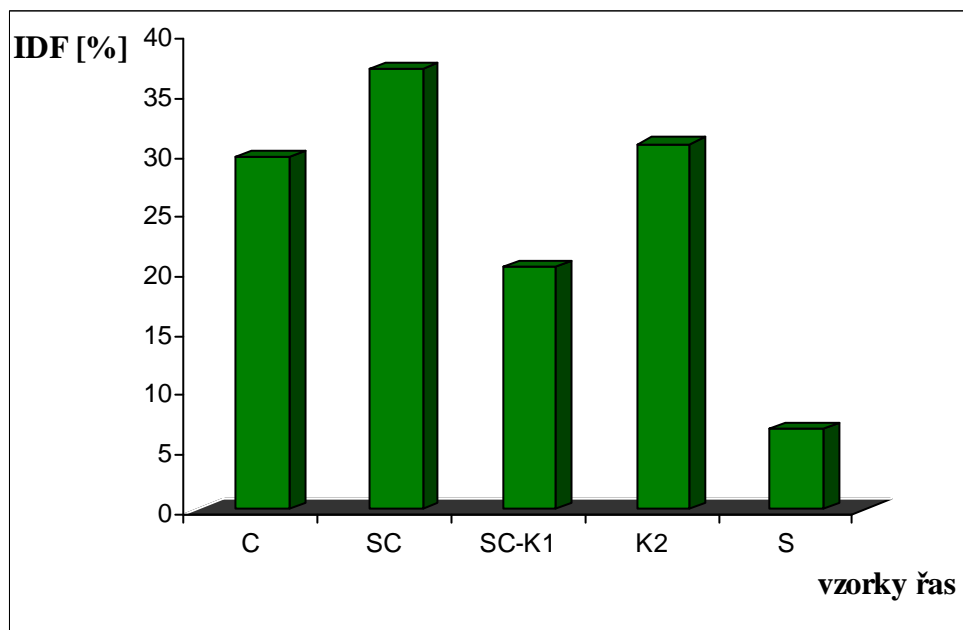
V hodnotě nerozpustné vlákniny (IDF) jsou zahrnuty obsahy celulosy, hemicelulosy a ligninu.

Obsahy IDF ve vzorcích sladkovodních řas jsou uvedeny v Tab. 11 a graficky jsou znázorněny na Obr. 19.

Tab. 11. Obsahy IDF ve vzorcích sladkovodních řas

Vzorky řas	Označení	Obsah IDF [%]
<i>Chlorella kessleri</i>	C	29,70 ± 0,02
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	SC	37,08 ± 0,27
<i>Scenedesmus</i> + kmen K1 (60 % + 40 %)	SC-K1	20,43 ± 0,78
kmen K2	K2	30,79 ± 2,27
<i>Spirulina platensis</i>	S	6,78 ± 0,35

Nejvyšší obsah IDF byl zjištěn ve vzorku řasy *Scenedesmus quadricauda* 37,08 %. Podobných výsledků bylo dosaženo u vzorků K2 a *Chlorella kessleri* s obsahy IDF 30,79 % a 29,70 % v uvedeném pořadí. Ve vzorku *Scenedesmus* + K1 bylo obsaženo 20,43 % IDF. Výrazně nižší obsah IDF byl stanoven ve vzorku sinice *Spirulina platensis* 6,78 %.



Obr. 19. Grafické znázornění obsahu IDF ve vzorcích sladkovodních řas

8.3 Srovnání metod použitých pro stanovení vlákniny

Stanovení vlákniny přístrojem ANKOM je omezeno na zjištění obsahu frakcí nerozpustné vlákniny (CF, NDF, ADF, ADL). Naproti tomu enzymatická metoda umožňuje stanovit jak vlákninu potravy, tak i zvláště její nerozpustnou a rozpustnou část.

Metodikou pro analýzu vlákniny, využívající přístroj ANKOM, byl odstraněn vliv obsluhy (lidský faktor) na variabilitu výsledků při extrakci a filtraci vzorků. Další výhody této metody byly spatřovány také ve vysoké kapacitě zpracovávaných vzorků (až 24 vzorků v rámci jednoho stanovení), eliminaci manipulace s horkými činidly, jednoduchosti ovládání přístroje a především časové nenáročnosti stanovení.

U enzymatické metody byla velmi problematická filtrace enzymové směsi, a proto bylo upuštěno od stanovení rozpustné vlákniny. Hlavní nevýhody této metody spočívaly, oproti předchozí metodě, ve značně delší době stanovení a vysoké pracnosti. U enzymatické metody bylo navíc nutno ve vzorcích stanovit obsah dusíkatých látek.

U vzorků vybraných druhů sladkovodních řas se tedy lépe osvědčilo stanovení vlákniny přístrojem ANKOM.

