



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**IZOLACE A CHARAKTERIZACE PŘÍRODNÍCH BETA-
GLUKANŮ**

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BETA-GLUCANS OF NATURAL ORIGIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lizaveta Ratsilouskaya

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1677/2021
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Lizaveta Ratsilouskaya**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Akademický rok: 2021/22

Název bakalářské práce:

Izolace a charakterizace přírodních beta–glukanů

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) rešerše – přírodní producenti beta–glukanů, přehled a biologické účinky glukanů z různých zdrojů se zaměřením na řasy a kvasinky
- 2) optimalizace metod extrakce a analýzy beta–glukanů z různých typů biologického materiálu
- 3) izolace beta–glukanů z vybraných makro– a mikrořas a kvasinek
- 4) charakterizace biologických účinků a bezpečnosti izolovaných preparátů

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Lizaveta Ratsilouskaya
studentka

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá charakterizací přírodních beta-glukanů a dalších aktivních látek izolovaných z makrořas a kvasinek. Použité vzorky makrořas se od sebe liší pigmentem, původem a metodou extrakce.

Teoretická část se zaměřuje na druhy mořských řas a kvasinek, na beta-glukany, jejich zdroje a biologické účinky, dále na další biologicky aktivní látky (jako jsou např.: polyfenoly a antioxidanty) a nakonec na metody stanovení těchto biologicky aktivních látek.

V praktické části byly analyzovány vzorky vybraných makrořas, konkrétně vzorky Arame, Nori, Kombu, Wakame, Hijiki a Spaghetti. V práci byly připraveny vodné, ethanolové a acetonové extrakty těchto řas. Vodné extrakty byly použity pro spektrofotometrické stanovení fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivity metodou ABTS. Ethanolové a acetonové extrakty zmíněných makrořas byly použity pro spektrofotometrické stanovení obsahu celkového chlorofylu a karotenoidů.

Součástí práce byla také analýza obsahu beta-glukanů u makrořas a kvasinky *R. toruloides*. Vysoký obsah beta-glukanů měly řasy Arame a Nori a kvasinky *R. toruloides*. Obsah beta-glukanů byl v případě ostatních makrořas velice nízký.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mořské řasy, makrořasy, beta-glukany, fenolické látky, flavonoidy, antioxidační aktivita, chlorofyl, karotenoidy, biologické účinky.

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the characterization of natural beta-glucans and other active substances isolated from macroalgae and yeasts. The used macroalgae samples differ in the pigment, origin and method of algae processing.

The theoretical part focuses on seaweed and yeast species, beta-glucans, their sources and biological effects, other biologically active substances (such as polyphenols and antioxidants) and finally on methods for determining these biologically active substances.

In the practical part, samples of selected macroalgae were analyzed, namely samples of Arame, Nori, Kombu, Wakame, Hijiki and Spaghetti. Aqueous, ethanol and acetone extracts of these algae were prepared in this work. The aqueous extracts were used for spectrophotometric determination of phenolic substances, flavonoids and antioxidant activity by the ABTS method. Furthermore, ethanol and acetone extracts of said macroalgae were used to determine total chlorophyll and carotenoid content spectrophotometric.

The work also focused on beta-glucan content, analyzing macroalgae and yeast *R. toruloides*. Arame and Nori algae and *R. toruloides* were high in beta-glucans. However, beta-glucans were very low in other macroalgae.

KEYWORDS

Seaweed, macroalgae, beta-glucans, phenolic substances, flavonoids, antioxidant activity, chlorophyll, carotenoids, biological effects.

RATSILOUSKAYA, Lizaveta. *Izolace a charakterizace přírodních beta-glukanů* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-24]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139341>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ivana Márová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce prof. RNDr. Ivaně Márové za cenné rady a odborné vedení při experimentální i teoretické části. Dále bych ráda poděkovala konzultantce Ing. Veronice Schildové za trpělivost, odborné rady a čas, který mi věnovala.

OBSAH

1 Úvod.....	8
2 Teoretická část.....	9
2.1 Beta-glukany.....	9
2.1.1 Chemické vlastnosti beta-glukanů.....	9
2.1.2 Zdroje beta-glukanů.....	10
2.2 Významné biologické účinky beta-glukanů	11
2.2.1 Imunomodulační účinek	11
2.2.2. Kontrola hladiny cukru a cholesterolu v krvi	12
2.2.3 Protinádorová aktivita	13
2.2.4 Účinky beta-glukanů na kůži.....	14
2.2.4.1 Antioxidační aktivita.....	14
2.3 Aplikace beta-glukanů.....	15
2.3.1 Potravinářský průmysl.....	15
2.3.2 Medicínské aplikace	15
2.3.3 Kosmetika.....	15
2.4 Mořské řasy	16
2.4.1 Makrořasy.....	16
2.4.1.1 Kombu.....	16
2.4.1.2 Wakame	17
2.4.1.3 Nori	17
2.4.1.4 Arame.....	17
2.4.1.5 Hijiki	17
2.4.1.6 Mořské špagety	18
2.5 Kvasinky	18
2.5.1 <i>Rhodosporidium toruloides</i>	18
2.6 Analytické metody.....	19
2.6.1 Spektrofotometrické metody stanovení.....	19
2.6.1.1 Stanovení antioxidační aktivity.....	19
2.6.1.2 Stanovení celkových polyfenolů.....	20
2.6.1.3 Stanovení chlorofylu a karotenoidů	20
2.6.1.4 Stanovení flavonoidů	21

2.6.2 Enzymové metody stanovení.....	21
2.6.2.1 Stanovení beta-glukanů.....	21
3 Cíle práce.....	23
4 Experimentální část	24
4.1 Použité chemikálie.....	24
4.2 Použité přístroje a pomůcky	24
4.3 Příprava extraktů.....	25
4.3.1 Vodné, acetonové a ethanolové extrakty	25
4.4 Charakterizace vzorků	25
4.4.1 Stanovení celkových fenolických látek	25
4.4.2 Stanovení flavonoidů.....	25
4.4.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity	26
4.4.4 Stanovení celkového chlorofylu a karotenoidů	26
4.4.5 Stanovení beta-glukanů	26
5 Výsledky a diskuze.....	28
5.1 Stanovení celkových fenolických látek	28
5.2 Stanovení flavonoidů	29
5.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity	29
5.4 Stanovení celkového množství chlorofylu a karotenoidů.....	30
5.5 Stanovení beta-glukanů	34
6 Shrnutí výsledků a závěr	36
7 Literatura	38
8 Seznam zkratk	48

1 ÚVOD

V dnešní době se klade velký důraz na lidské zdraví. Lidé preferují posilování imunity a léčení pomocí např. extraktů z rostlin a bylin. V extraktech se nachází různé biologicky aktivní látky mezi, které se řadí např. beta-glukany. Až ve vážnějších případech navštěvují lékaře a léčí se metodami moderní medicíny.

Beta-glukany jsou jednou z prospěšných skupin látek, kterou obsahují ve své buněčné stěně jak mořské řasy, tak i kvasinky. Jsou to polysacharidy, které jsou známé svými účinky na imunitu a obecně na lidské zdraví. Jsou nezbytné pro diabetiky tím, že regulují hladinu cukru v krvi. Dále jsou beta-glukany známé tím, že zlepšují funkce žaludku a snižují cholesterol v krvi. Právě z tohoto důvodu mě zaujalo zkoumání mořských řas a kvasinek

Mořské řasy jsou velice dostupným zdrojem, protože se nacházejí v každém oceánu, moři, ale i ve sladkých vodách. Mezi sebou se liší přítomností prospěšných látek pro naše zdraví. Takovými látkami mohou být např. minerály (jako je jód, jehož nedostatkem často trpíme), vitaminy a provitaminy (provitamin A), fenolické látky, antioxidanty a polysacharidy. Díky těmto aktivním látkám řasy pomáhají posilovat imunitu, zlepšovat lidské zdraví a dodávají pokrmům jedinečnou nesrovnatelnou chuť, čímž nachází své využití v medicínském, potravinářském a kosmetickém průmyslu. Mezi významné zastupitele mořských řas patří např.: Arame, Nori a Wakame.

Kvasinky jsou mikroorganismy, které jsou pro člověka a jeho zdraví také velmi užitečným zdrojem prospěšných látek. Extrakty z kvasinek se využívají v medicíně pro produkci vitamínů, enzymů, bílkovin, antibiotik a také pro produkci piva, droždí a vína v potravinářském průmyslu. Mezi významné zastupitele kvasinek patří např.: *S. cerevisae* a *R. toruloides*.

V rámci této bakalářské práce budou charakterizovány vybrané mořské řasy a kvasinky, některé z nich byly zmíněny výše. Bude charakterizováno zejména jejich složení, a to z hlediska obsahu aktivních látek, jako jsou beta-glukany, polyfenoly, flavonoidy, chlorofyl, karotenoidy a antioxidační aktivita.

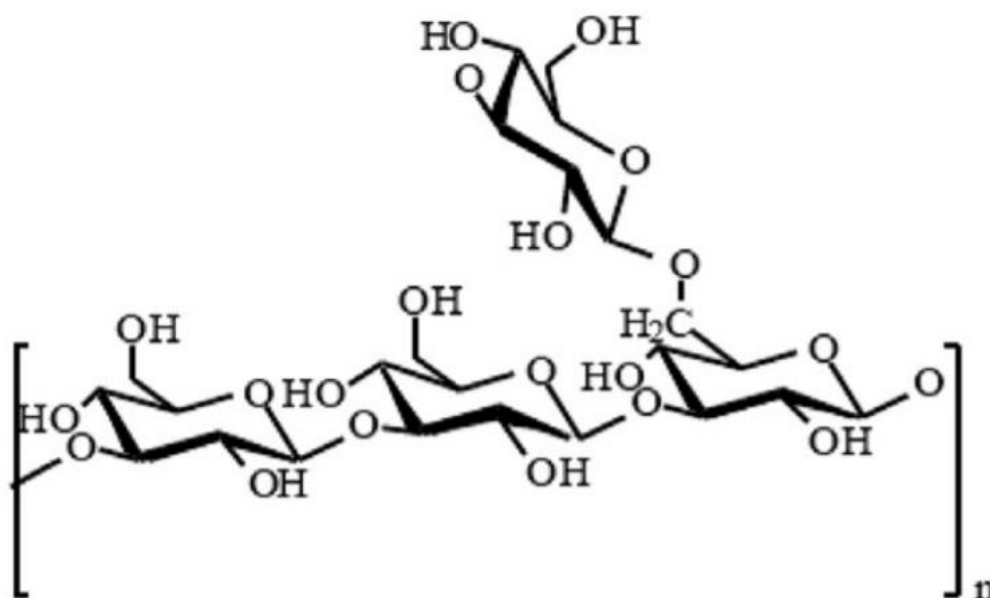
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Beta-glukany

Beta-glukany jsou označovány jako přírodní polysacharidy a skládají se z více než 250 000 glukosových jednotek spojených beta-glykosidickými vazbami. Beta-glukany lze nalézt v buněčné stěně různých přírodních zdrojů, jako jsou např.: mořské řasy, houby, bakterie, kvasinky a obiloviny např.: ječmen a oves. V průběhu let se beta-glukany těší velké pozornosti zejména díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem a biologickým účinkům na lidské tělo. Přírodní polysacharidy vykazují široké spektrum biologických vlastností včetně protinádorových, imunomodulačních a protizánětlivých vlastností [1][2].

2.1.1 Chemické vlastnosti beta-glukanů

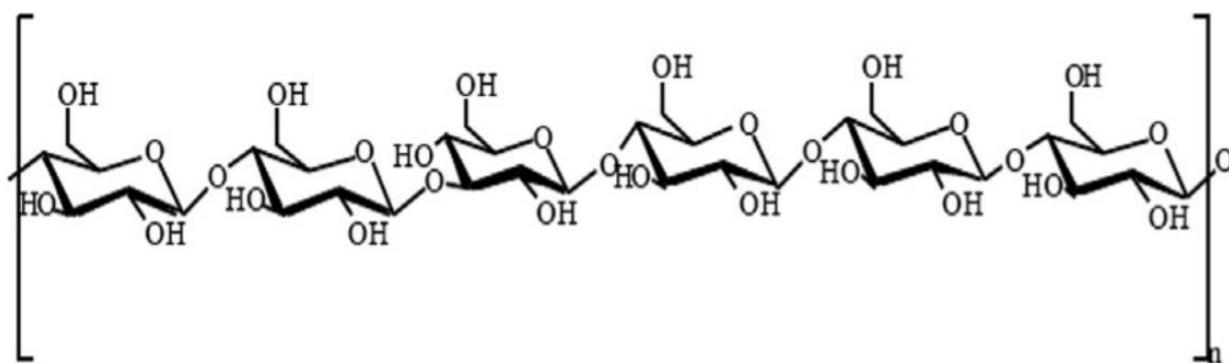
Z chemického hlediska jsou beta-glukany neškrobové polysacharidy s glukosovými zbytky buď v lineárních řetězcích, nebo více rozvětvených strukturách, přičemž glukosové jednotky jsou rozvětvené několika způsoby v závislosti na zdroji původu. U beta-glukanů získaných z obilí jsou řetězce zcela lineární, skládají se z opakujících se celulóзовých oligomerů spojených prostřednictvím vazeb beta-(1→3). K větvení dochází pomocí vazby beta-(1→4) spojených glukosových zbytků. V případě mikrobiálních beta-glukanů ke vzniku postranního řetězce dochází prostřednictvím vazeb beta-(1→6) (viz. *obrázek 1*) [3]. Celulóza je například beta-glukan spojený beta-(1→4) vazbami (viz. *obrázek 2*); kurdlan je beta-glukan spojený s beta-(1→3) vazbami; beta-glukan z lišejníku může obsahovat buď beta-(1→3) (1→4) nebo beta-(1→3) (1→6) vazby [1]. Navíc beta-glukany mohou tvořit velké cylindrické molekuly obsahující až 250 000 glukózových jednotek [3].



Obrázek 1 Struktura (1→3) (1→6)-beta-glukanů [1]

Molekulová hmotnost beta-glukanů je v rozsahu od desítek do několika tisíců kDa [4]. Rozpustnost beta-glukanů souvisí se stupněm polymerace (SP) molekuly. Beta-glukany jsou zcela nerozpustné ve vodě, když $SP > 100$. Rozpustnost se zvyšuje se snižujícím se SP [5]. Vlastnosti beta-glukanů, jako je rozpustnost, molekulová hmotnost, terciární struktura, stupeň větvení a náboj polymeru jsou ovlivněny jeho původem. Všechny výše zmíněné vlastnosti mají vliv i na stupeň imunomodulačních a protirakovinných účinků jednotlivých beta-glukanů [2][3]. Imunomodulační a protirakovinná aktivita beta-glukanů je založena i na jejich konformační struktuře. Tak např. beta-glukany s beta-(1→3) vazbami a s beta-(1→6) vazbami mají silný imunitní účinek a vyšší prozánětlivou stimulaci signálních proteinů cytokinů [2].

