

Stanovení fenolických látek a antioxidační aktivity u cereálií

Bc. Eva Mrázová

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva MRÁZOVÁ**
Osobní číslo: **T09826**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Stanovení fenolických látek a antioxidační aktivity u cereálií**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Shrnout teorii fenolických látek a jejich možnost stanovení Folinovým činidlem
2. Popsat princip stanovení antioxidační aktivity, zmínit metody jejího stanovení

II. Praktická část

1. Stanovení fenolických látek Folinovým činidlem u vybraných vzorků cereálií a vybraných druhů mouky
2. Nastavit metodu pro stanovení antioxidační aktivity v cereálních výrobcích

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization Assay, Free Radical Biology and Medicine 26, 1231-1237.

[2] A. Serpen et al., Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products, Journal of Cereal Science 48 (2008) 816-820.

[3] P. Stratil et al., Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals Talanta 71 (2007) 1741-1751.

[4] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 3, OSSIS, Tábor 1999.

[5] ŠÍPEK, S. a kol. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Praha 7: Grada Publishing, spol. s.r.o., 2000. 320 s. ISBN 80-7169-704-4.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: MAJEROVA EVA

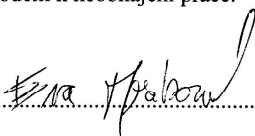
Obor: THEVP

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 užít 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 18.5.2011


.....

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 nevdělečně 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

Diplomová práce byla zaměřena na studium obsahu fenolických látek a celkové antioxidační aktivity v obilovinách (př. kamut, grünkern, špaldové kernotto, pšenice špalda, rýže natural, aj.). Fenolické látky byly stanoveny spektrofotometricky s pomocí Folinova činidla. Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí metod ABTS a DPPH. Nejvyšší obsah celkových polyfenolů a nejvyšší antioxidační aktivita v analyzovaných vzorcích byla naměřen v rýži natural.

Klíčová slova: obiloviny, polyfenoly, Folinovo činidlo, antioxidační aktivita, ABTS, DPPH,

ABSTRACT

Diploma thesis was focused on study of phenolic substances and total antioxidant activity in cereals (e.g. kamut, grünkern, spelt kernotto, spelt, natural rice, etc.). Phenolic compounds were analyzed using spectofotometric method with Folin reagent. Antioxidant activity was measured using methods ABTS and DPPH. The highest content of total polyphenols and the highest antioxidant activity of the analyzed samples were measured in natural rice.

Keywords: cereals, phenolic compounds, Folin reagent, total antioxidant activity, ABTS, DPPH

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Daniele Sumczynski, Ph.D. a Ing. Lence Fojtíkové za pomoc a čas, který mi věnovali při zpracování tématu diplomové práce.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka). Prohlašuji že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahrána do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA OBILOVIN.....	12
1.1 SLOŽENÍ OBILNÉHO ZRNA	12
1.2 OBILOVINY VE VÝŽIVĚ	13
1.3 VYBRANÉ DRUHY OBILOVIN	14
1.3.1 Kamut.....	14
1.3.2 Pšenice špalda	15
1.3.3 Grünkern.....	16
1.3.4 Špaldové kernotto.....	17
1.3.5 Pšenice ozimá.....	17
2 CHARAKTERISTIKA RÝŽE	19
2.1 RÝŽE VE VÝŽIVĚ.....	19
2.2 VYBRANÉ DRUHY RÝŽE	20
2.2.1 Rýže natural.....	20
2.2.2 Rýže divoká.....	20
2.2.3 Rýže kulatozrná.....	21
2.2.4 Rýže dlouhozrná.....	21
2.2.5 Rýže parboiled.....	22
3 ANTIOXIDANTY	23
3.1 VOLNÉ RADIKÁLY	23
3.2 MECHANIZMUS ÚČINKU ANTIOXIDANTŮ	24
3.3 VÝSKYT ANTIOXIDANTŮ	24
3.4 VLIV ANTIOXIDANTŮ NA ZDRAVÍ.....	25
4 POLYFENOLICKÉ SLOUČENINY	27
4.1 FENOLICKÉ KYSELINY.....	27
4.2 FLAVONOIDY	28
4.2.1 Flavonoly.....	28
4.2.2 Flavanoly	29
4.2.3 Antokyanidiny	29
4.2.4 Proantokyanidiny.....	30
4.2.5 Flavanony	31
4.2.6 Izoflavonoidy.....	31
4.2.7 Stilbeny.....	31
4.2.8 Ligniny a lignany.....	32
5 METODY STANOVENÍ.....	33
5.1 STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU FENOLICKÝCH SLOUČENIN	33
5.1.1 Metoda FCM	33
5.1.2 Metoda PBM	34

5.2	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY	34
5.2.1	Metoda TEAC	35
5.2.2	Metoda ABTS	36
5.2.3	Metoda DPPH	37
5.2.4	Metoda FRAP.....	38
5.2.5	Lipidově peroxidační metody.....	38
5.2.6	Metoda ORAC	38
II	PRAKTICKÁ ČÁST	39
6	METODIKA PRÁCE.....	40
6.1	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	40
6.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	40
6.3	POUŽÍVANÉ VZORKY	40
6.4	PRACOVNÍ POSTUP.....	43
6.4.1	Příprava standardů.....	43
6.4.2	Příprava vzorků	44
6.5	METODA FCM	44
6.5.1	Kalibrační křivka pro metodu FCM.....	44
6.6	METODA ABTS.....	45
6.6.1	Kalibrační křivka pro metodu ABTS	45
6.7	METODA DPPH.....	45
6.7.1	Kalibrační křivka pro metodu DPPH	46
7	VÝSLEDKY A DISKUSE	47
7.1	CELKOVÉ STANOVENÍ POLYFENOLŮ.....	47
7.1.1	Metoda FCM	47
7.2	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	50
7.2.1	Metoda ABTS	50
7.2.2	Metoda DPPH	53
7.2.3	Porovnání metod	56
	ZÁVĚR	59
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	61
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	65
	SEZNAM OBRÁZKŮ	66
	SEZNAM TABULEK.....	67

ÚVOD

Mnoho látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají spolu s potravou, má antioxidační vlastnosti. Velký význam se přikládá zejména polyfenolickým sloučeninám, které se jako sekundární metabolity vyskytují ve všech rostlinách. Jsou zastoupeny hlavně v léčivých rostlinách, koření, zelenině, ovoci, víně, čaji, obilí, luštěninách i jiných semenech. Fenolickým sloučeninám obsaženým v těchto surovinách je věnována pozornost hlavně pro jejich antioxidační vlastnosti, které pozitivně působí na lidské zdraví. Mohou se podílet na ochraně před škodlivým působením reaktivních forem kyslíku, a to zejména volných kyslíkových radikálů, které jsou působením antioxidantů zhaseny. Volné radikály jinak napadají tělní buňky a mohou způsobovat vážná onemocnění, včetně kardiovaskulárního a rakoviny.

Cereálie a celozrnné výrobky jsou významným zdrojem polyfenolů, zejména kyseliny ferulové, hydroxykořicové, v menším množství kyseliny kumarové, kávové a flavonoidů. Všechny mají potenciálně antioxidační vlastnosti vzhledem k přítomnosti aromatických fenolických kruhů, které mohou stabilizovat a delokalizovat nepárový elektron. Fenolické sloučeniny s antioxidační aktivitou, které se vyskytují hlavně v obalových částech zrna, klíčcích a aleuronové vrstvě nejsou zcela využitelné. Závisí na jejich rozpustnosti, díky které mohou být vstřebávány. Kromě fenolických sloučenin jsou cereálie významné pro vysoké nutriční hodnoty sacharidů, proteinů, tuků, vlákniny, vitaminů skupiny B, minerálních látek.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA OBILOVIN

Obiloviny jsou jednou z hlavních kulturních plodin v mnoha zemích. Mohou sloužit přímo pro lidskou výživu nebo jako krmivo pro zvířata. Mohou být hlavním zdrojem energie (obsahují zejména sacharidy) a proteinů (s vysokými nutričními podíly, nedosahují však nutriční hodnoty bílkovin živočišných). Nejzávažnějším nedostatkem je nižší obsah aminokyseliny lyzinu. Kromě energie a bílkovin poskytují obiloviny cenné vitaminy a minerální látky. Faktory, pro které jsou obiloviny nejvýznamnější potravinářskou skupinou, jsou zejména tyto:

- Obilniny mohou tvořit vhodný a hodnotný energetický zdroj (škrob v endospermu), mohou zajišťovat i většinu potřebných bílkovin v potravě a některé vitaminy.
- Vysoká přizpůsobivost rostlin k různým klimatickým poměrům. Obiloviny se pěstují od tropického pásma (kukuřice), přes mírné pásmo (pšenice) až do oblastí zasahujících za polární kruh (žito). Využívají suchá (čirok), normální (pšenice) i zamokřená (rýže) stanoviště.
- Malá pracnost pěstování s možností použití mechanizace a dosahování vysokých výnosů konzumních částí na velkých pěstebních plochách.
- Konzumní částí je suchý plod (obilka), který se dá snadno přepravovat a skladovat i po dobu několika let [1].

Pro lidskou výživu se přímo používá z obilovin výhradně zrna. Téměř všechny známé obiloviny patří do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Výjimku tvoří pohanka, patřící do čeledi rdesnovité (*Polygonaceae*). V posledních letech se také porůznu začala uplatňovat další semena např. amarant, patřící do čeledi amarantovité (*Amaranthaceae*) [2].

1.1 Složení obilného zrna

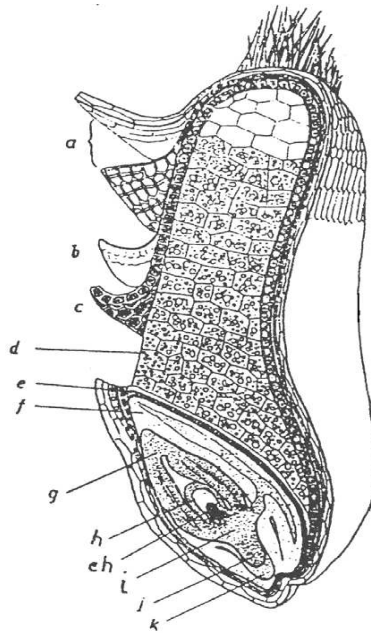
Každá obilka se skládá z endospermu, klíčku a obalových vrstev.

Endosperm představuje 84 – 86 % hmotnosti zrna, obsahuje především škrob a bílkoviny. Od obalových vrstev je oddělen vrstvou aleuronových buněk, obsahujících bílkoviny, minerální látky, tuky a vitaminy. Endosperm zajišťuje výživu zárodku a při zpracování tvoří podstatnou složku finálního výrobku.

Klíček je oddělen od endospermu štítkem, který obsahuje až 33 % bílkovin. Mimo jednoduchých cukrů obsahuje klíček bílkoviny, aminokyseliny, vitaminy rozpustné ve vodě

(hlavně vitamin B₁) a značné množství vitamínu E. V klíčku je obsažen rovněž tuk. Proto jsou klíčky před mletím z obilky odstraňovány tak, aby v získané mouce nebyl tuk hydrolyzován a nevznikla žluklá chuť.

Obaly tvoří 8 – 14 % hmotnosti zrna. Jsou tvořeny několika vrstvami buněk, které chrání endosperm a klíček před vysycháním a mechanickým poškozením [3].



Obr. 1: Řez obilkou a - oplodí, b - osemení, c - aleuronová vrstva, d - endosperm, e - vrstva palisádových buněk (nasávací meristém), f - štítek, g - koleoptile (pochva listu), h - základ pravého listu, ch - vzrostný vrchol, i - mezokotyl, j - základ kořínku, k - kořenová čepička text [3]

1.2 Obiloviny ve výživě

Celozrnné obiloviny zpomalují proces stárnutí, chrání tělo před nemocemi, jako je cukrovka, kardiovaskulární onemocnění a některými druhy rakoviny. Jsou dobrým zdrojem vitamínu E, kyseliny listové, folátů, fenolových kyselin, zinku, železa, selenu, mědi, manganu, karotenoidů, fytové kyseliny, ligninů, alkylresorcinolů a dalších sloučenin jako jsou betain, cholin, sirmé aminokyseliny, z nichž skoro všechny mají významné antioxidační vlastnosti [4].

Některé látky, jako vitamin E, přímo zabraňují negativnímu účinku volných radikálů, zatímco jiné působí jako kofaktory antioxidačních enzymů (selen, mangan a zinek). Obsah

betainu v pšenici je 1 % v buněčné stěně, je významným preventivním faktorem kardiovaskulárních onemocnění [5].

Protože se sloučeniny s antioxidačními vlastnostmi nachází především v otrubách a klíčcích v aleuronové vrstvě, obsahují rafinované moučné výrobky mnohem nižší antioxidační aktivitu, než celé zrno obiloviny. Množství antioxidantu v zrnech obilí i jejich výrobků se mění v závislosti na typu obilí, odrůdě, pěstování, obsahu polyfenolů, zpracování, faktorech prostředí (např. teplotní stres, sluneční záření a zavlažování) [5,6].

Polyfenolické látky obilovin s antioxidační aktivitou nelze zcela všechny využít. Jejich využitelnost je závislá na jejich rozpustnosti v zažívacím traktu, čímž se výrazně ovlivňuje jejich biologická dostupnost [7]. Nicméně, vázané frakce kyseliny ferulové a dalších fenolických látek mohou být uvolněny později v tlustém střevě fermentací [8].

1.3 Vybrané druhy obilovin

1.3.1 Kamut

Egyptský druh obilí kamut je nejstarším druhem pšenice, který by mohl dnes opět získat na významu pro jeho vysoké výživové hodnoty. Na taxonomické klasifikaci se světová vědecká obec ještě definitivně neshodla. Podle společnosti Kamut International se jedná o *Triticum turgidum* spp. *turanicum* (nazývanou rovněž Khorasan wheat), která má nejbližší k pšenici durum (*Triticum durum*). Zrno kamutu je oproti zrnu pšenice dvakrát až třikrát větší, obsahuje o 20 – 40 % více bílkovin, lipidů, aminokyselin, má zvýšený obsah vitamínů E, B₁, B₂, B₅, fosforu, hořčíku, zinku, mědi a komplexních sacharidů. Například obsah hořčíku a zinku je vyšší o 30 až 35 % než u pšenice. Má bohatou, máslovou chuť a je lehce stravitelný. Svou lahodnou, ořechovou chutí je obilí vhodné pro výrobu chleba a těstovin [9,10].