8.3.1 Srovnání obsahů vlákniny stanovených přístrojem ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer a enzymatickou metodou

U vzorků sladkovodních řas byly srovnány obsahy NDF stanovené přístrojem ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer s obsahy IDF zjištěnými enzymatickou metodou. Tyto druhy vlákniny představují nerozpustnou část vlákniny a zahrnují tudíž stejné frakce vlákniny – celulosu, hemicelulosy a lignin. Zároveň je u obou metod používána termostabilní α -amylasa.

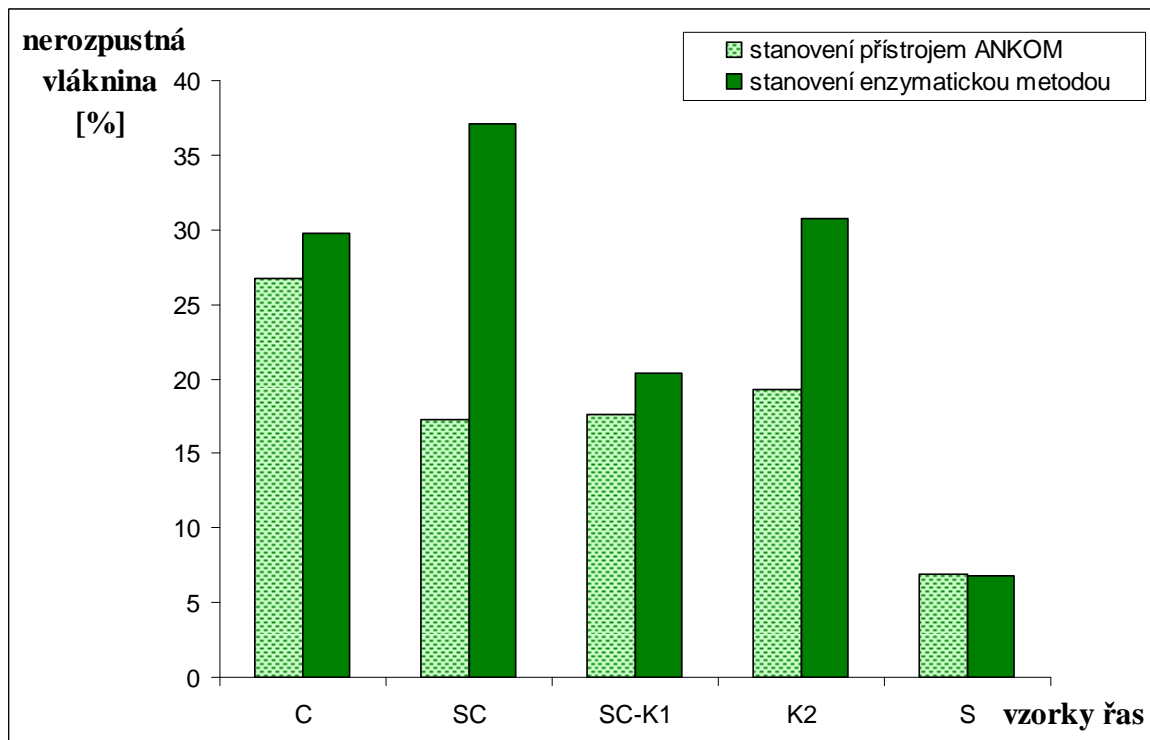
V Tab. 12 jsou zaznamenány hodnoty nerozpustné vlákniny získané pomocí výše uvedených metod. Obsahy vlákniny byly porovnány a graficky znázorněny (Obr. 20).

Tab. 12. Obsahy nerozpustné vlákniny ve vzorcích sladkovodních řas

Vzorky řas	Označení	Obsahy nerozpustné vlákniny [%]	
		Stanovení přístrojem ANKOM	Stanovení enzymatickou metodou
<i>Chlorella kessleri</i>	C	26,71 ± 3,02	29,70 ± 0,02
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	SC	17,29 ± 2,02	37,08 ± 0,27
<i>Scenedesmus + kmen K1</i> (60 % + 40 %)	SC-K1	17,57 ± 1,76	20,43 ± 0,78
<i>kmen K2</i>	K2	19,26 ± 2,04	30,79 ± 2,27
<i>Spirulina platensis</i>	S	6,91 ± 1,61	6,78 ± 0,35

Ve všech vzorcích řas byly stanoveny vyšší obsahy vlákniny při využití enzymatické metody. Výjimkou byl pouze vzorek sinice *Spirulina platensis*, u něhož byl zjištěn nepatrně vyšší obsah vlákniny metodou využívající přístroj ANKOM. Příčinou byly zřejmě ztráty vlákniny při filtraci, která probíhala u enzymatické metody velmi problematicky.