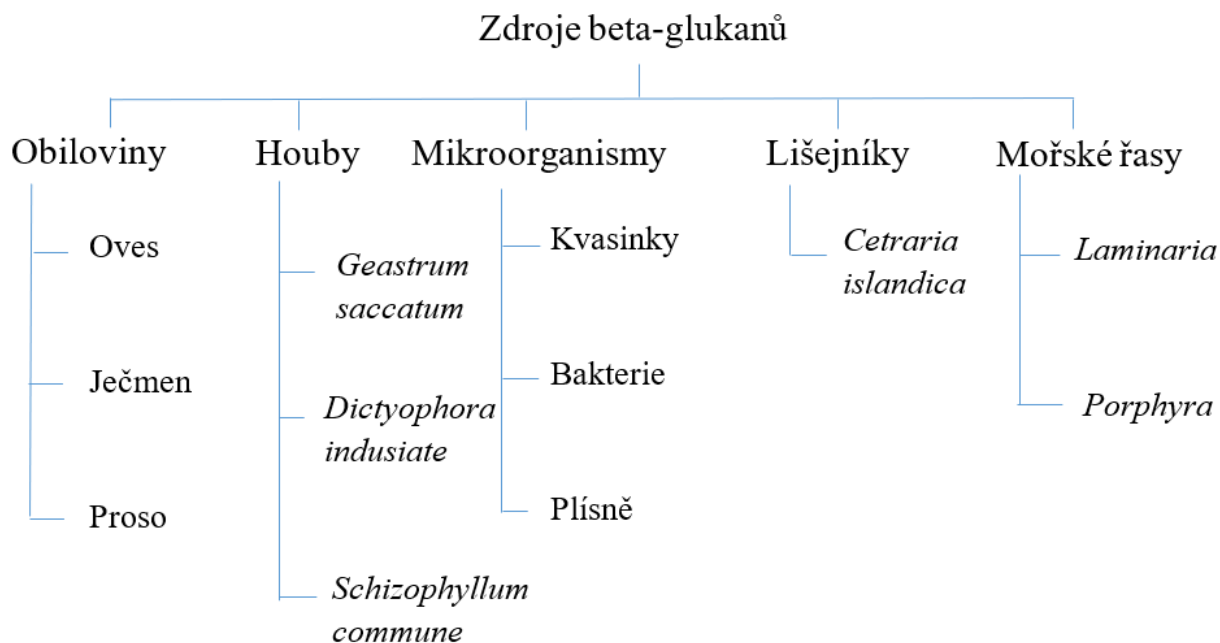
Dále bylo prokázáno, že jsou beta-glukany s beta-(1→3) řetězcem a s beta-(1→6) řetězcem účinnější při systematickém posílení imunitního systému než samotný beta-(1→3) lineární řetězec. Makromolekulární struktura beta-glukanů závisí jak na jejich zdrojích, tak na metodách izolace a postupu extrakce. To všechno ovlivňuje především distribuci a délku postranních řetězců, tvořících složité terciální struktury stabilizované mezi řetězcovými vodíkovými vazbami [3].



Obrázek 2 Struktura (1→4) beta-glukanů [1]

2.1.2 Zdroje beta-glukanů

Existuje velký počet přírodních zdrojů beta-glukanů. Z historických důvodů nejznámějším zdrojem beta-glukanů jsou obiloviny. S postupem času se vědcům podařilo objevit beta-glukany i v mikrobiálních zdrojích, v některých houbách, lišejnících a také v mořských řasách. Beta-glukany se konkrétně nacházejí v buněčné stěně. Na *obrázku 3* jsou přehledně znázorněné možné přírodní zdroje beta-glukanů [6].



Obrázek 3 Přehled přírodních zdrojů beta-glukanů [6]

2.2 Významné biologické účinky beta-glukanů

Beta-glukany patří k biologicky aktivním látkám, které pozitivně ovlivňují lidský organismus. Takovéto látky dokážou posílit imunitu, snížit hladinu cholesterolu v krvi, pomoci při léčbě nádorových onemocnění, udržovat normální hladinu cukru v krvi a omladit pleť [2].

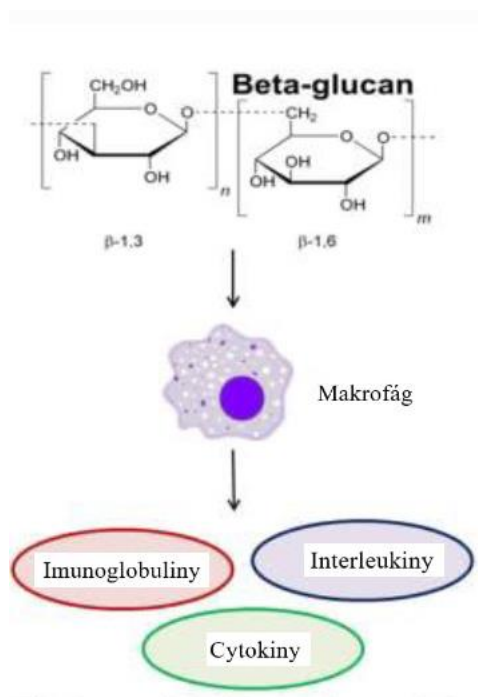
2.2.1 Imunomodulační účinek

Poruchy imunitního systému, způsobené mikroorganismy, vedou k rozvoji chronických onemocnění. Z toho důvodu je pro udržení normálního fungování těla nutné stimulovat ochranné schopnosti organismu. Beta-glukany jsou právě takovým imunomodulátorem, který zlepšuje imunitní odpověď [7].

Imunomodulační funkce beta-glukanů je obecně označována jako nezávislá mikrobiota, kvůli své schopnosti se vázat přímo na imunitní buňky. Na membránách makrofágů jsou speciální receptory pro připojení beta-glukanů. Na obrázku 4 je znázorněna aktivace makrofágů navázáním beta-glukanů na receptory a uvolnění imunoglobulinů, interleukinů a cytokinů k obraně hostitele proti různým patogenním stavům [2][8]. Kromě aktivace cytotoxických makrofágů je imunomodulační účinek beta-glukanů pravděpodobně spojen s aktivací T-helperů a NK buněk (přirození zabíječi) [5].

Vzhledem k tomu, že beta-glukany jsou tráveny a fermentovány různými bakteriemi ve střevě, imunomodulační účinek beta-glukanů může být způsoben i mikrobiálním zapojením. Střevní mikroflóra je mediátorem imunitní odpovědi. Důvodem toho je:

- probiotické působení beta-glukanů, díky kterému dochází ke změnám v biomase mikrobioty ve střevech
- střevní mikroflóra pomáhá přeměňovat nestravitelné oligosacharidy beta-glukanů na biologické aktivní mastné kyseliny s méně než šesti atomy uhlíku [2][8]



Obrázek 4 Mechanismus imunomodulační aktivity beta-glukanů prostřednictvím střevní mikroflóry [2]

2.2.2. Kontrola hladiny cukru a cholesterolu v krvi

Diabetes mellitus, též cukrovka, je chronické metabolické onemocnění způsobené nedostatkem produkce inzulínu nebo neúčinným působením tohoto hormonu, což vede k chronické hyperglykémii a ke kardiovaskulárnímu onemocnění, což patří mezi nejzávažnější komplikace cukrovky [9]. Inzulín je hlavním hormonem regulujícím pokles glukózy v krvi. Relativní riziko nalezení kardiovaskulárních onemocnění u pacientů s cukrovkou je 2–4krát vyšší než u pacientů, které ji nemají. Při kontrole komplikací způsobených cukrovkou byla prokázána skutečnost, že každé 1% zvýšení glykovaného hemoglobinu zvyšuje riziko kardiovaskulárního onemocnění přibližně o 18 %. Tudíž bylo zjištěno, že diabetici s kardiovaskulárními onemocněními mají 2–3krát vyšší úmrtnost než pacienti bez cukrovky [10].

Byly provedené pokusy na zvířatech a dále i klinické pokusy, které prokázaly, že přírodní beta-glukany snižují hladinu glukózy v krvi po perorálním podání [11]. Ve všech fázích studie byly použity nepřečištěné beta-glukany, a tedy nebyla identifikována aktivní složka. Nicméně přípravky z bazidiokarpu *Agaricus blazei* byly štěpeny endo-(1,6)-beta-glukanasou z *Bacillus megaterium* a výsledné di- a trisacharidy

měly dvojnásobek antidiabetické aktivity vykazované původními beta-glukany, což ukazuje, že jejich odvozené oligosacharidy jsou účinnými látkami [10].

Regulace glukózy v krvi může probíhat několika způsoby. Zaprvé může docházet ke zpomalení resorpce jednotlivých cukrů tak, že beta-glukany velmi dobře vážou vodu, tím dochází ke zvětšení objemu a zvýšení viskozity střevního obsahu. Z toho důvodu nastává zpomalení vstřebávání sacharidů do krevního oběhu a zároveň i k poklesu cholesterolu v krvi [12]. V dalších studiích bylo zjištěno, že beta-glukany dokážou snížit tělesnou hmotnost u jedinců s cukrovkou II. typu. Výsledky byly pozorovány při použití dávek vyšších než 3 g na osobu za den po dobu nejméně tří týdnů. Vláknina způsobuje zvýšenou viskozitu tráveniny, zpomaluje vyprazdňování žaludku, to vyvolává u jedinců pocit sytosti, což vede k nižší spotřebě energie. Dále bylo zjištěno, že dávky 4–6 gramů za den zvyšují hladiny pankreatického peptidového hormonu PYY33 souvisejícího se sytostí a mozkovou signalizací spokojenosti [9].

2.2.3 Protinádorová aktivita

Beta-glukany také vykazují antikarcinogenní aktivitu. Dokážou zabránit onkogenezi, a to díky ochrannému účinku proti silným genotoxickým karcinogenům. Protinádorový účinek je spojen s imunostimulačním účinkem beta-glukanů. Tak jako imunostimulační činidlo, které působí prostřednictvím aktivace makrofágů a cytotoxicity NK buněk, může beta-glukan inhibovat růst nádoru i ve stádiu propagace [7]. Navíc beta-glukany jsou prospěšné používat i při podpoře léčby rakoviny pacientů podrobených chemoterapií a radiační terapii, aby se zlepšil imunologický stav a snížily se nežádoucí účinky, které mohou ovlivnit zdravé tkáně [5].

Existuje určitá vazba mezi chemickými a fyzikálními vlastnostmi a intenzitou protinádorového účinku beta-glukanů. Ve velkém množství klinických studií o důkazu protinádorové aktivity byly použity lentinan a schizophyllan. Jedná se o polysacharidy se stejnou základní strukturou beta-glukanů, liší se pouze postranními glykosidovými větvemi, což ukazuje na důležitost struktury beta-glukanů s beta-(1→3) vazbami a s beta-(1→6) vazbami pro protinádorovou aktivitu [5].

Studie jednoho rozpustného a druhého částicového beta-glukanu extrahovaného ze *S. cerevisiae* prokázaly, že oba byly schopny inhibovat růst buněk karcinomu mléčné žlázy a melanomu B16, a také zvýšit přežití myši s podkožními nádorovými implantáty [5].

Další studie se zabývaly inhibiční aktivitou chemicky modifikovaných beta-glukanů z *Volvariella volvacea* na růst myších transplantovaných nádorů. Konverze glykosylových skupin substituovaných na O-6 atomech na odpovídající polyhydroxylové skupiny poskytla významné zvýšení původních aktivit jak na alogenních, tak na syngenních nádorech. Také konverze epoxidových skupin na hydrofilní glycerolové skupiny výrazně zvýšila protinádorovou aktivitu [1].

Studie z Norska zjistila, že beta-glukany mají účinky i na prevenci rakoviny tlustého střeva [13]. V těchto studiích byly použity výše zmíněné lentinan a schizophyllan a další

beta-glukany jako jsou grifolan a skleroglukan, které byly extrahovány z hub. Výsledky ukázaly, že tyto beta-glukany inhibovaly růst rakovinových buněk v tlustém střevě prostřednictvím produkce prozánětlivých cytokinů, aktivaci leukocytů a metastáz a inhibice růstu nádoru [2].

Byla testována rovněž antikarcinogenní aktivita dvou léčivých hub *Ganoderma lucidum* a *Tricholoma lobayense* proti buněčné transformaci vyvolané definovaným *Ras* onkogenem [14]. Proteiny *Ras* hrají klíčovou roli v regulaci buněčného růstu a v rozvoji rakovinového bujení. Tato studie prokázala, že extrakty z hub, obohacené o polysacharidy, mohou inhibovat buněčnou transformaci indukovanou definovaným onkogenem prostřednictvím nové necytocidní cesty. V této studii byly maligně transformované *Ras* buňky inhibovány během začáteční fáze transformace a byly stejně inhibovány, když byly stabilně transformované buňky smíchány s normálními buňkami. To znamená, že inhibiční účinek houbových extraktů proti *ras*-transformovaným buňkám vyžaduje přítomnost normálních buněk [7].

2.2.4 Účinky beta-glukanů na kůži

Dalším účinkem beta-glukanů je velmi silný lokální účinek na pokožku, zejména na obličej [15]. Různé studie o účincích přírodního beta-glukanu získaného z obilovin a mikroorganismů na podporu zdraví pokožky uvádí, že beta-glukany dokážou bojovat s vráskami, s různým poškozením pokožky a jsou schopné poskytnout bělicí účinek pokožky díky své antioxidační aktivitě, aktivitě proti vráskám, díky pohlcování ultrafialového záření a díky svým hydratačním vlastnostem. Navíc beta-glukany jsou účinné při hojení ran a na popáleniny [2].

Pillai, Redmond a Roding (2005) zkoumali hloubku průniku beta-glukanů extrahovaných z ovsa do modelu lidské kůže a jejich účinnost při redukci vrásek [16]. Vědci zjistili, že beta-glukany pronikly hluboko do pokožky. Výzkum podporuje použití beta-glukanů v péči a udržování zdravé pokožky a kosmetické ošetření na potlačení příznaků stárnutí [1].

Park a kol. (2001) získali beta-glukany s beta-(1→3) vazbami a s beta-(1→6) vazbami z kultury kapalného mycelia *S. commune*. Výsledky prokázaly, že tyto glukany mohou oddálit stárnutí pokožky, poskytnout bělicí účinek pokožky a účinně léčit poškození pokožky [1].

Ve studii Medeiros a kol. (2013) byly zkoumané účinky beta-glukanů z pekařských droždí na hojení ran u lidských bérceových vředů [17]. V důsledku toho bylo pozorováno zlepšení hojení vředů a zvýšená epitelální hyperplazie, stejně jako zvýšený počet zánětlivých buněk, angiogeneze a proliferace fibroblastů [1][17].

2.2.4.1 Antioxidační aktivita

Za normálních podmínek je v lidském organismu udržována rovnováha mezi počtem vznikajících a reaktivních forem kyslíku. Narušení této rovnováhy může být způsobeno faktory prostředí (exogenní zdroje), jako je stres, UV záření, pesticidy a průmyslové

chemikálie. Ve chvíli, kdy nastane narušení rovnováhy a produkce volných radikálů narůstá, tak nastává oxidační stres [18]. Je dokázáno, že oxidační stres je jedním z hlavních mechanismů stárnutí kůže a dermatologických poškození pokožky, proto fytochemikálie s prokázanou antioxidační aktivitou by mohly být užitečné pro léčbu mnoha dermatologických stavů a také stárnutí kůže [15].

Antioxidační aktivita beta-glukanů byla zkoumaná velkým množstvím vědců různými metodami, přitom i samy beta-glukany byly extrahovány z různých přírodních zdrojů. Tak například Kogan a kol. (2005) hodnotil antioxidační vlastnosti kvasinek beta-glukanů s beta-(1→3) vazbami pomocí elektronové paramagnetické rezonanční spektroskopie [19]; Guerra Doreet a kol. (2007) studoval protizánětlivou a antioxidační aktivitu extraktu bohatého na beta-glukany z houby *Geastrum saccatum* pomocí testů peroxidace superoxidových radikálů, hydroxylových radikálů a lipidů [20].