Nedávný výzkum prováděný Mezinárodní asociací pro potravinové alergie (IFAA - International Food Allergy Association) klinicky prověřily, že kamut nejen nezpůsobuje alergii na pšeničný lepek, ale je zcela přijatelný i pro již postižené pacienty s celiakií, přestože obsah gluteninu je velice vysoký. Z dosud neznámých důvodů nevykazuje žádnou alergicitu. Tím by se tento druh pšenice stal plnohodnotnou náhradou pšenice seté pro milióny alergiků na pšeničný lepek. Pacienti s celiakií ovšem musí při eventuálním zařazování kamutu do svého jídelníčku postupovat velmi obezřetně, nejlépe po poradě s lékařem, proto-

že testy prokázaly, že zhruba 30 % osob s alergií na pšenici je alergických rovněž na kamut. V některých případech mohou být reakce na kamut ještě horší než na běžnou pšenici. Na druhé straně ale řada lidí, kteří pšenici nemohou jíst s kamutem žádné problémy nemají. Kamut je obilovina s mnohostranným využitím, kterou je možno používat namísto všech druhů pšenice – tvrdé, měkké i pšenice durum. Jedním z významných aspektů pěstování pšenice kamut je i skutečnost, že se jedná o plodinu maximálně vhodnou pro udržitelné zemědělství, vzhledem k její schopnosti produkovat vysoce jakostní zrno bez nutnosti používat umělá hnojiva a pesticidy. Je tudíž vynikající plodinou pro organické zemědělství [10,11].

U výrobků obsahujících kamut nebo přímo u něj se setkáváme s označením Kamut®. Jedná se o registrovanou ochrannou známku společnosti Kamut International, Ltd. [12].



Obr. 2: Zrna kamutu [13]



Obr. 3: Klas Kamutu [14]

1.3.2 Pšenice špalda

Špalda je tradičně pěstovaná v německy mluvících zemích (Německu, Rakousku, Švýcarsku), ale i Belgii a Španělsku. Její popularita stoupá poslední dobou také v České republice [15]. Na rozdíl od tradičních obilnin patří pšenice špalda do skupiny tzv. pluchatých pšenic. Proto první zpracovatelskou operací po vyčištění je vyloupávání zrna z klásku. Vyloupané zrno se dále čistí a další potravinářské zpracování je podobné jako u běžných obilnin a závisí od druhu finálního výrobku. Skladování neloupaných klásků pšenice špaldy je z hlediska zachování kvality a čerstvosti produktu pozitivní vlastností. Pšenice špalda je potenciálním zdrojem nových potravinářských produktů s vysokým obsahem vlákniny.

Vyrábějí se z ní základy nebo přísady do těstovin, tvoří přísadu müsli i vánočního pečiva, zrna špaldy se dále zpracovávají na kroupy, krupici či vločky vhodné do kaší nebo polévek. Obsahuje téměř všechny základní složky důležité pro zdravý lidský organizmus, včetně bílkovin, tuků, sacharidů, vitaminů, minerálů [16].

Vzhledem k většímu podílu aleuronové vrstvy obsahuje v průměru 16 – 17 % bílkovin, což je více ve srovnání s pšenicí setou (12 – 14 %). Obsah esenciálních aminokyselin je nepatrně vyšší, ale podobně jako u pšenice seté je limitující lyzin, který následuje treonin. Z ostatních aminokyselin je výrazně vyšší obsah leucinu. Obsah lepku se pohybuje v rozmezí 35 – 45 %, dokonce až 54 % a jeho kvalita je vysoká. Je výborným zdrojem některých vitaminů skupiny B, především tiaminu (B₁), riboflavinu (B₂), ale také niacinu (B₃). Zajímavý je obsah β-karotenu a tiokyanátu, který působí regeneračně na tělní buňky a chrání proti infekcím. Vyšší je obsah draslíku, síry i hořčíku. Špalda obsahuje relativně hodně nenasycených mastných kyselin a neobsahuje cholesterol [15,16].



Obr. 4: Pšenice špalda [16]



Obr. 5: Klas pšenice špaldy [16]

1.3.3 Grünkern

Grünkern je pěstován v poměrně malé oblasti v jižním Německu. Jedná se o nedozrálá zelená zrna špaldy, která se po sklizení ještě před úplným dozráním restují pro docílení vzniku aromatických látek a chuti. Při uzení je používáno tvrdé bukové dřevo. Nezralá špaldová zrna byla pro výživu využívána již od roku 1660, kdy se z důvodu hladomoru sklízela zrna špaldy ještě před úplným dozráním. Do roku 1960 byl grünkern vyráběn tradičním způsobem. Nezralé špaldové klasy byly sklizeny a svázané do svazků a následně sušeny na roštech při teplotě 120 – 180 °C až do dosažení určitého stupně pražení. V dnešní době se

tato netradiční specialita přidává do pokrmů a je pěstována v ekologickém zemědělství pro výrobu biopotravin [17].



Obr. 6: Grünkern [18]



Obr. 7: Klas grünkernu [19]

1.3.4 Špaldové kernotto

Špaldové kernotto jsou velké kroupy. Tento výrobek vzniká šetrným obroušením špaldových zrn. Špaldové kernotto se podobá zrn, ale je obroušené od tvrdé obalové vrstvy. Proto není nutné kernotto pro uvaření namáčet. Po uvaření vypadá jako ječné kroupy. Je bohaté na bílkoviny (17 %), vlákninu, vitaminy skupiny B, vitamin A, E a hořčík [20].



Obr. 8: Špaldové kernotto [20]

1.3.5 Pšenice ozimá

Zrno pšenice se využívá k výrobě chleba, pečiva, těstovin, krup a v cukrářství. Pšeničné šroty, mouky nebo mačkané zrno a otruby se využívají jako krmivo pro hospodářská zvířa-

ta. Pšenice je hlavně zdrojem energie díky vysokému obsahu škrobu (50 – 70 %), který je lehce stravitelný. Obsah hrubé vlákniny je nízký (1,6 – 2,0 %). Obsah bílkovin v zrně je 8 – 13 %. Obsah zásobních bílkovin lze ovlivnit agrotechnickými zásahy. Zásobní bílkoviny gliadin (prolamin) a glutenin s vodou vytvářejí lepek. Vysoký obsah lepku pozitivně ovlivňuje pekárenské vlastnosti pšenice. Obsah tuku je nízký (1,5 – 3 %), nachází se v něm velké množství nenasyčených mastných kyselin, kyseliny olejové a linolové. Ty způsobují, že tuk snadno podléhá oxidaci, které také napomáhá kyselina fosforečná uvolněná štěpením fosfolipidů. Z vitaminů jsou v pšeničném zrně obsaženy hlavně vitaminy skupiny B, vitamin E a v menším množství také β -karoten. Z minerálních látek je nejvíce zastoupen fosfor [21].

Pšenice ozimá má vyšší nároky na půdu. Vyžaduje půdy strukturní, hrubší hlinité a jílovitohlinité s neutrální až slabě kyselou půdní reakcí, dobře zásobené živinami. Nevhodné jsou půdy písčité, kyselé a trvale zamokřené. Ozimá pšenice se seje na podzim a při dostatku vláhy a teplotě kolem 15 °C vzchází za 7 – 9 dní. Po vzejití poměrně rychle roste až do poklesu teploty na 4 – 5 °C, kdy růst zastavuje. Postupným přechodem do zimy získává aktuální mrazuvzdornost -18 až -25 °C. Květy a plody tvoří po přezimování na jaře a v létě dalšího roku [21].



Obr. 9: Pšenice ozimá [22]

2 CHARAKTERISTIKA RÝŽE

Podle tvaru rozlišujeme rýži dlouhozrnnou, střednězrnnou a kulatozrnnou. Podle konzistence se rýže dělí na moučnatou a sklovitou. Rýže moučnatá se vyznačuje vysokým obsahem škrobu a dextrinu, při vaření se rozpadá [23].

Spotřeba rýže v ČR se v průměru pohybuje okolo 4,5 kg na osobu za rok. Čeští spotřebitelé preferují dlouhozrnnou rýži (67 %) před střednězrnnou či kulatou. Ve státech EU činí spotřeba na jednu osobu za rok přes 5 kg. Hlavními exportéry rýže jsou Thajsko, Vietnam, USA, Čína, Indie a Pákistán. Rýže se v současné době do ČR dováží přibližně ze 75 % ze zemí mimo EU, především z Asie [24].

2.1 Rýže ve výživě

Rýže obsahuje antioxidační sloučeniny, zejména ve vnějších vrstvách zrna (otrubách). Obsahuje významné množství vitamínu E a oryzanol. Vzhledem k tomu, že obsah oryzanolu v rýžových otrubách je 10-krát větší než vitamínu E, může oryzanol více přispívat ke snížení cholesterolu než vitamín E, který je obvykle považován za hlavní antioxidant v rýžových otrubách. Existuje několik odrůd rýže, včetně barevných odrůd, u kterých je pravděpodobnější výskyt sloučenin s vyšší antioxidační aktivitou, než u bílé rýže. Například, kyanidin-3-glukosid a 3-glukosidpeonidin (antokyaninového pigmenty) jsou hlavní antioxidační sloučeniny v divoké rýži, ale nevyskytují se v rýži bílé. Prokyanidiny jsou hlavní sloučeniny podílející se na antioxidační aktivitě červené rýže. Na β -karoten je bohatá odrůda rýže (např. žlutá Golden Rice), která byla nedávno vyvinuta pomocí genetického inženýrství, s cílem přispět k boji proti vitaminovému nedostatku, a to zejména v asijských zemích. Výživová hodnota závisí na stupni jejího opracování (odstranění pluch, broušení, leštění) neboť vitaminy, minerální látky a částečně i bílkoviny jsou koncentrovány v povrchových vrstvách zrna [24].

Rýže hnědá natural pololoupaná (bez vnější obalové vrstvy) je výživově hodnotnější než rýže bílá. Je dobrým zdrojem především tiaminu a niacinu. Bílá rýže slouží především jako zdroj sacharidů. Rýže parboiled se jako neloupaná rýže nejprve vakuuje, potom je namočená v horké vodě (čímž se nutričně hodnotné látky uvolňují ze slupky dovnitř obilky rýže) a poté následuje opracování horkou vodní párou pod tlakem, zrna jsou vysušena a zbavena slupky. Nutriční parametry jsou srovnatelné s rýží natural, doba tepelné úpravy rýže parboiled je kratší. Tato rýže má i vyšší stabilitu, protože se záhřevem zničí enzymy, které štěpí

tuk a způsobují tak vady chuti a vůně [24]. Byla provedena studie na zvířatech, kde byla sledována antioxidační aktivita látek obsažených v barevné rýži, zejména v rýži černé, které poukazují na pozitivní působení. Dokonce má vyšší obsah látek s antioxidační aktivitou než je v otrubách pšenice a žita [6].

2.2 Vybrané druhy rýže

2.2.1 Rýže natural

Je hnědá, má odstraněnou (jen částečně obroušenou) slupku a vzhledem k tomu, že je u ní neporušený klíček, obsahuje vysoké množství vitaminů B₁, B₂, B₆, E, hořčíku, fosforu a vápníku. Má vyšší obsah tuku, takže snadněji žlukne. Konzumace rýže pomáhá snižovat hladinu cholesterolu a kyseliny močové v krvi. Vzhledem k mimořádně nízkému obsahu sodíku je vhodná i pro lidi s vysokým krevním tlakem [23].



Obr. 10: Rýže natural [25]

2.2.2 Rýže divoká

Velmi oblíbená rýže divoká (planá, indiánská) je pověstná svojí oříškovou chutí. Ve skutečnosti se nejedná o rýži v pravém slova smyslu, ale jde o dlouhá semena divoké (plané) vodní trávy rodu *Zizania* rostoucí v Kanadě (Saskatchewan) a v USA u velkých jezer. V současné době se už produkuje i komerčně v Kalifornii a ve státech Středního východu nebo v Austrálii (od roku 1992) i jinde. Divoká rýže se často kombinuje s hnědou rýží nebo pšenicí. Její nutriční hodnota je poměrně vysoká, obsahuje zejména vitaminy skupiny B a draslík, je významným zdrojem vlákniny [26].



Obr. 11: Rýže divoká [26]

2.2.3 Rýže kulatozrná

Neobsahuje gliadin a je tak vhodná pro pacienty s celiakií. Vzhledem k mimořádně nízkému obsahu sodíku je vhodná i pro lidi s vysokým krevním tlakem. Této rýži se říká chléb Asie. Většina její produkce pochází z Číny, Indie, Bangladéše a Indonésie. V těchto zemích tvoří nedílnou součást jídelníčku. Do Evropy ji přivezli Arabové [23].



Obr. 12: Rýže kulatozrná [25]

2.2.4 Rýže dlouhozrná

Je někdy označována jako rýže vodní. Bílá varianta je zbavena svrchní slupky a vyleštěna, aby získala svoji bělostnou barvu. Je velmi oblíbená díky rychlé přípravě a lehké stravitelnosti. Rýže je přirozeně bezlepková [23].



Obr. 13: Rýže dlouhozrná [25]

2.2.5 Rýže parboiled

Upravuje se patentovaným technologickým postupem, vyvinutým v USA zhruba před padesáti lety. Jedná se o čtyřfázovou hydrotermickou úpravu zrna, při níž se po namáčení neloupané rýže (paddy) působením vysokotlaké páry „vtlačí“ dovnitř zrna rozpuštěné vitaminy a minerální látky z povrchových vrstev. Takto opracované zrno se potom zpracovává stejně jako běžné druhy rýže, tzn. loupáním a leštěním, ovšem vitaminy a minerální látky v zrně zůstávají. Působením zvýšené teploty se mění i struktura škrobu, což se projeví na vařivosti. Při vaření absorbuje rýže parboiled více vody, což zlepšuje její výtěžnost. Barva syrové parboiled rýže je žlutá, varem však přejde v zářivě bílou. Obsahuje vitaminy skupiny B, včetně niacinu a kyseliny listové. Pokud jde o množství minerálních látek, expertní studie se shodují, že u sodíku a draslíku jsou hodnoty zhruba stejné jako u běžné rýže. Zatímco hořčík a fosfor vykazuje mírné navýšení, obsah vápníku a železa dosahuje oproti klasické loupané rýži téměř dvojnásobku [27].



Obr. 14: Rýže parboiled [25]

3 ANTIOXIDANTY

Termín „antioxidant“ pochází z potravinářské chemie ze 40. let, a je původně celkem úzce definován jako látka schopná zastavit řetězové radikálové reakce typu peroxidace lipidů [28]. Jedná se o látky, které brání oxidačnímu procesu nebo ho zpomalují. Aby mohly být považovány živiny za antioxidanty, musí potlačovat destrukční činnost volných radikálů tím, že poskytují chybějící elektron [29].

Antioxidační vlastnosti vykazuje řada rostlinných potravinářských materiálů. Přírodní antioxidanty získané z rostlin, nejčastěji jako extrakty, mají často omezené použití, neboť mohou vykazovat vůni po použitých rostlinách nebo hořkou chuť [30].

Antioxidanty brání oxidačnímu procesu nebo ho zpomalují. Aby mohly být považovány živiny za antioxidanty, musí potlačovat destrukční činnost volných radikálů tím, že poskytují chybějící elektron [29]. O sloučeniny s antioxidační kapacitou, které se přirozeně vyskytují v potravinách, je velký zájem v potravinářském průmyslu, zajišťují jejich delší údržnost a mají příznivé účinky na zdraví.