Přístrojem ANKOM bylo nejvyšší zastoupení vlákniny analyzováno ve vzorku *Chlorella kessleri*, zatímco enzymatickou metodou bylo nejvíce vlákniny zjištěno ve vzorku *Scenedesmus quadricauda*. Obě metody vykazovaly velmi podobné výsledky pouze u vzorku sinice *Spirulina platensis*. V tomto vzorku bylo obsaženo nejméně vlákniny, což souvisí s odlišným složením buněčné stěny sinic a řas.



Obr. 20. Grafické znázornění obsahu nerozpustné vlákniny ve vzorcích sladkovodních řas

8.4 Srovnání stanovených obsahů vlákniny ve vzorcích sladkovodních řas s údaji publikovanými v literárních zdrojích

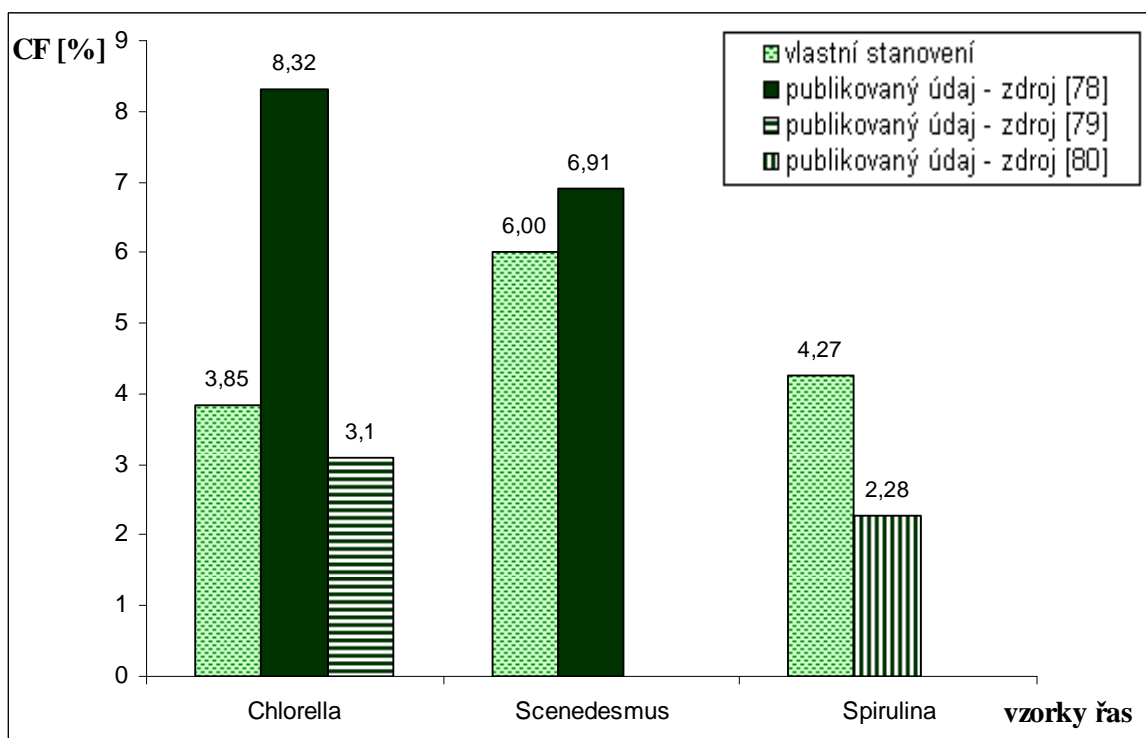
8.4.1 Srovnání obsahů hrubé vlákniny

Obsahy CF ve vzorcích *Chlorella kessleri* a *Scenedesmus quadricauda*, stanovené přístrojem ANKOM, byly srovnány s obsahy CF uvedenými v literárním zdroji [78] u vzorků sušených řas *Chlorella spp* a *Scenedesmus spp*. Zdroj neuveřejnil konkrétní metodu stanovení CF, ale pouze informaci, že bylo stanovení provedeno v souladu s AOAC metodami. Další literární zdroj [79] publikoval obsah CF pouze ve vzorku řasy *Chlorella*. Průměrná hodnota CF ve vzorku *Spirulina platensis*, zjištěná vlastním stanovením, byla srovnána s hodnotou CF, kterou uvedl literární zdroj [80] u sinice *Spirulina platensis*. Metody stanovení CF nebyly v literárních zdrojích popsány. Zjištěné obsahy vlákniny ve vzorcích řas jsou ovlivněny použitou metodou stanovení, tudíž bylo v některých případech dosaženo odlišných výsledků.

Ve vzorku *Chlorella kessleri* byl přístrojem ANKOM stanoven obsah CF 3,85 %, zatímco literární zdroj [78] uvedl téměř dvojnásobné množství CF 8,32 % ve vzorku *Chlorella spp*.