2.3 Aplikace beta-glukanů

Beta-glukany našly své využití v potravinářském průmyslu, v medicínských aplikacích a kosmetice [1].

2.3.1 Potravinářský průmysl

Beta-glukany se používají v potravinářském průmyslu v podobě aglomerovaných potravinářských aditiv nejčastěji extrahovaných z obilovin nebo hub. Taková aditiva jsou schopná vylepšit fyzikální vlastnosti a chuť produktů. Vědci ze Španělska a Íránu optimalizovali recepturu prebiotické klobásy a přišli k závěru, že beta-glukan má vydatný vliv na fyzikální a senzorické vlastnosti uzeniny [21]. Studie z Kanady zjistila, že jogurty obohacené beta-glukanem a pektinem vykazovaly rychlejší proteolýzu, nižší uvolňování velkých peptidů a vyšší podíl volných aminokyselin než jogurty bez přidaných beta-glukanů. Takže přidání beta-glukanu k mléčným výrobkům má za následek snížení cholesterolu a kalorií modifikovaných výrobků [1].

2.3.2 Medicínské aplikace

Beta-glukany se široce používají v medicínských aplikacích [22]. Cyklické glukany lze použít jako obvazový materiál díky jejich většímu průměru dutiny. Komplexy beta-glukanů a chitosanů mají využití v podobě průhledné krycí folie na rány, která prokazuje srovnatelnou nebo lepší terapeutickou účinnost než komerční obvazy. Studie z Jižní Karolíny dokázala, že beta-glukany významně snižují poúrazovou bolest a tím výrazně zjednodušují péči o rány u pacientů. Navíc beta-glukany jsou prospěšnými sloučeninami i při léčbě popálenin, a to díky svému účinku proti oxidativnímu poškození tkáně [1].

2.3.3 Kosmetika

Beta-glukany se již dlouho využívají jako přídavek v kosmetických krémech, mastích, práscích, emulzích a suspenzích. Lze je aplikovat na pokožku díky jejich účinkům, jako je např.: zvyšování produkce kolagenu, snížení počtů vrásek, prevence proti celulitidě, akné, dermatitidě, ekzémů a lupence. Momentálně je na trhu hodně kosmetických produktů,

které ve svém složení obsahují účinné množství beta-glukanů [1]. Ke značkám, které se zabývají výrobou daných kosmetických produktů a jsou přítomny na Českém trhu, patří například Mádara a Mossa.

2.4 Mořské řasy

V průběhu mnoha století byly v celé Asii, v Karibiku a na Britských ostrovech, na Dálném východě, v Irsku, Indii, u pobřeží Chile a také v Kanadě, mořské řasy aktivně konzumovány jako samostatný čerstvý produkt, potravinářská přísada a koření. Také byly používány k léčebným účelům, v kosmetice, a dokonce i v zemědělství jako vynikající přírodní hnojivo [23]. Momentálně mořské řasy nacházejí své uplatnění ve všech odvětvích biotechnologií, např.: při bioremediaci odpadních vod nebo jako zdroj biomasy pro produkci biopaliv. Také se využívají v potravinářském, kosmetickém a medicinském průmyslu díky svým biologickým aktivitám, jako jsou antimikrobiální, antivirová, antioxidační, antidiabetická, protirakovinná, protizánětlivá, hepatoprotektivní, kardioprotektivní, imunomodulační a neuroprotektivní aktivity [23][24]. Biologická aktivita mořských řas spočívá v přítomnosti sekundárních metabolitů, polysacharidů, proteinů, lipidů, aminokyselin, minerálů a některých vitamínů [25]. Zajímavé je, že halogenace metabolitů může mít souvislost s přítomností chloridových, bromidových a jodidových iontů v mořské vodě [24][25]. Řasy se mohou dělit na základě velikosti na makrořasy (dosahují až 60 metrů) a mikrořasy (mikrometry) a na základě přítomnosti pigmentů na zelené, červené a hnědé [24].

2.4.1 Makrořasy

Makrořasy jsou mnohobuněčné autotrofní mořské organismy, které se mohou vznášet jako volně žijící formy pod vodní hladinou nebo jsou připevněny k tvrdým substrátům, jako jsou skály. Velkoplošné autotrofní řasy hrají důležitou roli v pobřežních ekosystémech: poskytují stanoviště mnoha druhům, vytvářejí korálovou mikrobiální ekologii, chrání organismy před bouřemi, snižují deoxygenaci, emise CO₂, acidifikaci a udržují biogeochemické koloběhy [26].

2.4.1.1 Kombu

Mořské řasy Kombu (lat. *Laminaria japonica*, LJP), patřící do rodu *Laminaria*, jsou široce rozšířené na severní polokouli v Číně, Japonsku a Koreji a rostou hlavně na útesech mořského dna v Tichém oceánu a severních pobřežních oblastech Atlantiku. Dané řasy patří do čeledi hnědých mořských řas a jsou prospěšné jako zdravotní složky. LJP obsahují takové funkční látky, jako jsou polysacharidy, jód, vitamíny, mannitol, minerální prvky a další látky, které jsou schopny vychytávat a/nebo neutralizovat oxidační sloučeniny, včetně fenolických sloučenin, sulfatovaných polysacharidů a proteinů. Účinky, které vykazují řasy Kombu jsou různorodé např.: snižování otoků, odstraňování hlenů, hubnutí a léčení onemocnění z nedostatku jódu. Díky těmto vlastnostem mohou být řasy použité jako přírodní konzervační látky, bělicí činidla, porézní uhlíkové materiály a Pickeringové emulze. Zajímavé je, že Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů

konstatovala, že za posledních 10 let roční produkce řasy *L. japonica* v Číně nabrala 83–87 % celosvětové produkce [27][28].

2.4.1.2 Wakame

Undaria pinnatifida, které mají běžný název Wakame, jsou jedny z široce konzumovaných hnědých mořských řas a jsou bohatým zdrojem nutričně prospěšných hydrofilních a lipofilních sloučenin pro člověka. Wakame jsou bohaté na fucoxanthin, který patří ke xantofylům a je jedním z nejúčinnějších karotenoidů proti rakovině, obezitě a zánětům. Dané mořské řasy, díky velkému obsahu vlákniny, minerálů a dalších látek jsou perspektivní jako masová složka. Výsledky některých studií ukázaly, že Wakame dokážou překonat technologické a senzorické problémy produktů s nízkým obsahem soli, proto lze dané řasy použít jako potenciální funkční přísadu do nízko solených hovězích placiček. Další studie prokázaly vliv Wakame na snížení krevního tlaku u lidí [29][30][31].

2.4.1.3 Nori

Nori, patřící k rodu *Porphyra*, zastupují červené mořské řasy pěstované a konzumované v zemích východní a jihovýchodní Asie, jako je Japonsko, Korea a Čína. Větší část Nori tvoří polysacharidy, proteiny a peptidy včetně pigmentů (80 %), dále lipidy (4 %) a vitamíny a minerály (>10 %). Řasy jsou bohaté na bioaktivní sloučeniny, jako jsou fenolické složky, florotanin a taurin. Hlavním polysacharidem řas rodu *Porphyra* je porfyran, sulfatovaný polysacharid příbuzný agaróze, existující v mezibuněčné matici tkání červených řas. Nori mohou být použité v lékařském a potravinářském průmyslu díky svým prospěšným zdravotním účinkům, jako je protinádorový, imunomodulační, antioxidační, antihyper-lipidemický, protizánětlivý a hypercholesterolemický účinek. Řasy *Porphyra* jsou schopné absorbovat UV záření prostřednictvím aminokyseliny podobné mykosporinu. Zajímavé je, že Nori jsou obvykle vybaveny absorberem vlhkosti, aby si zachovaly svou kvalitu a křupavou texturu, ale ve chvíli, kdy se Nori používá k balení vlhké rýže, nastává ztížení této řasy a tím dochází ke změně její textury [32][33][34].

2.4.1.4 Arame

Eisenia bicyclis, též Arame, jsou běžné hnědé mořské řasy patřící k rodu *Eisenia*, které obývají střední pobřeží Tichého oceánu kolem Koreje a Japonska, používají se v tradičních asijských pokrmech, a také jsou suroviny pro extrakci alginátu sodného. V mnoha studiích bylo popsáno, že Arame mají různé bioaktivní deriváty, jako jsou florotanniny, polysacharidy, pyrofeofytin, peptidy, oxylipin, vysoké koncentrace jodů a zinků. U řas Arame bylo prokázáno mnoho prospěšných bioaktivit, včetně protizánětlivých, protialergických, antidiabetických a protinádorových aktivit [35].

2.4.1.5 Hijiki

Hijiki, lat. *Hizikia fusiformis*, jsou nejvíce konzumované hnědé mořské řasy na světě, které bez termické úpravy mají štiplavou chuť. Řasy ve svém složení zahrnují fucoxanthin, rostlinné bílkoviny, vlákninu, provitamin A a vitamin B, vápník, hořčík a draslík. Zajímavé je, že Hijiki obsahují velké množství anorganického arsenu, který je považován

za karcinogenní, a také látku, která přispívá ke vzniku anémie, onemocnění jater a problémy s gastrointestinálním traktem. Kyselé mytí, např.: 1% kyselinou citrónovou a zpracování horkou vodou snižují koncentrace arsenu v řasách do úrovně limitů prozatímního tolerovatelného týdenního příjmu doporučeného Světovou zdravotnickou organizací (WHO). Dále polysacharidové extrakty z Hijiki mají prospěšné účinky, jako jsou protinádorové, imunomodulační a antimutagenní, hlavně díky přítomnosti fucoidanů, což jsou komplexní sulfátové polysacharidy, které mají širokou škálu výše zmíněných biologických aktivit, včetně antioxidačních a antivirových aktivit [36].

2.4.1.6 Mořské špagety

Hnědé mořské řasy *Himanthalia elongata*, běžně známé jako „mořské špagety“ nebo SFpaghetti, patří k rodu *Himanthalia*, získaly svůj název díky protáhlému a úzkému tvaru jednotlivých řas, tedy se podobají klasickému tvaru špaget. Dané řasy je možné nalézt na kamenech a skálách v Atlantickém oceánu, avšak nejběžněji je lze najít v Norsku, Irsku, Velké Británii a severní Francii. Dříve se mořské špagety používaly v potravinářském průmyslu k přidání hovězí chuti nebo chuti podobné oříškům. Nyní se s nimi můžeme setkat v kosmetickém průmyslu jako s jedním z komponentů alginátových masek, a to zejména díky velké koncentraci vitamínu C, který stimuluje produkci kolagenu a zhašší volné radikály [37].

2.5 Kvasinky

Kvasinky jsou často využívané houbové mikroorganismy, jejich buňka je eukaryotního typu elipsoidního nebo protáhlého tvaru jako vlákno o velikosti přibližně 3–15 µm. Tvar a velikost kvasinkových buněk jsou především ovlivněny způsobem rozmnožování a rodovou příslušností. Jejich chemické složení také závisí na mnoha faktorech např.: na jejich druhu, kmenu a fyziologickém tvaru buněk. Největší část hmoty vyplňující vnitřní část buňky tvoří voda (60–80 %). Sušina buněk je bohatá na dusíkaté látky, cukry, lipidy, minerální látky a některé vitamíny. Díky velkému zastoupení vitamínů a minerálů kvasinky nachází své využití nejen při pečení, ale také v domácí kosmetice a zahradnictví. Některé kmeny geneticky modifikovaných kvasinek se používají pro prevenci i léčbu onemocnění. Důležité je zmínit, že některé druhy kvasinek mohou být považovány za patogenní mikroorganismy např. rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia* a *Trichosporon* [38].

2.5.1 *Rhodosporidium toruloides*

Rhodosporidium toruloides, patřící k rodu *Rhodosporidium*, je červená, heterotalická, bipolární kvasinka, která může existovat buď v kvasinkové formě nebo jako mycelium. V přírodě se můžeme setkat s *R. toruloides* v buničině borovicového dřeva, půdě, mořské vodě, kyselých odpadních vodách a v listech rostlin. *R. toruloides* je přirozený producent karotenoidů, neutrálních lipidů a důležitých enzymů. Díky těmto látkám se studovaná kvasinka používá v potravinářském, krmivářském a farmaceutickém průmyslu. Navíc ve fyziologických studiích, které byly provedené v Číně a Singapuru, byly u *R. toruloides* odhalené vlastnosti takzvané průmyslové kvasinky, a to je růst kvasinky

do vysoké buněčné hustoty a její schopnost využívat některé zdroje s velkým množstvím uhlíku a dusíku, které lze potenciálně využít k výrobě vysoce hodnotných produktů z levných substrátů [39][40].

2.6 Analytické metody

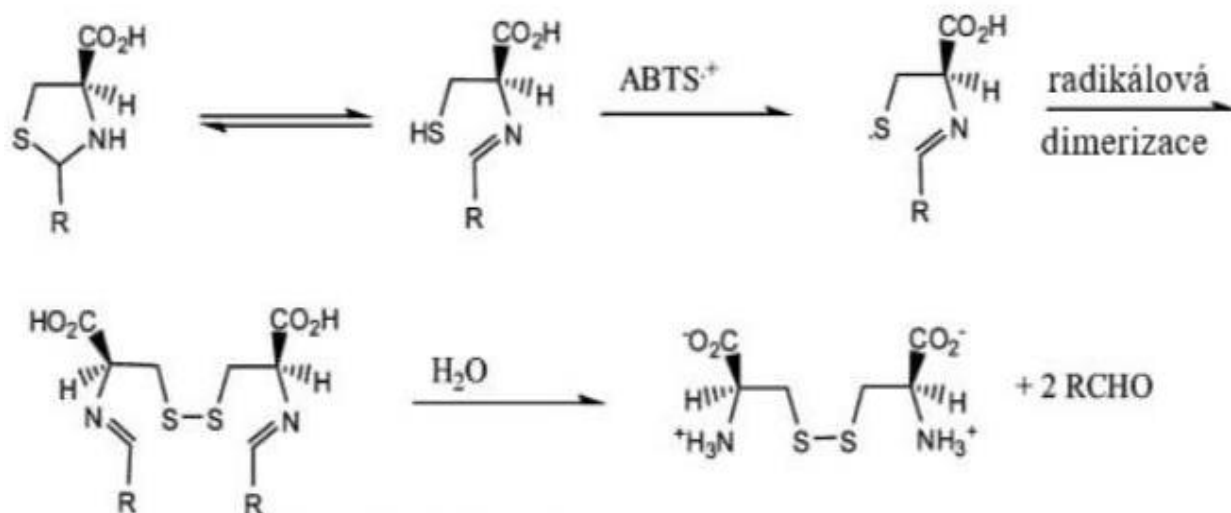
Charakterizovat makrořasy lze několika metodami, např.: UV-VIS spektrofotometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo plynová chromatografie v kombinaci s různými detektory, ICP-MS neboli hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a enzymová metoda stanovení beta-glukanů pomocí kitu. Danými analytickými metodami se dá určit složení, biologické aktivity a množství prospěchových a škodlivých látek v makrořasách [41].