Epidemiologické a živočišné studie naznačují, že pravidelná konzumace rostlinných potravin (ovoce, zelenina a celozrnné výrobky) může snížit riziko chronických onemocnění spojených s oxidativním poškozením [31].

Antioxidanty rozlišujeme endogenní a exogenní. Endogenní jsou takové, které dokáže organismus produkovat. Nejčastěji se jedná o enzymy, koenzymy, sloučeniny s obsahem síry. Mají své specifické funkce a plní v organismu určitou roli, např. enzymy a koenzymy jsou katalyzátory chemických reakcí. Mezi nejvýznamnější endogenní antioxidanty patří glutathion, některé enzymy, např. *superoxiddismutázy*, *kataláza*. Exogenní antioxidanty jsou takové, které je nutno přijmout potravou. Patří mezi ně vitaminy, hlavně C a E, bioflavonoidy, karotenoidy a několik sloučenin obsahujících síru [29].

3.1 Volné radikály

Škodlivost volných radikálů objevil v roce 1954 Dr. Denham Harman. Jako první přišel s teorií, že proces stárnutí způsobují volné radikály. Do této doby převládal názor, že volné radikály existují pouze vně těla [29]. Termín „volný radikál“ z chemického hlediska je jakákoliv molekula, atom nebo ion s nepárovými elektrony ve valenční sféře, schopný alespoň krátkodobě samostatné existence [28]. Volné radikály jsou velmi nestálé, reaktivní a vyhledávají další elektron, aby vytvořily nový pár. Jejich negativní účinek na lidský orga-

nizmus spočívá ve schopnosti vázat se na elektrony tělesných buněk [29]. V organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku a reaktivních forem dusíku. Tvorba kyslíkových radikálů je nevyhnutelnou součástí aerobního metabolismu [28].

Tabulka 1: Volné radikály [32]

Volné radikály reaktivní formy kyslíku	
Superoxid	O_2^{\cdot}
Hydroxylový radikál	HO^{\cdot}
Peroxy	ROO^{\cdot}
Alkoxy	RO^{\cdot}
Hydroperoxy	HO_2^{\cdot}
Volné radikály reaktivní formy dusíku	
Oxid dusnatý	NO^{\cdot}
Oxid dusičitý	NO_2^{\cdot}

3.2 Mechanismus účinku antioxidantů

Účinek antioxidantů lze shrnout do několika bodů. Antioxidanty převážně interferují s procesem oxidace lipidů a jiných oxylabilních sloučenin tak, že:

- primární antioxidant reagují s volnými radikály nebo sekundárními antioxidanty,
- redukují vzniklé hydroperoxy,
- váží do komplexů katalyticky působící kovy,
- eliminují přítomný kyslík [30].

3.3 Výskyt antioxidantů

Kromě endogenních nízkomolekulárních antioxidantů, jako je glutation, kyselina močová, koenzym Q a další, se do centra pozornosti řadí také mnoho dalších látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají společně s potravou. Některé potraviny rostlinného původu tak vedle své nutriční a energetické hodnoty mají důležitou roli zdroje an-

tioxidantů. K přírodním látkám s antioxidačními účinky, které jsou přijímané potravou, jsou v první řadě tradičně řazeny vitaminy C, E a karotenoidy [33].

Antioxidační vlastností karotenoidů je jejich schopnost inaktivovat excitované molekuly. Tento proces se nazývá zhášení. Příkladem může být zhášení singletové molekuly kyslíku ($^1\text{O}_2$), který vzniká fotochemickou reakcí, enzymaticky nebo při procesu peroxidace lipidů v membránách. Vitamin E zabráňuje destruktivnímu neenzymovému působení molekulárního kyslíku na dvojné vazby nenasycených mastných kyselin vázaných v tkáňových lipidech [34].

V poslední době se však mnohem větší význam přikládá dalším přírodním látkám, zejména polyfenolickým sloučeninám. Mezi ně patří např. flavonoidy, katechiny a fenolické kyseliny. Zdrojem těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaje, vína a aromatické a léčivé rostliny. Celkový denní příjem polyfenolů z různých zdrojů byl odhadnut na 1 g a je tedy vyšší než příjem antioxidačních vitaminů. V řadě experimentálních studií bylo také prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitaminů [35].

Za pomoci několika studií byl prokázán antioxidační potenciál sloučenin obsažených i v zelenině nebo koření, a to zejména v kakaových bobech, bramborách, špenátu, luštěninách, paprice, česneku, zázvoru, rozmarýnu, zeleném pepři i v řásách. Z nápojů, kromě ovocných šťáv, se antioxidační látky vyskytují hlavně ve víně, kde prokazují antioxidační aktivitu antokyany, dále pak i ve whisky, zeleném a černém čaji, kde je v sušině obsaženo až 30 % fenolických sloučenin s vyšším antioxidačním účinkem. Jejich důležitou složkou jsou katechiny. Dalšími účinnými látkami polyfenolů jsou flavony, které mají antimutagenní aktivitu a společně s xantofyly mají antivirové, antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Dalším potenciálním rostlinným zdrojem látek s antioxidační povahou mohou být zelený ječmen (důležité složky ve všech částech rostliny, ale nejvíce v listech), moruše, pohanka krupice, řepka, sezam, slunečnice, kukuřice, pšenice tvrdá. Ve vnějších vrstvách (obalech) se vyskytuje vyšší množství polyfenolických látek, které už z principu plní v rostlinách i ochrannou funkci [29,32,36].

3.4 Vliv antioxidantů na zdraví

Antioxidanty pohotově reagují s různými biologickými strukturami – mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy (nukleovými kysel-

linami) i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Tyto reaktivní formy mají značný fyziologický i patologický význam. Staly se proto předmětem intenzivního lékařského výzkumu a vědomosti o nich se postupně uplatňují v lékařské praxi [32]. Oxidační stres se podílí na vzniku rakoviny, kornatění cév, malárie a revmatoidní artritidy a může hrát roli v neurodegenerativních onemocněních a stárnutí. Fenoly s více hydroxylovými skupinami jsou obecně nejúčinnější pro prevenci oxidace lipidů a lipoproteinů o nízké hustotě (LDL, Low Density Lipoprotein). Kromě antioxidačních vlastností mají antioxidanty antibakteriální, antivirové, antimutagenní, antialergické, antikarcinogenní a protizánětlivé účinky [36].

Podávání potravinových doplňků s antioxidačními vitaminy C, E, případně β -karotenem a selenem, které bylo předmětem rozsáhlých a opakovaných studií, je jednoznačně prospěšné jen v případě předchozího deficitu, jinak je buď neúčinné, anebo dokonce škodí. Příčinu tohoto antioxidačního paradoxu je třeba hledat v komplexitě systémů antioxidační ochrany lidského těla, kde jsou nízkomolekulární antioxidanty jen malou součástí a v dalších interakcích použitých látek s organizmem [28].

Úloha antioxidantů v ochraně zdraví a v prevenci vzniku a rozvoje nemocí je značně složitá, její mechanismus není dosud v uspokojivé míře vysvětlen. Avšak výsledky velkého počtu experimentálních a klinických studií ukazují, že pravidelný a dostatečně velký příjem širokého spektra antioxidantů (často nad doporučenou denní dávku) mají příznivé účinky na větší odolnost organismu [36]. Antioxidanty se aktivně projevují již v trávicí trubici především po svém vstřebání, a to v krevním oběhu i v cílových tkáních [37].

4 POLYFENOLICKÉ SLOUČENINY

Jsou přírodní látky, které jsou jako sekundární metabolity zastoupeny v každé vyšší rostlině a v každém jejím orgánu. Tyto látky představují mnoho typů sloučenin, např. flavonoidy, které lze dále rozdělit na flavony, flavonoly, izoflavony, chalkony, aurony, redukované flavanoly, resp. flavan-3,4-dioly, dále pak fenolkarboxylové kyseliny a s nimi úzce spojené kumariny, antokyanová barviva a jejich redukované formy leukoantokyanidiny [38].

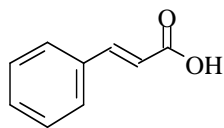
Polyfenolické látky si vytvářejí rostliny na svoji obranu proti škůdcům a chorobám, neboť mnohé z nich mají značnou fungicidní, baktericidní i viroidní účinnost, chrání embryo klíčku před škodlivými vlnovými délkami ultrafialového záření. Zatímco zde je jejich role pozitivní, ve výživě se některé typy uplatňují negativně. Důvodem je to, že zvláště rozpustné frakce vysokomolekulárních polyfenolů se váží s bílkovinami do nerozpustných komplexů, které nejsou monogastrickými organizmy využitelné [39].

4.1 Fenolické kyseliny

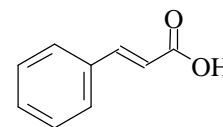
Vycházejí z kyseliny benzoové, jsou to např. kyselina gallová, její dimer (hexahydroxydifenová kyselina). Kyselina gallová je základem hydrolyzovatelných tříslovin. Fenolické kyseliny jsou přítomné v řadě potravin. Podle současných poznatků tvoří přibližně jednu třetinu polyfenolů v potravě. V naší stravě jsou fenolické kyseliny zastoupeny především hydroxyskořicovými kyselinami, převážně ve formě esterů. Nejčastěji je to kyselina kávová a její estery, dále pak kyselina ferulová [40]. Kyselina hydroxyskořicová (i kyselina ferulová) je zastoupena v obilovinách, kde vykazují dobré antioxidační vlastnosti vzhledem k přítomnosti aromatických fenolických kruhů, které mohou stabilizovat a delokalizovat nepárový elektron v jeho aromatickém kruhu a může být alespoň částečně zodpovědná za pozitivní účinky spojené se spotřebou obilovin. V malém se v obilovinách vyskytuje kumarová kyselina, kávová a deriváty kyseliny benzoové. Většina z těchto sloučenin se nachází v obalových vrstvách, otrubách. Jsou většinou kovalentně vázány na buněčné stěny polymerů a mohou být extrahovány po alkalické nebo kyselé hydrolyze [6,31].

Na obsah fenolických látek (hlavně kyseliny hydroxyskořicové) v obilovinách má vliv několik faktorů, zejména odrůda obilovin, oblast, životní prostředí, podmínky pěstování či mletí a rafinace zrna. S množstvím fenolických látek je také ovlivněna antioxidační vlastnost obilných výrobků. Aktuální doporučení z mezinárodních organizací pro zdraví

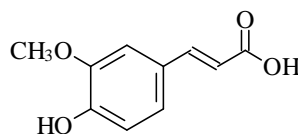
a výživu zahrnuje zvýšení spotřeby obilných výrobků pro jejich pozitivní vliv na lidské zdraví [6].



Kyselina skořicová



Kyselina kávová



Kyselina ferulová

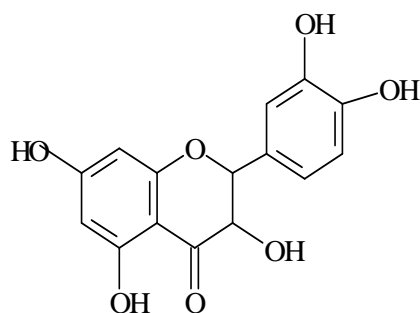
4.2 Flavonoidy

Flavonoidy (převážně antokyany, flavonoly, flavony, katechiny a flavanony), izoflavonoidy a ostatní polyfenoly (fenolkarboxylové kyseliny, lignany, stilbeny, resp. dusík obsahující betalainy aj.) jsou silnými antioxidanty, které zachycují volné radikály. Přirozeně se vyskytujících flavonoidů v potravinách je více než 5000 druhů. Nejvíce jich je dosud zjištěno zejména u cereálií [38,39].

Flavonoidy jsou nejčastěji se vyskytujícími polyfenoly v naší výživě. Odhadovaný příjem flavonoidů ve výživě člověka je v rozmezí několika desítek až stovek gramů za den, v závislosti na výživových zvyklostech. Mezi hlavní skupiny flavonoidů patří flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly, proantokyanidiny, kyanidiny a izoflavonoidy. Velká část flavonoidů je glykosylována. Navázána bývá glukóza, ramnóza, méně často galaktóza, arabinóza, xylóza, glukuronová kyselina a další cukry. Obvykle je navázána jedna cukerná jednotka, ale mohou být i dvě, tři či více [40].

4.2.1 Flavonoly

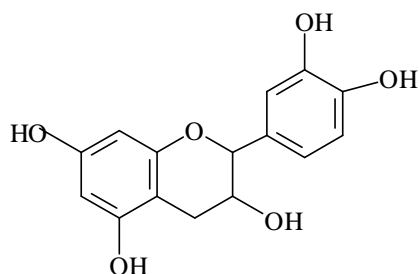
Dominantní flavonoid ve výživě člověka je flavonol kvercetin. Kvercetin se nachází ve vysokých koncentracích v běžně přijímaných potravinách jako cibule (300 mg.kg^{-1}), jablka ($21\text{--}72 \text{ mg.kg}^{-1}$), kapusta (100 mg.kg^{-1}), červené víno ($4\text{--}16 \text{ mg.l}^{-1}$) a zelený a černý čaj ($10\text{--}25 \text{ mg.l}^{-1}$) [40].



Kvercetin

4.2.2 Flavanoly

Hlavními flavanoly jsou katechiny. Patří k nim např. katechin, epikatechin, epigallokatechin a jejich estery s kyselinou gallovou. Jsou hlavně přítomné v čaji. Nálev ze zeleného čaje obsahuje kolem 1 g.l^{-1} katechinů. V černém čaji je obsah redukován asi na polovinu v důsledku oxidace na komplexnější polyfenoly během fermentace. Další zdroje jsou červené víno (270 mg.l^{-1}) a čokoláda. Vykazují astringentní účinky a výskytem jsou obvykle asociovány s flavanolovými katechiny. Běžným zdrojem jsou jablka, hrušky, hrozny, červené víno, čaj, čokoláda, kakao [40].

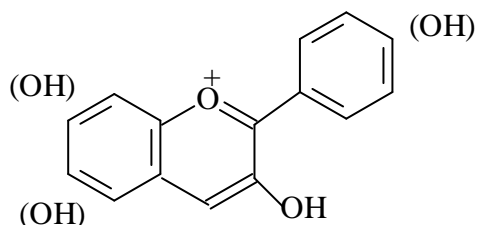


Katechin

4.2.3 Antokyanidiny

Antokyanidiny jsou ve vodě rozpustné pigmenty modré, fialové až červené barvy, vyskytující se např. v třešních, švestkách, rybízu, jahodách, ostružinách, malinách, borůvkách. Jsou hlavní skupinou flavonoidů, která je v cereáliích hlavně studována. Sloučeniny antokyanidinů se vyskytují v pigmentech oplodí u ječmene, rýže, kukuřice, pšenice, žita. Antokyanidiny jsou obsaženy i v pigmentech pšenice a žita. Ostatní flavonoidy, které se vyskytují v ovoci a zelenině se v obilovinách vyskytují také, ale v malém množství. Jedná se napří-

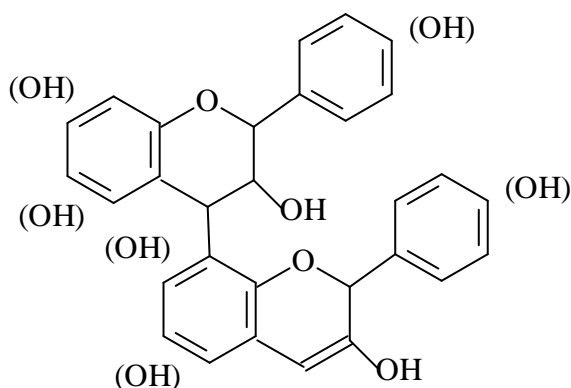
klad o flavon apigenin, který je obsažen jak v celeru a petrželi, tak v mletém ovsu, dále flavanony, které jsou hlavní složkou citrusových plodů a ova [38].