V literárním zdroji [79] byla publikována hodnota 3,1 % CF ve vzorku *Chlorella*. U vzorků *Scenedesmus quadricauda* a *Scenedesmus spp* bylo dosaženo podobných výsledků: 6,00 % a 6,91 % CF v uvedeném pořadí. Při vlastním stanovení byla ve vzorku *Spirulina platensis* zjištěna hodnota 4,27 % CF, literární zdroj [80] publikoval u této sinice hodnotu 2,28 % CF.

Výše zjištěné obsahy CF ve vzorcích *Chlorella*, *Scenedesmus* a *Spirulina* jsou graficky znázorněny na Obr. 21.



Obr. 21. Obsahy CF ve vzorcích *Chlorella*, *Scenedesmus* a *Spirulina*

Obsahy NDF, ADF a ADL ve sladkovodních řasách stanovených na přístroji ANKOM nebyly dosud publikovány.

Vzhledem k tomu, že kmeny řas *K1* a *K2* nebyly dosud taxonomicky určeny, nemohly být jejich obsahy vláknin srovnány s publikovanými údaji v literatuře.

ZÁVĚR

Zájem o problematiku vlákniny je celosvětově rozšířen, vychází nejen z řad odborníků, ale i laické veřejnosti, která se pod vlivem osvěty snaží žít zdravě, vyhýbat se škodlivým vlivům a preferovat zdravou výživu. V průmyslově rozvinutých zemích je v souvislosti s vysokým výskytem civilizačních chorob věnována fyziologickým účinkům vlákniny značná pozornost.

Charakter působení vlákniny v lidském organismu je ovlivněn více faktory, mezi které patří např. složení potravy obsahující vlákninu, typ a denní dávka vlákniny, individuální fyziologický profil konzumenta. Dostatečný příjem vlákniny vyvolává pocit sytosti, čehož je využíváno v redukčních dietách, eliminuje výskyt křečových žil a hemoroidů. Dále zabraňuje vzniku zácpy a průjmů. Rozpustná vláknina váže nadbytečnou vodu ze střev, zvětšuje objem stolice, zpomaluje vstřebávání cukru do krve a snižuje hladinu LDL cholesterolu v krvi. Nerozpustná vláknina podporuje činnost střev a vylučování rakovinotvorných a toxických látek z těla. Vláknina sehrává úlohu v prevenci a léčbě některých civilizačních nemocí jako obezita, diabetes II. typu, chronická zácpa, rakovina, ischemická choroba srdeční a další.

Vláknina byla stanovena ve vzorcích sladkovodních řas, které jsou souhrnně označovány pojmem „mikrořasy“. Z jejich biomasy jsou vyráběny doplňky stravy, které jsou zdrojem bílkovin, sacharidů, vlákniny, lipidů, vitaminů, minerálů a důležitých bioaktivních látek (antioxidantů, nenasycených mastných kyselin aj.). V současnosti se kultury mikrořas využívají také pro výrobu biopaliv, krmiv, případně pro zlepšení vlastností půdy či při bioremediacích. Světová zdravotnická organizace označila mikrořasy za „potravinu budoucnosti“.

Ve vzorcích sladkovodních řas byly přístrojem ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer stanoveny obsahy jednotlivých druhů vláknin: hrubá vláknina (CF), neutrálně-detergentní vláknina (NDF), acido-detergentní vláknina (ADF), acido-detergentní lignin (ADL). Enzymatickou metodou byly ve vzorcích řas zjištěny obsahy nerozpustné vlákniny (IDF).

Hodnoty NDF stanovené ve vzorcích řas byly značně vyšší než hodnoty CF, přestože složení obou druhů vláknin zahrnuje též nerozpustné frakce vlákniny (celulosu, hemicelulosy a lignin). Korelace mezi NDF a CF byla zřejmě ovlivněna podílem hemicelulosy a ligninu v jejich buněčné stěně. CF má obecně nízkou vypovídající schopnost

o kvalitě vlákniny. Příčinou jsou ztráty některých nestravitelných komponent, např. rozpustnost ligninu v alkáliích. Ve všech vzorcích řas byly zjištěny nižší hodnoty obsahu ADF (lignocelulosoový komplex) oproti hodnotám NDF. ADL je tvořen pouze jedinou frakcí nerozpustné vlákniny – ligninem, a proto byl ze stanovovaných druhů vláknin přítomen ve vzorcích řas v nejmenším množství.

Přístrojem ANKOM bylo zjištěno, že největší obsah CF (7,05 %) byl zastoupen ve směsném vzorku *Scenedesmus* + *K1*, NDF (26,71 %) a hemicelulosa (24,09 %) byly v největší míře obsaženy ve vzorku *Chlorella kessleri*, nejvíce ADF (15,01 %) i ADL (12,18 %) bylo analyzováno ve vzorku *Scenedesmus quadricauda*.

Enzymatickou metodou byl ve vzorcích řas stanoven obsah nerozpustné vlákniny (IDF). Nejvyšší obsah IDF byl zjištěn ve vzorku řasy *Scenedesmus quadricauda* (37,08 %).