2.6.1 Spektrofotometrické metody stanovení

UV-VIS spektrofotometrie je optická metoda, která pracuje na principu měření energie pohlcené vzorkem při průchodu záření. Rozmezí používaného záření se pohybuje od UV oblasti (200–400 nm) do oblasti viditelného záření (400–800 nm). Měřením jsou získána absorpční spektra, která jsou graficky vyjádřena jako závislost absorbance na vlnové délce a kvantitativní stanovení jsou založena na Lamber-Beerově zákoně [42].

2.6.1.1 Stanovení antioxidační aktivity

TEAC, neboli „Trolox Equivalent Antioxidant Capacity“ je jednou z nejpoužívanějších metod, která umožňuje stanovit celkovou antioxidační aktivitu v potravinářském a nutričním průmyslu [43]. Trolox je syntetická látka a její antiradikálová aktivita je srovnávána s antiradikálovou aktivitou měřeného vzorku. TEAC testuje schopnost vzorku či látek zhaset radikálový kation $ABTS^{\bullet+}$, který se v reakční směsi generuje oxidací ABTS (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát). Radikálový kation $ABTS^{\bullet+}$ je v roztoku zelenomodrý a má maximum absorbance při 734 nm. Oxidace ABTS může proběhnout pomocí peroxylových radikálů nebo jiných oxidantů v přítomnosti peroxidu vodíku. Kation radikálová forma ABTS je barevná a stabilní, ale v přítomnosti látek poskytujících vodík se redukuje a tím odbarvuje (viz. *obrázek 5*). Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku, koncentraci antioxidantu a době trvání reakce na inhibici absorpce radikálového kationtu [44][45]



Obrázek 5 Mechanismus reakce thiazolidinu s ABTS•⁺ [43]

2.6.1.2 Stanovení celkových polyfenolů

Polyfenoly patří k sekundárním rostlinným metabolitům, které se často vyskytují v různých druzích potravin včetně mořských řas. Polyfenolové sloučeniny jsou látky, které mají jeden nebo více aromatických kruhů, nesoucích více než jednu hydroxylovou skupinu [46]. Dané sloučeniny lze dělit podle struktury na fenolové kyseliny (např.: vanilin, kyselina gallová a kyselina kávová) a flavonoidy [47]. Bylo dokázáno, že polyfenolové látky vykazují zavedené antioxidační a protizánětlivé vlastnosti a jsou prospěšné k prevenci a zmírnění řady chronických patologických stavů, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní onemocnění, cukrovka a rakovina [46].

Ke stanovení celkových polyfenolů se používá několik metod, ale nejčastěji se využívá jejich reakce s Folin-Ciocalteuovým činidlem [48]. Původně byla tato metoda vyvinuta pro kolorimetrické stanovení tyrosinu, fenolické neesenciální aminokyseliny. Později byla daná metoda použita pro stanovení několika sloučenin včetně rostlinných fenolických látek, léčiv, vitaminu C a dalších složek v široké škále vzorků od rostlinných extraktů po moč a včelí produkty [49]. Během reakce polyfenolů s Folin-Ciocalteuovým činidlem vzniká barevný produkt, jehož intenzita je měřena spektrofotometricky. Jako fenolický standard se používá kyselina gallová. Folin-Ciocalteuova reakce s polyfenoly produkuje maximální absorbanci mezi 725 a 765 nm [48][49].

2.6.1.3 Stanovení chlorofylu a karotenoidů

Společným znakem mořských řas je přítomnost pigmentů, jako je např.: chlorofyl *a* a *b* nebo karotenoidy. Jejich funkce je absorbování modrého světla pro fotosyntézu, ochrana před UV zářením a zabezpečení přeměny aktivované formy kyslíků na teplo. Takové formy kyslíků mohou poškodit tylakoidy chloroplastů až do jejich úplného zničení [48]

Chlorofyly jsou tetrapyrolové deriváty obsahující jako centrální atom hořčík a jsou jednou z důležitých bioaktivních sloučenin produkovaných řasami ve velkém množství.

Používají se jako přírodní potravinářské barvivo a mají antioxidační, hojivé a antimutagenní vlastnosti [48][50].

Karotenoidy jsou přirozené izoprenoidy a jsou také vysoce hodnotnou bioaktivní sloučeninou, kterou lze také extrahovat z některých druhů řas [48][50].

Obsah fotosyntetických pigmentů lze stanovit měřením absorbance směsi pigmentů při různých vlnových délkách. Vlnové délky se vybírají tak, aby odpovídaly absorpčním maximům jednotlivých složek. Je důležité zmínit, že použit danou metodu lze v případě, kdy se pigmenty spektrálně výrazně odlišují. Takto bude změřena nulová absorbance nebo též absorbance vzorků při 710 nm, kde chlorofyly *a* a *b* neabsorbují. Dále absorbance chlorofylů *a* při 663 nm, absorbance chlorofylu *b* při 646 nm, a nakonec absorbance karotenoidů při 470 nm. Dále pomocí rovnic zmíněných v bodě 4.5.4 budou odečtené jednotlivé koncentrace složek ve vzorků [51].

2.6.1.4 Stanovení flavonoidů

Flavonoidy, se dříve nazývaly vitamin P, tvoří nejdůležitější skupinu polyfenolů. Jejich společným strukturním rysem je difenylpropanová skupina, kterou tvoří dva aromatické kruhy spojené heterocyklickým pyranovým kruhem [52]. Flavonoidy se dělí podle pozice substituentu na 6 skupin: katechiny, antokyaniny, isoflavonoidy, flavonoly, flavanoly, flavony [53].

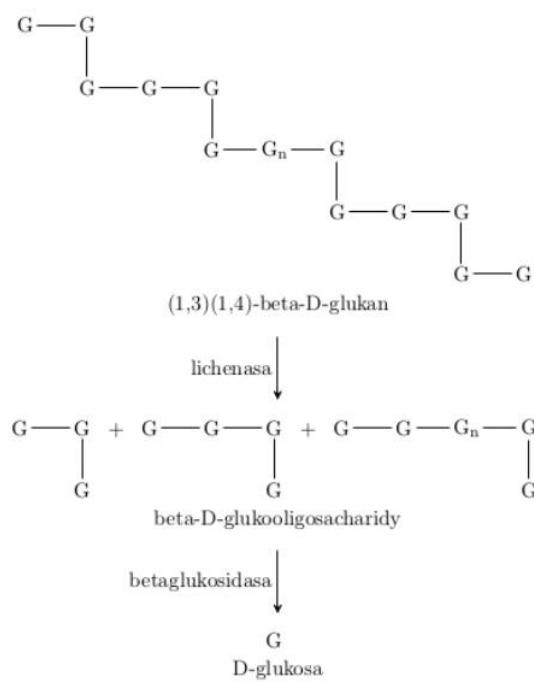
Stanovení celkových flavonoidů se provádí spektrofotometrickou metodou, a to měřením absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 510 nm, což je absorpčním maximum celkových flavonoidů [48].

2.6.2 Enzymové metody stanovení

Enzymové metody analýzy jsou metody pro kvantitativní stanovení chemických látek v roztoku pomocí enzymů. Takové metody se vyznačují vysokou citlivostí, specificitou, jednoduchostí měření, časovou nenáročností a cenovou dostupností [54][55].

2.6.2.1 Stanovení beta-glukanů

Jedná se o přímé kvantitativní stanovení (1→3) a (1→4)-beta-D-glukanů. Stanovení se dá použít při analýze beta-glukanů, které jsou extrahované např.: z obilovin, mořských řas a kvasinek. Měření probíhá pomocí vysoce purifikovaného enzymu lichenasy, který depolymerizuje vazby beta-glukanů a štěpí je na oligosacharidy. Oligosacharidy jsou pak kvantitativně hydrolyzovány na glukosu enzymem beta-D-glukosidasou (viz. *obrázek 6*). Glukosa je stanovena pomocí pufrované směsi glukosaoxidas a peroxidasy [56][57].



Obrázek 6 Mechanismus stanovení beta-glukanů pomocí enzymů lichenasa a beta-D-glukoidasa [57]

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je extrakce beta-glukanů a dalších látek z různých typů biologického materiálu a následné stanovení aktivních látek v těchto extraktech. V rámci práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Rešerše zaměřena na přírodní producenty beta-glukanů, přehled a biologické účinky glukanů z různých zdrojů se zaměřením na řasy a kvasinky
- 2) Optimalizace metod extrakce a analýzy beta-glukanů
- 3) Izolace beta-glukanů z vybraných makro- a mikrořas a kvasinek
- 4) Charakterizace biologických účinků a bezpečnosti izolovaných preparátů

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

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

Aceton P.A., p.a., LachNer (ČR)

Dusitan sodný, p.a., LachNer (ČR)

Ethanol 96%, p.a., LachNer (ČR)

Folin-Ciaultovo činidlo, p.a., LachNer (ČR)

Hydroxid sodný, p.a., LachNer (ČR)

Chlorid hlinitý, p.a., LachNer (ČR)

Katechin, Sigma-Aldrich (SRN)

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

Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina chlorovodíková konc., Lach-Ner (ČR)

Kyselina sírová konc., Lach-Ner (ČR)

Octan sodný, p.a., LachNer (ČR)

Trolox, Sigma-Aldrich (SRN)

Uhličitan sodný, p.a., LachNer (ČR)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (Německo)

Automatické pipety s různým rozsahem objemu, Discovery (SRN) a Biohit (SRN)

Centrifuga, Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (Německo)

Mixer ETA Vital Blend, ETA (ČR)

Předvážky, Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (SRN)

Spektrofotometr, VWR UV-1600PC (ČR)

Temperovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom (ČR)

Třepačka, IKA Yellow Line (SRN)

Vortex, Vitrum, Heidolph Reax top (SRN)

4.3 Příprava extraktů

Pro analýzu musely být vzorky upraveny. Jednotlivé vzorky byly rozemlety pomocí stolního pulzního mixeru ETA Vital Blend s příkonem 1500 W na menší částice, se kterými bylo dále pracováno.

4.3.1 Vodné, acetonové a ethanolové extrakty

Byl navážen 1 g namletého vzorku, ke kterému bylo přidáno 10 ml rozpouštědla (20–96% ethanol, aceton p.a. nebo destilovaná voda). Takto připravené vzorky byly promíchány na vortexu a po dobu 24 a 48 hodin byly ponechány na třepačce při laboratorní teplotě. Po skončení extrakce byl vzorek zcentrifugován při 9 000 ot/min po dobu 10 minut při 25 °C. Po uplynutí doby byl extrakt odstředěn a supernatant byl použit pro další analýzu. Takto byly připraveny vzorky ze všech druhů namletých mořských řas.

4.4 Charakterizace vzorků

Obecná charakteristika připravených extraktů zahrnuje stanovení celkových obsahů fenolických látek, flavonoidů, karotenoidů, chlorofylů, beta-glukanů a antioxidační aktivity.

4.4.1 Stanovení celkových fenolických látek

Nejprve byl připraven roztok nasyceného uhličitanu sodného (7,5 g Na_2CO_3 a 95 ml vody) a zředěný vodný roztok Folin-Ciocalteuova činidla v poměru 1:9.

K 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla bylo pipetováno 1 ml destilované vody a 100 μl vodného extraktu vzorku. Po promíchání byl roztok ponechán pět minut stát a poté bylo přidáno 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Po následném promíchání byl roztok ponechán na dalších 15 minut. Následně byla měřena absorbance při 750 nm proti blanku. Koncentrace celkových fenolických látek ve vzorku byla vypočítána z rovnice kalibrační křivky, která byla sestrojena pro roztok kyseliny gallové v rozmezí 0,1–0,7 mg/ml. Každý vzorek extrahovaný ve vodném rozpouštědle dle postupu v kapitole 4.3.1, byl analyzován třikrát. Dále byla vypočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

4.4.2 Stanovení flavonoidů

K 0,5 ml vodného extraktu vzorku bylo pipetováno 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku dusičnanu sodného. Po důkladném promíchání byl roztok ponechán stát 5 minut a poté se bylo do zkumavek přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého. Roztok byl řádně promíchán a ponechán stát dalších 5 minut. Po přidání 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody by roztok nechal na dalších 15 minut a poté následovalo měření absorbance při 510 nm proti blanku. Množství celkových flavonoidů ve vzorku bylo vypočítáno z rovnice kalibrační křivky, která byla sestrojena pro roztok katechinu v rozmezí 0,05–0,3 mg/ml. Každý vzorek, který byl extrahován ve vodném rozpouštědle dle postupu v kapitole 4.3.1, byl analyzován třikrát. Dále byla vypočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

4.4.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Nejprve bylo rozpuštěno ABTS v destilované vodě na koncentraci 7 mM. Radikálový kationt z ABTS byl vytvořen reakcí s 2,45 mM peroxodisíranem draselným. Roztok byl ponechán stát ve tmě při pokojové teplotě nejméně 12 hodin.

Byl zředěn zásobní roztok $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ethanolem pro UV/VIS na absorbanci $0,70 \pm 0,02$ při 734 nm proti blanku (UV/VIS ethanol). Do Eppendorfové zkumavky bylo napipetováno 1 ml zředěného $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a 10 μl destilované vody, poté byla ihned změřena absorbance v čase 0. Do další Eppendorfové zkumavky bylo napipetováno 1 ml $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a 10 μl vodného extraktu vzorku. Po důkladnému promíchání vzorek byl uschován ve tmě po dobu 10 minut a poté ihned byla změřena jeho absorbance. Celková antioxidační aktivita byla vypočítána z rovnice kalibrační křivky, která byla sestrojena pro roztok Troloxu v rozmezí koncentrace 40–320 $\mu\text{g/ml}$. Každý vzorek, extrahovaný ve vodném rozpouštědle dle postupu v kapitole 4.3.1, byl analyzován třikrát. Dále byla vypočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

4.4.4 Stanovení celkového chlorofylu a karotenoidů

V této analýze byly použity acetonové a různé procentní ethanolové extrakty makrořas. Do zkumavky bylo napipetováno 1 ml extraktu. Dále následovala centrifugace 5 minut na 11000 rpm. Byla měřena absorbance vzorku při čtyřech vlnových délkách: 710 nm-reference, 663 nm pro chlorofyl *a*, 646 nm pro chlorofyl *b* a 470 nm pro karotenoidy [58]. Každý vzorek, extrahovaný v alkoholovém rozpouštědle dle postupu v kapitole 4.3.1, byl analyzován třikrát. Dále byla vypočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

Při výpočtu celkového množství chlorofylů a karotenoidů prvně byla odečtená hodnota slepého vzorku při 710 nm od všech ostatních hodnot. Dále pomoci následujících rovnic byly odečtené jednotlivé koncentrace složek ve vzorku:

$$C_a = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{646} \quad (1)$$

$$C_b = 21,50 \times A_{646} - 5,10 \times A_{663} \quad (2)$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 \times A_{470} - 1,82 \times C_a - 85,02 \times C_b}{198} \quad (3)$$

Bylo vypočítáno množství pigmentů v celém objemu extraktu a přepočteno na čerstvou hmotu makrořas. Výsledný obsah byl uveden v mg pigmentu na g čerstvé hmoty.

4.4.5 Stanovení beta-glukanů

Při stanovení beta-glukanů byl použit beta-glukanový kit (MEGAZYME) a samo měření se dělilo na dvě části, a to na stanovení celkových glukanů a stanovení alfa-glukanů. Beta-glukany, které bylo za cíl stanovit, byly získány odečtením těchto dvou hodnot.