Antokyjanidiny

4.2.4 Proantokyjanidiny

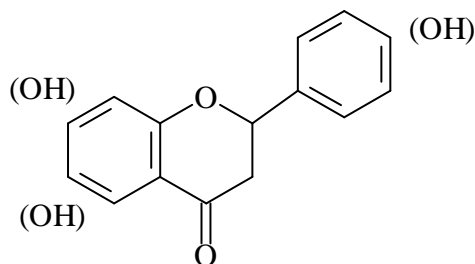
Proantokyjanidiny jsou polymerní flavanoly. Jedná se o komplexní směsi polymerů. Mohou být také vázány esterově s kyselinou gallovou. Z obilovin jsou proantokyjanidiny obsaženy v obalových vrstvách ječmene, kde se jeho obsah pohybuje kolem $0,74 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Jedná se o monomery, dimery a trimery. Taniny se vážou na proteiny, sacharidy a minerální látky a zlepšují jejich stravitelnost. V potravinách se charakterizují svojí svíravou chutí. Kondenzované taniny mají vysokou antioxidační aktivitu ve srovnání s jednoduchými fenoly. Kromě toho mají také antikarcinogenní, kardiovaskulární, gastroprotektivní účinky a snižují hladinu cholesterolu [38].



Proantokyjanidiny

4.2.5 Flavanony

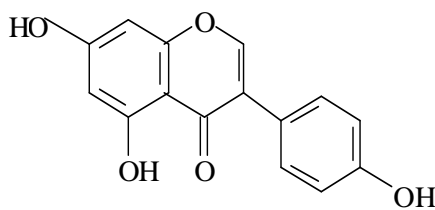
Flavanony jsou také nazývány jako „citrusové“ flavonoidy. Jsou to látky vyskytující se v pomerančích a grapefruitech. K hlavním se řadí naringenin, hesperetin a jejich glykosidy [40].



Flavanony

4.2.6 Izoflavonoidy

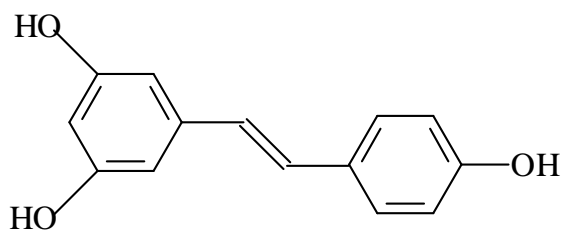
Patří k nim především izoflavony daidzein a genistein. Nachází se hlavně v luštěninách, jejich vydatným zdrojem je sója ($1 - 3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) a veškeré produkty z ní. Jejich průměrný příjem potravou je v Japonsku vzhledem k vysoké konzumaci sóji $30 - 40 \text{ mg}$ za den, zatímco u evropské populace jen $1 - 9 \text{ mg}$ za den [40].



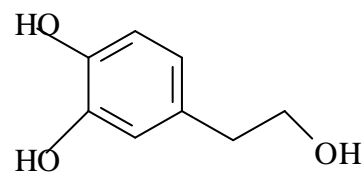
Izoflavonoid - genistein

4.2.7 Stilbeny

K dietárním polyfenolům se řadí dále stilbeny. Nejsou v rostlinné říši příliš rozšířeny. Jeden z nejvýznamnějších zástupců je resveratrol, který je obsažen v červeném víně. Kromě antioxidačního účinku má také účinky antikarcinogenní. Dalšími zástupci jsou např. hydroxytyrozol, oleuropein, které jsou obsaženy v olivovém oleji. Obsah se uvádí až $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ oleje, závisí však na odrůdě, podmínkách pěstování a způsobu zpracování [38].



Resveratrol



Hydroxytyrozol

4.2.8 Ligniny a lignany

Lignin tvoří 30 % rostlinné biomasy a patří k nejvíce se vyskytujícím organickým polymerům na zemi. Jsou hlavní složkou obilovin, kde se vyskytuje 3 – 7 % ligninů. Dlouho byly považovány za bezvýznamné, až po několika studiích bylo prokázáno, že díky jejich struktuře vykazují antioxidační vlastnosti. Lignany patří mezi fytoestrogeny, které jsou přítomny v rostlinných potravinách, včetně lněných semen a zrna (kukuřice, oves, pšenice a žito). Mezi lignany patří sekoizolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, pinoresinol a syringaresinol. Všechny mají polyfenolickou strukturu a můžou mít antioxidační účinky [41].

5 METODY STANOVENÍ

Byla stanovena antioxidační aktivita stovek položek potravin a vytvořena jejich databáze, kterou lze použít pro výpočet příjmu antioxidačních ekvivalentů k celkové stravě, nebo pro konkrétní surovinu [42,43].

V oblasti chemické analýzy a biologického hodnocení potravin byly v posledním desetiletí vypracovány početné metody, které umožňují stanovit tzv. celkovou antioxidační aktivitu vzorku. Metody jsou principiálně odlišné a jejich modifikace se postupně vyvíjejí. Jejich základním smyslem je charakterizovat v podmínkách blízkých fyziologickému prostředí jejich antioxidační účinnost jako souhrnnou vlastnost potravin [37]. Pro posouzení obsahu fenolických sloučenin jsou nejběžněji používané tyto tři metody:

- FCM (s Folin-Ciocalteuovým činidlem),
- PBM (Price and Butler Method, metoda Price a Butlera)
- AAPM (s 4-aminoantipyrinem, aminofenazonem)

Pro hodnocení antioxidační kapacity se využívá hlavně metod:

- TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, Antioxidační kapacita vyjádřená v přepočtu na množství standardu troloxu),
- DPPH (s difenyl-pikrylhydrazinem),
- FRAP (Feric Reducing Antioxidant Power, reakce železitých komplexů s antioxi-danty pro hodnocení antioxidační kapacity [43].

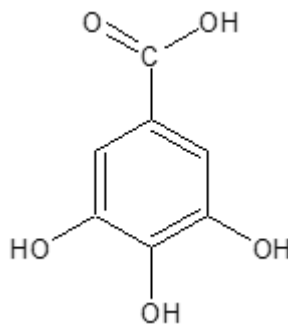
5.1 Stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin

Folin-Ciocalteuho spektrofotometrická metoda (FCM), se běžně používá pouze pro posouzení součtu fenolických sloučenin v rostlinných výtažcích a šťávách. Kromě FCM metody existují pro posouzení obsahu fenolických sloučenin další dvě, a to již zmiňovaná PBM a metoda AAPM (se 4-aminoantipyrinem) [43].

5.1.1 Metoda FCM

Folin-Ciocalteuho spektrofotometrická metoda je nazývána také Gallic Acid Equivalent method (GAE). Jako standard totiž slouží kyselina gallová. Výsledná hodnota je přepočítávána na ekvivalentní množství kyseliny gallové. Součástí Folin-Ciocalteuho činidla není fenol, ale obsahuje sloučeniny, které reagují s fenolickými sloučeninami. Jedná se o směs

fosfomolybdenanu a fosfowolframanu, která se používá pro kolorimetrické stanovení fenolických a polyfenolických antioxidantů. Folin-Ciocalteuho činidlo reaguje s fenoly a dochází k redukci látky na formu chromogenů, které mohou být zachyceny spektrofotometricky při vlnových délkách v rozmezí 550 – 750 nm [43,44].

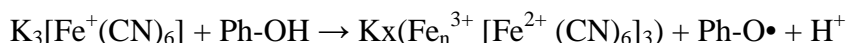


Kyselina gallová [37]

5.1.2 Metoda PBM

V této metodě je anion fenolátu zoxidován na radikál fenolátu a zároveň dochází k redukci hexakynoželezitanu na hexakynoželeznan, tvoří se pruská (neboli berlínská) modř $K_x(Fe_n^{3+} [Fe^{2+} (CN)_6]_3)$ [44].

Reakce probíhá podle rovnice :



5.2 Stanovení antioxidantní kapacity

Antioxidantní aktivita je definována jako schopnost sloučeniny (směsi látek) inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin (např. zabraňovat peroxidaci lipidů). Měly by se rozlišovat dva pojmy, antioxidantní kapacita a reaktivita.

Antioxidantní kapacita poskytuje informaci o délce trvání antioxidantního účinku, reaktivita charakterizuje počáteční dynamiku průběhu antioxidantního procesu při určité koncentraci antioxidantu. V oblasti chemické analýzy a biologického hodnocení jakosti rostlinných produktů byly v posledních letech vypracovány četné metody, které umožňují stanovit tzv. celkovou antioxidantní kapacitu vzorku (TAC, tj. Total Antioxidant Capacity) [45].

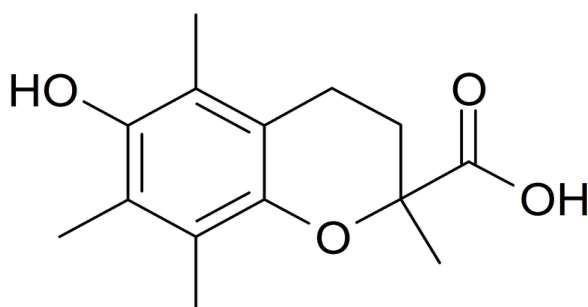
Pro měření celkové antioxidantní aktivity vzorku (Total Antioxidant Activity, TAA), která je prokazatelná jak v tělních tekutinách, tak v potravinách i v čistých sloučeninách, byla

zavedena řada testů. Každá metoda se vztahuje k tvorbě různých radikálních forem, jejich mechanismy účinku se od sebe liší [42].

Stanovení TAC u obilovin je docela komplikované vzhledem k tomu, že většina antioxidantů je kovalentně vázána na buněčné stěny. Bylo navrženo několik metodik za použití různých rozpouštědel jako voda, etanol, metanol, aceton a byly použity samostatně nebo v kombinaci pro maximální zisk vázaných i volných sloučenin s antioxidační aktivitou [5]. Možností praktického využití výsledků systematického hodnocení TAA potravin rostlinného původu je několik. Mohou být používány jako alternativní kritérium biologické hodnoty potravin, mohou být používány jako srovnávací znak potravin v závislosti na různých podmínkách jejich získávání a úschovy (odrůdy, technologie, způsob skladování, klimatické a agrotechnické podmínky, apod.), jsou podnětem pro přehodnocení účelnosti nahrazení ovoce, zeleniny a jiných potravin rostlinného původu farmaceutickými antioxidanty. Souhrnně lze stanovení TAA potravin hodnotit jako snahu standardními postupy určit fyziologicky interpretovatelnou antioxidační účinnost vzorku, a to způsobem, který by byl metodicky, materiálově a instrumentálně dostupný a použitelný k početným sériovým analýzám. Jeho výsledky by měly korespondovat s biologickými hodnotami téhož vzorku. Existuje velké množství metod pro stanovení a vyjádření TAA. Nejčastěji používanou metodou je již zmiňovaná TEAC [37].

5.2.1 Metoda TEAC

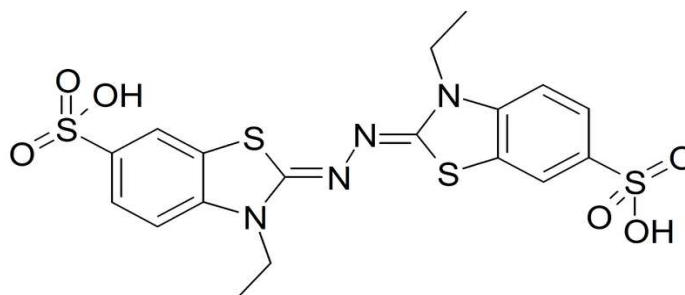
U metody TEAC se využívá činidel, pomocí kterých dojde ke vzniku radikálové formy po reakci s jinou látkou. Tato vzniklá radikálová forma je barevná a relativně stabilní. Pokud jsou ve vyextrahovaných vzorcích potravin přítomny látky, které vykazují antioxidační aktivitu, dochází k redukci a tím k odbarvení reakční směsi, je měřena relativní zhášecí schopnost antioxidantu v porovnání s Troloxem. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku. Aby vyjádření této kvality vzorku bylo standardní, stanovuje se shodným postupem TEAC v přítomnosti kyseliny askorbové, gallátu, troloxu či epikatechinu. Mezi nejčastěji používané prekurzory radikálů řadíme ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonová kyselina) a DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)-hydrazylu) [32,40].



Trolox

5.2.2 Metoda ABTS

Vytvoření ABTS radikálového kationu tvoří základ jedné ze spektrofotometrických metod, která může být použita k měření celkové antioxidační aktivity roztoků čistých látek, vodné směsi a nápojů. Při prověřování celkové antioxidační aktivity v potravinách se využívá principu odbarvování roztoku se vzorkem, kde radikálový kation $ABTS^{•+}$ vzniká ve stabilní formě před reakcí s domnělými antioxidanty. Iniciátorem, který ABTS přeměňuje na modrozelený kationradikál $ABTS^{•+}$, je $K_2S_2O_8$. Jako iniciátor $ABTS^{•+}$ lze dále také použít peroxid vodíku, $K_4[Fe(CN)_6]$ nebo AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid). ABTS test je vhodný pro měření hydrofilních i lipofilních antioxidantů, má absorpční viditelné oblasti 600 – 750 nm, tudíž můžeme antioxidační aktivitu snadno stanovit spektrofotometricky. Relativní antioxidační aktivita je definována jako koncentrace Troloxu se stejnou antioxidační aktivitou, kterou má vzorek o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Stanovení TEAC je závislé na čase inkubace i na poměru množství vzorku a koncentrace $ABTS^{•+}$. Jedním z omezení této metody je její malá selektivita při reakci s donory vodíkových atomů. Popsaná metoda umožňuje změřit antioxidační činnost řady karotenoidů, fenolů a některých antioxidantů obsažených v plazmě [42,46,47].