U vzorků sladkovodních řas byly srovnány obsahy NDF stanovené přístrojem ANKOM s obsahy IDF zjištěnými enzymatickou metodou. Tyto druhy vlákniny představují nerozpustnou část vlákniny a zahrnují tudíž stejné frakce vlákniny – celulosu, hemicelulosu a lignin. Zároveň je u obou metod používána termostabilní α -amylasa. Ve všech vzorcích řas byly stanoveny vyšší obsahy vlákniny při využití enzymatické metody. Výjimkou byl pouze vzorek sinice *Spirulina platensis*, u něhož byl zjištěn nepatrně vyšší obsah vlákniny metodou využívající přístroj ANKOM. Příčinou byly zřejmě ztráty vlákniny při filtraci, která probíhala u enzymatické metody velmi problematičtě.

Přístrojem ANKOM bylo nejvyšší zastoupení vlákniny analyzováno ve vzorku *Chlorella kessleri*, zatímco enzymatickou metodou bylo nejvíce vlákniny zjištěno ve vzorku *Scenedesmus quadricauda*. Obě metody vykazovaly velmi podobné výsledky pouze u vzorku sinice *Spirulina platensis*. V tomto vzorku bylo obsaženo nejméně vlákniny, což souvisí s odlišným složením buněčné stěny sinic a řas.

U vzorků vybraných druhů sladkovodních řas se lépe osvědčilo stanovení vlákniny přístrojem ANKOM, neboť bylo oproti enzymatické metodě méně pracné a časově mnohem méně náročné. Obě metody však vyžadovaly při vlastním stanovení velkou přesnost.

Použité metody potvrdily, že by mohly být sladkovodní řasy použity jako doplňující zdroj vlákniny, a proto bych doporučila jejich začlenění do jídelníčku jako součást běžné stravy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CUI, S. W. *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications*. New York: CRC Press, 2005. ISBN 0-4893-1574-3.
- [2] ZAMRAZILOVÁ, E. *Vláknina potravy: význam ve výživě a v klinické medicíně*. Praha: Avicentrum, 1989. ISBN 08-092-89.
- [3] TUNGLAND, B. C., MEYER D. Nondigestible Oligo- and Polysaccharides (Dietary Fiber): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2002, 19, p. 73-92.
- [4] DE VRIES, J. V. On defining dietary fibre, *Proceedings of the Nutrition Society*. 2003, 62, p. 37-43.
- [5] *Směrnice komise 2008/100/ES ze dne 28. 10. 2008*. Úřední věstník ES, OJ L 285/9.
- [6] *Předpis č. 330/2009 Sb.* Sbírka zákonů ČR, 2009, částka 102, ze dne 25. 9. 2009.
- [7] BENEŠOVÁ, L. a kol. *Potravinářství '91*. Praha: Výzkumný ústav potravinářský, 1992. ISBN 85120-26-7.
- [8] KVASNIČKOVÁ, A. *Sacharidy pro funkční potraviny: probiotika-prebiotika-symbiotika*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2000. ISBN 80-7271-001-X.
- [9] SUNGSOO CHO, S., PROSKY, L., DREHER, M. *Complex Carbohydrates in Foods*. New York: Marcel Dekker, 1999. ISBN 0-8247-0187-9.
- [10] *Vláknina v potravinách*. Bratislava: Výskumný ústav potravinářský, 2003. ISBN 80-89088-27-9.
- [11] BUŇKA, F. NOVÁK, V. KADIDLOVÁ, H. *Ekonomika výživy a výživová politika I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. ISBN 80-7318-429-X.
- [12] *EFSA launches public consultation on Dietary Reference Values for carbohydrates, dietary fibre and fat* [online]. [cit. 2009-11-21]. Dostupný z WWW: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902778363.htm.

- [13] PÁNEK, J., POKORNÝ, J., DOSTÁLOVÁ, J., KOHOUT, P. *Základy výživy*. Praha: Svoboda Servis, 2002. ISBN 80-86320-23-6.
- [14] BERÁNKOVÁ, J. *Soudobý pohled na vlákninu potravy*. Informační centrum bezpečnosti potravin [online]. [cit. 2009-12-11]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=147&ch=13&typ=1&val=88134>>.
- [15] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. ISBN 80-7318-295-5.
- [16] ČOPÍKOVÁ, J. *Chemie a analytika sacharidů*. Praha: VŠCHT, 1997. ISBN 80-7080-306-1.
- [17] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. Praha: SNTL, 1983.
- [18] CAMY, S., MONTANARI, S., RATTAZ, A., VIGNON, M., CONDORET, J. S. Oxidation of cellulose in pressurized carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2009, 51, p. 188-196.
- [19] SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2003, 30, p. 279-291.
- [20] EBRINGEROVÁ, A., HROMÁDKOVÁ, Z., HEINZE, T. *Advances in Polymer Science: Hemicelulose*. Berlin: Springer, 2005. ISBN 978-3-540-26112-4.
- [21] DUMITRU, S. *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*. New York: Marcel Dekker, 2005. ISBN 0-8247-5480-8.
- [22] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie 2: Živý systém jako stroj*. Praha: Academia, 1992. ISBN 80-200-0441-6.
- [23] *The complex lignin polymer* [online]. [cit. 2009-11-05]. Dostupný z WWW: <http://www.biorenew.org/index.php?option=com_content&task=view&id=68>.
- [24] CARRAHER, CH. E., SEYMOUR, R. B. *Giant Molecules: Essential Materials for Everyday Living and Problem Solving*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. ISBN 0-471-27399-6.
- [25] *Polysacharidy* [online]. [cit. 2009-11-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/default.html>>.