Pro stanovení celkových glukanů do zkumavek bylo naváženo 90 mg vzorku. Ke vzorku bylo přidáno 2 ml ledové kyseliny sírové (12 M), roztok byl promíchán na vortexu a poté byly zkumavky umístěny do vodní lázně s ledem po dobu 2 h. Během této

dobu byl obsah zkumavek několikrát promíchán na vortexu. Následně bylo přidáno 4 ml vody, roztok byl promíchán na vortexu, poté bylo přidáno dalších 6 ml vody a roztok zase byl promíchán. Nadále roztok byl inkubován při 100 °C po dobu dalších 2 h. Poté zkumavky byly ochlazeny na laboratorní teplotu a jejich obsah byl kvantitativně přenesen do 100 ml odměrných baněk pomocí acetátového pufru (200 mM, pH 4,5). Obsah odměrných baněk byl dobře promíchán a vzorek byl odebrán do centrifugálních zkumavek. Následovala centrifugace po dobu 5 minut. Po centrifugaci bylo přeneseno 0,1 ml supernatantu do čistých zkumavek, pak bylo přidáno 0,1 ml směsi exo-1,3- β -glukanasy (20 U/ml) a beta-glukosidasy (4 U/ml) v acetátovém pufru (200 mM, pH 4,5). Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu a inkubován při 40 °C po dobu 60 minut. Následně bylo přidáno 3,0 ml činidla GOPOD. Roztok ve zkumavkách byl inkubován 20 minut při 40 °C a následně již byla měřena absorbance při 510 nm proti blanku.

Pro stanovení alfa-glukanů do zkumavek bylo naváženo 100 mg vzorku. Ke vzorku bylo přidáno 2 ml hydroxidu sodného (1,7 M), roztok byl promíchán na vortexu, poté zkumavky byly ponechány na míchačce po dobu 20 min ve vodní lázni s ledem. Do každé zkumavky bylo přidáno 8 ml acetátového pufru (1,2 M, pH 3,8). Okamžitě bylo přidáno 0,2 ml amyloglukosidasy (1630 U/ml) a 0,2 ml invertázy (500 U/ml), roztok byl promíchán a inkubován při 40 °C po dobu 30 minut s přerušovaným mícháním na vortexu. Dále bylo nepipetováno 2 ml vzorku do centrifugačních zkumavek, následovala centrifugace po dobu 5 minut. Po centrifugaci bylo přeneseno 0,1 ml supernatantu do čistých zkumavek, pak bylo přidáno 0,1 ml acetátového pufru (200 mM, pH 4,5) a 3 ml činidla GOPOD. Roztok ve zkumavkách byl inkubován 20 minut při 40 °C a následně byla měřena absorbance při 510 nm proti blanku.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

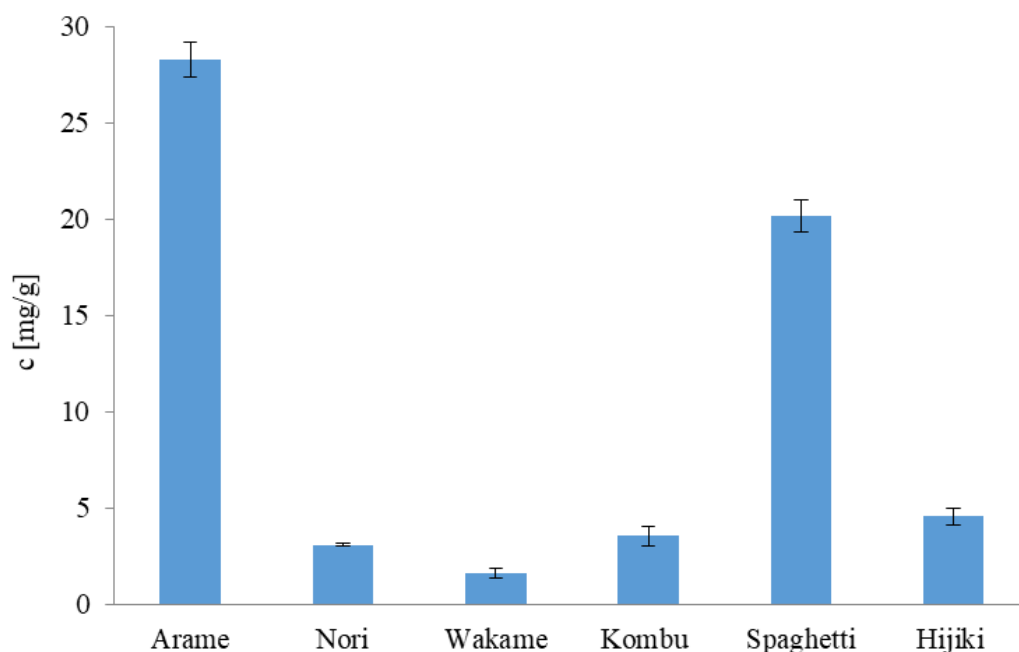
Práce jako celek byla zaměřena na přípravu vodných, acetonových a ethanolových extraktů různých druhů mořských řas a další jejich analýzu. Výsledky porovnávacích testů pro délku extrakce vyšly srovnatelně, proto pro zefektivnění metod byla zvolena 24 h extrakce. U těchto extraktů byl stanoven celkový obsah fenolických látek, celkový obsah flavonoidů, celkový obsah beta-glukanů, celkový obsah chlorofylu a karotenoidů a antioxidační aktivita.

5.1 Stanovení celkových fenolických látek

Ve vodných extraktech připravených podle postupu v bodě 4.3.1 bylo provedeno stanovení celkových fenolických látek dle postupu v bodě 4.4.1. Koncentrace fenolických látek byla stanovena ze sestavené kalibrační závislosti:

$$y = 2,8967 \cdot x \quad (4)$$

kde y je absorbance a x koncentrace fenolických látek ve vzorku. V grafu (viz. *obrázek 7*) jsou uvedené výsledky stanovení celkových fenolických látek včetně odchylky jednotlivých měření.



Obrázek 7 Srovnání obsahů celkových fenolických látek u makrořas v mg na g vzorku, $N=3$

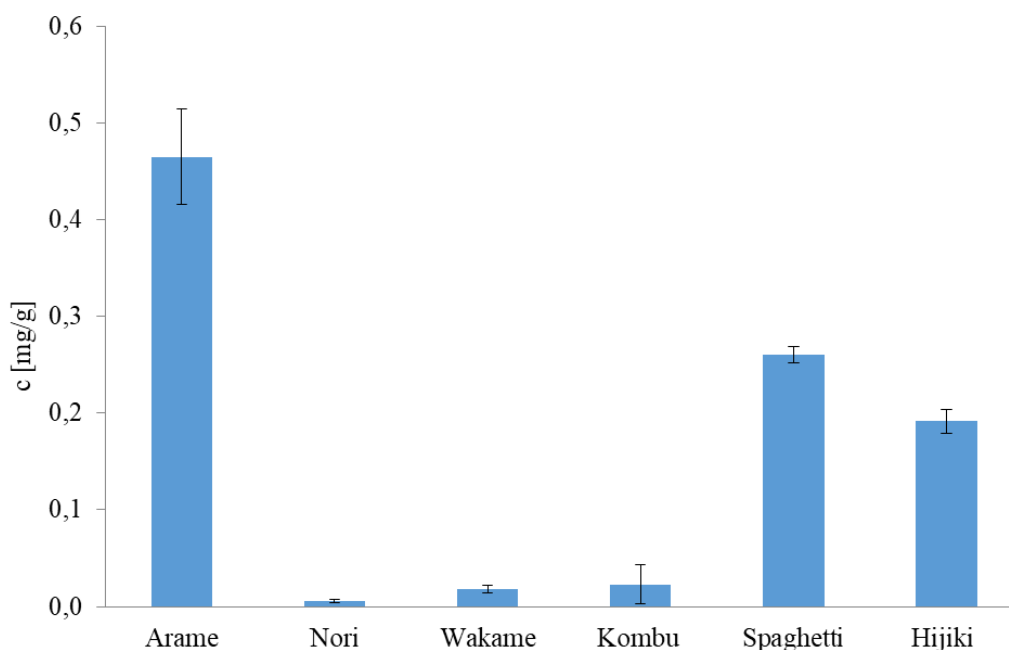
Největší obsah celkových fenolických látek byl naměřen u mořské řasy Arame ($28,27 \pm 0,91$ mg/g vzorku) a Spaghetti ($20,16 \pm 0,83$ mg/g vzorku). U vzorku Wakame ($1,61 \pm 0,28$ mg/g vzorku) byl tento obsah výrazně nižší. U ostatních vzorků obsah fenolických látek se pohyboval v rozmezí 3–4,6 mg na 1 g vzorku.

5.2 Stanovení flavonoidů

Ve vodných extraktech připravených podle postupu v bodě 4.3.1 bylo provedeno stanovení flavonoidů dle postupu v bodě 4.4.2. Koncentrace flavonoidů byla stanovena ze sestavené kalibrační závislosti:

$$y = 3,0137 \cdot x \quad (5)$$

kde y je absorbance a x obsah flavonoidů ve vzorku. Na *obrázku 8* jsou uvedené výsledky stanovení celkových fenolických látek včetně odchylky jednotlivých měření.



Obrázek 8 Srovnání obsahů celkových flavonoidů u makrořas v mg na g vzorku, $N=3$

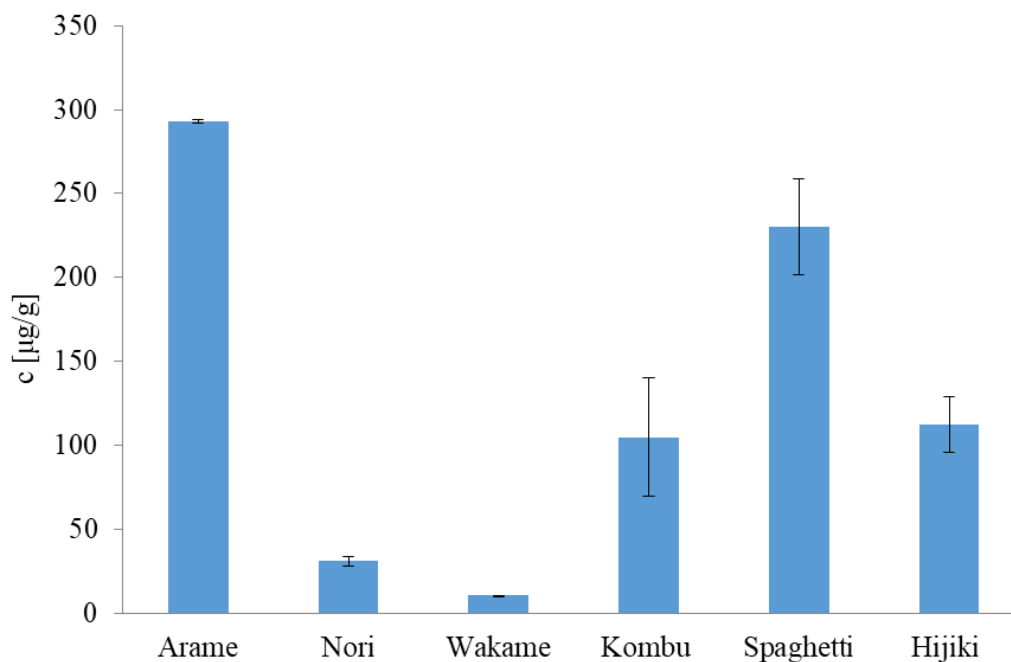
Podle výsledků výrazně větší obsah flavonoidů byl u mořské řasy Arame ($0,47 \pm 0,05$ mg/g vzorku). Dále je vidět, že nejnižší obsah flavonoidů v rozmezí 0,01–0,02 mg na 1 g vzorku měly vzorky Nori, Wakame a Kombu. Z toho může vyplývat například to, že dané řasy nejsou bohaté na flavonoidy, ale mohou obsahovat větší množství dalších látek fenolické povahy, jak je znázorněno v předchozím grafu (viz. *obrázek 7*).

5.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Ve vodných extraktech připravených podle postupu v bodě 4.3.1 bylo provedeno stanovení celkové antioxidační aktivity dle postupu v bodě 4.4.3. Celková antioxidační aktivita byla vypočítána pomocí následující kalibrační rovnice:

$$y = 0,0011 \cdot x \quad (6)$$

kde y je absorbance a x koncentrace antioxidantů ve vzorku. Následně tato koncentrace antioxidantů byla vyjádřena jako hodnota TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). V grafu (viz. *obrázek 9*) jsou uvedeny výsledky stanovení celkové antioxidační aktivity včetně odchylky jednotlivých měření.

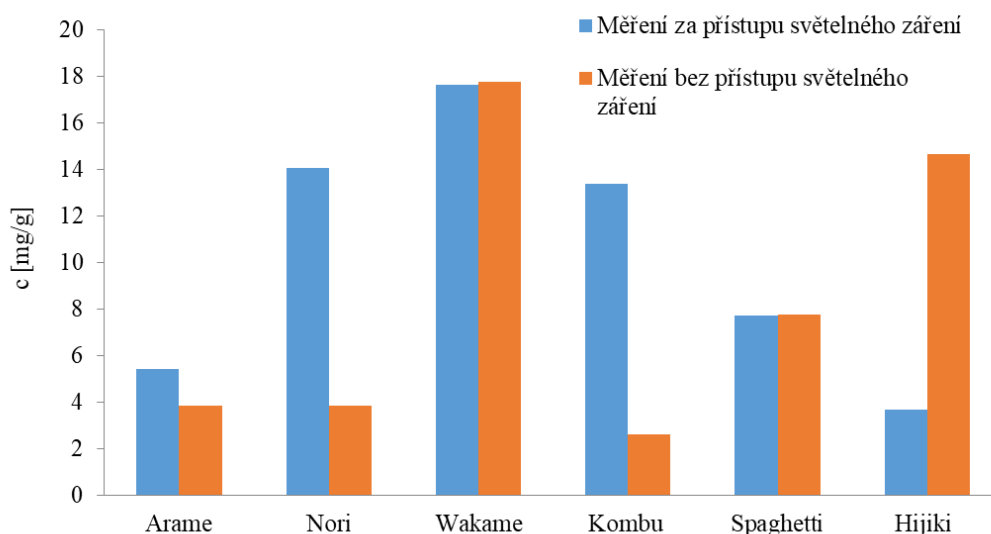


Obrázek 9 Srovnání antioxidační aktivity TEAC u mořských řas v μg na g vzorku, $N=3$

Z grafu vyplývá, že nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřená u Arame ($292,83 \pm 1,21 \mu\text{g/g}$ vzorku) a Spaghetti ($230,40 \pm 28,43 \mu\text{g/g}$ vzorku). Dále pak hodnoty koncentrace antioxidantů u Nori a Hijiki byly téměř stejné a pohybovaly se v rozmezí od 107 do 113 μg na 1 g vzorku. Nejnižší antioxidační aktivita byla stanovena u extraktu Wakame ($7,88 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ vzorku). Profil antioxidační aktivity u jednotlivých řas vcelku odpovídá koncentraci fenolických látek.