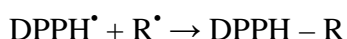
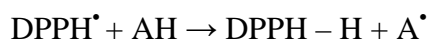


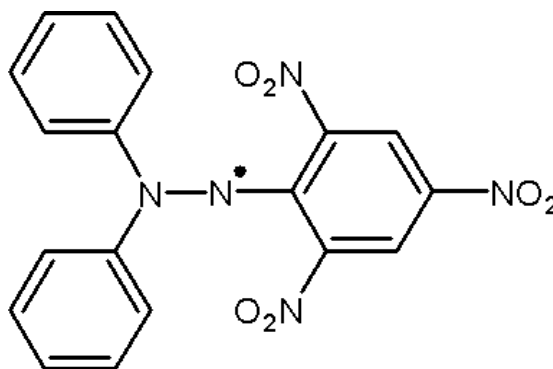
ABTS

5.2.3 Metoda DPPH

Principem stanovení celkové antioxidační aktivity touto metodou je vznik radikálové formy sloučeniny DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazylu), což je stabilní volný radikál, který může být díky své struktuře akceptorem atomu vodíku, čímž přechází do formy stabilní molekuly. DPPH test je při reakci s donory H selektivnější než ABTS^{•+}. Radikál DPPH je v metanolovém roztoku relativně stabilní, zbarvení tohoto roztoku je modrofialové působením železité soli. Po přidání vzorku se v přítomnosti redukčních faktorů radikál zháší, a tím se roztok odbarvuje. DPPH vykazuje silnou absorpci v UV/VIS spektru. Redukce DPPH antioxidantem nebo radikálem, která se projeví odbarvením roztoku, se měří spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm. Jako standard může být použita např. kyselina askorbová, kyselina gallová, kyselina izoaskorbová, epikatechin, Trolox, na jehož ekvivalentní množství se antioxidační aktivita vzorku přepočítává nejčastěji [42,47,48].

Reakce radikálové formy DPPH, který je redukován antioxidantem (AH) nebo radikálem (R) a přechází do stabilní formy [45]:





2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

5.2.4 Metoda FRAP

(Ferric Reduction Ability of Plasma) je založena na redukci železitých komplexů jako je TPTZ (2,4,6- tripyridyl-S-triazin), ferrikyanid aj., které jsou téměř bezbarvé a po redukci a eventuální reakci s dalším činidlem vytváří barevné produkty, jakým může být např. berlínská modř [45].

5.2.5 Lipidově peroxidační metody

Provádějí se v pufrovaných modelových systémech obsahujících nenasycené mastné kyseliny a testovaný vzorek. Často se přidává homogenát živočišné tkáně, např. jater nebo mozku. Lipidová peroxidace se v ní iniciuje tetrachlormetanem nebo peroxidem [37].

5.2.6 Metoda ORAC

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) spočívá ve vytvoření peroxylového radikálu fykoeritrinu, a to jeho oxidací činidlem ABAP (2,2'-azobis-2-metyl- propionamidin). Radikál se určuje kvantitativně fluorimetricky a hodnotí se rychlost úbytku signálu po přidání testovaného vzorku [37].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 METODIKA PRÁCE

6.1 Přístroje a zařízení

Měření antioxidační aktivity bylo provedeno na UV spektrofotometru Spekol 11. Standardy a vzorky byly připraveny pomocí mikropipet s nastavitelným objemem 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl. Dále byly použity digitální váhy Schoeller AFA-2102C.

6.2 Použité chemikálie

metanol (Penta)

redestilovaná voda (upravená na iontoměničích (Aquaosmotic system))

ABTS diamonná sůl (Sigma Aldrich, Německo)

K₂S₂O₈ - peroxidisíran draselný (Lachema)

DPPH (Sigma Aldrich, Německo)

standard Trolox (Sigma Aldrich, Dánsko)

kyselina askorbová (Fluka, Švýcarsko)

Folin-Ciocalteuho činidlo (Sigma Aldrich, Švýcarsko)

Na₂CO₃ (uhličitan sodný, Lachema)

kyselina gallová (Sigma Aldrich, Německo)

6.3 Používané vzorky

Kamut

Měřený vzorek byl od výrobce PRO-BIO s uvedenou zemí původu Kanada. Nutriční obsah kamutu ve 100 g výrobku: 1507 kJ, 19,6 g bílkovin, 68 g sacharidů, 2,6 g tuku, 411 mg P, 153 mg Mg, 4,3 mg Zn, 4,2 mg Fe, 5,54 mg niacinu, 0,45 mg tiaminu. Obilovina byla skladována v polypropylenovém obalu (PP) bez viditelného poškození o obsahu 500 g.

Pšenice špalda

Země původu vzorku loupané špaldy je Slovensko, distributorem je PRO-BIO obchodní společnost s.r.o., první český výrobce biopotravin. Nutriční obsah pšenice loupané ve 100g výrobku: 1480 kJ, 16 g bílkovin, 88 g sacharidů, 2,5 g tuku, 250 mg Mg, 4,3 mg niacinu, 0,6 mg tiaminu. Obilovina byla skladována v polypropylenovém obalu (PP) bez viditelného poškození o obsahu 1 kg.

Grünkern

Grünkern, zelená zrna špaldy, balena v 300g balení a skladována v nepoškozeném polypropylenovém obalu. Měřený vzorek pochází z Rakouska od výrobce PRO-BIO obchodní společnost s.r.o. Nutriční obsah Grünkernu ve 100 g výrobku: 1382 kJ, 12,3 g bílkovin, 62,5 g sacharidů, 3 g tuku.

Špaldové kernotto

Měřený vzorek špaldového kernotta pochází z České republiky, byl balen v polypropylenovém obalu. Obsah balení byl 500 g. Nutriční obsah špaldového kernotta ve 100 g výrobku: 1480 kJ, 16 g bílkovin, 86 g sacharidů, 2,5 g tuku, 280 mg Mg, 4,3 mg niacinu, 0,6 mg tiaminu.

Pšenice ozimá

Země původu vzorku pšenice ozimé je Česká republika od výrobce PRO-BIO s.r.o. Nutriční obsah pšenice ozimé ve 100 g výrobku: 1199 kJ, 18 g bílkovin, 57 g sacharidů, 1,9 g tuku, 5,9 mg Fe, 60 mg Mg, 0,12 mg vitamínu A. Pšenice ozimá byla balena v polypropylenovém (PP) obalu o obsahu 1 kg.

Směsi mouk pšenično-žitné

Vzorky mouk pšeničné (pšeničná hladká světlá - pekařský speciál) a žitné (žitná tmavá chlebová) jsou od stejného výrobce Penam, a.s. Cejl 38, Brno, mlýn Kroměříž. Obě mouky byly baleny v obalu PAP o obsahu 1 kg. Mouka pšeničná hladká světlá byla vyrobena dne 8.1.2011 a mouka žitná tmavá chlebová 13.12.2010. Jejich minimální trvanlivost je 6 měsíců od datumu výroby. Měřeny byly směsi těchto mouk, a to v poměru 10:90, 50:50, 90:10.

Rýže natural

Má částečně obroušenou slupku vyznačuje se vysokým obsahem vitaminů B₁, B₂, B₆, E, minerálních látek hořčíku, fosforu a vápníku. Země původu měřeného vzorku byla Itálie od výrobce Lagris. Nutriční hodnoty ve 100 g výrobku jsou: 1738 kJ, 9,7 g bílkovin, 85,4 g sacharidů, 3,3 g tuků, 0,53 g tiaminu, 429 mg P. Rýže natural byla balena v PP obalu o obsahu 500 g.

Rýže indiánská

Vzorek Indiánské rýže byl vybírán ze směsi rýže parboiled a indiánské. Země původu je Maďarsko a USA, výrobcem obchodní společnost Lagris. Nutriční hodnoty ve 100 g výrobku jsou: 1531 kJ, 13,7 g bílkovin, 74,2 g sacharidů, 1 g tuků. Výrobek byl skladován v papírovém obalu PAP o hmotnosti 500 g.

Rýže parboiled s indiánskou

Jedná se o směs rýže indické a rýže parboiled. Pro extrakci na měření antioxidační aktivity vzorku, byl spočítán stejný počet zrn z obou druhů této rýže. Výrobcem vzorku je obchodní společnost Lagris. Rýže byla skladována v neporušeném obalu o obsahu 500 g z PAP materiálu. Nutriční obsah výrobku ve 100 g je: 1473 kJ, 8 g bílkovin, 77,5 g sacharidů, 0,5 g tuků.

Rýže parboiled

Rýže parboiled se zpracovává vysokotlakou párou, přičemž vitaminy a minerály přecházejí ze slupky rýže dovnitř do zrna a jsou těmito složkami obohaceny. Nutriční hodnoty měřeného vzorku ve 100 g výrobku jsou: 1580 kJ, 7 g bílkovin, 77 g sacharidů, 0,3 g tuků, 0,33 mg tiaminu, 190 mg fosforu, 2,2 mg železa. Rýže byla skladována v obalu s papírového materiálu (PAP) o obsahu 500 g. Distributorem výrobku je Lagris a země původu Itálie.

Rýže kulatozrnná a dlouhozrnná

Rýže byla balena do nepoškozených polyetylenových obalů (PE). Obsah jednoho balení byl u rýže kulatozrnné i dlouhozrnné stejný, 1 kg. Nutriční hodnoty ve 100 g výrobku nebyly na obalu výrobku uvedeny, jednalo se o obchodní značku ARO.

Tabulka 2: Testované vzorky

Vzorek	Označení vzorku
Kamut	V1
Grünkern	V2
Špaldové kernotto	V3
Pšenice ozimá	V4
Pšenice špalda	V5
Mouka (pšenično-žitná 90:10)	V6
Mouka (pšenično-žitná 50:50)	V7
Mouka (pšenično-žitná 10:90)	V8
Rýže natural	V9
Rýže parboiled indická	V10
Rýže indická	V11
Rýže parboiled	V12
Rýže kulatozrná	V13
Rýže dlouhozrná	V14

6.4 Pracovní postup

6.4.1 Příprava standardů

- Pro metodu ABTS se používal standard Trolox, který byl rozpuštěn v metanolu, z tohoto zásobního roztoku byla ředěním připravena kalibrační řada o obsahu 0,01 – 0,06 $\mu\text{mol}\cdot 25\mu\text{l}^{-1}$ Troloxu.
- Pro metodu DPPH byla jako standard použita kyselina askorbová a kalibrační řada byla připravena ředěním o koncentracích 40, 80, 120 a 160 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny askorbové a výsledky jsou převáděny na ekvivalentní množství kyseliny askorbové (AAE – Ascorbic Acid Equivalents).
- U třetí metody, používané pro celkové stanovení fenolických látek Folin-Ciocalteuho metodou, byla použita jako standard kyselina gallová, která byla rozpuštěna v destilované vodě, ze zásobního roztoku byla ředěním připravena kalib-

rační řada obsahující 50, 100, 200, 400, 600 a 800 mg·l⁻¹ kyseliny gallové. Výsledky jsou udávány v ekvivalentech kyseliny gallové (GAE – Galic Acid Equivalents).

6.4.2 Příprava vzorků

Vzorky používané k analýze byly vždy rozemlety těsně před extrakcí, kvůli nestabilitě polyfenolických složek na světle a vzduchu. Po rozemletí bylo naváženo 5 g vzorku od každého, které bylo smícháno v Erlenmeyerově baňce s 50 ml metanolu. Poté se vzorky extrahovaly po dobu 24 hodin ve vodní lázni při pokojové teplotě. Po extrakci byl vzorek přefiltrován přes filtrační papír a získaný filtrát byl použit pro jednotlivá stanovení. Pipetované množství k analýze bylo 25 µl pro metodu ABTS, 450 µl pro metodu DPPH a 500 µl pro metodu FCM.

6.5 Metoda FCM

Do 10 ml odměrné baňky bylo postupně napipetováno 0,5 ml metanolického extraktu vzorku, 0,25 ml Folin-Ciocalteuho činidla a 1,25 ml 20% roztoku Na₂CO₃. Poté byla 10ml baňka doplněna po rysku destilovanou vodou a absorbance byla změřena na spektrofotometru spekol 11 při vlnové délce 765 nm proti slepému vzorku, který byl připraven stejným způsobem jako ostatní vzorky, místo 0,5 ml vzorku byla použita destilovaná voda. Celkové množství fenolických látek bylo vypočteno pomocí kalibrační křivky, která byla sestrojena pro standardní roztok kyseliny gallové. Výsledná absorbance analyzovaného vzorku byla vyjádřena jako GAE.kg⁻¹ (Gallic Acid Equivalents), ekvivalentní množství kyseliny gallové na 1 kg vzorku.

6.5.1 Kalibrační křivka pro metodu FCM

Pro kalibrační křivku byl použit stejný postup jako u vzorku, kdy byly k reakční směsi přidávány ředěním připravené koncentrace kyseliny gallové. Kyselina gallová byla ředěna destilovanou vodou na koncentrace 50, 100, 200, 400 a 800 mg·l⁻¹. Následně byly proměřeny absorbance jednotlivých koncentrací při vlnové délce $\lambda = 765$ nm a byla sestrojena kalibrační křivka v závislosti absorbance (%) na koncentraci kyseliny gallové (mg·l⁻¹).

6.6 Metoda ABTS

Radikál kationtu ABTS byl připraven reakcí ABTS diamonné soli s peroxidisíranem draselným. Bylo naváženo 0,096 g ABTS a poté rozpuštěno v 50 ml destilované vody na konečnou koncentraci $3,5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Poté byl přidán roztok $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ připravený smícháním 0,405 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ s 25ml destilované vody na koncentraci $0,06 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ v poměru 50:1. Tento vzniklý roztok byl ponechán 12 – 16 hodin reagovat za nepřístupu světla při laboratorní teplotě. Po uplynulé době byl roztok smíchán s čerstvě připraveným octanovým pufrům o pH 4,3 v poměru 39:1 (pufr:ABTS). S touto reakční směsí byl smícháván vzorek, kdy se ke 2 ml reakční směsi přidalo 25 μl vzorku. Roztok byl ponechán reagovat po dobu 30 minut a poté byl změřen úbytek absorbance A při vlnové délce $\lambda = 734 \text{ nm}$. Absorbance reakční směsi pufr:ABTS byla měřena spektrofotometricky za pomoci spekulu 11 proti pufru při stejné vlnové délce jako analyzované vzorky a činila $0,7 \pm 0,01$. Úbytek absorbance byl vyjádřen v % a pomocí regresní rovnice kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství Troloxu.

6.6.1 Kalibrační křivka pro metodu ABTS

Postup pro sestavení kalibrační křivky byl stejný jako při smíchávání reakčního roztoku s analyzovaným vzorkem. Ředěním troloxu s metanolem byly připraveny koncentrace $0,01 - 0,06 \mu\text{mol}\cdot 25\mu\text{l}^{-1}$ Troloxu, které byly přidávány k reakční směsi místo analyzovaného vzorku a následně byla měřena jejich absorbance.