- [26] PILLAI, C. K. S., PAUL, W. SHARMA, CH. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formativ. *Progress in Polymer Science*. 2009, 34, p. 641-678.
- [27] KALAČ, P. *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2001. ISBN 80-7040-520-1.
- [28] DOSTÁL, J., KAPLAN P. *Lékařská chemie II: Bioorganická chemie*. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2003. ISBN 80-210-2731-2.
- [29] ROP, O., VALÁŠEK, P., HOZA, I. *Teoretické principy konzervace potravin I: Hlavní konzervárenské suroviny*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. ISBN 80-7318-339-0.
- [30] IJIMA, M., NAKAMURA, K., HATAKEYAMA, T., HATAKEYAMA, H. Phase transition of pectin with sorbed water. *Carbohydrate Polymers*. 2000, 41, p. 101-106.
- [31] ODSTRČIL, J., ODSTRČILOVÁ, M. *Chemie potravin*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2006. ISBN 80-7013-435-6.
- [32] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin I*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-3-7.
- [33] KARMAKAR, P., GHOSH, T., SINHA, S., SAHA, S., MANDAL, P., GHOSAL, P. K., RAY, B. Polysaccharides from the brown seaweed *Padina tetrastratica*: Charakterization of a sulfated furan. *Carbohydrate Polymers*. 2009, 78, p. 416-421.
- [34] JIMÉNEZ-ESCRIG, A., SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effect on cholesterol metabolism. *Nutrition Research*. 2000, 20, p. 587-598.
- [35] GUDIÉL-URBANO, M., GOÑI, I. Effect of edible seaweeds (*Undaria pinnatifida* and *Porphyra tenera*) on the metabolic activities of intestinal microflora in rats. *Nutrition Research*. 2002, 22, p. 323-331.
- [36] RICHTER, M., TŘINÁCTÝ, J., HARAŽIM, J. Vývoj hodnocení obsahu vlákniny. *Krmivářství*. 2000, 4, s. 28-30.

- [37] LUTONSKÁ, P., PICHL, I. *Vláknina (Chemické zloženie, metódy stanovenia, význam vo výžive)*. Bratislava: Príroda, 1983.
- [38] KOPÁČOVÁ, O. *Vláknina potravy a nutriční hodnota potravin* [online]. [cit. 2009-11-22]. Dostupný z WWW: <<http://www.agroporadenstvi.cz/default.asp?ids=0&ch=207&typ=1&val=31558>>.
- [39] DAVÍDEK, J. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: SNTL, 1977.
- [40] CEIRWYN, S. J. *Analytical chemistry of foods*. New York: Chapman & Hall. ISBN 0-8342-1298-6.
- [41] NIELSEN, S. S. *Food analysis*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. ISBN 0-8342-1298-6.
- [42] INSTITUTE OF MEDICINE. *Dietary Reference Intakes: Proposed Definition of Dietary Fiber*. Washington: The National Academies Press, 2001. ISBN 0-309-07564-5.
- [43] THEANDER, O., AMAN, P., WESTERLUND, E., ANDERSON, R., PETTERSSON, D. Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and Klason lignin (The Uppsala Metod): collaborative study. *Journal of AOAC International*. 1995, 78, p. 1030-1044.
- [44] JUNG, H. J. G. Analysis of Forage Fiber and Cell Walls in Ruminant Nutrition, *The Journal of Nutrition*. 1997, 127, p. 810-813.
- [45] TEPER, I. ANKOM 220: nový přístup ke stanovení vlákniny. *Krmivářství*. 2000, 7, s. 20-21.
- [46] ANKOM²²⁰ *Fiber Analyzer: přístroj pro stanovení vlákniny využívající technologie filtračních sáčků* [online]. [cit. 2010-02-11]. Dostupný z WWW: <http://www.biopro.cz/_data/page/575/Fiber_Analyzer_-_P49.02-305.pdf>.
- [47] ANKOM²²⁰ *Fiber Analyzer* [online]. [cit. 2010-02-11]. Dostupný z WWW: <<http://www.eprotech.co.kr/ankom220.htm>>.
- [48] *FibertecTM 1023 (E)* [online]. [cit. 2010-02-11]. Dostupný z WWW: <http://www.milcom.cz/foss/fibertec_systems.php>.