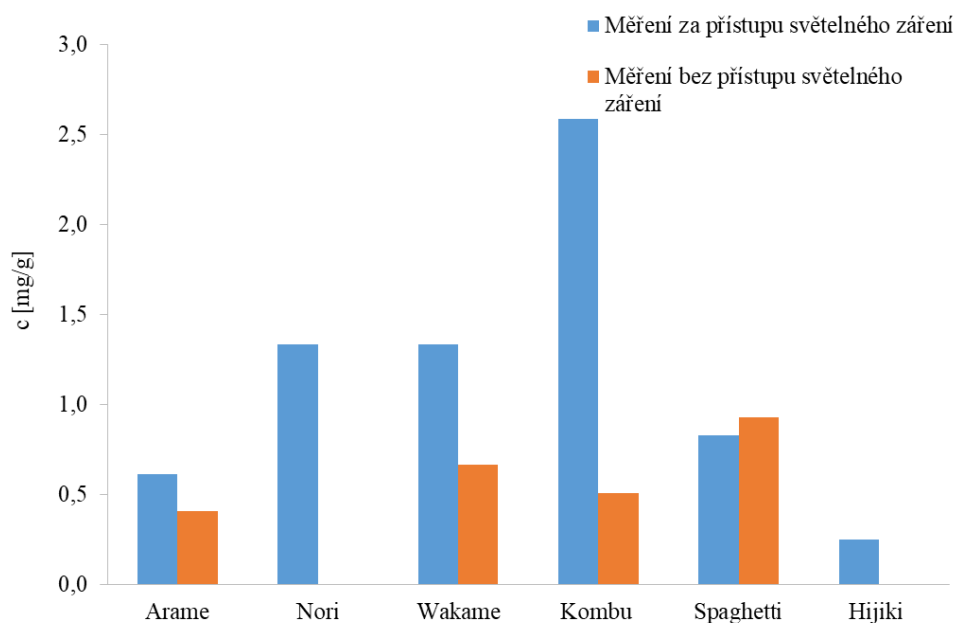
5.4 Stanovení celkového množství chlorofylu a karotenoidů

Stanovení celkového množství chlorofylu a karotenoidů bylo provedeno dle postupu v kapitole 4.4.4 v alkoholových extraktech, připravených podle postupu v bodě 4.3.1. Nejprve byl zkoumán vliv světelného záření na stabilitu při stanovení chlorofylu a karotenoidů. Na grafech (viz. *obrázek 10* a *Obrázek 11*) jsou porovnány obsahy chlorofylu a karotenoidů u vzorku, u kterých extrakce a měření probíhaly za a bez přístupu světelného záření. Vzorky byly vystaveny světelnému záření při teplotě 23°C po dobu 3 hodin.



Obrázek 10 Srovnání obsahů celkového chlorofylu u mořských řas za a bez přístupu světelného záření v acetonu v mg na g vzorku, $N=3$

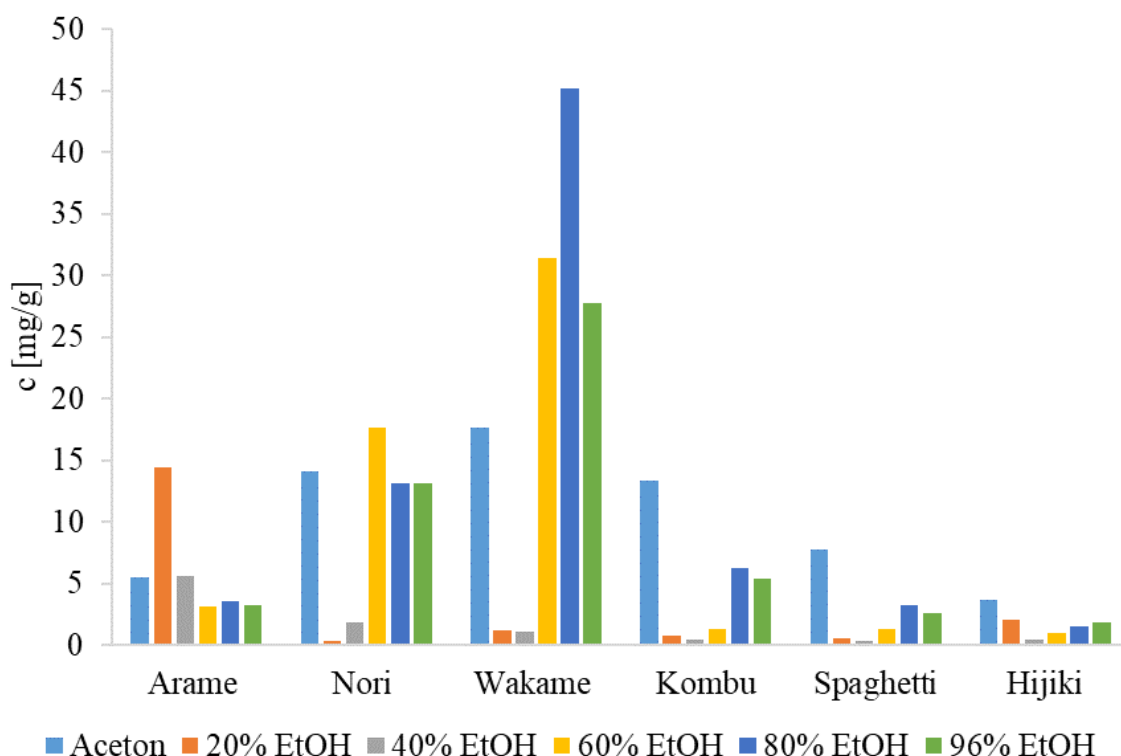
Graf (viz. obrázek 10) znázorňuje, zda světelné záření ovlivňuje měření obsahu chlorofylu v acetonu. Pro Arame, Nori a Kombu platilo, že s přístupem světelného záření obsah chlorofylu byl výrazně větší než bez přístupu světelného záření. U Wakame a Spaghetti nebyl pozorován téměř žádný rozdíl mezi koncentracemi chlorofylu. U Hijiki byla pozorována opačná situace. Hodnoty obsahu chlorofylu bez přístupu světelného záření u Hijiki byly téměř čtyřnásobně vyšší než za přístupu tohoto záření.



Obrázek 11 Srovnání obsahů celkových karotenoidů u mořských řas za a bez přístupu světelného záření v acetonu v mg na g vzorku, $N=3$

Graf (viz.Obrázek 11) znázorňuje vliv světelného záření na měření obsahu celkových karotenoidů v acetonu. Z grafu lze vyčíst, že hodnoty stanovované za přístupu světelného záření vykazovaly lepší výsledky, než ty, bez přístupu světelného záření. Jedinou výjimkou byly řasy Spaghetti, kde vyšší hodnoty byly naměřeny bez přístupu tohoto záření. Zajímavé je, že u mořských řas Nori a Hijiki při stanovení bez přístupu světelného záření nebyly karotenoidy vůbec detekovány.

Dále byly stanovovány celkové obsahy chlorofylu a karotenoidů v jednotlivých řasách. Na základě předchozího experimentu bylo zvoleno měření za přístupu světelného záření, protože to ve většině případů byla větší výtěžnost. Výsledky měření jsou znázorněné na *obrázcích 12 a 13*.



Obrázek 12 Srovnání obsahů celkového chlorofylu u mořských řas za přístupu světelného záření v různých rozpouštědlech v mg na g vzorku, $N=3$

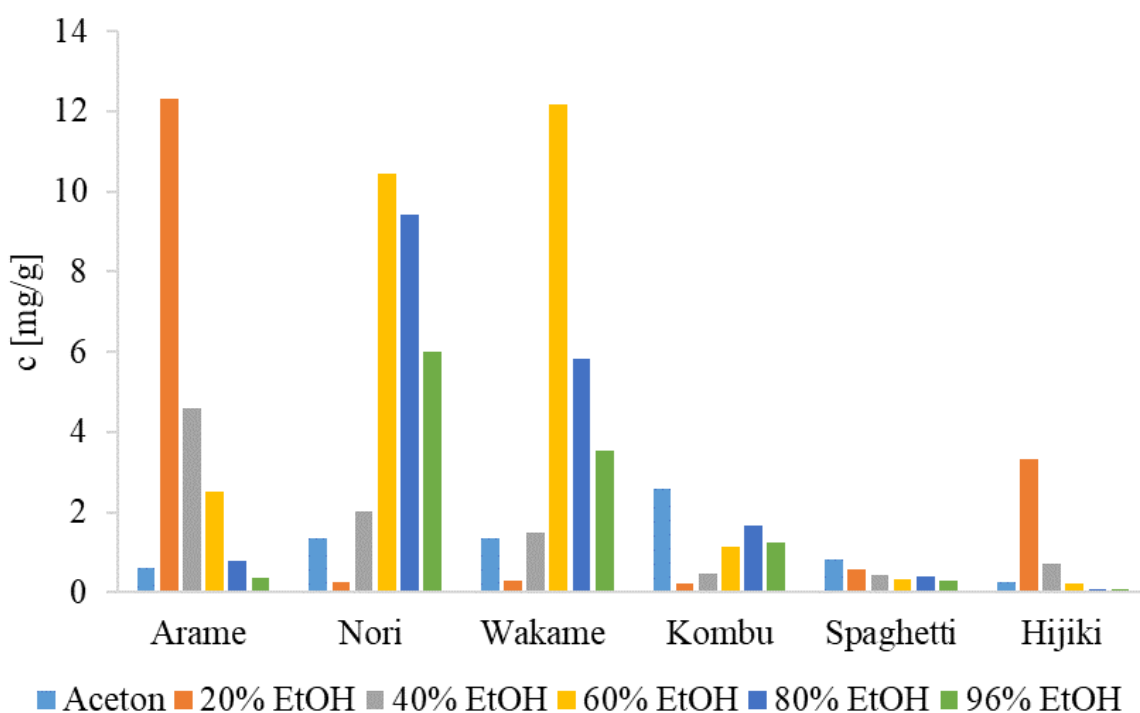
Z grafu (viz. obrázek 12) vyplývá, že největší obsah chlorofylu měly vzorky řasy Wakame ($45,14 \pm 1,36$ mg/g vzorku) rozpuštěné v 80% ethanolu. Nejnižší obsah chlorofylu byl detekován u Hijiki ($3,67 \pm 0,14$ mg/g vzorku) pro kterou byl nejúčinnějším rozpouštědlem aceton.

Dále z grafu lze odečíst nejúčinnější rozpouštědlo pro konkrétní druh řasy.

- pro Arame například nejlepším rozpouštědlem, ve kterém bylo extrahováno nejvíce chlorofylu byl 20 % ethanol ($14,46 \pm 0,79$ mg/g vzorku) a nejméně účinným byl 60 % ethanol ($3,13 \pm 0,47$ mg/g vzorku).

- pro mořskou řasu Nori 60 % ethanol byl naopak dobrým rozpouštědlem ($17,62 \pm 0,89$ mg/g vzorku) a v 20 % ethanolu bylo rozpuštěno nejmenší množství chlorofylu ($0,35 \pm 0,18$ mg/g vzorku).
- pro Wakame byl nejúčinnějším rozpouštědlem 80 % ethanol ($45,14 \pm 1,36$ mg/g vzorku) a nejméně účinnými rozpouštědly byly 20 % ($1,18 \pm 0,29$ mg/g vzorku) a 40 % ethanol ($1,06 \pm 0,18$ mg/g vzorku).
- pro Kombu, Spaghetti a Hijiki nejúčinnějším rozpouštědlem byl aceton ($13,38 \pm 0,52$ mg/g vzorku-Kombu, $7,71 \pm 0,68$ mg/g vzorku-Spaghetti, $3,67 \pm 0,14$ mg/g vzorku-Hijiki) a nejméně účinným byl 40 % ethanol ($0,38 \pm 0,09$ mg/g vzorku-Kombu, $0,37 \pm 0,11$ mg/g vzorku-Spaghetti, $0,45 \pm 0,00$ mg/g vzorku-Hijiki).

Z celkových hodnot a výtěžků lze posoudit, že všeobecně byl nejlepším rozpouštědlem pro stanovení chlorofylu aceton.



Obrázek 13 Srovnání obsahů celkových karotenoidů u mořských řas za přístupu světelného záření v různých rozpouštědlech v mg na g vzorku, $N=3$

Z grafu (viz. obrázek 13) vyplývá, že největší obsah karotenoidů měly vzorky řasy Arame ($12,31 \pm 0,32$ mg/g vzorku) rozpuštěné v 20% ethanolu a Wakame ($12,16 \pm 0,70$ mg/g vzorku) rozpuštěné v 60% ethanolu. Nejnižší obsah karotenoidů byl detekován u Spaghetti ($0,83 \pm 0,15$ mg/g vzorku), pro kterou nejúčinnějším rozpouštědlem byl aceton.

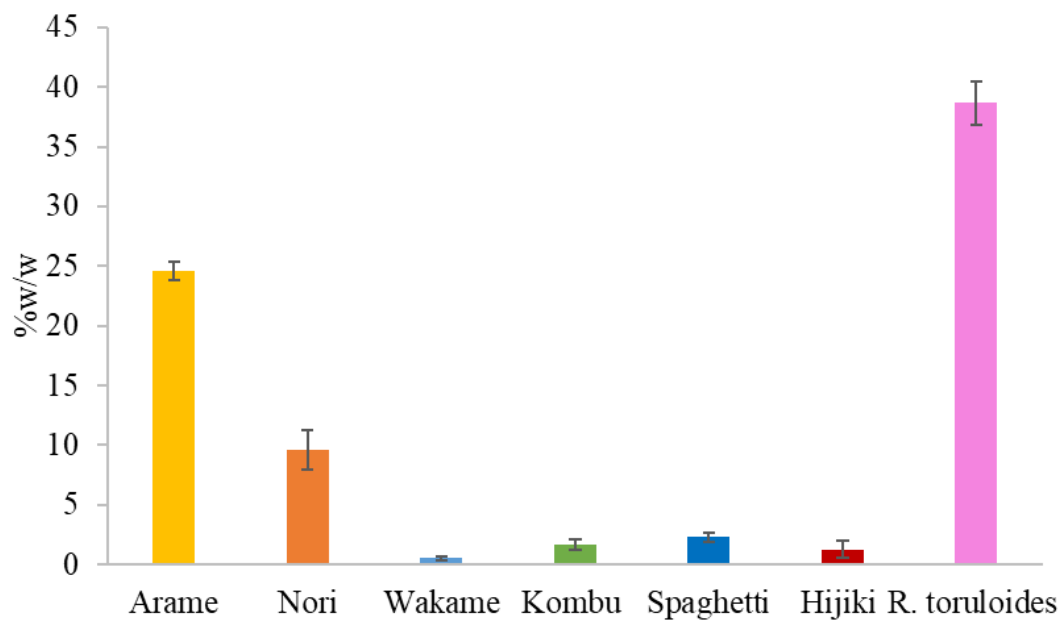
Z grafu lze odečíst také nejúčinnější rozpouštědlo, ve kterém bylo rozpuštěno nejvíce karotenoidů pro konkrétní druh řasy.