6.7 Metoda DPPH

Zásobní roztok byl připraven navážením 24 mg DPPH a smícháním v odměrné baňce (100ml) s metanolem. Ze zásobního roztoku DPPH byl připraven roztok pracovní, kdy bylo smícháno 10 ml zásobního roztoku se 45 ml metanolu. Absorbance vzniklé směsi byla proměřena spektrofotometricky při vlnové délce $\lambda = 515 \text{ nm}$ proti metanolu a činila tak $1,075 \pm 0,01$. K analýze bylo pipetováno do 10ml odměrné baňky 450 μl vzorku a 8,55 ml pracovního roztoku. Směs se nechala reagovat po dobu 1 hodiny ve tmě a pak byl měřen úbytek absorbance při vlnové délce $\lambda = 515 \text{ nm}$ na spektrofotometru spekulu 11. Úbytek absorbance byl pomocí regresní rovnice kalibrační křivky přepočten na AAE $\cdot\text{kg}^{-1}$ (Ascorbic Acid Equivalents), ekvivalentní množství kyseliny askorbové na 1 kg vzorku.

6.7.1 Kalibrační křivka pro metodu DPPH

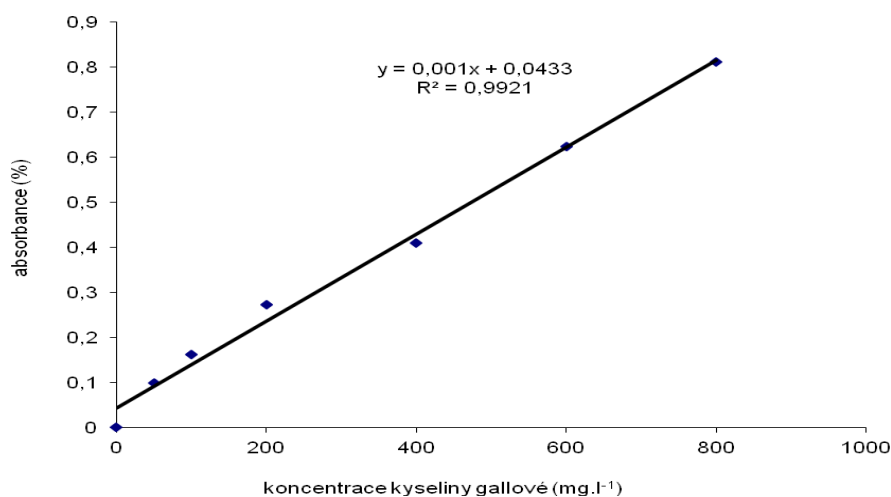
U metody DPPH byl jako standard použita kyselina askorbová, která byla ředěna destilovanou vodou na koncentrace 40, 80, 120 a 160 mg.l⁻¹ kyseliny askorbové. Byly změřeny absorbance jednotlivých koncentrací kyseliny askorbové a následně byla sestrojena kalibrační křivka v závislosti absorbance % na koncentraci kyseliny askorbové mg.l⁻¹. Pomocí kalibrační křivky byla získána regresní rovnice.

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

7.1 Celkové stanovení polyfenolů

7.1.1 Metoda FCM

Folin-Ciocalteuho činidlo obsahuje směsi fosfomolybdenanu a fosfowolframanu, které reagují s fenolickými látkami obsaženými v měřených vzorcích a dochází tak k jejich redukci.



Obr. 15: Závislost změny absorbance A na množství kyseliny gallové

Bylo proměřeno celkem 14 druhů vzorků, 5 vzorků obilovin, 3 vzorky mouk a 6 vzorků rýže. Z rovnice regrese kalibrační křivky byly vypočteny výsledky, vyjádřené v g kyseliny gallové na 1 kg čerstvých rozemletých vzorků (g GAE·kg⁻¹). Každý ze vzorků byl proměřen 5x a výsledná hodnota byla zprůměrována. Výsledné průměrné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3 i v grafickém znázornění na obr. 16. Z grafického znázornění je patrné, že nejvyšší celkový obsah polyfenolů je obsažen u vzorku rýže natural (V9), a to z důvodu nejvyššího obsahu polyfenolů právě v obalových částech zrna. Rýže natural je při technologickém zpracování pouze částečně obrušována, narozdíl od rýže bílé. Z druhů bílé rýže byly měřeny vzorky rýže dlouhozrné (V14), kulatozrné (V13) a rýže parboiled (V12). U těchto druhů rýže bylo naměřeno podstatně menší množství polyfenolů než u rýže natu-

ral. Druhá nejvyšší hodnota byla naměřena u vzorku rýže indické (V11), kde se v podstatě nejedná o rýži jako takovou, ale o semena divoké (plané) vodní trávy. Indická rýže byla vybírána ze směsi rýže parboiled indické. Stejně tak byla z této směsi vybrána i rýže parboiled, která je zpracovávána hydrotermickou úpravu zrna. U rýže parboiled (V12) byl naměřen obsah polyfenolů podstatně nižší než u samotné rýže indické (V11). Při navažování 5 g rýže parboiled indické (V10), (směsi těchto dvou druhů) byl napočítán stejný podíl zrn a výsledná hodnota celkového obsahu polyfenolů byla díky obsahu semen plané traviny vyšší, než u samotné rýže parboiled.

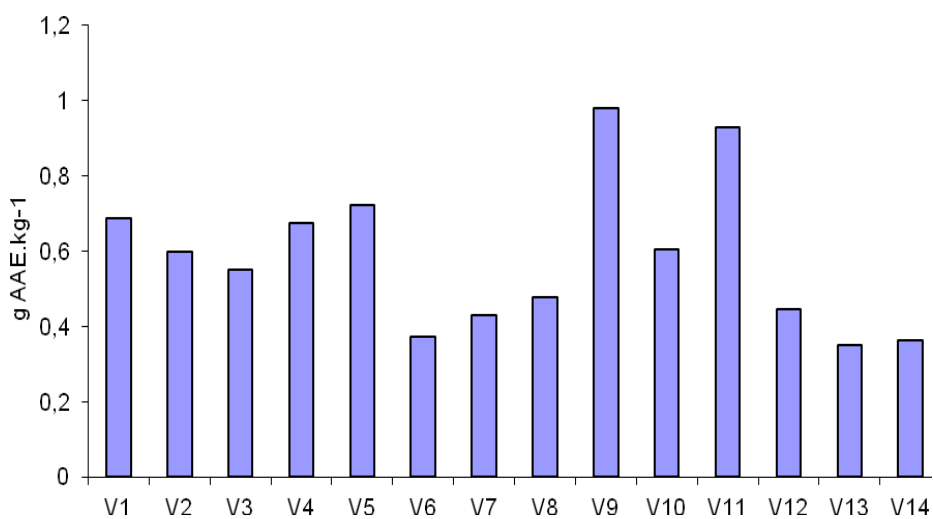
Zhruba stejný obsah celkového množství polyfenolů obsahují obiloviny kamut (V1), grünkern (V2), pšenice ozimá (V4), pšenice špalda (V5) a špaldové kernotto (V3) v rozmezí 0,812 – 0,967 g GAE·kg⁻¹. Nejvyšší obsah polyfenolů z obilovin byl naměřen u vzorku pšenice špaldy (V4).

U vybraných druhů pšenično-žitných mouk bylo naměřeno nejvyšší množství polyfenolických látek u směsi mouky pšenično-žitné v poměru 10:90 (V8).

Tabulka 3: Průměrné hodnoty stanovení celkového obsahu polyfenolů za použití metody FCM u měřených druhů vzorků

Označení vzorku	Vzorek	FCM (mg GAE·kg ⁻¹) ± S.D.
V1	Kamut	0,917 ± 0,084
V2	Grünkern	0,867 ± 0,151
V3	Špaldové kernotto	0,847 ± 0,013
V4	Pšenice ozimá	0,812 ± 0,226
V5	Pšenice špalda	0,967 ± 0,190
V6	Mouka (pšenično-žitná 90:10)	0,172 ± 0,091
V7	Mouka (pšenično-žitná 50:50)	0,347 ± 0,367
V8	Mouka (pšenično-žitná 10:90)	0,407 ± 0,120
V9	Rýže natural	2,047 ± 0,395
V10	Rýže parboiled indická	0,512 ± 0,007
V11	Rýže indická	1,502 ± 0,042
V12	Rýže parboiled	0,252 ± 0,106
V13	Rýže kulatozrná	0,197 ± 0,056
V14	Rýže dlouhozrná	0,127 ± 0,042

S.D. – směrodatná odchylka



Obr. 16: Stanovení polyfenolů v jednotlivých druzích vzorků za použití metody FCM

7.2 Stanovení antioxidační aktivity

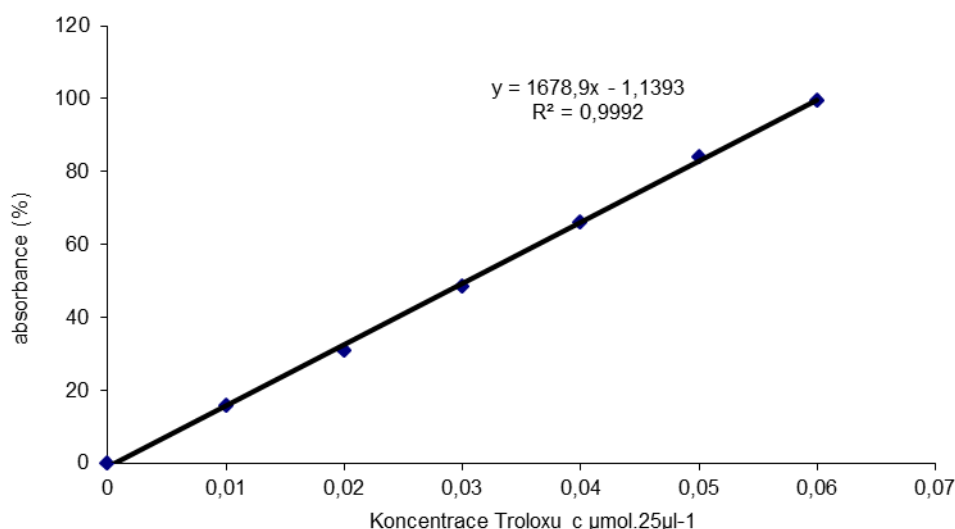
Pro měření byly použity dvě metody a to metoda ABTS a metoda DPPH.

7.2.1 Metoda ABTS

Radikál kation ABTS vznikl reakcí diamonné soli s peroxidisíranem draselným podle výše popsaného postupu (kapitola 6.6). Antioxidační aktivita byla přepočítána jako pokles hodnoty absorbance pomocí vzorce:

$$A(\%) = A_0 - \frac{A_1}{A_0} \cdot 100 \quad (1)$$

kde A_0 je naměřená absorbance pracovního roztoku a A_1 získaná absorbance směsi pracovního roztoku se vzorkem. Zjištěná závislost úbytku absorbance A_0 na koncentraci Troloxu je znázorněna pomocí kalibrační křivky na obr. 17.



Obr. 17: Závislost úbytku absorbance A na koncentraci Troloxu – metoda ABTS

Stejně jako v předchozích metodách bylo proměřeno celkem 14 druhů vzorků. Pomocí rovnice regrese kalibrační křivky, závislosti úbytku absorbance A na koncentraci Troloxu, byl zjištěn úbytek absorbance vzorku, který byl přepočten na ekvivalentní množství Troloxu. Každý vzorek byl měřen 5x a z něj byla vypočtena průměrná hodnota, která byla vztažena na 1 kg vzorku. Výsledné průměrné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4. Grafické zná-

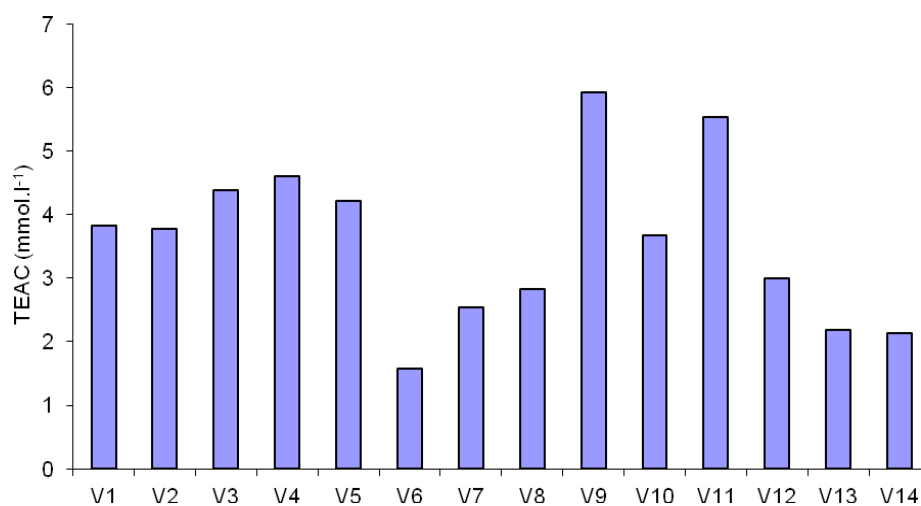
zornění je na obr. 18, z kterého je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazuje vzorek rýže natural (V9) a druhou nejvyšší hodnotu antioxidační aktivity pak rýže indická (V11). Z bílých rýží má nejvyšší hodnotu antioxidační aktivity rýže parboiled (V12), která byla opět vybírána ze směsi rýže parboiled indické. Rýže dlouhozrná (V14) a kulatozrná (V13) vykazují aktivitu přibližně shodnou a jejich hodnota antioxidační aktivity je z analyzovaných vzorků rýže nejnižší.

Ze vzorků obilovin mají přibližně stejnou antioxidační aktivitu vzorky špaldové kernotto (V3), pšenice ozimá (V4) a pšenice špalda (V5). V porovnání s Folin-Ciocalteuho spektrofotometrickou metodou, kde byla hodnota celkového obsahu polyfenolů u špaldového kernotta z obilovin nejnižší, je naopak hodnota antioxidační aktivity za použití metody ABTS vyšší než u kamutu (V1) a Grünkernu (V2). Každá z používaných metod má jiný mechanismus účinku což může způsobit rozdílné výsledky. Dalším z důvodů může být ztráta obsahu fenolických sloučenin obsažených u špaldového kernotta během přípravy vzorku k celkovému stanovení fenolů, působením oxidace ke které mohlo dojít při mletí zrn špaldového kernotta, nebo světelným působením na získaný extrakt.

U vzorku směsi pšenično-žitných mouk byla naměřena opět nejvyšší hodnota antioxidační aktivity u směsi smíchané v poměru 10:90 (V8) a nejnižší u směsi 90:10 (V6).