- [49] JANKOVSKÝ, L. *Viry, prokaryota, řasy, houby a lišejníky: přehled systému, fylogeneze a ekologie*. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 1997. ISBN 80-210-1555-1.
- [50] KALINA, T., VÁŇA, J. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1036-1.
- [51] SVRČEK, M. A KOL. *Klíč k určování bezcévných rostlin*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1976.
- [52] VAN DEN HOEK, C., MANN, D. G., JAHNS, H. M. *Algae: An introduction to phycology*. New York: Cambridge University Press, 1995. ISBN 0-521-31687-1.
- [53] POULÍČKOVÁ, A., JURČÁK, J. *Malý obrazový atlas našich sinic a řas*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2001. ISBN 80-244-0242-4.
- [54] CHAPMAN, J., ROBERTS, M. *Biodiversity: The abundance of life*. New York: Cambridge University Press, 1997. ISBN 0-521-57794-2.
- [55] ETTL, H. *Grundriß der allgemeinen Alogologie*. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, 1980.
- [56] ROSYPAL, A KOL. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientina, 2003. ISBN 80-7183-268-5.
- [57] KALINA, T. *Systém a vývoj sinic a řas*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-611-2
- [58] MAMATHA, B. S., NAMITHA, K. K., SENTHIL, A., SMITHA, J., RAVISHANKAR G. A. Studies on use of Enteromorpha in snack food. *Food Chemistry*. 2007, 101, p. 1707-1713.
- [59] SUKOVÁ, I. *Mikrořasy-nevyčerpatelný zdroj bioaktivních látek* [online]. [cit. 2010-02-14]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=150&ch=13&typ=1&val=95959>>.
- [60] FOTT, B. *Sinice a řasy*. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1956.
- [61] CAMPBELL, N. A., REECE, J. B. *Biologie*, Brno: Komputer Press, 2006. ISBN 80-251-1178-4.

- [62] MARCUS, J. B. Cullinary Applications of Umami. *Food Technology*. 2005, 59, p. 24-30.
- [63] HAYWARD, P., NELSON-SMITH T., SHIELDS, CH. *Živočichové a rostliny evropského pobřeží*. Praha: Svojtka & CO., 2006. ISBN 80-7352-252-7.
- [64] KOUBOVÁ, D. *Řasy k ochraně rostlin* [online]. [cit. 2010-02-14]. Dostupný z WWW:
<<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=103&ch=1&typ=1&val=1341>>.
- [65] SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006, 101, p. 87-96.
- [66] BHATIA, A. *Encyclopaedia of health and nutrition*. New Delhi: Anmol publications, 1999. ISBN 81-261-0323-X.
- [67] SUKOVÁ, I. *Chlorelový-růstový faktor* [online]. [cit. 2010-02-14]. Dostupný z WWW:
<<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=150&ch=13&typ=1&val=36692>>.
- [68] DOSTÁL, P. *Evoluce a systém stélkatých organismů a cévnatých výtrusných rostlin*. Praha: Univerzita Karlova v Praze – pedagogická fakulta, 2005. ISBN 80-7290-201-6.
- [69] BARSANTI, L., GUALTIERI, P. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. New York: Taylor & Francis, 2006. ISBN 0-8493-1467-4.
- [70] *Chlorella kessleri*, Botanický ústav AV ČR v. v. i., Třeboň, CCALA – sbírka kultur autotrofních organismů [online]. [cit. 2010-02-15]. Dostupný z WWW:
<http://www.butbn.cas.cz/ccala/col_images/250.jpg>.
- [71] *Oddělení Chlorophyta – zelené řasy* [online]. [cit. 2010-02-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.sinicearasy.cz/pokr/Chlorophyta>>.
- [72] *Scenedesmus quadricauda*, Botanický ústav AV ČR v. v. i., Třeboň, CCALA – sbírka kultur autotrofních organismů [online]. [cit. 2010-02-15]. Dostupný z WWW: <http://www.butbn.cas.cz/ccala/col_images/464.jpg>.