- pro Arame nejlepším rozpouštědlem, byl 20% ethanol ($12,31 \pm 0,32$ mg/g vzorku) a nejméně účinným byl aceton ($0,61 \pm 0,12$ mg/g vzorku) a 96% ethanol ($0,37 \pm 0,14$ mg/g vzorku).
- pro Nori ($10,44 \pm 0,05$ mg/g vzorku) stejně jako pro Wakame ($12,16 \pm 0,70$ mg/g vzorku) 60% ethanol byl dobrým rozpouštědlem a v 20% ethanolu bylo rozpuštěno nejmenší množství karotenoidů ($0,26 \pm 0,09$ mg/g vzorku u Nori, $0,30 \pm 0,06$ mg/g vzorku u Wakame).
- pro Kombu byl nejúčinnějším rozpouštědlem aceton ($2,58 \pm 0,05$ mg/g vzorku) a nejméně účinným byl 20% ethanol ($0,22 \pm 0,10$ mg/g vzorku).
- Spaghetti obecně vykazovaly nejmenší množství karotenoidů v porovnání se všemi druhy řas. Však největší množství karotenoidů se rozpustilo v acetonu ($0,83 \pm 0,15$ mg/g vzorku).
- pro Hijiki byl nejlepším rozpouštědlem 20% ethanol ($3,33 \pm 0,73$ mg/g vzorku). Stejně malé množství karotenoidů se rozpustilo v 80% a 96% ethanolu ($0,09 \pm 0,02$ mg/g vzorku).

Z celkových hodnot a výtěžků lze posoudit, že všeobecně byl nejlepším rozpouštědlem pro stanovení karotenoidů byl 60% ethanol.

5.5 Stanovení beta-glukanů

Stanovení beta-glukanů bylo provedeno dle postupu v kapitole 4.4.5. Obsah beta-glukanů byl stanoven pomocí předem připraveného excelu Megazyme Mega-Calc™, který byl součástí kitu pro stanovení beta-glukanů. Obsah beta-glukanů v jednotlivých vzorcích je uveden v grafu (viz. *Obrázek 14*) včetně odchylky jednotlivých měření.



Obrázek 14 Srovnání beta-glukanů u makrořas, $N=3$

Z grafu vyplývá, že nejvyšší obsah beta-glukanů v porovnání se vzorkem kvasinek *R. toruloides* ($38,66 \pm 1,85$ %w/w vzorku) byl u Arame ($24,58 \pm 0,78$ %w/w vzorku). Dále obsah beta-glukanů u Kombu ($1,68 \pm 0,41$ %w/w vzorku) a Spaghetti ($2,28 \pm 0,35$ %w/w vzorku) byl téměř stejný. Výrazně nižší hodnotu obsahu beta-glukanů oproti ostatním zkoumaným mořským řasám měla Wakame ($0,54 \pm 0,15$ %w/w vzorku).

6 SHRnutí VÝSLEDKŮ A ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na izolaci a charakterizaci přírodních beta-glukanů a dalších biologicky aktivních látek u vybraných makrořas a jednoho zástupce kvasinek *R. toruloides*.

Byla vypracovaná literární rešerše na téma beta-glukany, jejich zdroje a biologické účinky, také na mořské řasy, kvasinky a jejich vybrané zástupce. Dále se rešerše zabývá biologicky aktivními látkami (jako jsou polyfenoly, flavonoidy, chlorofyly, karotenoidy, beta-glukany a antioxidanty) a jejich metodami stanovení.

V praktické části bylo analyzováno 6 vzorků makrořas, konkrétně vzorky Arame, Nori, Kombu, Wakame, Hijiki, Spaghetti a vzorek kvasinky *R. toruloides*. Vzorky byly nejprve vhodně zpracovány pro analýzu. Pro dobrou homogenitu vzorku byly řasy rozemlety na práškovou formu. Následně byly vzorky podrobeny extrakci dle typu analýzy. Připravené extrakty byly použity pro stanovení aktivních složek jako jsou polyfenoly, flavonoidy, antioxidanty, chlorofyl, karotenoidy a beta-glukany.

Nejprve byla zkoušena 24 h a 48 h vodná extrakce. Výsledky těchto extrakcí vycházely srovnatelně, proto pro nejefektivnější stanovení byla zvolena kratší doba extrakce.

Při analýze biologicky aktivních složek byl nejprve stanoven obsah celkových fenolických látek. Nejvyšší obsah byl stanoven v případě Arame ($28,27 \pm 0,91$ mg/g vzorku) a Spaghetti ($20,16 \pm 0,83$ mg/g vzorku). Naopak nejnižší obsah fenolických látek byl stanoven v případě Wakame ($1,61 \pm 0,28$ mg/g vzorku). Obsah fenolických látek v řase Kombu byl naměřen ve výši $3,56 \pm 0,52$ mg na 1 g vzorku, což je srovnatelné s hodnotou udávané v literatuře [59]. Podle této studie obsah fenolických látek u Kombu byl stanoven v rozmezí 3,40–3,98 mg na 1 g látky. Na základě shody výsledků lze odhadnout, že měření bylo provedeno správně. Při stanovení flavonoidů bylo dosaženo velice nízkých výsledků. Nejvyšší obsah flavonoidů byl stanoven u Arame ($0,46 \pm 0,05$ mg/g vzorku), Spaghetti ($0,26 \pm 0,01$ mg/g vzorku) a Hijiki ($0,19 \pm 0,01$ mg/g vzorku). Ukázalo se, že řasy Nori, Wakame a Kombu nebyly bohaté na flavonoidy, ale zároveň obsah polyfenolů v těchto řasách byl mnohem vyšší. Konkrétně obsah flavonoidů u daných řas byl v rozmezí 0,01–0,02 mg na 1 g vzorku a polyfenolů 1,6–3,6 mg na 1 g vzorku. Z toho vyplývá, že tyto mořské řasy mohou obsahovat větší množství dalších látek fenolické povahy.

Dále byla stanovena celková antioxidační aktivita analyzovaných vzorků. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovala Arame ($292,83 \pm 1,21$ μ g/g vzorku) nebo Spaghetti ($230,40 \pm 28,43$ μ g/g vzorku). Nejnižší obsah vykazovala Wakame ($7,88 \pm 0,01$ μ g/g vzorku). Celková antioxidační aktivita většinou odpovídala obsahu fenolických látek.

Dále byl stanoven obsah beta-glukanů u makrořas a kvasinek *R. toruloides*. Kvasinky *R. toruloides* měly ze všech vzorků největší obsah beta-glukanů ($38,66 \pm 1,85$ %w/w vzorku). Z řas na tom byla nejlépe Arame ($24,58 \pm 0,78$ %w/w vzorku)

a Nori ($9,56 \pm 1,66$ %w/w vzorku). U ostatních řas bylo dosaženo velice nízkých hodnot v rozmezí od 0,5 do 2,5 %w/w.

Studie z Číny ukazují souvislost hodnoty antioxidační aktivity s obsahem beta-glukanů [60]. Z výsledků lze posoudit, že toto tvrzení je pravdivé pro mořské řasy Arame a Wakame. U Arame byl naměřen nejvyšší obsah antioxidantů a beta-glukanů z měřených řas. U Wakame lze pozorovat opačnou situaci. Nejnižší obsah antioxidantů odpovídal nejnižšímu obsahu beta-glukanů. U ostatních řas nebyla pozorována tato souvislost.

Při měření obsahu celkového chlorofylu a karotenoidů byly použity ethanolové a acetonové extrakty makrořas o různé koncentraci. Ve studii [61] se tvrdí, že světelné záření může ovlivnit množství naměřeného chlorofylu. Proto na základě této studie byla vyzkoušena extrakce a dále i stanovení obsahu chlorofylu a karotenoidů za a bez přístupu světelného záření. Výsledky danou souvislost potvrdily a z tohoto důvodu bylo měření prováděno za přístupu světelného záření.

V rámci měřených hnědých řas měla nejvíce chlorofylu Wakame rozpuštěna v 80% ethanolu. Množství chlorofylu v tomto extraktu bylo stanoveno na $45,14 \pm 1,36$ mg/g. Naopak nejnižší obsah chlorofylu byl detekován u hnědé řasy Hijiki ($3,67 \pm 0,14$ mg/g) rozpuštěné v acetonu.

Nejvyšší obsah karotenoidů byl stanoven ve 20% ethanolovém extraktu Arame ve výši $12,31 \pm 0,32$ mg/g a Wakame rozpuštěné v 60% ethanolu ($12,16 \pm 0,70$ mg/g). Nori rozpuštěná v 60% ethanolu také vykazovala vysoký obsah karotenoidů ($10,44 \pm 0,05$ mg/g). Takto vysoká hodnota obsahu karotenoidů potvrzuje to, že Nori obsahuje velké množství červeného pigmentu a díky tomu patří ke skupině červených mořských řas [32]. Nejnižší obsah vykazovala řasa Spaghetti ($0,83 \pm 0,15$ mg/g) extrahovaná do acetonu.

Dále dané měření umožnilo detekovat nejúčinnější rozpouštědlo, ve kterém bylo extrahováno největší množství chlorofylu nebo karotenoidů. Nejlepším rozpouštědlem pro stanovení chlorofylu byl aceton. Nejlepším rozpouštědlem pro stanovení karotenoidů u řas byl 60% ethanol.

Z literatury lze definovat, že makrořasy mají biologické účinky, které byly potvrzeny provedeným měřením. Takové účinky jsou například antioxidační, protizánětlivé, antivirové a antibakteriální. Na základě využívání extraktů v kosmetice jsou všechny zkoumané makrořasy biologicky nezávadné a je potvrzena bezpečnost izolovaných preparátů [62][63][64].

Lze tedy celkově shrnout ze zkoumaných řas, že podle poměru cena/výkon byla na tom nejlépe řasa Arame. Na českém trhu se zpravidla prodává 100 g této řasy za 250 Kč. Zastoupení zkoumaných biologicky aktivních látek u této řasy bylo obecně nejvyšší ze všech testovaných řas. U Hijiki a Nori bylo celkově naměřeno nejnižší množství biologicky aktivních látek, přičemž jejich cena za 100 g dosahuje 480 Kč.

7 LITERATURA

- [1] ZHU, Fengmei, Bin DU a Baojun XU. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids* [online]. 2016, 52, 275-288 [cit. 2022-01-25]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.07.003. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X15300126>
- [2] JAYACHANDRAN, Muthukumaran, Jiali CHEN, Stephen CHUNG a Baojun XU. A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. 2018, 61, 101-110 [cit. 2022-01-25]. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2018.06.010. ISSN 09552863. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286317310070>
- [3] LAM, Ka-Lung a Peter CHI-KEUNG CHEUNG. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* [online]. 2013, 2(1), 45-64 [cit. 2022-01-26]. DOI: 10.1016/j.bcdf.2013.09.001. ISSN 22126198. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212619813000326>
- [4] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-00-3.
- [5] MANTOVANI, Mário, Marilanda BELLINI, José ANGELI, Rodrigo OLIVEIRA, Ariane SILVA a Lúcia RIBEIRO. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2008, 658(3), 154-161 [cit. 2022-01-29]. DOI: 10.1016/j.mrrev.2007.07.002. ISSN 13835742. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574207000269>
- [6] KAUR, Ramandeep, Minaxi SHARMA, Dawei JI, Min XU a Dominic AGYEI. Structural Features, Modification, and Functionalities of Beta-Glucan. *Fibers* [online]. 2020, 8(1) [cit. 2022-02-20]. DOI: 10.3390/fib8010001. ISSN 2079-6439. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2079-6439/8/1/1>
- [7] AKRAMIENÈ, Dalia, Anatolijus KONDROTAS, Janina DIDŽIAPETRIENÈ a Egidijus KÈVELAITIS. Effects of β -glucans on the immune system. *Medicina* [online]. 2007, 43(8) [cit. 2022-01-27]. DOI: 10.3390/medicina43080076. ISSN 1648-9144. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1648-9144/43/8/597>
- [8] WILLIAMS, David, Antje MUELLER a William BROWDER. Glucan-Based Macrophage Stimulators. *Clinical Immunotherapeutics* [online]. 1996, 5(5), 392-399

- [cit. 2022-01-27]. DOI: 10.1007/BF03259335. ISSN 1172-7039. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03259335>
- [9] ANDRADE, Eric Francelino, et al. Effect of beta-glucans in the control of blood glucose levels of diabetic patients: a systematic review. *Nutricion hospitalaria* [online]. 31(1), 170-177 [cit. 2022-01-28]. ISSN 0212-1611. Dostupné z: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309232878015>
- [10] CHEN, Jiezhong. Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. *Vascular Health and Risk Management* [online]. 2008, 4, 1265-1272 [cit. 2022-01-28]. DOI: 10.2147/VHRM.S3803. ISSN 1178-2048. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2663451/#:~:text=In%20conclusion%2C%20beta%2Dglucans%20are,for%20the%20treatment%20of%20diabetes.>
- [11] LO, Hui-Chen, Fu-Ann TSAI, Solomon WASSER, Jyuer-Ger YANG a Bu-Miin HUANG. Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Retz: Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats. *Life Sciences* [online]. 2006, 78(17), 1957-1966 [cit. 2022-05-23]. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.08.033. ISSN 00243205. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320505010489>
- [12] KNUDSEN, Knud, Bent JENSEN a Inge HANSEN. Oat Bran but Not a β -Glucan-Enriched Oat Fraction Enhances Butyrate Production in the Large Intestine of Pigs. *The Journal of Nutrition* [online]. 1993, 123(7), 1235-1247 [cit. 2022-01-28]. DOI: 10.1093/jn/123.7.1235. ISSN 0022-3166. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/14806870_Oat_but_not_a_b-glucan-enriched_oat_fraction_enhances_butyrate_production_in_the_large_intestine_of_pigs
- [13] SVEINBJØRNSSON, Baldur, Christian RUSHFELDT, Rolf SELJELID a Bård SMEDSRØD. Inhibition of establishment and growth of mouse liver metastases after treatment with interferon gamma and β -1,3- D -glucan. *Hepatology* [online]. 1998, 27(5), 1241-1248 [cit. 2022-05-23]. DOI: 10.1002/hep.510270509. ISSN 02709139. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9581677/>
- [14] HSIAO, W. L. W. Medicinal mushroom extracts inhibit ras-induced cell transformation and the inhibitory effect requires the presence of normal cells. *Carcinogenesis* [online]. 2004, 25(7), 1177-1183 [cit. 2022-05-23]. DOI: 10.1093/carcin/bgh119. ISSN 1460-2180. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15205366/>

- [15] DU, Bin, Zhaoxiang BIAN a Baojun XU. Skin Health Promotion Effects of Natural Beta-Glucan Derived from Cereals and Microorganisms: A Review. *Phytotherapy Research* [online]. 2014, 28(2), 159-166 [cit. 2022-01-31]. DOI: 10.1002/ptr.4963. ISSN 0951418X. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23494974/>
- [16] PILLAI, R., M. REDMOND a J. RODING. Anti-Wrinkle Therapy: Significant New Findings in the Non-Invasive Cosmetic Treatment of Skin Wrinkles with Beta-Glucan. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2005, 27(5), 292-292 [cit. 2022-05-23]. DOI: 10.1111/j.1463-1318.2005.00268_3.x. ISSN 0142-5463. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1463-1318.2005.00268_3.x
- [17] MEDEIROS, Sarah, Sara CORDEIRO, Jéssica CAVALCANTI et al. Effects of Purified *Saccharomyces cerevisiae* (1→3)-β-Glucan on Venous Ulcer Healing. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, 13(7), 8142-8158 [cit. 2022-05-23]. DOI: 10.3390/ijms13078142. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22942695/>
- [18] LOBO, V, A PATIL, A PHATAK a N CHANDRA. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* [online]. 2010, 4(8) [cit. 2021-07-08]. DOI: 10.4103/0973-7847.70902. ISSN 0973-7847. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22228951/>
- [19] KOGAN, G, A STASKO, K BAUEROVA, M POLOVKA, L SOLTES, V BREZOVA, J NAVAROVA a D MIHALOVA. Antioxidant properties of yeast (1→3)-β--glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2005, 61(1), 18-28 [cit. 2022-05-24]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.02.010. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861705000688>
- [20] GUERRA DORE, Celina, Tarciana AZEVEDO, Micheline DE SOUZA et al. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β-glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. *International Immunopharmacology* [online]. 2007, 7(9), 1160-1169 [cit. 2022-05-24]. DOI: 10.1016/j.intimp.2007.04.010. ISSN 15675769. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576907001269>
- [21] AMINI SARTESHNIZI, Roghayeh, Hedayat HOSSEINI, Dolly BONDARIANZADEH, Francisco COLMENERO a Ramin KHAKSAR. Optimization of prebiotic sausage formulation: Effect of using β-glucan and resistant starch by D-