Tabulka 4: Průměrné hodnoty stanovení antioxidační aktivity za použití metody ABTS

Označení vzorku	Vzorek	TEAC (mmol.l ⁻¹) ± S.D.
V1	Kamut	3,82 ± 0,25
V2	Grünkern	3,78 ± 0,15
V3	Špaldové kernotto	4,21 ± 0,81
V4	Pšenice ozimá	4,6 ± 0,27
V5	Pšenice špalda	4,38 ± 0,34
V6	Mouka (pšenično-žitná 90:10)	1,57 ± 0,25
V7	Mouka (pšenično-žitná 50:50)	2,54 ± 0,35
V8	Mouka (pšenično-žitná 10:90)	2,83 ± 0,37
V9	Rýže natural	5,92 ± 0,42
V10	Rýže parboiledá indická	3,68 ± 0,21
V11	Rýže indická	5,53 ± 0,42
V12	Rýže parboiled	3,0 ± 0,61
V13	Rýže kulatozrná	2,18 ± 0,53
V14	Rýže dlouhozrná	2,14 ± 0,22

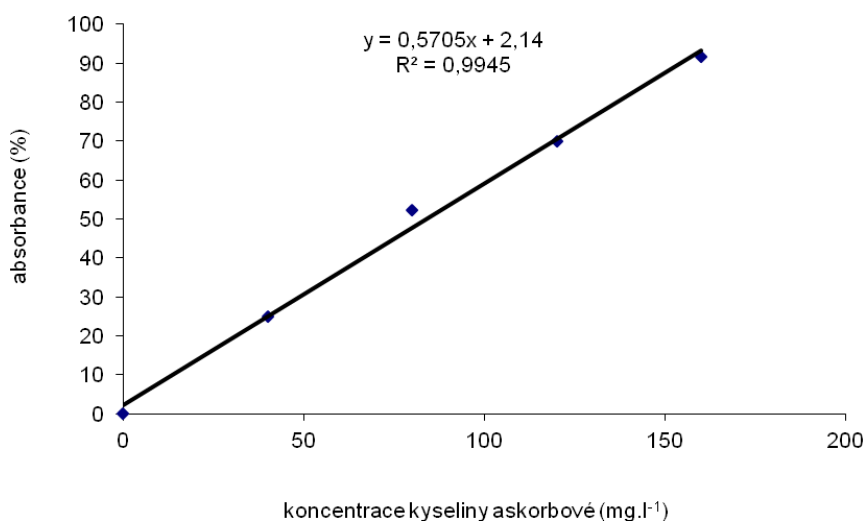


Obr. 18: Antioxidační aktivita testovaných vzorků za použití metody ABTS

7.2.2 Metoda DPPH

Radikál DPPH (1,1-difeny-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) vzniká v roztoku s metanolem. Za přítomnosti antioxidačních látek ve vzorku je tento radikál zhášen díky antioxidantům a dochází k odbarvování původně modrofialového roztoku, jehož absorbance byla měřena spektrofotometricky. Postup přípravy reakčního činidla je uveden v kapitole 6.7

Úbytek hodnoty absorbance byl vypočten podle stejného vzorce jako u metody ABTS. U metody DPPH byla použita jako standard kyselina askorbová, narozdíl od metody ABTS, kde byl použit jako standard trolox. Úbytek absorbance byl, za pomoci rovnice regrese z kalibračního grafu závislosti úbytku absorbance na množství kyseliny askorbové, přepočten na ekvivalentní množství kyseliny askorbové a konečná hodnota byla vztažena na 1 kg vzorku.



Obr. 19: Závislost úbytku absorbance A na koncentraci kyseliny askorbové za použití metody DPPH

Pro celkové stanovení antioxidační aktivity bylo použito stejných 14 druhů vzorku, jako v předchozích měřeních, opět byl každý vzorek proměřen 5x a byla vypočtena směrodatná odchylka měření.

U vzorků obilovin bylo zjištěno, že nejvyšší hodnotu antioxidační aktivity má pšenice špalda (V5). Zhruba stejná hodnota byla naměřena u vzorku kamutu (V1) a pšenice ozimé

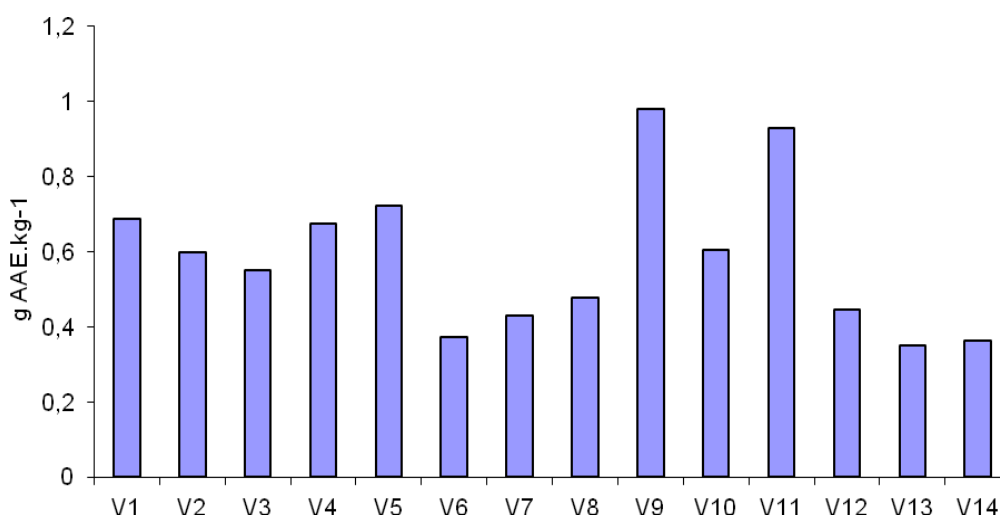
(V4). Po pšenici ozimé a kamutu následuje grünkern (V2), nejmenší hodnota antioxidační aktivity byla naměřena u špaldového kernotta (V3). Naměřené hodnoty antioxidační aktivity u obilovin se od sebe navzájem příliš neliší.

Pšenično-žitné mouky smíchané v poměrech 10:90, 50:50 a 90:10 obsahují látky s antioxidační aktivitou v hodnotách 0,372 – 0,478 g AAE·kg⁻¹. Sestupné seřazení výsledných hodnot antioxidační aktivity směsí mouk je směs pšenično-žitné mouky smíchané v poměru 10:90, 50:50 a 90:10. Vyšší množství antioxidačních látek obsahuje tedy mouka s větším podílem mouky žitné tmavé chlebové než směs mouky s vyšším podílem mouky pšeničné světlé hladké.

Z grafického znázornění na obr. 20 je patrné, že nejvíce se liší hodnotou antioxidační aktivity od ostatních vzorků je rýže natural (V9) a s o něco menší hodnotou rýže indická (V11). Bílé rýže kulatozrná (V13) a dlouhozrná (V14) mají nižší množství antioxidačně aktivních látek než rýže parboiled (V12), což bylo prokázáno ve všech měřeních. Díky obsahu rýže indické ve směsi rýže parboiled indické (V10) se hodnota antioxidační aktivity liší a je vyšší než u ostatních druhů bílé rýže.

Tabulka 5: Průměrné hodnoty stanovení antioxidační aktivity za použití metody DPPH

Označení vzorku	Vzorek	DPPH (g AAE.kg ⁻¹) ± S.D.
V1	Kamut	0,688 ± 0,672
V2	Grünkern	0,598 ± 0,396
V3	Špaldové kernotto	0,550 ± 0,596
V4	Pšenice ozimá	0,674 ± 0,284
V5	Pšenice špalda	0,722 ± 0,461
V6	Mouka (pšenično-žitná 90:10)	0,372 ± 0,788
V7	Mouka (pšenično-žitná 50:50)	0,431 ± 0,253
V8	Mouka (pšenično-žitná 10:90)	0,478 ± 0,296
V9	Rýže natural	0,981 ± 0,411
V10	Rýže parboiled indická	0,605 ± 0,356
V11	Rýže indická	0,930 ± 0,267
V12	Rýže parboiled	0,444 ± 0,363
V13	Rýže kulatozrná	0,349 ± 0,583
V14	Rýže dlouhozrná	0,364 ± 0,567



Obr. 20: Antioxidační aktivita testovaných vzorků za použití metody DPPH

7.2.3 Porovnání metod

Pro celkové stanovení polyfenolů byla použita Folin-Ciocalteuho spektrofotometrická metoda, jejímž principem je reakce látek (nejedná se o fenoly) obsažených v Folin-Ciocalteuho činidle, které reagují se složkami (fenoly) vyskytujícími se v daném vzorku. Absorbance byla měřena spektrofotometricky a z rovnice regrese, která byla sestavena za pomoci kalibrační křivky, byla převedena vypočtená hodnota na ekvivalentní množství kyseliny gallové, která byla u Folin-Ciocalteuho spektrofotometrické metody použita jako standard.

Průměrné hodnoty celkových polyfenolů za použití Folin-Ciocalteuho spektrofotometrické metody se pohybovaly v rozsahu 0,127 – 2,047 g GAE·kg⁻¹ výrobku. Nejvyšší obsah celkových polyfenolů v analyzovaných vzorcích byl naměřen ve skupině vzorků rýže, a to u rýže natural v hodnotě 2,047 g GAE·kg⁻¹. Druhý nejvyšší obsah polyfenolů, který se více lišil od obsahu polyfenolů ostatních vzorků, byl naměřen u rýže indické (plané), a to v množství 1,502 g GAE·kg⁻¹.

U rýže kulatozrné, rýže dlouhozrné a rýže parboiled se množství pohybovalo v rozmezí 0,127 – 0,252 g GAE·kg⁻¹. Jen u rýže parboiled indické bylo množství polyfenolů vyšší 0,512 g GAE·kg⁻¹ díky obsahu indické rýže ve směsi.

Polyfenoly se vyskytují v obalových vrstvách zrn, proto byly u rýže natural, která je při technologickém zpracování pouze částečně broušena, naměřena vyšší antioxidační aktivita než u vzorků bílých rýží, které jsou při zpracování obrušovány a leštěny. Výjimkou je rýže parboiled, která se zpracovává hydrotermickou úpravou zrn, při které se po namáčení neloupané rýže působením vysokotlaké páry dostávají do zrn látky z povrchových vrstev. Proto je hodnota celkového množství polyfenolů u rýže parboiled vyšší než u jiných druhů bílých rýží.

Z analyzovaných vzorků obilovin se pohybovaly průměrné hodnoty v rozsahu 0,812 – 0,967 g GAE·kg⁻¹, kde bylo nejvyšší množství naměřeno u vzorku pšenice špalda a nejnižší u pšenice ozimé. Celkové množství polyfenolů v obilovinách se od sebe příliš nelišilo, stejně jako u směsí pšenično-žitných mouk, kde bylo naměřeno množství v rozmezí 0,349 – 0,444 g GAE·kg⁻¹. Směs mouky pšenično-žitné smíchané v poměru 10:90 vykazovala nejvyšší obsah polyfenolů.

Pro stanovení antioxidační aktivity byly používány dvě metody, a to metoda ABTS a metoda DPPH. U metody ABTS byl použit jako standard trolox, kdy úbytek absorbance vzorku

byl přepočten na ekvivalentní množství troloxu na 1 kg vzorku, ale u metody DPPH byl použit jako standard kyselina askorbová. Tedy úbytek absorbance vzorku se přepočítával na ekvivalentní množství kyseliny askorbové na 1 kg vzorku.

Průměrné hodnoty pro celkové stanovení antioxidační aktivity při použití metody ABTS se pohybovaly v rozsahu 2,14 – 5,92 TEAC ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) výrobku a při použití metody DPPH 0,349 – 0,981 g AAE $\cdot\text{kg}^{-1}$.

U analyzovaných vzorků obilovin za použití metody ABTS nebyly hodnoty příliš odlišné, pohybovaly se v rozmezí 3,78 – 4,6 TEAC ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$). Stejně tak se rozmezí hodnot nelišil ani při použití metody DPPH 0,550 – 0,722 g AAE $\cdot\text{kg}^{-1}$ a metody FCM pro celkové stanovení polyfenolů 0,812 – 0,967 g GAE $\cdot\text{kg}^{-1}$. Při použití metody ABTS byla největší hodnota antioxidační aktivity naměřena u pšenice ozimé 4,6 TEAC ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$), nejnižší hodnota u grünkernu 3,78 TEAC ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$). U metody DPPH byla nejvyšší antioxidační hodnota u vzorku pšenice špaldy 7,22 g AAE $\cdot\text{kg}^{-1}$ a nejnižší u vzorku špaldového kernotta 0,550 g AAE $\cdot\text{kg}^{-1}$. Tato odlišnost v pořadí od nejvýše naměřených hodnot látek s antioxidační aktivitou může být způsobena jinou schopností reakčních činidel reagovat se složkami.

U směsí pšenično-žitných mouk je pořadí hodnot antioxidační aktivity stejná jak u metody ABTS tak i metody DPPH, a to pšenično-žitná mouka smíchaná v poměru 10:90, 50:50, 90:10.

V cereáliích a celozrnných výrobcích je velká část polyfenolů s antioxidační aktivitou vázána na hemicelulózu v obalových vrstvách zrn, proto se používá kromě extrakce analyzovaného vzorku pomocí rozpouštědla i alkalická hydrolyza působením hydroxidu sodného, aby došlo k uvolnění vázaných frakcí fenolických látek s antioxidační aktivitou z hemicelulózy [5].

U ABTS metody byly analyzované vzorky obilovin a rýže extrahovány pomocí rozpouštědla metanolu a poté podstoupil vzorek i alkalickou hydrolyzu [5]. Výsledná hodnota celkové antioxidační aktivity u vzorku pšenice činila 17,8 TEAC ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$), u vzorku žita 23,2 TEAC ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) a u vzorku rýže 18,1 TEAC ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) [5].

V použitých rešerších byl pospán postup extrakce analyzovaných vzorků pomocí použití rozpouštědla metanolu s následnou alkalickou hydrolyzou pro vyextrahování co největšího množství fenolických sloučenin u kterých je v závislosti na schopnosti reagovat s radikálem ABTS^{•+} prokázána antioxidační aktivita. Pomocí alkalické hydrolyzy jsou

uvolňovány frakce fenolických sloučenin, které jsou vázány v polysacharidu hemicelulóza a tím je také ovlivněno výsledné množství fenolů s antioxidační aktivitou než jen při použití extrakce metanolem.

V porovnání se stanovenými výsledky antioxidační aktivity v této diplomové práci, kdy nebyla použita alkalická hydrolyza vybraných vzorků k měření, ale pouze extrakce pomocí rozpouštědla metanolu, byly výsledné hodnoty antioxidační aktivity u pšenice ozimé 4,6 TEAC ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$), u rýže natural 5,92 TEAC ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) Nižší naměřené hodnoty mohou být ovlivněny způsobem extrakce. Dále byla antioxidační aktivita proměřena i u netradičních druhů obilovin (kamutu, špaldového kernotta, grünkernu), směsí mouk pšenično-žitných a rýže indické, rýže bílé (kulatozrné a dlouhozrné), kde byla taktéž zjištěno určité množství fenolických látek s antioxidační aktivitou.

Z výše uvedených výsledků rešerší, je patrné že při použití metody ABTS má vyšší antioxidační aktivitu žito 23,2 TEAC ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) než pšenice 17,8 TEAC ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$). To také odpovídá výsledkům, že směsi mouky pšenično-žitné smíchané v poměru 10:90 mají vyšší hodnotu antioxidační aktivity než směsi mouky smíchané v poměru 50:50 a 90:10.