- [73] CHALLEM, J. J. *Spirulina: The microscopic nutrient powerhouse and how it protect and restores health*. New Canaan: Keats Publishing, 1981. ISBN 0-87983-262-2.
- [74] VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira): Fysiology, Cell-biology and Biotechnology*. London: Taylor & Francis, 1997. ISBN 0-7484-0673-3.
- [75] JIMÉNEZ, C. COSSÍO, B. R., LABELLA, D., NIELL, F. X. The Feasibility of industrial production of Spirulina (Arthrospira) in Southern Spain. *Aquaculture*. 2003, 217, p. 179-190.
- [76] CONVERTI, A., LODI, A., SOLISIO, C. Cultivation of Spirulina platensis in a combined airlift-tubular reactor system. *Biochemical Engineering Journal*. 2006, 32, p. 13-18.
- [77] *Spirulina platensis*, sbírka kultur řas Texaské univerzity v Austinu [online]. [cit. 2010-02-16]. Dostupný z WWW: <<http://web.biosci.utexas.edu/utex/algaeDetail.aspx?algaeID=4806>>.
- [78] BADWY, T. M., IBRAHIM, E. M., ZEINHOM M. M. *Partial replacement of fish meal with dried microalga (Chlorella spp and Scenedesmus spp) in Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) diets*, 8. International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Egypt, 2008, p. 801-811.
- [79] LUBITZ, J. A. The Protein Quality, Digestibility, and Composition of Algae, Chlorella 71105. *Journal of Food Science*. 1963, 28, p. 229-232.
- [80] KAPOOR, R., MEHTA, U. Supplementary effect of spirulina on hematological status of rats during pregnancy and lactation. *Plant Foods for Human Nutrition*. 1998, 52, p. 315-324.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AACC	American Association of Cereal Chemists
ES	Evropské společenství
EHS	Evropské hospodářské společenství
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
CF	hrubá vláknina
DF	vláknina potravy
PF	rostlinná vláknina
NPPF	surová rostlinná vláknina
PPF	čistá rostlinná vláknina
UC	nestravitelné sacharidy
PX	plantix
CCX	complantix
PDPP	částečně stravitelné rostlinné polymery
PDB	částečně stravitelné biopolymery
GI	gastrointestinální
EFSA	European Food Safety Authority
TDF	vláknina potravy
IDF	nerozpustná vláknina
SDF	rozpustná vláknina
FBT	technologie filtračních sáčků
NDF	neutrálně-detergentní vláknina

ADF	acido-detergentní vláknina
ADL	acido-detergentní lignin
AOAC	Association of Analytical Communities
CGF	chlorelový růstový faktor

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Struktura celulosy	20
Obr. 2. Primární struktura 4-O-metyl-D-glukurono-D-xylanu	21
Obr. 3. Struktura ligninu	22
Obr. 4. Struktura chitinu	23
Obr. 5. Struktura pektinu	23
Obr. 6. Struktura buněčné stěny hnědých řas.....	26
Obr. 7. ANKOM ²²⁰ Fiber Analyzer	31
Obr. 8. Fibertec TM 1023 (E)	32
Obr. 9. Struktura jednobuněčné zelené řasy <i>Chlamydomonas</i>	36
Obr. 10. Struktura buněčné stěny zelené řasy <i>Scenedesmus quadricauda</i>	37
Obr. 11. <i>Chlorella kessleri</i>	42
Obr. 12. <i>Scenedesmus quadricauda</i>	43
Obr. 13. <i>Spirulina platensis</i>	44
Obr. 14. Grafické znázornění obsahu CF ve vzorcích sladkovodních řas	63
Obr. 15. Grafické znázornění obsahu NDF ve vzorcích sladkovodních řas	64
Obr. 16. Grafické znázornění obsahu ADF ve vzorcích sladkovodních řas	65
Obr. 17. Grafické znázornění obsahu hemicelulos ve vzorcích řas	67
Obr. 18. Grafické znázornění obsahu ADL ve vzorcích sladkovodních řas	68
Obr. 19. Grafické znázornění obsahu IDF ve vzorcích sladkovodních řas.....	70
Obr. 20. Grafické znázornění obsahu nerozpustné vlákniny ve vzorcích sladkovodních řas	72
Obr. 21. Obsahy CF ve vzorcích <i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus</i> a <i>Spirulina</i>	73

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Termíny používané pro vlákninu.....	15
Tab. 2. Obsah vlákniny ve vybraných potravinách.....	18
Tab. 3. Přehled řasových oddělení a jejich současné zařazení.....	34
Tab. 4. Chemické složení řas a účinky bioaktivních látek obsažených v řasách.....	39
Tab. 5. Analyzované vzorky řas.....	61
Tab. 6. Obsahy CF ve vzorcích sladkovodních řas.....	62
Tab. 7. Obsahy NDF ve vzorcích sladkovodních řas.....	63
Tab. 8. Obsahy ADF ve vzorcích sladkovodních řas.....	65
Tab. 9. Obsahy hemicelulos ve vzorcích sladkovodních řas	66
Tab. 10. Obsahy ADL ve vzorcích sladkovodních řas.....	67
Tab. 11. Obsahy IDF ve vzorcích sladkovodních řas	69
Tab. 12. Obsahy nerozpustné vlákniny ve vzorcích sladkovodních řas	71