- optimal mixture design approach. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2015, 62(1), 704-710 [cit. 2022-05-23]. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.05.014. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814003028>
- [22] TUNGLAND, B.C. a D. MEYER. Nondigestible Oligo- and Polysaccharides (Dietary Fiber): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2002, 1(3), 90-109 [cit. 2022-05-24]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2002.tb00009.x. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00009.x>
- [23] TIWARI, Brijesh a Declan TROY. Seaweed sustainability – food and nonfood applications. *Seaweed Sustainability* [online]. Elsevier, 2015, s. 1-6 [cit. 2022-02-03]. DOI: 10.1016/B978-0-12-418697-2.00001-5. ISBN 9780124186972. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124186972000015>
- [24] PŘEROVSKÁ, Tereza, Eva BENEŠOVÁ a Petra LIPOVOVÁ. Biologically active compounds from marine algae and cyanobacteria. *Chem. Listy* [online]. 2021, 2021(115), 171-178 [cit. 2022-02-03]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/download/3824/3743/>
- [25] MABEAU, Serge a Joël FLEURENCE. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 1993, 4(4), 103-107 [cit. 2022-02-03]. DOI: 10.1016/0924-2244(93)90091-N. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/092422449390091N>
- [26] SASAKI, Yusuke a Yasuo YOSHIKUNI. Metabolic engineering for valorization of macroalgae biomass. *Metabolic Engineering* [online]. 2022 [cit. 2022-02-03]. DOI: 10.1016/j.ymben.2022.01.005. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35077903/>
- [27] LI, Hai-Yang, Yan-Ling YI, Sheng GUO, Fang ZHANG, Hui YAN, Zhi-Lai ZHAN, Yue ZHU a Jin-Ao DUAN. Isolation, structural characterization and bioactivities of polysaccharides from *Laminaria japonica*: A review. *Food Chemistry* [online]. 2022, 370 [cit. 2021-10-28]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131010. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34530347/>
- [28] YIN, Dafang, Xiaojie SUN, Na LI, Yingying GUO, Yu TIAN a Lianzhu WANG. Structural properties and antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Laminaria japonica* using various methods. *Process Biochemistry* [online]. 2021 [cit.

- 2021-10-28]. DOI:10.1016/j.procbio.2021.10.019. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511321003056>
- [29] TERASAKI, Masaru, Yasuhiro KURAMITSU, Mareshige KOJOMA et al. High fucoxanthin wakame (*Undaria pinnatifida*) prevents tumor microenvironment formation in an AOM/DSS mouse carcinogenic model. *Journal of Functional Foods* [online]. 2020, 64 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1016/j.jff.2019.103709. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464619306334>
- [30] LÓPEZ-LÓPEZ, I., S. COFRADES, V. CAÑEQUE, M.T. DÍAZ, O. LÓPEZ a F. JIMÉNEZ-COLMENERO. Effect of cooking on the chemical composition of low-salt, low-fat Wakame/olive oil added beef patties with special reference to fatty acid content. *Meat Science* [online]. 2011, 89(1), 27-34 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2011.03.016. ISSN 03091740. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174011001197>
- [31] PRABHASANKAR, P., P. GANESAN, N. BHASKAR, A. HIROSE, Nimishmol STEPHEN, Lalitha GOWDA, M. HOSOKAWA a K. MIYASHITA. Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. *Food Chemistry* [online]. 2009, 115(2), 501-508 [cit. 2021-11-11]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.12.047. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608014908>
- [32] JUNG, Hwabin, Won YOON a Shingo MATSUKAWA. Effect of moisture uptake on the texture of dried laver *Porphyra*. (Nori) studied by mechanical characterization and NMR measurements. *Food Hydrocolloids* [online]. 2022, 124 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.107223. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X21006391>
- [33] PAN, Chuang, Jingrong MA, Fengting TAO, Chenyang JI, Yongqiang ZHAO, Shengjun CHEN a Xianqing YANG. Novel insight into the antioxidant proteins derived from laver (*Porphyra haitanensis*) by proteomics analysis and protein based bioinformatics. *Food Bioscience* [online]. 2021, 42 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101134. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429221002595>
- [34] NISHIGUCHI, Tomoki, Kichul CHO, Shogo ISAKA, Mikinori UENO, Jun-O JIN, Kenichi YAMAGUCHI, Daekyung KIM a Tatsuya ODA. Protective effect of porphyrin isolated from discolored nori (*Porphyra yezoensis*) on lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *International Journal of Biological Macromolecules* [online].

- 2016, 93, 1273-1278 [cit. 2021-11-01]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.091. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301631306X>
- [35] IRFAN, Muhammad, Tae-Hyung KWON, Bong-Sik YUN, Nyun-Ho PARK a Man RHEE. Eisenia bicyclis (brown alga) modulates platelet function and inhibits thrombus formation via impaired P2Y12 receptor signaling pathway. *Phytomedicine* [online]. 2018, 40, 79-87 [cit. 2022-02-27]. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.01.003. ISSN 09447113. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29496178/>
- [36] DAI, Yu-Lin, Yun-Fei JIANG, Hyo LEE, You-Jin JEON a Min-Cheol KANG. Characterization and screening of anti-tumor activity of fucoidan from acid-processed hijiki (*Hizikia fusiforme*). *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, 139, 170-180 [cit. 2022-03-10]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.119. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31336117/>
- [37] GARCIA-VAQUERO, M., M. LOPEZ-ALONSO a M. HAYES. Assessment of the functional properties of protein extracted from the brown seaweed *Himanthalia elongata* (Linnaeus) S. F. Gray. *Food Research International* [online]. 2017, 99, 971-978 [cit. 2022-03-10]. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.06.023. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28865623/>
- [38] KOPECKÁ, JANA, DAGMAR MATOULKOVÁ a MIROSLAV NĚMEC. Kvasinky a jejich využití. *Kvasný průmysl* [online]. 2012, 58(11-12), 326-335 [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Dagmar-Matoulkova/publication/307796771_Yeast_and_its_uses/links/57da632d08ae72d72ea1477e/Yeast-and-its-uses.pdf
- [39] PARK, Young-Kyoung, Jean-Marc NICAUD a Rodrigo LEDESMA-AMARO. The Engineering Potential of *Rhodospiridium toruloides* as a Workhorse for Biotechnological Applications. *Trends in Biotechnology* [online]. 2018, 36(3), 304-317 [cit. 2022-05-05]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.10.013. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29132754/>
- [40] WEN, Zhiqiang, Sufang ZHANG, Chuks ODOH, Mingjie JIN a Zongbao ZHAO. *Rhodospiridium toruloides* - A potential red yeast chassis for lipids and beyond. *FEMS Yeast Research* [online]. 2020, 20(5) [cit. 2022-05-05]. DOI: 10.1093/femsyr/foaa038. ISSN 1567-1356. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsyr/article/20/5/foaa038/5866477>

- [41] CABALLERO, Eduardo, Agustín FLORES a Araceli OLIVARES. Sustainable exploitation of macroalgae species from Chilean coast: Characterization and food applications. *Algal Research* [online]. 2021, 57 [cit. 2022-02-10]. DOI: 10.1016/j.algal.2021.102349. ISSN 22119264. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926421001685>
- [42] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [43] WALKER, Richard a Jace EVERETTE. Comparative Reaction Rates of Various Antioxidants with ABTS Radical Cation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2009, 57(4), 1156-1161 [cit. 2022-02-10]. DOI: 10.1021/jf8026765. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf8026765>
- [44] RE, Roberta, Nicoletta PELLEGRINI, Anna PROTEGGENTE, Ananth PANNALA, Min YANG a Catherine RICE-EVANS. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 1999, 26(9-10), 1231-1237 [cit. 2022-02-10]. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584998003153>
- [45] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, 98, 174-179. ISSN 0009-2770.
- [46] TRUONG, Van-Long a Woo-Sik JEONG. Antioxidant and anti-inflammatory roles of tea polyphenols in inflammatory bowel diseases. *Food Science and Human Wellness* [online]. 2022, 11(3), 502-511 [cit. 2022-02-12]. DOI: 10.1016/j.fshw.2021.12.008. ISSN 22134530. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453021001361>
- [47] ABBAS, Munawar, Farhan SAEED, Faqir ANJUM et al. Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties* [online]. 2017, 20(8), 1689-1699 [cit. 2021-07-08]. DOI: 10.1080/10942912.2016.1220393. ISSN 1094-2912. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2016.1220393>
- [48] MÁROVÁ, I a D VRÁNOVÁ. *Praktikum z biochemie - pracovní sešit*. FCH VUT v Brně, 2002.

- [49] ATTARD, Everaldo. A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols. *Open Life Sciences* [online]. 2013, 8(1), 48-53 [cit. 2022-02-12]. DOI: 10.2478/s11535-012-0107-3. ISSN 2391-5412. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11535-012-0107-3/html>
- [50] SARKAR, Sambit, Mriganka MANNA, Tridib BHOWMICK a Kalyan GAYEN. Extraction of chlorophylls and carotenoids from dry and wet biomass of isolated *Chlorella Thermophila*: Optimization of process parameters and modelling by artificial neural network. *Process Biochemistry* [online]. 2020, 96, 58-72 [cit. 2022-03-13]. DOI: 10.1016/j.procbio.2020.05.025. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511320302981>
- [51] Úloha č. 4. Návod na praktikum z fyziologie rostlin. spekrofotometrické stanovení obsahu chlorofylu a karotenoidů v listech [online]. [cit. 2022-02-20]. Dostupné z: http://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KEBR220/old/KFR220_U04-Pigmenty-2009.pdf
- [52] VALKO, M., C.J. RHODES, J. MONCOL, M. IZAKOVIC a M. MAZUR. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2006, 160(1), 1-40 [cit. 2021-07-08]. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.12.009. ISSN 00092797. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16430879/>
- [53] PANDEY, Kanti a Syed RIZVI. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2009, 2(5), 270-278 [cit. 2021-07-08]. DOI: 10.4161/oxim.2.5.9498. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20716914/>
- [54] *Enzymatic Methods of Analysis* [online]. In: . [cit. 2022-04-10]. Dostupné z: <https://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Enzymatic+Methods+of+Analysis>
- [55] VORLOVÁ, Lenka. *Chemické laboratorní metody v analýze potravin H1CL* [online]. [cit. 2022-02-20]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2012/01/KA_2340_4_8up_enzymy.pdf
- [56] MCCLEARY, Barry, David MUGFORD, M CAMIRE, T GIBSON, K HARRIGAN, M JANNING, F MEUSER a P WILLIAMS. Determination of β -Glucan in Barley and Oats by Streamlined Enzymatic Method: Summary of Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* [online]. 1997, 80(3), 580-583 [cit. 2022-03-08]. DOI:

10.1093/jaoac/80.3.580. ISSN 1060-3271. Dostupné z:
<https://academic.oup.com/jaoac/article/80/3/580/5684317>

- [57] JIRSA, Ondřej, Irena SEDLÁČKOVÁ a Kateřina VACULOVÁ. *Efektivní metodika stanovení obsahu β -glukanů v ječmenu, jeho meziproduktech a vedlejších produktech* [online]. Kroměříž: Agrotest fyto, s.r.o, 2018 [cit. 2022-03-08]. ISBN 978-80-87555-16-3. Dostupné z:
https://www.vukrom.cz/userfiles/files/vysledky_vyzkumu/Metodiky/2018_Efektivni_metodika_stanoveni_obsahu_%CE%B2-glukanu_metodika.pdf
- [58] GUIDI, Lucia, Massimiliano TATTINI a Marco LANDI. How Does Chloroplast Protect Chlorophyll Against Excessive Light?. JACOB-LOPES, Eduardo, Leila Queiroz ZEPKA a Maria Isabel QUEIROZ, ed., Eduardo JACOB-LOPES, Leila ZEPKA, Maria QUEIROZ. *Chlorophyll* [online]. InTech, 2017 [cit. 2022-05-04]. DOI: 10.5772/67887. ISBN 978-953-51-3107-6. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/54493>
- [59] PARK, Jung-Nam, Abdelkader ALI-NEHARI, Hee-Chul WOO a Byung-Soo CHUN. Thermal stabilities of polyphenols and fatty acids in *Laminaria japonica* hydrolysates produced using subcritical water. *Korean Journal of Chemical Engineering* [online]. 2012, 29(11), 1604-1609 [cit. 2022-05-16]. DOI: 10.1007/s11814-012-0051-y. ISSN 0256-1115. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11814-012-0051-y?noAccess=true>
- [60] DU, Bin, Zhaoxiang BIAN a Baojun XU. Skin Health Promotion Effects of Natural Beta-Glucan Derived from Cereals and Microorganisms: A Review. *Phytotherapy Research* [online]. 2014, 28(2), 159-166 [cit. 2022-01-31]. DOI: 10.1002/ptr.4963. ISSN 0951418X. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.4963>
- [61] NAPOLITANO, Guillermo E. THE RELATIONSHIP OF LIPIDS WITH LIGHT AND CHLOROPHYLL MEASUREMENTS IN FRESHWATER ALGAE AND PERIPHYTON1. *Journal of Phycology* [online]. 1994, 30(6), 943-950 [cit. 2022-05-15]. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1994.00943.x. ISSN 0022-3646. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0022-3646.1994.00943.x>
- [62] PIMENTEL, Filipa, Rita ALVES, Francisca RODRIGUES a M. P. P. OLIVEIRA. Macroalgae-Derived Ingredients for Cosmetic Industry—An Update. *Cosmetics* [online]. 2018, 5(1), 1-18 [cit. 2022-05-15]. DOI: 10.3390/cosmetics5010002. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2079-9284/5/1/2>

- [63] LÓPEZ-HORTAS, Lucía, Noelia FLÓREZ-FERNÁNDEZ, Maria TORRES, Tania FERREIRA-ANTA, María CASAS, Elena BALBOA, Elena FALQUÉ a Herminia DOMÍNGUEZ. Applying Seaweed Compounds in Cosmetics, Cosmeceuticals and Nutricosmetics. *Marine Drugs* [online]. 2021, 19(10) [cit. 2022-05-15]. DOI: 10.3390/md19100552. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1660-3397/19/10/552>
- [64] PENG, Zhenfei, Min LIU, Zhexiang FANG, Jiulin WU a Qiqing ZHANG. Composition and cytotoxicity of a novel polysaccharide from brown alga (*Laminaria japonica*). *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, 89(4), 1022-1026 [cit. 2022-05-15]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.03.043. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24750908/>

8 SEZNAM ZKRATEK

ABTS	2,2'-azino-di-(3-etylbenzthiazolin sulfát)
LJP	<i>Laminaria japonica</i>
NK buňky	přirození zabíječi
SP	stupeň polymerace
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
UV záření	ultrafialové záření, část elektromagnetického záření