Ze všech měření byly jednoznačně naměřeny nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity za použití metody ABTS a DPPH, a hodnoty pro celkový obsah polyfenolů pomocí metody FCM u vzorku rýže natural a rýže indické. U metody ABTS pro rýži natural 5,92 TEAC ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) a pro rýži indickou 5,53 TEAC ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$), u metody DPPH pro rýži natural 0,981 g AAE $\cdot\text{kg}^{-1}$ a pro rýži indickou 0,93 g AAE $\cdot\text{kg}^{-1}$ a u metoda FCM pro rýži natural 2,047 GAE $\cdot\text{kg}^{-1}$ a pro rýži indickou 1,502 GAE $\cdot\text{kg}^{-1}$. V dalším pořadí u všech metod byly celkově obiloviny, směsi pšenično-žitných mouk a bílé rýže s výjimkou rýže parboiled indické.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovení antioxidační aktivity a stanovení celkového obsahu fenolických látek, které jsou obsaženy v daných vzorcích cereálií, rýže a směsí pšenično-žitných mouk. V rámci diplomové práce byla pro stanovení antioxidační aktivity použita metoda ABTS a metoda DPPH, pro celkové stanovení polyfenolů byla použita Folin-Ciocalteuho spektrotometrická metoda (FCM). Metody ABTS a DPPH jsou založeny na vzniku syntetických radikálů, které jsou zhášeny pomocí antioxidantů, obsažených ve vzorku. Metoda ABTS poskytuje vyšší hodnoty, protože reaguje s širokým okruhem látek vykazujících antioxidační aktivitu. Celkové stanovení bylo stanovováno spektrofotometricky.

Průměrné hodnoty celkových polyfenolů za použití Folin-Ciocalteuho spektrofotometrické metody se pohybovaly v rozsahu 0,127 – 2,047g GAE·kg⁻¹ výrobku.

V pořadí bylo nejvyšší celkové množství polyfenolů naměřeno u vzorku rýže natural, rýže indická, pšenice špalda, kamut, grünkern, špaldové kernotto, pšenice ozimá, rýže parboiled indická, směs mouky pšenično-žitné v poměru 10:90, směs mouky pšenično-žitné 50:50, rýže parboiled, rýže kulatozrná, směs mouky pšenično-žitné 90:10, rýže dlouhozrná.

Pro stanovení antioxidační aktivity byly používány dvě metody, a to metoda ABTS a metoda DPPH. V obou metodách se používá jiné reakční činidlo, které reaguje s jinak širokým okruhem látek různými mechanismy. Při použití metody ABTS vzniká radikálový kation ABTS^{•+}, který reaguje jak s lipofilními tak i s hydrofilními antioxidanty, DPPH^{•+} radikál reaguje pouze s donory atomu vodíku, a tím se redukuje. DPPH nereaguje s prenylovanými flavonoidy (mají připojený prenylový radikál (3,3-dimethylallyl jako acyklický nebo cyklický řetězec na základní C15 strukturu) a některými dalšími fenolickými látkami a výsledné hodnoty jsou nižší. Proto by měla být metoda ABTS účinnější a měla by dosahovat vyšších hodnot antioxidační aktivity zjištěné u měřených druhů vzorků, než při použití metody DPPH. V porovnání pořadí vzorků s nejvyšší antioxidační aktivitou po nejmenší se od sebe metody liší. Průměrné hodnoty pro stanovení antioxidační aktivity při použití metody ABTS jsou 2,14 – 5,92 TEAC (mmol·kg⁻¹) a při použití metody DPPH 0,349 – 0,981g AAE·kg⁻¹.

Pořadí vzorků při použití metody ABTS je: rýže natural, rýže indická, pšenice ozimá, špaldové kernotto, pšenice špalda, kamut, grünkern, rýže parboiled indická, rýže parboiled,

směs mouky pšenično-žitné v poměru 10:90, směs mouky pšenično-žitné 50:50, rýže kulatozrná, rýže dlouhozrná, směs mouky pšenično-žitné 90:10.

Při použití metody DPPH pak: rýže natural, rýže indická, pšenice ozimá, kamut, pšenice špalda, rýže parboiled indická, grünkern, špaldové kernotto, směs mouky pšenično-žitné v poměru 10:90, rýže parboiled, směs mouky pšenično-žitné 50:50, směs mouky pšenično-žitné 90:10, rýže dlouhozrná, rýže kulatozrná.

V porovnání všech tří metod, Folin-Ciocalteuho spektrofotometrické metody pro celkové stanovení polyfenolů, ABTS metody a DPPH metody používanými pro stanovení celkové antioxidační aktivity je pořadí u vybraných analyzovaných vzorků stejné. U všech tří metod byla naměřena nejvyšší hodnota u rýže natural a rýže indické, dále celkově v obilovinách, směsích pšenično-žitných mouk a nejnižší hodnoty byly naměřeny ve vzorcích bílých rýží s výjimkou rýže parboiled indické, která díky obsahu rýže indické ve směsi dosahovala vyšších obsah polyfenolů v analyzovaném vzorku.

Tyto metody mohou sloužit jako alternativní kritérium biologické hodnoty potraviny, nebo mohou být použity jako srovnávací metody pro určení závislosti různých podmínek při jejich zisku a skladování.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BENDA, V., BABŮREK, I., ŽĎÁRSKÝ, J. *Biologie II, Nauka o potravinářských surovinách*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. 2000. 195 s. [online]. [22.1.2011]. Dostupné z www: <http://biomikro.vscht.cz/trp/documents/baburek/BII.pdf>
- [2] PŘÍHODA, J., SKŘIVAN, P., HRUŠKOVÁ, M.: *Cereální chemie a technologie I. Cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 2003. 157 s. ISBN 80-7080-530-7
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-530-7/pages-pdf/011.html
- [3] HRABĚ, J., ROP, O., HOZA, I. *Technologie výroby potravin rostlinného původu*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2008, ISBN 80-7318-372-2.
- [4] SLAVIN, J., 2003. Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society* 62, 2003,129-134
- [5] SERPEN, A., et al., Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products, *Journal of Cereal Science* 48 (2008) 816–820
- [6] FARDET, A., ROCK, E., RE´ME´SY, CH. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo, *Journal of Cereal Science* 48 (2008), 258-276
- [7] SCALBERT, J., CALBE, A., WILLIAMSON, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *Journal of Nutrition* 130, 2073S-2085S
- [8] ADOM, K.K., LIU, R.H., 2002. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6182-6187
- [9] BERANKOVA, J. *Staronový kamut je velmi výživný*, online 30.12.2010, dostupné z <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=104&ch=1&typ=1&val=89344>
- [10] Dostupné na: <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92219> [on–line, 22.1.2011]
- [11] QUINN R.M. *Kamut®: Ancienit Braun, New cereal*, Perspectives on new crops and new uses, 1999. 182 – 183 [on – line 22.1.2011] Dostupné na: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1999/v4-182.html>
- [12] Dostupné na: <http://www.diabetic-diet-secrets.com/content/view/141/136/> [on – line 22.1.2011]

- [13] Dostupné na: <http://www.probio.cz/vyrobky/obilniny/kamut-a-dvouzrnka> [on – line 22.1.2011]
- [14] Dostupné na: <http://www.ogigia.com/2009/07/16/le-tante-virtu-del-kamut/> [on – line 22.1.2011]
- [15] SUKOVÁ, I. Metodika „Pěstování obilnin a pseudoobilnin v ekologickém zemědělství, [on – line 25.1.2011] dostupné z:
<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=104&ch=1&typ=1&val=86025>
- [16] Dostupné na: <http://www.probio.cz/ARCHIV/vyrobky/psenice-spalda.htm> [on-line, 24.1.2011]
- [17] Dostupné na: <http://www.gruenkern.de/product.htm> [on-line, 24.1.2011]
- [18] Dostupné na: <http://www.probio.cz/vyrobky/obilniny/spalda> [on-line, 24.1.2011]
- [19] Dostupné na: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1017194> [on - line 22.1.2011]
- [20] Dostupné na: <http://www.bio-life.cz/bio-vyrobky/kernotto.html> [on-line, 24.1.2011]
- [21] Dostupné na: <http://vfu-www.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/czech/psenice.htm> [on-line, 28.1.2011]
- [22] Dostupné na: <http://www.probio.cz/vyrobky/obilniny/psenice> [on-line, 28.1.2011]
- [23] DOSTÁLOVÁ, J. Rýže, *Výživa potravin*, 2000, roč. 55, č. 6, str. 91 – 92.
- [24] Dostupné na:
http://www.agronavigator.cz/inf_pult.asp?ids=0&ch=0&zobraz=1&id_dotazu=1629 [on-line, 28.1.2011]
- [25] Dostupné na: <http://www.foodish.eu/ke-stazeni/produktove-foto-volne> [on-line, 28.1.2011]
- [26] Dostupné na: <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92011> [on-line, 28.1.2011]
- [27] Dostupné na: <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92030> [on-line, 28.1.2011]
- [28] Dostupné na: <http://www.solen.cz/pdfs/int/2009/01/06.pdf> [on-line, 28.1.2011]
- [29] PASSWATER, R. A. *O antioxidantech*; Praha: Pragma, 2002, ISBN 80-7205-897-5

- [30] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*, Tábor: OSSIS, 1999, ISBN 80-902391-5-3.
- [31] GALLARDO C., JIMÉNEZ L., GARCÍA-CONESA M. Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions, *Food Chemistry* 99 (2006) 455–463, 2005)
- [32] ŠÍPEK, S. a kol. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha 7: Grada Publishing, spol. s.r.o., 2000, ISBN 80-7169-704-4)
- [33] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ H., TÁBORSKÁ, E., Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*, *Chem. Listy* 98, 174 – 179 (2004)
- [34] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie II*. Zlín: UTB, 2006. ISBN 80-7318-395-1.
- [35] RICE-EVANS, CA., MILLER, NJ., PAGANGA, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids., *Free Radic Biol Med*. 1996;20(7):933-56.
- [36] MOURE A., CRUZ M., FRANCO D., DOMÍNGUEZ M., SINEIRO J., DOMÍNGUEZ H., PARAJÓ C. Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry* 72 (2), 2001, p. 145-171)
- [37] ZLOCH Z., ČEKALOVSKÝ J., AUJEZDSKÁ A. *Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu*, Plzeň, 2004
- [38] DYKES L., ROONEY L. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits, *Cereal foods world*, 2007, CFW-52-3-0105
- [39] LACHMAN J., PIVEC V., ORSÁK M., HOSNEDL V., PROKINOVÁ E., LAPČÍK O. *Polyphenolic compounds - antioxidants influencing biological quality of seed*, [on – line 19.2.2011] dostupné z:
<http://www.agris.cz/vyzkum/detail.php?id=111118&iSub=566&PHPSESSID=a3>)
- [40] TRNA J., TÁBORSKÁ E. *Přírodní polyfenolové antioxidanty*, [on – line 19.2.2011] dostupné z: www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf
- [41] BEGUM, A.N., NICOLLETE, C., MILA, I., LAPIERRE, C., NAGANO, K., FUKUSIMA, K., HEINENON, S.M., ADLERCREUTZ, H., REMESY, C., SCALBERT, A., 2004. Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats. *Journal of Nutrition* 134, 120-127.

- [42] SERPEN A., CAPUANO E., FOGLIANO V. A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2007, p. 7676–7681.
- [43] STRATIL P., ET AL. P. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals, *Talanta* 71 (2007) 1741–1751
- [44] STRATIL P., KUBÁŇ V., FOJTOVÁ J., Comparison of the Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determined by Spectrophotometric Methods, *Czech J. Food Sci.*, 2008, vol.26: 242–253.
- [45] ŠULC M., LACHMAN J., HAMOUZ K., ORSÁK M., DVOŘÁK P., HORÁČKOVÁ V., Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity červených a fialových odrůd brambor, *Chemické Listy* 101, 584–591 (2007)
- [46] Re R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M., RICE-EEVANS C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization Assay, *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237.
- [47] BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M., BERSET C., Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food science technology*, 1995, Pages 25-30
- [48] ROP, O., MLČEK, J., JURIKOVA, T., VALSIKOVA, M., SOCHOR, J., KRAMAROVA, D., Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen, species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(22), pp. 2431-2437

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Absorbance
AAE	Askorbid Acid Equivalent, ekvivalentní množství kyseliny askorbové
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid
AAPM	4-aminoantipyrine method, metoda se 4-aminoantipyrinem
ABAP	2,2'-azobis-2-metyl-propionamidin
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etylbenzotiazoline- 6-sulfonová kyselina)
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazylu
FCM	Folin-Ciocalteu Method, Folin-Ciocalteuho spektrofotometrická metoda
FRAP	Feric Reducing Antioxidant Power, reakce železitých komplexů s antioxidanty pro hodnocení antioxidační kapacity
GAE	Gallic Acid Equivalence, ekvivalentní množství kyseliny gallové
IFAA	International Food Allergy Association, Mezinárodní asociace zaměřená na potravinové alergie
LDL	Low Density Lipoprotein, lipoproteiny o nízké hustotě
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity, schopnost pohlcování volných radikálů
PBM	Price and Butler Method, metoda podle Price a Butlera
RNS	Reactive Nitrogen Species, reaktivní formy dusíku
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktivní formy kyslíku
TAA	Total Antioxidant aktivity, celková antioxidační aktivita
TAC	Total Antioxidant Capacity, celková antioxidační kapacita
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, Antioxidační kapacita vyjádřená v přepočtu na množství standardu troloxu
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-S-triazin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Řez obilkou [3]	13
Obr. 2: Zrna kamutu [13]	Obr. 3: Klas Kamutu [14]..... 15
Obr. 4: Pšenice špalda [16]	Obr. 5: Klas pšenice špaldy [16]..... 16
Obr. 6: Grünkern [18]	Obr. 7: Klas grünkernu [19]..... 17
Obr. 8: Špaldové kernotto [20]	17
Obr. 9: Pšenice ozimá [22]	18
Obr. 10: Rýže natural [25]	20
Obr. 11: Rýže divoká [26]	21
Obr. 12: Rýže kulatozrná [25]	21
Obr. 13: Rýže dlouhozrná [25]	22
Obr. 14: Rýže parboiled [25]	22
Obr. 15: Závislost změny absorbance A na množství kyseliny gallové.....	47
Obr. 16: Stanovení polyfenolů v jednotlivých druzích vzorků za použití metody FCM.....	49
Obr. 17: Závislost úbytku absorbance A na koncentraci Troloxu – metoda ABTS	50
Obr. 18: Antioxidační aktivita testovaných vzorků za použití metody ABTS	52
Obr. 19: Závislost úbytku absorbance A na koncentraci kyseliny askorbové za použití metody DPPH.....	53
Obr. 20: Antioxidační aktivita testovaných vzorků za použití metody DPPH	55

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Volné radikály [32].....	24
Tabulka 2: Testované vzorky.....	43
Tabulka 3: Průměrné hodnoty stanovení celkového obsahu polyfenolů za použití metody FCM u měřených druhů vzorků.....	49
Tabulka 4: Průměrné hodnoty stanovení antioxidační aktivity za použití metody ABTS.....	52
Tabulka 5: Průměrné hodnoty stanovení antioxidační aktivity za použití metody DPPH.....	55

